

## Tesis de Posgrado

# Factores capaces de condicionar la actividad biológica de los anticuerpos IgG : Acción de las enzimas proteolíticas e impacto de la carga eléctrica

Trevani, Analía S.

1996

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](http://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](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Trevani, Analía S.. (1996). Factores capaces de condicionar la actividad biológica de los anticuerpos IgG : Acción de las enzimas proteolíticas e impacto de la carga eléctrica. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2817\\_Trevani.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2817_Trevani.pdf)

Cita tipo Chicago:

Trevani, Analía S.. "Factores capaces de condicionar la actividad biológica de los anticuerpos IgG : Acción de las enzimas proteolíticas e impacto de la carga eléctrica". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1996.

[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2817\\_Trevani.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2817_Trevani.pdf)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

**FACTORES CAPACES DE CONDICIONAR LA ACTIVIDAD  
BIOLOGICA DE LOS ANTICUERPOS IgG**

**Acción de las enzimas proteolíticas e impacto de la carga eléctrica**

**Autor: Analía S. Trevani**

Tesis para optar al título de  
Doctor de la Universidad de Buenos Aires

Director: Dr. Jorge R. Geffner

Sección Inmunología  
Instituto de Investigaciones Hematológicas  
Academia Nacional de Medicina  
Buenos Aires

Año 1996

4j2

UNIVERSITY OF BUENOS AIRES  
COLLEGE OF EXACT AND NATURAL SCIENCES

**FACTORS THAT CONDITION THE BIOLOGICAL ACTIVITY  
OF IgG ANTIBODIES**

**Action of proteolytic enzymes and electric charge impact**

**Author: Analía S. Trevani**

Thesis to obtain the degree of  
PhD from the University of Buenos Aires

Director: Jorge R. Geffner, PhD

Department of Immunology  
Institute of Hematological Research  
National Academy of Medicine  
Buenos Aires

1996

## RESUMEN

En la presente Tesis, se estudió la capacidad de factores propios a los entornos inflamatorios e inherentes a los complejos inmunes (CI), de condicionar distintas respuestas biológicas inducidas a consecuencia de la interacción del fragmento Fc de los anticuerpos IgG con sus receptores celulares específicos (RFcy). Respecto a los primeros se evaluó el efecto de dos enzimas proteolíticas de distinta especificidad, pronasa y quimotripsina. Los resultados obtenidos indicaron que estas proteasas incrementan marcadamente la avidéz y la funcionalidad del RFcyII expresado por neutrófilos, condicionando la magnitud de las respuestas biológicas que involucran la participación de este receptor. Este efecto, sin embargo, parece ser dependiente de las características del CI empleado como estímulo, puesto que las proteasas aumentaron notablemente las respuestas inducidas por eritrocitos sensibilizados con anticuerpos IgG y por CI solubles, pero no modificaron aquellas inducidas por CI precipitantes. La acción potenciadora de las proteasas parece ser selectiva del RFcyII, pues este efecto no fue observado en otros receptores operativos en neutrófilos. Considerando la existencia de altos niveles de proteasas en áreas inflamatorias, es posible que este mecanismo sea relevante *in vivo* en la regulación de la actividad del RFcyII del neutrófilo humano.

En cuanto a los factores inherentes a los CI, se analizó el impacto de la carga eléctrica de los anticuerpos y antígenos que los conforman, sobre su capacidad de inducir respuestas proinflamatorias y trombóticas mediadas por células fagocíticas y plaquetas, respectivamente. La cationización de la fracción IgG de los CI, procedimiento que incrementó sus *pI* desde 5,8-8,2 hasta 8,0-9,5, aumentó, al menos en un orden de magnitud, su capacidad de inducir funciones dependientes de los RFcy expresados por células fagocíticas, tales como la citotoxicidad, la emisión de quimioluminiscencia y la liberación extracelular de elastasa. El efecto potenciador de la cationización fue aún más notable empleando plaquetas. Los CI que incluían anticuerpos IgG cationizados fueron capaces de inducir fuertes respuestas de activación de plaquetas lavadas, filtradas o plaquetas suspendidas en plasma, mientras que aquellos formados con componentes nativos fueron incapaces de inducir la activación plaquetaria bajo condiciones experimentales similares. La cationización del

componente antigénico de los CI, también incrementó marcadamente su potencia biológica. En conjunto, estos hallazgos indican que la carga eléctrica de los CI constituye una propiedad crítica que condiciona su capacidad de inducir la activación celular y sugieren que los anticuerpos y antígenos catiónicos podrían ser relevantes en eventos inflamatorios asociados a enfermedades que cursan con altos niveles de CI circulantes.

Durante el transcurso de estos estudios se realizaron observaciones adicionales relacionadas con el desarrollo de procesos inflamatorios agudos. El paradigma actual asume que la capacidad quimiotáctica de la IgG reside en su habilidad para formar CI e inducir la activación del sistema complemento y la subsecuente producción de péptidos quimiotácticos como el C5a. En la presente Tesis, se observó que los CI son capaces, *per se*, de estimular la quimiotaxis de neutrófilos a través de su interacción con el RFcyII. Esta actividad quimiotáctica intrínseca de los CI podría ser responsable, al menos en parte, del reclutamiento de neutrófilos observado en sitios inflamatorios de huéspedes deficientes de complemento.

## **ABSTRACT**

In the current Thesis it was studied the ability of different factors to condition biological functions induced by the interaction of the Fc fragment of IgG antibodies with their cellular specific receptors (FcγR). Both factors belonging to inflammatory focus and IC-intrinsical factors were evaluated. Among the formers, the effect of two proteolytic enzymes with distinct specificity, pronase and chymotrypsin, was analyzed. The results obtained showed that proteases markedly increase the avidity and functionality of FcγRII, conditioning the magnitude of the biological responses that involve this receptor. However, this effect appears to be dependent on the characteristics of the IC employed as stimulus judging by the capacity of proteases to increase functions induced by erythrocytes coated with IgG antibodies and soluble IC but not those induced by precipitating IC. The enhancing action of proteases seems to be restricted to FcγRII-dependent functions since proteases did not up-regulate the activity of other receptors expressed by neutrophils. Taking into account the high levels of proteases in inflammatory areas, these findings suggest that a mechanism involving the action of proteolytic enzymes could be relevant for the *in vivo* regulation of human neutrophil FcγRII activity.

Among IC-intrinsical factors, the impact of electric charge of the antibodies and antigens on their ability to induce proinflammatory and thrombotic responses mediated by phagocytes and platelets was analyzed. Cationization of the IgG fraction of IC, procedure that increased its *pI* from 5.8-8.2 to 8.0-9.5, enhanced at least by tenfold their ability to induce RFcγ-dependent functions by phagocytic cells such as cytotoxicity, chemiluminescence emission and the elastase extracellular release. Noteworthy, it was observed that IC prepared with cationized antibodies were able to trigger platelet activation either in washed platelets, gel-filtered platelets or plasma suspended platelets. By contrast, IC formed with native components did not induce platelet activation under similar experimental conditions. Additional experiments showed that antigen cationization also markedly increased IC biological activity. These findings suggest that the electric charge of IC constitutes a critical property that conditions their ability to induce cellular activation and support a role of cationic

antibodies and antigens in the development of inflammatory events associated to certain IC-induced diseases.

During the course of these studies, additional observations related to the development of acute inflammatory processes were made. The current paradigm for the mechanism by which IgG induce neutrophil chemotaxis assert that this ability lies on its capacity to form IC and induce complement activation with the subsequent generation of chemotactic peptides such as C5a. In the current Thesis, it was observed that IC are able, *per se*, to induce neutrophil chemotaxis through their interaction with FcγRII. This intrinsic chemotactic activity of IC may account, at least in part, for the neutrophil recruitment that is observed at inflammatory sites in complement-deficient hosts.

*A Juan y a mi mamá*



## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado con el apoyo y colaboración de personas a quienes quiero expresar mi agradecimiento:

En especial a mi Director, el Dr. Jorge Geffner, por el apoyo brindado, por su manera entusiasta de transmitirme sus conocimientos, por el seguimiento constante de mi trabajo, por su dedicación y su confianza. Por su afecto y su profundo sentido del compañerismo.

A Mirta Giordano, por su ayuda continua y por el tiempo dedicado a la revisión de este manuscrito.

A mi compañera Graciela Andonegui, por su colaboración en el trabajo cotidiano, su afecto y su predisposición constante a darme su ayuda.

A Mónica Vermeulen, por brindarme su amistad y su colaboración incondicional. Por escucharme en todos los momentos en que lo necesité.

A Marina Palermo, Graciela Dran y Daniel López, por su ayuda y calidez.

A Martín Isturiz por transmitirme sus conocimientos y por su afecto.

A mis compañeros en general, por hacer del lugar de trabajo un sitio afectuoso y comprensivo.

A Juan, por su ayuda incondicional y constante. Por alentarme a lograr mis objetivos. Por soportar mi *ausencia* durante la escritura de esta Tesis. Por estar siempre a mi lado.

A mi mamá, por su apoyo constante. Por haberme ayudado a no bajar los brazos, a enfrentar la realidad y seguir adelante. Por su dedicación incondicional para que lograra todas las metas que me propuse.

---

## INDICE

1.- INTRODUCCION.....	1
1.1.- Receptores celulares para el fragmento Fc de la IgG.....	2
1.1.1.- Diversidad estructural y distribución celular.....	3
1.1.2.- Subunidades adicionales de los RFcy.....	6
1.1.3.- Interacción de los CI y los RFcy: el entrecruzamiento de los RFcy como evento crítico en la activación celular.....	8
1.2.- Funciones mediadas por RFcy inducidas por complejos inmunes.....	9
1.2.1.- Fagocitosis.....	9
1.2.2.- Mecanismos citotóxicos dependientes del oxígeno.....	10
1.2.3.- Mecanismos citotóxicos independientes del oxígeno.....	15
1.2.4.- Liberación de mediadores lipídicos de inflamación.....	17
1.2.5.- Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA).....	19
1.3.- Papel del los RFcy en la injuria tisular inducida por CI.....	21
1.4.- Promiscuidad en el reconocimiento de ligandos y superposición de funciones en el sistema de RFcy.....	23
2.- OBJETIVOS.....	26
3.- MATERIALES Y METODOS.....	27
3.1.- Reactivos generales.....	27
3.1.1.- Solución de Ficoll-Hypaque.....	27
3.1.2.- Solución de dextrán.....	27
3.1.3.- Tampón fosfato salino (PBS).....	27
3.1.4.- Solución de Hank's.....	27
3.1.5.- Solución Tyrode.....	28
3.1.6.- Solución Tris-EDTA para el lavado de plaquetas.....	28
3.1.7.- Medio de cultivo.....	28
3.1.8.- Solución de Turk para el recuento de células.....	28
3.1.9.- Solución de azul tripán.....	28
3.1.10.- Colorantes para identificación de granulocitos.....	29
3.1.11.- Caracterización citoquímica de las distintas poblaciones leucocitarias humanas.....	29
3.2.- Obtención de leucocitos de sangre periférica humana.....	29
3.2.1.- Células mononucleares periféricas humanas.....	29
3.2.2.- Linfocitos humanos.....	30
3.2.3.- Monocitos humanos.....	30
3.2.4.- Granulocitos polimorfonucleares humanos.....	30
3.2.5.- Plaquetas humanas.....	31

3.3.- Preparación de complejos inmunes.....	32
3.3.1.- Obtención de IgG de conejo anti-IgG humana.....	32
3.3.2.- Obtención de IgG de conejo anti-ovoalbúmina (OA) y anti-SAB.....	32
3.3.3.- Obtención de suero anti-eritrocitos de pollo.....	32
3.3.4.- Antígenos empleados para la preparación de los CI.....	33
3.3.5.- Cationización de antígenos y anticuerpos.....	33
3.3.6.- Obtención de fracciones aniónicas y catiónicas de IgG normal.....	34
3.3.7.- Preparación de CI.....	34
3.3.7.1.- CI preparados con anticuerpos o antígenos cationizados.....	34
3.3.7.2.- Complejos inmunes precipitantes (Cip).....	35
3.3.7.3.- CI solubles preparados con las fracciones aniónicas y catiónicas de la IgG.....	35
3.3.7.4.- Preparación de CI particulados con las fracciones aniónica y catiónica de la IgGc anti-Ep.....	35
3.3.7.5.- Preparación de IgG humana agregada.....	36
3.3.7.6.- Determinación del peso molecular de los CI por ultracentrifugación en gradiente de densidad de sacarosa.....	36
3.4.- Anticuerpos monoclonales.....	36
3.5.- Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos .....	37
3.5.1.- Células blanco .....	37
3.5.2.- Marcación de células blanco con cromato de sodio radioactivo.....	37
3.5.3.- Sensibilización de las células blanco.....	37
3.5.4.- Reacción de CCDA.....	37
3.6.- Citotoxicidad inducida por CI.....	38
3.6.1.- Obtención de células blanco.....	38
3.6.2.- Marcación de células blanco con cromato de sodio radioactivo.....	38
3.6.3.- Reacción de citotoxicidad inducida por CI.....	38
3.7.- Emisión de quimioluminiscencia (QL) por neutrófilos y monocitos.....	39
3.8.- Citometría de flujo .....	39
3.8.1.- Determinación de la unión de CI a la superficie de los neutrófilos.....	39
3.8.2.- Inhibición de la unión de CI a la superficie celular por bloqueo de receptores con AcM.....	39
3.8.3.- Expresión de P-selectina por plaquetas.....	40
3.8.4.- Unión de proteínas cationizadas a la superficie plaquetaria.....	40
3.8.5.- Cambio de forma de neutrófilos.....	40
3.9.- Liberación extracelular de elastasa por neutrófilos estimulados.....	41
3.10.- Quimiotaxis de neutrófilos.....	41
3.11.- Efecto de los AcM anti-RFc $\gamma$ sobre diferentes respuestas de neutrófilos inducidas por CI.....	42

3.12.- Tratamiento de neutrófilos con enzimas.....	42
3.13.- Formación de rosetas EA por neutrófilos.....	42
3.14.- Ensayo de agregación plaquetaria.....	43
3.15.- Liberación de ATP por plaquetas.....	43
3.16.- Liberación de Tromboxano B <sub>2</sub> (TXB <sub>2</sub> ) por plaquetas.....	43
3.17.- Análisis estadístico de los datos.....	43
<b>4.- RESULTADOS</b>	
4.1.- Impacto de las enzimas proteolíticas sobre la actividad del RFcγII en el neutrófilo humano.....	44
4.1.1.- Efecto de las proteasas sobre la expresión de los RFcγ en el neutrófilo.....	45
4.1.2.- Efecto de las proteasas sobre la capacidad de los neutrófilos de unir eritrocitos sensibilizados con IgG (IgG-Ep).....	46
4.1.3.- Efecto de las proteasas sobre la capacidad de los neutrófilos de mediar respuestas inducidas por IgG-Ep.....	47
4.1.4.- Efecto de la neuroaminidasa sobre las respuestas de neutrófilos inducidas por IgG-Ep.....	49
4.1.5.- Efecto de las proteasas sobre la QL mediada por neutrófilos inducida por diferentes tipos de CI.....	51
4.1.6.- Impacto de las proteasas sobre la QL mediada por neutrófilos inducida por diferentes agonistas.....	55
4.2.- Impacto de la carga eléctrica de anticuerpos y antígenos sobre la capacidad de los CI que los contienen de inducir respuestas proinflamatorias y trombóticas.....	56
4.2.1.- Activación de células fagocíticas inducida por CI preparados con anticuerpos cationizados (CIcat).....	57
4.2.1.1.- Respuestas citotóxicas mediados por neutrófilos inducidas por CIcat.....	57
4.2.1.2.- Rol del metabolismo oxidativo en la citotoxicidad mediada por neutrófilos estimulados por CIcat.....	59
4.2.1.3.- Rol del citoesqueleto en la citotoxicidad mediada por neutrófilos inducida por CIcat.....	61
4.2.1.4.- Papel de los diferentes RFcγ en la citotoxicidad mediada por neutrófilos inducida por CIcat.....	62
4.2.1.5.- Unión de CIcat a la superficie del neutrófilo.....	63
4.2.1.6.- Citotoxicidad mediada por monocitos inducida por CIcat.....	65
4.2.1.7.- Respuesta QL mediada por neutrófilos y monocitos inducida por CIcat.....	66
4.2.1.8.- Liberación extracelular de elastasa por neutrófilos estimulados con CIcat.....	68

4.2.2.- Activación de plaquetas humanas inducida por CI preparados con IgG humana cationizada.....	69
4.2.2.1.- Determinación del tamaño molecular de los CI preparados con IgG humana cationizada.....	70
4.2.2.2.- Activación plaquetaria inducida por CIc y CIcat evaluada en plasma rico en plaquetas (PRP).....	71
4.2.2.3.- Activación de plaquetas lavadas (PL) o filtradas en geles (PF) por CIc y CIcat.....	74
4.2.2.4.- Inhibición por polianiones de la agregación plaquetaria inducida por CIcat.....	76
4.2.2.5.- Estimulación de la expresión de P-selectina por CI preparados con IgG cationizada.....	77
4.2.2.6.- Agregación plaquetaria inducida por IgG cationizada.....	78
4.2.2.7.- Rol de RFcyII en la agregación plaquetaria inducida por CIcat.....	79
4.2.3.- Activación de neutrófilos humanos inducida por CI preparados con fracciones aniónicas y catiónicas de anticuerpos de clase IgG nativos.....	80
4.2.4.- Activación de células fagocíticas por CI preparados con antígenos cationizados.....	86
4.2.4.1.- Respuestas mediadas por células fagocíticas estimuladas por CI preparados con antígenos cationizados.....	86
4.2.4.2.- RFcy involucrados en la emisión de QL por neutrófilos inducida por CIcat(Ag).....	88
4.2.4.3.- Activación de plaquetas humanas inducida por CIcat(Ag).....	89
4.3.- Quimiotaxis de neutrófilos humanos inducida por complejos inmunes.....	93
4.3.1.- Migración de neutrófilos humanos inducida por la presencia de un gradiente positivo de concentración de CI.....	94
4.3.2.- Rol de los RFcyII y RFcyIII en la quimiotaxis de neutrófilos inducida por CI.....	96
4.3.3.- Quimiotaxis de neutrófilos inducida por la presencia conjunta de FMLP y CI.....	99
5.- DISCUSION.....	101
5.1.- Modulación de la actividad del RFcyII por acción de proteasas.....	101
5.2.- Impacto de la carga eléctrica de los CI sobre su capacidad de inducir respuestas biológicas mediadas por células fagocíticas y plaquetas humanas.....	105
5.2.1.- Respuestas proinflamatorias mediadas por neutrófilos y monocitos inducidas por CI: Impacto de la carga eléctrica de los anticuerpos IgG.....	105
5.2.2.- Respuestas tromboticas inducidas por CI: Impacto de la carga eléctrica de los anticuerpos IgG.....	112
5.2.3.- Respuestas proinflamatorias mediadas por neutrófilos y monocitos inducidas por CI: Impacto de la carga eléctrica de los antígenos.....	113

5.3.- Capacidad de los CI de inducir per se la quimiotaxis de neutrófilos humanos.....	116
6.- CONCLUSIONES.....	119
7.- REFERENCIAS.....	121
8.- PUBLICACIONES PARCIALES DEL TRABAJO REALIZADO Y REUNIDO EN ESTA TESIS.....	152

## **ABREVIATURAS**

AcM	anticuerpo monoclonal
CCDA	citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos
CI	complejos inmune
Cian	complejo inmune preparado con la fracción aniónica de la IgG nativa
Ciac	complejo inmune preparado con la fracción catiónica de la IgG nativa
Cicat	complejo inmune preparado con anticuerpos IgG cationizados
Cicat(Ag)	complejo inmune preparado con antígenos cationizados
CIp	complejo inmune precipitante
CI <sub>s</sub>	complejo inmune soluble
Ep	eritrocitos de pollo
GFI	glicosilfosfatidilinositol
IEF	isoelectroenfoque
IFN $\gamma$	interferón $\gamma$
Ig	inmunoglobulina
IgG	inmunoglobulina G
IgG <sub>h</sub>	Inmunoglobulina G humana
IRO	intermediarios reactivos del oxígeno
LES	lupus eritematoso sistémico
LT	leucotrieno
MPO	mieloperoxidasa
OA	ovoalbúmina
PAF	factor activador plaquetario
PF	plaquetas filtradas
PG	prostaglandina
pI	punto isoeléctrico
PL	plaquetas lavadas
PRP	plasma rico en plaquetas
QL	quimioluminiscencia

RFc $\gamma$	receptor para el fragmento Fc de la IgG
SAB	seroalbúmina bovina
SOD	superóxido dismutasa
TX	tromboxano



## 1.- INTRODUCCION

Los seres humanos habitan un ambiente poblado de agentes microbianos capaces de causar trastornos patológicos y eventualmente provocar su muerte. A fin de enfrentar a los mismos, los vertebrados han desarrollado un sistema inmunológico altamente eficiente. Este puede mediar dos clases de respuestas: innatas o inespecíficas y adquiridas o específicas, las que funcionando de manera coordinada, posibilitan la eliminación de los agentes infecciosos. Las respuestas específicas son ejecutadas a través de dos sistemas genéricamente denominados *celular* y *humoral*. La inmunidad *celular* comprende respuestas mediadas por linfocitos T, mientras que la *humoral* es desarrollada por acción de anticuerpos producidos a expensas de la activación de linfocitos B. Ambos tipos de respuestas son inducidas a consecuencia de la interacción entre determinantes antigénicos particulares y receptores de alta especificidad, expresados por clones T y B.

La interacción de los anticuerpos con sus antígenos específicos, conduce a la formación de asociaciones macromoleculares denominadas complejos inmunes (CI). Los mismos juegan un papel relevante en la etiopatogénesis de numerosas enfermedades humanas asociadas a la presencia de altos niveles de complejos inmunes circulantes (CIC) y/o depósito tisular de CI, tales como el lupus eritematoso sistémico (LES), la artritis reumatoidea, ciertas glomerulonefritis, vasculitis y una amplia variedad de enfermedades de etiología infecciosa (1). Debe destacarse, sin embargo, el papel de los CI como herramientas cruciales en la fisiología de la respuesta inmune, pues la interacción de anticuerpos y determinantes antigénicos microbianos, es en general incapaz de neutralizar la capacidad infecciosa y/o patogénica de los microorganismos. Son entonces los CI, los que contribuyen críticamente a este objetivo. Ellos presentan la capacidad, a diferencia de los anticuerpos libres, de activar poderosos mecanismos efectores humorales y celulares fundamentales, no sólo en la inmunología antimicrobiana sino también en la respuesta inmune antitumoral. Los mecanismos efectores humorales involucran, principalmente, la activación del sistema complemento, iniciada a través de la interacción del fragmento Fc de las IgG e IgM con el componente C1q (primer componente de la vía clásica de activación) (2,3). Dicha activación conduce, no sólo a la lisis de diferentes tipos de microorganismos y

células tumorales, sino también al reclutamiento local de agentes inflamatorios, a consecuencia de la generación *in situ* de potentes factores quimiotácticos y anafilácticos (2,3). Los mecanismos efectores celulares activados por los CI involucran numerosas respuestas, inducidas como consecuencia de la interacción del fragmento Fc de la IgG con sus receptores específicos (RFcy) (4-6). Ellas incluyen la fagocitosis de células sensibilizadas por anticuerpos, la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA), la liberación de intermediarios reactivos del oxígeno (IRO), la secreción de una gran variedad de enzimas hidrolíticas, la producción de citoquinas como así también la inducción de señales inmunomodulatorias capaces de regular la proliferación linfocitaria y la secreción de anticuerpos (4-6).

### **1.1.- Receptores celulares para el fragmento Fc de la IgG**

Los eventos subsecuentes a la inducción de una respuesta inmune involucran la acción coordinada y altamente regulada de distintos tipos celulares, a través de la activación de receptores expresados en la superficie de los mismos. Estos receptores incluyen a aquellos clasificados dentro de la superfamilia de las inmunoglobulinas (Ig). En la misma se agrupan moléculas derivadas de un precursor génico común y como consecuencia evolutivamente relacionadas y estructuralmente homólogas (7). Todos sus miembros presentan una estructura tridimensional común, caracterizada por la presencia de al menos un dominio tipo-Ig, homólogo a los dominios C o V de las Igs. Los mismos contienen residuos conservados que les permiten asumir una estructura terciaria característica, compuesta de un arreglo en *sandwich* de dos hojas  $\beta$ -plegadas estabilizadas por el establecimiento de un puente disulfuro que determina la formación de un lazo de 55 a 75 aa (7). Las moléculas pertenecientes a la superfamilia de las Igs juegan un papel crítico en el desarrollo de la respuesta inmune. Entre ellas se encuentran las Igs de superficie de linfocitos B, el receptor antigénico de linfocitos T (RCT), los antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I y II, las moléculas CD4, CD8 y CD2, el receptor para PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas), las moléculas de adhesión ICAM-1, ICAM-2 y VCAM-1, como así también los receptores para el fragmento Fc de las diferentes clases de Igs (RFc) (7):

RFc $\gamma$  para IgG; RFc $\epsilon$  para IgE; RFc $\alpha$  para IgA; RFc $\mu$  para IgM y RFc $\delta$  para IgD (8-16).

### 1.1.1.- Diversidad estructural y distribución celular

En humanos, se han descrito hasta el presente tres clases de RFc $\gamma$ : el RFc $\gamma$ I (CD64), el RFc $\gamma$ II (CD32) y el RFc $\gamma$ III (CD16) (8-16).

La característica distintiva del RFc $\gamma$ I es la alta avididad por su ligando ( $K_a = 1-3 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ ). Constituye el único RFc $\gamma$  capaz de unir IgG monomérica (9,10). No obstante, su avididad varía frente a distintas subclases de IgG (IgG 1 > IgG 3 > IgG 4 >> IgG 2). Se han identificado tres genes altamente homólogos, el RFc $\gamma$ IA, IB y IC, que codifican a distintas isoformas de este receptor. Los mismos mapean en el brazo largo del cromosoma 1. Estos genes responden a una organización estructural común a todos los genes de RFc $\gamma$ : (1) dos exones diferentes codifican al péptido *leader*, el segundo de los cuales codifica el sitio de clivaje para la peptidasa y (2) exones individuales codifican a cada dominio tipo-Ig (*Figura 1*) (9). En el caso del RFc $\gamma$ I, los genes poseen además un único exón que codifica a las regiones transmembrana y citoplasmática. La diferencia entre los genes RFc $\gamma$ IA y los IB/IC está localizada en el exón EC3, que codifica al dominio tipo-Ig más cercano a la membrana. En los genes IB y IC, a diferencia del IA, el EC3 codifica codones de terminación. El RFc $\gamma$ IA genera una glicoproteína de 72 kDa, capaz de unir IgG monomérica. Posee una región extracelular de 292 aa con tres dominios tipo-Ig, una región transmembrana de 21 aa y una cola citoplasmática de 61 aa. El RFc $\gamma$ IB da origen a dos transcritos, uno que codifica al RFc $\gamma$ Ib1, que es un receptor soluble, y el otro que origina una forma transmembrana, el RFc $\gamma$ Ib2, carente del tercer dominio tipo-Ig. El RFc $\gamma$ IC codifica una forma soluble, el RFc $\gamma$ Ic (9)(*Figura 2*). Los RFc $\gamma$ I se expresan constitutivamente en monocitos y macrófagos; su expresión es inducida por acción del IFN $\gamma$ , en neutrófilos, células HL-60 y eosinófilos (9,17). En todos los tipos celulares analizados se ha detectado la expresión conjunta de los transcritos RFc $\gamma$ Ia y RFc $\gamma$ Ib2.

El incremento en la expresión del RFc $\gamma$ I durante infecciones Streptocóccicas (18) y durante la profilaxis exitosa con IFN $\gamma$  en pacientes con enfermedad

granulomatosa crónica (9), sugirió que el RFcγI cumple un rol relevante en la resistencia a infecciones bacterianas. Sin embargo, observaciones realizadas por Ceuppens y colaboradores (19,20) en individuos cuyas células fagocíticas no expresan el RFcγI, cuestionaron su importancia biológica. La ausencia del RFcγI no se asoció con una mayor susceptibilidad a infecciones. Los individuos deficientes en el RFcγI presentaron además, niveles normales de CIC y respuestas normales de anticuerpos contra antígenos virales (19,20).

El RFcγII se expresa en diversas poblaciones celulares. A diferencia del RFcγI, presenta muy baja avidéz por la IgG monomérica ( $K_a < 10^7 \text{ M}^{-1}$ ) (9,10,21-23). La unión de la IgG a este receptor sólo puede ser evidenciada empleando IgG complejada o polimérica (9,10). Su especificidad es mayor para las subclases IgG1 e IgG3 que para las IgG2 e IgG4. Los RFcγII constituyen una familia de glicoproteínas de 40 kDa que presentan regiones extracelulares similares de 180 aa conteniendo dos dominio tipo-Ig, una región transmembrana de 27 a 29 aa y dominios citoplasmáticos de longitudes variables (44 a 76 aa) (*Figura 2*) (9). Se han identificado seis isoformas, codificadas por un total de tres genes localizados en el brazo largo del cromosoma 1 (RFcγIIA, IIB y IIC) (*Figura 1*) (5,10). Las principales diferencias entre las isoformas yacen en sus regiones intracitoplasmáticas, cada una codificada por tres exones. Este hecho explica el motivo por el cual los anticuerpos monoclonales (AcM) que reconocen las regiones extracelulares, en general no distinguen entre miembros de la familia. Tres transcritos distintos, RFcγIIb1, b2 y b3, son originados a partir del gen IIB (9). Dos de ellos, b1 y b2, son generados por *splicing* alternativo de los exones citoplasmáticos. Un tercero, b3, es generado por *splicing* alternativo de los exones que codifican a la secuencia señal. Por análisis de *Northern blot* se determinó que los transcritos IIB se expresan en monocitos, macrófagos, linfocitos B y varias líneas celulares pluripotenciales, pero no en neutrófilos, células NK y células T. El gen IIB difiere del IIA sólo en la secuencia señal y en parte del dominio citoplasmático. Mientras que las diferencias entre los genes IIB y IIC radican en el dominio citoplasmático, el rasgo que distingue a los genes IIA y IIC yace en la secuencia señal. El gen IIA da origen a dos transcritos, RFcγIIa1 y RFcγIIa2, como resultado de poliadenilación alternativa. El gen IIC origina sólo un transcrito, el RFcγIIc (9). Los genes IIA y IIC se expresan constitutivamente en monocitos, neutrófilos y algunas

líneas celulares como HL-60 y K562. No se expresan en linfocitos y células NK (9-15). El gen IIA se expresa, además, en plaquetas (25).

La compleja heterogeneidad de los RFcγII adquiere aún mayor relieve al considerar la existencia de dos formas alélicas del RFcγIIa. Ellas difieren en su capacidad de inducir la proliferación de células T activadas por AcM anti-CD3 de clase IgG1 murina; los monocitos del 70% de los dadores Caucásicos normales (altos respondedores: HR), sustentan eficientemente la respuesta mitogénica, mientras que el 30% restante (bajos respondedores, LR) no lo hacen (26). Similares observaciones han sido realizadas al analizar diversas respuestas de monocitos inducidas por IgG1 murina (IgG1m) tales como la producción de TNFα e IL6 y la citotoxicidad contra células blanco sensibilizadas por IgG1m (5). Las diferencias funcionales de las dos formas alélicas del RFcγIIa no sólo se expresan en relación a la IgG1m. Warmerdam y colaboradores (27), han demostrado que este polimorfismo genético condiciona las respuestas a IgG humana. Los fagocitos de individuos homocigotas para el alelo definido originalmente como RFcγIIa<sup>LR</sup>, unen e internalizan eritrocitos opsonizados con IgG2 humana con mayor eficiencia respecto de los homocigotas para el alelo RFcγIIa<sup>IR</sup> (27,28). Considerando que la IgG2 cumple un papel prominente no sólo en las infecciones a bacterias encapsuladas como *Haemophilus influenzae* y *Streptococcus pneumoniae*, sino también en la prevención de sepsis bacterianas (29), se ha propuesto que los individuos con fenotipo RFcγIIa<sup>IR</sup> podrían ser más susceptibles a infecciones bacterianas (9). Esta hipótesis se halla sustentada en dos observaciones adicionales: (1) una frecuencia disminuida de individuos homocigotas para el alelo RFcγIIa<sup>LR</sup> detectada en un grupo de niños con infecciones bacterianas recurrentes y (2) la correlación existente en la población japonesa entre la alta prevalencia del fenotipo RFcγIIa<sup>LR</sup> (85%) y la ausencia de infecciones ocasionadas por *H. influenzae* (30).

El RFcγIII precipita como una banda amplia con pesos moleculares que oscilan entre 50 y 80 kDa debido a una glucosilación extensiva. Exhibe baja afinidad por la IgG monomérica ( $Ka < 10^7 M^{-1}$ ) y al igual que el RFcγII, une IgG en forma polimérica con mayor eficiencia (9,10). Dos genes altamente homólogos, el RFcγIIIA y el RFcγIIIB, codifican a las dos isoformas conocidas, las cuales presentan regiones extracelulares de 190 aa bajo la forma de dos dominios tipo-Ig (*Figuras 1 y 2*)(9,10).

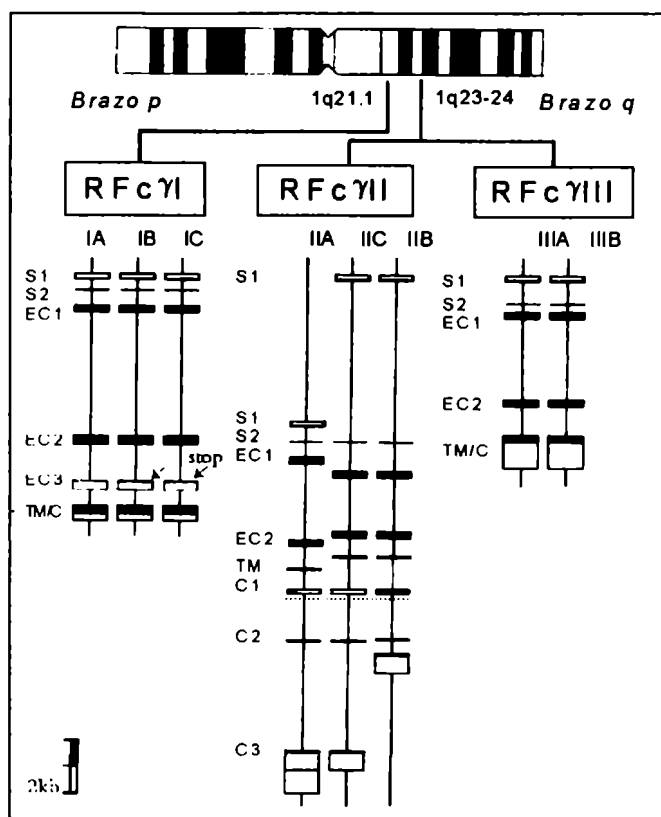
El RFcyIIIA codifica a un receptor transmembrana con una cola citoplasmática de 25 aa, que es expresado por macrófagos, células NK y algunas células T (31,32). El producto del gen RFcyIIIB se halla unido a la cara externa de la membrana plasmática a través de un enlace glicosilfosfatidilinositol (GFI). Se expresa constitutivamente en neutrófilos, siendo inducido en eosinófilos por acción del IFN $\gamma$  (9). La diferencia más importante entre los productos de ambos genes, radica en el aa 203. El RFcyIIIB codifica para una serina en dicha posición, lo que determina el anclaje vía GFI; mientras que una fenilalanina en el RFcyIIIA determina la preservación de las regiones transmembrana e intracitoplasmática (33,34). Debido al tipo de anclaje, el RFcyIIIB puede ser liberado de las células por tratamiento con fosfolipasa C específica de fosfatidilinositol. Se ha demostrado, además, la existencia de dos formas alélicas del RFcyIIIB, las cuales codifican a los aloantígenos NA1 y NA2, definidos tanto por serología como por movilidad electroforética. Los PMN que expresan el alotipo RFcyIIIB<sup>NA1</sup> fagocitan eritrocitos sensibilizados con IgG humana con mayor eficiencia respecto de los que expresan el fenotipo IIIB<sup>NA2</sup> (35). La relevancia fisiológica de esta observación no ha sido aún establecida.

De Haas y colaboradores, por otra parte, han descrito la existencia de individuos cuyos neutrófilos no expresan el RFcyIIIB, como consecuencia de una delección que abarca parte del gen RFcyIIIB y el gen RFcyIIC (36). Esta deficiencia no se asoció con una susceptibilidad incrementada a infecciones bacterianas. La expresión normal del RFcyIIA en estos individuos, sería suficiente para garantizar la capacidad microbicida de sus neutrófilos.

### 1.1.2.- Subunidades adicionales de los RFcy

El RFcyI y el RFcyIIIA, al igual que el RFc $\epsilon$ I, son complejos heteroligoméricos, es decir, se hallan asociados a otras proteínas. Las mismas pueden ser dímeros de cadenas- $\gamma$ , dímeros de cadena  $\zeta$  o heterodímeros  $\gamma$ - $\zeta$ . Ambos tipos de cadenas,  $\gamma$  y  $\zeta$ , fueron identificados originalmente como componentes del receptor antigénico de los linfocitos T. El RFcyIIIA expresado en células NK (37), se halla asociado a homodímeros de cadenas  $\zeta$  o heterodímeros  $\gamma$ - $\zeta$  (38-40). Estas subunidades son esenciales para la expresión del RFcyIIIA en la superficie celular, dado que impiden su

degradación en retículo endoplásmico (41). Por otra parte, parecen cumplir un papel relevante en los mecanismos transduccionales inducidos tanto a través del RFc $\gamma$ IIIa como del RFc $\gamma$ I (8,9). Un nivel aún mayor de complejidad es revelado en estudios realizados en mastocitos, donde se ha descrito la asociación entre la cadena  $\beta$  del RFc $\epsilon$ I y el RFc $\gamma$ IIIa (42).



**Figura 1.** Representación esquemática de los genes que codifican a los distintos RFc $\gamma$  humanos. Los exones están representados por rectángulos y los intrones por líneas sólidas. S: secuencias señal; EC: dominios extracelulares; TM: dominios transmembrana; C: región citoplásmica. Tomado de *Immunology Today* 14: 215, 1993.

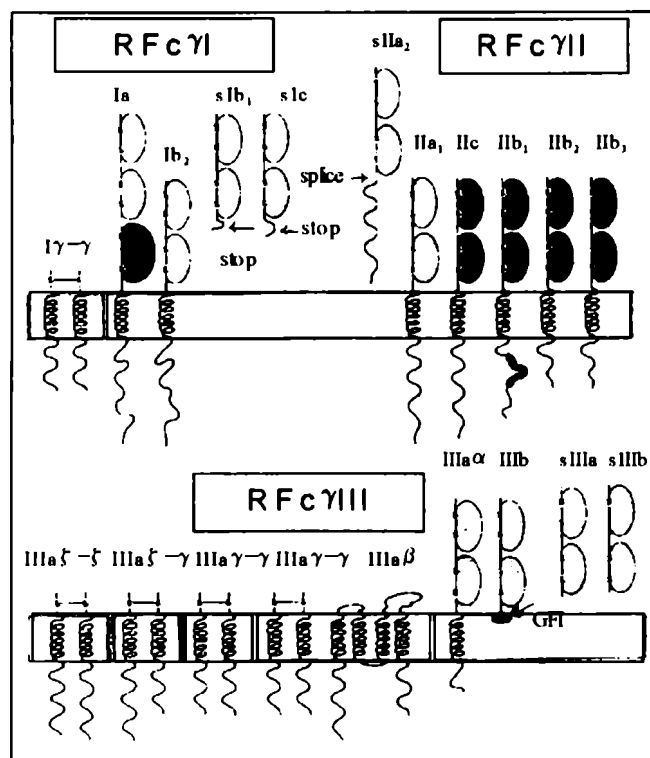


Figura 2. Representación esquemática de la familia de RFc $\gamma$  humanos. Tomado de *Immunology Today* 14: 215, 1993.

1.1.3.- Interacción de los CI y los RFc $\gamma$ : el entrecruzamiento de los RFc $\gamma$  como evento crítico en la activación celular

Los CI presentan un afección hacia los RFc $\gamma$  muy superior a la exhibida por la IgG monomérica. Este hecho resulta de la capacidad del antígeno de actuar como concentrador espacial de los anticuerpos. En el CI, los fragmentos Fc de los mismos son presentados en forma polimérica a los RFc $\gamma$  expresados sobre la superficie celular, permitiendo el establecimiento de interacciones múltiples entre el CI y sus receptores. A consecuencia de ellas, no sólo se incrementa la afección de los fragmentos Fc por los RFc $\gamma$ , sino que también se induce la agregación de los mismos. Este último evento constituye un requerimiento absoluto para la activación de respuestas celulares a través de los RFc $\gamma$  (8). Ello explica la incapacidad que presentan tanto la IgG monomérica como los CI monovalentes, para inducir la activación celular (8,25).



La agregación de los RFcy conduce a la concentración de los complejos ligando-receptor en zonas de alta densidad (*patches*) sobre la membrana celular (43,44). La extensión de este fenómeno depende de diferentes variables tales como la concentración del ligando en la fase fluida, su valencia y afinidad hacia los RFcy y la densidad de los mismos sobre la superficie celular (45). Este proceso tiende a potenciar la asociación entre CI y RFcy, no sólo porque la unión se torna irreversible, sino también por las altas concentraciones que los CI alcanzan en la superficie celular. Estudios de inmunofluorescencia realizados en macrófagos han detectado la presencia de 80 a 250 *patches* sobre la superficie de cada célula (45). Cada *patch*, que cubre un área aproximada de  $6 \mu\text{m}^2$  contendría entre 2000 y 12.000 moléculas de anticuerpo y se encontraría separado de un *patch* vecino por una distancia promedio de  $2,8 \mu\text{m}$  (45). Este proceso de acumulación permite que, partiendo de soluciones de CI a una concentración de  $10^{-8}$  M, la concentración efectiva de CI en sitios discretos sobre la superficie del macrófago alcance valores 1.000 veces superiores (46). Procesos similares de acumulación de CI, han sido descriptos en linfocitos (43). La relevancia de este proceso, tanto en fagocitos como en células linfoides, es notable, puesto que permite que pequeñas cantidades de CI constituyan estímulos eficientes para la inducción de distintas funciones a través de los RFcy.

## **1.2.- Funciones mediadas por RFcy inducidas por complejos inmunes**

### **1.2.1.- Fagocitosis**

Al arribar a un foco inflamatorio, los fagocitos reconocen al microorganismo invasor, se adhieren a él y lo internalizan (47). La eficiencia de este proceso, denominado fagocitosis, depende tanto del linaje de la célula fagocítica y su estado de activación, como de la presencia sobre la superficie del microorganismo, de moléculas que puedan ser reconocidas por receptores expresados por los fagocitos. Estas moléculas pueden clasificarse en dos grupos diferentes según sean propias al microorganismo o se depositen sobre su superficie a consecuencia de la interacción del agente infeccioso con el sistema inmune del huésped. Este segundo grupo de moléculas, que incluyen a la IgG e IgM y a los factores C3b y C3bi, reciben

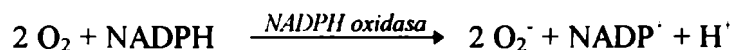
colectivamente el nombre de opsoninas (47). Ellas facilitan el reconocimiento de los microorganismos por los fagocitos, a través de su interacción con los receptores para los componentes C3b y C3bi ( CR1 y CR3, respectivamente) y los receptores para la IgG e IgM (RFc $\gamma$  y RFc $\mu$ , respectivamente). Para la mayoría de las partículas opsonizadas, las interacciones C3bi-CR3 y C3b-CR1 promueven la adhesión del agente invasor al fagocito pero no su ingestión, mientras que la unión IgG-RFc $\gamma$  induce la adhesión y la internalización (48). Dado que ambos tipos de receptores están presentes sobre los fagocitos, estas opsoninas actúan en forma cooperativa, disminuyendo la cantidad de anticuerpos requerida para inducir la ingestión del microorganismo (49). En todos los casos, la unión del microorganismo promueve en el fagocito la polimerización de actina en la zona subyacente al sitio de contacto, lo que conduce a la extensión de pseudópodos que envuelven a la partícula dando origen a una vacuola fagocítica o fagosoma. En forma simultánea a estos eventos, los lisosomas primarios se unen al fagosoma naciente dando origen a un fagolisosoma. Dentro del mismo, el patógeno es sometido a la acción de dos sistemas citotóxicos de distinta naturaleza (47), uno dependiente de oxígeno y otro independiente del mismo.

### 1.2.2.- Mecanismos citotóxicos dependientes del oxígeno

La activación de las células fagocíticas por un estímulo proinflamatorio conduce a la producción de intermediarios reactivos del oxígeno (IRO) (50). Ellos cumplen un papel relevante no sólo en la destrucción de microorganismos invasores, sino también en la generación de lesiones tisulares asociadas a manifestaciones autoinmunes. Los IRO incluyen radicales oxidantes, halógenos oxidados y el oxígeno singlete. Son generados por reducción parcial del oxígeno molecular a través de un proceso denominado *estallido respiratorio* (50). El mismo se caracteriza por un incremento abrupto en el consumo de oxígeno y la activación de la vía metabólica denominada *desviación de las hexosas monofosfato*, generadora de potencial de reducción bajo la forma de NADPH (50-54).

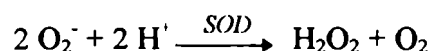
Todos los IRO producidos por los fagocitos derivan, en última instancia, del anión superóxido (O $_2^-$ ) (50). La enzima responsable de su generación es la NADPH

oxidasa, que cataliza la reducción univalente del oxígeno molecular utilizando NADPH como dador de electrones, según la siguiente reacción:



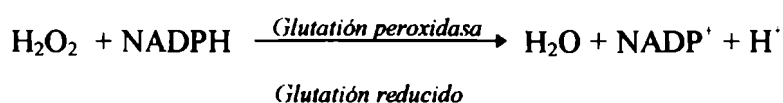
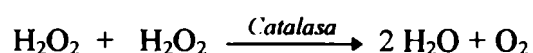
La enzima NADPH oxidasa, inactiva en condiciones basales, consta de un componente asociado a la membrana celular, el citocromo *b<sub>558</sub>* y dos componentes citoplasmáticos, *p67-phox* y *p47-phox*. El citocromo *b<sub>558</sub>* consta de dos subunidades, una de 22 kDa llamada *p22-phox* y otra de 91 kDa, la *gp91-phox*. Esta última presenta sitios de unión para FAD y NADPH. La activación de la NADPH oxidasa involucra la fosforilación de *p47-phox* y su translocación, junto con *p67-phox*, a la membrana plasmática, donde se ensambla con el citocromo *b<sub>558</sub>* y una proteína G monomérica adicional, denominada Rac (53,54). Las mutaciones en cualquiera de los cuatro genes que codifican a los componentes de la NADPH oxidasa dan origen a una patología conocida como Enfermedad Granulomatosa Crónica, caracterizada por la incapacidad de los fagocitos para producir  $\text{O}_2^-$  (55). Ello se asocia a infecciones bacterianas y micóticas recurrentes, las cuales pueden causar la muerte del paciente. El defecto más frecuente se manifiesta en el gen que codifica para *gp91-phox* (incidencia relativa: 56%) (56).

El anión superóxido es capaz de reaccionar con un amplia variedad de sustratos biológicos. No obstante, el mismo no cumpliría, por sí solo, un papel relevante en las respuestas citotóxicas desarrolladas hacia microorganismos y/o células propias del huésped. Esto estaría dado, fundamentalmente, por dos razones: su escaso potencial oxidante (57) y la velocidad y eficiencia con la cual dos moléculas de anión superóxido interactúan para formar peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (58). Esta reacción puede desarrollarse espontáneamente o ser catalizada por la enzima superóxido dismutasa (SOD), según:



La dismutación espontánea ocurre lentamente a pH neutro ( $K=4,5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ seg}^{-1}$ ), pero se acelera a valores de pH ácidos semejantes a los encontrados dentro del

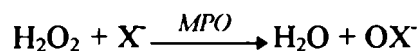
fagolisosoma ( $K=8,5 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ seg}^{-1}$ ) (59,60). Por su parte, la SOD, presente en células eucariotas en dos isoformas, mitocondrial y citoplasmática, cataliza la reacción de dismutación con una  $K=1,9 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ seg}^{-1}$  (61,62). El  $\text{H}_2\text{O}_2$  es un oxidante estable capaz de ejercer efectos tóxicos en distintos sistemas biológicos (63). No obstante, muchos tipos celulares, entre ellos los propios fagocitos y numerosos microorganismos, suelen contener potentes enzimas que detoxifican el  $\text{H}_2\text{O}_2$ , tales como la catalasa y/o la glutatión peroxidasa (64), a través de las siguientes reacciones:



La presencia de tales enzimas, en microorganismos y fagocitos, redundan en una resistencia marcada a los efectos tóxicos del  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

La inhabilidad relativa del  $\text{O}_2^-$  y del  $\text{H}_2\text{O}_2$  de actuar *per se* como agentes citotóxicos, sugiere que son otras las especies que dan cuenta del potencial citotóxico de los fagocitos. Las mismas pueden ser generadas a expensas de reacciones posteriores que involucren al  $\text{O}_2^-$  y al  $\text{H}_2\text{O}_2$ , e incluyen a los hipohalitos ( $\text{XO}^-$ ) y al radical hidroxilo ( $\text{OH}^\cdot$ ) (58).

La producción de hipohalitos involucra la acción de peroxidases, las que pueden ser liberadas al medio extracelular cuando la célula es estimulada. Ellas incluyen a la mieloperoxidasa (MPO), que se encuentra tanto en neutrófilos como en monocitos (constituyendo en los neutrófilos el 5% de su peso seco) (58) y a la peroxidasa de eosinófilos (EPO). Ambas enzimas catalizan la oxidación de haluros ( $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Br}^-$  y/o  $\text{I}^-$ ) por el  $\text{H}_2\text{O}_2$  generando aniones hipohalitos según la siguiente reacción:

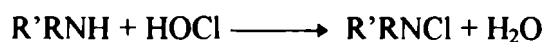


donde  $\text{X}^- = \text{Cl}^-, \text{Br}^-, \text{I}^-$ .

Mientras que la MPO emplea como sustrato fisiológico el  $\text{Cl}^-$ , cuya concentración plasmática es mil veces superior respecto de los otros haluros, la EPO emplea  $\text{Br}^-$ , no pudiendo oxidar el  $\text{Cl}^-$  (65).

Debido a la capacidad oxidante extremadamente alta del hipoclorito, una vez producido interactúa rápidamente con una variedad de moléculas biológicamente relevantes, como ser aminas, aminoácidos, tioles, tioéteres, nucleótidos y hemoproteínas (66). Se calcula que a pH neutro,  $10^6$  neutrófilos generan  $2 \times 10^{-7}$  moles de OCl<sup>-</sup>, suficientes para destruir 150 millones de organismos de *E. coli* en milisegundos (58,66). Los efectos citotóxicos atribuibles al hipoclorito incluyen la oxidación y/o decarboxilación de proteínas de membrana, hecho que conduce al incremento de la permeabilidad celular (67), la oxidación de componentes de la cadena respiratoria bacteriana (67,68) y la peroxidación de membranas (69).

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



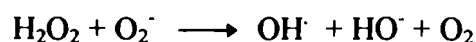
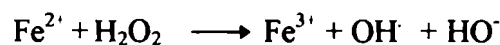
Si bien las cloraminas son menos reactivas que el hipoclorito, sus vidas medias suelen ser más prolongadas. Algunas de ellas pueden ser recuperadas de sobrenadantes de neutrófilos luego de 16 horas de ocurrida la activación celular (58).

A pesar de no estar completamente definido si el hipoclorito o las cloraminas constituyen el mediador final de los efectos tóxicos, la evidencia acumulada sugiere que el hipoclorito, merced a su alta reactividad, ejerce sus efectos tóxicos sobre *blancos* asociados a membrana (58). Este hecho se encuentra sustentado, además, por la naturaleza catiónica de la MPO, propiedad que facilita su adherencia a superficies celulares incrementando la producción local de hipoclorito (65). Por su parte, las cloraminas, especialmente aquellas con características lipofílicas, difunden a través de la membrana plasmática atacando componentes citosólicos (58).

Mientras persista la producción continua de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por los fagocitos (los neutrófilos humanos son capaces de generar peróxido de hidrógeno durante varias horas posteriores a su estimulación -70-), la MPO podrá generar HOCl hasta que el *pool* de blancos susceptibles se haya agotado, luego de lo cual los oxidantes reaccionarán e inactivarán oxidativamente a la propia MPO (66).

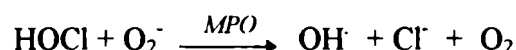
A diferencia de lo que ocurre en neutrófilos, monocitos y eosinófilos, los mecanismos microbicidas operativos en macrófagos no incluyen a los hipohalitos, dado que estas células presentan muy bajos niveles de MPO (65).

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

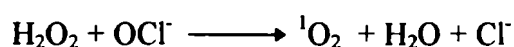


No existe consenso en la literatura en relación al papel del  $OH\cdot$  en los mecanismos citotóxicos mediados por fagocitos. El  $OH\cdot$  es capaz de reaccionar rápidamente con una amplia variedad de enlaces químicos, causando daño en regiones próximas al sitio de producción. Su rol en los mecanismos citotóxicos fue sugerido originalmente basándose en el efecto inhibitorio inducido por catalasa, SOD y agentes *secuestradores* del  $OH\cdot$  tales como manitol y benzoato de sodio. Los experimentos tendientes a determinar, en forma directa, la producción de  $OH\cdot$  por fagocitos han arrojado, sin embargo, resultados controvertidos (65). Por otra parte, es necesario considerar que, en condiciones fisiológicas, la mayor parte del hierro se encuentra unido a la transferrina o a la lactoferrina, de forma que no es accesible para catalizar la reacción de Haber-Weiss (65). No obstante, diversas evidencias sugieren la existencia de fuentes alternativas de hierro para catalizar la reacción. Entre ellas figuran el hierro liberado de la transferrina a causa del bajo pH fagolisosomal (71), los quelatos de hierro producidos por acción de proteasas bacterianas sobre la transferrina y/o lactoferrina (72) y los sideróforos producidos por patógenos microbianos (73). El análisis del papel del  $OH\cdot$  en los mecanismos citotóxicos mediados por los fagocitos, se complica aún más teniendo en cuenta hallazgos recientes indicando que los neutrófilos

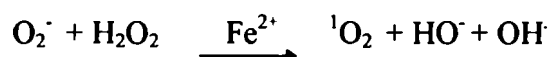
pueden generar OH<sup>·</sup> en ausencia de hierro, merced a la acción de la enzima MPO (65), según:



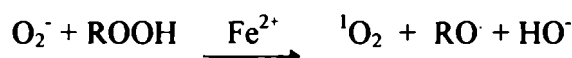
Se ha postulado también que los fagocitos son capaces de producir una especie sumamente agresiva denominada oxígeno singlete (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>). El mismo no constituye por definición un radical libre ya que no presenta electrones desapareados (52). Se han propuesto diversas reacciones para explicar su producción *in vivo*. De acuerdo a Kahn (74), la reacción procedería según:



Para Kellogg y Fridovich (75), su producción involucraría a la reacción de Haber-Weiss según:



también podría producirse según:



Hasta el presente, la evidencia acumulada no es concluyente en relación al papel del <sup>1</sup>O<sub>2</sub> en la actividad citotóxica mediada por fagocitos.

### 1.2.3.- Mecanismos citotóxicos independientes del oxígeno

Los fagocitos contienen, además de su sistema generador de IRO, gránulos citoplasmáticos cargados de agentes antimicrobianos. Los mismos son liberados al fagolisosoma durante la fagocitosis, o al medio extracelular, en el caso de estímulos solubles o estímulos particulados no fagocitables. Estos agentes incluyen enzimas hidrolíticas tales como fosfolipasas, glucosidasas, lisozima, proteasas y péptidos/proteínas capaces de alterar la fisiología de las células *blanco* (47).

Las proteasas de mayor relevancia incluyen a la elastasa, la catepsina G, la colagenasa y la gelatinasa (55,57).

La elastasa es una proteasa de serina que se encuentra en altas concentraciones en los gránulos azurófilos de los neutrófilos. Es activa sobre una amplia variedad de sustratos que incluyen a casi todas las proteínas de la matriz extracelular, proteínas plasmáticas (Igs, componentes del complemento, factores de coagulación) y numerosas proteínas expresadas sobre la superficie de células intactas (76,77). Además de contribuir a la degradación de los microorganismos fagocitados, sería importante para la locomoción de los neutrófilos, dado que al degradar a los componentes de la matriz extracelular facilitaría la penetración de los mismos en los tejidos. Su relevancia fisiopatológica ha sido cuestionada debido a que el plasma contiene altas concentraciones de inhibidores tales como la  $\alpha$ 1-antitripsina, la  $\alpha$ 2-macroglobulina y el inhibidor de la leucoproteínasa secretoria (65). Sin embargo, se ha demostrado que estos tres inhibidores pueden ser inactivados por los IRO producidos por los propios fagocitos. Ello permitiría a la elastasa mediar su actividad proteolítica (77,78).

Las metaloproteasas incluyen a la colagenasa, que degrada al colágeno intersticial tipo I, II y III y a la gelatinasa, que cliva colágenos tipo V, XI y posiblemente, también al tipo IV (79). Son sintetizadas y liberadas como proenzimas, es decir, en forma inactiva. Pese a los esfuerzos realizados, no se han encontrado aún enzimas fisiológicas capaces de activarlas. Sin embargo, se ha demostrado que los propios neutrófilos son capaces de inducir su activación, a través de mecanismos de naturaleza oxidativa, que involucrarían la acción del  $OCl^-$  y/o las cloraminas (80,81). Estos hallazgos han sido confirmados en estudios llevados a cabo con neutrófilos provenientes de pacientes con Enfermedad Granulomatosa Crónica, los que se muestran incapaces de activar a la colagenasa (80).

La catepsina G, constituye en realidad una familia de isozimas catiónicas contenidas en los gránulos azurófilos de los neutrófilos. Son proteasas de serina que presentan una especificidad hidrolítica semejante a la quimotripsina. Su actividad bactericida sería independiente de la funcionalidad enzimática, pues su acción antimicrobiana persiste luego de ser inactivada por calor (82).

Otras proteínas que forman parte del arsenal destructivo de los fagocitos son la lisozima y la lactoferrina. La lisozima es una enzima catiónica presente en altas



concentraciones en los gránulos azurófilos y específicos de los neutrófilos y también en macrófagos (83). Ejerce sus propiedades bacteriolíticas al hidrolizar uniones beta 1-4 glucosídicas de los mucopéptidos de la pared celular bacteriana. Es capaz de ejercer efectos antimicrobianos a través de mecanismos no enzimáticos (83). Por su parte, la lactoferrina media un efecto bacteriostático al fijar y retener hierro, necesario para el metabolismo normal bacteriano (83).

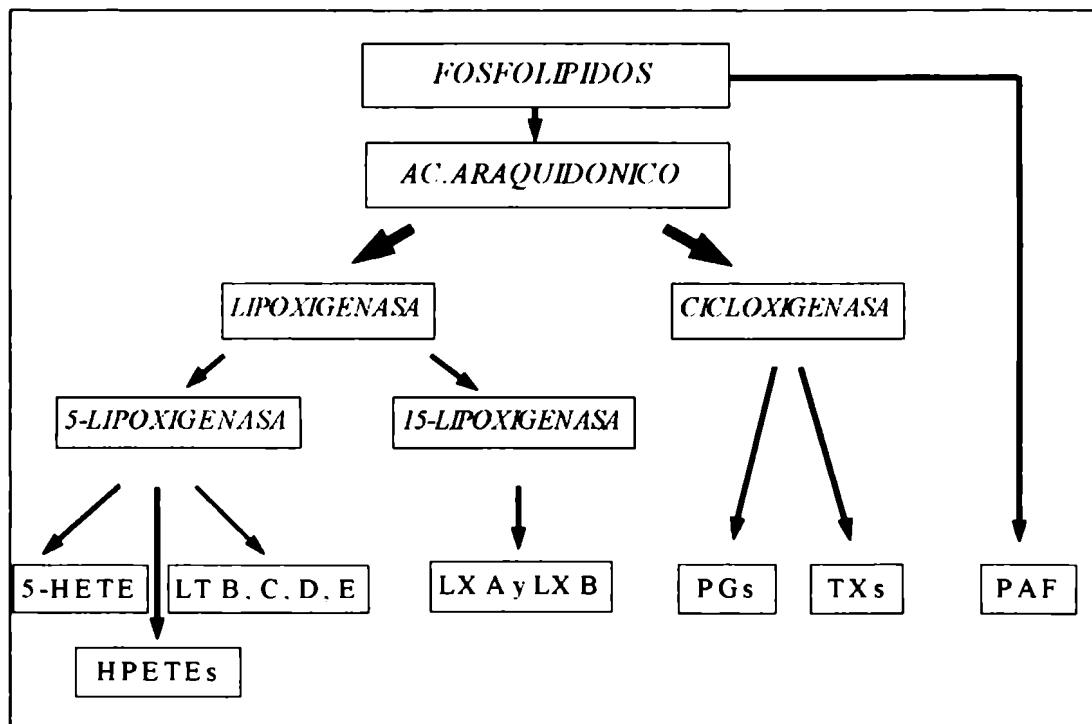
Los fagocitos contienen, además, proteínas tales como la B/PI de neutrófilos (proteína bactericida incrementadora de la permeabilidad) y los péptidos catiónicos 1 y 2 de los macrófagos, capaces de permeabilizar las membranas bacterianas a través de un mecanismo no enzimático (84). Presentan también *defensinas*, péptidos moderadamente catiónicos, muy abundantes en los gránulos azurófilos de los neutrófilos, que actúan induciendo alteraciones en la integridad de las membranas de bacterias, hongos y ciertos virus envueltos (83).

#### 1.2.4.- Liberación de mediadores lipídicos de inflamación

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

La interacción de los CI con los RFcy induce la liberación de ácidos grasos insaturados desde los fosfolípidos que forman parte de la membrana celular (87), por acción directa de la fosfolipasa A<sub>2</sub> o a través de una acción indirecta mediada por la fosfolipasa C (88). Entre ellos, el ácido araquidónico es el más importante y su disponibilidad, en estado libre, constituye el factor limitante en la síntesis de eicosanoides (89). El mismo puede ser metabolizado por la enzima ciclooxigenasa a prostaglandinas (PG) y tromboxanos (TX) o por la enzima lipoxigenasa, a ácidos hidroperóxidos (HPETEs), ácidos hidroxieicosatetraenoicos (HETEs) o leucotrienos (LT), (52,85,86,90) (*Figura 3*). La preponderancia de cada una de estas vías

metabólicas es variable dependiendo, no sólo del tipo celular sino también del estímulo inductor.



**Figura 3.** Biosíntesis de mediadores lipídicos de inflamación

En células fagocíticas se han identificado dos isoformas de la enzima lipoxigenasa, la 5-lipoxigenasa y la 15-lipoxigenasa (85). Uno de los productos de la 5-lipoxigenasa, el LTB<sub>4</sub>, constituiría un mediador endógeno de la activación leucocitaria (91). Se ha demostrado que es un potente inductor de la quimiotaxis (92), quimioquinesis (migración no dirigida) (93), agregación (94) y liberación de enzimas lisosomales (95) por parte de los neutrófilos. El LTB<sub>4</sub> estimula también el movimiento celular de eosinófilos, linfocitos y monocitos (86). Se ha demostrado además, que incrementa la expresión de receptores para C3b en neutrófilos y eosinófilos (95). Otro producto de la 5-lipoxigenasa, el 5-HETE, es un débil estimulador de la actividad leucocitaria (97), sin embargo, es capaz de potenciar sinérgicamente las respuestas de neutrófilos inducidas por PAF y LTB<sub>4</sub> (98,99).

La 15-lipoxigenasa, presente en neutrófilos y monocitos (100), da origen a dos potentes inhibidores de la actividad NK (101) conocidos como lipoxinas A y B (LXA

y LXB). La LXA es capaz, también, de estimular la degranulación y el estallido respiratorio en neutrófilos (100,102).

Por otra parte, en respuesta a una variedad de estímulos específicos, entre ellos los CI, numerosos tipos celulares tales como fagocitos, plaquetas y células endoteliales sintetizan otro poderoso mediador inflamatorio conocido como factor de activación plaquetaria (PAF) (1-O-alkil-2-acetil-*sn*-glicero-3-fosfolina) (103,104). El PAF contribuye a la inflamación causando la degranulación y agregación plaquetaria (103,105,106), estimulando la adherencia, la agregación y la degranulación leucocitaria (107-109), e incrementando la contracción del músculo liso y la permeabilidad vascular (110).

#### 1.2.5.- Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA)

La CCDA constituye un mecanismo citotóxico mediado por diferentes poblaciones efectoras, operativo contra células *blanco* recubiertas por anticuerpos específicos (111). La destrucción de las células *blanco* involucra un proceso no restringido por antígenos de histocompatibilidad, en el cual no participa el sistema complemento. La especificidad de la CCDA esta conferida por los anticuerpos, los que a muy bajas concentraciones (mucho menores que las requeridas para mediar la lisis por complemento en *blancos* susceptibles), inducen la citotoxicidad (111). Pese a que los mecanismos involucrados en la CCDA no han sido elucidados con claridad, en todos los casos, la reacción es activada a través de la interacción de los fragmentos Fc de los anticuerpos que recubren la célula *blanco*, con los RFcy expresados por las células efectoras. Estas últimas incluyen no sólo subpoblaciones linfocitarias sino también a los leucocitos polimorfonucleares, monocitos, macrófagos y plaquetas (111). A pesar de que hasta el presente no se ha podido determinar en forma concluyente la relevancia fisiológica de la CCDA, numerosas evidencias indirectas sugieren que la misma juega un papel importante en la inmunidad antitumoral, antiviral y en el rechazo a órganos transplantados (112-114).

Los linfocitos *killer* (linfocitos K) constituyen una subpoblación linfocitaria, diferente a los linfocitos B y T, capaz de mediar la CCDA con alta eficiencia. Representan, aproximadamente, el 5% de los linfocitos periféricos humanos y son

capaces, además, de mediar una forma distinta de citotoxicidad, la citotoxicidad *natural killer* (NK), efectiva contra diferentes tipos de células *blanco* no recubiertas por anticuerpos (115). La CCDA mediada por linfocitos K puede ser inducida por anticuerpos IgG, pertenecientes a cualquiera de las cuatro subclases descritas en el hombre. Es efectiva contra una amplia variedad de células *blanco* incluyendo células normales, tumorales e infectadas por virus como así también contra bacterias, hongos y parásitos. En contraste con los linfocitos K, las otras poblaciones linfocitarias que expresan RFcy, representadas por el conjunto de linfocitos B y una subpoblación de linfocitos T, no muestran, en general, capacidad para mediar la CCDA (111). Ello indica que la expresión de RFcy por parte de una población celular no le otorga, *per se*, capacidad citotóxica.

Los monocitos, macrófagos y leucocitos polimorfonucleares son capaces de mediar la CCDA, en forma eficiente, contra diferentes tipos de células *blanco* recubiertas por anticuerpos IgG, en forma similar a lo observado para los linfocitos K (111). Su potencialidad citotóxica es regulada por la acción de diferentes citoquinas y/o productos inflamatorios. El IFN $\gamma$  activa, en forma notoria, la CCDA mediada por fagocitos mononucleares y neutrófilos. Este efecto se encuentra asociado a un marcado incremento tanto en la expresión del RFcyI como en el potencial oxidativo celular (181). La interleuquina 1 (IL1) y 4 (IL4) previenen parcialmente el incremento en el número de RFcyI y en consecuencia, la potenciación de la CCDA inducida por el IFN $\gamma$  (111). Otros mediadores inflamatorios tales como el factor de necrosis tumoral (TNF), el factor estimulador de la formación de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) y el C5a, potencian la CCDA mediada por fagocitos (111). Por el contrario, los glucocorticoides y ciertos agentes capaces de incrementar los niveles intracelulares de AMPc, como la prostaglandina E<sub>2</sub>, inhiben la CCDA (111).

El mecanismo citolítico responsable de la destrucción de la células *blanco* en la CCDA no es único. Diferentes mecanismos parecen operar dependiendo del modelo experimental. Se ha demostrado que mientras que la CCDA mediada por linfocitos K involucra procesos no oxidativos, la mediada por monocitos muestra un patrón diferente dependiendo de la célula *blanco*. Aquella ejercida contra eritrocitos es dependiente de la generación de IRO, por el contrario, la mediada contra *blancos* linfoblastoides no los involucra (116). Observaciones similares fueron realizadas en

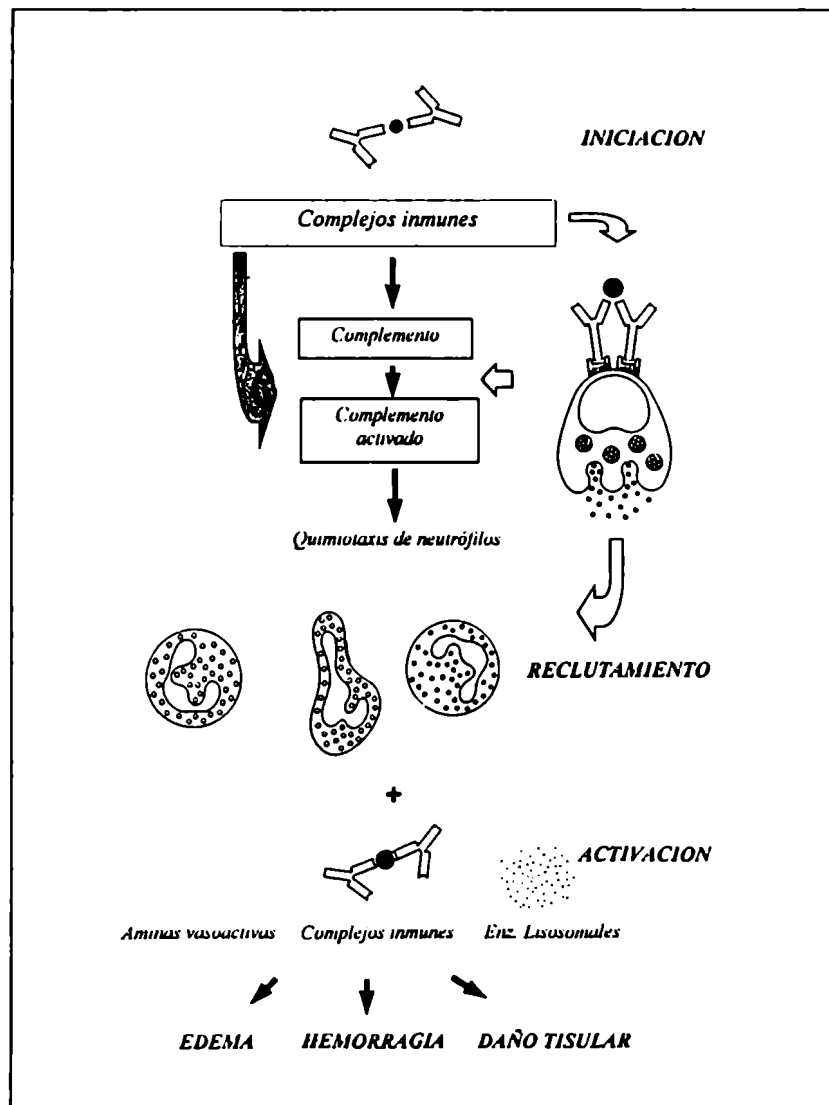
neutrófilos. La CCDA ejercida contra células tumorales ha demostrado ser dependiente (117) e independiente de la producción de IRO (118).

### 1.3.- Papel del los RFcy en la injuria tisular inducida por CI

Los CI formados con anticuerpos IgG juegan un papel relevante en diversas patologías autoinmunes tales como el LES, la artritis reumatoidea, ciertas glomerulonefritis, vasculitis y diferentes enfermedades de naturaleza infecciosa (119-122). El mecanismo patógeno inducido por los CI involucra, en todos los casos, el desencadenamiento de una reacción inflamatoria de tipo III (123) (*Figura 4*). La misma involucra tres componentes críticos: los CI, el complemento y los fagocitos. La ausencia de cualquiera de estos tres componentes resulta en una marcada atenuación de la respuesta inflamatoria. Las cepas de ratones neutropénicos o deficientes de complemento presentan una reacción de Arthus (utilizada como modelo de reacción inflamatoria de tipo III) significativamente disminuida (8). A partir de observaciones realizadas *in vitro* (124), se propuso un modelo que explica la inducción de esta reacción inflamatoria. El mismo adjudica un papel fundamental al complemento, tanto en la fase inicial como en la fase de amplificación de la respuesta inflamatoria. Según este modelo, los componentes C3a y C5a, generados a consecuencia de la activación del sistema complemento por los CI, provocan la degranulación de mastocitos con la consecuente liberación de aminas vasoactivas que incrementan la permeabilidad vascular. La actividad quimiotáctica del C5a, contribuye además, al flujo de células fagocíticas al sitio donde los CI se hallan depositados (8). Allí, los fagocitos son activados, tanto por la acción de factores derivados del complemento como por la interacción directa de los CI con los RFcy, produciéndose la liberación de potentes mediadores inflamatorios. De acuerdo a este modelo, los RFcy no estarían involucrados en la iniciación del proceso inflamatorio, es decir, en la infiltración fagocítica (8).

Este modelo fue reexaminado empleando ratones que no expresan el RFcyI, el RFcyIII ni el FcεRI (receptor de alta afinidad para la IgE), debido a un defecto genético que les impide sintetizar la cadena γ (125). Al intentar reproducir la reacción de Arthus, se observó que el depósito tisular de CI no indujo una reacción inflamatoria

significativa. Tanto el edema como la hemorragia y la infiltración de neutrófilos fueron mínimos comparados con lo observado en ratones controles o deficientes sólo de FcεRI (126). La ausencia de neutrófilos es particularmente relevante. Sugiere que los RFcy juegan un papel crítico en la fase inicial de la cascada inflamatoria, es decir, en el reclutamiento (quimiotaxis) de los fagocitos (8,126). Experiencias complementarias, desarrolladas en ratones deficientes de mastocitos, sugieren que la activación de sus RFcy es responsable, al menos en parte, de la infiltración inflamatoria (127). La posible participación de los RFcy expresados por otros tipos celulares, en la iniciación de los procesos inflamatorios, no ha sido aún definida.



**Figura 4.** Modelos de iniciación de la reacción inflamatoria de tipo III.

La flecha llena corresponde al modelo clásico. Las flechas vacías indican el modelo propuesto por Ravetch (8), que involucraría la participación de mastocitos.

#### 1.4.- Promiscuidad en el reconocimiento de ligandos y superposición de funciones en el sistema de RFcy

A diferencia de los linfocitos B y las plaquetas, que presentan un solo tipo de RFcy (el RFcyII), los monocitos, macrófagos y leucocitos polimorfonucleares presentan, tal como se ha mencionado previamente, diferentes tipos de RFcy (8-10,25). Los fagocitos mononucleares expresan el RFcyI, el RFcyII y el RFcyIII. Los neutrófilos, expresan el RFcyII y el RFcyIII y luego de su estimulación con IFN $\gamma$  o GM-CSF, adquieren la capacidad de expresar el RFcyI. Numerosos trabajos han analizado la contribución de cada uno de los RFcy a las respuestas biológicas mediadas por fagocitos. Sin embargo, tanto la coexistencia de distintos RFcy sobre un mismo tipo celular, como la heterogeneidad de los ligandos capaces de ser reconocidos por cada uno de ellos, han constituido un obstáculo importante a fin de determinar el papel de los distintos RFcy en las respuestas inducidas por diferentes tipos de CI.

A diferencia de otros modelos ligando-receptor, pertenecientes tanto al sistema inmune como a los sistemas nervioso y endócrino, los ligandos naturales de los RFcy presentan un alto grado de heterogeneidad (119). La misma está dada por diferencias, no sólo en las subclases de IgG que integran el CI, sino también por variaciones en la afinidad de los anticuerpos, la naturaleza del antígeno (soluble o particulado), la densidad de epitopes antigénicos y la relación molar antígeno/anticuerpo. Estas características condicionan, no sólo las funciones que un CI es capaz de activar, sino también el/los tipos de RFcy involucrados en su inducción (119).

Estudios desarrollados por Zhang y colaboradores (128), empleando CI preparados con diferentes subclases de IgG, mostraron que aquellos formados con IgG1, IgG2 e IgG4, pero no con IgG3, eran capaces de inducir la activación del estallido respiratorio de neutrófilos. Por el contrario, los CI preparados con IgG3 fueron los que presentaron mayor capacidad para estimular la liberación de enzimas lisosomales. La capacidad de inducir el estallido respiratorio de los CI preparados con IgG1, IgG2 e IgG4, fue dependiente de la relación molar antígeno/anticuerpo. Aquellos preparados en exceso de anticuerpo mostraron mayor actividad respecto de los preparados en equivalencia. Los formados en exceso de antígeno, fueron los que presentaron menor actividad relativa. Los mismos autores demostraron, por último,

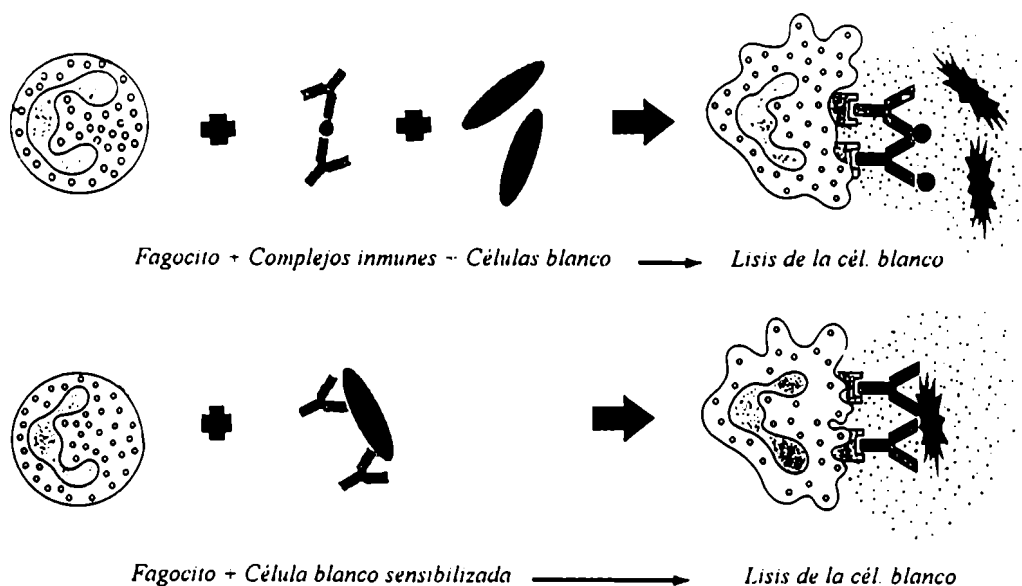
que la densidad de epitopes expresados por el antígeno condiciona, críticamente, la capacidad de los CI de inducir tanto el estallido respiratorio como la degranulación de los neutrófilos (128).

Estudios desarrollados por Crockett-Torabi y Fantone (129) en neutrófilos, han demostrado que los CI precipitantes inducen la producción de  $O_2^-$  a través del RFcyIII, mientras que los CI solubles lo hacen involucrando tanto al RFcyII como al RFcyIII. Estos resultados ponen de manifiesto, no sólo que las características del CI condiciona el tipo de RFcy involucrado en la activación celular, sino también la capacidad de diferentes RFcy de mediar una misma respuesta biológica. Son numerosos los trabajos que han ilustrado este aspecto. Tanto el RFcyII como el RFcyIII muestran capacidad de mediar la activación del estallido respiratorio y la liberación de enzimas lisosomales por neutrófilos humanos (5,11,130). Hallazgos similares se realizaron al analizar otras respuestas funcionales como la fagocitosis de células sensibilizadas por anticuerpos (131) o la CCDA mediada por monocitos y neutrófilos contra líneas celulares de hibridoma expresando en su superficie AcM específicos para cada uno de los RFcy (132). Tanto el RFcyI, como el RFcyII y el RFcyIIIa fueron capaces de mediar la lisis de las células blanco.

Estudios realizados en nuestro laboratorio empleando fagocitos, han demostrado que la forma particular en la que un CI presenta los anticuerpos a los RFcy, condiciona la naturaleza de las respuestas citotóxicas que ellos inducen. Trabajos desarrollados en los años 1986/1988 demostraron que la estimulación de células fagocíticas por CI, conduce a la destrucción de células *blanco* no sensibilizadas por anticuerpos (citotoxicidad inespecífica-CIN) (133-136). A diferencia de la CCDA, donde el anticuerpo IgG inductor se encuentra recubriendo a la célula *blanco*, en la CIN, los anticuerpos IgG no interactúan con ella (*Figura 5*). Ambos mecanismos citotóxicos difirieron marcadamente en los siguientes aspectos: (1) los mecanismos efectores citolíticos, (2) la naturaleza de las vías transduccionales involucradas en su inducción, (3) su susceptibilidad a ser modulados por acción del IFN $\gamma$  y (4) los tipos de RFcy que participan en su inducción. Estas diferencias no pudieron ser atribuidas a propiedades particulares de los anticuerpos IgG, dado que todas las subclases de IgG humana fueron capaces de inducir ambos mecanismos citotóxicos (137). Más aún, tanto la CCDA como la CIN pudieron ser inducidas por un mismo anticuerpo



monoclonal de origen murino. La primera, al presentarse el anticuerpo sobre la superficie de los eritrocitos empleados como *blancos* de la reacción. La segunda, al presentarse el anticuerpo bajo la forma de CI precipitante.



**Figura 5.** Representación esquemática de la CIN y la CCDA

La identificación de aquellos factores capaces de condicionar la actividad de los CI, constituye un requerimiento indispensable a fin de comprender, no sólo la etiopatogénesis de numerosas enfermedades autoinmunes, sino también los mecanismos a través de los cuales los anticuerpos participan en la inmunidad antimicrobiana y antitumoral. La presente Tesis, intenta contribuir a este objetivo mediante el desarrollo de dos líneas de investigación. La primera, referida al efecto de ciertas proteasas sobre la funcionalidad de los RFcy expresados por el neutrófilo humano. La segunda, concerniente al impacto de la carga eléctrica de los CI sobre su capacidad de inducir respuestas inflamatorias y/o trombóticas a través de los RFcy expresados en fagocitos y plaquetas. Se desarrolla, además, una tercera línea de investigación que analiza la capacidad de los CI de actuar, *per se*, como estímulos quimiotácticos, a través de la activación de los RFcy expresados por el neutrófilo.

## 2.- OBJETIVOS

La presente Tesis involucra dos objetivos relacionados. El primero de ellos concierne al análisis de los factores capaces de condicionar la actividad biológica de los CI. Con este fin se han desarrollado dos líneas de investigación que han centrado su atención en (1) el efecto ejercido por ciertas enzimas proteolíticas sobre la funcionalidad de los RFcy expresados por neutrófilos humanos y (2) el impacto de la carga eléctrica de anticuerpos y antígenos sobre la capacidad de los CI que ellos integran, de inducir respuestas inflamatorias y trombóticas mediadas por células fagocíticas y plaquetas, respectivamente. El segundo objetivo contempla el análisis de la capacidad de los CI de inducir, *per se*, respuestas quimiotácticas mediadas por neutrófilos humanos.

### **3.- MATERIALES Y METODOS**

#### **3.1.- Reactivos generales:**

##### **3.1.1.-Solución de Ficoll-Hypaque**

Las células mononucleares periféricas humanas (CMPH) y los leucocitos polimorfonucleares (PMN) fueron purificados mediante el empleo de una solución de Ficoll-Hypaque preparada según el método descrito por Boyum (138). A 2,4 volúmenes de Ficoll 400 (Pharmacia, Uppsala, Suecia) al 9% en agua destilada, se le agregó un volumen de Hypaque al 34% (Gobby-Novag, Argentina), siendo la densidad final de la solución a 4°C de 1,077 g/l.

##### **3.1.2.- Solución de dextrán**

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

##### **3.1.3.- Tampón fosfato salino (PBS)**

La solución fue preparada con NaCl 0,138M, KCl 0,027M, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,078M y KHPO<sub>4</sub> 0,015M; pH=7,4.

En algunos ensayos, las células fueron resuspendidas en PBS suplementado con 0,1% de seroalbúmina bovina (SAB), CaCl<sub>2</sub> 1mM y MgCl<sub>2</sub> 1mM (PBSSup). En los ensayos de quimiotaxis, se empleó PBS suplementado sólo con 0,1% de SAB.

##### **3.1.4.- Solución de Hank's**

En los ensayos de quimioluminiscencia, las células fueron resuspendidas en solución de Hank's sin MgCl<sub>2</sub> y sin rojo fenol (Sigma, St. Louis, MO).

### 3.1.5.- Solución Tyrode

Las plaquetas fueron resuspendidas en solución Tyrode conteniendo NaCl 0.137M, KCl 0.0027M, NaHCO<sub>3</sub> 0.0119M, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.0042M, MgCl<sub>2</sub> 0.001M, CaCl<sub>2</sub> 0.001M , glucosa 0.1% y SAB 3.5%, en agua destilada, pH=7,4.

### 3.1.6.- Solución Tris-EDTA para el lavado de plaquetas

La solución fue preparada con Tris 0.015M, NaCl 0.145M, EDTA 0.002M, glucosa 0.1% y SAB 0.005%, pH=6.5.

### 3.1.7.- Medio de cultivo

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

### 3.1.8.- Solución de Turk para el recuento de células

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

### 3.1.9.- Solución de azul tripán

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

### 3.1.10.- Colorantes para identificación de granulocitos

El porcentaje de neutrófilos presente en las suspensiones de granulocitos, se determinó a través del recuento diferencial en extendidos coloreados con May-Grunwald-Giemsa. En los experimentos de quimiotaxis, los neutrófilos fueron teñidos con la coloración comercial Diff-Quick (Dade Diagnostics, Inc., Aguada, PR).

### 3.1.11.- Caracterización citoquímica de las distintas poblaciones leucocitarias humanas

Los porcentajes de linfocitos, monocitos y PMN presentes en las suspensiones celulares, fueron determinados empleando los colorantes específicos para naftol AS-D cloroacetato estearasa (CAE) y  $\alpha$ -naftil-acetato estearasa (ANAE), que permiten la caracterización de las distintas poblaciones leucocitarias (139). Para ello se fijaron extendidos celulares con una solución tamponada compuesta de citrato, acetona y metanol, durante 2 minutos a temperatura ambiente. Luego, fueron lavados con agua destilada e incubados con  $\alpha$ -naftil-acetato o con naftol AS-D cloroacetato (Sigma, St. Louis, USA) en presencia de una sal estable de diazonio (Fast Blue RR y Fast Corinth V, respectivamente) (Sigma, St. Louis, USA). Posteriormente, fueron lavados, secados y examinados microscópicamente. La actividad de ANAE, que caracteriza a la población de monocitos, se evidenció por la presencia de gránulos citoplasmáticos negros, mientras que la actividad de CAE, característica de la serie granulocítica, se determinó por la presencia de granulaciones rojas.

### 3.2.- Obtención de leucocitos de sangre periférica humana

#### 3.2.1.- Células mononucleares periféricas humanas

Las CMPH fueron obtenidas a partir de sangre de donadores normales (Sección Hemoterapia-IIHEMA-Academia Nacional de Medicina) recogida sobre heparina o sobre citrato de sodio. La sangre fue diluida al medio con solución fisiológica y sembrada sobre una solución de Ficoll-Hypaque formando un sistema bifásico que fue centrifugado a 500 x g durante 30 minutos a 4°C (138). La interfase conteniendo las CMPH fue lavada 3 veces

con medio de cultivo. Las células fueron contadas y luego de determinada la viabilidad, fueron resuspendidas en el medio adecuado según el experimento a desarrollar. En todos los casos, la viabilidad fue superior al 98% y el grado de contaminación con PMN fue menor al 5%.

### 3.2.2.- Linfocitos humanos

Las CMPH fueron cosechadas según el procedimiento descrito previamente (3.2.1) y resuspendidas en medio de cultivo suplementado con 5% de SFB a una concentración de  $2,5 \times 10^7$ /ml. Posteriormente fueron incubadas durante 2 horas a 37°C, en placas de Petri (pretratadas con medio de cultivo suplementado con 5% de SFB) bajo una atmósfera constituida por 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de aire húmedo. Las células no adherentes, recuperadas mediante lavado con medio de cultivo, contuvieron más de 95% de linfocitos.

### 3.2.3.- Monocitos humanos

En los experimentos que requirieron monocitos en suspensión, se siguió el procedimiento descrito en 3.2.2. Luego de retirados los linfocitos, las células adherentes fueron removidas con un *rubber policeman* y resuspendidas a la concentración deseada. Las suspensiones contuvieron 90-95% de monocitos.

En los ensayos de citotoxicidad se emplearon monocitos adheridos a policubetas de plástico de 96 pozos, pretratadas con medio de cultivo suplementado con 10% de SFB. Para ello, alícuotas de 0,15 ml de una suspensión de CMPH ( $5 \times 10^6$  cél/ml) fueron incubadas durante 2 horas a 37°C bajo una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de aire húmedo. Las células no adherentes fueron luego removidas por lavados sucesivos con medio de cultivo. Las células adheridas contuvieron más de 90% de monocitos.

### 3.2.4.- Granulocitos polimorfomucleares humanos

El sedimento de eritrocitos y granulocitos obtenido según 3.2.1 fue diluido al medio con solución fisiológica. Luego se agregó dextrán al 6%, en una proporción de tres volúmenes de suspensión celular a un volumen de dextrán al 6%. Se dejó sedimentar 30

minutos a temperatura ambiente, se retiró el sobrenadante rico en granulocitos y se lavó con solución fisiológica. Los eritrocitos contaminantes fueron eliminados por shock osmótico con agua destilada durante 30 segundos a 4°C y restitución inmediata de la isotonicidad. Las preparaciones contuvieron más de 95% de granulocitos, de los cuales el 95-98% fueron neutrófilos.

Los neutrófilos a ser empleados en los ensayos de quimiotaxis, fueron purificados a través de un esquema similar, realizado a 4°C, con el objeto de minimizar la activación celular.

### 3.2.5.- Plaquetas humanas

Las plaquetas fueron obtenidas a partir de sangre citratada de donadores normales (Sección Hemoterapia-IIHEMA-Academia Nacional de Medicina) quienes no habían tomado ninguna medicación desde al menos los 10 días previos a la extracción de la muestra. El plasma rico en plaquetas (PRP) fue recogido luego de la centrifugación de la sangre a 180 x g por 10 minutos. Luego de la remoción del PRP, el plasma pobre en plaquetas (PPP) se obtuvo por centrifugación de la sangre remanente a 1500 x g durante 20 minutos. El PRP fue ajustado a la concentración deseada por adición de PPP autólogo.

El PRP fue centrifugado 15 minutos a 1500 x g en presencia de EDTA 5mM y el sedimento rico en plaquetas fue lavado dos veces (1500 x g por 15 minutos) con Tris-EDTA. Finalmente las plaquetas lavadas (PL) fueron resuspendidas a la concentración deseada en solución Tyrode.

Las plaquetas filtradas (PF) fueron preparadas a partir del PRP por filtración en Sepharosa 2B (Pharmacia, Uppsala, Suecia) en presencia de PgE1 (1µM), siguiendo un protocolo descrito previamente (140). Luego de la filtración, la concentración fue ajustada a  $3 \times 10^8$ /ml con solución Tyrode.

### 3.3.- Preparación de complejos inmunes

#### 3.3.1.- Obtención de IgG de conejo anti-IgG humana

El antisuero se obtuvo por inmunización de conejos con IgG humana (IgGh) purificada cromatográficamente (Sigma, St. Louis, USA). El esquema de inmunización consistió en una primera inoculación subcutánea de IgGh emulsionada en adyuvante de Freund completo y dos inoculaciones subcutáneas de IgGh emulsionadas con adyuvante de Freund incompleto, 10 y 30 días después de la primera inoculación. Cuarenta días después de la primera inoculación, el conejo fue sangrado y la IgG fue obtenida por precipitación del suero inactivado con sulfato de amonio al 50%, cromatografía en DE-52 celulosa (Whatman Paper Co). Posteriormente, la IgG de conejo fue pasada a través de una columna de afinidad de IgGh polimerizada con glutaraldehído, preparada según el método descrito por Avrameas y Ternynck (141). La IgG de conejo anti-IgGh (IgGc anti-IgGh) fue eluida de la columna con solución tamponada de glicina-clorhídrico 0,1M pH=2,8 y dializada contra PBS.

#### 3.3.2.- Obtención de IgG de conejo anti-ovoalbúmina (OA) y anti-SAB

La ovoalbúmina (Cappel Lab., Detroit, Michigan) y la SAB (Sigma, St. Louis, USA) purificadas cromatográficamente, fueron pasadas a través de una columna de Sephadex G-150 (Pharmacia, Uppsala, Suecia) para remover agregados de alto peso molecular, previo a la inmunización. Los antisueros fueron obtenidos siguiendo el mismo esquema de inmunización empleado en 3.3.1 y las IgG de conejo anti-OA (IgGc anti-OA) y anti-SAB (IgGc anti-SAB) fueron purificadas por cromatografía de afinidad según 3.3.1.

#### 3.3.3.- Obtención de suero anti-eritrocitos de pollo

El antisuero fue obtenido mediante inmunización endovenosa de conejos con 1ml de suspensión de eritrocitos de pollo (Ep) al 10% en solución fisiológica, dos veces a la semana por el término de un mes. A los 45 días de la primera inoculación, se procedió al



sangrado, separación del suero e inactivación del mismo por calentamiento. El suero fue alicuotado y conservado a -20°C hasta el momento de su uso.

#### 3.3.4.- Antígenos empleados para la preparación de los CI

Se emplearon IgGh, SAB y OA purificadas cromatográficamente (Sigma, St. Louis, USA). Con el objeto de eliminar contaminantes, la IgGh fue adsorbida a una columna de proteína G acoplada a Sepharosa y luego de eluida, dializada contra PBS.

#### 3.3.5.- Cationización de antígenos y anticuerpos

Se cationizaron los siguientes anticuerpos y antígenos: IgGc anti-IgGh, IgGc anti-SAB, IgGh, OA y SAB. La cationización fue realizada siguiendo el método descrito por Gauthier y colaboradores (142) empleando etilendiamina (EDA) (Sigma, St. Louis, USA) como nucleófilo para reemplazar grupos carboxílicos de aminoácidos y 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (CDI) (Sigma, St. Louis, USA) como activador de la reacción. Las distintas proteínas fueron dializadas contra solución tamponada de acetato 0,1M pH=4,75 previo a la reacción. La misma fue realizada agregando 0,5g de EDA a 10ml de solución conteniendo 4 mg de antígeno o anticuerpo. Tras ajustar el pH a 4,75, se agregó 0,3g de CDI. La reacción fue llevada a cabo en baño de hielo con agitación durante 20 minutos. Finalizada la misma, los reactivos en exceso fueron removidos por diálisis exhaustiva contra PBS (pH=7,4) en cámara fría. Los antígenos y anticuerpos controles fueron sometidos al mismo proceso, con excepción del agregado de EDA y CDI. Los puntos isoeléctricos (*pI*) de las proteínas cationizadas y controles fueron determinados por técnicas habituales de isoelectrenfoque (IEE), por comparación con el *pI* de proteínas patrones (*pI*=3-10) corridas simultáneamente (Pharmacia, Uppsala, Suecia). El rango de *pI* para los anticuerpos nativos de conejo y para la IgGh no tratada correspondió a 5,8-8,2. Los *pI* fueron mayores a 9,1 para los anticuerpos de conejo cationizados y estuvieron entre 8 y 9,5 para la IgGh, OA y SAB cationizadas.

### 3.3.6.- Obtención de fracciones aniónicas y catiónicas de IgG normal

Las fracciones aniónicas y catiónicas de IgGh normal (Sigma, St. Louis, USA), de IgGc anti-SAB y de IgG de conejo anti-eritrocitos de pollo (IgGc anti-Ep) (Sigma, St. Louis, USA) fueron aisladas por cromatofocado empleando Polybuffer 96 y Polybuffer exchanger PBE 94 (Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Suecia). Las siguientes fracciones fueron aisladas y sus *pI* confirmados por IEE: IgGh: 6,0-6,4 y 7,6-8,5; IgGc anti-SAB: 5,9-6,2 y 7,5-7,8 e IgGc anti-Ep 6,3-6,5 y 7,8-8,0.

### 3.3.7.- Preparación de CI

Los CI fueron preparados en base a curvas de precipitación cuantitativa empleando antígenos o anticuerpos marcados radioactivamente con  $^{125}\text{I}$  (New England Nuclear, Boston, MA). La iodinación de proteínas fue realizada siguiendo un protocolo descrito previamente (143), alcanzándose un nivel de marcación de 10 a 40  $\mu\text{Ci}$  de  $^{125}\text{I}/\text{mg}$  de proteína. Los puntos de equivalencia fueron definidos como las concentraciones a las cuales la marca en el precipitado fuera máxima. En todos los casos, previo a la preparación de los CI, los antígenos y los anticuerpos fueron centrifugados a 50.000 x g durante 1 hora a 4°C para remover agregados de alto peso molecular.

#### 3.3.7.1.- CI preparados con anticuerpos o antígenos cationizados

Los CI controles fueron preparados empleando IgGh e IgGc anti-IgGh, OA e IgGc anti-OA, o SAB e IgGc anti-SAB. Los CI cationizados fueron preparados empleando antígenos o anticuerpos cationizados. En todos los casos los CI fueron formados en 5 veces exceso de antígeno, incubando antígenos y anticuerpos durante 1 hora a 37°C y 18 horas a 4°C. Luego, los CI fueron centrifugados a 5000 x g por 10 minutos, el precipitado descartado y el sobrenadante empleado como CI solubles. De acuerdo a lo reportado previamente por Gauthier y colaboradores (142), se observó que la cationización de antígenos y anticuerpos modificó su reactividad. Para CI preparados con IgGh e IgGc anti-IgGh no tratadas, el punto de equivalencia correspondió a una relación de 120  $\mu\text{g}$  IgGh/mg IgGc anti-IgGh. Para aquellos preparados con proteínas cationizadas, los puntos de

equivalencia fueron: 80 µg de IgGh no tratada/ mg de anticuerpo cationizado y 240 µg de IgGh cationizada/ mg de anticuerpo no tratado. Modificaciones similares en la reactividad se observaron en los otros sistemas antígeno/anticuerpo.

#### 3.3.7.2.- Complejos inmunes precipitantes (Cip)

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

#### 3.3.7.3.- CI solubles preparados con las fracciones aniónicas y catiónicas de la IgG

Se prepararon CI con: (a) IgGc anti-IgGh y las fracciones aniónica o catiónica de la IgGh (ver 3.3.6) y (b) las fracciones aniónica o catiónica de los anticuerpos IgGc anti-SAB y SAB (ver 3.3.6). Los CI fueron formados en 2, 5, 10 y/o 25 veces exceso de antígeno, incubando antígenos y anticuerpos por 30 minutos a 37°C y 1 hora a 4°C. Luego fueron centrifugados 10 minutos a 10.000 x g y los sobrenadantes empleados como CI solubles. Los CI que incluyeron IgG de las fracciones aniónica y catiónica fueron llamados aniónicos (CIan) y catiónicos (CIcac), respectivamente. No se observaron diferencias en los puntos de equivalencia correspondientes a los CIan y CIcac.

#### 3.3.7.4.- Preparación de CI particulados con las fracciones aniónica y catiónica de la IgGc anti-Ep

Los CI particulados fueron preparados empleando Ep y títulos equivalentes de fracciones aniónica y catiónica de anticuerpos IgG anti-Ep. Los mismos fueron determinados en función de su capacidad de aglutinar Ep.

### 3.3.7.5.- Preparación de IgG humana agregada

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

### 3.3.7.6.- Determinación del peso molecular de los CI por ultracentrifugación en gradiente de densidad de sacarosa.

El estado monomérico de la IgGh no tratada y de la cationizada, como así también el peso molecular de los CI, fueron determinados empleando IgGh marcada con  $^{125}\text{I}$ , por ultracentrifugación en un gradiente continuo (10%-30%) de sacarosa en solución tampón borato salina, corrida 18 horas a 4°C a 40.000 rpm en un rotor SW41Ti, utilizando una centrifuga Beckman L2-65B (Beckman Instruments, Irvine, CA) (142). Las muestras fueron colectadas y su radioactividad detectada en un contador gamma (Beckman Instruments, Inc., Palo Alto, California).

El estado monomérico de la IgG fue determinado también por filtración molecular (Sephacryl S-200; Pharmacia, Upsala, Suecia). En concordancia con reportes previos se observó que las proteínas cationizadas interactuaron con la matriz del gel (144), por lo cual fue necesario emplear NaCl 2M como eluyente para superar la interacción.

### 3.4.- Anticuerpos monoclonales

Se utilizaron los siguientes anticuerpos monoclonales (AcM), obtenidos de Medarex Inc. (West Lebanon, NH): 32.2 (IgG1) y 197 (IgG2a), dirigidos contra el RFcyl humano; IV.3 (IgG2b) y su fragmento Fab, que reconocen al RFcylII humano y 3G8 (IgG1) y su fragmento F(ab')<sub>2</sub>, que reconocen al RFcylIII humano.

### 3.5.- Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos

#### 3.5.1.- Células blanco

Se emplearon eritrocitos de pollo (Ep) como células *blanco*. Los mismos fueron obtenidos por punción venosa con una jeringa humedecida con heparina (Abbot Lab., Argentina).

#### 3.5.2.- Marcación de células blanco con cromato de sodio radioactivo

Se incubaron 20  $\mu$ l de sangre heparinizada obtenida según 5.1, con 50-100  $\mu$ Ci de  $^{51}\text{Cr}$  (New England Nuclear), durante 1 hora a 37°C, con agitación intermitente. Posteriormente, las células fueron lavadas 7 veces con medio de cultivo y resuspendidas a la concentración deseada.

#### 3.5.3.- Sensibilización de las células blanco

Los Ep fueron sensibilizados con concentraciones subaglutinantes de anticuerpos anti-Ep, incubando volúmenes iguales de una suspensión de [ $^{51}\text{Cr}$ ]-Ep al 0,5% y una dilución de anticuerpos anti-Ep, obtenida según lo detallado en 3.3.3.

#### 3.5.4.- Reacción de CCDA

El ensayo fue realizado según lo descrito previamente (145). Se incubaron  $2 \times 10^5$  neutrófilos (células efectoras) con  $2 \times 10^5$  [ $^{51}\text{Cr}$ ]-Ep sensibilizados (células *blanco*), en placas de 96 pozos, a 37°C bajo una atmósfera conteniendo 5% de  $\text{CO}_2$  y 95% de aire húmedo. Todos los ensayos fueron realizados por triplicado, en medio de cultivo RPMI suplementado con concentraciones de SFB que variaron según el experimento. Luego de transcurrido el tiempo de incubación (variable en los distintos ensayos), las células fueron centrifugadas y una alícuota de cada sobrenadante (la tercera parte del volumen total) fue transferida a tubos para proceder al conteo radioactivo. La radiactividad de las muestras (sedimento celular y sobrenadante) fue determinada en una contador gamma (Beckman

Instruments, Inc., Palo Alto, California) y el efecto citotóxico fue cuantificado en base a la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Citotoxicidad} = \frac{\text{cpm sobrenadante} \times 3 \times 100}{\text{cpm totales}}$$

Al valor así obtenido, se le sustrajo el % de liberación espontánea de  $^{51}\text{Cr}$ , que en todos los experimentos fue menor al 5%.

### 3.6.- Citotoxicidad inducida por CI

#### 3.6.1.- Obtención de células blanco

Se emplearon eritrocitos de pollo, de carnero, de conejo y eritrocitos humanos, como células *blanco*.

#### 3.6.2.- Marcación de células blanco con cromato de sodio radioactivo

La incorporación de  $^{51}\text{Cr}$  por las células blanco fue realizada por incubación de 20  $\mu\text{l}$  de sangre heparinizada con 50  $\mu\text{Ci}$  de  $^{51}\text{Cr}$  durante 1 hora a  $37^\circ\text{C}$ . Luego, las células fueron lavadas 7 veces con medio de cultivo y resuspendidas a la concentración deseada.

#### 3.6.3.- Reacción de citotoxicidad inducida por CI

La citotoxicidad fue ensayada como se describió previamente (133,134). Las células efectoras ( $1 \times 10^5$  monocitos o  $2 \times 10^5$  neutrófilos) fueron estimuladas por diferentes concentraciones de CI en presencia de células *blanco* ( $2 \times 10^5$ ) y cultivadas durante 18 horas a  $37^\circ\text{C}$  bajo una atmósfera conteniendo 5% de  $\text{CO}_2$  y 95% de aire húmedo. Luego, las células fueron centrifugadas y la radioactividad de las muestras fue determinada. Los porcentajes de  $^{51}\text{Cr}$  liberados al medio extracelular fueron calculados de acuerdo a lo descrito para la CCDA.

### 3.7.- Emisión de quimioluminiscencia (QL) por neutrófilos y monocitos

La respuesta luminiscente fue cuantificada con un lumiagregómetro (Chrono-log) a 1000 rev/minuto y a 37°C en presencia de luminol ( $10^{-7}\text{M}$ ) (146). Para ello,  $1 \times 10^6$  neutrófilos o monocitos fueron estimulados con diversas concentraciones de CI, FMLP, PAF, zymosán, PMA o ácido araquidónico. Inmediatamente después del agregado del estímulo, la emisión de luz fue registrada en forma continua durante 10 minutos. Los resultados fueron expresados como unidades relativas de QL (URQL). Una URQL fue definida como el corrimiento de un 1cm en la emisión de la señal luminosa registrada automáticamente.

### 3.8.- Citometría de flujo

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

#### 3.8.1.- Determinación de la unión de CI a la superficie de los neutrófilos

Los neutrófilos ( $5 \times 10^5$ ), resuspendidos en 100 $\mu\text{l}$  de PBSsup., fueron incubados por 30 minutos a 4°C con los CI. Luego fueron lavados y la unión de los CI revelada mediante el empleo de anticuerpos conjugados con isotiocianato de fluoresceína (ITCF) (Sigma, St. Louis, USA; Dako, Dinamarca). La intensidad de fluorescencia fue determinada sobre 10.000 células en cada muestra. Dado que la intensidad de fluorescencia mostró, en todos los casos, una distribución unimodal, los resultados fueron expresados como intensidad de fluorescencia media específica (IFM), calculada luego de restar la fluorescencia inespecífica.

#### 3.8.2.- Inhibición de la unión de CI a la superficie celular por bloqueo de receptores con AcM

En los experimentos de bloqueo, las células fueron pretratadas con concentraciones saturantes del AcM IV.3 y/o del fragmento  $\text{F(ab')}_2$  del AcM 3G8 por 20 minutos a 4°C.

### 3.8.3.- Expresión de P-selectina por plaquetas

La expresión de P-selectina fue determinada en plaquetas filtradas (PF) ( $3 \times 10^8$ /ml), incubadas en presencia o ausencia de CI o IgGh por 10 minutos a 37°C sin agitación. Luego, las plaquetas fueron tratadas con un AcM de ratón IgG anti-P-selectina por 30 minutos y la unión del mismo revelada por incubación con IgG de cabra anti-IgG de ratón conjugada con ITCF (Sigma, St. Louis, USA). La intensidad de fluorescencia fue analizada sobre 10.000 células de cada muestra.

### 3.8.4.- Unión de proteínas cationizadas a la superficie plaquetaria

La unión de CI cationizados (formados por IgGh cationizada e IgGc anti-IgGh nativa) a PF ( $3 \times 10^8$ /ml) fue evaluada luego de una incubación de 10 minutos a 37°C sin agitación. Se procedió luego al lavado con Tris-EDTA y posterior incubación por 30 minutos con IgG de cabra anti-IgGc conjugada con ITCF. Las PF fueron luego lavadas y la fluorescencia determinada.

La unión de OA y SAB cationizadas (100µg/ml) a las PF fue analizada luego de 10 minutos de incubación a 37°C sin agitación. Las PF fueron luego lavadas e incubadas con IgG específica de conejo por 30 minutos a 37°C. La unión del anticuerpo fue revelada mediante el empleo de IgG de cabra anti-IgGc conjugada con ITCF. Los resultados fueron expresados como IFM.

### 3.8.5.- Cambio de forma de neutrófilos

Los neutrófilos ( $1,5 \times 10^6$  resuspendidos en 100µl de PBSSup) fueron incubados en presencia o ausencia de 100µg/ml de CI o  $10^{-7}$ M de FMLP, por 15 minutos a 37°C, en baño de agua con agitación. Luego, las células fueron lavadas, resuspendidas en PBS y fijadas por el agregado de un volumen igual de glutaraldehído al 0,5% en PBS. El cambio de forma fue determinado por citometría de flujo y los resultados expresados como valor medio de distribución de tamaño.



### 3.9.- Liberación extracelular de elastasa por neutrófilos estimulados

La liberación de elastasa al medio extracelular fue analizada a través de la determinación de su efecto amidolítico sobre L-piroglutamil-L-prolil-L-valina-*p*-nitroanilida (KabiVitrum Diagnostica, Suecia), sustrato altamente específico para la elastasa de granulocitos, siguiendo un protocolo descrito previamente (147). Para ello,  $5 \times 10^6$  neutrófilos, resuspendidos en 400  $\mu$ l de solución de Hank's o PBSSup, fueron incubados con 1  $\mu$ g/ml de citocalasina B durante 10 minutos a temperatura ambiente. Luego, las células fueron estimuladas con CI durante 10 minutos a 37°C y la presencia de elastasa en los sobrenadantes fue determinada fotométricamente a 405 nm. La actividad medida en las muestras fue calculada a través de la fórmula: U/l de elastasa = 138 x A (205).

### 3.10.- Quimiotaxis de neutrófilos

El ensayo de quimiotaxis fue realizado empleando cámaras de quimiotaxis de 48 pozos (Neuroprobe, Cabin John, MD) y filtros de policarbonato libres de polivinilpirrolidona (PVP) de 10  $\mu$ m de espesor y 3  $\mu$ m de tamaño de poro (Nucleopore, Bethesda, MD) (148). Los atractantes (FMLP, suero activado por zimosán y CI) fueron diluidos en PBSSup a las concentraciones indicadas en cada experimento y los neutrófilos ( $2 \times 10^6$  cél./ml) fueron resuspendidos en PBSSup frío. Luego de una incubación de 30 minutos a 37°C bajo una atmósfera compuesta por 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de aire húmedo, los filtros fueron retirados de las cámaras y las células depositadas en la parte superior de los mismos (células que no migraron), fueron removidas con un *rubber policeman*. Las células retenidas en los filtros fueron fijadas, coloreadas con Diff-Quick y los filtros montados sobre un portaobjetos. La migración de neutrófilos fue determinada mediante el recuento del número de células, que atravesando los poros del filtro, alcanzaron la superficie inferior del mismo. Se examinaron 5 campos microscópicos (400x) correspondientes a cada pozo. Cada concentración de attractante fue evaluada por triplicado y los resultados fueron expresados como el número medio de células que migraron/campo microscópico.

En ensayos tendientes a determinar el rol de los RFcy en la quimiotaxis inducida por CI, alícuotas de 40  $\mu$ l de una suspensión de neutrófilos ( $5 \times 10^7$ / ml) en PBSSup frío, fueron incubadas por 30 minutos a 4°C en presencia o ausencia de concentraciones

saturantes de AcM 1V.3 y/o de fragmentos F(ab')<sub>2</sub> del AcM 3G8. Posteriormente, la concentración de las células fue ajustada a  $2 \times 10^6$ /ml con PBSsup, siendo empleadas luego en el ensayo de quimiotaxis. La quimioquinesis fue evaluada empleando un ensayo *checkerboard* tal como fuera descrito por Zigmond y Hirsch (149)

### 3.11.- Efecto de los AcM anti-RFcy sobre diferentes respuestas de neutrófilos inducidas por CI

Los neutrófilos fueron resuspendidos a las concentraciones indicadas en cada experimento e incubados con concentraciones saturantes de AcM anti-RFcy por 30 minutos a 4°C. Luego de lavados, fueron empleados en los distintos ensayos.

### 3.12.- Tratamiento de neutrófilos con enzimas

Los neutrófilos ( $5 \times 10^6$ /ml) resuspendidos en solución fisiológica, fueron incubados en presencia o ausencia de 200µg/ml de pronasa E (obtenida de *Streptomyces griseus*), 1mg/ml de α-quimotripsina (tipo II, obtenida de páncreas bovino, 42U/mg) o 0,25 U/ml de neuroaminidasa (tipo VI, obtenida de *Clostridium perfringens*), por 30 minutos a 37°C. Posteriormente fueron lavados 4 veces y resuspendidos en el medio deseado para cada experimento. La viabilidad celular, juzgada por exclusión del colorante vital azul tripán, fue siempre mayor de 95%.

### 3.13.- Formación de rosetas EA por neutrófilos

Las rosetas fueron formadas siguiendo el protocolo descrito por Sandor y colaboradores (150). Para ello, 15µl de suspensión de neutrófilos ( $5 \times 10^6$ /ml) fueron incubados con 100µl de una suspensión al 2% v/v de Ep sensibilizados con concentraciones subaglutinantes de IgGc anti-Ep (ambos resuspendidos en medio de cultivo con 5% de SFB), por 45 minutos a 4°C. Luego, el roseteo fue evaluado por observación microscópica a 400 x. El porcentaje de neutrófilos que unen al menos un Ep y el número de Ep en cada roseta, fueron determinados contando al menos 100 neutrófilos en cada preparado.

### 3.14.- Ensayo de agregación plaquetaria

Fue registrada utilizando un lumiagregómetro (Chrono-log, Harverton, PA) por el método descrito por Born y Cross (151). La agregación fue determinada en alícuotas de 400µl de PRP, PL o PF durante 5 a 15 minutos y expresada como porcentaje de transmisión máxima de la luz. Cuando fueron usadas PL o PF, 0,25mg/ml de fibrinógeno fueron adicionados 1 minuto previo al agregado de los agonistas.

### 3.15.- Liberación de ATP por plaquetas

La liberación de ATP fue determinada simultáneamente con la agregación plaquetaria por el método de la luciferin-luciferasa, utilizando un lumiagregómetro (Chrono-log, Harverton, PA).

### 3.16.- Liberación de Tromboxano B<sub>2</sub> (TXB<sub>2</sub>) por plaquetas

El TXB<sub>2</sub> (metabolito estable del TXA<sub>2</sub>) presente en el sobrenadante de PL estimulada, fue medido por ELISA. (Caiman Chemical, Ann Arbor, MI).

### 3.17.- Análisis estadístico de los datos

Las diferencias entre datos con distribución normal fueron analizadas a través del test de t de Student. Los datos con distribución no normal, fueron comparados por el test no paramétrico de Wilcoxon y el test de Friedman para comparaciones entre múltiples grupos. Al comparar los resultados obtenidos con los distintos tratamientos, sólo aquellos que presentaron un valor de  $P < 0,05$  fueron considerados significativamente diferentes.

## **4.- RESULTADOS**

### **4.1.- Impacto de las enzimas proteolíticas sobre la actividad del RFcyII en el neutrófilo humano**

La presencia de altas concentraciones de enzimas proteolíticas en el medio extracelular constituye una característica observada en la mayoría de los focos inflamatorios. Ellas son producidas *in situ* a expensas, no sólo de la estimulación de células fagocíticas y linfoides, sino también por activación de diversos sistemas humorales ampliamente interconectados, tales como el sistema de kininas, el complemento y el sistema de coagulación (58,152,153). Numerosos trabajos han analizado el papel de las proteasas como mediadoras de daño tisular, como así también su capacidad de generar péptidos dotados de diversas propiedades biológicas, a partir del clivaje de proteínas autólogas. Los mismos sugieren que las proteasas juegan un rol relevante, no sólo en la inducción sino también en la amplificación de los fenómenos inflamatorios (58,152,153).

Las enzimas proteolíticas son capaces, además, de interactuar con receptores específicos expresados sobre diferentes tipos celulares. Esta interacción, suele inducir una amplia variedad de respuestas, tales como el incremento en los niveles intracelulares de  $Ca^{2+}$ , la activación de protein quinasas, el aumento en la expresión de moléculas de adhesión y la transcripción de genes de activación temprana y/o proliferación celular (154,157). La inducción de dichas respuestas involucra, dependiendo del modelo experimental, la proteólisis limitada de dominios extracelulares de la molécula receptora (155).

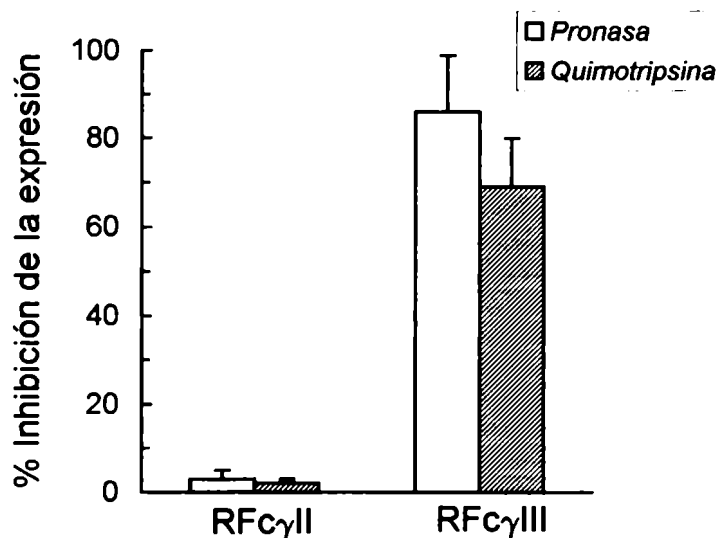
Estudios realizados por Van de Winkel y colaboradores (158-160) han demostrado la capacidad de ciertas proteasas de modular la actividad de los RFcy expresados por monocitos humanos. Sus resultados demuestran que el tratamiento de las células con pronasa o tripsina incrementa la avidéz y funcionalidad del RFcyII, a través de un mecanismo aún no dilucidado. En relación a los leucocitos polimorfonucleares se observó que, a consecuencia del tratamiento con enzimas proteolíticas, la expresión del RFcyIII resulta marcadamente disminuida, sin afectarse la expresión del RFcyII (161,162). No existen estudios previos que hayan analizado el impacto de las proteasas sobre la funcionalidad del RFcyII en el neutrófilo. Es interesante destacar, no obstante, las

observaciones realizadas por Tosi y colaboradores (162) indicando que el tratamiento de los neutrófilos con elastasa no altera su capacidad de producir anión superóxido en respuesta a CI solubles.

Los hallazgos que se describen a continuación, ilustran la capacidad de ciertas proteasas de modular, dramáticamente, la actividad del RFc $\gamma$ II en el neutrófilo humano.

#### 4.1.1.- Efecto de las proteasas sobre la expresión de los RFc $\gamma$ en el neutrófilo

A fin de evaluar la acción de las proteasas sobre la expresión de los RFc $\gamma$ , los neutrófilos fueron tratados durante 30 minutos a 37°C con dos enzimas diferentes: pronasa y quimotripsina. Posteriormente, la presencia de los RFc $\gamma$ III y RFc $\gamma$ II fue evaluada por citometría de flujo, mediante el empleo del fragmento F(ab')<sub>2</sub> del AcM 3G8 (anti-RFc $\gamma$ III) y el AcM IV.3 (anti-RFc $\gamma$ II), respectivamente. El tratamiento con proteasas indujo una marcada reducción en la expresión del RFc $\gamma$ III ( $P < 0,01$ ), sin afectar la expresión del RFc $\gamma$ II (Figura 6).



**Figura 6:** Los neutrófilos ( $5 \times 10^6$ /ml, en solución fisiológica) fueron incubados en ausencia o presencia de pronasa (200 $\mu$ g/ml) o quimotripsina (1mg/ml) durante 30 minutos a 37°C. Posteriormente fueron lavados e incubados con concentraciones saturantes del AcM IV.3 (anti-RFc $\gamma$ II) o del fragmento F(ab')<sub>2</sub> del AcM 3G8 (anti-RFc $\gamma$ III) por 30 minutos a 4°C. Luego, fueron lavados y la unión de los AcM fue revelada mediante el empleo de anticuerpos de cabra anti-IgG de ratón conjugados con ITCF. Los datos están expresados como la media aritmética  $\pm$  ES de 4 dadores.

4.1.2.- Efecto de las proteasas sobre la capacidad de los neutrófilos de unir eritrocitos sensibilizados con IgG (IgG-Ep)

Con el objeto de analizar la acción de las enzimas proteolíticas sobre la actividad del RFcyII se examinó, en primera instancia, el efecto del tratamiento con pronasa y quimotripsina sobre la capacidad de los neutrófilos de reconocer y unir IgG-Ep. Los resultados obtenidos indicaron que el tratamiento proteolítico incrementó marcadamente ( $P < 0,01$ ), no sólo el porcentaje de neutrófilos capaces de unir IgG-Ep, sino también el número de Ep presentes en cada roseta (Tabla 1).

**Tabla 1.** Efecto de la proteólisis sobre la formación de rosetas EA.

Tratamiento	Ep	Ep sens.	AcM IV.3	Fab IV3	F(ab') <sub>2</sub> AcM 3G8	% Rosetas EA	Ep en cada roseta EA	n
Ninguno	+	-	-	-	-	0	0	13
"	-	+	-	-	-	29±4	3±0	29
"	-	+	+	-	-	7±4	1±1	4
"	-	+	-	-	+	4±2	2±1	5
Pronasa (200µg/ml)	+	-	-	-	-	0	0	13
"	-	+	-	-	-	91±3	10±2	24
"	-	+	+	-	-	9±6	2±1	4
"	-	+	-	+	-	12±5	ND	4
"	-	+	-	-	+	85±7	7±1	5
Quimotripsina (1mg/ml)	+	-	-	-	-	0	0	13
"	-	+	-	-	-	85±4	7±1	6
"	-	+	+	-	-	10±0	3±0	3
"	-	+	-	+	-	22±6	ND	4
"	-	+	-	-	+	56±2	6±0	3

Los neutrófilos ( $5 \times 10^6$ /ml, en solución fisiológica) fueron incubados en ausencia o presencia de pronasa (200 µg/ml) o quimotripsina (1 mg/ml) por 30 minutos a 37°C. Posteriormente fueron lavados e incubados con AcM IV.3, su fragmento Fab, el fragmento F(ab')<sub>2</sub> del AcM 3G8 o con medio de cultivo sólo por 30 minutos a 4°C. Luego, fueron lavados y empleados en ensayos de formación de rosetas EA. Los datos están expresados como la media aritmética ± ES de n dadores. ND: No determinado.

A fin de determinar la contribución de los RFcγII y RFcγIII a la formación de rosetas, se emplearon el AcM IV.3 y el fragmento F(ab')<sub>2</sub> del AcM 3G8. Ambos redujeron significativamente el porcentaje de rosetas EA, en los neutrófilos no tratados con proteasas ( $P < 0,05$ ) (*Tabla 1*). En neutrófilos tratados con pronasa, la formación de rosetas EA no fue afectada por el fragmento F(ab')<sub>2</sub> del AcM 3G8, pero fue marcadamente inhibida ( $P < 0,01$ ) tanto por el AcM IV.3 como por su fragmento Fab (*Tabla 1*). En las células tratadas con quimotripsina, se observó una leve inhibición por el fragmento F(ab')<sub>2</sub> del AcM 3G8 y una marcada reducción por parte del AcM IV.3 o su fragmento Fab ( $P < 0,01$ ) (*Tabla 1*). Los resultados descriptos indican que, mientras la unión de los IgG-Ep a los neutrófilos controles depende tanto del RFcγII como del RFcγIII, su unión a los neutrófilos tratados con proteasas es marcadamente dependiente del RFcγII.

#### 4.1.3.- Efecto de las proteasas sobre la capacidad de los neutrófilos de mediar respuestas inducidas por IgG-Ep

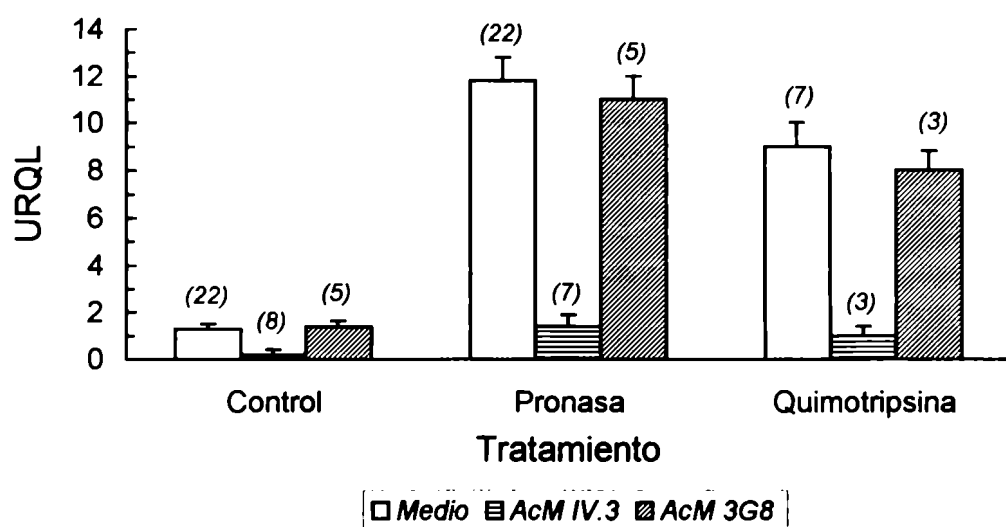
El impacto del tratamiento proteolítico sobre la funcionalidad del RFcγII fue analizado mediante el estudio de dos respuestas celulares: la emisión de quimioluminiscencia (QL) y la CCDA. La activación del estallido respiratorio está asociada a la emisión de QL (163). Este fenómeno es consecuencia de la emisión de fotones provocada por el decaimiento de especies electrónicamente excitadas como el oxígeno singlete u otras generadas a expensas de reacciones de oxidación sobre moléculas del entorno (146,163). Tal como se observa en la *Figura 7*, el tratamiento de los neutrófilos con proteasas potenció significativamente la QL inducida por IgG-Ep ( $P < 0,01$ ). Un incremento notable se observó también al analizar la capacidad de dichos neutrófilos de mediar la CCDA ( $P < 0,01$ ) (*Tabla 2*). La preincubación de neutrófilos controles y de aquellos tratados con proteasas con fragmentos F(ab')<sub>2</sub> del AcM 3G8 no modificó la CCDA ni la QL (*Tabla 2 y Figura 7*). Ambas funciones, sin embargo, fueron marcadamente inhibidas por el AcM IV.3 ( $P < 0,05$ ) (*Tabla 2 y Figura 7*). Estos resultados indican que, mientras la unión de IgG-Ep a los neutrófilos no tratados con proteasas es dependiente del RFcγII y del RFcγIII, las funciones inducidas por IgG-Ep involucran exclusivamente al RFcγII. Por el contrario, tanto la unión como las funciones estimuladas por IgG-Ep mediadas por neutrófilos tratados con proteasas involucran sólo al RFcγII.

**Tabla 2.** Efecto de la proteólisis sobre la CCDA.

Tratamiento	IgG anti-Ep (ng)	AcM IV.3	AcM F(ab') <sub>2</sub> 3G8	% ADCC	n
Ninguno	3	-	-	5±1	17
“	10	-	-	21±3	17
“	10	+	-	5±2	6
“	10	-	+	24±5	6
<b>Pronasa (200µg/ml)</b>	3	-	-	49±3	14
“	10	-	-	63±4	14
“	10	+	-	11±3	6
“	10	-	+	71±6	6
<b>Quimotripsina (1mg/ml)</b>	3	-	-	33±4	5
“	10	-	-	51±5	5
“	10	+	-	12±4	3
“	10	-	+	48±6	3

Los neutrófilos ( $5 \times 10^6$ /ml, en solución fisiológica) fueron incubados en ausencia o presencia de pronasa (200µg/ml) o quimotripsina (1mg/ml) durante 30 minutos a 37°C. Posteriormente fueron lavados e incubados con el AcM IV.3, con el fragmento F(ab')<sub>2</sub> del AcM 3G8 o con medio de cultivo sólo por 30 minutos a 4°C. Luego fueron lavados y empleados en ensayos de CCDA utilizando dos concentraciones diferentes de IgGc anti-Ep. Los datos están expresados como la media aritmética ± ES de n dadores evaluados por triplicado.





**Figura 7.** Efecto de enzimas proteolíticas sobre la QL inducida por IgG-Ep. Los neutrófilos ( $5 \times 10^6$ /ml, en solución fisiológica) fueron incubados en ausencia o presencia de pronasa (200  $\mu$ g/ml) o quimotripsina (1mg/ml) durante 30 minutos a 37°C. Posteriormente fueron lavados e incubados con el AcM IV.3, con el fragmento F(ab')<sub>2</sub> del AcM 3G8 o con medio de cultivo sólo por 30 minutos a 4°C. Luego fueron lavados y empleados en ensayos de QL utilizando Ep sensibilizados con concentraciones subaglutinantes de IgGc anti-Ep como estímulo. Los datos están expresados como la media aritmética  $\pm$  ES de (n) dadores evaluados por duplicado.

#### 4.1.4.- Efecto de la neuroaminidasa sobre las respuestas de neutrófilos inducidas por IgG-Ep

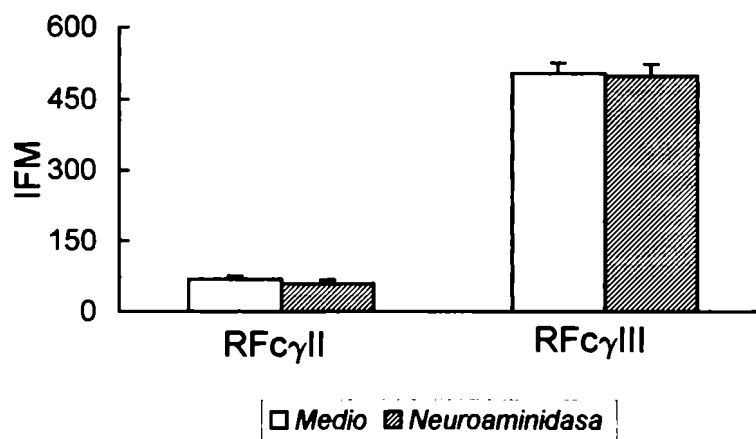
El contenido de ácido siálico contribuye a determinar la carga eléctrica de la superficie celular. Se consideró la posibilidad de que el tratamiento proteolítico ocasionara el clivaje de glicoproteínas de membrana ricas en ácido siálico y consecuentemente indujera una disminución de la carga negativa neta de la superficie celular. El incremento en la funcionalidad del RFc $\gamma$ II inducido por el tratamiento proteolítico, podría ser consecuencia de una reducción de las fuerzas repulsivas entre los IgG-Ep y los neutrófilos, lo que facilitaría la interacción de los mismos. A fin de testear esta hipótesis, se analizó el efecto de la neuroaminidasa, enzima capaz de remover residuos de ácido siálico, sobre la funcionalidad del RFc $\gamma$ II. Los resultados descritos en la *Tabla 3* muestran que el tratamiento de los neutrófilos con neuroaminidasa incrementó, no sólo su capacidad de unir IgG-Ep sino también su capacidad de mediar la CCDA y de inducir la emisión de QL, en

niveles semejantes a los obtenidos por acción de la pronasa o la quimotripsina ( $P < 0,01$ ). El tratamiento con neuroaminidasa, por otra parte, no afectó la expresión de los RFc $\gamma$ II y RFc $\gamma$ III (Figura 8).

**Tabla 3.** Efecto de la neuroaminidasa sobre la formación de rosetas, la CCDA y la QL inducida por IgG-Ep.

Función analizada	Tratamiento		n
	Control	Neuroaminidasa	
Formación de rosetas EA (%)	26±6	95±5	7
CCDA (%)	4±2	38±4	6
QL (URQL)	1±1	15±3	8

Los neutrófilos ( $5 \times 10^6$ /ml, en solución fisiológica) fueron incubados en ausencia o presencia de neuroaminidasa (0,25U/ml) durante 30 minutos a 37°C. Luego fueron lavados y empleados en ensayos de formación de rosetas EA, CCDA y QL inducidas por IgG-Ep. Los datos están expresados como la media aritmética  $\pm$  ES de n dadores evaluados por triplicado.



**Figura 8.** Efecto de la neuroaminidasa sobre la expresión de los RFc $\gamma$ . Los neutrófilos ( $5 \times 10^6$ /ml, en solución fisiológica) fueron incubados en ausencia o presencia de neuroaminidasa (0,25U/ml) durante 30 minutos a 37°C. Luego fueron lavados e incubados con concentraciones saturantes del AcM IV.3 (anti-RFc $\gamma$ II) o del fragmento F(ab') $_2$  del AcM 3G8 (anti-RFc $\gamma$ III) por 30 minutos a 4°C. Luego, fueron lavados y la unión de los AcM fue revelada mediante el empleo de anticuerpos de cabra anti-IgG de ratón conjugados con ITCF. Los datos están expresados como la media aritmética  $\pm$  ES de 4 dadores.

A diferencia de lo observado con pronasa y quimotripsina, la unión de IgG-Ep a neutrófilos tratados con neuroaminidasa fue significativamente inhibida tanto por el fragmento F(ab')<sub>2</sub> del AcM 3G8 como por el fragmento Fab del AcM IV.3 ( $P < 0,05$ ) (Tabla 4). La CCDA y la QL mediada por neutrófilos sometidos a la acción de la neuroaminidasa fueron marcadamente inhibidas por el fragmento Fab del IV.3 ( $P < 0,01$ ) sin ser modificadas por el fragmento F(ab')<sub>2</sub> del AcM 3G8 (Tabla 4).

**Tabla 4.** Efecto del tratamiento con AcM anti RFcys sobre las funciones mediadas por neutrófilos tratados con neuroaminidasa inducidas por IgG-Ep.

Función analizada	% Inhibición por tratamiento con	
	Fab del IV.3	F(ab') <sub>2</sub> del 3G8
Formación de rosetas EA	39±5	71±7
CCDA	87±6	7±2
QL	74±6	9±1

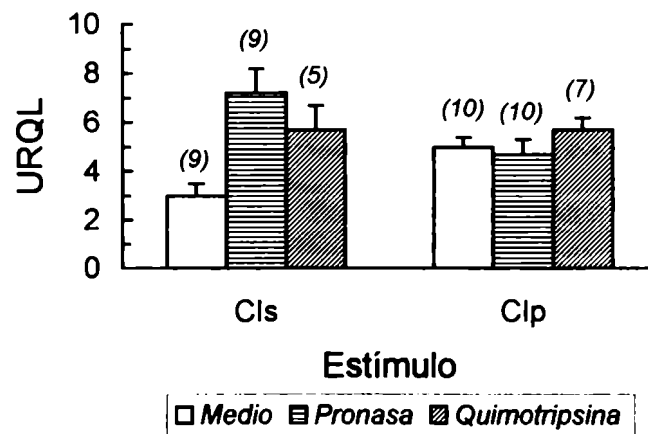
Los neutrófilos ( $5 \times 10^6$ /ml, en solución fisiológica) fueron incubados en ausencia o presencia de neuroaminidasa (0,25U/ml) durante 30 minutos a 37°C. Luego fueron lavados e incubados con el AcM IV.3, el fragmento F(ab')<sub>2</sub> del AcM 3G8 o con medio de cultivo sólo por 30 minutos a 4°C. Luego, fueron lavados y empleados en ensayos de formación de rosetas EA, CCDA y QL inducidas por IgG-Ep. Los datos están expresados como la media aritmética ± ES de 4 dadores evaluados por triplicado.

Considerados en conjunto, los resultados obtenidos sugieren que el efecto de las proteasas puede explicarse, al menos parcialmente, en función de una reducción del contenido de ácido siálico de la superficie celular.

#### 4.1.5.- Efecto de las proteasas sobre la QL mediada por neutrófilos inducida por diferentes tipos de CI

Como se ha mencionado previamente, los CI constituyen un grupo heterogéneo de agonistas que difieren no sólo en su capacidad de inducir diferentes respuestas celulares, sino también en los mecanismos transduccionales involucrados en su estimulación

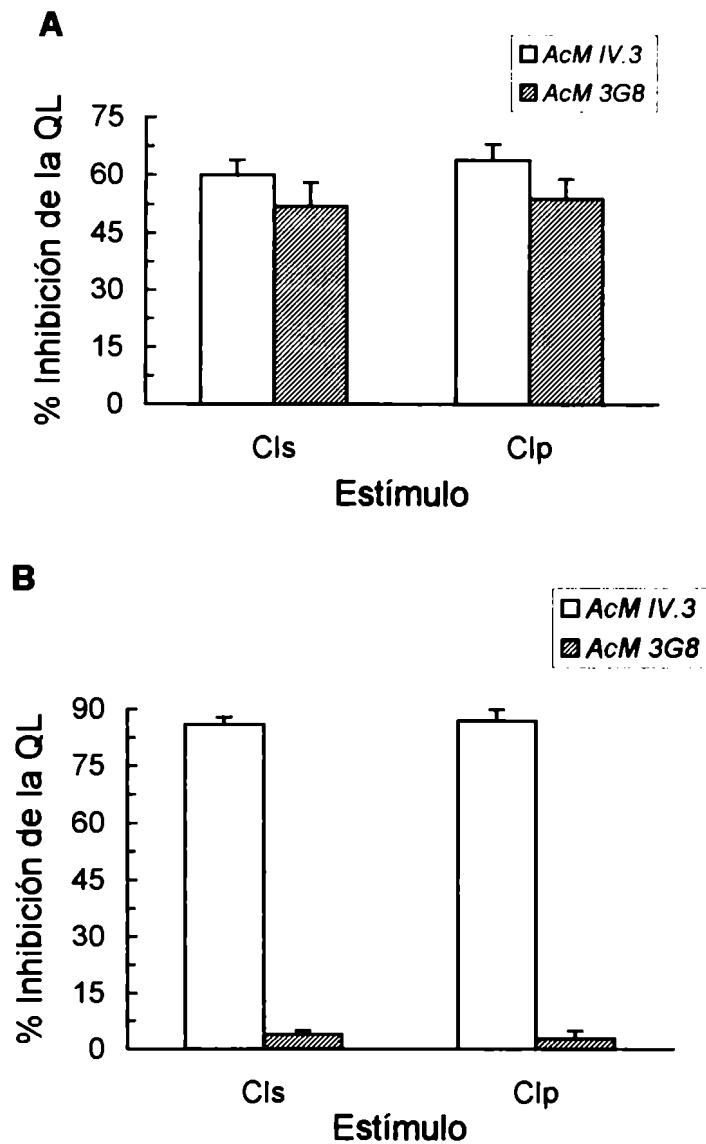
(119,128,129,136). Los experimentos descritos previamente se desarrollaron empleando IgG-Ep como modelo de CI. Con el objeto de determinar si las proteasas era capaces de modular respuestas de neutrófilos inducidas por otros CI, se evaluó la QL estimulada por CI del tipo IgGh: IgG de conejo anti-IgGh, preparados tanto en forma soluble (5x exceso de antígeno) como precipitante. El tratamiento de neutrófilos con pronasa o quimotripsina incrementó significativamente ( $P<0,01$ ) la respuesta inducida por CIs pero no modificó aquella estimulada por Clp (*Figura 9*).



**Figura 9.** Efecto de la proteólisis sobre la respuesta QL inducida por CIs y Clp. Los neutrófilos ( $5 \times 10^6$ /ml, en solución fisiológica) fueron incubados en ausencia o presencia de pronasa (200 $\mu$ g/ml) o quimotripsina (1mg/ml) por 30 minutos a 37°C. Luego, fueron lavados y empleados en ensayos de QL utilizando CIs (50 $\mu$ g/ml) o Clp (5 $\mu$ g/ml) como estímulos. Los datos están expresados como la media aritmética  $\pm$  ES de (n) dadores evaluados por duplicado.

Teniendo en cuenta que el tratamiento proteolítico induce una reducción sustancial en la expresión del RFcyIII, las diferencias observadas podrían explicarse considerando la posibilidad de que la QL inducida por Clp fuese fuertemente dependiente del RFcyIII. En ese caso, la contribución de una mayor actividad del RFcyII a la respuesta QL podría verse compensada por la ausencia del RFcyIII. Al testear esta hipótesis mediante el empleo de los AcM anti-RFcy, se encontró que la misma no fue válida puesto que la respuesta inducida por ambos tipos de CI en neutrófilos tratados con proteasas fue inhibida en niveles similares por el AcM IV.3 y el fragmento F(ab')<sub>2</sub> del AcM 3G8 (*Figura 10A*). Por otra parte, en

acuerdo con lo esperado, la QL inducida por ambos tipos de CI, emitida por neutrófilos tratados con proteasas, fue prácticamente suprimida por el AcM IV.3 (Figura 10B).



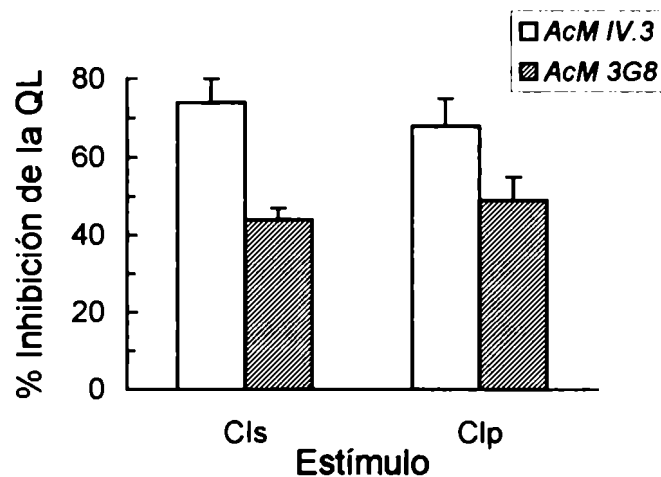
**Figura 10.** Efecto de los AcM anti-RFc $\gamma$  sobre la QL inducida por Cls y Clp mediada por neutrófilos controles y tratados con proteasas. Los neutrófilos ( $5 \times 10^6$ /ml, en solución fisiológica) fueron incubados en ausencia o presencia de pronasa ( $200 \mu\text{g/ml}$ ) o quimotripsina ( $1 \text{mg/ml}$ ) por 30 minutos a  $37^\circ\text{C}$ . Posteriormente fueron lavados e incubados con el AcM IV.3, el fragmento F(ab') $_2$  del AcM 3G8 o con medio de cultivo sólo por 30 minutos a  $4^\circ\text{C}$ . Luego, fueron lavados y empleados en ensayos de QL utilizando Cls ( $50 \mu\text{g/ml}$ ) y Clp ( $5 \mu\text{g/ml}$ ) como estímulos. (A) QL mediada por neutrófilos no sometidos a la acción de las proteasas. (B) QL mediada por neutrófilos tratados con enzimas. Los datos están expresados como la media aritmética  $\pm$  ES de 5 dadores evaluados por duplicado

En forma similar a lo realizado con los IgG-Ep, se analizó posteriormente el efecto de la neuroaminidasa sobre la QL de neutrófilos inducida por CIs y Clp. Los resultados obtenidos (*Tabla 5*) muestran que este tratamiento potenció significativamente no sólo la QL inducida por CIs sino también aquella inducida por Clp ( $P<0,05$ ), respuestas que estuvieron mediadas a través de los RFcyII y RFcyIII (*Figura 11*). Este efecto contrasta con el ejercido por las proteasas, las cuales sólo potenciaron la respuesta inducida por CIs.

**Tabla 5.** Efecto del tratamiento con neuroaminidasa sobre la QL inducida por CIs y Clp.

Tratamiento	QL inducida por (URQL)	
	CIs	Clp
Control	2±1	4±2
Neuroaminidasa	8±2	9±1

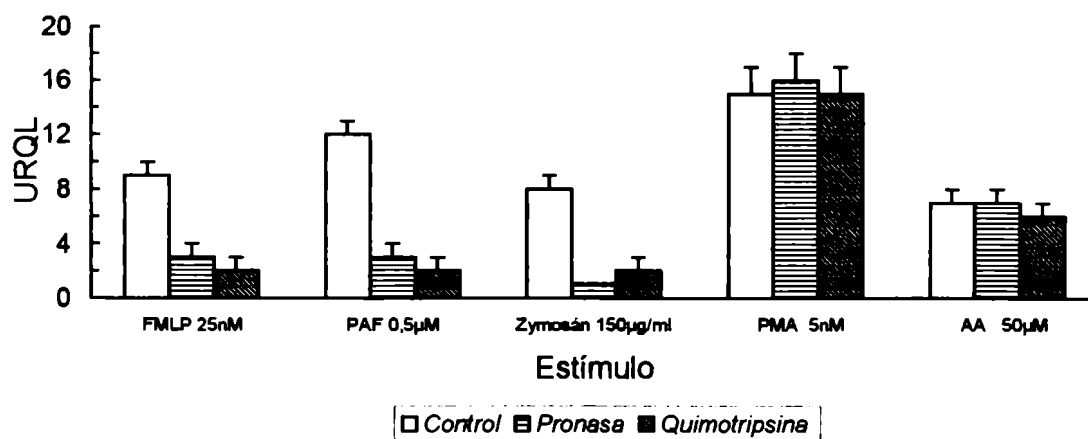
Los neutrófilos ( $5 \times 10^6$ /ml, en solución fisiológica) fueron incubados en ausencia o presencia de neuroaminidasa (0,25U/ml) durante 30 minutos a 37°C. Luego fueron lavados y empleados en ensayos de QL inducida por CIs (50µg/ml) o Clp (5µg/ml). Los datos están expresados como la media aritmética ± ES de 5 dadores evaluados por duplicado



**Figura 11.** Efecto de los AcM anti-RFcy sobre la QL inducida por CIs y Clp mediada por neutrófilos tratados con neuroaminidasa. Los neutrófilos ( $5 \times 10^6$ /ml, en solución fisiológica) fueron incubados en ausencia o presencia de neuroaminidasa (0,25U/ml) durante 30 minutos a 37°C. Luego fueron lavados e incubados con el AcM IV.3, el fragmento F(ab')<sub>2</sub> del AcM 3G8 o con medio de cultivo sólo por 30 minutos a 4°C. Posteriormente, fueron lavados y empleados en ensayos de QL utilizando CIs (50µg/ml) y Clp (5µg/ml) como estímulos. Los datos están expresados como la media aritmética ± ES de 4 dadores evaluados por duplicado

#### 4.1.6.- Impacto de las proteasas sobre la QL mediada por neutrófilos inducida por diferentes agonistas

A fin de determinar la acción moduladora ejercida por las proteasas sobre la funcionalidad de otros sistemas de receptores operativos en neutrófilos, se examinó la QL inducida por diferentes agonistas. Los resultados obtenidos (Figura 12) indicaron que la emisión de luz inducida por el péptido quimiotáctico FMLP, el zymosán y el PAF fue marcadamente inhibida como consecuencia del tratamiento proteolítico ( $P < 0,01$ ). Por el contrario, la QL inducida por el ácido forbol mirístico (PMA) y el ácido araquidónico, estímulos que inducen la activación celular sin interactuar con receptores de superficie, no fue modificada por el tratamiento enzimático.



**Figura 12.** Efecto de la proteólisis sobre la respuesta QL inducida por distintos agonistas. Los neutrófilos ( $5 \times 10^6$ /ml, en solución fisiológica) fueron incubados en ausencia o presencia de pronasa (200µg/ml) o quimotripsina (1mg/ml) durante 30 minutos a 37°C. Luego, fueron lavados y empleados en ensayos de QL utilizando los agonistas indicados. Los datos están expresados como la media aritmética  $\pm$  ES de 5 dadores evaluados por duplicado.

Considerados en conjunto, los resultados descriptos demuestran que la acción de ciertas enzimas proteolíticas conduce, de modo selectivo, a la potenciación de la funcionalidad del RFcyII del neutrófilo humano. Dicha acción, no obstante, resulta dependiente de las características del CI que actúa como estímulo.

#### 4.2.- Impacto de la carga eléctrica de anticuerpos y antígenos sobre la capacidad de los CI que los contienen de inducir respuestas proinflamatorias y trombóticas

La formación de CI es un proceso que en general resulta beneficioso para el hospedador, puesto que conduce a la neutralización o eliminación del antígeno. Sin embargo, bajo ciertas circunstancias, los CI pueden depositarse en estructuras vasculares e inducir respuestas inflamatorias capaces de comprometer el funcionamiento de los órganos que ellas irrigan (1,120-122). Este proceso es responsable de diversas manifestaciones clínicas no sólo en enfermedades de naturaleza autoinmune, sino también en enfermedades neoplásicas y patologías infecciosas ocasionadas por bacterias, virus y parásitos (1,120). Numerosos trabajos han demostrado que la actividad patogénica de los CI guarda una estrecha relación con su capacidad de inducir respuestas secretorias y/o citotóxicas mediadas por células fagocíticas (1,164,165). No obstante, el conocimiento de las propiedades inherentes a los CI que condicionan su capacidad de inducir tales respuestas es muy limitado.

En el caso particular del LES, se ha postulado que los CI formados por ADN y anticuerpos IgG específicos se hallan involucrados en la inducción del daño renal, que constituye la manifestación más severa de la enfermedad (166). Sin embargo, no existe correlación entre los niveles de anticuerpos anti-ADN y la presencia de compromiso renal (167). Este hecho sugiere que dichos autoanticuerpos no siempre son nefritogénicos (168). Estudios realizados por Ebling y Hahn en ratones con LES (169), demostraron la presencia de anticuerpos anti-ADN catiónicos ( $pI > 8,5$ ) coincidentes con el inicio de la lesión renal. Los autores describieron, además, la existencia de una marcada correlación entre la severidad de la nefritis y la concentración de estos anticuerpos en los eluidos renales de dichos ratones. Hallazgos posteriores de Datta S.K. y colaboradores (170-173) confirmaron, tanto en modelos de lupus murino como en el LES humano, la producción de autoanticuerpos anti-ADN catiónicos asociada al desarrollo de la nefritis. Las propiedades patogénicas de estos anticuerpos no han sido claramente elucidadas. No obstante, merece mencionarse que los CI que incluyen anticuerpos catiónicos, presentan una fuerte tendencia a depositarse y persistir en los glomérulos renales (144,174). Este fenómeno involucra el establecimiento de interacciones electrostáticas entre grupos cargados positivamente expresados en la molécula de anticuerpo y sitios aniónicos de la membrana basal



glomerular (MBG) (175,176). La avidéz de tal interacción explica el motivo por el cual la presencia de anticuerpos catiónicos, aún en proporciones mínimas, incrementa notablemente la capacidad de los CI de depositarse a nivel tisular (177).

No existen estudios previos que hayan analizado el impacto de la carga eléctrica de los anticuerpos IgG en relación a su capacidad de inducir respuestas proinflamatorias a través de los RFcy. Los resultados que se describen a continuación ilustran la investigación realizada a fin de evaluar este aspecto.

#### 4.2.1.- Activación de células fagocíticas inducida por CI preparados con anticuerpos cationizados (CIcat)

##### 4.2.1.1.- Respuestas citotóxicas mediados por neutrófilos inducidas por CIcat

A fin de determinar el modo en el cual la carga eléctrica de los anticuerpos IgG condiciona la actividad de los CI, se procedió a cationizar *in vitro* anticuerpos IgGc anti-IgGh, siguiendo el protocolo descrito en Materiales y Métodos. Luego se prepararon CI solubles empleando IgGh como antígeno y anticuerpos IgGc anti-IgGh, nativos (*pI*: 5,8-8,2) o cationizados (*pI*: 9,2-9,5). Se evaluó posteriormente su capacidad de inducir respuestas citotóxicas mediadas por neutrófilos contra células *blanco* no sensibilizadas. En forma sorpresiva, se observó que los CI preparados con anticuerpos cationizados (CIcat) indujeron altos niveles de citotoxicidad, aún al emplearse a concentraciones tan bajas como 4µg/ml (*Tabla 6*). Por el contrario, aquellos preparados con anticuerpos nativos (CIc) indujeron muy bajos niveles de citotoxicidad, aún cuando fueron empleados a concentraciones de 200µg/ml. Es importante destacar las diferencias en la magnitud de las respuestas inducidas en cada caso. Los CIcat empleados a concentraciones 50 veces inferiores respecto de los CIc, indujeron niveles de citotoxicidad tres veces superiores.

Con el objeto de confirmar los hallazgos descriptos, se empleó un segundo tipo de CI preparado con seroalbúmina bovina (SAB) y anticuerpos IgG específicos de conejo nativos (*pI*: 5,8-8,2) o cationizados (*pI* > 9,1). Los CIcat indujeron, nuevamente, niveles de citotoxicidad notoriamente superiores respecto de los inducidos por CIc ( $P < 0,01$ ) (*Tabla 6*).

**Tabla 6.** Citotoxicidad mediada por neutrófilos inducida por CIcat.

CI empleado como estímulo		% Citotoxicidad	n
Ninguno		3±1	17
CI: IgGh-IgGc anti-IgGh con			
anticuerpo nativo	200 µg/ml	11±2	10
	20 µg/ml	3±2	10
	4 µg/ml	3±1	10
anticuerpo cationizado	20 µg/ml	71±2	9
	4 µg/ml	34±3	7
IgGh cationizada	20µg/ml	66±5	5
CI: SAB-IgGc anti-SAB con			
anticuerpo nativo	20 µg/ml	3±1	6
	4 µg/ml	3±1	6
anticuerpo cationizado	20 µg/ml	47±3	6
	4 µg/ml	14±2	6

Los CI solubles fueron preparados con IgG humana, nativa o cationizada y anticuerpos IgG de conejo anti-IgGh, nativos o cationizados, o seroalbúmina bovina (SAB) y anticuerpos IgG de conejo anti-SAB, nativos o cationizados, en 5x exceso de antígeno. Los ensayos de citotoxicidad fueron desarrollados enfrentando neutrófilos y células *blanco* por 18 horas a 37°C en presencia de los CI detallados. Los resultados están expresados como la media aritmética ± ES de *n* experimentos diferentes realizados por triplicado.

Los resultados mencionados previamente, fueron obtenidos en ensayos de citotoxicidad en los que se usaron Ep como células *blanco*. El empleo de eritrocitos de carnero y eritrocitos humanos como *blancos* de citotoxicidad arrojó resultados similares. Los CI formados con IgGh nativa e IgGc anti-IgGh cationizada (20µg/ml), indujeron altos niveles de citotoxicidad tanto frente a eritrocitos de carnero (% citotoxicidad=59±6, n=4) como contra eritrocitos humanos (% citotoxicidad=38±5, n=4). Bajo similares condiciones, los CI preparados con componentes nativos no indujeron respuestas significativas. Es importante destacar que, al igual que los anticuerpos IgG nativos, los anticuerpos IgG cationizados no indujeron, *per se*, niveles significativos de citotoxicidad.

Las experiencias descritas precedentemente, se realizaron empleando anticuerpos de conejo cationizados. A fin de evaluar el impacto de la carga eléctrica de la IgG humana sobre su actividad biológica, se prepararon CI solubles con IgGh nativa (*pI*: 5,8-8,2) (CIc) o cationizada (*pI*: 8,0-9,5) (CIcat) y anticuerpos IgG específicos de conejo nativos. Mientras que los CIcat indujeron altos niveles de citotoxicidad, los CIc fueron incapaces de inducir respuestas significativas (*Tabla 6*).

Considerados en conjunto, los resultados descriptos indican que la cationización de la fracción IgG de los CI, incrementa al menos diez veces su capacidad de inducir respuestas citotóxicas mediadas por neutrófilos.

#### 4.2.1.2.- Rol del metabolismo oxidativo en la citotoxicidad mediada por neutrófilos estimulados por CIcat

Nuestro grupo de investigación ha demostrado previamente que los CI solubles son capaces de inducir respuestas citotóxicas mediadas por neutrófilos, a través de un mecanismo lítico que involucra la participación de IRO (133-137). Considerando las diferencias de magnitud en las respuestas inducidas por CIc y CIcat, se evaluó la posibilidad de que las mismas obedecieran a la participación de diferentes mecanismos citolíticos. Con el objeto de testear esta hipótesis, los ensayos de citotoxicidad fueron realizados en presencia de enzimas capaces de degradar a los IRO producidos a consecuencia de la activación del estallido respiratorio. No se encontraron diferencias en relación a las respuestas inducidas por CIc y CIcat (*Tabla 7*). Ambas respuestas fueron marcadamente inhibidas por catalasa ( $P < 0,01$ ), no siendo modificadas por la SOD (*Tabla 7*). Ello sugiere un rol central del  $H_2O_2$  en los mecanismos citolíticos.

Tal como se mencionara previamente, el  $H_2O_2$  es capaz de ejercer efectos citotóxicos *per se* o a través del sistema  $H_2O_2$ -mieloperoxidasa-haluro, mediante la producción de especies tóxicas más poderosas tales como el anión hipoclorito y/o las cloraminas (58,178). Para diferenciar entre ambas posibilidades se ensayó la reacción en presencia de tres inhibidores de hemo-enzimas: azida sódica, cianuro de potasio y aminotriazol. Ninguno de los tres inhibidores fue capaz de suprimir las respuestas citotóxicas. Por el contrario, en todos los casos, ellas fueron significativamente incrementadas ( $P < 0,05$ ) (*Tabla 7*). Las causas de dichos incrementos no resultan obvias.

No obstante, podrían explicarse considerando que los inhibidores de hemo-enzimas podrían ocasionar un aumento en la concentración efectiva de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a expensas de la inhibición de la catalasa endógena. Esta hipótesis, sin embargo, no ha sido corroborada experimentalmente.

Considerados en conjunto, los resultados mencionados sugieren que las respuestas citotóxicas inducidas tanto por CIc como por CIcat, involucran la participación de mecanismos líticos dependiente del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pero independientes de la mieloperoxidasa.

**Tabla 7.** Mecanismos involucrados en la citotoxicidad mediada por neutrófilos inducida por CIcat.

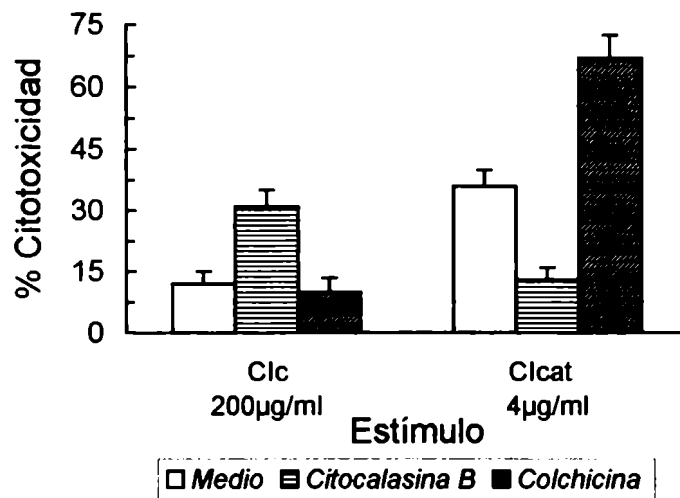
		% Citotoxicidad inducida por	
		CIc	CIcat
Tratamiento		200 µg/ml	20 µg/ml    4 µg/ml
Ninguno		10±2	66±4    24±3
Catalasa	200 µg/ml	3±1	12±2    3±1
	50 µg/ml	3±1	26±2    3±1
Catalasa inactivada <sup>#</sup>	200 µg/ml	13±3	62±5    27±3
Superóxido dismutasa	200 µg/ml	15±3	62±4    29±3
	50 µg/ml	15±2	68±5    28±2
Azida sódica	1 mM	27±3	69±4    35±3
Cianuro	1 mM	19±3	65±4    33±3
Aminotriazol	30 mM	28±4	72±5    38±4

Se emplearon CI solubles preparados con IgGh y anticuerpos IgG de conejo anti-IgGh, nativos (CIc) o cationizados (CIcat). Los ensayos de citotoxicidad fueron desarrollados enfrentando neutrófilos y células *blanco* por 18 horas a 37°C en presencia de CIc o CIcat. Los resultados están expresados como la media aritmética ± ES de 6 experimentos diferentes realizados por triplicado.

<sup>#</sup> Catalasa inactivada por calor.

#### 4.2.1.3.- Rol del citoesqueleto en la citotoxicidad mediada por neutrófilos inducida por Cl cat

Estudios previos han establecido la relevancia del citoesqueleto en la citotoxicidad mediada por células fagocíticas (135,136). Con el objeto de determinar el papel desempeñado por el mismo en la citotoxicidad inducida por Clc y Clcat, se evaluó el efecto de dos agentes que interfieren el ensamblado de sus componentes: (1) la citocalasina B, un agente disruptor del sistema de microfilamentos de actina (179) y (2) la colchicina, un inhibidor de la polimerización de tubulina (180). Los resultados obtenidos indicaron que la citotoxicidad inducida por Clc fue marcadamente incrementada por citocalasina B ( $P<0,01$ ), sin ser afectada por tratamiento con colchicina (Figura 13). Mientras que aquella inducida por Clcat fue significativamente inhibida por citocalasina B ( $P<0,01$ ) y notablemente potenciada por colchicina ( $P<0,01$ ) (Figura 13). Estos resultados sugieren distintos requerimientos del citoesqueleto en las respuestas citotóxicas inducidas por Clc y Clcat.



**Figura 13.** Efecto de la citocalasina B y de la colchicina sobre la citotoxicidad mediada por neutrófilos inducida por Clcat. Los neutrófilos ( $2 \times 10^5$ ) fueron incubados en presencia de  $1 \mu\text{g/ml}$  de citocalasina B,  $25 \mu\text{g/ml}$  de colchicina o medio de cultivo sólo durante 5 minutos a  $37^\circ\text{C}$ . Posteriormente fueron empleados en ensayos de citotoxicidad desarrollados enfrentandolos con células blanco durante 18 horas a  $37^\circ\text{C}$ , en presencia de CI solubles preparados con IgGh y anticuerpos IgG de conejo anti-IgGh, nativos (Clc) o cationizados (Clcat). Los resultados están expresados como la media aritmética  $\pm$  ES de 5 experimentos diferentes realizados por triplicado.

4.2.1.4.- Papel de los diferentes RFcy en la citotoxicidad mediada por neutrófilos inducida por Clcat

La participación de los RFcy en la citotoxicidad inducida por Clc y Clcat fue evaluada empleando el AcM IV.3 y el fragmento F(ab')<sub>2</sub> del AcM 3G8. Dado que los Clc indujeron niveles muy bajos de citotoxicidad, algunos experimentos fueron realizados en presencia de azida sódica con el objeto de incrementar las respuestas citotóxicas. La citotoxicidad inducida por Clcat fue completamente inhibida por el tratamiento con el AcM IV.3 ( $P < 0,01$ ) sin ser modificada por el fragmento F(ab')<sub>2</sub> del AcM 3G8 (Tabla 8). Estos resultados indican que el RFcyII es el responsable de la inducción de citotoxicidad. Por el contrario, la respuesta inducida por Clc, en presencia o ausencia de azida, fue significativamente inhibida ( $P < 0,01$ ) por los dos AcM (Tabla 8), lo que sugiere la participación de ambos RFcy en su inducción.

**Tabla 8.** Rol de los diferentes RFcy en la citotoxicidad de neutrófilos inducida por CI cationizados.

CI empleado como estímulo	Conc.	AcM agregado	% Citotoxicidad	n
Ninguno		Ninguno	3±1	15
IgGh-IgGc anti-IgGh con				
Anticuerpo nativo	200 µg/ml	Ninguno	13±2	9
“	“	F(ab') <sub>2</sub> 3G8	7±2	9
“	“	IV.3	4±2	9
Anticuerpo nativo + azida sódica (1mM)	200 µg/ml	Ninguno	31±5	5
“		F(ab') <sub>2</sub> 3G8	19±3	5
“	“	IV.3	14±3	5
Anticuerpo cationizado	20 µg/ml	Ninguno	68±4	6
“		F(ab') <sub>2</sub> 3G8	73±5	6
“	“	IV.3	6±3	6

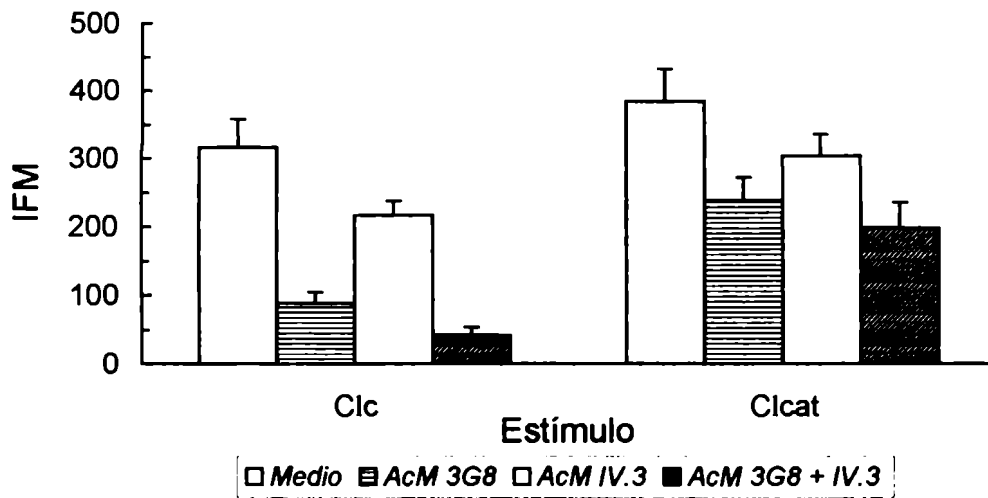
Los neutrófilos fueron incubados durante 30 minutos a 37°C en presencia del fragmento F(ab')<sub>2</sub> del AcM 3G8 o del AcM IV3. Luego las células fueron estimuladas con CI solubles preparados con IgG humana y anticuerpos IgG de conejo anti-IgG humana, nativos (CIc) o cationizados (CIcat). Los ensayos de citotoxicidad fueron desarrollados incubando células efectoras y células blanco durante 18 horas a 37°C. Los resultados están expresados como la media aritmética ± ES de *n* dadores evaluados por triplicado.

Al ser estimulados con IFN $\gamma$ , los neutrófilos neosintetizan y expresan sobre su superficie el RFc $\gamma$ I (CD64) (9). Estudios previos realizados en nuestro laboratorio, han demostrado que el RFc $\gamma$ I no está involucrado en la citotoxicidad inducida por CIc (181). A fin de determinar la posible participación del RFc $\gamma$ I en la inducción de la citotoxicidad por CIcat, los neutrófilos fueron preincubados con 100 U/ml de IFN $\gamma$  durante 18 hs a 37°C, evaluándose luego la contribución del RFc $\gamma$ I mediante el empleo de dos AcM dirigidos contra distintos epitopes del RFc $\gamma$ I, el AcM 32.2 y el AcM 197. El tratamiento con IFN $\gamma$  no incrementó la citotoxicidad inducida por CIcat (10  $\mu$ g/ml). La misma tampoco fue modificada por el tratamiento conjunto con dichos AcM (% inhibición <10, n=5), siendo prácticamente suprimida por el AcM IV.3 (% inhibición=83±6, n=5).

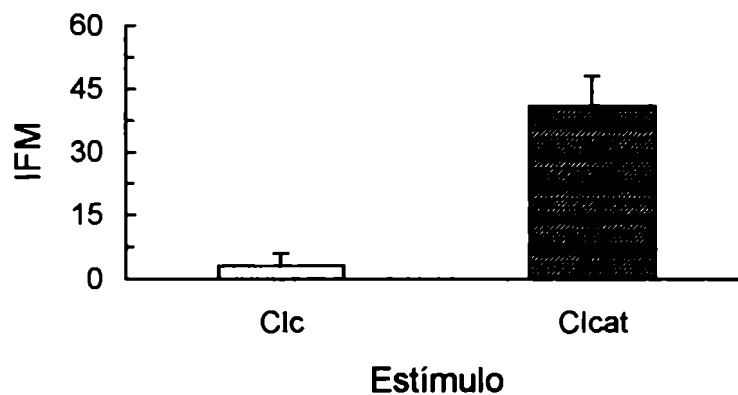
#### 4.2.1.5.- Unión de CIcat a la superficie del neutrófilo

Las proteínas cationizadas tienden a unirse con mayor eficiencia que las nativas a las superficies celulares a través del establecimiento de interacciones que involucran sus grupos cargados positivamente y moléculas con carga negativa expresadas sobre la membrana celular (182-184). La mayor capacidad citotóxica exhibida por los CIcat podría ser consecuencia de su habilidad para interactuar con gran avidez con la superficie del neutrófilo merced al establecimiento de interacciones electroestáticas no específicas. A fin de testear esta hipótesis, se evaluó la capacidad de los AcM dirigidos contra el RFc $\gamma$ II y el RFc $\gamma$ III de bloquear la unión de los CIc y CIcat a la superficie del neutrófilo. La unión de los CIc fue prácticamente anulada por el pretratamiento de los neutrófilos con el AcM IV.3 y el fragmento F(ab')<sub>2</sub> del AcM 3G8 ( $P<0,01$ ) (*Figura 14*), señalando la naturaleza específica de la unión. Por el contrario, la unión de los CIcat fue sólo parcialmente inhibida por el bloqueo conjunto de ambos receptores ( $P<0,05$ ) (*Figura 14*), lo que sugiere la participación de mecanismos adsorptivos inespecíficos en su unión a las membranas celulares. Este hecho fue confirmado al determinar que los timocitos murinos, que no

expresan mayoritariamente RFcy (10), fueron capaces de unir cantidades relativamente altas de Clcat (Figura 15).



**Figura 14.** Inhibición de la unión de CI por AcM dirigidos contra los RFcy. Los neutrófilos ( $5 \times 10^6$ ) fueron incubados durante 30 minutos a  $4^\circ\text{C}$  con fragmentos  $\text{F(ab')}_2$  del AcM 3G8, el AcM IV.3, fragmentos  $\text{F(ab')}_2$  del AcM 3G8 más el AcM IV.3 o con medio de cultivo sólo. Luego fueron lavados e incubados durante 30 minutos a  $4^\circ\text{C}$  con CI solubles preparados con IgGh e IgGc anti-IgGh nativa (Clc) o cationizada (Clcat). Posteriormente, la unión de los mismos fue revelada por incubación con el fragmento  $\text{F(ab')}_2$  de IgGc anti-IgGh conjugada con ITCF. Los datos están expresados como valores medios de intensidad de fluorescencia específica  $\pm$  ES de 5 dadores.



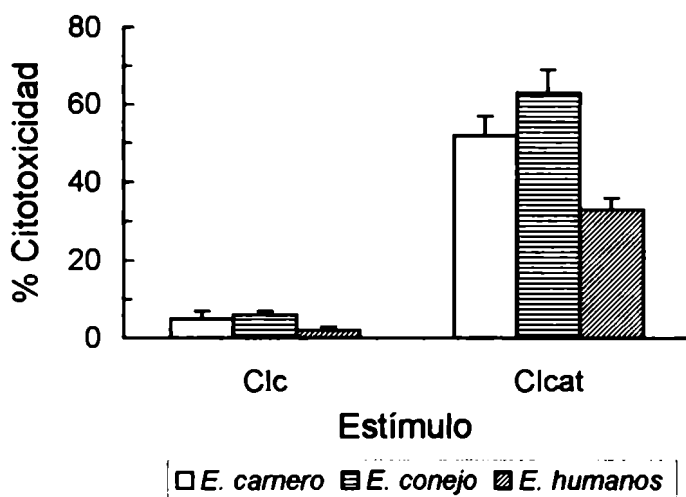
**Figura 15.** Unión de Clcat a timocitos murinos. Los timocitos ( $2 \times 10^6$ ) fueron incubados durante 30 minutos a  $4^\circ\text{C}$  con CI solubles preparados con IgGh e IgGc anti-IgGh nativa (Clc) o cationizada (Clcat). Posteriormente fueron lavados y la unión de los CI fue revelada por incubación con fragmentos  $\text{F(ab')}_2$  de IgGc anti-IgGh conjugada con ITCF. Los datos están expresados como valores medios de intensidad de fluorescencia específica  $\pm$  ES de 3 dadores. Significación estadística:  $P < 0,01$ , Clcat vs Clc.



#### 4.2.1.6.- Citotoxicidad mediada por monocitos inducida por C<sub>1</sub>c

En continuidad con los estudios previos, se evaluó si, tal como se había observado con neutrófilos, los C<sub>1</sub>c<sub>at</sub> eran capaces de inducir niveles altos de citotoxicidad mediados por monocitos. Los experimentos fueron realizados empleando tres tipos diferentes de CI solubles, preparados con: (1) IgGh nativa como antígeno y anticuerpos IgGc anti-IgGh nativos (*pI*: 5,8-8,2) o cationizados (*pI*>9,1), (2) SAB y anticuerpos IgGc anti-SAB nativos (*pI*: 5,8-8,2) o cationizados (*pI*>9,1) y (3) IgGh nativa (*pI*: 5,8-8,2) o cationizada (*pI*>9,1) y anticuerpos IgGc anti-IgGh nativos. Los resultados obtenidos (*Figura 16* y *Tabla 9*) indican que los C<sub>1</sub>c<sub>at</sub> indujeron niveles de citotoxicidad marcadamente superiores a los obtenidos con C<sub>1</sub>c ( $P < 0,01$ ), aún cuando éstos fueran empleados a concentraciones de diez a cincuenta veces mayores.

En forma similar a lo observado con neutrófilos, el tratamiento con catalasa (200 µg/ml) inhibió notablemente la citotoxicidad inducida tanto por C<sub>1</sub>c como C<sub>1</sub>c<sub>at</sub> (% inhibición > 86 en todos los casos,  $P < 0,01$ ,  $n=10$ ), mientras que la SOD (200 µg/ml) y la catalasa inactivada por calor no ejercieron efectos. Estos hallazgos sugieren un papel fundamental del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la citotoxicidad inducida tanto por C<sub>1</sub>c como por C<sub>1</sub>c<sub>at</sub>.



**Figura 16.** Citotoxicidad mediada por monocitos inducida por C<sub>1</sub>c<sub>at</sub> contra distintos tipos de células blanco. Los ensayos de citotoxicidad fueron desarrollados enfrentando monocitos y eritrocitos de distintas especies como células blanco durante 18 horas a 37°C en presencia de CI preparados con IgGc anti-IgGh e IgGh nativa (C<sub>1</sub>c) o cationizada (C<sub>1</sub>c<sub>at</sub>). Los resultados están expresados como la media aritmética ± ES de 5 experimentos diferentes realizados por triplicado.

**Tabla 9.** Citotoxicidad de monocitos inducida por Cícat.

Estímulo empleado	Conc.	% Citotoxicidad	<i>n</i>
Ninguno		5±1	14
IgGc anti-IgGh cationizada	20 µg/ml	5±1	11
CI: IgGh-IgGc anti-IgGh con			
IgGc nativa	200 µg/ml	16±3	8
“	20 µg/ml	5±2	8
“	4 µg/ml	5±1	8
IgGc cationizada	20 µg/ml	84±4	8
“	4 µg/ml	28±4	8
IgGc anti-SAB cationizada	20 µg/ml	4±1	3
CI: SAB-IgGc anti-SAB con			
IgGc nativa	20 µg/ml	5±1	3
“	4 µg/ml	5±2	3
IgGc cationizada	20 µg/ml	51±6	3
“	4 µg/ml	11±4	3

Los CI solubles fueron preparados con IgGh y anticuerpos IgG de conejo anti-IgGh, nativos o cationizados o SAB y anticuerpos IgG de conejo anti-SAB, nativos o cationizados, en 5x exceso de antígeno. Los ensayos de citotoxicidad fueron desarrollados enfrentando neutrófilos y células *blanco* por 18 horas a 37°C. Los resultados están expresados como la media aritmética ± ES de *n* experimentos diferentes realizados por triplicado.

#### 4.2.1.7.- Respuesta QL mediada por neutrófilos y monocitos inducida por Cícat

Los resultados descriptos en los párrafos previos, indican que las respuestas citotóxicas inducidas por Cíc y Cícat involucran la generación de IRO. Las diferencias en la magnitud de las respuestas observadas en cada caso podrían reflejar diferentes capacidades de los Cíc y los Cícat de inducir la activación del estallido respiratorio. Este aspecto fue analizado evaluando la respuesta QL como indicador general de la producción de IRO. Los resultados obtenidos (*Tabla 10*) muestran que la emisión de luz por neutrófilos y monocitos

fue marcadamente superior cuando las células se estimularon con C<sub>icat</sub> ( $P < 0,01$ ), aún cuando estos fueron empleados a concentraciones diez veces menores respecto de los C<sub>Ic</sub>.

Posteriormente se determinó el papel de los diferentes RF<sub>cγ</sub> expresados por neutrófilos en la inducción de QL. En acuerdo con las observaciones referidas a la inducción de citotoxicidad, la QL inducida por C<sub>icat</sub> fue dependiente del RF<sub>cγ</sub>II, mientras que la inducida por C<sub>Ic</sub> fue mediada a través del RF<sub>cγ</sub>II y del RF<sub>cγ</sub>III (Tabla 10).

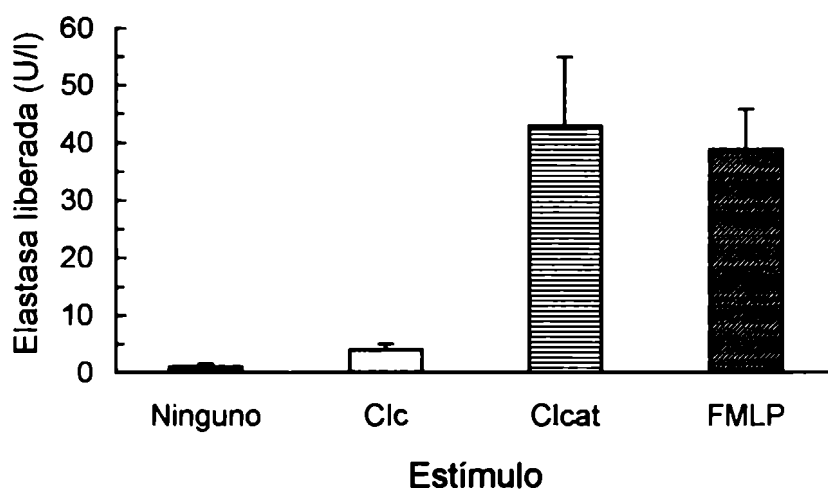
**Tabla 10.** Emisión de QL por neutrófilos y monocitos estimulados por C<sub>icat</sub>.

Estímulo empleado	Conc. (µg/ml)	AcM	QL mediada por (URQL)			
			Neutrófilos	<i>n</i>	Monocitos	<i>n</i>
Ninguno			0,3±0,3	20	0,2±0,3	20
IgGh cationizada	100	-	0,3±0,4	13	0,3±0,4	15
C <sub>Ic</sub>	100	-	3,4±1,7	9	2,8±1,4	12
“	100	3G8	1,6±1,1	4	ND	-
“	100	IV.3	1,2±0,9	4	0,9±0,6	3
“	100	3G8 + IV.3	0,3±0,3	4	ND	-
C <sub>icat</sub>	100	-	17,6±3,2	9	14,2±2,4	12
“	10	-	11,4±2,3	6	9,6±2,7	6
“	100	3G8	18,8±4,2	4	ND	-
“	100	IV.3	1,7±2,1	4	3,9±1,8	3

Los CI solubles fueron preparados con anticuerpos IgG de conejo anti-IgG humana nativos e IgG humana nativa (C<sub>Ic</sub>) o cationizada (C<sub>icat</sub>). La señal máxima de QL registrada en los 10 minutos posteriores a la estimulación fue expresada en unidades relativas de QL (URQL). En algunos casos, las células fueron incubadas durante 30 min a 4°C con fragmentos F(ab')<sub>2</sub> del AcM 3G8 y/o el AcM IV.3, antes del añadido del estímulo. Los resultados se expresan como la media aritmética ± ES de *n* experimentos diferentes realizados por duplicado. ND: No determinado.

#### 4.2.1.8.- Liberación extracelular de elastasa por neutrófilos estimulados con Clcat

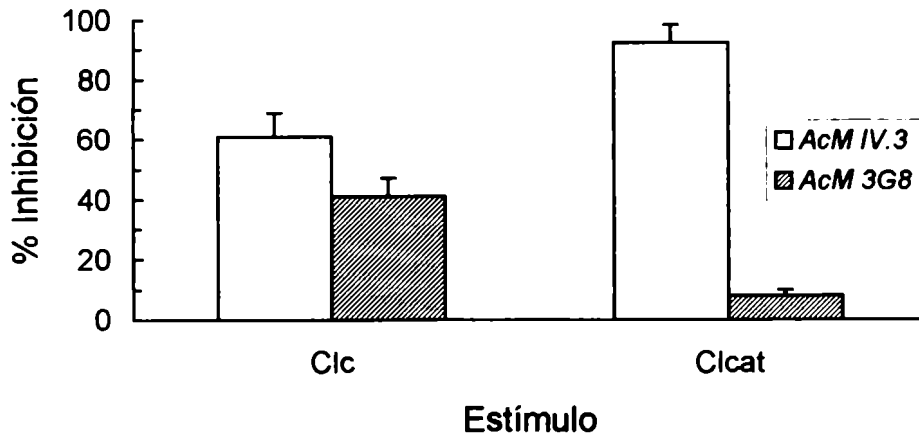
Como se mencionó previamente, el rol fisiológico de la elastasa leucocitaria, incluye la degradación de microorganismos invasores en las vacuolas fagocíticas y la locomoción y penetración de los neutrófilos en los tejidos periféricos. Sin embargo, se considera que junto a los IRO, la elastasa cumple también un rol relevante en el daño tisular mediado por neutrófilos (58,77,185). La habilidad de los Clcat de inducir la liberación de elastasa, constituiría una medida apropiada de su capacidad de activar mecanismos citotóxicos independientes del oxígeno. Los resultados obtenidos (*Figura 17*) muestran que la liberación de elastasa inducida por Clcat fue significativamente superior a la inducida por Clc ( $P<0,01$ ), alcanzando niveles similares a los observados por acción del FMLP ( $10^{-6}M$ ), que constituye un potente inductor de la degranulación de neutrófilos.



**Figura 17.** Liberación de elastasa por neutrófilos estimulados por Clcat. La liberación de elastasa en células preincubadas con citocalasina B ( $1\mu g/ml$ ), fue inducida por  $100\mu g/ml$  de CI solubles preparados con anticuerpos IgG de conejo nativos e IgG humana, nativa (Clc) o cationizada (Clcat) o por FMLP ( $10^{-6}M$ ). Los resultados están expresados como la media aritmética  $\pm$  ES de 8 experimentos diferentes realizados por triplicado.

Por otra parte, al igual que lo observado en relación a la inducción de citotoxicidad y QL, la liberación de elastasa inducida por Clcat fue inhibida por el AcM IV.3 ( $P<0,01$ ), pero no por el fragmento  $F(ab')_2$  del AcM 3G8 (*Figura 18*). Por el contrario, la liberación

de elastasa inducida por Clc fue significativamente inhibida por ambos AcM ( $P < 0,01$ ) (Figura 18).



**Figura 18.** Efecto de los AcM anti-RFcys sobre la liberación de elastasa inducida por Clcat. Los neutrófilos fueron incubados durante 30 min a 4°C con fragmentos F(ab')<sub>2</sub> del AcM 3G8 o con el AcM IV.3. Luego, fueron incubados con citocalasina B (1µg/ml) y la liberación de elastasa fue inducida por CI solubles preparados con anticuerpos IgG de conejo nativos e IgG humana, nativa (Clc) o cationizada (Clcat). Los resultados están expresados como la media aritmética ± ES de 4 experimentos diferentes realizados por triplicado.

#### **4.2.2.- Activación de plaquetas humanas inducida por CI preparados con IgG humana cationizada**

La interacción de los CI con el RFcyII expresado en plaquetas (186,187), es capaz de inducir la agregación plaquetaria y la liberación del contenido de sus gránulos específicos (188-191). Independientemente de estas observaciones realizadas *in vitro*, el rol fisiopatológico del RFcyII plaquetario, no ha sido aún establecido. A diferencia del papel de los RFcy expresados en fagocitos, su posible participación tanto en la respuesta inmune anti-infecciosa, como así también en fenómenos hemostáticos y/o de autoinmunidad, constituye un interrogante abierto.

Diferentes autoanticuerpos presentes en el suero de pacientes con LES han sido caracterizados. Entre ellos, aquellos con especificidad por ADN y por fosfolípidos aniónicos han recibido una atención particular (192,193). Numerosos trabajos han establecido la existencia de reactividad cruzada entre ambas familias de anticuerpos (169-

171). Como se mencionó previamente, los anticuerpos anti-ADN, especialmente aquellos que presentan altos  $pI$ , parecen jugar un papel fundamental en la patogénesis de la glomerulonefritis y tal vez en otras manifestaciones autoinmunes del LES (169-171). Por otra parte, los anticuerpos anti-fosfolípidos, participan en la inducción de fenómenos tromboembólicos asociados al LES y a otras patologías de naturaleza autoinmune (169-171). Dentro de los mismos, se ha identificado a una subfamilia de anticuerpos con altos  $pI$  (Ruiz Arguelles, Universidad de Puebla, México, comunicación personal). Considerando: (a) la marcada eficiencia que presentan los CI preparados con anticuerpos cationizados de inducir la activación de células fagocíticas a través de los RFcy, (b) la presencia de anticuerpos catiónicos en el suero de pacientes con manifestaciones tromboembólicas, y (c) la prevalencia de fenómenos de agregación plaquetaria en dichas manifestaciones, se evaluó el impacto de la carga eléctrica de los anticuerpos IgG sobre la capacidad de los CI de inducir la activación de plaquetas humanas. Para ello se emplearon, en todos los casos, CI solubles preparados en 5 veces exceso de antígeno, con anticuerpos IgGc anti-IgGh e IgGh nativa (CIc) o cationizada (CIcat).

#### 4.2.2.1.- Determinación del tamaño molecular de los CI preparados con IgG humana cationizada

El tamaño molecular de los CIc y CIcat fue determinado por ultracentrifugación en gradientes de densidad de sacarosa. Confirmando resultados preliminares obtenidos por técnicas de tamizaje molecular (datos no mostrados), no se observaron diferencias en el tamaño molecular de ambos tipos de CI (*Figura 19*). Por otra parte, en concordancia con lo expuesto por otros autores (142,144,177), se determinó que la IgG permanece en estado monomérico luego del procedimiento de cationización (*Figura 19*).

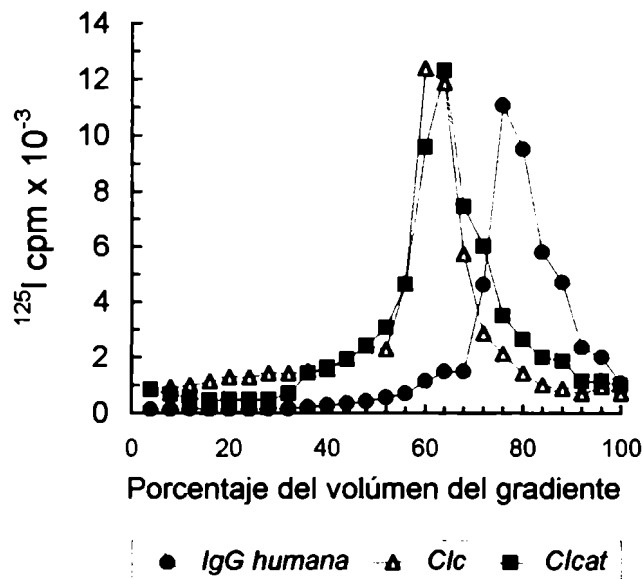
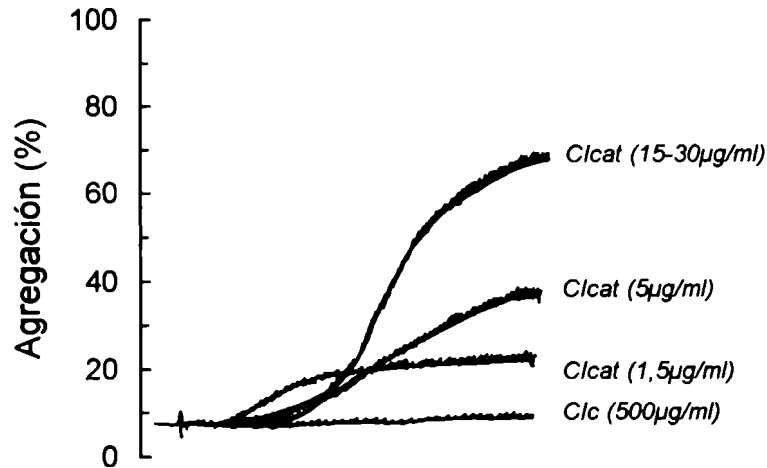


Figura 19. Comparación del tamaño molecular de los Clc y Clcat por ultracentrifugación en gradientes continuos de sacarosa. Los CI fueron preparados en 5 veces exceso de antígeno empleando anticuerpos IgG de conejo anti-IgGh e IgG humana nativa (Clc) o cationizada (Clcat).

4.2.2.2.- Activación plaquetaria inducida por Clc y Clcat evaluada en plasma rico en plaquetas (PRP)

Empleando PRP se analizó, en primera instancia, la capacidad de los Clcat de inducir la agregación plaquetaria. Los resultados obtenidos (Figura 20A) demostraron que los mismos constituyen potentes agonistas plaquetarios. Es importante destacar que las respuestas descriptas fueron inducidas empleando muy bajas concentraciones de Clcat (1,5-30  $\mu\text{g/ml}$ ) y un número fisiológico de plaquetas ( $3 \times 10^8/\text{ml}$ ). Los Clc, por el contrario, fueron incapaces de inducir niveles significativos de agregación, aún al emplearse en concentraciones tan altas como 500  $\mu\text{g/ml}$  (Figura 20).



**Figura 20.** Agregación plaquetaria inducida por Clcat en PRP. Las concentraciones de Clc y Clcat indicadas entre paréntesis fueron añadidas al PRP (400 µl,  $3 \times 10^8$  plaquetas/ml). La figura muestra un experimento representativo de los 15 realizados.

La preincubación de las plaquetas durante un minuto con 5mM de EDTA (n=5) o 1µg/ml de Prostaglandina E1 (n=4) suprimió la agregación inducida por 15-30µg/ml de Clcat (% inhibición > 90%). Ello indica que la respuesta observada constituye un fenómeno metabólicamente activo, es decir, no representa aglutinación plaquetaria. La IgG cationizada no tuvo efectos *per se* sobre la agregación plaquetaria, aún cuando fuera empleada a concentraciones tan elevadas como 200µg/ml.

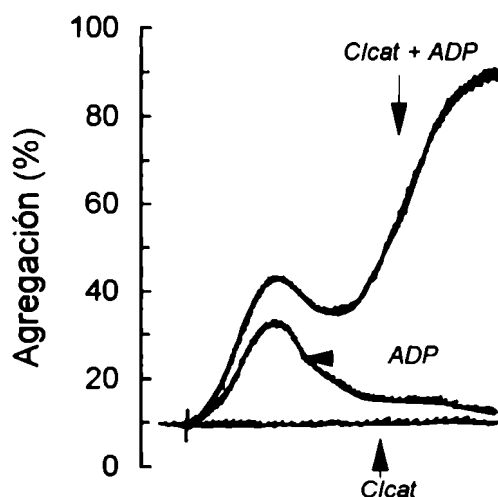
Posteriormente, se analizó la capacidad de los Clcat de actuar como agentes *primantes* de respuestas plaquetarias inducidas por los agonistas habituales. La preincubación del PRP con concentraciones de Clcat inferiores a las requeridas para inducir la agregación plaquetaria (0,5-1µg/ml) incrementó marcadamente la agregación inducida por concentraciones subóptimas de ADP, PAF, epinefrina o PMA ( $P < 0,01$ ) (Tabla 11). De hecho, en plaquetas preincubadas con Clcat, la primer ola de agregación inducida por ADP, PAF o adrenalina, fue seguida por una segunda ola de agregación asociada a liberación de ATP (Tabla 11 y Figura 21). La preincubación del PRP con Clc se mostró, por el contrario, incapaz de potenciar las respuestas inducidas por los mismos agonistas.



**Tabla 11.** Potenciación por preincubación con Cícat de la agregación plaquetaria y de la liberación de ATP inducida por diferentes agonistas.

Cí cat	Respuesta plaquetaria			
	Agregación		Liberación de ATP	
	-	+	-	+
ADP (0,25-0,50 $\mu$ M)	22 $\pm$ 3 (10)	59 $\pm$ 3 (10)	0 (4)	2,3 $\pm$ 0,4 (4)
Epinefrina (0,5-1 $\mu$ M)	10 $\pm$ 2 (4)	69 $\pm$ 9 (4)	0 (4)	2,7 $\pm$ 0,1 (4)
PAF (5-10nM)	17 $\pm$ 3 (4)	64 $\pm$ 9 (4)	0 (4)	2,0 $\pm$ 0,4 (4)
PMA (50-150nM)	9 $\pm$ 2 (4)	63 $\pm$ 4 (4)	ND	ND

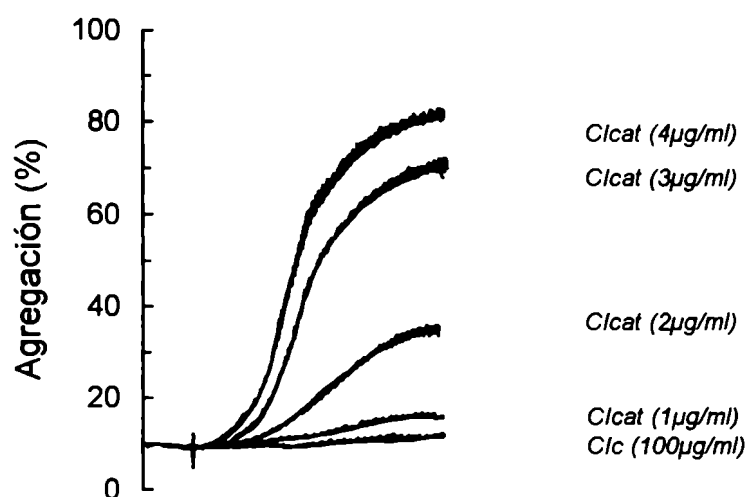
Una suspensión de 400  $\mu$ l de PRP ( $3 \times 10^8$  plaquetas/ml) fue incubada durante 1 minuto a 37°C en presencia (+) o ausencia (-) de concentraciones de Cícat inferiores a las necesarias para inducir la agregación (0,5-1  $\mu$ g/ml). Luego, la agregación plaquetaria y la liberación de ATP fue inducida por concentraciones subumbrales de diferentes agonistas. Los resultados son expresados como porcentajes, referidos a los niveles máximos de agregación plaquetaria y  $\mu$ moles of ATP liberados. Los valores representan la media aritmética  $\pm$  ES de (n) experimentos diferentes. ND: no determinado



**Figura 21.** Efecto de concentraciones subóptimas de Cícat sobre la agregación inducida por ADP. El PRP (400 $\mu$ l,  $3 \times 10^8$  plaquetas/ml) fue incubado durante 1 minuto a 37°C con concentraciones de Cícat inferiores a las requeridas para inducir agregación (0,5 $\mu$ g/ml). Luego, la agregación plaquetaria fue inducida por concentraciones subumbrales de ADP (0,5 $\mu$ M). Se indican también las respuestas de agregación inducidas por Cícat (0,5 $\mu$ g/ml) o ADP (0,5 $\mu$ M) sólo. La figura muestra un experimento representativo de los 5 realizados.

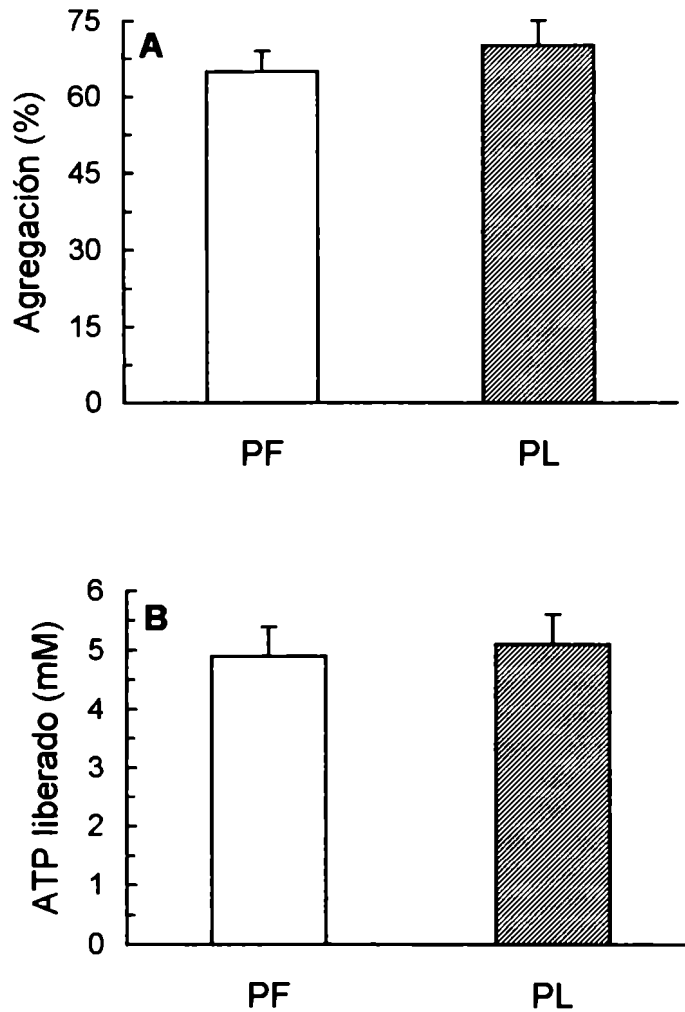
#### 4.2.2.3.- Activación de plaquetas lavadas (PL) o filtradas en geles (PF) por C1c y C1cat

Se examinó luego, la capacidad de los C1cat de estimular la activación de PL. Se evaluó no sólo la agregación plaquetaria, sino también otros parámetros de activación tales como la liberación de ATP y la producción de Tromboxano B<sub>2</sub> (TXB<sub>2</sub>). Los C1cat, aún empleados a muy bajas concentraciones (1-4µg/ml), indujeron una potente agregación de PL, resuspendidas a concentraciones fisiológicas (*Figura 22*). Bajo similares condiciones los C1c fueron incapaces de inducir la agregación de PL (*Figura 22*). Sólo se observaron niveles significativos de agregación (% de agregación: 35±2, n=5) al emplear simultáneamente altas concentraciones de plaquetas (9 x 10<sup>8</sup>/ml) y C1c (500µg/ml) ( $P < 0,05$ ).



**Figura 22.** Agregación de PL inducida por C1cat. Las PL (400µl, 3 x 10<sup>8</sup>/ml) fueron estimuladas con C1c y C1cat a las concentraciones indicadas. La figura muestra los resultados correspondientes a un experimento representativo de los 15 realizados.

Considerando que el proceso de lavado podría preactivar a las plaquetas, tornándolas susceptibles a ser activadas por concentraciones subóptimas de agonistas, se decidió evaluar el efecto de los C1cat sobre PF. Los C1cat indujeron agregación y liberación de ATP en niveles similares a los observados empleando PL (*Figura 23 A y B*). La preincubación de las plaquetas con EDTA (5mM, n=4) o Prostaglandina E1 (1µg/ml, n=4) suprimió la respuesta de agregación y la liberación de ATP estimuladas por C1cat (4µg/ml) tanto con PL como con PF (% inhibición > 92%, en todos los casos).



**Figura 23.** (A) Agregación de PF y de PL inducida por Cícat. (B) Liberación de ATP por PL y por PF inducida por Cícat. Las PL y las PF (400 $\mu$ l,  $3 \times 10^8$ /ml) fueron estimuladas con 4-5 $\mu$ g/ml de Cícat. Los resultados están expresados como la media aritmética  $\pm$  ES de 4 (A) o 5 (B) experimentos diferentes.

La agregación plaquetaria inducida por los Cícat estuvo asociada a la producción de TXB<sub>2</sub> (Tabla 12). Al emplearse bajas concentraciones de Cícat (1-1,5 $\mu$ g/ml), ambas respuestas fueron completamente inhibidas por preincubación con *aspirina* ( $P < 0,01$ ) (Tabla 12). Por el contrario, a altas concentraciones de Cícat (4-5 $\mu$ g/ml), la agregación se mostró levemente disminuída ( $P < 0,05$ ), mientras que la producción de TXB<sub>2</sub> fue completamente suprimida ( $P < 0,01$ ) (Tabla 12).

**Tabla 12.** Agregación de plaquetas lavadas y producción de  $\text{TxB}_2$  inducida por Cícat. Inhibición por aspirina.

	Respuesta plaquetaria			
	Agregación		Producción de $\text{Tx B}_2$	
Aspirina	-	+	-	+
Control	0	0	<0,6	ND
Cícat (1-1,5 $\mu\text{g/ml}$ )	30 $\pm$ 9	4 $\pm$ 2	25 $\pm$ 11	<0,6
Cícat (4-5 $\mu\text{g/ml}$ )	70 $\pm$ 5	58 $\pm$ 2	62 $\pm$ 4	<0,6
AA (0,3mM)	73 $\pm$ 4	0	241 $\pm$ 70	<0,6

Una suspensión de 400  $\mu\text{l}$  de plaquetas lavadas ( $3 \times 10^8$  plaquetas/ml) fue incubada durante 3 minutos a temperatura ambiente en presencia (+) o ausencia (-) de aspirina (1 $\mu\text{M}$ ). Luego, la agregación plaquetaria y la liberación de  $\text{TXB}_2$  fueron inducidas por las concentraciones indicadas de Cícat o ácido araquidónico (AA). Los resultados están expresados como porcentajes de agregación y ng/ml de  $\text{TXB}_2$ . Cada valor representa la media aritmética  $\pm$  ES de 5 experimentos. ND: No determinado.

#### 4.2.2.4.- Inhibición por polianiones de la agregación plaquetaria inducida por Cícat

La notable capacidad de los Cícat de inducir activación plaquetaria podría ser explicada, al menos parcialmente, por un incremento en la afección de los CI por el  $\text{RFcyII}$ , debido a interacciones electrostáticas inespecíficas establecidas entre los grupos cargados positivamente expresados en los Cícat y los fosfolípidos aniónicos de la superficie plaquetaria. Para testear esta hipótesis, se estudió la capacidad de distintos compuestos polianiónicos de inhibir la activación plaquetaria estimulada por Cícat. El pretratamiento de PL con heparina suprimió la agregación inducida por Cícat, sin modificar las respuestas inducidas por ácido araquidónico, PAF o trombina (Tabla 13).

**Tabla 13.** Efecto de la heparina sobre la agregación plaquetaria inducida por C1cat.

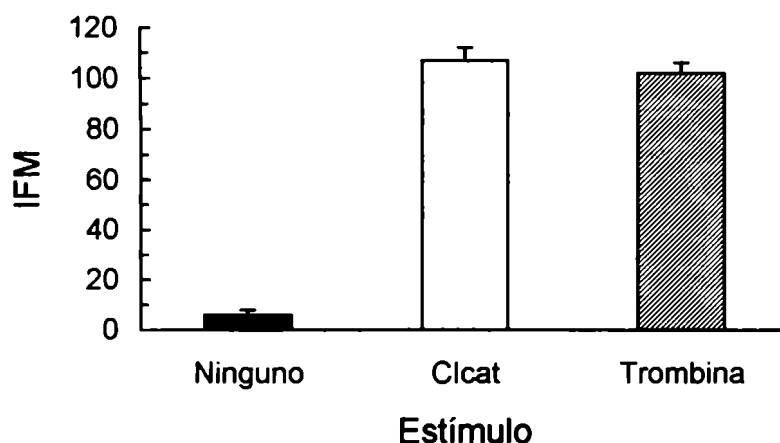
% Inhibición por	Estímulo			
	C1cat	AA	PAF	Trombina
Heparina	95±2	6±2	3±1	7±1

Las PL (400µl,  $3 \times 10^8$ /ml) fueron preincubadas durante 1 minuto a 37°C con heparina (0,05U/ml). Luego, la agregación plaquetaria fue inducida con 4µg/ml de C1cat, 0,3mM de AA, 5nM de PAF o 1U/ml de trombina. Los resultados están expresados como la media aritmética ± ES de 5 experimentos diferentes.

La acción de la heparina se correlacionó con una disminución marcada en la unión de los C1cat a la superficie plaquetaria, evidenciada por citometría de flujo (% inhibición: 67±8, n=5). Se obtuvieron resultados similares al ensayar el efecto de un segundo polianión, el dextrán sulfato (20µg/ml), sobre la agregación plaquetaria inducida por 4µg/ml de C1cat (% inhibición: 96±6, n=5).

#### 4.2.2.5.- Estimulación de la expresión de P-selectina por C1 preparados con IgG cationizada

Con el objeto de analizar si la activación plaquetaria inducida por C1cat, requería la interacción plaqueta-plaqueta, se evaluó como marcador de activación temprano, la expresión de P-selectina en un sistema sin agitación. Bajo estas condiciones se observó que, aún en ausencia de agregación plaquetaria, los C1cat fueron capaces de inducir un marcado incremento en la expresión de P-selectina ( $P<0,01$ ) (Figura 24).



**Figura 24.** Expresión de P-selectina por plaquetas estimuladas con Clcat. Una suspensión de 400 $\mu$ l de PF ( $3 \times 10^8$ /ml) fue incubada en presencia de 4 $\mu$ g/ml de Clcat o 1U/ml de trombina durante 10 minutos a 37°C sin agitación. Luego las PF fueron incubadas con un AcM anti-P-selectina durante 30 minutos y la unión fue revelada con un anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón conjugado con ITCF. Los resultados están expresados como la media aritmética  $\pm$  ES de 4 experimentos diferentes.

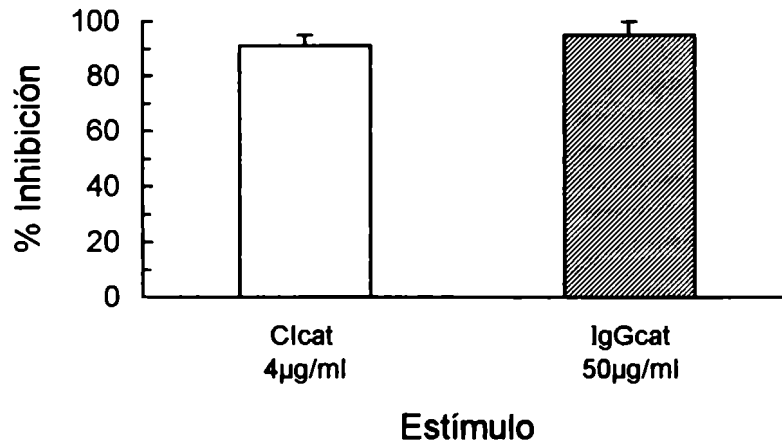
#### 4.2.2.6.- Agregación plaquetaria inducida por IgG cationizada

A diferencia de los resultados obtenidos empleando neutrófilos y monocitos se encontró, de modo inesperado, que la IgG humana cationizada era capaz *per se* de inducir agregación de PL. Sin embargo, las concentraciones de IgGcat necesarias para inducir un 50% del valor máximo de agregación ( $18,2 \pm 0,8 \mu\text{g/ml}$ ), demostraron ser 8 veces superiores a las requeridas para alcanzar la misma respuesta empleando Clcat como estímulo ( $2,3 \pm 0,3 \mu\text{g/ml}$ ). Otras proteínas cationizadas, tales como la OA (*pl*: 9,4) o la SAB (*pl*: 9,1) fueron incapaces de inducir activación plaquetaria aún cuando fueran ensayadas a altas concentraciones (200 $\mu$ g/ml).

La agregación inducida por IgGh cationizada (35 $\mu$ g/ml) fue inhibida por 0,05U/ml de heparina (% inhibición:  $95 \pm 4$ , n=4), la cual a su vez suprimió en forma marcada la unión de la IgGh cationizada a la superficie plaquetaria (% reducción en la IFM:  $77 \pm 8$ ,  $P < 0,05$ , n=4).

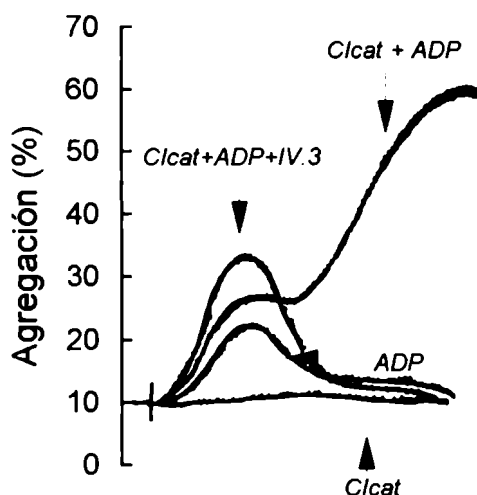
#### 4.2.2.7.- Rol de RFc $\gamma$ II en la agregación plaquetaria inducida por C $\gamma$ cat

Se evaluó luego, la participación del RFc $\gamma$ II en la agregación plaquetaria inducida por C $\gamma$ cat. El pretratamiento de PL con el AcM IV.3, inhibió en forma prácticamente total la agregación inducida por C $\gamma$ cat (*Figura 25*). Se obtuvieron resultados similares al analizar el efecto del IV.3 sobre la agregación inducida por IgGh cationizada (*Figura 25*). La preincubación de PL con IV.3 no modificó las respuestas de agregación inducidas por otros agonistas como el ADP (2,5 $\mu$ M) o el colágeno (1 $\mu$ g/ml) (datos no mostrados). Se obtuvieron resultados similares empleando PRP y 30  $\mu$ g/ml de C $\gamma$ cat como agonista (datos no mostrados).



**Figura 25.** Rol del RFc $\gamma$ II en la agregación plaquetaria inducida por C $\gamma$ cat o IgGcat. Una suspensión de 400 $\mu$ l de PL ( $3 \times 10^8$  plaquetas/ml) fue incubada 20 minutos antes de la adición del estímulo con concentraciones saturantes del AcM IV.3. Luego, la agregación fue inducida con 4 $\mu$ g/ml de C $\gamma$ cat o 50 $\mu$ g/ml de C $\gamma$ cat. Los resultados están expresados como la media aritmética  $\pm$  ES de 3 experimentos diferentes.

Por otra parte, se observó que la preincubación del PRP con IV.3, anuló el sinergismo en la respuesta obtenida con concentraciones subóptimas de ADP y C $\gamma$ cat. De hecho, en presencia de IV.3 no se observó una segunda ola de agregación inducida por la acción conjunta de ambos agonistas, aunque la primer ola causada por el ADP no fue modificada (*Figura 26*).



**Figura 26.** Rol del RFcyII en la agregación plaquetaria inducida por Clcat y ADP. El PRP (400 $\mu$ l,  $3 \times 10^8$  plaquetas/ml) fue incubado 20 minutos antes de la adición del estímulo con concentraciones saturantes del AcM IV.3 a temperatura ambiente. Luego fue incubado durante 1 minuto a 37°C sin agitación con concentraciones no agregantes de Clcat (0,5 $\mu$ g/ml). Posteriormente, la agregación fue inducida con concentraciones subumbrales de ADP (0,5 $\mu$ M). La figura muestra un experimento representativo de los 3 realizados.

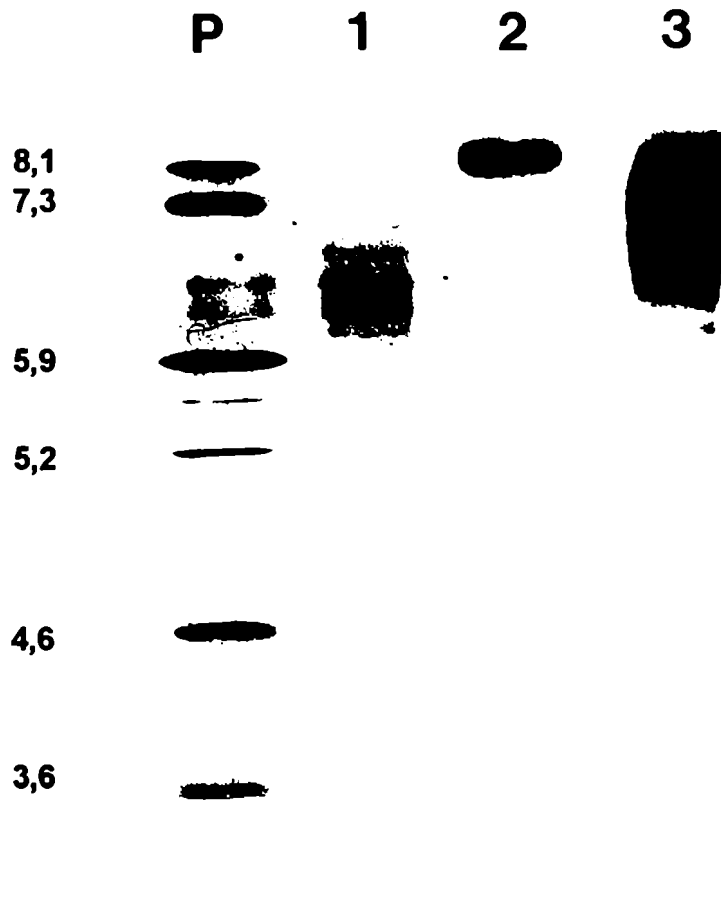
En un grupo adicional de experimentos, se evaluó la habilidad del AcM IV.3 de inhibir la unión de los CI a la superficie plaquetaria. Pese a su capacidad de suprimir la activación plaquetaria inducida por Clcat, el AcM IV.3 sólo indujo una leve reducción de la unión de los Clcat a las plaquetas (% inhibición:  $24 \pm 4$ ,  $P < 0,05$ ,  $n=5$ ).

#### 4.2.3.- Activación de neutrófilos humanos inducida por CI preparados con fracciones aniónicas y catiónicas de anticuerpos de clase IgG nativos

Los resultados expuestos previamente indican que la capacidad agonista de los CI resulta notablemente potenciada al incrementarse los *pI* de las IgG nativas a valores comprendidos en el rango 8,5-10,0. Considerando el alto grado de heterogeneidad presente en los *pI* de las IgG nativas (*pI*: 5,8-8,5), se decidió analizar la posible existencia de diferencias en su actividad, en función de sus valores particulares de *pI*. Con este objetivo se aislaron por técnicas de cromatofocado fracciones aniónicas y catiónicas de anticuerpos IgG a partir de: (1) sueros inmunes obtenidos en conejo y (2) un *pool* de IgG



humana normal. Los *pI* de cada una de las fracciones fueron confirmados por isoelectroenfoque (*Figura 27*).



**Figura 27.** Isoelectroenfoque de las fracciones aniónicas y catiónicas de la IgGh aisladas por cromatofocado a partir de un *pool* de IgGh normal. Calle P, patrones de IEF. Calle 1, fracción aniónica de la IgGh nativa. Calle 2, fracción catiónica de la IgGh nativa.. Calle 3, IgGh total a partir de la cual se aislaron las fracciones aniónica y catiónica.

Un primer grupo de experimentos fue llevado a cabo con CI solubles preparados con anticuerpos IgGc anti-IgGh y la fracción aniónica (*pI*:6,0-6,4) (CIan) o catiónica (*pI*:7,6-8,5) (CIcac) de la IgGh nativa. Se investigó su capacidad de inducir el cambio de forma de neutrófilos humanos, lo que constituye una respuesta temprana de activación leucocitaria (194,195). No se observaron diferencias en la extensión del cambio de forma inducida por los dos tipos de CI (*Figura 28*). La *Figura 29* muestra un experimento representativo de los seis realizados.

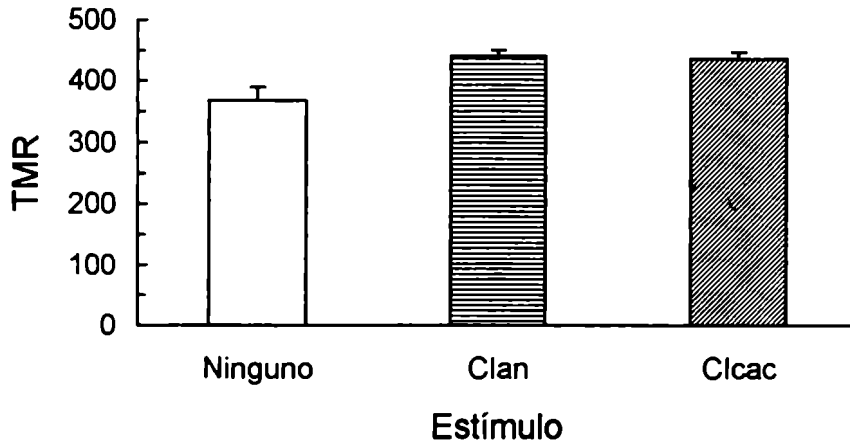


Figura 28. Efecto de los Clan y Clcac sobre el cambio de forma de neutrófilos. El ensayo fue realizado empleando 100µg/ml de CI preparados con fracciones aniónica o catiónica de IgGh nativa y anticuerpos IgGc anti-IgGh. Los resultados están expresados como el tamaño medio relativo (TMR) ± ES de 6 experimentos diferentes.

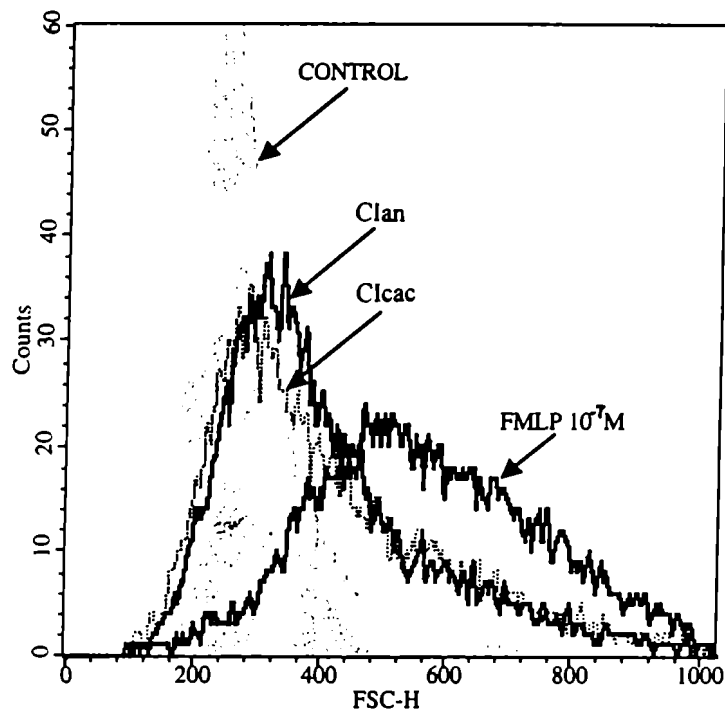


Figura 29. Efecto de los Clan y Clcac sobre el cambio de forma de neutrófilos. El ensayo fue realizado empleando 100µg/ml de CI preparados con fracciones aniónica o catiónica de IgGh nativa y anticuerpos IgGc anti-IgGh. El efecto del FMLP 10<sup>7</sup>M fue evaluado como control positivo. Los histogramas son representativos de un dador de los 6 evaluados.

Empleando los CI solubles descriptos en el párrafo precedente y otros preparados con SAB y la fracción aniónica (*pl*: 5,9-6,2) o catiónica (*pl*: 7,5-7,8) de anticuerpos IgGc anti-SAB, se examinó su capacidad de inducir la emisión de QL y la liberación de elastasa. Los CIc y CIcac indujeron respuestas similares para todas las relaciones antígeno/ anticuerpo analizadas (*Tabla 14*).

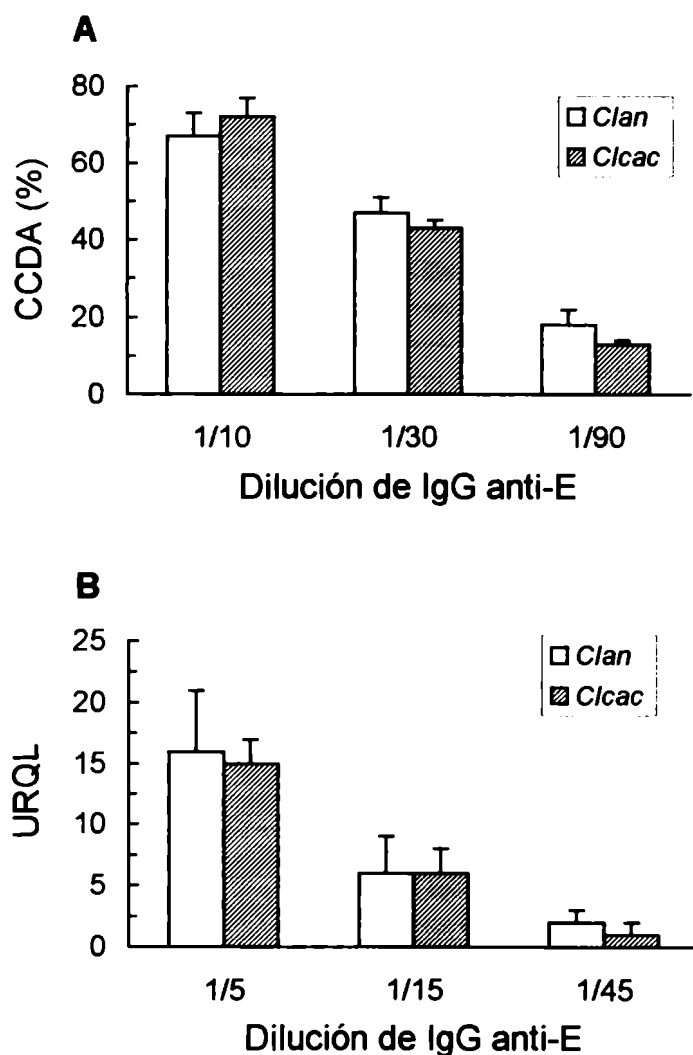
**Tabla 14.** Emisión de QL y liberación de elastasa por CI preparados con fracciones aniónicas y catiónicas de anticuerpos IgG.

		QL inducida por (URQL)		
Tipo de CI soluble		CIan	CIcac	<i>n</i>
IgGc: IgGc anti-IgGh	2X	16±5	14±4	7
	5X	6±4	8±2	7
	10X	5±1	6±2	7
	25X	2±1	3±2	7
SAB: IgGc anti-SAB	5X	6±2	6±2	5
	25X	2±1	3±1	5
		Liberación de elastasa inducida por		
Tipo de CI soluble		CIan	CIcac	<i>n</i>
IgGh: rIgGc anti-IgGh	5X	7±3	5±2	4
SAB: IgGc anti-SAB	5X	2.6±0.5	2.4±0.5	6

Ambas respuestas fueron inducidas por 100µg/ml de CI solubles preparados con fracciones aniónicas (CIan) o catiónicas (CIcac) de IgGh empleada como antígeno e IgGc anti-IgGh o CI formados con SAB y fracciones aniónicas (CIan) o catiónicas (CIcac) de anticuerpos IgGc anti-SAB. Los datos están expresados como la media aritmética ± ES de *n* dadores evaluados por duplicado.

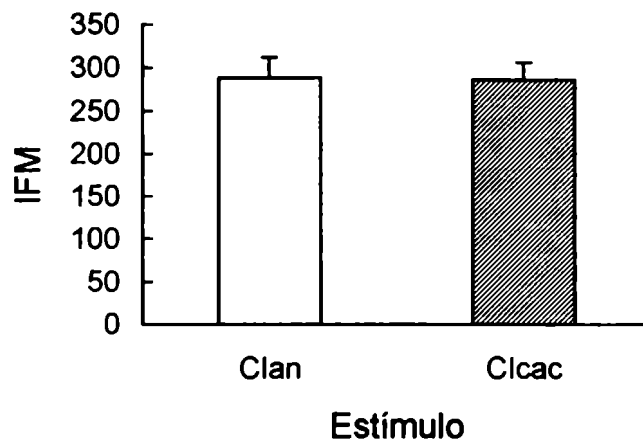
Teniendo en cuenta las diferentes propiedades que presentan los CI solubles y particulados (119,129), se determinó si los CI particulados preparados con anticuerpos IgG nativos de distintos *pl*, presentaban diferencias en su actividad biológica. Como modelo de CI particulado, se emplearon Ep sensibilizados con anticuerpos IgG específicos de conejo correspondientes a las fracciones aniónica (*pl*: 6,3-6,5) o catiónica (*pl*: 7,8-8,0), en títulos

equivalentes. Estos CI fueron utilizados para evaluar su capacidad de estimular la QL y la CCDA mediadas por neutrófilos (*Figura 30*). Los resultados obtenidos indicaron, en acuerdo con lo observado para los CIs, que la actividad de los CI particulados no difiere en función de los valores particulares de *pI* que presentan los anticuerpos IgG nativos que los conforman.



**Figura 30.** CCDA y emisión de QL inducidas por IgG-Ep. La CCDA (**A**) y la QL (**B**) fueron inducidas por Ep sensibilizados con diferentes cantidades de fracciones aniónicas y catiónicas de IgGc anti-Ep, empleando relaciones neutrófilo:Ep de 1:1 para la CCDA y 1:5 para la QL, respectivamente. Los datos están expresados como la media aritmética  $\pm$  ES de 6 dadores evaluados por triplicado.

La notable actividad agonista que presentan los CI preparados con IgG cationizada *in vitro*, se encuentra asociada, tal como se ha mencionado previamente, al establecimiento de interacciones adsorptivas inespecíficas, insensibles al bloqueo de los RFcy con AcM específicos. La ausencia de diferencias en las respuestas inducidas por CI preparados con anticuerpos IgG nativos de distintos *pI*, podría reflejar la incapacidad de las fracciones catiónicas de la IgG nativa de establecer uniones electrostáticas inespecíficas con la superficie celular. En apoyo a esta hipótesis se observó que, los CI preparados con anticuerpos IgGc anti-IgGh y la fracción aniónica o catiónica de la IgGh, no sólo exhibieron niveles semejantes de unión a la superficie de los neutrófilos (*Figura 31*), sino que además dicha unión fue inhibida en forma prácticamente total, por el tratamiento conjunto con los AcM IV.3 y 3G8 (% de inhibición > 85,  $P < 0,01$ ,  $n=6$ ).



**Figura 31.** Unión de los Clan y Clcac a la superficie de los neutrófilos. Los neutrófilos ( $40\mu\text{l}$ ,  $5 \times 10^7/\text{ml}$ ) fueron incubados en presencia de  $100\mu\text{g}/\text{ml}$  de Clan o Clcac durante 20 minutos a  $4^\circ\text{C}$ . Luego fueron lavados y la unión de los CI fue revelada con anticuerpos anti-IgG de conejo conjugados con ITCF. Los resultados están expresados como la intensidad de fluorescencia media (IFM)  $\pm$  ES de 21 experimentos diferentes.

Considerados en conjunto, los resultados descriptos indican que a diferencia de los anticuerpos IgG cationizados *in vitro*, que presentan altos valores de *pI* (8,5-10,0), la carga eléctrica de los anticuerpos IgG nativos no afecta su capacidad de inducir la activación celular a través de los RFcy.

#### 4.2.4.- Activación de células fagocíticas por CI preparados con antígenos cationizados

La capacidad de los antígenos proteicos de depositarse y persistir a nivel tisular constituye una propiedad patogénica relevante capaz de condicionar la severidad de las lesiones renales y articulares en distintos modelos de glomerulonefritis y artritis. La MBG (196-198), el cartílago y el sinovio (199,200) poseen sitios aniónicos capaces de actuar como receptores para antígenos catiónicos, incrementando la persistencia de los mismos en estos tejidos. Las proteínas con alta carga eléctrica poseen entonces, un potencial nefritogénico y artrítogénico superior, en virtud de su capacidad de unirse superficies aniónicas y predisponer a la formación CI *in situ* (144,201,202). Los trabajos desarrollados hasta el presente, concernientes a la capacidad de las proteínas catiónicas de inducir lesiones renales y de actuar como potentes artrítógenos, se han limitado a la evaluación de las manifestaciones clínicas de las mismas o a la examinación histológica de los cambios que a ellas subyacen. Los experimentos que se describen a continuación, fueron realizados con el objeto de determinar si la carga eléctrica antigénica, al igual que la carga eléctrica de los anticuerpos, es capaz de condicionar la capacidad de los CI de inducir respuestas proinflamatorias a través de los RFcy.

##### 4.2.4.1.- Respuestas mediadas por células fagocíticas estimuladas por CI preparados con antígenos cationizados

Se prepararon CI solubles con anticuerpos IgGc nativos y OA nativa (*pI*: 4,5) (CIc) o cationizada (*pI*: 8-9) -CIcat(Ag)-. Los mismos fueron empleados en ensayos de citotoxicidad, emisión de QL y liberación de elastasa. Los resultados obtenidos indican que, en todos los casos, los CIcat(Ag) indujeron respuestas notablemente superiores respecto de aquellas inducidas por los CIc ( $P < 0,01$ ) (Tabla 15). La OA cationizada fue incapaz *per se* de inducir respuesta significativas (Tabla 15).

**Tabla 15.** Respuestas mediadas por neutrófilos y monocitos inducidas por C<sub>1</sub>cat(Ag).

Respuesta celular		C <sub>1</sub> c	C <sub>1</sub> cat (Ag)	OAc <sub>1</sub> cat	n
Citotoxicidad mediada por neutrófilos	%	4±2	65±4	3±1	6
Citotoxicidad mediada por monocitos	%	5±2	48±5	4±1	6
QL mediada por neutrófilos	URQL	3±2	12±3	0	7
QL mediada por monocitos	URQL	2±2	14±4	0	6
Liberación de elastasa por neutrófilos	U/I	1±1	14±3	0	6

Las diferentes respuestas fueron inducidas por 100 µg/ml de CI solubles preparados con OA nativa (C<sub>1</sub>c) o cationizada -C<sub>1</sub>cat(Ag)- y anticuerpos IgG de conejo nativos o con 100µg/ml de OA cationizada. Los resultados están expresados como la media aritmética ± ES de n experimentos diferentes realizados por duplicado o triplicado.

Los resultados obtenidos fueron confirmados, en un segundo grupo de experimentos, empleando CI preparados con anticuerpos IgGc nativos y SAB nativa (*pI*: 4,5) (C<sub>1</sub>c) o cationizada (*pI*: 8-9) -C<sub>1</sub>cat(Ag)-. Nuevamente, los C<sub>1</sub>cat(Ag) indujeron respuestas sustancialmente mayores respecto de los C<sub>1</sub>c (*P*<0,01). No obstante, las mismas fueron menores a las obtenidas con los CI preparados con anticuerpos IgGc cationizados (*pI* > 9,1) y SAB nativa. A fin de obtener niveles similares de respuesta, los C<sub>1</sub>cat(Ag) debieron ser empleados a concentraciones cinco veces mayores respecto de los C<sub>1</sub>cat(IgG) (Tabla 16).

**Tabla 16.** Respuestas mediadas por neutrófilos inducidas por C<sub>1</sub>cat(Ag).

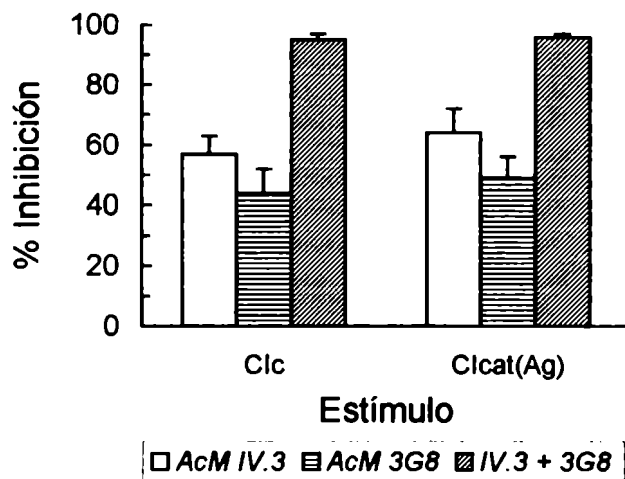
Respuesta celular		C <sub>1</sub> c (100µg/ml)	C <sub>1</sub> cat (SABcat) (100µg/ml)	C <sub>1</sub> cat(IgGcat) (20µg/ml)
Citotoxicidad	%	5±1	55±5	51±6
QL	URQL	2±1	11±1	10±2

Las respuestas fueron inducidas por CI solubles preparados con anticuerpos IgGc anti-SAB nativos y SAB nativa (C<sub>1</sub>c) o cationizada -C<sub>1</sub>cat(SABcat)- o con CI formados con IgGc anti-IgGh nativa e IgGh cationizada -C<sub>1</sub>cat(IgGcat)-. Los resultados están expresados como la media aritmética ± ES de 3 experimentos diferentes realizados por duplicado o triplicado.

Los resultados presentados indican que, no sólo la cationización de los anticuerpos, sino también la de los antígenos potencia notablemente la capacidad de los CI de inducir la activación de células fagocíticas.

#### 4.2.4.2.- RFc $\gamma$ involucrados en la emisión de QL por neutrófilos inducida por C $\gamma$ cat(Ag)

A fin de analizar la participación de los diferentes RFc $\gamma$  en la respuesta QL estimulada por C $\gamma$ cat(Ag), se emplearon los AcM IV.3 y el fragmento F(ab')<sub>2</sub> del AcM 3G8. Los dos anticuerpos inhibieron significativamente las respuestas inducidas tanto por CI preparados con OA nativa como por aquellos preparados con OA cationizada ( $P < 0,05$ ) (Figura 32). Para ambos CI, la emisión de luz fue suprimida por tratamiento conjunto con los dos AcM (Figura 32). Estos resultados indican que, a diferencia de lo observado con los CI preparados con anticuerpos IgG cationizados, la QL inducida por C $\gamma$ cat(Ag) es dependiente no sólo del RFc $\gamma$ II sino también del RFc $\gamma$ III.



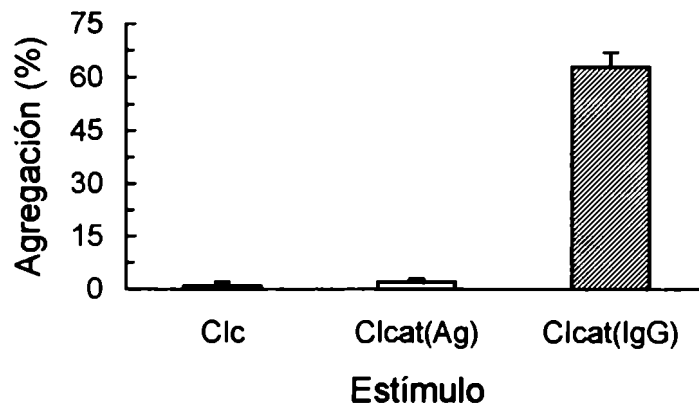
**Figura 32.** Rol de los RFc $\gamma$ s en la emisión de QL inducida por C $\gamma$ cat(Ag). Los CI solubles fueron preparados con anticuerpos IgGc anti-OA y OA nativa (C $\gamma$ c) o cationizada (C $\gamma$ cat(Ag)). Las células fueron incubadas durante 30 minutos a 4°C con fragmentos F(ab')<sub>2</sub> del AcM 3G8 y/o el AcM IV.3 antes del añadido del estímulo. Los resultados están expresados como expresados como la media aritmética  $\pm$  ES de 4 experimentos diferentes realizados por duplicado.



#### 4.2.4.3.- Activación de plaquetas humanas inducida por C<sub>I</sub>cat(Ag)

Las plaquetas expresan un sólo tipo de RFc $\gamma$ , el RFc $\gamma$ II (25). Los resultados mostrados en el párrafo anterior sugieren que, al menos en neutrófilos, la activación inducida por C<sub>I</sub>cat(Ag) requiere la participación de los RFc $\gamma$ II y RFc $\gamma$ III. Podrían los antígenos cationizados potenciar la actividad de los CI en sistemas celulares que sólo expresasen el RFc $\gamma$ II ?

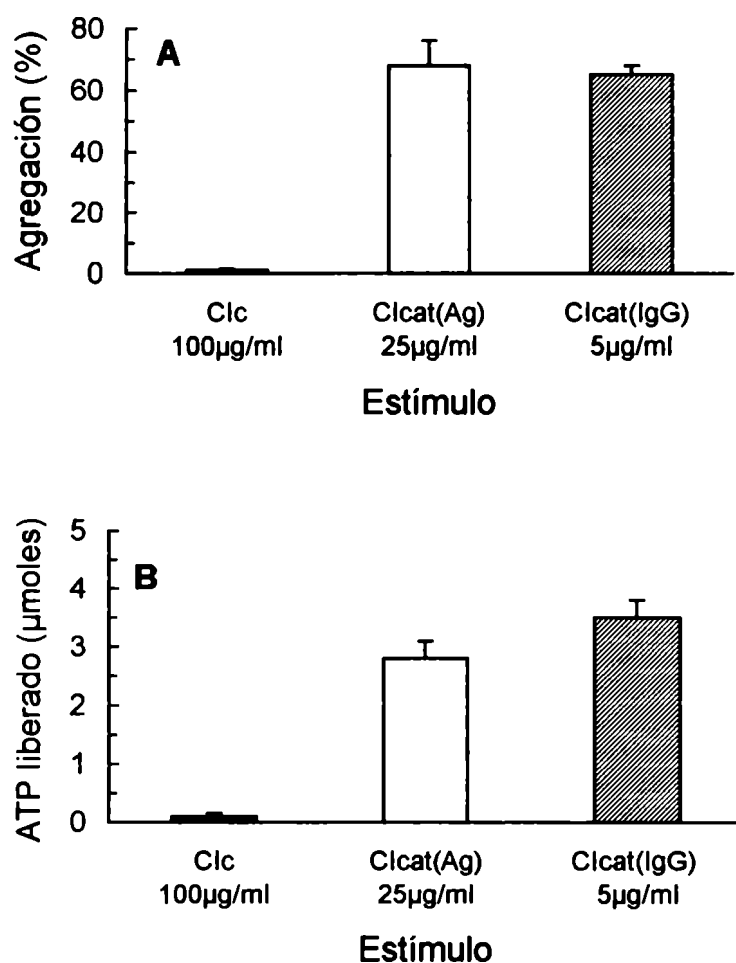
Con el objeto de responder a este interrogante, se emplearon CI preparados con anticuerpos IgGc nativos y OA nativa (*pI*: 4,5) o cationizada (*pI*:8,0-9,5). Se evaluó, en primer lugar, su capacidad de inducir la agregación plaquetaria utilizando PRP. A diferencia del comportamiento observado con los CI formados con IgG cationizada, los CI preparados con OA cationizada fueron incapaces de inducir la agregación plaquetaria (Figura 33).



**Figura 33.** Agregación de plaquetas inducida por C<sub>I</sub>cat(Ag) en PRP. La gregación fue inducida por el añadido de CI preparados con IgGc anti-OA nativa y OA nativa (Clc, 100 $\mu$ g/ml) o cationizada -C<sub>I</sub>cat(Ag), 100 $\mu$ g/ml- o CI preparados con IgGc anti-IgGh e IgGh cationizada C<sub>I</sub>cat(IgG), 15 $\mu$ g/ml- a 400 $\mu$ l ( $3 \times 10^8$  plaquetas/ml) de PRP. Los datos están expresados como la media aritmética  $\pm$  ES de 8 dadores diferentes.

Se analizó luego su capacidad de estimular la activación de PL. Los CI que incluían OA cationizada indujeron niveles altos de agregación y liberación de ATP. Por el contrario,

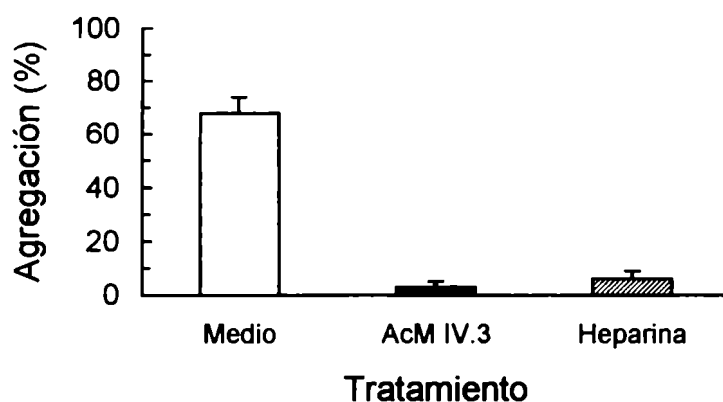
aquellos CI formados con OA nativa no indujeron respuesta alguna (*Figura 34*). Merece destacarse, sin embargo, que los CI preparados con OA cationizada mostraron menor potencia agonista, respecto de aquellos preparados con IgG cationizada. Es por ello que, a fin de obtener respuestas similares, los CI preparados con OA cationizada debieron emplearse a concentraciones cinco veces superiores (*Figura 34*).



**Figura 34.** Activación de plaquetas lavadas inducida por Clcat(Ag). Una suspensión de 400 µl de PL ( $3 \times 10^8$  plaquetas/ml) fue estimulada con CI preparados con IgGc anti-OA nativa y OA nativa (Clc) o cationizada -Clcat(Ag)- o con CI preparados con IgGc anti-IgGh e IgGh cationizada -Clcat(IgG)-, determinándose la agregación plaquetaria (A) y la liberación de ATP (B) en forma simultánea. Los datos están expresados como la media aritmética  $\pm$  ES de 7 dadores evaluados por duplicado.

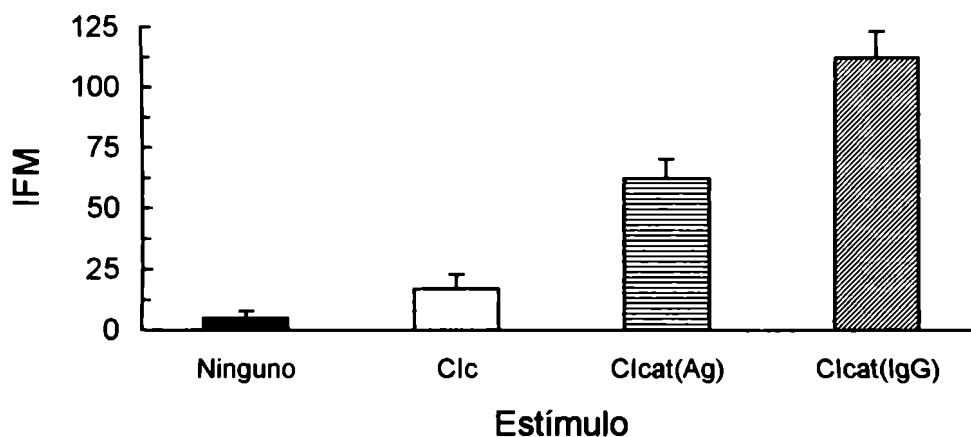
En acuerdo con lo esperado, el AcM IV.3 inhibió en forma prácticamente total la agregación de PL inducida por CI preparados con OA cationizada (*Figura 35*). Asimismo,

en presencia de heparina se observó una inhibición de la agregación superior al 90% (Figura 35).



**Figura 35.** Inhibición de la agregación de PL por el AcM anti-RFcyII o por heparina. Una suspensión de 400  $\mu$ l de PL ( $3 \times 10^8$  plaquetas/ml) fue incubada 1 minuto antes de la adición del estímulo con AcM IV.3 (1  $\mu$ g/ml) o heparina (0,05 U/ml). Luego, la agregación fue inducida por 25  $\mu$ g/ml de CI preparados con IgGc anti-OA nativa y OA cationizada. Los resultados están expresados como la media aritmética  $\pm$  ES de 4 experimentos realizados por duplicado.

Por último, en las experiencias realizadas a fin de determinar la expresión de P-selectina en ausencia de agregación plaquetaria, se observó que los CI preparados con OA catiónica estimularon su expresión en niveles significativamente superiores a los inducidos por los CIc ( $P < 0,05$ ) (Figura 36).



**Figura 36.** Expresión de P-selectina por plaquetas estimuladas con Clcat(Ag). Una suspensión de 400µl de PL ( $3 \times 10^8$ /ml) fue incubada durante 10 minutos a 37°C sin agitación con CI preparados con IgGc anti-OA nativa y OA nativa (Clc) o cationizada -Clcat(Ag)- (25µg/ml) o con CI preparados con IgGc anti-IgGh e IgGh cationizada -Clcat(IgG)- (5µg/ml). Luego las PL fueron incubadas con un AcM anti-P-selectina durante 30 minutos y la unión fue revelada con un segundo anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón conjugado con ITCF. Los resultados están expresados como la media aritmética  $\pm$  ES de 4 experimentos diferentes.

Considerados en conjunto, estos resultados sugieren que, no sólo la cationización de la fracción anticuerpo de un CI, sino también de su fracción antigénica, potencia notablemente su capacidad agonista.

### 4.3.- Quimiotaxis de neutrófilos humanos inducida por complejos inmunes

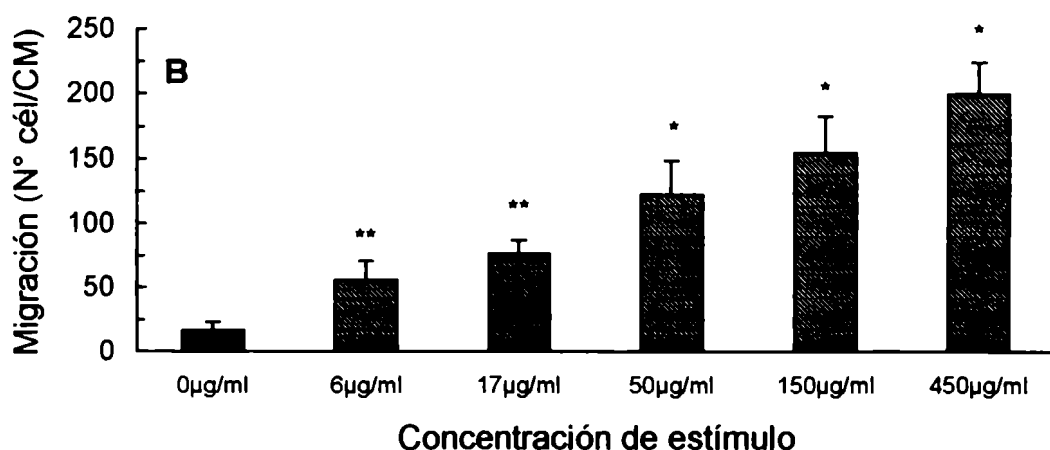
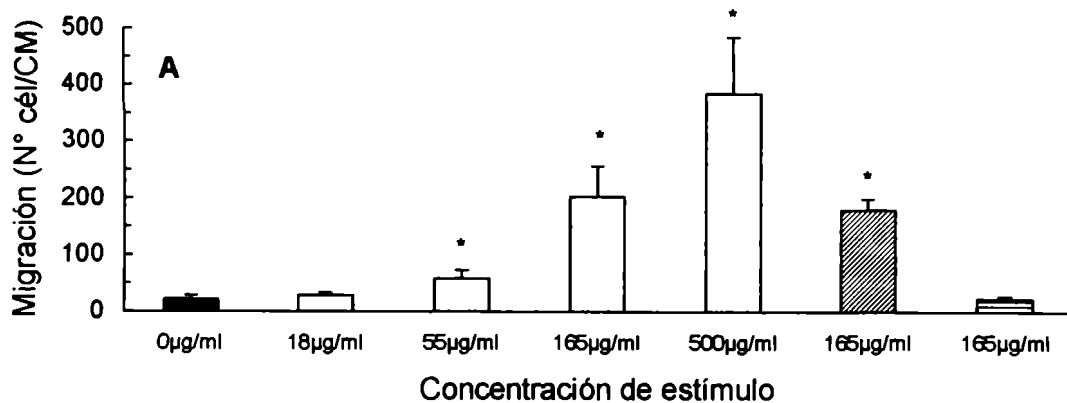
Los neutrófilos juegan un papel preponderante en la defensa del huésped, debido a que rápidamente acuden a sitios de invasión microbiana en respuesta a la producción *in situ* de estímulos quimiotácticos (56,203). Estos estímulos son los responsables de orientar la migración celular a través de la generación de un gradiente positivo de concentración, es decir, desde un área caracterizada por la presencia de bajas concentraciones de estímulo hacia otra donde éste alcanza su máxima concentración (204). El mecanismo quimiotáctico involucra la unión del atrayente a receptores específicos sobre la membrana plasmática, la adherencia reversible de las células al endotelio o a la matriz extracelular, la deformación celular, que les permite atravesar espacios intercelulares y la liberación de distintos mediadores leucocitarios, que en algunos casos amplifican la respuesta inflamatoria y en otros la limitan (203-207).

Se han identificado numerosos estímulos quimiotácticos para los PMN. Entre ellos figuran productos derivados de la activación del sistema complemento, particularmente el C5a (208-211), péptidos formilados bacterianos (212,213), citoquinas producidas por leucocitos (214) y factores derivados de PMN activados (94,215,216).

La capacidad de los CI de inducir quimiotaxis de neutrófilos, ha sido tradicionalmente adjudicada, a su habilidad de activar al sistema complemento con la consecuente generación de C5a (217,218). Estudios desarrollados por Wilkinson, no obstante (219), han demostrado que la IgG humana agregada por calor induce *per se* la migración de neutrófilos humanos. En el mismo sentido, Arashi y colaboradores (220), han indicado que las Ig monoméricas de rata son capaces de inducir la locomoción celular. Otros investigadores, por el contrario, han descrito la incapacidad tanto de la IgG monomérica como de la IgG agregada, de inducir la migración de neutrófilos (221,222). No existen trabajos previos que hayan establecido la capacidad de los CI de estimular *per se* la migración de neutrófilos. Este aspecto adquiere un relieve notable a la luz de trabajos recientes desarrollados *in vivo* por Sylvestre y Ravetch (126), sugiriendo que la inducción del infiltrado fagocítico en las reacciones inflamatorias de tipo III involucraría una acción directa de los CI, no mediada a través de la activación del sistema complemento (8). Los resultados que se presentan a continuación demuestran la habilidad de los CI de estimular *in vitro* la quimiotaxis de los neutrófilos.

#### 4.3.1.- Migración de neutrófilos humanos inducida por la presencia de un gradiente positivo de concentración de CI

A fin de evaluar la capacidad de los CI de inducir la migración de neutrófilos, se utilizaron CI preparados con (1) IgG humana y anticuerpos IgG de conejo anti-IgGh y (2) OA y anticuerpos IgG de conejo anti-OA. Las células y los CI fueron resuspendidos en una solución tamponada no enriquecida en proteínas séricas, con el objeto de descartar la presencia de componentes del sistema complemento. Se observó que los CI fueron capaces de inducir la migración de los neutrófilos, en forma dependiente de la concentración (*Figura 37*). Merece destacarse, que dichas respuestas locomotoras fueron observadas aún a concentraciones de CI inferiores a las descritas en diversos focos inflamatorios (58,83). Empleando IgG humana soluble agregada por calor como análogo artificial de CI, se observaron niveles similares de migración (*Figura 37A*). En acuerdo con el paradigma de activación celular mediado por RFc $\gamma$ , según el cual la microagregación de receptores es un requerimiento insoslayable para la inducción de respuestas biológicas, la IgG monomérica se mostró incapaz de inducir migración celular (*Figura 37A y B*).



**Figura 37.** Migración de neutrófilos inducida por (A) CI preparados con IgGh:IgGc anti-IgGh (□), por IgGh agregada por calor (▨), IgG monomérica (▤) o en ausencia de estímulo (■); (B) por CI preparados con OA-IgGc anti-OA (▩) o en ausencia de estímulo (■). Los datos están expresados como la media aritmética  $\pm$  ES de 9 dadores evaluados por triplicado. Significación estadística: \*  $P < 0,01$ , \*\*  $P < 0,05$  comparados con el control.

Con el objeto de discernir si la migración observada era dirigida por un gradiente positivo de concentración de CI (quimiotaxis) o simplemente reflejaba un incremento aleatorio en la motilidad celular (quimoquinesis), se realizó un análisis *checkerboard* (149). El mismo refleja la respuesta locomotora celular inducida por: (1) un gradiente positivo de concentración del estímulo, (2) un gradiente negativo de concentración del estímulo y (3) la presencia del estímulo, en ausencia de gradiente de concentración. Los resultados obtenidos, indicaron que la motilidad fue dependiente de la presencia de un gradiente positivo de concentración de CI (Tabla 17), lo que define básicamente un mecanismo quimiotáctico de locomoción.

**Tabla 17.** Análisis *checkerboard* de la migración de neutrófilos inducida por CI.

Concentración de CI en la cámara inferior ( $\mu\text{g/ml}$ ) <sup>a</sup>	N° medio de células/Campo Microscópico $\pm$ ES		
	cámara superior ( $\mu\text{g/ml}$ ) <sup>a</sup>		
	0	250	500
0	25 $\pm$ 11 <sup>a</sup>	32 $\pm$ 10 <sup>d</sup>	36 $\pm$ 14 <sup>g</sup>
250	189 $\pm$ 47 <sup>b</sup>	60 $\pm$ 17 <sup>e</sup>	34 $\pm$ 13 <sup>h</sup>
500	320 $\pm$ 56 <sup>c</sup>	104 $\pm$ 33 <sup>f</sup>	73 $\pm$ 34 <sup>i</sup>

Los datos están expresados como la media aritmética  $\pm$  ES de 5 dadores evaluados por triplicados.

Significación estadística: c  $P < 0,05$  comparado con a y con i; b  $P < 0,05$  comparado con a y con e; f  $P < 0,05$  comparado con i; d *NS* comparado con a; h  $P < 0,05$  comparado con e.

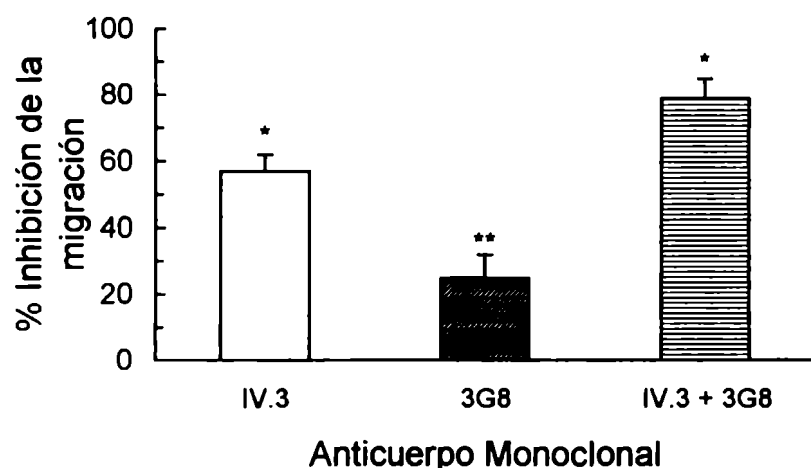
<sup>a</sup> CI: IgGh:IgGc anti-IgGh.

#### 4.3.2.- Rol de los RFc $\gamma$ II y RFc $\gamma$ III en la quimiotaxis de neutrófilos inducida por CI

Para que la respuesta quimiotáctica se haga efectiva, se requiere la unión del quimioattractante a receptores específicos de la membrana plasmática, lo cual permite transformar la información ambiental en una serie de respuestas celulares que dan como resultado el movimiento dirigido (205).

Con el objeto de determinar el papel de los RFc $\gamma$  expresados por los neutrófilos en la quimiotaxis inducida por CI, se examinó el efecto del AcM IV.3 y del fragmento F(ab')<sub>2</sub> del AcM 3G8. Ambos anticuerpos disminuyeron significativamente la respuesta quimiotáctica (*Figura 38*). No obstante, la inhibición observada en presencia del IV.3 fue marcadamente superior, sugiriendo un rol preponderante del RFc $\gamma$ II en la inducción de la quimiotaxis.

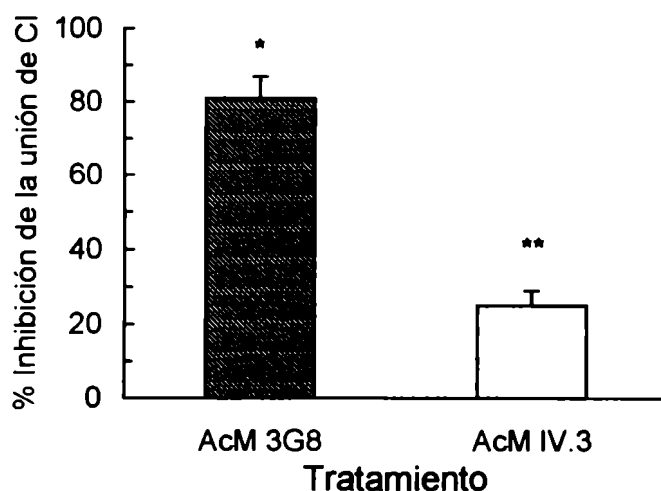




**Figura 38.** Efecto de los AcM anti-RFcys sobre la quimiotaxis de neutrófilos inducida por CI. La migración fue inducida por CI preparados con IgGh:IgGc anti-IgGh. Los datos están expresados como porcentajes de inhibición de la migración calculada después de restarles los valores de migración al azar. Cada barra representa la media aritmética  $\pm$  ES de 6 dadores evaluados por triplicado.

Significación estadística: \*  $P < 0,01$ , \*\*  $P < 0,05$  comparados con los controles.

Se analizó posteriormente la contribución relativa de los RFcy a la unión de los CI. El fragmento  $F(ab')_2$  del 3G8 inhibió en forma marcada la unión de los CI, mientras que el IV.3 sólo la redujo moderadamente (*Figura 39*). Ello indica que la capacidad de los RFcy de unir CI guarda una relación directa con el número de receptores expresados sobre la superficie celular ( $10^5$  RFcyIII/célula y  $10^4$  RFcyII/célula). Estos resultados plantean, además, que la participación de cada uno de los RFcy en la inducción de la respuesta quimiotáctica no se correlaciona con su capacidad de unir CI.



**Figura 39.** Inhibición de la unión de CI por AcM dirigidos contra los RFcy. Los neutrófilos ( $2 \times 10^6/\text{ml}$ ) fueron incubados durante 30 minutos a  $4^\circ\text{C}$  con fragmentos  $\text{F(ab}')_2$  del AcM 3G8 o el AcM IV.3 o con medio de cultivo sólo. Luego fueron lavados e incubados durante 30 minutos a  $4^\circ\text{C}$  con CI solubles preparados con IgGh e IgGc anti-IgGh. Posteriormente, la unión de los mismos fue revelada por incubación con anticuerpos IgG anti-IgGc conjugados con ITCF. Los datos están expresados como % de inhibición de la unión de CI y representan la media aritmética  $\pm$  ES de 4 dadores.

Significación estadística: \*  $P < 0,01$ , \*\*  $P < 0,05$  comparados con los controles.

A fin de descartar que el efecto de los AcM se debiese a la inducción de señales inhibitorias y no al bloqueo específico de los RFcy, se realizaron experimentos adicionales donde se evaluó la acción de los mismos sobre la quimiotaxis inducida por FMLP o suero activado por zymosán. En ningún caso, se observó inhibición de las respuestas quimiotácticas (*Tabla 18*). Por el contrario, empleando suero activado por zymosán como estímulo, el bloqueo del RFcyIII la incrementó significativamente. Las causas de dicho incremento, no obstante, no han sido examinadas.

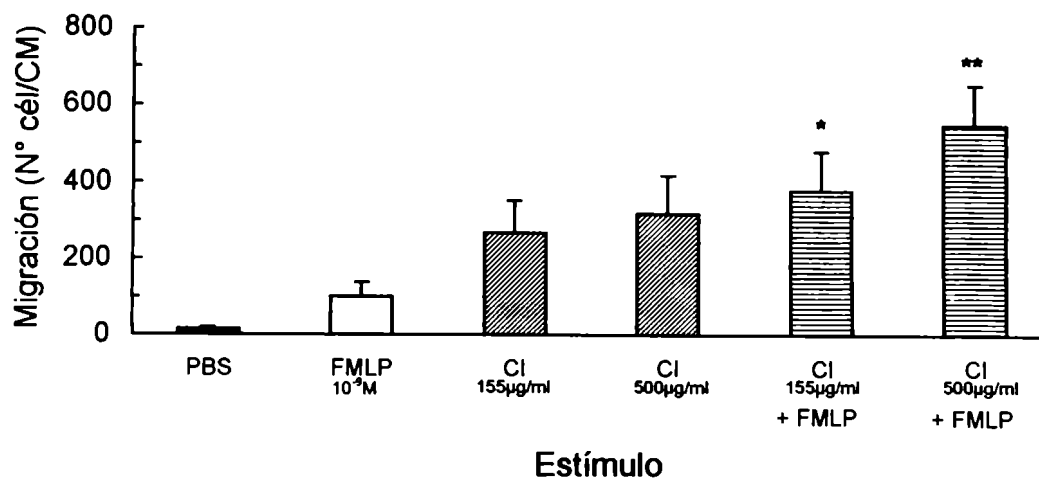
**Tabla 18.** Efecto de los AcM anti-RFcys sobre la respuesta quimiotáctica inducida por FMLP y suero activado por zymosán.

AcM agregado	Quimiotaxis de neutrófilos inducida por (N° medio de cél./Campo microscópico ± ES)	
	FMLP 10 <sup>-8</sup> M (n = 8)	Suero activado por Zymosan (n = 7)
Ninguno	266±76	725±103
IV.3	234±50	642±106
F(ab') <sub>2</sub> 3G8	264±71	1333±125*
IV.3 + F(ab') <sub>2</sub> 3G8	212±44	1095±135*

Inhibición de la quimiotaxis inducida por FMLP y suero activado por zymosán por AcM dirigidos hacia el RFcyII y RFcyIII. Los datos están expresados como la media aritmética ± ES de *n* dadores evaluados por triplicado después de restarle los valores de migración al azar. Significación estadística: \* *P*<0,05 comparado con valores obtenidos en ausencia de AcM.

#### 4.3.3.- Quimiotaxis de neutrófilos inducida por la presencia conjunta de FMLP y CI

Los péptidos formilados bacterianos juegan un rol crítico en el reclutamiento de neutrófilos en sitios inflamatorios asociados a diversos procesos infecciosos (212,223). Considerando que la presencia de altas concentraciones de CI constituye una característica observada en numerosas infecciones bacterianas (120), se evaluó la quimiotaxis inducida por la presencia conjunta de los CI y el FMLP. Los resultados descritos en la *Figura 40* muestran un incremento de naturaleza aditiva, en la respuesta estimulada por ambos agonistas.



**Figura 40.** Efecto de los CI sobre la quimiotaxis inducida por FMLP. La migración fue inducida por FMLP, CI o FMLP más CI. Cada barra representa la media aritmética  $\pm$  ES de 6 dadores evaluados por triplicado.

Significación estadística: \*  $P < 0,05$  comparado con la migración inducida por FMLP ( $10^{-9}$ M) sólo y *NS* comparado con la migración inducida por CI ( $155\mu\text{g/ml}$ ); \*\*  $P < 0,05$  comparado con la quimiotaxis inducida por FMLP ( $10^{-9}$ M) y con CI ( $500\mu\text{g/ml}$ ).

Considerados en conjunto, los resultados presentados indican que los CI constituyen *per se* potentes estímulos quimiotácticos para los neutrófilos. Ello sugiere que los mismos podrían participar en la respuesta inmune, no sólo como inductores de respuestas secretorias y/o citotóxicas mediadas por fagocitos, sino también como agentes relevantes en el reclutamiento de los neutrófilos en el foco inflamatorio.

## 5.- DISCUSION

### 5.1.- Modulación de la actividad del RFcγII por acción de proteasas

Las enzimas proteolíticas se encuentran en altas concentraciones en los focos inflamatorios (85,224). A ellos confluyen diferentes proteasas liberadas, no sólo por granulocitos y macrófagos activados (225) sino también por linfocitos T, células NK y mastocitos (226-228). La activación de sistemas humorales tales como el complemento y los sistemas de coagulación y fibrinolítico contribuyen a incrementar las concentraciones locales de proteasas.

Las proteasas cumplen funciones biológicas cruciales en la fisiología de los seres vivos. Distintas enzimas proteolíticas son responsables del mantenimiento del balance hemostático (229,230) y fibrinolítico (229-231), la activación del sistema complemento (2,3), la generación de señales conducentes a la activación celular y/o muerte celular programada (154-157,232,233) y la destrucción de agentes infecciosos, células infectadas por virus y células tumorales (226,227). La evidencia experimental reciente sugiere que las proteasas participarían en la regulación de las funciones leucocitarias y consecuentemente en la modulación de los procesos inflamatorios (234). Estudios desarrollados por Tax y van de Winkel (158,160) demostraron que la actividad del RFcγII expresado en monocitos humanos y en células K562, puede ser incrementada por proteólisis. En concordancia con estos hallazgos, los resultados presentados en esta Tesis muestran que el tratamiento de neutrófilos humanos con proteasas aumenta tanto la avidéz como la funcionalidad del RFcγII.

Merece destacarse la magnitud del efecto de las proteasas sobre este receptor. Empleando IgG-Ep como CI, se encontró que la cantidad de Ep unidos por cien neutrófilos se incrementa entre seis y diez veces a consecuencia del tratamiento proteolítico. Considerando que la proteólisis no induce la expresión de nuevos RFcγ y prácticamente anula la expresión del RFcγIII, los resultados obtenidos pueden ser adjudicados a un aumento en la avidéz del RFcγII. Esta conclusión está sustentada en los hallazgos realizados en presencia de AcM anti-RFcγ, que demuestran que la unión de IgG-Ep a los neutrófilos tratados con proteasas es dependiente fundamentalmente del RFcγII. En el mismo sentido, Van de Winkel y colaboradores (158) describieron que el tratamiento con

proteasas de monocitos humanos cuyos RFcyI fueron selectivamente modulados, incrementa su capacidad de unir IgG-E. Por otra parte, en células K562, que sólo expresan el RFcyII (235), la incubación con pronasa o elastasa aumenta significativamente su afinidad por la IgG humana sin modificar la expresión de este receptor (158).

El aumento en la avidéz del RFcyII ocasionado por el tratamiento enzimático se asoció a un incremento en las respuestas inducidas por IgG-Ep tales como la CCDA y la QL (*Tabla 2 y Figura 7*). Efectos similares fueron descritos por Debets y colaboradores (159) en monocitos deficientes de RFcyI. El tratamiento con proteasas incrementó la producción de TNF- $\alpha$  inducida por IgG, a expensas de una actividad exacerbada del RFcyII.

El efecto potenciador de las proteasas, sin embargo, fue dependiente de las características del CI empleado como estímulo. En este sentido, se observó que mientras las respuestas QL inducidas por IgG-Ep y por CIs fueron significativamente incrementadas luego de la incubación de los neutrófilos con pronasa o quimotripsina, la QL inducida por CIp no fue modificada (*Figura 9*). Dado que el mecanismo de potenciación ejercido por las proteasas sobre la actividad del RFcyII no ha sido elucidado, no resulta sencillo elaborar una hipótesis capaz de explicar el efecto diferencial de la proteólisis sobre la respuesta QL inducida por CIs y CIp. Esta dificultad es aún mayor al considerar que ambas respuestas mediadas por células controles, involucran una participación similar de los RFcyII y RFcyIII. Los CIp, a diferencia de los CIs, constituyen grandes redes de anticuerpos, hecho que incrementa su valencia y avidéz hacia los RFcy. Esta propiedad, sin embargo, no permitiría explicar las diferencias observadas dado que la máxima capacidad potenciadora de las proteasas se observó con IgG-Ep, los cuales, al igual que los CI precipitantes, se caracterizan por presentar a los anticuerpos bajo la forma de amplias redes lo que les confiere alta avidéz hacia los RFcy. Hallazgos adicionales realizados en nuestro laboratorio parecen indicar, por otra parte, que distintas respuestas biológicas inducidas por un mismo CI pueden ser moduladas diferencialmente por el tratamiento enzimático. Así, mientras que el tratamiento de los neutrófilos con proteasas incrementó notablemente la QL inducida por CIs (*Figura 9*), no afectó la citotoxicidad inducida por los mismos contra células blanco no sensibilizadas (236).

La capacidad potenciadora de las proteasas parece estar restringida a las funciones dependientes del RFcyII. De hecho, la QL inducida por agonistas que activan a las células a

través de otros receptores, como el FMLP, el PAF y el zymosán fue marcadamente inhibida por el tratamiento proteolítico.

No todas las proteasas parecen ser capaces de potenciar la actividad del RFcγII. Tosi y Berger (162) encontraron que la incubación de neutrófilos con elastasa leucocitaria no incrementa en la ingestión de partículas cubiertas con IgG ni la producción de O<sub>2</sub><sup>-</sup> inducida por CI. En acuerdo con estos resultados, se observó que el tratamiento de neutrófilos con elastasa (10-100 μg/ml) no afecta la formación de rosetas EA, la CCDA ni la QL inducida por IgG-Ep (datos no mostrados). Teniendo en cuenta la acción potenciadora de la elastasa sobre la avidéz del RFcγII en células K562 (158), estos resultados sugieren que el impacto de las proteasas sobre la actividad del RFcγII se encuentra condicionado por la estirpe celular que lo expresa.

El mecanismo por el cual las proteasas incrementan la actividad del RFcγII no es conocido. Van de Winkel y colaboradores (158) han informado que el tratamiento de células K562 con pronasa, no modifica el peso molecular ni el *pI* del RFcγII. Estos hallazgos argumentan en contra de una acción directa de las enzimas sobre el receptor. No obstante, no es posible descartar que las proteasas induzcan un cambio conformacional en la molécula o alteren su disposición en la membrana celular, de modo tal que se incremente su movilidad lateral y su capacidad de microagregarse. Un efecto indirecto sobre moléculas accesorias podría también ser factible. Esta posibilidad se encuentra avalada por tres observaciones: (1) el papel relevante que juega la integrina CD11b/CD18 en la inducción de numerosas respuestas inducidas a través de los RFcγ tales como la CCDA y la fagocitosis (55); (2) la incapacidad de las enzimas proteolíticas de reducir la expresión del complejo CD11b/CD18 y (3) el incremento en la actividad del complejo CD11b/CD18, medido en función de su capacidad de unir fibrinógeno a consecuencia del tratamiento proteolítico (b y c, resultados propios no mostrados).

El ácido siálico de la membrana, incluyendo los derivados acetilados de aminohexosas y ácido *N*-acetilneuroamínico, es al menos en parte, responsable de la carga negativa neta de la superficie celular (237,238). Estudios previos han demostrado que la remoción parcial del ácido siálico de la membrana celular por tratamiento con neuroaminidasa, incrementa la unión de IgG-E a monocitos humanos y potencia tanto la fagocitosis de *S. aureus* opsonizado con IgG como la producción de O<sub>2</sub><sup>-</sup> por neutrófilos humanos en respuesta a los mismos (239,240). Estos efectos fueron explicados

considerando que la disminución de la carga negativa neta superficial por acción de la sialidasa ocasionaría una reducción de las fuerzas repulsivas entre las células efectoras y los *blancos*. Un mecanismo similar podría ser el responsable, al menos parcialmente, del efecto potenciador de las proteasas sobre la actividad del RFcyII. Ellas podrían inducir una disminución del contenido de ácido siálico a expensas del clivaje de ciertas glicoproteínas ricas en el mismo. Esta hipótesis permite explicar los resultados obtenidos empleando IgG-Ep. Sin embargo, no explica aquellos obtenidos con otros tipos de CI, puesto que el comportamiento de las proteasas no mimetiza en todos los casos los efectos de la neuroaminidasa, tal como lo evidencian sus respectivas acciones sobre la QL inducida por CIp (Figura 9 y Tabla 5).

Las enzimas lisosomales de los neutrófilos humanos como la elastasa, gelatinasa y colagenasa, a las que tradicionalmente se les ha adjudicado un papel relevante en los mecanismos de agresión tisular, se hallan presentes en cantidades superiores a  $1\mu\text{g}/10^6$  células (58). Considerando la presencia de  $25 \times 10^6$  neutrófilos por cada  $100\mu\text{l}$  de fluido en sitios inflamatorios intersticiales (58), es posible que altas concentraciones de enzimas, similares o aún mayores a las empleadas en el presente estudio, se encuentren en los focos inflamatorios. Por otra parte, las proteasas producidas a consecuencia de la activación de sistemas de coagulación, complemento y quininas podrían contribuir a incrementar aún más las concentraciones locales de enzimas. Si bien el potencial proteolítico de las mismas se hallaría limitado por la acción de los inhibidores de proteasas presentes en grandes cantidades en los fluidos intersticiales (77,241), la evidencia acumulada hasta el presente sugiere que estos inhibidores son eficientemente inactivados por los IRO producidos por las propias células fagocíticas, generando de este modo, un microentorno permisible a la acción de las proteasas (58,77,78,241,243,244). El efecto de las enzimas proteolíticas sobre la actividad del RFcyII observado *in vitro*, podría por lo tanto, ser también operativo *in vivo*.



## 5.2.- Impacto de la carga eléctrica de los CI sobre su capacidad de inducir respuestas biológicas mediadas por células fagocíticas y plaquetas humanas

### 5.2.1.- Respuestas proinflamatorias mediadas por neutrófilos y monocitos inducidas por CI: Impacto de la carga eléctrica de los anticuerpos IgG.

Diversos autoanticuerpos son encontrados en el suero de pacientes lúpicos (166). Entre ellos, aquellos con especificidad por el ADN parecen jugar un rol crítico en la inducción de fenómenos inflamatorios conducentes al daño renal. La evidencia acumulada hasta el presente sugiere, sin embargo, que los mismos no siempre son nefritogénicos. Ello impulsó numerosas investigaciones tendientes a determinar la naturaleza de los factores que influyen la patogenicidad de los mismos. Estos estudios caracterizaron inmunológicamente, idiopícticamente y estructuralmente a los anticuerpos anti-ADN (245-248). Se encontró que los anticuerpos anti-ADN nefritogénicos son de clase IgG, principalmente IgG1 e IgG3, las subclases que fijan complemento más eficientemente (249). Entre ellos, aquellos de alta avididad, es decir con mayor capacidad de formar complejos estables, son los más frecuentemente asociados al desarrollo de la enfermedad renal (250,251). Trabajando en modelos de lupus murino, Ebling y Hahn (169) demostraron, en forma original, que los anticuerpos anti-ADN nativos predominantes tanto en el suero como en el líquido renal son catiónicos. Mientras los anticuerpos anti-ADN séricos presentaron  $pI$  entre 8,0 y 8,5, aquellos obtenidos de líquidos glomerulares presentaron  $pI$  entre 8,0 y 9,0, sugiriendo una retención local selectiva. Estudios posteriores desarrollados por Datta y colaboradores (170) utilizando cepas murinas usualmente empleadas para el estudio de la patogénesis del LES [MRL- $+/+$ , (NZB x NZW) $F_1$  y (NZB x SWR) $F_1$  ], demostraron en las tres cepas, un defecto inmunoregulatorio común coincidente con el inicio de la glomerulonefritis. Dicho defecto se tradujo en la producción de anticuerpos anti-ADN altamente catiónicos ( $pI$ : 8,5-10,0). Numerosos trabajos establecieron, posteriormente, la presencia de anticuerpos IgG altamente catiónicos con especificidad anti-ADN en el suero de pacientes con LES (171,252,253) y sugirieron su participación en la génesis del daño renal. La carga catiónica de estos anticuerpos está determinada, fundamentalmente, por la presencia de residuos básicos en las regiones variables de sus cadenas pesadas (173,254). En este sentido, se ha observado que las mutaciones somáticas en los genes que codifican a los anticuerpos anti-

ADN conducen, con alta frecuencia, a la incorporación de aminoácidos básicos tales como arginina, asparragina y lisina, los que incrementan su afinidad por el ADN confiriéndoles, además, capacidad de unir otras moléculas cargadas negativamente como el heparan sulfato (254,255).

Los anticuerpos IgG cationizados tienden a depositarse en la MBG (174) debido a la presencia de sitios cargados negativamente (175,176). Hallazgos realizados por Gauthier y Mannik (177) indican que la presencia de anticuerpos IgG catiónicos en un CI, aún en proporciones mínimas, incrementa sustancialmente su tendencia al depósito tisular. Estas evidencias sugieren que los anticuerpos IgG catiónicos son potencialmente nefritogénicos en virtud de su alta afección por la MBG, sin embargo, no explican los mecanismos a través de los cuales inducen el daño tisular. Los resultados presentados en esta Tesis demuestran que la presencia de anticuerpos cationizados en un CI potencia notablemente su capacidad de inducir respuestas inflamatorias mediadas por células fagocíticas. Este fenómeno podría jugar un papel relevante en los mecanismos de injuria tisular en los pacientes con LES. La convalidación de esta hipótesis requiere la realización de experimentos adicionales que empleen anticuerpos catiónicos naturales aislados a partir del suero de pacientes con LES activo. Esta fase experimental ha sido encarada recientemente. Por otra parte, los resultados presentados indican que, bajo ciertas circunstancias, la carga eléctrica de los anticuerpos constituye una propiedad crítica en relación a las propiedades biológicas de los CI que los contienen. Estudios adicionales son necesarios a fin de examinar la posible participación de anticuerpos catiónicos en otras entidades patológicas como así también para determinar si la modificación del *pI* de los anticuerpos podría constituir una herramienta válida desde el punto de vista terapéutico.

Estudios previos realizados en nuestro laboratorio demostraron que la estimulación de neutrófilos y monocitos por CI conduce a la destrucción de diferentes células *blanco* a través de un mecanismo lítico de naturaleza oxidativa (133-137). Este sistema citotóxico constituye un modelo adecuado para el estudio de los fenómenos de injuria tisular asociados a la presencia de fagocitos y CI. Es importante destacar que si bien es necesaria la producción de IRO por parte de los fagocitos para mediar la destrucción de los *blancos*, no siempre se encuentra correlación entre la cantidad de  $O_2^-$  y/o  $H_2O_2$  producido y los niveles de citotoxicidad (181). Los resultados que componen la presente Tesis indican que la cationización de la fracción IgG de los CI incrementa, al menos en un orden de magnitud,

los niveles de citotoxicidad inducidos por los mismos. Aún cuando los CIcat fueron empleados a concentraciones entre diez y cincuenta veces menores respecto de los CIc, indujeron respuestas citotóxicas en niveles al menos tres veces superiores (*Tabla 6*).

Las respuestas citotóxicas inducidas por CIc y CIcat difirieron no sólo en el aspecto cuantitativo sino también en los requerimientos del citoesqueleto involucrados en su producción. En este sentido, se observó que la citocalasina B ejerció efectos opuestos sobre las mismas, incrementando notablemente la citotoxicidad inducida por CIc e inhibiendo marcadamente aquella inducida por CIcat (*Figura 13*). Se determinaron también efectos diferentes, al analizar la acción de la colchicina. La misma no afectó la respuesta inducida por CIc mientras que prácticamente duplicó aquella estimulada por CIcat. Más interesantes aún fueron las observaciones realizadas al emplear Prostaglandina E<sub>2</sub> como inmunomodulador. Se determinó que a concentraciones de 0.1µM no afectó la citotoxicidad inducida por CIc (200µg/ml; % inhibición: 5±4, n=5) pero inhibió marcadamente las citotoxicidad inducida por CIcat (4µg/ml; % inhibición: 68±11, P<0,01, n=6). Estas diferencias no pueden ser fácilmente explicadas. Las mismas constituyen un objeto de estudio en la actualidad.

Los IRO son capaces de inducir la destrucción de tejidos (256-259) a través de un conjunto de mecanismos, entre los que figuran la alteración de proteínas intra y extracelulares, la modificación de la estructura de los ácidos nucleicos y la peroxidación lipídica, conducente a la pérdida de la integridad estructural de las membranas celulares (52). Los resultados del presente estudio indican que los CIcat inducen respuestas QL marcadamente exacerbadas respecto de las estimuladas por CIc. La identidad de las especies responsables de la emisión de luz no ha sido determinada. Sin embargo, la marcada inhibición de la QL inducida por ambos tipos CI en presencia de SOD (% inhibición>60, en todos los casos), confirman que las especies reactivas del oxígeno generadas por activación celular son las principales responsables de la respuesta observada.

Numerosas evidencias sugieren que la elastasa, junto con las metaloproteasas colagenasa y gelatinasa, constituyen mediadores claves de la destrucción tisular en los procesos inflamatorios (58,77). De hecho, cada una de estas enzimas es capaz no sólo de degradar componentes de la matriz extracelular sino que también puede amplificar los procesos inflamatorios al clivar componentes del complemento, el fibrinógeno y el factor de Hageman y generar fragmentos bioactivos (260,261). La actividad de las proteasas se

encuentra regulada por diferentes antiproteasas presentes en el plasma y los fluidos intersticiales tales como la  $\alpha_1$ -antitripsina, la  $\alpha_2$ -macroglobulina y el inhibidor de leucoproteasas. Sin embargo, estos inhibidores pueden ser oxidativamente inactivados tanto *in vitro* (77,78,241,243,244,262) como *in vivo* (244,263) por radicales libres generados a expensas de la activación de los propios neutrófilos. Por lo tanto, la capacidad destructiva de las proteasas del neutrófilo *in vivo*, guarda estrecha relación con la habilidad de los mismos de generar oxidantes. Esta afirmación se halla sustentada, además, en la actividad que ejercen los oxidantes sobre la colagenasa y la gelatinasa. Ellas son liberadas como proenzimas y son activadas por IRO producidos por las células fagocíticas (80,81).

Los resultados presentados en esta Tesis indican que los CIcat, no sólo estimulan la producción de mayores cantidades de IRO respecto de los CIc, sino que además son potentes inductores de la liberación extracelular de elastasa (*Figura 17*). Es posible entonces, que los oxidantes producidos a expensas de la activación inducida por CIcat, subviertan, *in vivo*, la capacidad antiproteásica de los tejidos, permitiendo a las enzimas proteolíticas incrementar la destrucción tisular y amplificar la inflamación.

Los neutrófilos humanos expresan constitutivamente dos tipos de RFcy, el RFcyII y el RFcyIII. Empleando neutrófilos intactos, Tosi y Berger (162), cuantificaron estos receptores mediante el uso de los AcM IV.3 y 3G8, radiomarcados con  $^{125}\text{I}$ . Los mismos revelaron la existencia de  $110.200 \pm 9600$  RFcyIII/célula y  $15.100 \pm 700$  RFcyII/célula, coincidente con lo informado por Petroni y colaboradores (264). El RFcyII es una proteína transmembrana de 40 kDa de peso molecular, mientras que el RFcyIII expresado en neutrófilos, es una molécula extrínseca anclada a la membrana a través de un enlace GFI, cuyo peso molecular varía entre 50 y 70 kDa dependiendo del grado de glicosilación (4,265,266). El significado funcional de cada uno de ellos en la activación de respuestas de neutrófilos humanos inducidas por CI ha sido motivo de una fuerte controversia. Tosi y Berger (162) describieron que la eliminación del RFcyIII por tratamiento con elastasa no inhibe la fagocitosis de partículas de parafina cubiertas con IgG. Este tratamiento tampoco inhibe la producción de  $\text{O}_2^-$  estimulada por diferentes tipos de CI, tales como IgG agregada por calor, CI formados con seroalbúmina humana (SAH)/anti-SAH o partículas de látex cubiertas con SAH/anti-SAH. Coincidiendo con estos resultados, Graziano y Fanger (132) observaron que el RFcyIII del neutrófilo es incapaz de mediar la CCDA contra líneas celulares de hibridoma que expresan en su superficie AcM específicos para este receptor.

Considerados en conjunto, estos hallazgos sugieren que el RFcyIII expresado por el neutrófilo no constituye, al menos en estos modelos experimentales, un receptor transduccionalmente activo. Huizinga y colaboradores (267) sugirieron, por otra parte, que la unión de un CI al RFcyIII incrementa la afinidad del mismo por el RFcyII, el cual constituye un receptor activo transduccionalmente. De acuerdo a este modelo, el RFcyIII expresado en neutrófilos, en virtud de su superioridad numérica, podría cumplir un papel relevante como sitio de anclaje para los CI. Ello incrementaría la concentración local de los mismos, facilitando su interacción con el RFcyII (8).

Contrastando con estos estudios, Shen y colaboradores (268) demostraron que la CCDA contra *blancos* eritroides puede ser inducida por heteroanticuerpos consistentes de fragmentos Fab del AcM 3G8 (anti-RFcyIII) y fragmentos Fab con especificidad hacia las células *blanco*. Ello sugiere que el RFcyIII expresado por el neutrófilo, pese a estar anclado a la membrana citoplasmática a través de un grupo GPI puede funcionar como molécula transductora de señales de activación. Por otra parte, en estudios realizados a fin de determinar las consecuencias funcionales relacionadas con la existencia de las variantes alélicas NA1 y NA2 del RFcyIII, Salmon y colaboradores (131) observaron que el bloqueo del RFcyII con fragmentos Fab del AcM IV.3 inhibe sólo parcialmente la fagocitosis de EA, mientras que fragmentos Fab del 3G8 lo hacen marcadamente. Los autores postularon que ambos receptores participan de modo sinérgico en la fagocitosis de EA. Asimismo, observaron que neutrófilos de individuos con el alotipo NA2 fagocitan menos eficientemente EA que aquellos que exhiben el alotipo NA1 y que dicha diferencia se amplifica tres veces si se bloquea al RFcyII. Resultados similares fueron obtenidos por Bredius y colaboradores (269) empleando *S. aureus*, *H. influenzae* tipo b y *N. meningitidis* grupo B, sensibilizados con anticuerpos IgG1. Por otra parte, Hundt y Schmidt (270) informaron, que tanto el RFcyII como el RFcyIII son capaces de inducir el estallido respiratorio al ser *entrecruzados* con AcM específicos. Crockett-Torabi y Fantone (129) demostraron que los CI precipitantes inducen la producción de  $O_2^-$  a través del RFcyIII, en tanto que ambos receptores son responsables de la activación del neutrófilo inducida por CI solubles. Estudios adicionales demostraron que ambos RFcy están involucrados en la liberación de enzimas lisosomales (271,272). Estos hallazgos sugieren que tanto el RFcyII como el RFcyIII son capaces de inducir la activación de diferentes respuestas en el

neutrófilo humano. El rol de cada uno de ellos parece depender de las características del CI empleado y de la función analizada.

Las respuestas inducidas por CI preparados con IgG catiónica involucran sólo la participación del RFcyII. El hecho de que concentraciones saturantes del AcM 3G8 resulten incapaces de reducir las diferentes funciones analizadas, sugiere que el RFcyIII no funciona como elemento de anclaje de los C<sub>I</sub>cat a la superficie celular ni participa en la transducción de señales de activación celular. La supresión completa de las respuestas, producida a consecuencia del bloqueo del RFcyII con el AcM IV.3, confirman este último tópico. En relación a las funciones inducidas por C<sub>I</sub>c o C<sub>I</sub>cat(Ag), se observó una inhibición parcial a consecuencia del bloqueo del RFcyIII sugiriendo que este receptor participa en las respuestas estimuladas por estos CI. Su modo de participación no se hallaría restringido al anclaje de los CI, como lo demuestra el hecho de que aún en presencia de concentraciones saturantes del AcM IV.3, las diferentes respuestas analizadas alcanzan valores significativos.

Los neutrófilos humanos no expresan en condiciones basales el RFcyI. Sin embargo, el mismo puede ser inducido por acción del IFN $\gamma$  (17,268). El IFN $\gamma$  se ha detectado en altas concentraciones en el suero de pacientes con enfermedades autoinmunes (271). Se ha descrito también una correlación entre los niveles de IFN $\gamma$  séricos y la actividad de la enfermedad (271). Considerando la relevancia de los CI en las manifestaciones clínicas de las enfermedades autoinmunes, y en particular la importancia de los anticuerpos catiónicos en las manifestaciones renales de LES, se especuló que los C<sub>I</sub>cat serían capaces de inducir aún mayores niveles de citotoxicidad luego de la neosíntesis del RFcyI, a consecuencia de la incubación con IFN $\gamma$ . El pretratamiento de neutrófilos con IFN $\gamma$  no incrementó, sin embargo, las respuestas citotóxicas inducidas por C<sub>I</sub>c o C<sub>I</sub>cat. La irrelevancia del RFcyI en la inducción de dichas respuestas fue demostrada, además, mediante el empleo de dos AcM dirigidos contra diferentes epitopes del RFcyI. Ellos se mostraron absolutamente incapaces de inhibir la citotoxicidad inducida por los mismos.

Los mecanismos responsables de la notable actividad agonista de los C<sub>I</sub>cat, no han sido elucidados. Numerosos trabajos han establecido que las proteínas cationizadas son capaces de unirse a las superficies celulares a través del establecimiento de interacciones inespecíficas de naturaleza electrostática (272,273). Ginsburg y colaboradores (274) describieron la capacidad de la poli-L-histidina de aglutinar leucocitos y *Streptococcus* a

pH 7,4. Los mismos autores, demostraron que, al ser cationizadas, las enzimas glucosa oxidasa y catalasa adquieren una alta avidéz por las células endoteliales (275). Más aún, la glucosa oxidasa cationizada, al ser instilada en la traquea de ratas anestesiadas, mostró una actividad tóxica sobre el pulmón al menos diez veces superior respecto de la enzima nativa (275). Otros autores demostraron que las moléculas policationicas pueden interactuar con cargas negativas presentes en el lumen del endotelio microvascular (276,277). Triguero y colaboradores (278), por su parte, establecieron que la cationización de la IgG permiten su pasaje a través de la barrera hematoencefálica, el cual no se observa empleando IgG nativa. Según estos autores, las interacciones electrostáticas establecidas entre las moléculas de IgG y secciones aniónicas de las superficies capilares inducen un mecanismo de endocitosis que conduce *in vivo* a la transcitosis neta de la IgG cationizada al cerebro (278).

Teniendo en cuenta estos antecedentes, es posible especular que el establecimiento de interacciones electrostáticas entre las membranas de las células fagocíticas y grupos cationicos de los CIcat, incremente la unión de los mismos a la superficie celular, aumentando la avidéz del CI por los RFcy y su capacidad de activar respuestas a través de los mismos. Esta presunción se fundamenta, además, en los resultados obtenidos al analizar la actividad agonista de los CIcat sobre plaquetas, en presencia de agentes fuertemente aniónicos tales como la heparina (Tabla 13). No sólo la unión de los CIcat a la superficie celular fue marcadamente disminuída, sino que su capacidad de inducir la activación plaquetaria resultó reducida a los niveles observados para los CIc. Resultados similares se encontraron al analizar la actividad agonista de los CIcat sobre células fagocíticas (datos no mostrados).

El aumento de la capacidad agonista de los CI ocasionado por la cationización de la fracción IgG, se manifiesta aún en circunstancias en que la IgG funciona como antígeno en el CI. Esta observación resulta relevante a la luz de recientes hipótesis propuestas a fin de explicar la etiopatogénesis de la nefritis lúpica. Sugisaki y colaboradores (279) demostraron en ratones NZB/NZW F1, la existencia de anticuerpos antinucleares con reactividad cruzada hacia el Fc de las IgG, es decir, con actividad de factor reumatoideo (FR). Cabe destacar que los FR se encuentran presentes en el suero de aproximadamente el 50% de los pacientes con lupus activo (279) y parecen jugar un papel relevante en la inducción de daño renal. Al analizar la composición de los depósitos inmunes glomerulares los autores establecieron la presencia de CI formados por IgG e IgG antinuclear con actividad de FR.

Teniendo en cuenta la presencia de altas concentraciones de IgG catiónica tanto en el suero como en el eluido renal de pacientes con LES, es posible suponer que aún cuando la IgG catiónica constituya la fracción antigénica de los CI, la misma podría inducir un notorio incremento en la magnitud de las reacciones inflamatorias generadas *in situ*, a consecuencia del depósito de CI sobre la MBG.

#### 5.2.2.- Respuestas trombóticas inducidas por CI: Impacto de la carga eléctrica de los anticuerpos IgG

Diversas evidencias involucran a las plaquetas en la inflamación glomerular en el LES. Se han detectado niveles relativamente bajos de plaquetas circulantes en pacientes con nefritis activa (280). Coincidentemente, se ha observado que la disminución en los niveles de plaquetas se correlaciona con la presencia de trombos intraglomerulares y patología renal (285). Se ha encontrado, además, una disminución en los niveles de serotonina intraplaquetaria en pacientes con nefritis lúpica (281), la que se correlaciona con una elevada capacidad agregante de las plaquetas (281,282) y un aumento en los niveles de serotonina plasmática, sugiriendo que la liberación de aminas vasoactivas plaquetarias tiene lugar *in vivo*. Debido a que los niveles más bajos de serotonina intraplaquetaria fueron observados en pacientes con nefropatía membranosa, prototipo de glomerulonefritis mediada por CI (166), se ha postulado que la activación plaquetaria es el resultado de la interacción entre plaquetas y CI (166).

Es importante destacar la prevalencia de manifestaciones tromboembólicas en pacientes con glomerulonefritis lúpica. La presencia de anticuerpos catiónicos en estos pacientes (171,252) y la marcada eficiencia de los CI que los contienen para inducir activación plaquetaria, sugieren que los mismos podrían constituir importantes factores trombogénicos que contribuyan al deterioro de la funcionalidad renal en el LES. En este sentido, cabe señalar además la existencia de una fuerte asociación entre eventos tromboembólicos asociados a la glomerulonefritis lúpica y la presencia de diferentes familias de anticuerpos anti-fosfolípidos (286,287), una de las cuales se caracteriza por expresar altos *pI* (Dr Ruiz Arguelles, Universidad de Puebla, México, comunicación personal). Estos anticuerpos, al igual que los anticuerpos catiónicos anti-ADN podrían jugar un papel relevante en la patogénesis del LES, confiriéndole a los CI que los contienen,



una notable potencia inflamatoria y trombótica. La eficiencia de los CIcat de inducir activación plaquetaria, por otra parte, podría también ser importante como fenómeno amplificador de la inflamación, a través de la liberación de aminas vasoactivas plaquetarias, las cuales podrían incrementar el influxo de fagocitos, exacerbando la severidad de las lesiones renales.

Los resultados obtenidos en el presente estudio, indican que la IgG humana cationizada es capaz *per se* de inducir agregación de PL y PF. Estos resultados difieren de los obtenidos empleando neutrófilos y monocitos como células efectoras, con los cuales la IgG cationizada resultó incapaz de inducir la activación celular. Por otra parte, este hallazgo contradice al actual paradigma de activación que sostiene que sólo la IgG agregada o los CI conteniendo IgG son capaces de inducir funciones dependientes de los RFcy (23,25,288). Aún cuando no resulta posible descartar que este efecto obedezca a la presencia de bajas concentraciones de IgG agregada, otro mecanismo podría ser operativo. Trabajos recientes han demostrado que ciertos AcM dirigidos contra Ag de la superficie plaquetaria son capaces de activar a las plaquetas a través de la microagregación de RFcy de plaquetas adyacentes (289-291). Es posible especular, que las moléculas de IgG cationizada, merced a su capacidad de establecer fuertes interacciones electrostáticas con moléculas aniónicas de la superficie plaquetaria, conformen un CI particulado capaz inducir la agregación plaquetaria.

### 5.2.3.- Respuestas proinflamatorias mediadas por neutrófilos y monocitos inducidas por CI: Impacto de la carga eléctrica de los antígenos

Los resultados presentados en esta Tesis muestran, además, que la incorporación de antígenos catiónicos en un CI le confiere también notables propiedades agonistas. Merece destacarse, no obstante, que en todos los sistemas estudiados los niveles de activación inducidos por los CIcat(Ag) fueron significativamente menores respecto de aquellos inducidos por los CI preparados con IgG catiónica. Este comportamiento se evidenció con mayor claridad al evaluar las respuestas de activación plaquetaria ensayadas en PRP (*Figura 33*). Mientras que los CI preparados con IgG catiónica indujeron potentes respuestas de agregación, aquellos preparados con antígenos cationizados no indujeron respuesta alguna. Los motivos de tal comportamiento no resultan obvios. Podrían estar

relacionados con la mayor o menor distancia de los grupos químicos cargados positivamente, respecto del dominio del Fc de la IgG responsable de interactuar con los RFcy.

Numerosos estudios previos han sugerido que los antígenos catiónicos presentan propiedades inflamatorias particulares, las que parecen jugar un papel relevante en la patogénesis del LES como así también en ciertas glomerulonefritis y artritis de origen infeccioso.

Los sitios aniónicos de la MBG condicionan la permeabilidad glomerular a las proteínas plasmáticas (175,176,196,198,292). Los antígenos catiónicos presentan una capacidad incrementada respecto de los aniónicos o neutros para establecer interacciones electrostáticas con proteoglicanos altamente aniónicos de la MBG. Oite y colaboradores (144) han demostrado que la perfusión en la arteria renal de antígenos catiónicos, seguida por la administración sistémica de anticuerpos específicos induce glomerulonefritis severa en ratas, mientras que el mismo procedimiento no es nefritogénico al emplear antígenos nativos. Por otra parte, se ha demostrado que la administración diaria de SAB cationizada ( $pI > 9,5$ ) a conejos, predispone a la formación de CI *in situ*, induciendo nefropatía membranosa asociada a síndrome nefrótico (201). Estos antecedentes llevaron a postular que diversas proteínas catiónicas podrían estar involucradas en la inducción del daño tisular asociado a las manifestaciones renales del LES (293,294). Entre ellas, las histonas, proteínas altamente catiónicas ( $pI = 10,5-11,0$ ) con gran afinidad por la MBG, han recibido una atención particular debido a que están presentes en concentraciones aumentadas en el suero de pacientes con LES (295,296). La deposición de histonas, fenómeno observado en glomérulos de pacientes lúpicos (293), podría promover la deposición adicional de ADN liberado local o sistémicamente y determinaría, además, la formación de CI a consecuencia de la interacción de anticuerpos anti-ADN y/o anti-histonas. De hecho, los anticuerpos anti-histonas son los prevalentes entre los anticuerpos antinucleares del LES (297), existiendo una correlación positiva entre la actividad de la enfermedad y sus niveles sistémicos (298,299).

La participación de los antígenos catiónicos en la inducción de daño renal no se hallaría restringido al LES. Se ha demostrado que los *Streptococcus* del grupo A producen ciertas proteínas catiónicas extracelulares ( $pI > 8,5$ ) que presentan alta afinidad por la MBG

(300). Las mismas tienden a depositarse en glomérulos, siendo encontradas como depósitos inmunes glomerulares en las glomerulonefritis post-streptocóccicas en el hombre (301).

Los estudios mencionados han adjudicado el potencial nefritogénico de los antígenos catiónicos a su mayor tendencia a depositarse a nivel renal y neutralizar a los polianiones glomerulares. Los resultados de la presente Tesis sugieren, sin embargo, que independientemente de su capacidad de alterar la permeabilidad glomerular, el papel patogénico de los antígenos catiónicos podría estar relacionado a su capacidad de conferir, a los CI que los contienen, propiedades proinflamatorias y trombóticas exacerbadas.

La carga eléctrica, como factor que influencia la retención articular de los antígenos, está emergiendo como un concepto importante en la inmunopatología de las artritis. La retención antigénica constituye uno de los fenómenos responsables de la persistencia de la inflamación articular, que eventualmente puede conducir a la destrucción severa del cartilago en diversas formas de artritis crónicas (302-304). No obstante, se ha demostrado que la cationicidad de una proteína no garantiza *per se* su potencialidad artritogénica. En distintos modelos de artritis se estableció que se requiere la preinmunización del animal para el desarrollo de la misma (302,305,306). Ello sugiere que la formación de CI es un hecho determinante para que la inflamación articular tenga lugar. Estos hallazgos están de acuerdo con los resultados de la presente Tesis donde se encontró que los antígenos cationizados son incapaces *per se* de inducir respuestas proinflamatorias.

La notoria capacidad artritogénica conferida por los antígenos catiónicos a los CI que los incluyen, podría explicar el desarrollo de ciertas artritis infecciosas, en las cuales se han descrito antígenos bacterianos altamente catiónicos tales como las inducidas por *Yersinia enterocolitica* y *Streptococcus* del grupo A (300,306).

El tratamiento de las glomerulonefritis y de las artritis está basado principalmente en terapias inmunosupresoras y anti-inflamatorias. Son múltiples las evidencias presentadas que sugieren un papel destacado para los anticuerpos y antígenos catiónicos en las mismas. Sería importante evaluar el potencial terapéutico de aquellos agentes capaces de interferir, *in vivo*, las interacciones electroestáticas establecidas entre los agentes catiónicos, potencialmente dañinos y diversas moléculas aniónicas naturales. Hallazgos de Adler y colaboradores (307) indicando que la protamina interfiere en la unión de antígenos catiónicos exógenos a sitios aniónicos de la pared capilar glomerular, ejerciendo un efecto

beneficioso sobre la nefropatía membranosa (307), alientan a continuar la investigación en este campo.

La incrementada actividad biológica conferida a los anticuerpos IgG como consecuencia de su cationización *in vitro*, plantea la posibilidad de que este procedimiento brinde una herramienta terapéutica adecuada en casos, tales como la inmunoterapia pasiva anti-tumoral, en los que el reclutamiento de funciones efectoras inducidas a través de los RFcy es deseable. A este respecto, merecen destacarse hallazgos realizados en otros laboratorios empleando procedimientos de cationización *in vitro* similares a los utilizados en el presente estudio. Triguero y colaboradores (308) demostraron que la IgG cationizada presenta, en relación a la IgG nativa, no sólo un mayor índice de captura por diferentes órganos luego de su administración *in vivo*, sino también la capacidad de acceder a sitios protegidos como el sistema nervioso central (SNC) (278). Por otra parte, Pardridge y colaboradores (309,310) cationizaron AcM IgG dirigidos contra una proteína del virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) observando que, a diferencia de los anticuerpos IgG nativos, los catiónicos presentan una mayor tendencia a ser endocitados, inhibiendo la replicación del HIV en linfocitos periféricos humanos. Estos resultados llevaron a postular el empleo de AcM catiónicos para el diagnóstico y/o tratamiento de distintas patologías (311). En nuestro laboratorio hemos realizado, en los últimos meses, una serie de experiencias tendientes a evaluar *in vivo* la capacidad de los anticuerpos IgG catiónicos de inducir mecanismos citotóxicos dirigidos contra adenocarcinomas murinos. Los resultados obtenidos, sumamente preliminares, son alentadores y sugieren que la modificación del *pI* de los anticuerpos IgG constituye una alternativa que merece ser explorada en función de su posible utilidad diagnóstica y/o terapéutica.

### **5.3.- Capacidad de los CI de inducir per se la quimiotaxis de neutrófilos humanos**

Es aceptado que las propiedades quimiotácticas de la IgG residen en su habilidad de formar CI e inducir, consecuentemente, la activación del complemento y la subsecuente producción de péptidos quimiotácticos como el C5a (217,218,312,313). Sin embargo, los resultados de algunos estudios han cuestionado esta apreciación. Wilkinson (219), determinó que mientras la IgG nativa no indujo quimiotaxis de neutrófilos, la IgG agregada por calor ejerció efectos quimiotácticos y quimioquinéticos. Contrastando con estos

hallazgos, Sibille y colaboradores (221) describieron que la IgG nativa fue quimiotáctica, pero no quimioquinética. Arashi y colaboradores (220), por otra parte, demostraron que tanto las IgG monoméricas de rata como también los CI con ellas formados, estimularon la locomoción celular, aunque la naturaleza de tal migración (quimiotáctica o quimioquinética) difirió entre las distintas subclases de IgG. Otros estudios, por el contrario, señalaron la incapacidad, tanto de la IgG nativa como de la agregada de inducir la migración de neutrófilos (221,222). Los resultados de la presente Tesis indicaron que distintas clases de CI solubles son capaces de inducir la migración de neutrófilos humanos en ausencia de complemento (*Figura 36*). El análisis *checkerboard* estableció la naturaleza quimiotáctica de dicha respuesta locomotora (*Tabla 17*). En acuerdo con Wilkinson (219) se observó, además, que la IgG monomérica es incapaz *per se* de inducir la quimiotaxis de PMN, pero adquiere dicha capacidad al ser agregada por calor. Se determinó, también, que la capacidad quimiotáctica de los CI y la IgG agregada (dato no mostrado) fue dependiente principalmente del RFcyII. El hecho de que (1) sólo la IgG complejada o polimérica sea capaz de inducir la migración celular y (2) que dicha respuesta involucre la participación de los RFcy, están de acuerdo con el paradigma clásico respecto de la funcionalidad de los RFcy, que indica que sólo aquellos ligandos capaces de inducir la microagregación de los RFcy son capaces de transducir señales de activación celular.

Durante el desarrollo de los experimentos se observó, en uno de los controles, que la migración de neutrófilos inducida por FMLP no fue afectada por la preincubación de las células con el fragmento F(ab')<sub>2</sub> del AcM 3G8. Estos resultados contrastan marcadamente con los informados por Kew y colaboradores (314), quienes encontraron que tanto el AcM 3G8 como sus fragmentos Fab inhiben la quimiotaxis inducida por FMLP. Las razones de esta discrepancia no pueden ser fácilmente explicadas, sin embargo, es posible que obedezcan, al menos en parte, a las distintas metodologías empleadas para evaluar la migración celular. El método empleado por Kew y colaboradores, (*leading front method*), requiere el uso de un filtro cuyo espesor es de aproximadamente 120-130 µm, siendo la quimiotaxis cuantificada en función de la profundidad de penetración alcanzada por las células que migran más lejos (315). El efecto inhibitorio del AcM 3G8 observado bajo dichas condiciones experimentales, podría reflejar una reducción en la velocidad de migración de la población entera o bien de una subpoblación de la misma. La evaluación de las respuestas quimiotácticas en la presente Tesis, se basa en el empleo de un filtro 10 veces

más delgado, siendo la migración determinada en función del recuento de las células que atraviesan el mismo. Reducciones parciales en la velocidad de locomoción por lo tanto, podrían ser distinguidas por el método de Kew y colaboradores sin ser aparentes en las condiciones experimentales empleadas en este estudio.

Los péptidos formilados bacterianos juegan un rol crítico en el reclutamiento de neutrófilos a sitios inflamatorios durante el transcurso de diversas infecciones bacterianas (212,223). Los resultados del presente estudio indicaron que la quimiotaxis inducida por FMLP o por CI es incrementada aditivamente cuando la migración es inducida de manera simultánea por ambos estímulos (*Figura 40*). Esta respuesta de naturaleza aditiva podría ser relevante en numerosos procesos infecciosos asociados a la presencia de CI circulantes (120).

Los hallazgos recientes de Sylvestre y Ravetch en ratones deficientes de RFcy, sugieren que los CI son los responsables de iniciar las respuestas inflamatorias de tipo III, a través del reclutamiento de células fagocíticas (8,126). En contraposición con las hipótesis tradicionales, el complemento contribuiría sólo a amplificar la reacción inflamatoria. Esta hipótesis se encuentra sustentada, además, en observaciones realizadas en huéspedes deficientes del complemento, en los cuales se observa un infiltrado inflamatorio significativo (316-318). Los resultados del presente estudio proveen evidencias de que los CI podrían inducir *per se* la quimiotaxis de neutrófilos a dichos focos inflamatorios. El empleo de un modelo *in vivo* que permita determinar la importancia de este fenómeno, no sólo en la etiología de la injuria tisular de naturaleza autoinmune sino también en el reclutamiento necesario de los neutrófilos a fin de enfrentar las diversas agresiones microbianas, constituye un proyecto desafiante a ser emprendido en un futuro próximo.

## 6.- CONCLUSIONES

- El tratamiento de neutrófilos humanos con pronasa o quimotripsina potencia notablemente la actividad del RFcyII. Esta potenciación se expresa en una capacidad incrementada de formar rosetas EA y de mediar la CCDA y la QL. Este efecto es selectivo para el RFcyII, no siendo observado en otros receptores operativos en el neutrófilo.
- La cationización de la fracción IgG de los CI, incrementa al menos en un orden de magnitud su capacidad agonista dependiente de los RFcy. Aún cuando los CIcat sean empleados a concentraciones entre diez y cincuenta veces menores, inducen respuestas proinflamatorias mediadas por células fagocíticas en niveles superiores a las inducidas por los CIc. Las respuestas estimuladas por los CIcat involucran exclusivamente la participación del RFcyII, mientras que aquellas inducidas por los CIc están mediadas por el RFcyII y el RFcyIII.
- Las plaquetas constituyen el sistema celular donde el impacto de la carga eléctrica de los CI se evidencia con mayor intensidad. Los CIcat indujeron una fuerte respuesta de activación plaquetaria empleando concentraciones fisiológicas de PL, PF o PRP. Bajo idénticas condiciones, los CIc no estimularon la activación plaquetaria aún cuando fueron utilizados a concentraciones cien veces superiores. Los CIc sólo indujeron bajos niveles de activación cuando se usaron a concentraciones 500 veces mayores y en presencia de concentraciones de plaquetas tres veces superiores.
- La cationización del componente antigénico de los CI -CIcat(Ag)-, también incrementa notablemente la potencia biológica de los mismos comparada con aquella exhibida por CI formados con antígenos nativos. A diferencia de los RFcy involucrados en las respuestas estimuladas por los CIcat, las respuestas inducidas por los CIcat(Ag) involucran la participación del RFcyII y del RFcyIII. La presencia del RFcyIII, sin embargo, no es un requisito indispensable para que los CIcat(Ag) se

comporten como potentes agonistas, dado que los mismos indujeron fuertes respuestas de activación de plaquetas, las cuales sólo expresan el RFc $\gamma$ II.

- Los anticuerpos IgG nativos obtenidos del suero de individuos normales presentan *pI* heterogéneos, comprendidos en el rango 5,8-8,5. Sin embargo, la carga eléctrica de los mismos, no afecta la capacidad de los CI que los incluyen de inducir respuestas dependientes de los RFc $\gamma$  mediadas por células fagocíticas.
- Los CI constituyen *per se* potentes estímulos quimiotácticos para los neutrófilos humanos. Su capacidad de inducir la migración de neutrófilos involucra, fundamentalmente, la participación del RFc $\gamma$ II.



## 7.- REFERENCIAS

- 1.- Theofilopoulos, A.N. y Dixon, F.J.  
Immune complexes in human diseases.  
Am. J. of Pathol. 100: 531, 1980.
- 2.- Muller-Erberhard, J.H.  
Complement reaction pathways.  
En Progress in Immunology IV, ed. Fougereau M.y Dausset, J.  
Academic Press, New York, 1980, pp. 1002.
- 3.- Kathryn Liszewsky, M. y Atkinson, P.  
The complement system.  
En Fundamental Immunology III, ed. Paul, W.E.  
Raven Press, New York, 1993, pp.917.
- 4.- Unkeless, J.C.  
Function and heterogeneity of human Fc receptors for immunoglobulin G.  
J. Clin. Invest. 83: 355, 1989.
- 5.- Van de Winkel, J.G.J. y Anderson, C.L.  
Biology of human immunoglobulin G Fc receptors.  
J. Leuk. Biol. 49: 511, 1991.
- 6.- Amigorena, S., Bonnerot, C., Drake, J.R., Choquet, D., Hunziker, W., Guillet, J.G., Wester, P., Sautes, C., Mellam, I. y Fridman, W.H.  
Cytoplasmic domain heterogeneity and functions of IgG Fc receptors in B lymphocytes.  
Science 256: 1808, 1992.
- 7.- Williams, A.F. y Neil Barclay A.  
The immunoglobulin superfamily-domains for cell surface recognition.  
Ann. Rev. Immunol. 6: 381, 1988.
- 8.- Ravetch, J.  
Fc receptors: Rubor redux.  
Cell. 78: 553, 1994.
- 9.- Van de Winkel, J.G.J. y Capel, P.J.A.  
Human IgG Fc receptor heterogeneity:molecular aspects and clinical implications.  
Immunol. Today 14: 215, 1993.
- 10.- Ravetch, J. y Kinet, J.P.  
Fc receptors.  
Ann. Rev. Immunol. 9: 457, 1991.
- 11.- Fridman, W.H., Bonnerot, C., Daeron, M., Amigorena, S., Teillaud, J.L. y Sautes, C.  
Structural bases of FcγReceptor functions.  
Immunol. Rev. 125: 49, 1992.

- 12.- Metzger, H. y Kinet, J.P.  
How antibodies work: focus on Fc receptors.  
FASEB J. 2: 3, 1988.
- 13.- Metzger, H.  
The receptor with high affinity for IgE.  
Immunol.Rev. 125: 37, 1992.
- 14.- Beaven, M.A. y Metzger, H.  
Signal transduction by Fc receptors: the FcεRI case.  
Immunol.Today 14: 222, 1993.
- 15.- Sandor, M. y Lynch, R.G.  
The biology and pathology of Fc receptors.  
J. Clin. Immunol. 13: 237, 1993.
- 16.- Dower, S.K., De Lisi, C, Titus, J.A. y Segal, P.M.  
The mechanism of binding of multivalent immune complexes to Fc receptors.  
Biochemistry 20: 6335, 1981.
- 17.- Perussia, B., Dayton, E., Lazaruz, R., Fanning, V. y Trinchieri, G.  
Immune interferon induce the receptor for monomeric IgG1 on human monocytic and myeloid cells.  
J. Exp. Med. 158: 1092, 1983.
- 18.- Walker, B.A.M., Hagenlocker, B.E., Stubbs, E.B., Sandborg, R.R., Agranoff, B.W. y Ward, P.A.  
Signal transduction events and RFcγ engagement in human neutrophils stimulated with human immune complexes.  
J. Immunol. 146: 735, 1991.
- 19.- Ceuppens, J.L., Bloemmen, F.J. y Van Wauwe, J.P.  
T-cell unresponsiveness to the mitogenic activity of OKT3 antibody results from a deficiency of the monocyte Fc-gamma receptors for murine IgG2a and inability to cross-link the T3-Ti complex.  
J. Immunol. 135: 165, 1985.
- 20.- Ceuppens, J.L., Baroja, M.L. y Van Vaeck, F. y Anderson, C.L.  
Defect in membrane expression of high affinity 72-kD Fcγ receptors on phagocytic cells in four healthy subjects.  
J. Clin. Invest. 82: 571, 1988.
- 21.- Cohen, L., Sharp, S., Kulczycki, A. Jr.  
Human monocytes, B lymphocytes each has structurally unique Fc receptors.  
J. Immunol. 131:378, 1983.
- 22.- Kurlander, R.J., Haney, A.F., Gartrell, J.  
Human peritoneal macrophages posses two populatios of IgG Fc receptors.  
Cell. Immunol. 86: 479,1984.

- 23.- Rosenfeld, S.I., Looney, R.J., Leddy, J.P., Phipps, D.C., Abraham, G.N., Anderson, C.L..  
Human platelet Fc receptor for immunoglobulin G: Identification as a 40,000 molecular weight membrane protein shared by monocytes.  
J. Clin. Invest. 76: 2317, 1985.
- 24.- Warmerdan, P.A.M., Van de Winkel, J.G.J., Vlug, A., Westerdaal, N.A.C., y Capel, P.J.A.  
A single aminoacid in the second Ig-like domain of the human Fc $\gamma$  receptor II is critical for the human IgG2 binding.  
J. Immunol. 147: 1338, 1991.
- 25.- Anderson, C.L., Chacko, G.W., Osborne, J.M. Brandt, J.T.  
The Fc receptor for the immunoglobulin G (Fc $\gamma$ RII) on human platelets.  
Seminars in Thrombosis and hemostasis 21: 1, 1995.
- 26.- Tax, W.J.M., Willems, H.W., Reekers, P.P.M., Capel, P.J.A., y Koene, R.A.P.  
Polymorphism in mitogenic effect of IgG1 monoclonal antibodies against T3 antigen on human T cells.  
Nature 304: 445, 1983.
- 27.- Warmerdan, P.A.M., Van de Winkel, J.G.J., Vlug, A., Westerdaal, N.A.C., y Capel, P.J.A.  
A single aminoacid in the second Ig-like domain of the human Fc $\gamma$  receptor II is critical for the human IgG2 binding.  
J. Immunol. 147: 1338, 1991.
- 28.- Warmerdan, P.A.M., Van de Winkel, J.G.J., Gosselin, E.J., y Capel, P.J.A.  
Molecular basis for the polymorphism of human Fc $\gamma$  RII (CD32).  
J. Exp. Med. 172:109, 1990.
- 29.- Katz, H.R., Raizman, M.B., Gartner, C.S., Scott, H.C., Benson, A.C. y Frank Austen, K.  
Secretory granules mediators release and generation of oxidative metabolites of arachidonic acid via Fc-IgG receptor binding in mouse mast cells.  
J. Immunol. 148: 868, 1992.
- 30.- Narasimhan, V., Holowka, D. y Baird, B.  
A guanine nucleotide-binding protein participates in IgE receptor mediated activation of endogenous and reconstituted phospholipase A<sub>2</sub> in a permeabilized cell system.  
J. Biol. Chem. 265: 1459, 1990.
- 31.- Selvaraj, P., Carpen, O., Hibbs, M.L. y Springer, T.A.  
Natural killerang granulocyte Fc $\gamma$  receptor III (CD16) differ in membrane anchor and signal transduction.  
J. Immunol. 143: 3283, 1989.

- 32.- Scallon, B.J., Scigliano, E., Freedman, V.H., Miedel, M.C., Pan, I.C.E., Unkeless, J.C., y Schlondorff, D.A.  
A human immunoglobulin G receptor exists in both polypeptide-anchored and phosphatidylinositolglycan-anchored forms.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86: 5079, 1989.
- 33.- Kurosaki, T. y Ravetch, J.V.  
A single amino acid in the glycosyl phosphatidylinositol attachment domain determines the membrane topology of Fc $\gamma$ RIII.  
Nature 342: 805, 1989.
- 34.- Lanier, L., Cwirla, S., Yu, G., Testi, R. y Philips, J.H.  
Membrane anchoring of a human Fc receptor (CD16) determined by a single amino acid.  
Science 246:1611, 1989.
- 35.- Salmon, J.E., Edberg, J.C. y Kimberly, R.P.  
Fc $\gamma$  receptor III on human neutrophils. Allelic variants have functionally distinct capacities.  
J. Clin. Invest. 85: 1287, 1990.
- 36.- De Haas, M., Kleijer, M., van Zwieten, R., Roos, D. y von dem Borne, A.E.C.Kr.  
Neutrophil Fc $\gamma$ RIIIb deficiency, nature, and clinical consequences: study of 21 individuals from 14 families.  
Blood 86: 2403, 1995.
- 37.- Weissman, A.M., Baniyash, M., Hou, D., Samuelson, L.E., Burgess, W.H. y Klausner, R.D.  
Molecular cloning of the  $\zeta$  chain of the T cell antigen receptor.  
Science 239: 1018, 1989.
- 38.- Anderson, P., Caligiuri, M., O'Brian, C., Manley, T., Ritz, J. y Schlossman, S.  
Fc $\gamma$ RIII(CD16) is included in the  $\zeta$  Nk receptor complex expressed by human natural killer cells.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 2274, 1990.
- 39.- Wirthmueller, U. Kurosaki, T., Murakami, M.S. y Ravetch, J.V.  
Signal transduction by Fc $\gamma$ RIII (CD16) is mediated through the g chain.  
J. Exp. Med. 175: 1381, 1992.
- 40.- Lanier, L.L., Yu, G. y Phillips, J.P.  
Co-association of the CD3 with a receptor (CD16) for IgG Fc on human NK cells.  
Nature 342: 803, 1989.
- 41.- Kurosaki, T., Gander, I. y Ravetch, J.V.  
A subunit common to an IgG Fc receptor and the T cell receptor mediates assembly through different interactions.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 3837, 1991.

- 42.- Kurosaki, T., Gander, I., Wirthmueller, U. y Ravetch, J.V.  
The  $\beta$  subunit of the Fc $\epsilon$ RI is associated with the R $\gamma$ RIII on mast cells.  
J. Exp. Med. 175: 447, 1992.
- 43.- Klingenstein, R.J. y Dickler, H.P.  
The effect of pharmacologic agents on immune complex-induced redistribution of B-lymphocyte Fc  $\gamma$  receptor.  
Scand. J. Immunol. 10: 145, 1983.
- 44.- Segal, D.M., Titus, J.A. y Dower, S.K.  
The Fc $\gamma$ R mediated endocytosis of model immune complexes by cells from the P388D1 mouse macrophage line. II. The role of ligand-induced self aggregation in promoting internalization.  
J. Immunol. 130: 138, 1983.
- 45.- Leslie, R.G.Q.  
Complex aggregation: a critical event in macrophage handling of soluble immune complexes.  
Immunology today 6: 183, 1985.
- 46.- Dower, S.K., De Lisi, C., Titus, J.A. y Segal, D.M.  
The mechanism of binding of multivalent immune complexes to Fc receptors.  
Biochemistry 20: 6335, 1981.
- 47.- Verhoef, J. y Visser, M.R.  
Neutrophil phagocytosis and killing.  
En The natural immune system: The neutrophil, ed. Abramson, J. y Gary Wheeler, J.  
Oxford University Press Inc, Nueva York, 1993, pp.109.
- 48.- Metzger, H.  
Fc receptors and the action of antibodies, ed. Metzger, H.  
ASM Publications, Washington DC, 1987.
- 49.- Shaw, D.R. y Griffin, F.M.  
Phagocytes require repeated triggering of macrophage phagocytic receptor during particle ingestion.  
Nature 289: 409, 1981.
- 50.- Babior, B.M.  
The respiratory burst oxidase.  
Advances in Enzymology 65: 49, 1992.
- 51.- Rosen, G., Pou, S., Ramos, C., Cohen, M. y Britigan, B.  
Free radicals and phagocytic cells.  
Faseb J. 9: 200, 1995.
- 52.- Flohé, L., Beckmann, H. y Loschen, G.  
Oxygen-centered free radicals as mediators of inflammation.  
En: Oxidative stress, ed. Sies, H.  
Academic Press Inc, Londres, 1985. pp.403.

- 53.- Bastian, N. y Hibbs, J.  
Assembly and regulation of NADPH oxidase and nitric oxide syntase.  
Curr. Op. Immunol. 6:131-39,1994.
- 54.- McPhail, L.  
SH3-dependent assembly of the phagocytes NADPH oxidase.  
J. Exp. Med. 180: 2011,1994.
- 55.- Mills, E.L. y Noya, F.J.D.  
Congenital neutrophils deficiencies.  
En The natural immune system: The neutrophil. ed. Abramson, J. y Gary Wheeler, J.  
Oxford University Press Inc, Nueva York,1993. pp.194.
- 56.- McPhail, L.C. y Harvath, L.  
Signal transduction in neutrophil oxidative metabolism and chemotaxis.  
En The natural immune system: The neutrophil, ed. Abramson, J. y Gary Wheeler, J.  
Oxford University Press Inc, Nueva York, 1993. pp. 63.
- 57.- Ganz, T., Selsted, M., Babior, B. y Cumutte, J.  
Neutrophils and host defense.  
Ann. Intern. Med. 109: 127,1988.
- 58.- Weiss, S.  
Tissue destruction by neutrophils  
New Engl. J. Med. 320: 365,1989
- 59.- Klebanoff, S.J.  
Myeloperoxidase-mediated cytotoxic system.  
En: The reticuloendothelial system. Vol. 2: Biochemistry and metabolism, ed. Sbarra,  
A.J. y Strauss, R.R.  
Plenum Press, New York, 1980, pp.279.
- 60.- Bielsky, B.H. y Allen, A.O.  
Mechanism of disprotionation of superoxide radicals.  
J. Phys. Chem. 81: 1048, 1977.
- 61.- Jensen, M.S. y Bainton, D.F.  
Temporal changes in pH within the phagocytic vacuole of the polymorphonuclear  
neutrophilic leukocytes.  
Cell. Biol. 56: 379,1973.
- 62.- Chance, B., Sies, H. y Boveris, A.  
Hidroperoxide metabolism in mammalian organs.  
Physiol. Rev. 59: 527, 1979.
- 63.- Hyslop, P.A., Hinshaw, D.B. y Halsey W.A.  
Mechanisms of oxidant mediated-cell injury: the glycolytic and mitochondrial pathways of  
ADP phosphorilation are major intracelular targets inactivated by hydrogen peroxide.  
J. Biol. Chem. 263: 1665,1988.

- 64.- Thomas, L.T. y Lehrer, R.I.  
Human neutrophil antimicrobial activity.  
Rev. Infect. Dis. 10, suppl. 2: S450, 1988.
- 65.- Rosen, G., Pou, S., Ramos, C., Cohen, M. y Britigan, B.  
Free radicals and phagocytic cells.  
Faseb J. 9: 200, 1995.
- 66.- Test, S.T. y Weiss, S.J.  
The generation of utilization of chlorinated oxidants by human neutrophils.  
Adv. Free Radical Biol. Med. 2: 91, 1986.
- 67.- Albrich, R.J., Gilbaugh, J.H., Callahan, K.B. y Hurst, J.K.  
Effect of the putative neutrophil-generated toxin, hypochlorous acid on membrane permeability and transport systems of *Escherichia coli*.  
J. Clin. Invest. 78: 177, 1986.
- 68.- Rakita, R.M., Michel, B.R. y Rosen, H.  
Mieloperoxidase mediated inhibition of microbial respiration: damage to *Escherichia coli* ubiquinol oxidase.  
Biochemistry 28: 3031, 1989.
- 69.- Winterbourn, C.C., van der Berg, J.J. Roltman, E. y Kuipers, F.A.  
Chlorohydrin formation from unsaturated fatty acids reacted with hypochlorous acid.  
Arch. Biochem. Biophys. 296: 547, 1992.
- 70.- Nathan, C.F.  
Neutrophil activation on biological surfaces: masive secretion of hydrogen peroxide in response to products of macrophages and lymphocytes.  
J. Clin Invest. 80: 1550, 1987.
- 71.- Klebanoff, S.J. y Walterdorff, A.M.  
Prooxidant activity of transferrin and lactoferrin.  
J. Exp. Med. 172: 1293, 1990.
- 72.- Britigan, B.E. y Edeker, B.L.  
Pseudomonas and neutrophil products modify transferrin and lactoferrin to create conditions that favor hydroxyl radical formation.  
J. Clin. Invest. 88: 1092, 1991.
- 73.- Coffman, T.J. Cox, C.D., Edeker, B.L. y Britigan, B.E.  
Possible role of bacterial siderophores in inflammation. Iron bound to the *Pseudomonas* siderophore pyochelin can function as a hydroxyl radical catalyst.  
J. Clin. Invest. 86: 1030, 1990.
- 74.- Kahn, A.V. y Kasha, M.  
Red chemiluminescence of molecular oxygen in aqueous solution.  
Chem. Phys. 39: 2105, 1963.

- 75.- Kellog, E.W. y Fridovich, I.  
Superoxide, hydrogen peroxide and singlet oxygen in lipid peroxidation by a xantine oxidase system.  
J. Biol. Chem 250: 8812, 1975.
- 76.- Henson, P.M., Henson, J.E., Fritschen, C., Kimani, G., Bratton, D.L. y Riches, D.W.H.  
Phagocytic cells: degranulation and secretion.  
En Inflammation: basic principles and clinical correlates. ed. Gallin, J.I., Goldstein, I.M. y Snyderman, R.,  
Raven Press, Nueva York, pp.363, 1988.
- 77.- Janoff, A.  
Elastase in tissue injury.  
Annu. Rev. Med. 36: 207, 1985.
- 78.- Kramps, J.A., Van Twisk, C. y Dijkman, J.H.  
Oxidative inactivation of bronchial antileukoprotease by triggered polymorphonuclear leukocytes.  
Am. Rev. Respir. Dis. 135:290,1987 (abstr.)
- 79.- Weiss, S.J. y Peppin, G.J.  
Collagenolytic metalloenzymes of the human neutrophil: characteristics, regulation and potential function in vivo.  
Biochem. Pharmacol. 35: 3189,1986.
- 80.- Weiss, S.J., Peppin, G.J., Ortiz, X., Ragsdale, C. y Test, S.T.  
Oxidative autoactivation of latent collagenase by human neutrophils.  
Science 227: 747,1985.
- 81.- Peppin, G.J. y Weiss, S.J.  
Activation of the endogenous metalloproteinase, gelatinase, by triggered human neutrophils.  
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 83:4322-6,1986.
- 82.- Odeberg, H. y Olsson, I.  
Mechanisms for the microbicidal activity of cationic proteins of human granulocytes.  
Infect. Immunun. 14: 1269,1976.
- 83.- Ganz, T., Selsted, M., Babior, B. y Curnutte, J.  
Neutrophils and host defense.  
Ann. Intern. Med. 109: 127,1988.
- 84.- Weiss, J., Elsbach, P., Olsson, I. y Odeberg, H.  
Purification and characterization of a potent microbicidal and membrane active protein from the granules of human polimorphonuclear leukocytes.  
J. Biol. Chem. 253: 2664, 1978.
- 85.- Larsen, G.L. y Henson, P.M.  
Mediators of inflammation.  
Ann. Rev. Immunol. 1: 335, 1983.



- 86.- Sturm, R.J. y Chang, J.Y.  
Neutrophil-derived lipid mediators of inflammation  
En: Immunopharmacology, ed. Gilman, S.C. y Rogers, T.J.  
The Telford Press, Caldwell, New Jersey, 1989, pp.89-104.
- 87.- Sato, M., Nakamura, T. y Koyama, J.  
Different abilities of two distinct Fcγ receptors on guinea pig polymorphonuclear leukocytes to trigger the arachidonic acid metabolic cascade.  
FEBS letters 224: 29, 1987.
- 88.- Smith, R.J., Yein, F.S., Speciale, S.C. y Bowman, B.J.  
A possible requirement for arachidonic acid lipoxygenation in the mechanism of phagocytic degranulation by human neutrophils stimulated with aggregated immunoglobulin G.  
Biochem. Biophys. Res. Commun. 136: 310, 1986.
- 89.- Irvine, R.F.  
How is the level of free arachidonic acid controlled in mammalian cells?  
Biochem. J. 204: 3, 1982.
- 90.- Parker, C.W.  
Lipid mediators produced through the lipoxygenase pathway.  
Ann. Rev. Immunol. 5: 65, 1987.
- 91.- O'Flaherty, J.T., Wykle, R.L., Thomas, M.J. y McCall, G.E.  
Neutrophil degranulation responses to combinations of arachidonate metabolites and platelet-activating factor.  
Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. 43: 3, 1984.
- 92.- Goetzl, E.J. y Pickett, W.G.  
The human polymorphonuclear leukocyte chemotactic activity of complex hydroxy-eicosatetraenoic acid.  
J. Immunol. 125: 1789, 1980.
- 93.- Palmer, R.M.J., Stepney, R.J. y Eakins, K.E.  
Chemokinetic activity of arachidonic acid lipoxygenase products of leukocytes of different species.  
Prostaglandins 20: 411, 1980.
- 94.- Ford-Hutchinson, A.W., Bray, M.A., Doig, M.U., Shipley, M.E. y Smith, M.J.H.  
Leukotriene B<sub>4</sub>, a potent chemokinetic and aggregating substance released from polymorphonuclear leukocytes.  
Nature 286: 264, 1980.
- 95.- Bokoch, G.M. y Reed, P.W.  
Effect of various lipoxygenase metabolites of arachidonic acid on degranulation of polymorphonuclear leukocytes.  
J. Biol. Chem. 256: 5317, 1981.

- 96.- Benveniste, J., Henson, P.M., y Cochrane, C.G.  
Leukocyte-dependent histamine release from rabbit platelets. The role of IgE, basophils and platelet-activating factor.  
J. Exp. Med. 136: 1356, 1972.
- 97.- O'Flaherty, J.T., Thomas, M.J., Lees, C.J. y McCall, G.E.  
Neutrophil aggregating activity of monohydroxyeicosatetraenoic acids.  
Am. J. Pathol. 104: 55, 1981.
- 98.- O'Flaherty, J.T.  
Neutrophil degranulation: evidence pertaining to its mediation by the combined effects of leukotriene B<sub>4</sub>, platelet-activating factor, and 5-HETE.  
J. Cell. Physiol. 122: 229, 1985.
- 99.- O'Flaherty, J.T., Thomas, M.J., McCall, G.E. y Wykle, R.L.  
Potentiating actions of hydroxyeicosatetraenoates on human neutrophil degranulation responses to leukotriene B<sub>4</sub> and phorbol myristate acetate.  
Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. 40: 475, 1983.
- 100.- Serhan, G.N. Hamberg, M. y Samuelson, B.  
Lipoxins: a novel series of biological active compounds formed from arachidonic acid in human leukocytes.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 5335, 1984.
- 101.- Ramstedt, U., Ng, J., Wigzell, H., Seaham, C.N. y Samuelson, B.  
Actions of a novel eicosanoids lipoxin A & B on human natural Killer cell cytotoxicity: effects on intracellular cAMP an target cell binding.  
J. Immunol. 135: 3434, 1985.
- 102.- Vanderhoek, J.Y., Karim, M.T. y Ekboug, S.L.  
Endogenous hydroxyeicosatetraenoic acids stimulate the human polymorphonuclear leukocyte 15-lipoxygenase pathway.  
J. Biol. Chem. 260: 15483, 1985.
- 103.- Pinkard, R.N., Ludwig, J.C. y McManus, L.M.  
Platelet-activating factors.  
En: Inflammation: Basic principles and clinical correlates, ed. Gallin, J.I., Goldstein, I.M. y Snyderman, R.  
Raven Press, New York, 1988, pp. 139.
- 104.- Geffner, J.R., Schattner, M.A., Lazzari, M.A. y Isturiz, M.A.  
Gamma interferon enhances PAF-acether production by stimulated human polymorphonuclear leukocytes.  
Scand. J. Immunol. 33: 575, 1991.
- 105.- Berton, G., Zeni, L., Cassatella, M.A. y Rossi, F.  
Gamma interferon is able to enhance the oxidative metabolism of human neutrophils.  
Biochem. Biophys. Res. Commun. 138: 1276, 1986.

- 106.- McManus, L.M., Hanahan, D.J. y Pinckard, R.N.  
Human platelet stimulation by acetyl glyceryl ethyl-phosphoryl-choline (AGEPC).  
*J. Clin. Invest.* 67: 903, 1981.
- 107.- Lad, P.M., Olson, C.V. y Grewall, I.S.  
Platelet-activating factor mediated effects on human neutrophil function are inhibited by pertussis toxin.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 129: 632, 1985.
- 108.- Shaw, J.O., Pinckard, R.N., Ferrigni, K.S., McManus, L.M. y Hanahan, D.J.  
Activation of human neutrophils with 1-O-hexadecyl-octadecyl-2-acetyl-sn-glyceryl-3-phosphoryl-choline (PAF).  
*J. Immunol.* 127: 1250, 1981.
- 109.- Ingraham, L.M., Coates, T.D., Allen, J.N., Hoggins, C.P., Bachner, R.I. y Boxer, L.A.  
Metabolic, membrane and functional responses of human polymorphonuclear leukocyte to platelet-activating factor.  
*Blood* 59: 1259, 1982.
- 110.- Findley, S.R., Lichtenstein, L.M., Hanahan, D.J. y Pinckard, R.N.  
The contraction of guinea pig ileal smooth muscle by acetyl glyceryl ether phosphoryl-choline.  
*Am. J. Physiol.* 241: C130, 1981.
- 111.- Geffner, J.R.  
Antibody-dependent cell mediated cytotoxicity.  
En: *Encyclopedia of Immunology*, ed. Roitt, I.M. y Delves, P.J.  
Academic Press, Londres, 1993, pp. 100.
- 112.- Key, M.E. y Haskill, S.  
The role of macrophage-mediated ADCC in defense against disease. A potential antitumor defense mechanism.  
En: *Macrophage mediated ADCC*, ed. Koren, H.S.  
Marcel Dekker, Inc., 1983, pp. 237.
- 113.- Shore, S.L., Black, C.M., Mewicz, F.M., Wood, P.A. y Nahmias, J.  
ADCC to target cells infected with type 1 and type 2 HSV.  
*J. Immunol.* 116: 194, 1976.
- 114.- Thomas, J.M., Thomas, F.T., Kaplan, A.M. y Lee, H.M.  
Antibody-dependent cellular cytotoxicity and chronic renal allograft rejection.  
*Transplantation* 22: 94, 1976.
- 115.- Sayers, T.J. y Wiltrout, R.H.  
Regulation and functions of natural killer cells.  
En: *Immunopharmacology*, ed. Gilman, S.C. y Rogers, T.J.  
The Telford Press, Caldwell, New Jersey, 1989, pp. 343.

- 116.- Katz, P., Simone, C.B., Henkart, P.A. y Fauci, A.S.  
Mechanism of antibody-dependent cellular cytotoxicity.  
J. Clin. Invest. 65: 55, 1980.
- 117.- Clark, R.A. y Klebanoff, S.A.  
Studies on the mechanism of antibody-dependent polymorphonuclear leukocyte mediated cytotoxicity.  
J. Immunol. 119: 1413, 1977.
- 118.- Kushner, B.H. y Cheung, N.V.  
Clinically effective monoclonal antibody 3F8 mediates nonoxidative lysis of human neuroectodermal tumor cells by polymorphonuclear leukocytes.  
Cancer Research 51:4865, 1991.
- 119.- Mannik, M.  
Pathophysiology of circulating immune complexes.  
Arthr.Rheumat. 25:783, 1982.
- 120.- Nydegger, V.E., Kazatchkine, M.D. y Lambert, P.H.  
Involvement of immune complexes in Diseases.  
En: Progress in Immunology IV, ed. Fougereau, M. y Dausset, J.  
Academic Press, New York, 1980, pp: 1025.
- 121.- Haynes, B.F. y Katz, P.  
The spectrum of vasculitis.  
Ann. Intern. Med. 89: 660, 1978.
- 122.- Henson, P., Fantone, J.C. Ward, P. y Dreisin, R.B.  
Immune complex injury of the lung.  
Blood reviews 2: 738, 1981
- 123.- Gallin, J.  
Inflammation.  
En: Fundamental Immunology III, ed. Paul, W.E.  
Raven Press, New York, 1993, pp. 1015.
- 124.- Perlmutter, D.H. y Colten, H.R.  
Molecular immunology of complement biosynthesis: a model for single cell control of effector inhibitor balance.  
Annu. Rev. Immunol. 4: 231, 1986.
- 125.- Takai, T., Li, M., Sylvestre, D., Clynes, R. y Ravetch, J.V.  
FcR $\gamma$  chain deletion results in pleiotropic effector cell defects.  
Cell 76: 519, 1994.
- 126.- Sylvestre, D.L. y Ravetch, J.V.  
Fc receptors initiate the Arthus Reaction: Redefining the inflammatory cascade.  
Science 265: 1095, 1994.

- 127.- Zhang, Y., Ramos, B.F. y Jakchik, B.  
Neutrophil recruitment by tumor necrosis factor from mast cell immune complex peritonitis.  
Science 258: 1957, 1992.
- 128.- Zhang, W., Voice, J. y Lachmann, P.J.  
A systematic study of neutrophil degranulation and respiratory burst *in vitro* by defined immune complexes.  
Clin. Exp. Immunol. 101: 507, 1995.
- 129.- Crockett-Torabi E. y Fantone, J.C.  
Soluble and insoluble immune complexes activate human neutrophil NADPH oxidase by distinct Fcγ receptors-specific mechanisms.  
J. Immunol. 145: 3026, 1990.
- 130.- Lund-Johansen, F., Olweus, J., Symington, F.W., Arli, A., Thomson, J.S., Vilella, R., Skubitz, K. y Horejsi, V.  
Activation of human monocytes and granulocytes by monoclonal antibodies to glycosylphosphatidylinositol-anchored antigens.  
Eur. J. Immunol. 23: 2782, 1993.
- 131.- Salmon, J.E., Edberg, J.C., Brogle, N.L. y Kimberly, R.P.  
Allelic polymorphisms of human phagocyte function.  
J. Clin. Invest. 89: 1274, 1992.
- 132.- Graziano, R.F. y Fanger, M.W.  
FcγRI and FcγRII on monocytes and granulocytes are cytotoxic trigger molecules for tumor cells.  
J. Immunol. 139: 3536, 1987.
- 133.- Geffner, J., Giordano, M., Serebrinsky, G. y Isturiz, M.  
The role of reactive oxygen intermediates in nonspecific monocyte cytotoxicity induced by immune complexes.  
Clin. Exp. Immunol. 67: 646, 1987.
- 134.- Geffner, J. Giordano, M. Serebrinsky, G. Palermo, M. y Isturiz, M.  
Neutrophil-mediated cytotoxicity triggered by immune-complexes: the role of reactive oxygen metabolites.  
Clin. Exp. Immunol. 69: 668, 1987.
- 135.- Giordano, M., Geffner, J. Serebrinsky, G. Palermo, M. y Isturiz, M.  
Different requirements for the induction of antibody-dependent and immune complexes triggered cytotoxicity mediated by monocytes.  
Immunol.Letters 17: 109, 1988.
- 136.- Geffner, J., Giordano, M., Serebrinsky, G. y Isturiz, M.  
Different activation pathways involved in antibody-dependent and immune complexes triggered cytotoxicity mediated by neutrophils.  
Clin.Exp.Immunol. 74: 471, 1988.

- 137.- Isturiz, M.A., Geffner, J.R., Pizzolato, M.  
Two different Fc receptor dependent cytotoxic mechanism triggered by monoclonal immunoglobulins.  
Immunol.Lett. (USA) 29:271, 1991.
- 138.- Boyum, A.  
Separation of leukocytes from blood and bone marrow.  
Scan. J. Clin. Lab. Invest. 21 (Supl. 97): 77, 1968.
- 139.- Cy, L., Lam, K.W. y Yam, L.T.  
Esterases in human leukocytes.  
Histochem. Cytochem. 21: 1, 1973.
- 140.- McCrae, K.R., Shattil, S.J. y Cines, D.B.  
Platelet activation induced Fc receptor expression.  
Immunol. 144: 3920, 1990.
- 141.- Avrameas, S. y Ternynck, T.H.  
The cross-linking of proteins with glutaraldehyde and its use for the preparations of the immunoabsorbents.  
Immunochemistry 6: 53, 1969.
- 142.- Gauthier, V.J., Mannik, M. y Stricker, G.E.  
Effect of cationized antibodies in preformed immune complexes on deposition and persistences in renal glomeruli.  
J. Exp. Med. 156: 766, 1982.
- 143.- Odell, W.D. y Heber, D.  
Radioiodination of peptides and proteins for radioimmunoassays or radioreceptor assays.  
En: Manual of Clinical Immunology, ed. Rose, N.R. and Fridman, H.  
American Society for Microbiology, Washington, 1980, pp: 329.
- 144.- Oite, T., Batsford, S.R., Mihatsch, M.J., Takamiya, H. y Vogy, A.  
Quantitative studies of in situ immune complex glomerulonephritis in the rat induced by planted cationized antigen.  
J. Exp. Med. 155: 460, 1982.
- 145.- Isturiz, M.A., Fink, S. y Bracco, M.M.E.  
Reversal of immune complex inhibition of antibody dependent cell-mediated cytotoxicity by normal human serum.  
Clin.Exp.Immunol. 48: 685, 1982.
- 146.- Trush, M.A., Wilson, M.E. y Van Dyke, K.  
The generation of chemiluminescence by phagocytic cells.  
En: Methods in Immunology, Vol.LVII, Bioluminescence and chemiluminescence, ed. De Luca M.A..  
Academic Press, New York, 1978, pp. 462.

- 147.- Kramps, J.A., van Twisk, C. y van der Linden, A.C.  
L-Pyroglutamyl-L-prolyl-L-valine-*p*-nitroanilide, a highly specific substrate for granulocyte elastase.  
Scand. J. Clin. Lab. Invest. 43: 427, 1983.
- 148.- Harvath, L., Falk, W. y Leonard, E.J.  
Rapid quantitation of neutrophil chemotaxis: use of a polyvinylpyrrolidone-free polycarbonate membrane in a multiwell assembly.  
Immunol. Methods 37: 39, 1980.
- 149.- Zigmond, S. y Hirsch, J.  
Leukocyte locomotion and chemotaxis: New methods for evaluation and demonstration of cell-derived chemotactic factor.  
J. Exp. Med. 137: 387, 1973.
- 150.- Sandor, M., Fust, G., Medgyesi, G.A. y Gergely, J.  
Isolation and characterization of Fc receptors shed from human peripheral mononuclear cells.  
Immunology 35: 559, 1978.
- 151.- Born, G.V.R. y Cross, M.J.  
The aggregation of blood platelets.  
J.Physiol. 168: 178, 1963.
- 152.- Cochrane, C.G.  
Immunologic tissue injury mediated by neutrophilic leukocytes.  
Adv. Immunol. 9: 97, 1968.
- 153.- Henson, P.M. y Johnston, R.B.  
Tissue injury in inflammation: oxidants, proteinases and cationic proteins.  
J. Clin. Invest. 79: 669, 1987.
- 154.- Vischer, T.L.  
Stimulation of mouse B lymphocytes by trypsin.  
J. Immunol 113: 58, 1974.
- 155.- Glenn, K.C. y Cunningham, D.  
Thrombin-stimulated cell division involves proteolysis of its cell surface receptor.  
Nature 278: 711, 1979.
- 156.- Kramer, M.D. y Simon, M.M.  
Are proteinases functional molecules of T lymphocytes?  
Immunol Today 8: 140, 1987.
- 157.- Altieri, D.C. y Starnes, S.J.  
Protease-dependent T cell activation: ligation of effector cell protease receptor-1 (EPR-1) stimulates lymphocyte proliferation.  
Cell. Immunol. 155: 372, 1994.

- 158.- Van de Winkel J.C.J., Van Ommen R., Huizinga T.W.J., de Raad M.A.H.V.M., Tuijnman W.B., Groenen P.J.T.A., Capel P.J.A., Koene R.A.P. y Tax W.J.M.  
Proteolysis induces increased binding affinity of the monocyte type II for human IgG.  
J.Immunol. 143: 571, 1989.
- 159.- Debets J.M.H., Van de Winkel J.C.J., Ceuppens J.L., Dieteren I.E.M. y Buurman, W.A.  
Cross-linking of both FcγRI and FcγRII induced secretion of tumor necrosis factor by human monocytes requiring high affinity Fc-FcγR interactions. Functional activity of FcγRII by treatment with proteases or neuroaminidase.  
J.Immunol. 144: 1304, 1990.
- 160.- Tax W.J.M. y Van de Winkel J.G.J.  
Human Fcγ receptor II: a standby receptor activated by proteolysis?  
Immunol.Today 11: 308, 1990.
- 161.- Fleit H.B. y Kuhnle M.  
Biochemical characterization of a Fc receptor purified from human neutrophils.  
J.Immunol. 140: 3120, 1988.
- 162.- Tosi M.F. y Berger M.  
Functional differences between the 40 kDa and 50 to 70 kDa IgG Fc receptors on human neutrophils revealed by elastase treatment and antireceptor antibodies.  
J.Immunol. 141: 2097, 1988.
- 163.- Cheung, K., Archibald, A.C. y Robinson, M.F.  
The origin of chemiluminescence produced by neutrophils stimulated by opsonized zymosan.  
J. Immunol. 130: 2324, 1983.
- 164.- Hugli, T.E. y Muller-Heberbard, H.J.  
Anaphylotoxins: C3a and C5a.  
Adv. Immunol. 26:1-53, 1978.
- 165.- Johnston, R.B., Lehmyer, J.E. y Guthrie, L.A.  
Generation of superoxide anion and chemiluminescence by human monocytes during phagocytosis and on contact with surface-bound immunoglobulin G  
Exp. Med. 143: 1551, 1976.
- 166.- Golbus, J. y McCune, J.  
Lupus nephritis: Clasification, prognosis, immunopathogenesis and treatment.  
En: Rheumatic disease clinics of North America, vol 20, ed. McCune, J. pp.228.
- 167.- Steinberg, A.D., Smolen, J.S., Sakane, T., Kumagai, S., Marimoto, T., Chused, T.M., Green, I., Hirata, F., Siminovitch, K.A. y Steinberg, R.T.  
Immune regulatory abnormalities in systemic lupus eritematosus.  
En: Immune mechanisms in Renal Disease, ed. Cummings, N.B., Michael, A.F. y Wilson, C.B.  
Plenum Publishing, New York, 1982, pp.529.



- 168.- Hahn, B.H., Ebling, F.M.  
Suppression of NZB/NZW murine nephritis by administration of syngeneic monoclonal antibody to DNA: possible role of anti-idiotypic antibodies.  
J. Clin. Invest. 71: 1728, 1983.
- 169.- Ebling, F. y Hahn, B.H.  
Restricted subpopulations of DNA antibodies in kidneys of mice with systemic lupus: comparison of antibodies in serum and renal eluates.  
Arthritis Rheum. 23:392, 1980.
- 170.- Datta, S.K., Patel, H. y Berry, D.  
Induction of a cationic shift in IgG anti-DNA autoantibodies.  
J. Exp. Med 165: 1252, 1987.
- 171.- Shivakumar, S., Sokos, G.C. y Datta, S.K.  
T cell receptor alpha/beta expressing double negative (CD4<sup>-</sup>/CD8<sup>-</sup>) and CD4<sup>+</sup> T helper cells in humans augment the production of pathogenic anti-DNA autoantibodies associated with lupus nephritis.  
J. Immunol. 143: 103, 1989.
- 172.- Rajagopalan, S., Zordan, T., Tsokos, G. y Datta, S.  
Pathogenic anti-DNA autoantibody-inducing T helper cell lines from patients with active lupus nephritis: Isolation of CD4<sup>+</sup>8<sup>-</sup> T helper cell lines that express the gd T-cell antigen receptor.  
Proc. Natl. Acad. Sci, USA 87: 7020, 1990.
- 173.- Gavalchin, J., Nicklas, J.A., Eastcott, J.W., Madaio, M.P., Stollar, B.D., Schwartz, R.S. y Datta, S.K.  
Lupus prone (SWR x NZB)F1 mice produce potentially nephritogenic autoantibodies inherited from the normal SWR parent.  
J. Immunol. 134: 885, 1985.
- 174.- Gallo, G.R., Caulin-Glaser, T. y Lamm, M.E.  
Charge of circulating immune complexes as a factor in glomerular basement membrane localization in mice.  
J. Clin. Invest. 67: 1305, 1981.
- 175.- Rennke, H.G., Cotran, R.S. y Venkatachalam, M.A.  
Role of molecular charge in glomerular permeability. Tracer studies with cationized ferritin.  
Cell. Biol. 67: 638, 1975.
- 176.- Kanwar, Y.S. y Farquhar, M.G.  
Anionic sites in the glomerular basement membrane. In vivo and in vitro localization to the laminae rarae by cationic probes.  
Cell. Biol. 81: 137, 1976.

- 177.- Gauthier, V.J. y Mannik, M.  
A small proportion of cationic antibodies in immune complexes is sufficient to mediate their deposition in glomeruli.  
*J. Immunol.* 145: 3348, 1990.
- 178.- Clark, R.A. y Klebanoff, S.J.  
Neutrophil-mediated tumor cell cytotoxicity: role of peroxidase system.  
*J. Exp. Med.* 141: 1442, 1975.
- 179.- Skosey, J.L., Chow, D., Damgaard, E. y Sorensen, L.B.  
Effect of cytochalasin B on response of human polymorphonuclear leukocytes to zymosan.  
*Cell. Biol.* 57: 237, 1973.
- 180.- Goldstein, I., Hoffstein, S., Gallin, J. y Weissmann, G.  
Mechanisms of lysosomal enzymes release from human leukocytes: microtubule assembly and membrane fusion induced by a component of complement.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70: 2916, 1973.
- 181.- Geffner, J.R., Minucci, F. y Isturiz, M.A.  
Interferon gamma is unable to increase monocyte and neutrophil-mediated nonspecific cytotoxicity induced by immune complexes.  
*Immunol. lett.* 33: 21, 1992.
- 182.- Basu, S.K., Goldstein, J.L., Anderson, R.G.W. y Brown, M.S.  
Degradation of cationized low density lipoprotein and regulation of cholesterol metabolism in homozygous familial hypercholesterolemia fibroblasts.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73: 3178, 1976.
- 183.- Shen, W.C. y Ryser, H.J.P.  
Conjugation of poly-L-lysine to albumin and horseradish peroxidase: a novel method of enhancing the cellular uptake of proteins.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 1872, 1978.
- 184.- Bergmann, P., Kacenelembogen, R. y Vizet, A.  
Plasma clearance, tissue distribution and catabolism of cationized albumins with increasing isoelectric points in the rat.  
*Clin. Sci.* 67: 35, 1984.
- 185.- Clark, J.M., Vaughan, D.W., Aiken, B.M. y Kagan, H.M.  
Elastase-like enzymes in human neutrophils localized by ultrastructural cytochemistry.  
*Cell. Biol.* 84: 102, 1980.
- 186.- Israels, E.D., Nisli, G., Paraskevas, F. e Israels, L.G.  
Platelet Fc receptor as a mechanism for Ag-Ab complex-induced platelet injury.  
*Thrombos. Diathes. Haemorrh.* 29: 434, 1973.
- 187.- Kelton, J.G., Smith, J.W., Santos, A.V., Murphy, W.G. y Horsewood, P.  
Platelet IgG receptor.  
*Am J Hematol* 25: 299, 1987.

- 188.- Mueller-Eckhard, C.L. y Lüscher, E.F.  
Immune reactions of human blood platelets. I. A comparative study on the effects on platelets on heterologous antiplatelet antiserum, antigen-antibody complexes, aggregated gamma globulins, and thrombin.  
Thromb.Diath.Haemorrh. 20: 155, 1968.
- 189.- Pfueller, S.L. y Lüscher, E.F.  
The effects of aggregated immunoglobulins on human blood platelets in relation to their complement-fixing abilities. I. Studies of Immunoglobulins of different types.  
J Immunol 109: 517, 1972.
- 190.- Pfueller, S.L. y Lüscher, E.  
The effects of aggregated immunoglobulins on human blood platelets in relation to their complement-fixing abilities. II. Structural requirement of the immunoglobulin.  
J.Immunol. 109: 526, 1972.
- 191.- Henson, P.M. y Spiegelberg, H.L.  
Release of serotonin from human platelets induced by aggregated immunoglobulins of different classes and subclasses.  
J.Clin.Invest. 52: 1282, 1973.
- 192.- Colaco, C.B. y Elkon, K.B.  
The lupus anticoagulant. A disease marker in antinuclear antibody negative lupus that is cross reactive with autoantibodies to double-stranded DNA.  
Arthritis Rheum. 28: 67, 1985.
- 193.- Koike, T., Tomioka, H. y Kumagai, A.  
Antibodies cross-reactive with DNA and cardiolipin in patients with systemic lupus erythematosus.  
Clin.Exp.Immunol. 56: 193, 1984
- 194.- Craig Stocks, S., Kerr, M.A., Haslett, C., Dransfield, I.  
CD66-dependent neutrophil activation: a possible mechanism for vascular selectin-mediated regulation of neutrophil adhesion.  
J. Leukoc. Biol. 58: 40, 1995.
- 195.- Hoffstein, S.T., Friedman, R.S. y Weissmann, G.  
Degranulation, membrane addition, and shape change during chemotactic factor-induced aggregation of human neutrophils.  
Cell Biol. 95: 234, 1982.
- 196.- Spiro, R.G.  
Studies of the renal glomerular basement membrane.  
Cell. Biol. Chem. 242: 1915, 1976.
- 197.- Kanwar, Y.S. y Farquhar, M.G.  
Presence of heparan sulfate in the glomerular basement membrane.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76: 1303, 1979.

- 198.- Kanwar, Y.S. y Farquhar, M.G.  
Anionic sites in the glomerular basement membrane. In vivo and in vitro localization to the lamina rarae by cationic probes.  
Cell. Biol. 81: 137, 1979.
- 199.- Stanescu, R. y Leibovich, S.J.  
The negative charge of articular cartilage surfaces: an electron microscopic study using cationized ferritin.  
Bone Joint Surg. 64: 388, 1982.
- 200.- Henderson, B. y Edwards, J.C.W.  
Biochemistry and metabolism of the normal synovial lining.  
En: The synovial lining in health and disease, ed. Henderson, B. y Edwards, J.C.W.  
Cambridge University Press, Cambridge, UK, 1987, pp. 103.
- 201.- Border, W.A., Ward, H.J., Kamil, E.S. y Cohen, A.H.  
Induction of a membranous nephropaty in rabbits by administration of an exogenous cationic antigen. Demonstration of a pathogenic role for electrical charge.  
J. Clin Invest. 69: 451, 1982.
- 202.- Batsford, S.R., Takamiya, H. y Vogt, A.  
A model of in situ complex glomeruloneohritis in the rat employing cationized ferritin.  
Clin. Nephrol. 14: 211, 1980.
- 203.- Turner, R.A., Turner, S.R. y Johnson, J.A.  
Neutrophil chemotaxis.  
En: Immunopharmacology, ed. Gilman, S.C. y Rogers, T.J.  
The Telford Press, Inc, New Jersey, 1989, pp. 105.
- 204.- Cassimeris, L. y Zigmond, S.H.  
Chemoattractant stimulation of polymorphonuclear leukocyte locomotion.  
Sem. Cell. Biol. 1: 125, 1990.
- 205.- Whited, S.C. y Gallin, J.I.  
Neutrophil chemotaxis.  
Int. J. Dermatol. 19: 130, 1980.
- 206.- Zigmond, S.H.  
Chemotaxis by polymorphonuclear leukocytes.  
Cell. Biol. 77: 269, 1978.
- 207.- Wayne Smith, C., Hollers, J.C., Patrick, R.A. y Hasslett, C.  
Motility and adhesiveness in human neutrophils.  
J. Clin. Invest. 63: 221, 1979.
- 208.- Keller, H.U. y Sorkin, E.  
Studies on chemotaxis. IV. The influence of serum factors on granulocyte locomotion.  
Immunology 10: 409, 1966.

- 209.- Ward, P.A., Cochrane, C.G. y Miller-Eberhard, H.J.  
The role of serum complement in chemotaxis of PMNs.  
J. Exp. Med. 122: 327, 1965.
- 210.- Shin, H.S. Snyderman, R., Friedman, E., Mellors, A. y Mayer, M.M.  
Chemotactic and anaphylatoxin fragment cleaved from the fifth component of guinea pig complement.  
Science 162: 361, 1968.
- 211.- Webster, R.O., Hong, S.R., Johnston, R.B. y Henson, P.M.  
Biological effects of the human complement fragments C5a and C5a<sub>des Arg</sub> on neutrophil function.  
Immunopharmacology 2: 201, 1980.
- 212.- Schiffmann, E., Corcoran, B.A. y Wahl, S.M.  
N-formyl-methionyl peptides as chemoattractants for leukocytes.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 72: 1059, 1975.
- 213.- Showell, H.J., Freer, R.J., Zigmond, S.H., Schiffmann, E., Aswanikumar, S., Corcoran, B.A. y Becker, E.J.  
The structure activity relations of synthetic peptides as chemotactic factors and inducers of lysosomal enzymes secretion for neutrophils.  
J. Exp. Med. 143: 1154, 1976.
- 214.- Ward, P.A., Remold, H.G. y David, J.R.  
The production by antigen-stimulated lymphocytes of a leukotactic factor distinct from migration inhibitory factor.  
Cell. Immunol. 1: 162, 1970.
- 215.- Goetzl, E., Brash, A.R., Tauber, A.I., Oates, J.A. y Hubbard, W.C.  
Modulation of human neutrophil function by monohydroxy-eicosatetraenoic acids.  
Immunology 39: 491, 1980.
- 216.- Dahinden, C.A., Clancy, R.M., Hugli, T.E.  
Stereospecificity of leukotriene B<sub>4</sub> and structure-function relationships for chemotaxis of human neutrophils.  
J. Immunol. 133: 1277, 1984.
- 217.- Hugli, T.E., Muller-Eberhard, H.J.  
Anaphylotoxins C3a and C5a.  
Adv. Immunol. 26: 1, 1978.
- 218.- Johnson, K.J., Anderson, T.P. and Ward, P.A.  
Suppression of immune complex-induced inflammation by the chemotactic factor inactivator.  
J. Clin. Invest. 59: 951, 1977
- 219.- Wilkinson, P.C.  
Effects of human IgG on locomotion of human neutrophils related to IgG binding of a hydrophobic probe.  
Immunology 41: 457, 1980.

- 220.- Arashi, M., Sibille, Y., Merrill, M., Rits, M., Bazin, h. y Vaerman, J.P.  
Chemotactic properties of rat immunoglobulins and immune complexes.  
*Infect. Immun.* 57: 452, 1989.
- 221.- Sibille, Y., Delacroix, D.L., Merrill, M., Chatelain, B. y Vaerman, J.P.  
IgA induced chemokinesis human polymorphonuclear neutrophils: Requirement of their Fc  
alpha receptor.  
*Mol. Immunol.* 24: 551, 1987.
- 222.- Eckle, I., Kolb, G. y Havemann, K.  
Inhibition of neutrophil chemotaxis by elastase-generated IgG fragments.  
*Scand. J. Immunol.* 34: 359, 1991.
- 223.- Fontán, P.A., Amura, C.R., García, V.E., Cerquetti, M.C. y Sordelli, D.O.  
Preliminary characterization of *Pseudomonas aeruginosa* peptide chemotactins for polymor-  
phonuclear leukocytes.  
*Infect. Immun.* 60: 2465, 1992.
- 224.- Hirschhorn, R.  
Lysosomal mechanisms in the inflammatory process.  
En: *The inflammatory process*, ed. Zweifach, B.  
Academic Press, New York, 1974, pp. 259.
- 225.- Cardella, C.J., Davies, P. y Allison, A.C.  
Immune complexes induce selective release of lysosomal hydrolases from macrophages.  
*Nature* 247: 46, 1974.
- 226.- Masson, D. y Tschopp, J.  
A family of serine estearases in lytic granules of cytolytic T lymphocytes.  
*Cell.* 49: 679, 1987.
- 227.- Bleakley, R.C., Lobe, C.G., Duggan, B., Ehrman, N., Fregeau, C., Meier, M., et al.  
The isolation and characterization of a family of serine proteases genes in activated cytotoxic  
T lymphocytes.  
*Immunol. Rev.* 103: 5, 1988.
- 228.- Rouss, S.J., Hartmann, T. y Caughley, G.H.  
Mast cell tryptase is a mitogen for cultured fibroblast.  
*J. Clin. Invest.* 88: 593, 1991.
- 229.- Davie, E.W., Fugikawa, K. y Kisiel, W.  
The coagulation cascade. initiation, maintenance, and regulation.  
*Biochemistry* 30: 10363, 1991.
- 230.- Furie, B. y Furie, B.C.  
Molecular and cellular biology of blood coagulation.  
*N. Engl. J. Med.* 326: 800, 1992.

- 231.- Patthy, L.  
Evolution of the proteases of blood coagulation and fibrinolysis by assembly from modules.  
Cell 41: 657, 1985.
- 232.- Munger, W.E., Berrebi, G.A. y Henkart, P.A.  
Possible involvement of CTL granule proteases in target cell DNA breakdown.  
Immunol. Rev. 103: 99, 1988.
- 233.- Hayes, M.P., Berrebi, G.A. y Henkart, P.A.  
Induction of target cell DNA release by the cytotoxic T lymphocyte granule protease granzyme A.  
J. Exp. Med. 176: 1521, 1989.
- 234.- Altieri, D.C.  
Proteases and protease receptors in modulation of leukocyte effector functions.  
J. Leukoc. Biol. 58: 120, 1995.
- 235.- Liesveld, J.L.C., Abboud, C.N., Looney, R.J., Ryan, D.H. y Brennan, J.K.  
Expression of IgG Fc receptors in myeloid leukemic cells lines. Effect of colony-stimulating factors and cytokines.  
J. Immunol. 140: 1527, 1988.
- 236.- Geffner, J.R., Trevani, A.S., Malchiodi, Serebrinsky, G.P. y Isturiz, M.A.  
Neutrophil cytotoxicity induced by immune complexes prepared with cationized antibodies.  
Scand. J. Immunol. 37: 187, 1993.
- 237.- Lichtman, M.A. y Weed, R.I.  
Electrophoretic mobility and *N*-acetyl neuraminic acid content of human normal and leukemic lymphocytes and granulocytes.  
Blood 35: 12, 1970.
- 238.- Weiss, L.  
Studies on cell deformability. I. Effect of surface charge.  
Cell Biol. 26: 735, 1965.
- 239.- Wilkinson, P.C.  
Action of sphingomyelinase C and other lipid-specific agents as inhibitors of Fc binding and locomotion in human leukocytes.  
Immunology 33: 407, 1977.
- 240.- Henricks, P.A.J, van Erne-van der Tol, M.E. y Verhoef, J.  
Partial removal of sialic acid enhances phagocytosis and the generation of chemiluminescence by polymorphonuclear leukocytes.  
J. Immunol. 129: 745, 1982.
- 241.- Travis, J. y Salvesen, G.S.  
Human plasma proteinase inhibitors.  
Ann. Rev. Biochem. 52: 655, 1983.

- 242.- Weiss, S.J. y Regiani, S.  
Neutrophils degrade subendothelial matrices in the presence of alpha-1-proteinase inhibitor: cooperative use of lysosomal proteinases and oxygen metabolites.  
J. Clin. Invest. 73: 1297, 1984.
- 243.- Weiss, S.J., Cumutte, J.T. y Regiani, S.  
Neutrophil-mediated solubilization of the subendothelial matrix: oxidative and non oxidative mechanisms of proteolysis used by normal and chronic granulomatous disease phagocytes.  
J. Immunol. 136: 636, 1986.
- 244.- Baird, B.R., Cheronis, J.C., Sandhaus, R.A., Berger, E.A., White, C.W. y Repine, J.E.  
O<sub>2</sub> metabolites and neutrophil elastase synergistically cause edematous injury in isolated rat lungs.  
Appl. Physiol. 61: 2224, 1986.
- 245.- Shoenfeld, Y., Isenberg, D.A., Rauch, J., Madaio, M.P., Stollar, B.D. y Schwartz, R.S.  
Idiotypic cross-reactions of monoclonal human lupus autoantibodies.  
J. Exp. Med. 148: 718, 1983.
- 246.- Cairns, E., Block, J. y Bell, D.A.  
Anti-DNA autoantibody producing hybridomas of normal human lymphoid cell origin.  
J. Clin. Invest. 74: 880, 1984.
- 247.- Stollar, B.D. y Schwartz, R.S.  
Origin and diversification of anti-DNA antibodies.  
Immunol. Rev. 105: 137, 1988.
- 248.- O'Keefe, T.L., Bandyopadhyay, SW., Datta, S.K. y Imanishi-Kari, T.  
V region sequences of an idiotypically connected family of pathogenic anti-DNA autoantibodies.  
Immunol. 144: 4275, 1990.
- 249.- Schur, P.H., Monroe, M. y Rothfield, N.  
The gamma G subclasses of antinuclear and antinucleic acid antibodies.  
Arthritis Rheum. 15: 174, 1972.
- 250.- Leon, S.A., Green, A. y Ehrlich, G.E.  
Avidity of antibodies in SLE: Relation to severity of renal involvement.  
Arthritis Rheum. 20: 23, 1977.
- 251.- Winfield, J.B., Faiferman, I. y Koffler, D.  
Avidity of anti-DNA antibodies in serum and IgG glomerular eluates from patients with systemic lupus erythematosus. Association of high avidity antinative DNA antibody with glomerulonephritis.  
J. Clin. Invest. 59: 90, 1977.



- 252.- Suzuki, N., Harada, T., Mizushima, Y. y Sakane, T.  
Possible pathogenic role of cationic anti-DNA autoantibodies in the development of nephritis in patients with systemic lupus erythematosus.  
*J. Immunol.* 151: 1128, 1993.
- 253.- Suenaga, R. y Abdou, N.I.  
Cationic and high affinity serum IgG anti-dsDNA antibodies in active lupus nephritis.  
*Clin. Exp. Immunol.* 94: 418, 1993.
- 254.- Radic, M.Z. y Weigert, M.  
Genetic and structural evidence for antigen selection of anti-DNA antibodies.  
*Ann. Rev. Immunol.* 12: 487, 1994.
- 255.- Kalsi, J.K., Martin, A.C.R. y Isenberg, D.A.  
Structure-function relationships of anti-DNA antibodies.  
*Lupus* 4: 245, 1995.
- 256.- Martin, W.J., Gadek, J.E., Hunninghake, G.W. y Crystal, R.G.  
Oxidant injury of lung parenchymal cells.  
*J. Clin. Invest.* 68: 1277, 1981.
- 257.- Johnson, K.J., Fantone, J.C., Kaplan, J. y Ward, P.A.  
In vivo damage of rat lungs by oxygen metabolites.  
*J. Clin. Invest.* 67: 983, 1981.
- 258.- Johnson, K.J. y Ward, P.A.  
Role of oxygen metabolites in immune complex injury of lung.  
*J. Immunol.* 126: 2365, 1981.
- 259.- McCord, J.M.  
Free radicals and inflammation: Protection of synovial fluid by superoxide dismutase.  
*Science* 185: 529, 1974.
- 260.- Plow, E.F.  
Comparative immunochemical characterization of products of plasmin and leukocyte protease cleavage of human fibrinogen.  
*Thromb. Res.* 12: 473, 1978.
- 261.- Snyderman, R., Shin, H.S. y Dannenberg, A.M.  
Macrophage proteinase and inflammation: the production of chemotactic activity from the fifth component of complement by macrophage proteinase.  
*J. Immunol.* 109: 896, 1972.
- 262.- Ossanna, P.J., Test, S.T., Metheson, N.R., Regiani, S. y Weiss, S.J.  
Oxidative regulation of neutrophil-elastase-alpha-1-antiproteinase inhibitor interactions.  
*J. Clin. Invest.* 77: 1939, 1986.
- 263.- Opie, E.L.  
Intracellular digestion: the enzymes and anti-enzymes concerned.  
*Physiol. Rev.* 2: 552, 1922.

- 264.- Petroni, K.C., Shen, L. y Guyre, P.M.  
Modulation of human polymorphonuclear leukocyte IgG Fc receptors and Fc-receptors mediated functions by IFN-gamma and glucocorticoids.  
J. Immunol. 140: 3467, 1988.
- 265.- Selvaraj, P., Carpen, O., Silber, R. y Springer, T.A.  
Natural killer cell and granulocyte Fc $\gamma$  receptor III (CD16) differ in membrane anchor and signal trasduction.  
J. Immunol. 143: 3283, 1989.
- 266.- Selvaraj, P., Rose, W.F., Silber, R. y Springer, T.A.  
The major Fc receptor in blood has a phosphatidylinositol anchor and is deficient in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria.  
Nature 333: 565, 1988.
- 267.- Huizinga, T., van Kemenade, F., Koenderman, L., Dolman, K., von dem Borne, A., Tetteroo, P.A.T. y Roos, D.  
The 40-kDa receptor (FcRII) on human neutrophils is essential for the IgG-induced respiratory burst and IgG-induced phagocytosis.  
J. Immunol. 142: 2365, 1989.
- 268.- Shen, L., Guyre, P.M. y Fanger, M.W.  
Polymorphonuclear leukocyte function triggered through the high affinity Fc receptor for monomeric IgG.  
J. Immunol. 139: 534, 1987.
- 269.- Bredius, R.G.M., De Haas, C.A.P., Kuijper, E.J., Weening, R.S., van de Winkel, J.G.J. y Out, T.A.  
Role of neutrophil Fc $\gamma$ RII (CD32) and Fc $\gamma$ RIII (CD16) polymorphic forms in phagocytosis of human IgG1 and IgG3-opsonized bacteria and erythrocytes.  
Immunology 83: 624, 1994.
- 270.- Hundt, M. y Schmidt, R.E.  
The glycosylphosphatidylinositol-linked Fc $\gamma$  receptor III represents the dominant receptor structure for immune complex activation of neutrophils.  
Eur. J. Immunol. 22: 881, 1992.
- 271.- Hooks, J.J., Moutsopoulos, H.M., Geis, S.A., Stahl, N., Decker, J.L. y Notkins, A.L.  
Immune interferon in the circulation of patients with autoimmune disease.  
N. Engl. J. Med. 301: 5, 1979.
- 272.- Hammes, M. y Singh, A.  
Effect of polycations on permeability of glomerular epithelial cell monolayers to albumin.  
Lab Clin. Med. 123: 437, 1994.

- 273.- Guinsburg, I.  
Cationic polyelectrolytes: A new look at their possible roles as opsonins, as stimulators of respiratory burst in leukocytes, in bacteriolysis, and as modulators of immune complexes diseases. (A review hypothesis).  
*Inflammation* 11: 489, 1987.
- 274.- Guinsburg, I., Borinski, R., Sadovnic, M., Eilam, Y. y Rainford, K.  
Poly L-histidine: A potent stimulator of superoxide generation in human blood leukocytes.  
*Inflammation* 11: 253, 1987.
- 275.- Guinsburg, I., Mitra, M., Gibbs, D.F., Varani, J. y Kohen, R.  
Killing of endothelial cells among hydrogen peroxide, membrane-damaging agents, cationic substances and proteinases and their modulation by inhibitors.  
*Inflammation* 17: 295, 1993.
- 276.- Simionescu, N., .- Simionescu, M. y Palade, G.E.  
Differentiated microdomains on the luminal surface of the capillary endothilium. I. Preferential distribution of anionic sites.  
*Cell Biol.* 90: 605, 1981.
- 277.- Simionescu, N., .- Simionescu, M. y Palade, G.E.  
Differentiated microdomains on the luminal surface of the capillary endothilium. II. Partial characterization of their anionic sites.  
*Cell Biol.* 90: 614, 1981.
- 278.- Triguero, D., Buciak, J.B., Yang, J. y Patridge, W.M.  
Blood-brain barrier transport of cationized immunoglobulin G: Enhanced delivery compared to native protein.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 4761, 1989.
- 279.- Sugisaki, T. y Takase, S.  
Composition of immune deposits present in glomeruli of NZB/W F<sub>1</sub> mice.  
*Clin. Immunol. Immunopathol.* 59: 296, 1991.
- 280.- Clark, W.F., Linton, A.L. y Cordy P.E.  
Immunologic findings, thrombocytopenia and disease activity in lupus nephritis.  
*Can. Med. Assoc. J.* 118: 1391, 1978.
- 281.- Parbtani, A., Frampton, G. y Yewdall, V.  
Platelet and plasma serotonin in glomerulonephritis III: the nephritis of systemic lupus erythematosus.  
*Clin. Nephrol.* 14: 164, 1980.
- 282.- Kasi, N., Parbtani, A. y Cameron, J.S.  
Platelet-aggregating immune-complexes and intraplatelet serotonin in idiopathic glomerulonephritis and systemic lupus.  
*Clin. Exp. Immunol.* 43: 64, 1981.

- 283.- Martinez-Hernandez, A. y Amenta, P.S.  
The basement membrane in pathology.  
Lab. Invest. 48: 656, 1983.
- 284.- Cameron, J.S.  
Pathogenesis and treatment of membranous nephropathy.  
Kidney Int. 15: 88, 1979.
- 285.- Kant, K.S., Pollak, V.E. y Weiss, M.A.  
Glomerular thrombosis in systemic lupus erythematosus: prevalence and significance.  
Medicine 60: 71, 1981.
- 286.- Long, A.A., Ginsberg, J.S., Brill-Edwards, P., Johnston, M., Turner, C., Denburg, J.A.,  
et al.  
The relationship of antiphospholipid antibodies to thromboembolic disease in systemic  
lupus erythematosus: A cross-sectional study.  
Thromb. Haemost. 66: 520, 1991.
- 287.- Feinstein, D.  
Lupus anticoagulant, anticardiolipin antibodies, fetal loss, and systemic lupus  
erythematosus.  
Blood 80: 859, 1992.
- 288.- Metzger, H.  
Transmembrane signaling: The joy of aggregation.  
J.Immunol. 149: 1477, 1992.
- 289.- Horsewood, P., Hayward, C.P.M., Warke, T.E. y Keltpn, J.G.  
Investigation of the mechanisms of monoclonal-antibody-induced platelet activation.  
Blood 78: 1019, 1991.
- 290.- Rubinstein, E., Boucheix, C., Urso, I. y Carrol, R.C.  
Fcy-receptor mediated interplatelet activation by a monoclonal antibody against  $\beta$ 2  
microglobulin.  
J. Immunol. 147: 3040, 1991.
- 291.- Morel, M.C., Lecompte, T., Champeix, P., Favier, R., Potevin, F., Samama, M.,  
Salmon, C. y Kaplan, C.  
PL2-49, a monoclonal antibody against glycoprotein IIb which is a platelet activator.  
Br. J. Haematol. 71: 57, 1989.
- 292.- Barnes, J.L., Radnik, R.A., Gilchrist, E.P. y Venkatachalam, M.A.  
Size and charge selective permeability defects induced in glomerular basement  
membrane by a polycation.  
Kidney Int. 25: 11, 1984.
- 293.- Schmiedeke, T.M.J., Stockl., F.W., Weber, R., Sugisaki, Y., Batsford, S.R. y Vogt, A.  
Histone have high affinity for the glomerular basement membrane.  
Exp. Med. 169: 1879, 1989.

- 294.- Camussi, G., Tetta, C., Segoloni, G., Coda, R. y Vercellone, A.  
Localization of neutrophil cationic proteins and loss of anionic charges in glomeruli of patients with systemic lupus erythematosus glomerulonephritis.  
Clin. Immunol. Immunopathol. 24: 299, 1982.
- 295.- Waga, S., Tan, E.M. y Rubin, R.L.  
Identification and isolation of soluble histones from bovine milk and serum.  
Biochem. J. 244: 675, 1987.
- 296.- Rumore, P.M. y Steiman, C.R.  
Endogenous circulating DNA in systemic lupus erythematosus. Occurrence as multimeric complexes bound to histones.  
J. Clin. Invest. 86: 69, 1990.
- 297.- Bustos, A. Boimorto, R., Sibuya, J.L., Pereira, L.F., Marco, M., Figueredo, M.A. y De La Concha, E.G.  
Inhibition of histone/anti-histone reactivity by histone-binding serum components; differential effect on anti-H1 versus anti-H2B antibodies.  
Clin. Exp. Immunol. 95: 408, 1994.
- 298.- Rubin, R.L.  
Antihistone antibodies.  
En: Systemic lupus erythematosus, ed. Lahita, R.G., 1st. edition.  
John Willey & Sons, 1987, 271.
- 299.- Konstantinov, K., Russanova, K. y Russeva, V.  
Antibodies to histone and disease activity in systemic lupus erythematosus: a comparative study with an enzyme-linked immunoadsorbent assay and immunoblotting.  
Arch. Dermatol. Res. 278: 410, 1986.
- 300.- Vogt, A., Mertz, A., Bastford, S. y Rodriguez-Iturbe, B.  
Cationic extracellular streptococcal antigen; affinity for the renal glomerulus.  
En: Recent advances in Streptococci and streptococcal diseases.  
Reedbooks Ltd, Bracknell, Berkshire, 1985, pp. 170.
- 301.- Vogt, A., Bastford, S., Rodriguez-Iturbe, B. y Garcia, R.  
Cationic antigens in poststreptococcal glomerulonephritis.  
Clin. Nephrol. 20: 271, 1983.
- 302.- Van der Berg, W.B., Van de Putte, L.B.A., Zwarts, W.A. y Joosten, L.A.B.  
Electrical charge of the antigen determines intraarticular antigen handling and chronicity of arthritis in mice.  
Clin. Invest. 74: 1850, 1984.
- 303.- Brackertz, D., Mitchell, G.F. y Mackay, I.R.  
Antigen induced arthritis in mice. I. Induction of arthritis in various strains of mice.  
Arthritis Rheum. 20: 841, 1977.

- 304.- Van Lent, P.L.E.M., Van der Berg, W.B., Schalkwijk, J., Van de Putte, L.B.A. y Van Den Bersselaar, L.  
Allergic arthritis induced by cationic antigens: relationship of chronicity with antigen retention and T-cell reactivity.  
*Immunology* 62: 265, 1987.
- 305.- Van Lent, P.L.E.M., Dekker, C., Mostered, J., Van Den Bersselaar, L. y Van der Berg, W.B.  
Allergic arthritis induced by cationic proteins: role of molecular weight.  
*Immunology* 67: 447, 1989.
- 306.- Mertz, A.K., Batsford, S.R., Curschellas, E., Kist, M.J. y Gondolf, K.B.  
Cationic Yersinia antigen-induced chronic allergic arthritis in rats. A model for reactive arthritis in humans.  
*J. Clin. Invest.* 87: 632, 1991.
- 307.- Adler, S.G., Wang, H., Ward, H.J., Cohen, A.H. y Border, W.A.  
Electrical charge. Its role in the pathogenesis and prevention of experimental membranous nephropathy in the rabbit.  
*J. Clin. Invest.* 71: 487, 1983.
- 308.- Triguero, D., Buciak, J.L. y Patridge, W.M.  
Cationization of immunoglobulin G results in enhanced organ uptake of the protein after intravenous administration in rats and primate.  
*Pharm. Exp. Ther.* 258: 186, 1991.
- 309.- Partridge, W.M., Bickel, U., Buciak, J., Yang, J. y Diagne, A.  
Enhanced endocytosis and anti-human immunodeficiency virus type I activity of anti-rev antibodies after cationization.  
*J. Infect. Dis.* 169: 55, 1994.
- 310.- Partridge, W.M., Bickel, U., Buciak, J., Yang, J., Diagne, A. and Aepinus, C.  
Cationization of a monoclonal antibody to the human immunodeficiency virus REV protein enhances cellular uptake but does not impair antigen binding of the antibody.  
*Immunol. Lett.* 42: 191, 1994.
- 311.- Bickel, U., Lee, V.M., Trojanowsky, J.Q. y Partridge, W.M.  
Development and in vitro characterization of a cationized monoclonal antibody against beta A4 protein: a potential probe for Alzheimer's disease.  
*Bioconjug. Chem.* 5: 119, 1994.
- 312.- Snyderman, R., Phillips, J. y Mergenhagen, S.E.  
Polymorphonuclear leukocyte chemotactic activity in rabbit serum and guinea pig serum treated with immune complexes: Evidence for C5a as the major chemotactic factor.  
*Infect. Immun.* 1: 521, 1970.
- 313.- Laster, C.E. y Gleich, G.J.  
Chemotaxis of eosinophils and neutrophils by aggregated immunoglobulins.  
*Allergy Clin. Immunol.* 48: 297, 1971.

- 314.- Kew, R., Grimaldi, C.M., Furie, M.B. y Fleit, H.B.  
Human neutrophils FcγRIIIB and formyl peptides receptors are functionally linked during formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine-induced chemotaxis.  
J. Immunol. 149: 989, 1992.
- 315.- Bignold, L.P.  
Measurement of chemotaxis of polymorphonuclear leukocytes in vitro.  
Immunol. Methods 108: 1, 1988.
- 316.- Fries, L.F. y Frank, M.M.  
Complement and related proteins: inherited deficiencies.  
En: Inflammation: Basic principles and clinical correlates, ed. Gallin, J.I., Goldstein, I.M. y Snyderman, R.  
New York: Raven Press, 1988, pp. 89.
- 317.- Tanoue, M., Yshizawa, Y., Sato, T., Yano, H., Kimula, Y. y Miyamoto, K.  
The role of complement-derived chemotactic factors in lung injury induced by preformed immune complexes.  
Int. Arch. Allergy Immunol. 101: 47, 1993.
- 318.- Larsen, G.L., Mitchell, B.C. y Henson, P.M.  
The pulmonary response of C5 sufficient and deficient mice to immune complexes.  
Am. Rev.respir.Dis. 123: 434, 1981.

## **8.- PUBLICACIONES PARCIALES DEL TRABAJO REALIZADO Y REUNIDO EN ESTA TESIS**

- 1.- Geffner, J.R., Trevani, A.S., Malchiodi, E., Serebrinsky, G. y Isturiz, M.A.  
Neutrophil cytotoxicity induced by immune complexes prepared with cationized antibodies.  
Scand. J. Immunol. 37: 187, 1993.
- 2.- Geffner, J.R., Trevani, A.S., Schattner, M., Machiodi, E., López, D.H., Lazzari, M. y Isturiz, M.A.  
Activation of human neutrophils and monocytes by immune complexes prepared with cationized antibodies or antigens.  
Clin. Immunol. Immunopath. 69: 9, 1993.
- 3.- Schattner, M., Lazzari, M., Trevani, A.S., Malchiodi, E., Kempfer, A., Isturiz, M.A. y Geffner, J.R.  
Activation of human platelets by immune complexes prepared with cationized human IgG.  
Blood 82: 3045, 1993.
- 4.- Trevani, A.S., Isturiz, M.A., Schatner, M., Serebrinsky, G. y Geffner, J.R.  
Effect of proteolytic enzymes on neutrophil FcγR II activity.  
Immunology 82: 632, 1994.
- 5.- Trevani, A.S., Fontán, P., Andonegui, G.A., Isturiz, M.A. Geffner, J.R.  
Neutrophil chemotaxis induced by immune complexes.  
Clin. Immunol. Immunopathol. 74:107, 1995.
- 6.- Trevani, A.S., Andonegui, G., Kempfer, C., Malchiodi, E. y Geffner, J.R.  
Activation of human neutrophils induced by immune complexes prepared with cationic and anionic fractions of normal IgG antibodies.  
Scand. J. Immunol. (en prensa).