

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

**REGULACION DE RECEPTORES PARA INMUNOGLOBULINA G (FcγR)
EN NEUTROFILOS HUMANOS POR PEPTIDOS FORMILADOS
BACTERIANOS**

Autor : María Fernanda Alves Rosa

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

Director. Dr. Martín A. Isturiz

Sección Inmunología
Instituto de Investigaciones Hematológicas
Academia Nacional de Medicina

Año 1999

UNIVERSITY OF BUENOS AIRES
COLLEGE OF EXACT AND NATURAL SCIENCES

**REGULATION OF HUMAN NEUTROPHIL IMMUNOGLOBULIN G
RECEPTORS (Fc γ R) BY BACTERIAL N-FORMYL PEPTIDES**

Author: María Fernanda Alves Rosa

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

Director. Dr. Martín A. Isturiz, PhD.

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

Año 1999

A mi abuela "Queta".... te extraño.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, quienes siempre me apoyaron en cada uno de mis emprendimientos e inquietudes.

A mi hermana Nani, quien merece un capítulo aparte en mi vida... existe un antes y después de ella.

A mi hermana Vale, de quien valoro su amor por la libertad.

Muy especialmente, al director de esta tesis, el Dr. Martín Isturiz. El fue quién me transmitió su amor por la investigación, me enseñó a comprender que de los errores también se aprenden cosas...y que un investigador, ante todo, es un ser humano. Por su apoyo incondicional en cada nuevo proyecto. Por la confianza depositada en mi. Por haber respetado mis decisiones y haberme permitido “crecer” a su lado. Y por sobre todas las cosas por su profesionalismo y calidad humana...¡Gracias!.

A Marina Palermo, una persona de 10... Porque pude experimentar el placer de trabajar con ella.

A mis compañeras de siempre, María del Carmen, Marta, Susana, Mercedes, Martita, Nora, Norma, Beatriz, Graciela, Liliana y también Marisa, con quienes compartí gran parte de mis días en el laboratorio de Inmunología. Todas ellas aportaron su granito de arena para mi crecimiento personal y profesional.

A María y Pilar.

A Maca, Paula, Gaby y Caro... siempre dispuestas a darme una mano...las quiero mucho.

A Patri y Luis...De ellos aprendí el valor de la amistad. Siempre disfruté de la calidez de su compañía y de sus abrazos en el tiempo y momento apropiados.

A Mercedes P. Por haberme hecho comprender que todos los seres humanos tenemos “alas”....grandes o chiquitas... pero alas al fin.

A CAM por estar...

RESUMEN

Los neutrófilos (PMN) son células fagocíticas que constituyen la primera línea de defensa durante los procesos infecciosos bacterianos cuya función principal es la destrucción de microorganismos. Estas células son capaces de migrar en forma inidireccional e irreversible hacia los focos inflamatorios. Este desplazamiento que se opera a favor de un gradiente de concentración de moléculas, es conocida como quimiotaxis y las moléculas que lo inducen, factores quimiotácticos. Estos últimos pueden ser de naturaleza endógena como exógena. Durante los procesos infecciosos, los factores exógenos más importantes son aquellos producidos por bacterias: los péptidos formilados, cuyo representante más estudiado es el péptido prototipo formil-metionil-leucil-fenilalanina (FMLP). En el foco inflamatorio, las altas concentraciones de péptidos quimiotácticos conducen al arresto celular, a la degranulación y a la activación de los sistemas microbicidas de los PMNs.

Dentro del foco, los PMNs también desempeñan diferentes funciones efectoras, debido a la activación de sus receptores para el fragmento Fc de Inmunoglobulina G (Fc γ Rs) por parte de sus ligandos naturales, los complejos inmunes. Estas funciones involucran a la fagocitosis, la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y la liberación de reactivos intermediarios del oxígeno. Los PMN poseen dos clases de Fc γ Rs: Fc γ RII y Fc γ RIIB. Estos receptores cumplen un papel fundamental dentro de los eventos inflamatorios dado que constituyen un nexo entre la inmunidad humoral y la celular, siendo determinantes en el desempeño de procesos de relevancia biológica. De estos datos se desprende que cualquier modificación, de la expresión de los Fc γ Rs, es susceptible de provocar alteraciones biológicas de suma importancia.

Debido a las múltiples y diversas acciones de péptidos formilados y los Fc γ Rs, iniciamos estudios en neutrófilos para investigar posibles interrelaciones entre ambas moléculas en el transcurso del fenómeno inflamatorio de origen infeccioso.

En este trabajo, presentamos evidencia que la preincubación de PMN con FMLP inhibe diferentes funciones celulares dependientes de los Fc γ Rs tales como la fagocitosis, la citotoxicidad celular dependiente de radicales libres y la ADCC. Este fenómeno de inhibición funcional del PMN causada por el FMLP, podría ser explicado por una disminución de la expresión (*down regulation*) de ambos Fc γ Rs en la superficie celular.

Por otra parte, encontramos que este fenómeno esta asociado a eventos secretorios. En efecto, sobrenadantes de PMNs estimulados con FMLP pueden inducir la *down regulation* de

Fc γ Rs en PMNs vírgenes de tratamiento. Este efecto es amplificado por el uso de citochalasinina B, un reconocido agente secretagogo. Ello implica que dada la activación celular, se liberan moléculas con actividad enzimática específica para Fc γ RIIIB y Fc γ RII. Estudios con inhibidores de proteasas indicaron que se trata de una proteasa(s) de serina. Al evaluar el papel del Ca²⁺ (intra y extracelular) en este proceso, encontramos que la *down regulation* de ambos Fc γ Rs inducida por FMLP es estrictamente dependiente de Ca²⁺ extracelular.

Por otra parte, observamos que, la preincubación de PMN con FMLP no es necesaria para la inhibición de la ADCC. Teniendo en cuenta que la *down-regulation* de los Fc γ Rs inducida por FMLP no se observa hasta después de los 20- 30 min. de incubación, y que la ADCC es una función que se activa rápidamente, es muy factible que el FMLP pueda modificar dicha función a través de la modificación de eventos intracelulares que operan tempranamente. Ello fue corroborado al realizar ensayos de quimioluminiscencia donde se observaron efectos inhibitorios del FMLP a tiempos cortos de incubación (10 - 15 min.) con este péptido formilado. Así, el FMLP ejercería su acción inhibitoria: i) a nivel de los Fc γ Rs de membrana y ii) a través de alteraciones transduccionales en el PMN.

Todos estos datos, permiten concluir que la resolución de un proceso inflamatorio de origen infeccioso, estaría supeditado no sólo al número de células efectoras involucradas en el mismo, sino paradójicamente a la concentración de moléculas de reconocida acción proinflamatoria, capaz de ejercer efectos claramente antiinflamatorios.

SUMMARY

The neutrophils (PMN) are phagocytic cells that constitute the first line of defense during bacterial infections. These cells undergo a series of sequential changes in response to a great variety of stimuli that permit their migration toward inflammatory areas. The unidirectional movement that is operated in favor of a concentration gradient is known as chemotaxis. The molecules that induce it are known as chemotactic factors. The formyl peptides are the most important chemoattractants produced during bacterial infections and one of the most representative is the prototype N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (FMLP). In the inflammatory area, the high concentrations of chemotactic peptides lead to cellular arrest, degranulation and to the activation of the PMN microbicidal systems. In addition, PMNs perform different cellular functions, including phagocytosis, antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC), and release of reactive oxygen intermediates. Each one of these functions are activated through the interaction between the Fc portion of IgG (Fc γ) and the Fc γ receptors (Fc γ Rs) on the neutrophil surface. PMNs possess two classes of Fc γ Rs: Fc γ RII and Fc γ RIIIB. These Fc γ Rs fulfil a fundamental role within the inflammatory events since they constitute a link between the humoral and cellular immunity, being determinant in the performance of relevant biological processes. From these data we can speculate that any modification of the Fc γ Rs expression, it is susceptible of provoking important biological alterations.

Due to the multiple actions of both, FMLP and Fc γ Rs, we developed studies in PMNs in order to investigate possible interrelationships between both molecules in the course of the inflammatory phenomenon of infectious origin. In this work, we present evidence that FMLP inhibits different neutrophil Fc γ R- dependent cellular functions such as phagocytosis, and release of reactive oxygen intermediates and ADCC. This functional inhibition of PMN caused by FMLP, would be explained by the down regulation of both, cellular surface Fc γ RIIIB and FcRII on the cell surface.

We find that this phenomenon is associated to secretory events, since supernatants of stimulated PMNs can induce Fc γ R down regulation of naive cells. This implies that during cellular activation, molecules with specific enzymatic activity for Fc γ RIIIB and Fc γ RII are released. Studies with proteases inhibitors suggested that it is as serine protease. We found that the FMLP- induced Fc γ R down regulation is strictly dependent of extracellular Ca²⁺.

On the other hand, we observe that, PMN preincubation with FMLP is not necessary for the

inhibition of ADCC. Taking into account that the FMLP-dependent Fc γ R down regulation is not observed before 20- 30 min of incubation, and the onset of ADCC occurs rapidly, it is possible that FMLP can modify this function by altering early transductional intracellular events. This was supported by the data obtained from the chemiluminiscense assays that demonstrate that FMLP exerts an inhibitory effect on respiratory burst when PMN treatment was performed at short intervals of time (10 - 15 min.).

All these data, led us to conclude that the resolution of an inflammatory process of infectious origin would be subordinated not only to the number of effector cells, but also to to the concentration of molecules of well known proinflammatory actions, capable of exerting antinflammatory effects.

INDICE

página

Agradecimientos.

i

ABREVIATURAS.

RESUMEN

1. BREVE INTRODUCCION GENERAL Y OBJETIVOS.

1

2. INTRODUCCION.

5

2.1.El neutrófilo.

2.2. Los receptores para el fragmento Fc de Inmunoglobulina (FcR).

10

2.2.1. Clasificación de los FcR desde el punto de vista funcional.

10

2.2.2. Los FcR y su importancia biológica.

14

2.2.3. Receptores para el fragmento Fc de IgG (Fc γ R).

15

2.2.3.1. Estructura molecular y distribución.

16

2.2.3.2. Señales de activación celular inducidas por los Fc γ Rs.

17

2.2.3.2.1 La señal intracelular inicial: La agregación de receptores.

17

2.2.3.2.2. Señales de transducción intracelulares.

18

2.2.3.3. Funciones celulares de neutrófilos mediadas por los Fc γ Rs con ITAMs.

20

2.2.3.3.1. Fagocitosis.

20

2.2.3.3.2. Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC).

22

2.2.3.3.3. Sistemas microbicidas dependientes del oxígeno.

La producción de reactivos intermediarios del oxígeno.

23

2.2.3.3.4. Sistemas microbicidas independientes del oxígeno.

26

2.2.3.3.4.1. Gránulos y vesículas secretorias.

27

2.2.3.3.4.2. Vesículas secretorias.

29

2.2.3.3.4.3. Gránulos de gelatinasa.

30

2.2.3.3.4.4. Gránulos específicos.

30

2.2.3.3.4.5. Gránulos azurófilos.

31

2.2.3.3.4.6. Actividad de las moléculas relevantes de los gránulos.

31

2.2.3.3.5. Producción de mediadores lipídicos de inflamación.

33

2.2.3.3.6. Producción de citoquinas.

34

2.2.3.4. Funciones celulares de neutrófilos mediadas por los Fc γ Rs

sin ITAMs.

35

2.2.3.4.1. Cooperación negativa entre distintos receptores.
Inhibición de la activación de funciones mediadas
por FcR con ITAMs por FcγRIIB.

35

2.2.3.4.2. Cooperación positiva entre distintos tipos de
receptores.

36

2.2.3.4.3. Rol Protectorio de la IgG monomérica por FcRn.

37

2.2.3.5. Diversidad y características de los receptores para Fc de
Inmunoglobulina G.

38

2.2.3.5.1. FcγRI.

38

2.2.3.5.2. FcγRIIA, -IIB y -IIC.

39

2.2.3.5.3. FcγRIIIA y FcγRIIIB.

40

2.3. Factores quimiotáticos de naturaleza bacteriana: Los péptidos formilados.

41

2.3.1. Rol biológico de los péptidos formilados.

43

2.3.2. Receptores para péptidos formilados.

44

2.3.2.1. Señales de transducción en los neutrófilos generadas por activación del FPR.

47

2.3.2.2. Reciclado del FPR.

51

2.3.3. Receptores para moléculas quimiotáticas en la membrana del neutrófilo.

53

3. MATERIALES Y METODOS.

54

3.1. Reactivos generales.

54

3.2.

Soluciones.

54

3.2.1. Solución de Ficoll-Hypaque.

3.2.2. Solución de dextrán..

54

3.2.3. Solución fisiológica.

55

3.2.4. Solución de Hank's (HBSS) 10x.

55

3.2.5. Solución de Türk para el recuento de células.

55

3.2.6. Solución de azul tripán.

55

3.2.7. Medio de cultivo completo (MCC).

56

3.3. Purificación de neutrófilos polimorfonucleares (PMN).

56

3.4. Preparación de complejos inmunes (CI).

56

3.4.1. Antígenos empleados para la preparación de los CI.

56

3.4.2. Obtención de IgG de conejo anti-Ovoalbúmina (IgGc anti-OA)

57

3.4.3. Formación de los Complejos Inmunes (CI).

57

3.5. Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC).

57

3.5.1. Células blanco.

57

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

58

3.5.3. Sensibilización de las células blanco.

58

3.5.4. Reacción de ADCC.

58

3.6. *Fagocitosis.*

59

3.6.1. Células blanco.

59

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

59

3.6.3. Sensibilización de células blanco.

59

3.6.4. Ensayo de Fagocitosis.

59

3.6.5. Evaluación de la cinética de lisis de los ^{51}C - Ec fagocitados.

60

3.7. *Citotoxicidad celular mediada por radicales libres.*

61

3.7.1. Células blanco.

61

3.7.2. Marcación de células blanco con cromato de sodio radioactivo.

61

3.7.3. Reacción de citotoxicidad.

61

3.8. *Emisión de quimioluminiscencia por neutrófilos estimulados.*

62

3.9. *Permeabilización de neutrófilos.*

62

3.10. *Remoción de los $Fc\gamma RIIIB$ de la superficie celular de los PMN.*

62

3.11. *Tratamiento de PMN vírgenes de tratamiento con sobrenadantes de células estimuladas con FMLP o Citochalasin B (CB) + FMLP.*

63

3.12. *Citometría de Flujo..*

63

3.12.1. Evaluación de la expresión de FcγRII y FcγRIIIB.

63

3.12.2. Evaluación de la movilización de calcio intracelular $[Ca^{2+}]_i$.

64

3.12.2.1. Marcación de células con Fluo-3AM.

64

3.12.2.2. Análisis de los datos obtenidos.

65

3.12.3. Evaluación de las variaciones de la complejidad celular como parámetro de degranulación.

65

3.13. *Análisis estadístico de los datos obtenidos.*

66

4. RESULTADOS

67

4.1. Análisis del efecto del FMLP sobre funciones efectoras celulares de PMNs.

67

4.1.1 Funciones independientes de los Receptores para Fc de IgG (Fc γ R).

67

4.1.1.1. Citotoxicidad celular mediada por radicales libres inducida por FMLP y Complejos Inmunes.

67

4.1.1.2. Especificidad de la acción del FMLP.

69

4.1.1.3. Evaluación de la actividad de la enzima NADPH oxidasa en PMNs tratados con FMLP.

71

4.1.2. Análisis del efecto del FMLP sobre funciones efectoras celulares de PMNs dependientes de los receptores para Fc de IgG (Fc γ R).

72

4.1.2.1. Fagocitosis dependiente de los Fc γ Rs.

73

4.1.2.2. Citotoxicidad celular mediada por radicales libres inducida por CI formados en distintas relaciones molares antígeno: anticuerpo.

76

4.1.2.3. Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC).

77

4.2. *Expresión de FcγRIIIB y FcγRII en PMNs tratados con FMLP.*

78

4.2.1. Expresión de FcγRs en la superficie celular de PMN tratados y controles.

79

4.2.2. Cambios en el contenido intracitoplasmático de FcγRIIIB y FcγRII de PMN tratados y controles.

81

4.2.3. Efecto del FMLP sobre la expresión de FcγRIIIB intracelular en PMN tratados con GPI-PLC.

82

4.3. *Mecanismos de eliminación o shedding de los FcγRs en la membrana citoplasmática.*

84

4.3.1. Evaluación del efecto de sobrenadantes de PMNs tratados con

FMLP sobre la expresión de los FcγRs en células libres de tratamiento.

84

4.3.2. Tratamiento de PMNs con agentes promotores de secreción.

85

4.3.2.1. Efecto de la Citochalasin B sobre la *down regulation* de FcγRs de PMNs tratados con FMLP.

85

4.3.2.2. Evaluación de la degranulación de PMNs tratados con CB + FMLP mediante la técnica de citometría de flujo.

88

4.3.2.3. Evaluación del efecto de sobrenadantes de PMNs tratados con CB+ FMLP.

91

4.3.3. Naturaleza del producto(s) de secreción responsable de la *down regulation* de los FcγRs.

92

4.3.3.1. Identificación de la calidad del producto de secreción a través del uso de inhibidores de proteasas.

92

4.4. ¿Cómo afecta al pool intracelular de FcγRs el tratamiento de los PMNs con CB + FMLP?.

95

4.5. La inhibición de las funciones dependientes de FcγRs se debe sólo a la “down regulation” de ambos FcγRs?.

98

4.5.1. Evaluación de la generación de radicales libres a tiempos cortos de tratamiento con FMLP.

98

4.6. Rol del Ca²⁺ extracelular en el proceso de “down regulation”.

100

4.6.1. Evaluación del efecto del FMLP en medio libre o suplementado con CaCl₂ 1mM.

100

4.7. Rol del Ca²⁺ intracelular en la “down regulation” de FcγRs por FMLP

102

4.7.1. Evaluación de la movilización de Ca²⁺ intracelular inducida por FMLP en medio HBSS libre de Ca²⁺ (HBSS) o suplementado con CaCl₂ 1mM (HBSS- Ca²⁺).

102

4.7.2. Movilización de [Ca²⁺]_i en células pretratadas con el quelante de Ca²⁺ intracelular BAPTA-AM.

105

4.7.3. Inhibición de respuestas celulares dependientes de la movilización de Ca^{2+} intracelular.

107

4.7.3 Expresión de $Fc\gamma$ Rs en PMNs pretratados con BAPTA-AM y estimulados con FMLP.

109

48. Evaluación del efecto del FMLP sobre otras moléculas expresadas durante los procesos inflamatorios, la β_2 integrina CD11b-CD18 (Mac-1).

111

5. DISCUSION.

113

5.1. Expresión de los $Fc\gamma$ RIIIB y $Fc\gamma$ RII en la membrana del neutrófilo. 115

5.2. Mecanismos de eliminación o shedding de los $Fc\gamma$ Rs de membrana citoplasmática. 118

5.3. Naturaleza del producto(s) de secreción responsable(s) de la down regulation de los $Fc\gamma$ Rs. 121

5.4. ¿La inhibición de las funciones dependientes de $Fc\gamma$ Rs se debe sólo a la “down regulation” de ambos $Fc\gamma$ Rs?
Efecto del FMLP sobre la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y la quimioluminiscencia. 122

5.5. Papel del calcio en el proceso de “down regulation” de $Fc\gamma$ RIIIB y $Fc\gamma$ RII inducida por FMLP. 123

5.5. Implicancia biológica del proceso de down regulation de $Fc\gamma$ RIIIB y $Fc\gamma$ RII. 126

6. BIBLIOGRAFIA.

ABREVIATURAS

[Ca ²⁺] _i	Calcio libre intracelular
¹ O ₂	Oxígeno singlete
⁵¹ Cr-Ep	Eritrocitos de pollo marcados con ⁵¹ Cr
⁵¹ Cr-Ec	Eritrocitos de carnero marcados con ⁵¹ Cr
AA	Acido araquidónico
AcMo	Anticuerpo monoclonal
ADCC	Citotoxicidad celular mediada por anticuerpos
aIL-1	Antagonista del receptor para IL-1
AM	acetometil ester
AMPc	AMP cíclico
ANOVA	Análisis de variancia
BCR	Receptor de linfocitos B
BPI	Proteína bactericida incrementadora de la permeabilidad
C3b	Producto del clivaje del factor C3 del Complemento
C5a	Producto de clivaje del factor C5 del Complemento
CB	Citochalcasina B
CI	Complejos inmunes.
CR	Células respondedoras
CR1	Receptor de C3b
DAG	Diacilglicerol
DTM	Dominios transmembrana
EC	Dominios extracitoplasmáticos
Ec	Eritrocitos de carnero
Ep	Eritrocitos de pollo
Fcγ	Fragmento Fc de IgG
FcγR	Receptor para el fragmento Fc de IgG
FcαR	Receptor para Fc de IgA
FcεRI	Receptor para Fc de IgE tipo I
FcR	Receptor para región Fc de Inmunoglobulinas
FcRn	Receptor neonatal para IgG
FITC	Ficoeritrina

F11	Fluorescencia
FMLP	N- Formil metionil leucil fenilalanina
FMLP-FITC	FMLP fluoresceinado
FPR	Receptor para péptidos formilados
GM-CSF	Factor estimulador de colonias granulocíticas macrofágicas
GPI	Glicosil fosfatidil inositol
GPI-PLC	Fosfolipasa C específica de enlaces glicosil fosfatidil inositol
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrógeno
HBSS	Solución buffereada de Hank (sin Calcio)
HBSS-Ca ²⁺	Solución buffereada de Hank suplementada con CaCl ₂ 1mM
IC	Dominios intracitoplasmáticos
IgA	Inmunoglobulina A
IgG	Inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M
IL-1 β	Interleukina 1- β
IL-10	Interleukina-10
IL-3	Interleukina-3
IL-4	Interleukina-4
IL-8	Interleukina- 8
INF- γ	Interferon- γ
IP ₃	Inositol-(1,4,5) trifosfato (IP ₃)
ITAM	<i>Immune receptor tyrosine activation motif</i>
ITIM	<i>Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif</i>
LFA-1	Antígeno asociado a la función linfocitaria-1
LPS	Lipopolisacáridos
LT	Leucotrienos
MCC	Medio de cultivo completo
MHC	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
MIF	Mediana de Intensidad de Fluorescencia
MIP-1 α y MIP-1 β	Proteínas inflamatorias 1 α y 1 β de macrófagos
MPO	Mieloperoxidasa
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido

NK	células natural killer
N-t-BOC	N-t-Boc-Phe-Leu-Phe-Leu
O ₂ ⁻	Anión superóxido
OA	Ovoalbúmina
PAF	Factor de activación plaquetario
PBS	Solución salina tamponada
PG	Prostaglandinas
PI	Fosfoinosítidos
PIgR	Receptor de IgA multimérica
PKC	Proteína quinasa C
PLC	Fosfolipasa C
PLD	Fosfolipasa D
PMN	Neutrófilos polimorfonucleares
rpm	Revoluciones/ minuto
SEM	Desvío standard muestral
SN	Sobrenadantes
SOD	Superóxido dismutasa
SSC	<i>Side scatter light</i>
TCR	Receptor de linfocitos T
TGF-β1	Factor transformador de crecimiento β1
TM	Dominios de transmembrana
TNF-α	Factor de Necrosis Tumoral-α
TX	Tromboxanos
URQL	Unidades relativas de quimioluminiscencia

1. BREVE INTRODUCCION GENERAL Y OBJETIVOS.

La respuesta inmune constituye un mecanismo de protección contra antígenos reconocidos por el organismo como “exógenos”. Los eventos subsiguientes a este hecho, involucran una respuesta altamente regulada y coordinada de diversos tipos celulares.

Tradicionalmente, se consideró a los linfocitos como las células más importantes dentro de las reacciones inmunes debido a la especificidad de su respuesta. Sin embargo, otros tipos celulares, entre ellos los polimorfonucleares neutrófilos, son necesarios para la erradicación de los microorganismos. Estas células no sólo son de vital importancia en la fagocitosis y la destrucción de microorganismos sino también en la generación de la respuesta inflamatoria, que constituye el mecanismo de defensa primario en los procesos infecciosos.

Los neutrófilos circulantes “perciben” señales emanadas de los focos inflamatorios. Estas señales pueden ser de naturaleza bacteriana o provenir de las células huésped. De ello se desprende que los tipos y calidad de señal recibidas por estas células son muy variados y de distinta naturaleza.

Los neutrófilos son las primeras células que arriban a los sitios inflamatorios. El hecho de que puedan detectar alteraciones homeostáticas y abandonar la circulación en un punto particular, implica el reconocimiento de moléculas que se encuentran en las cercanías del foco inflamatorio (Osborn *et al*,1990). Las moléculas quimiotácticas, son quienes “vectorizan” el movimiento del neutrófilo hacia el punto crítico de inflamación.

En los procesos inflamatorios de naturaleza bacteriana, los neutrófilos no sólo se movilizan en respuesta a gradientes crecientes de moléculas endógenas tales como C5a (el producto de clivaje del factor C5 del Complemento), Leucotrieno B₄, Factor activador plaquetario o Interleuquina- 8 (IL-8), sino también en respuesta a péptidos formilados bacterianos que constituyen probablemente los agentes quimiotácticos más prominentes dentro del foco infeccioso - inflamatorio. Estas moléculas,

se liberan como consecuencia de la destrucción bacteriana ya sea por parte del sistema inmune o bien por un proceso de autólisis (Gallin *et al*, 1988), por lo que es factible detectarlas en concentraciones relativamente altas que oscilan entre 0.1 y 1 μ M.

Cabe mencionar, que si bien estos péptidos son moléculas de origen esencialmente procariótico, existen moléculas de igual naturaleza que derivan de la síntesis de proteínas mitocondriales, que son liberadas al medio extracelular como consecuencia del daño tisular (Carp *et al*, 1982).

Los neutrófilos reconocen a los péptidos formilados a través de receptores específicos con el propósito de “orientarse” y migrar hacia el punto de infección donde se sitúan las bacterias, (principal fuente de producción de estas moléculas)

En forma concomitante al proceso migratorio, se operan cambios tanto en las paredes del endotelio subyacente al foco inflamatorio como en la superficie del neutrófilo. En primer término, hay un incremento de la adhesividad celular, que les permite a los neutrófilos interactuar más eficientemente con el endotelio. Ello los conduce a rodar a lo largo de la pared endotelial (*rolling*) a una velocidad menor a la del flujo sanguíneo hasta quedar inmovilizados (Hemler *et al*, 1991). Posteriormente, atraviesan la pared endotelial a través de las uniones intercelulares y migran rápidamente al foco inflamatorio bajo el efecto de los agentes quimiotácticos.

En el foco inflamatorio, las altas concentraciones de péptidos quimiotácticos conducen al arresto celular, a la degranulación y a la activación de los sistemas microbicidas del neutrófilo (Snyderman *et al*, 1984).

Por otra parte, los neutrófilos, también ejercen sus funciones fagocíticas reconociendo como “identidades foráneas” a las bacterias opsonizadas con IgG y/o C3b (el producto del clivaje del factor C3 del Complemento). Este proceso de “identificación” implica la interacción de la porción Fc de

IgG y/o C3b con sus receptores en la membrana del neutrófilo, Fc γ R y CR1 respectivamente. Mientras que los CR1 favorecen la interacción física neutrófilo - bacteria, la activación de los Fc γ Rs inicia los mecanismos de fagocitosis y una serie de funciones microbicidas de suma importancia.

Los Fc γ Rs cumplen un rol fundamental dentro de los eventos inflamatorios dado que constituyen un nexo entre la inmunidad humoral y la celular, siendo determinantes en el desempeño de procesos de relevancia biológica. La base de estos fenómenos reside en la interacción de los Fc γ Rs con sus ligandos naturales, los complejos inmunes (CI). En efecto, estos receptores son los responsables directos de funciones efectoras tales como la fagocitosis, la liberación de gránulos azurófilos, considerada como el sistema microbicida no oxidativo más importante del neutrófilo (Verhoef *et al*, 1993) y la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), un mecanismo citotóxico extracelular más específico que involucra la muerte de los microorganismos opsonizados. Además, promueven la activación del estallido respiratorio que involucra la activación del complejo enzimático NADPH oxidasa, fuente principal de metabolitos oxidativos altamente tóxicos e inespecíficos (Babior *et al*, 1992). Por otra parte, son los responsables de la depuración de CI (Palermo *et al*, 1997)) y, además, están involucrados en la secreción de TNF- α (Haziot *et al*, 1993), IL-1 β (Malyak *et al*, 1994), el antagonista del receptor para IL-1 (Malyak *et al*, 1994), IL- 8 (Cassatella *et al*, 1992), el factor transformador de crecimiento β 1 (Fava *et al*, 1993) y las proteínas inflamatorias 1 α y 1 β de macrófagos (Kasama *et al*, 1993). También están implicados en la liberación al medio extracelular de mediadores lipídicos de inflamación, tales como factor de activación plaquetario, prostaglandinas, tromboxanos y lipoxigenasas generadoras de leucotrienos, lipoxinas e hidroxiácidos (Powell *et al*, 1996; Larsen *et al*, 1983).

De estos datos se desprende que cualquier modificación, ya sea cuali o cuantitativa, de la expresión de los Fc γ Rs, en la membrana celular de la célula efectora, es susceptible de provocar alteraciones biológicas de suma importancia.

Debido a las múltiples y diversas acciones de los FMLP y los Fc γ Rs, iniciamos estudios en neutrófilos tendientes a investigar posibles interrelaciones entre ambas moléculas en el transcurso del fenómeno inflamatorio de origen infeccioso. Partiendo de observaciones experimentales previas, que sugerían que los péptidos formilados podían modular funciones mediadas por los Fc γ Rs, decidimos estudiar en profundidad el fenómeno observado. Para ello, nos planteamos los objetivos de esta tesis:

- I. *Evaluar la influencia de los péptidos formilados en la modulación de diversas funciones efectoras de neutrófilos mediadas por los Fc γ R. Para ello, utilizamos el péptido formilado prototipo N-formil-metionil-leucil-fenilalanina (FMLP).*
- II. *Determinar los mecanismos responsables de la modulación de las funciones efectoras mediadas por los Fc γ Rs.*
- III. *Analizar el efecto de los péptidos formilados sobre la expresión de las dos clases de Fc γ Rs constitutivos en la superficie de los neutrófilos: Fc γ RII y Fc γ RIIIB, así como también los mecanismos de translocación de los pools intracelulares de estos receptores hacia la membrana plasmática.*
- IV. *Evaluar, la participación del calcio extracelular en el proceso modulador de los Fc γ Rs inducido por los péptidos formilados.*

2. INTRODUCCION

2.1.El neutrófilo.

Los neutrófilos son células fagocíticas que constituyen la primera línea de defensa durante los procesos infecciosos bacterianos. Su función principal es la destrucción de microorganismos.

Son células de corta vida media cuyo ciclo vital comienza en la médula ósea, donde se producen en forma diaria entre 60 y 400×10^7 neutrófilos. Allí, permanecen aproximadamente 14 días antes de ser liberados al torrente circulatorio. Los neutrófilos en sangre se concentran en dos *pools* de tamaño similar, el **circulante** y el **marginal**. Este último, comprende aquellas células que están adheridas a endotelio y suelen entrar a los tejidos.

Luego de permanecer entre 6 y 9 horas en circulación, los neutrófilos abandonan el lecho vascular, accediendo a tejidos periféricos en respuesta a diversos estímulos. Una vez en los tejidos, no regresan a la circulación (Sigal *et al*, 1994), por lo que el flujo de células es irreversiblemente **unidireccional**. Allí sobreviven por un período de entre 6 y 48 horas hasta su muerte o pérdida en la mucosa del tracto gastrointestinal.

Los neutrófilos sufren una serie de cambios en respuesta a una gran variedad de estímulos. Estos se operan secuencialmente y permiten su migración hacia los focos inflamatorios. Estas células interactúan con el endotelio capilar a través de glicoproteínas denominadas **L-selectinas**, que les permite unirse a sus paredes, ya sea cuando están en circulación o bien durante la migración hacia el foco inflamatorio. Por otra parte, las células endoteliales expresan dos glicoproteínas que aumentan la eficiencia de la interacción célula-célula, la **P** y **E-selectina**. La primera de ellas, es inducible por trombina e histamina, en tanto que la segunda, lo es por efecto de moléculas activadas del complemento o por citoquinas tales como IL-1 y TNF- α , producidas por los monocitos en el foco inflamatorio (Crocket-Torabi *et al*, 1995)

Posteriormente, la exposición a mediadores inflamatorios inducen la eliminación o *shedding* de las selectinas de la membrana de los neutrófilos, y la aparición concomitante de otras proteínas de adhesión denominadas **integrinas** como los son Mac-1 (CD11b/CD18) o el antígeno asociado a la función linfocitaria (LFA) (CD11a/CD18) y gp150,95 (CD11c/CD18). Estas proteínas son heterodímeros que se encuentran a modo de reserva en los gránulos de los neutrófilos. Allí, permanecen (Baiton *et al*, 1987) hasta que las moléculas quimiotácticas que se liberan en el foco inflamatorio inducen su expresión en la superficie del neutrófilo (Sengelov *et al*, 1996). Las células endoteliales expresan en su membrana plasmática moléculas de adhesión llamadas ICAM-1 (contrareceptor de las β_2 integrinas) (Dustin *et al*, 1986). Así, ocurrida la adhesión al capilar, los neutrófilos se movilizan hacia los nexos de las células endoteliales, las cuales cambian su arquitectura en dicho punto para facilitar el pasaje de los neutrófilos (Figura 2.1), fenómeno denominado **diapédesis**. El mecanismo por el cual se induce la apertura de la unión endotelial, no se ha caracterizado aún.

Todos estos eventos conducen al movimiento dirigido de los granulocitos desde la circulación periférica hacia el foco inflamatorio con la subsiguiente acumulación de estas células en dicho punto. El desplazamiento **unidireccional** que se opera a favor de un gradiente de concentración de moléculas es conocido como **quimiotaxis** (Devreotes *et al*, 1988; Cassimeris *et al*, 1990). Las moléculas que inducen dicho fenómeno “migratorio dirigido” se denominan **factores quimiotácticos**.

Los neutrófilos estimulados por los agentes quimioácticos, desarrollan cambios morfológicos rápidos modificando su forma redondeada hacia una forma elongada, proyectando lamelipodios en la región anterior y un urópodo contráctil en la región posterior. Ello le confiere una polaridad morfológica la cual es requerida para una migración unidireccional eficiente. El

fenómeno migratorio requiere la interacción reversible con un sustrato y una serie de eventos repetitivos en los que los neutrófilos extienden sus lamelipodios en la dirección del gradiente de concentración y retraen su uropodio hacia el cuerpo celular (Cassimeris *et al*, 1990; Johanson *et al*, 1993).

En los procesos infecciosos, los factores quimiotácticos más importantes son aquellos producidos y liberados por bacterias (Johanson *et al*, 1993). Ellos son los péptidos formilados cuyo representante más estudiado es el formil-metionil-leucil-fenilalanina (FMLP) (Schiffmann *et al*, 1975; Schiffmann *et al*, 1977), un péptido formilado prototipo de amplio uso en biología experimental. También, existen otros agentes quimiotácticos generados por las células inflamatorias o tejidos dañados como consecuencia de la reacción inflamatoria. En este grupo están incluidos los metabolitos derivados del ácido araquidónico, como el LTB₄, producido por el propio neutrófilo (Ford *et al*, 1980), los componentes del sistema Complemento activado como C3a y C5a (Ehrengruber *et al*, 1994), y también la Interleukina 8 (IL-8) producida por macrófagos estimulados con IL-1, el Factor de Necrosis Tumoral - α (TNF- α), Lipopolisacáridos (LPS) o bien con el Factor estimulador de colonias granulocíticas macrofágicas (GM-CSF).

Los neutrófilos expresan en la membrana plasmática receptores para estos agentes quimiotácticos los cuales son requeridos para “percibir” los gradientes de las diversas moléculas quimiotácticas. Uno de los receptores más estudiados es el receptor para péptidos formilados (FPR) (Johanson *et al*, 1993; Murphy *et al*, 1994), cuyas características se detallan en la sección **1.2.7.1**.

Mientras se opera la migración unidireccional de los neutrófilos, las bacterias son **opsonizadas**. Esto es, se recubren principalmente de inmunoglobulinas G (IgG) y componentes del sistema Complemento activado como C3b y C3bi para poder ser reconocidos por los neutrófilos quienes poseen en su membrana plasmática, receptores para tales moléculas, Fc γ R, CD35 y CD11b/

CD18 respectivamente (Daëron *et al*, 1997; Wrigth *et al*, 1983; Wrigth, Sao *et al*, 1983). Tanto las moléculas del Complemento como las de anticuerpo, son ligandos que favorecen la unión de las bacterias a la superficie celular, incrementando la eficiencia de las interacciones bacteria-célula por lo que se ve facilitando el proceso de fagocitosis. Por otra parte, en el foco inflamatorio también se desarrollan dos procesos importantes. El primero de ellos, es el **estallido respiratorio**, que consiste en la marcada y repentina activación del metabolismo oxidativo resultando en la producción de anión superóxido (O_2^-) (Rossi *et al*, 1986) y de otras especies derivadas del oxígeno. El segundo proceso es la **degranulación** (Hirsch *et al*, 1960), que implica la liberación del contenido de los gránulos citosólicos, ya sea al interior de la vacuola fagocítica o bien al medio extracelular. La combinación de ambos eventos, conduce a la digestión y muerte bacteriana. Todos estos procesos se describen detalladamente en las Secciones siguientes.

Figura 2.1

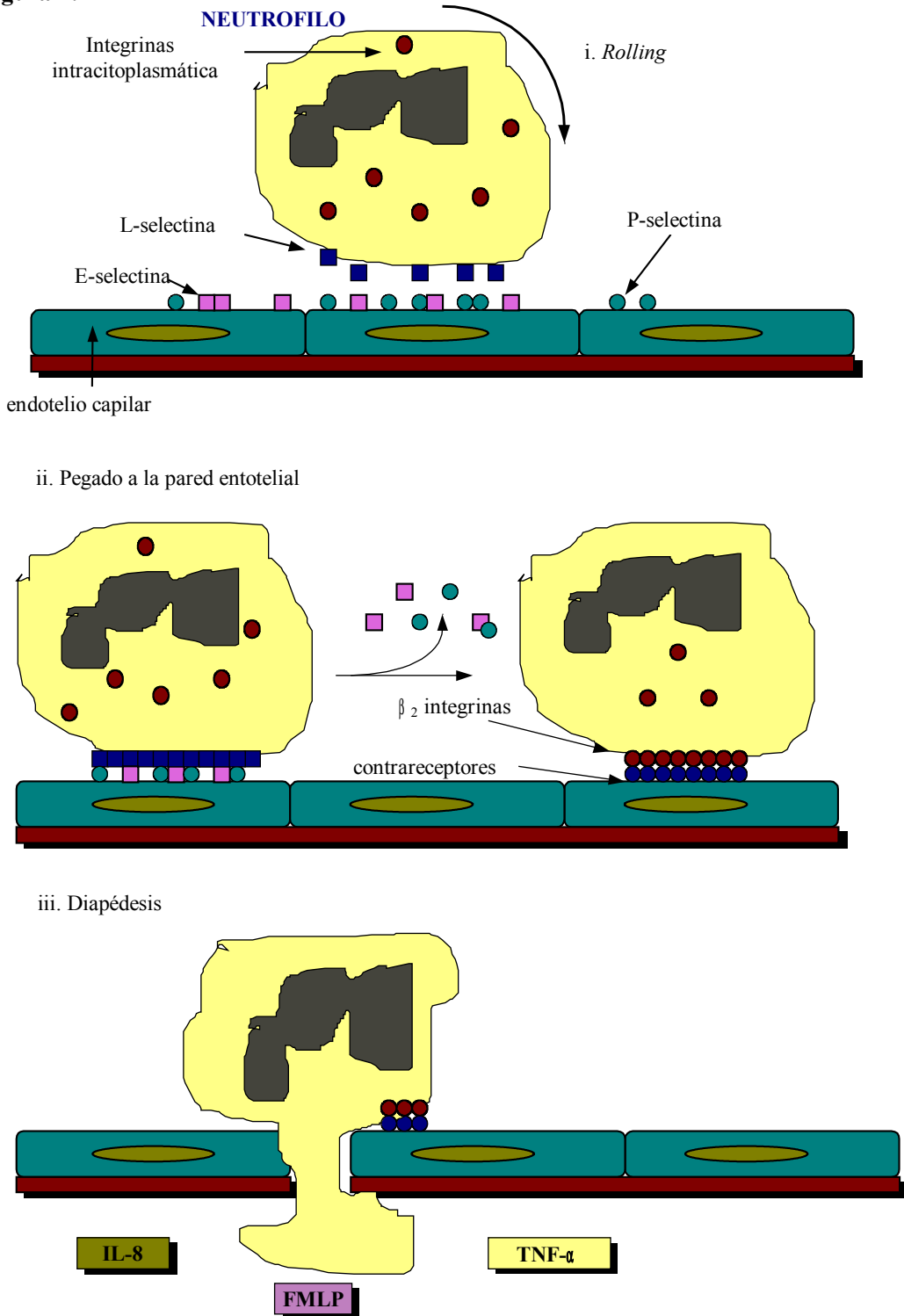


Figura 2.1. Interacciones moleculares durante la adhesión de los neutrófilos al endotelio en el foco inflamatorio.

2.2. Los receptores para el fragmento Fc de Inmunoglobulina (FcR).

2.2.1 Clasificación de los FcR desde el punto de vista funcional.

Los anticuerpos, producidos durante la respuesta inmune contra microorganismos invasores constituyen un importante mecanismo inflamatorio de defensa. Estas moléculas forman complejos inmunes cuando se unen a antígenos microbianos y juegan un rol preponderante como opsoninas y activadores de otras funciones efectoras celulares.

Como es ampliamente conocido, las inmunoglobulinas están formadas por dos cadenas pesadas y dos livianas. La porción amino terminal de la cadena pesada y liviana constituyen el sitio de unión al antígeno determinado la especificidad del anticuerpo. El extremo C-terminal de las cadenas pesadas constituyen la porción Fc de la molécula que es la responsable de iniciar diversas respuestas celulares a través de la interacción con receptores específicos (FcR). Así, una gran variedad de respuestas mediadas por diferentes clases de anticuerpos depende, en parte, de su interacción con los FcR de cada tipo celular (Ravetch *et al*, 1997; Rosales *et al*, 1993).

Desde un punto de vista funcional, los FcR pueden dividirse en dos grandes grupos: aquellos que pueden mediar la activación celular y los que no pueden hacerlo.

Los FcR que median la activación celular comparten una secuencia homóloga con otros receptores implicados en la respuesta inmune como el receptor B (BCR) y el receptor T (TCR) denominada secuencia de activación de tirosinas de los receptores inmunes [*immune receptor tyrosine activation motif* (ITAM)] la cual está involucrada en el reclutamiento y activación de tirosina quinasas específicas una vez ocurrida la activación o *cross-linking* del receptor (Van den Herij-Oudijk *et al*, 1995).

Los FcRs con ITAMs pueden subdividirse en dos grupos. El primer grupo representa a la mayoría de los FcRs. Se trata de receptores multiméricos que constan de una subunidad α y una o

dos subunidades accesorias. La subunidad α , determinaría la especificidad de isotipo y la afinidad de estos receptores. Las subunidades accesorias, situadas en los dominios intracitoplasmáticos donde se ubican las secuencias ITAMs, determinarían tanto las propiedades de señalización y el ensamblado del receptor ante un estímulo dado (Ravetch *et al.*, 1994). Dentro de este grupo encontramos a Fc γ RI y Fc γ RIIA, Fc ϵ RI (receptor para Fc de IgE tipo I) y Fc α R (receptor para Fc de IgA)

El segundo grupo, comprende a Fc γ RIIA y Fc γ RIIC, ambos Fc γ R de cadena única, que poseen una secuencia ITAM única (Ver Tabla 2.1 y Figura 2.2)

Por otra parte, los FcR que no pueden dar lugar a la activación celular, también pueden dividirse en dos categorías. Dentro de la primera, se encuentra los Fc γ IIB, pertenientes a la familia de Fc γ R de cadena única. Estos FcR poseen en su dominio intracitoplasmático una secuencia de aminoácidos, considerada *necesaria y suficiente* para inhibir la activación celular mediada por los FcR con ITAMs. La misma ha sido designada como secuencia inhibitoria de los receptores inmunes ITAMs [*immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif* (ITIM)].

En la segunda categoría, se encuentran los receptores incapaces tanto de desencadenar la activación celular como de ejercer su actividad inhibitoria sobre otros FcR. Dentro de esta categoría encontramos al receptor neonatal para IgG (FcRn). Finalmente el Fc γ RIIIB, es un receptor sin ITAM incapaz de dar lugar a la activación celular “*per se*” pero es susceptible de contribuir a la señalización celular por asociación con otros receptores (Ver Tabla 2.1).

Figura 2.2

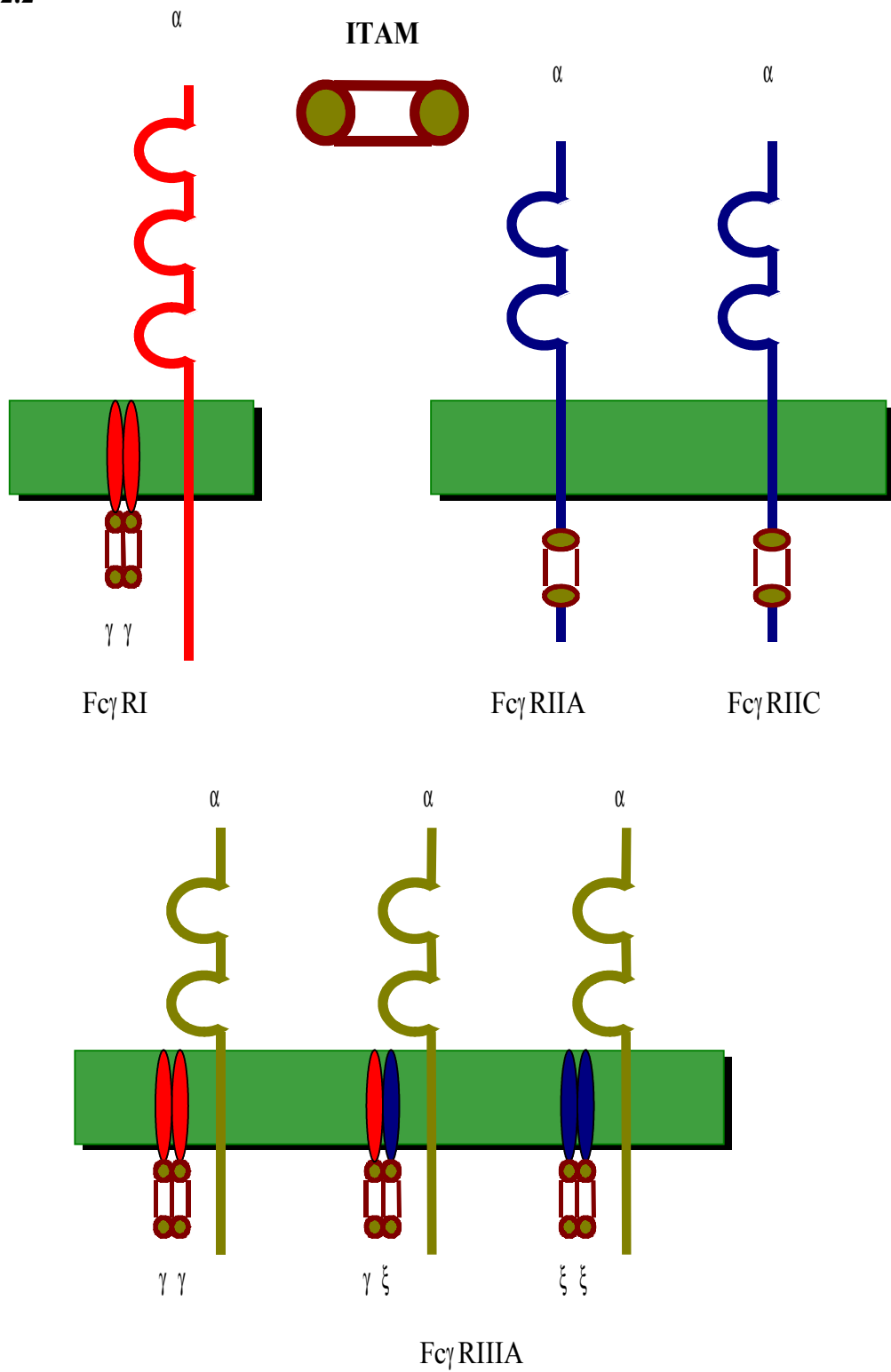


Figura 2.2. Estructura esquemática de los FcR con ITAMs. Los ovalos de distintos colores representan a las subunidades complementarias asociadas a las cadenas α .

Figura 2.3

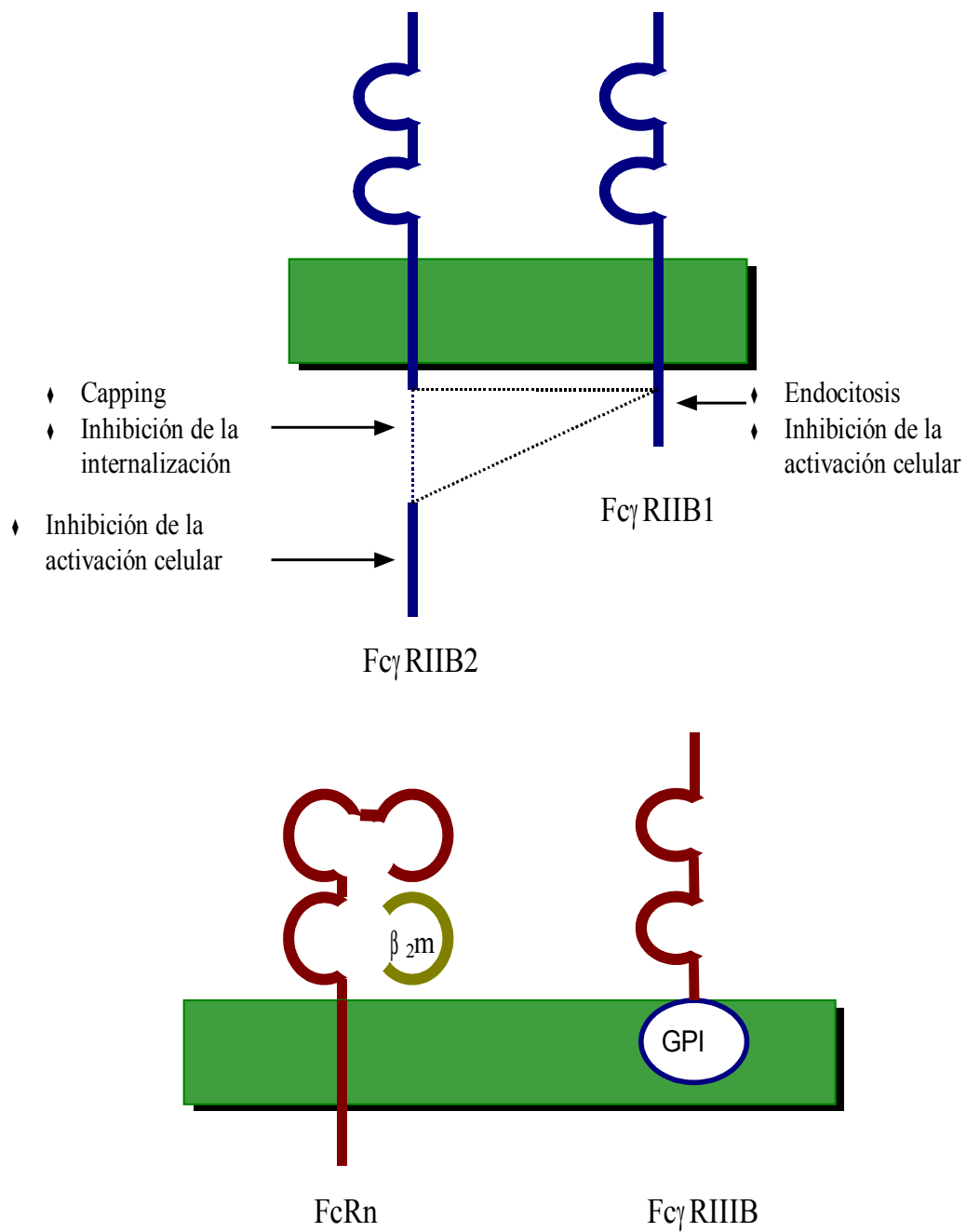


Figura 2.3. Estructura esquemática de los FcRs sin ITAMs. GPI= glicosil fosfatidil inositol. β_2m = β_2 microglobulina.

Tabla 2.1. Características de los distintos tipos de Fc γ R.

<i>Secuencia ITAM</i>	<i>Subunidades asociadas</i>	<i>Función</i>	<i>FcγR</i>
+ (dos)	γ	Activación celular	Fc γ RI
+ (dos)	$\alpha\gamma_2$, $\alpha\gamma\xi$, $\alpha\xi_2$	Activación celular	Fc γ RIIA
+ (única)	-	Activación celular	Fc γ RIIA
+ (única)	-	Activación celular	Fc γ RIIC
-	-	inhibición de la activación celular	Fc γ RIIB
-	-	Señalización celular por asociación con otros receptores	Fc γ RIIB
-	β_2 microglobulina	Protección de IgG monomérica	FcRn

2.2.2. Los FcR y su importancia biológica.

En términos generales, los FcR pueden clasificarse en dos grandes grupos: aquellos implicados en las funciones efectoras como los FcR para IgG (Fc γ RI, II y III), IgE (Fc ϵ R), IgA (Fc α R) y aquellos responsables del transporte de inmunoglobulinas a través de las superficies epiteliales, que incluyen al receptor de IgA multimérica (*poli IgA receptor*: pIgR) y el transportador de IgG de neonatos (FcRn) (Ravetch *et al*, 1997). Debido a que nuestros estudios se basan específicamente en los Fc γ Rs, haremos un estudio detallado de los mismos a lo largo de esta sección. Estos receptores constituyen moléculas capaces de mediar diversas funciones celulares de gran implicancia biológica tales como:

- i. **Depuración o clearance** de complejos inmunes (CI) (Michel *et al*, 1983; Finbloom *et al*, 1985).
- ii. **Activación del estallido respiratorio** mediado por complejos inmunes (Gresham, McGarr *et al*, 1988).

- iii. **Fagocitosis** (Gresham, Clement *et al*, 1986; Gresham, Mc Garr *et al*, 1988).
- iv. **Secreción de mediadores inflamatorios** como al ácido araquidónico (Pawloski *et al*, 1983), el factor de activación plaquetario (PAF), prostaglandinas (PG), tromboxanos (Tx) y lipoxigenasas (5-, 12- y 15-lipoxigenasas) generadoras de leucotrienos (LT), lipoxinas e hidroxiácidos (Powell *et al*, 1996; Larsen *et al*, 1983).
- v. **Secreción de citoquinas** como TNF- α (Haziot *et al*, 1993) IL-1 β (Malyak *et al*, 1994), el antagonista del receptor para IL-1 (Malyak *et al*, 1994), IL-8 (Cassatella *et al*, 1992), el factor transformador de crecimiento β 1 (TGF- β 1) (Fava *et al*, 1993) y las proteínas inflamatorias 1α y 1β de macrófagos (MIP- 1α y MIP- 1β) (Kasama *et al*, 1993).
- vi. **Citotoxicidad celular dependientes de anticuerpos** (ADCC) (Graziano *et al*, 1987; Karpovsky *et al*, 1984).
- vii. **Cooperación en funciones mediadas** por otros receptores para Fc de Ig o bien por otros receptores no relacionados con Igs (Ej. CD11b/CD18) (Daëron *et al*, 1997; Zhou *et al*, 1994).
- viii. **Inhibir funciones mediadas por FcR (cooperación negativa).**(Daëron *et al*, 1997).
- ix. **Ejercer un efecto protector sobre la IgG monomérica** (FcRp) (Junghans *et al*, 1996).

2.2.3. Receptores para el fragmento Fc de IgG (Fc γ R).

2.2.3.1. Estructura molecular y distribución.

El análisis de cDNAs y de los genes que codifican para los Fc γ R, indica que todos ellos derivan de un gen común ancestral y que pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas.

Estos receptores están compuestos por dominios extracitoplasmáticos (**EC**) de estructura tipo inmunoglobulina con homología entre sí y por regiones de transmembrana (**TM**) e intracitoplasmática (**IC**) que divergen estructuralmente (Unkeless *et al*, 1988; Ravetch *et al*, 1991; Fridman *et al*, 1992).

En humanos, al menos dos genes codifican para Fc γ RI, mientras que en el caso de Fc γ RII, se han encontrado tres genes distintos Fc γ RIIA, Fc γ RIIB y Fc γ RIIC que codifican al menos seis isoformas: Fc γ RIIA -HR y -LR; Fc γ RIIB -1, -2 y -3 y Fc γ RIIC (Unkeless *et al*, 1988; Ravetch *et al*, 1991). En neutrófilos sólo se expresan -IIA y -IIC. Finalmente, el Fc γ RIII está codificado por dos genes IIIA y IIIB. El producto génico de Fc γ RIIA es una molécula que posee un dominio TM, en tanto que Fc γ RIIB codifica para una proteína unida a la membrana citoplasmática a través de un enlace glicosil fosfatidil inositol (GPI) (Unkeless *et al*, 1988; Ravetch *et al*, 1991) que carece de dominios TM e IC.

Aunque se hayan distribuidos en un amplio rango de células, los Fc γ Rs poseen cierta especificidad de expresión (Ver Tabla 2.2). Así, Fc γ RI se expresa constitutivamente en monocitos, y macrófagos, mientras que Fc γ RII está expresado en la gran mayoría de las células hematopoyéticas. No obstante, las distintas isoformas de Fc γ RII, generadas por *splicing* del RNAm, se expresan en determinados tipos celulares. Por otra parte, el Fc γ RIIA tiene su expresión restringida a macrófagos, células NK y mastocitos. En tanto que el Fc γ RIIB se expresa en neutrófilos. Este tipo de distribución célula-específica de receptores con similar capacidad de unión a su ligando y con diversos dominios TM e IC, sugieren que las regiones intracelulares de dichos receptores contienen la mayoría de las estructuras que determinan las respuestas celulares como consecuencia de la activación mediada por complejos inmunes (Fridman *et al*, 1992).

Tabla 2.2. Expresión de los FcγR en células hematopoyéticas.

	Familia de FcγR							
	Mφ	Mono	Neut.	NK	B	T	Mast.	Basof.
FcγIR	+	+	+, i	-	-	-	-	-
FcγRIIA	+	+	+	-	-	-	-	-
FcγRIIB	+	+	-	-	-	-	?	?
FcγRIIC	+	+	+	-	-	-/? ^a	?	?
FcγRIIIA	+	+/i	-	+	-	+ ^b	?	?
FcγRIIIB	-	-	+	-	-	-	?	?

Los datos corresponden al RNA identificado con sondas específicas que discriminan los distintos tipos de receptores y los miembros homólogos de cada grupo particular.

^a Negativa es células T (Molt-4- Jurkat, Fro-2), no testado en sangre periférica.

^b Sólo expresado en el especies Tγ y linfocitos CD16/CD3 (+).

i= inducible.

2.2.3.2. Señales de activación celular inducidas por los FcγRs.

2.2.3.2.1. La señal intracelular inicial: La agregación de receptores.

Con el propósito de generar señales intracelulares conducentes a la activación del neutrófilo, es necesario que los FcγRs se agregen en la membrana plasmática por efecto de los complejos inmunes. Este proceso es considerado como el punto crítico del proceso de señalización, aún más crítico que la propia interacción del receptor con su ligando.(Daëron *et al*, 1997).

Si bien los procesos que llevan a la agregación de los FcγRs dependen de la afinidad por su ligando, la consecuencia final es la misma, las diferencias sólo residen en el orden secuencial de los eventos. Así, los FcγRs de alta afinidad interaccionarán con inmunoglobulinas monoméricas antes de que estas se acomplejen con antígenos multivalentes, mientras que los de

baja afinidad sólo lo harán con complejos inmunes o bien con inmunoglobulinas agregadas experimentalmente.

De estos datos se desprende que aún existiendo varias alternativas que llevan a la agregación de los receptores, la consecuencia final es única y las respuestas celulares generadas por cada receptor son igualmente eficaces (Daerön *et al*, 1997).

2.2.3.2.2. Señales de transducción intracelulares.

Un evento característico intracelular, posterior a la agregación de los receptores con ITAMs, es la fosforilación inmediata de los receptores. La fosforilación de las ITAMs correlaciona con la activación de diversos *sets* de proteínas quinasas citoplasmáticas. Como las quinasas de la familia *src* o *syk*. Estas familias de quinasas fosforilan diversos substratos intracelulares, que incluyen enzimas como las fosfolípido- quinasas, fosfolipasas, y proteínas asociadas al citoesqueleto. Como es de esperarse, el mecanismo de fosforilación de tirosinas inducido por los FcγR está modulado por fosfatasa citoplasmáticas y de transmembrana. La tirosina fosfatasa de transmembrana, CD45, regula positivamente la actividad de las quinasas *src* a través de la defosforilación del residuo de tirosina en la zona regulatoria del dominio de quinasas (Thomas *et al*, 1994). Por otra parte, diversos experimentos han demostrado que la agregación de las subunidades proteicas portadoras de ITAMs es suficiente para generar la activación celular a través del reclutamiento de proteínas quinasas y que dicha agregación resulta ser esencial para contactar enzimas críticas con sus respectivos substratos.

El ligamiento de los FcγR con ITAMs tales como FcγRI, FcγRII (Van de Winkel *et al*, 1990), FcγRIIIA (Cassatella *et al*, 1989; Portnoy *et al*, 1986), involucra el incremento la activación de la quinasa *syk* que induce la activación de la fosfolipasa C, la cual genera

metabolitos que activan la proteína quinasa C y el ciclo de los inosítidos fosfato (PI) que conduce a la movilización del Ca^{2+} intracelular.

El mecanismo inicial por el cual se incrementa la concentración de Ca^{2+} libre intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) (Rosales *et al*, 1992), involucra principalmente a un producto del clivaje de los fosfoinosítidos (PI), el inositol-(1,4,5) trifosfato (IP_3) (Mathews *et al*, 1989). IP_3 desencadena la movilización de Ca^{2+} intracelular al unirse a los receptores para IP_3 situados en el retículo endoplasmático y también parece estimular influjos de Ca^{2+} extracelular.

La activación celular también resulta en la apertura de canales iónicos de alta conductancia. Esto constituye un segundo sitio de entrada de Ca^{2+} cuya activación es mediada por proteínas G sensibles a la toxina colérica que ocurre en forma independiente de la hidrólisis de PI (Daëron *et al*, 1997)

También, la activación de los $\text{Fc}\gamma\text{Rs}$ induce la activación de la PLA_2 generando ácido araquidónico, que constituye un intermediario de la síntesis de prostaglandinas y leucotrienos (Parker *et al*, 1987) su activación parecería estar mediada por una Proteína G. La Fosfolipasa D es activada para sintetizar ácido fosfatídico, el cual es convertido posteriormente en diacilglicerol (DAG). Por otra parte el DAG activaría a la Proteína Kinasa C (PKC), por lo que dicha proteína se translocaría a la membrana citoplasmática para activar el sistema NADPH oxidasa.

Con respecto a los FcR sin ITAMs, la bibliografía indica que el $\text{Fc}\gamma\text{RIIIB}$ puede dar lugar a la movilización de Ca^{2+} intracelular cuando se encuentra agregado por antígenos multivalentes en la superficie de los neutrófilos (Unkeless, Shen *et al*, 1995). Por otra parte, algunos autores han reportado que el $\text{Fc}\gamma\text{RIIIB}$ es también capaz de inducir la movilización de Ca^{2+} a pesar de carecer de dominios TM e IC (Kimberly *et al*, 1990).

2.2.3.3. Funciones celulares de neutrófilos mediadas por los $Fc\gamma R$ s con ITAMs.

Son numerosos los mecanismos a través de los cuales los neutrófilos median efectos microbiostáticos y/o microbicidas. Los de mayor relevancia biológica son descritos a continuación, en forma resumida.

2.2.3.3.1. Fagocitosis.

La fagocitosis, descrita por Metchnikoff en el siglo pasado (Metchnikoff 1905), es un proceso utilizado por los neutrófilos para ingerir y eliminar grandes partículas ($>0.5 \mu\text{m}$.), entre las que se encuentran agentes infecciosos, desechos celulares y células senescentes. Al arribar al foco inflamatorio, estas células reconocen al microorganismo invasor, se adhieren a él y lo internalizan (Verhoef *et al*, 1993).

La internalización de las partículas es iniciada por la interacción de los receptores específicos en la membrana del fagocito con los ligandos en la superficie de la partícula. Ello conduce a la polimerización de actina en la zona subyacente al punto de ingestión y la posterior **internalización de la partícula**. En este proceso, la partícula es rodeada y finalmente envuelta, generándose una estructura denominada **fagosoma primario** o **vesícula fagocítica**. Posteriormente, la partícula fagocitada queda expuesta a un conjunto de sistemas microbicidas dependientes de la producción de especies oxidantes derivadas del oxígeno o bien a la acción de diversas enzimas hidrolíticas, culminando en la formación del **fagolisosoma** (Verhoef *et al*, 1993).

La eficiencia de este proceso, depende de los factores séricos que se unen a los microorganismos y de los receptores para dichas moléculas expresados en los fagocitos. Estos factores incluyen a las IgG e IgM y a los factores C3b y C3bi del complemento que reciben,

colectivamente, el nombre de **opsoninas** (Verhoef *et al*, 1993). Estas moléculas facilitan el reconocimiento de los microorganismos por parte de los fagocitos, a través de su interacción con receptores para la IgG, IgM, y los receptores para los componentes C3b y C3bi: CR1 (CD35) y CR3 (CD11b/CD18) respectivamente. Recientes estudios también han destacado la significancia de otros receptores fagocíticos adicionales, en particular el receptor de fibronectina y otras integrinas (Lee-Amm *et al*, 1996; Blstone *et al*, 1994).

Las interacciones establecidas entre C3b y/o C3bi y sus receptores promueven la adhesión del agente invasor al fagocito pero no su ingestión, en tanto que la interacción de la IgG sensibilizante con el Fc γ R, induce tanto la adhesión como su ingestión (Metzger *et al*, 1987). Así, la presencia de ambos tipos de receptores en los fagocitos, permite a las opsoninas actuar en forma cooperativa. De este modo, la presencia de C3b o C3bi sobre un microorganismo ha demostrado disminuir, marcadamente, la cantidad de anticuerpos IgG requerida para inducir su ingestión.

Es importante señalar que los sistemas microbicidas dependiente o no del oxígeno pueden actuar en forma extracelular en ciertas circunstancias:

i.- cuando el tamaño de la partícula reconocida es excesivamente grande o bien se haya inmovilizado, la interacción del fagocito con dicho estímulo, induce la liberación de especies tóxicas al medio extracelular.

ii .- cuando el fagocito es activado por estímulos solubles, tales como complejos inmunes, péptidos quimiotácticos, citoquinas o productos derivados de la activación del sistema complemento.

2.2.3.3.2. Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC).

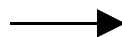
Se trata de una función que se activa a través de la interacción entre los anticuerpos que recubren a la célula blanco o *target* y los Fc γ Rs de las células efectoras (Isturiz *et al*, 1990). Una vez dada tal interacción hay citólisis extracelular.

Son numerosas las evidencias que sugieren que la ADCC juega un papel importante en la inmunidad antitumoral, antiviral y en el rechazo a órganos transplantados (Nathan *et al*, 1982; Key *et al*, 1983). Una particularidad de dicha función reside en que la célula efectora no presenta restricciones en cuanto a antígenos de histocompatibilidad. Así, es capaz de operar contra células blanco singeneicas, alogeneicas o xenogeneicas (Isturiz *et al*, 1990). Además, su actividad máxima se desarrolla a concentraciones muy bajas de anticuerpo. La concentración de anticuerpos sensibilizantes es de 100 a 1000 veces menor que la necesaria para inducir la lisis por complemento.

En la mayor parte de los casos, el anticuerpo que participa en la ADCC es de la clase IgG, por lo que los receptores que intervienen en dicha función son los Fc γ R. Existe evidencia que indica que el Fc γ RIIIB de los neutrófilos no es capaz de mediar la ADCC (Fanger *et al*, 1989). Por otra parte, parecería ser que el Fc γ RII tampoco es capaz de activar este sistema citolítico en el neutrófilo. No obstante, se ha descrito que el tratamiento de monocitos con IFN γ induce un incremento de la muerte de hibridomas vía Fc γ RI y Fc γ RII. Así, queda por elucidar si las diferencias funcionales del Fc γ RII residen en los en diversos dominios citoplasmáticos de diferentes tipos celulares.

2.2.3.3. Sistemas microbicidas dependientes del oxígeno. La producción de reactivos intermediarios del oxígeno.

Ante la activación de los fagocitos por diversos estímulos, se genera un grupo complejo de agentes químicos altamente reactivos que destruyen a los microorganismos



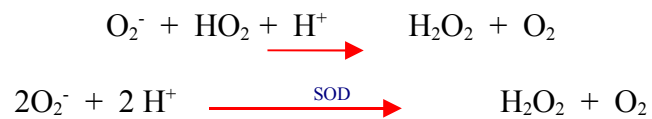
invasores a través de un proceso de oxidación inespecífico (Babior *et al*, 1992). Estos agentes químicos, cumplen un papel importante tanto en la destrucción de microorganismos como en la generación de lesiones tisulares asociadas a manifestaciones inflamatorias de diferente etiología. Dichos agentes, incluyen halógenos oxidados, radicales oxidantes y oxígeno singlete. En forma concomitante a la producción de dichos agentes, se opera un aumento drástico del consumo de oxígeno (de hasta 50 veces), de la producción de anión superóxido (O_2^-) y H_2O_2 y el incremento de la oxidación de la glucosa por la vía de *las hexosas monofosfato* (Babior *et al*, 1984; Babior *et al*, 1992). Este proceso es denominado “*estallido respiratorio*” y la regulación de dicho proceso es sumamente importante ya a que debe ser restringido a los límites de la vacuola fagocítica, y actuar en forma breve cuando los microorganismos son ingeridos (Segal *et al*, 1996)

El estallido respiratorio resulta de la activación de la enzima NADPH oxidasa, que cataliza la reducción del oxígeno a O_2^- a expensas de NADPH:

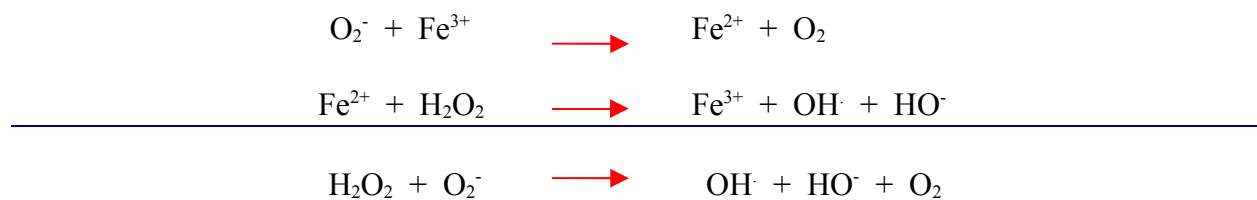


La enzima NADPH oxidasa, es un complejo enzimático que consta esencialmente de un componente asociado a la membrana celular, el citocromo b_{558} y dos componentes citoplasmáticos, $p67^{phox}$ y $p47^{phox}$. El citocromo b_{558} consiste en dos subunidades, $p21^{phox}$ (o subunidad α) y la $gp91^{phox}$ (o subunidad β) que presenta sitios de unión para FAD y NADPH. La activación de la NADPH oxidasa involucra la fosforilación de $p47-phox$ y su translocación, junto con $p67-phox$, a la membrana plasmática, donde se ensambla con el citocromo b_{558} y una proteína G monomérica adicional, denominada Rac (Segal *et al*, 1996; Bastian *et al*, 1994).

El anión superóxido es capaz de reaccionar con un amplia variedad de sustratos biológicos. No obstante, debido a su escaso potencial oxidante, y a la velocidad y eficiencia con la cual dos moléculas de anión superóxido interactúan para formar peróxido de hidrógeno (Klebanoff *et al*, 1975), este metabolito no cumpliría por si mismo un papel crítico en las respuestas citotóxicas desarrolladas hacia microorganismos. El superóxido producido es subsecuentemente convertido a H₂O₂ ya sea en forma espontanea o a través de enzima superóxido dismutasa (SOD):



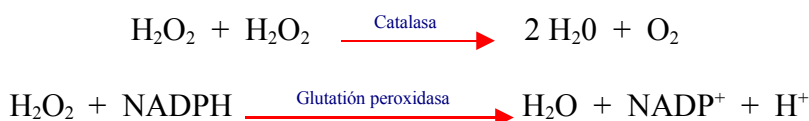
Por otra parte, los fagocitos son capaces de incrementar la potencialidad tóxica del O₂⁻ y el H₂O₂ a través de un mecanismo alternativo, consistente en la producción de un oxidante extremadamente reactivo y destructivo, el radical hidroxilo (OH·). Este se origina por la interacción de O₂⁻ y H₂O₂ en una reacción catalizada por Fe³⁺ (reacción de Haber-Weiss) (Rosen *et al*, 1995)



El papel del OH· en los mecanismos citotóxicos mediados por fagocitos no ha sido definido con precisión. Este metabolito es capaz de reaccionar rápidamente con

una amplia variedad de enlaces químicos, causando daño en regiones próximas a su sitio de producción (Rosen *et al*, 1995)

Por otra parte, concentraciones altas de H_2O_2 ($>0.5\mu\text{M}$) ejercen efectos antimicrobianos. Algunos microorganismos son más sensibles que otros y esta susceptibilidad podría estar supeditada en parte a la capacidad de degradarlo (por su contenido en catalasa o peroxidasa) según



Otro mecanismo fisiológico a través del cual la potencialidad microbicida del H_2O_2 puede ser incrementada de manera significativa involucra la acción de peroxidasas, en particular la mieloperoxidasa (MPO). Esta enzima se encuentra en concentración elevadas en los gránulos primarios azurófilos de los neutrófilos (constituye el 5% de su peso seco) y pasa a los fagosomas durante la fusión de estas dos estructuras. La MPO, junto con el H_2O_2 producido durante la fagocitosis y un cofactor oxidante como el haluro o el tiocianato, forman halógenos oxidantes muy efectivos contra bacterias, hongos, virus, micoplasmas y células tumorales.



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

Los leucocitos concentran yoduro, tiroxina y triyodotironina, y en la infecciones bacterianas la tasa de reciclaje de estos dos últimos se acelera. La combinación de MPO, el haluro y el H_2O_2 es muy eficaz en la destrucción bacteriana. Este sistema actúa mediante la halogenación de las paredes bacterianas, la oxidación de distintos integrantes de los microorganismos y la decarboxilación de los aminoácidos de las paredes bacterianas

conducentes al incremento de la permeabilidad celular, la oxidación de componentes de la cadena respiratoria bacteriana (Albrich *et al*, 1986), peroxidación de membranas (Rakita *et al*, 1989).y la generación de otros intermediarios sumamente potentes, las cloraminas.



Se ha postulado también que los fagocitos son capaces de producir una especie sumamente agresiva denominada oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$). Sin embargo, hasta el momento, la evidencia obtenida no es concluyente con respecto al papel del $^1\text{O}_2$ en la actividad citotóxica mediada por fagocitos (Flohé *et al*, 1985).

2.2.3.3.4. Sistemas microbicidas independientes del oxígeno.

Los fagocitos, además de poseer sistemas citotóxicos dependientes del O_2 , cuentan con sistemas microbicidas que actúan en forma independiente del O_2 . En los neutrófilos, existen proteínas granulares cargadas de agentes antimicrobianos. Los gránulos han sido reconocidos como lugar de reposición de las proteínas antimicrobianas y también como vehículos para la liberación de su propio contenido ya sea dentro de los fagosomas en el proceso de la fagocitosis, o al medio extracelular, en el caso de estímulos solubles o estímulos particulados no fagocitables (Elsbach *et al*, 1988). Estos agentes incluyen proteasas, fosfolipasas, glucosidasas, lisozimas y otras proteínas y péptidos que rompen las funciones o estructuras microbianas. Es muy probable que todos estos agentes se unan a la superficie celular microbiana para ejercer su actividad citotóxica (Verhoef *et al*, 1993).

2.2.3.3.4.1. Gránulos y vesículas secretorias.

En los últimos años se han caracterizado distintos tipos de gránulos intracitoplasmáticos, tales como los gránulos de **gelatinasa**, los **específicos** y los **azurófilos** (Borregaard *et al*, 1993). Por otra parte, existen **vesículas secretorias**, que representan una forma especializada de vesícula endocítica que contienen en su matriz proteínas plasmáticas no sintetizadas por la célula.

Los gránulos se definen tanto por su contenido interno (matriz) como por su membrana. Así, es posible encontrar gránulos con similar composición de membrana y diferente contenido interno o viceversa. Ello depende del mecanismo que regula la síntesis y el tráfico de las proteínas destinadas a la matriz o a la membrana.

La Tabla 2.3 indica el contenido de las tres especies de gránulos así como también de las vesículas secretorias.

Tabla 2. 3 Contenido de los gránulos y vesículas secretorias de los neutrófilos humanos.

<i>Gránulos azurófilos</i>	<i>Gránulos específicos</i>	<i>Gránulos de gelatinasa</i>	<i>Vesículas secretorias</i>
MEMBRANA	MEMBRANA	MEMBRANA	MEMBRANA
CD 63	CD 15	Mac 1(CD11b)	Fosfatasa alcalina
CD 68	CD 66	FMLP-R	Citocromo b ₅₅₈
MATRIZ	CD 67	øEnz. DeacilanteDAG	Mac-1 (CD11b)
ác. β-glicerofosfato	Citocromo b ₅₅₈	MATRIZ	#Activ. Uroplasm.
ác.mucopolisacárido	FMLP-R	Gelatinasa	FMLP-R
α-antitripsina	Fibronectina	Acetiltransferasa	CD10,CD13,CD45
α- manosidasa	Proteína Gα		FcγRIII
Azurocidin	Laminina		CR1
β-glicerofosfato	Mac-1 (CD11b)		MATRIZ
* PPIP	TNF-R		Prot. Plasmáticas
β-glucoronidasa	Vitronectina- R		
Catepsina	Proteína 19kD		
Defensina	Proteína 155kD		
Elastasa	MATRIZ		
Lisozyrna	β-microglobulina		
Mieloperoxidasa	Colagenasa		
Sialidasa	Gelatinasa		

Proteinasa 3	Histaminasa		
	Lactoferrina		
	Lisozima		
	Prot.Unión a Vit B ₁₂		
	♣Activ.Plasminógen		

∅ Enzima deacilante de Diacilglicerol

Activador Uroplasminógeno

* Proteína que incrementa la permeabilidad bactericida

♣Activador de Plasminógeno

Se han detectado diferencias en la movilización de los distintos tipos de gránulos. Parecería ser que los más densos son los menos movilizados (Sengeløv *et al*, 1993; Lew *et al*, 1993). No se sabe a ciencia cierta, si existe alguna conexión de tipo mecánica entre la densidad de cada gránulo en particular y su grado de movilización. Pero lo cierto es que, tanto los gránulos como las vesículas secretorias, están adosados al sistema de microtúbulos y dado un estímulo, todos ellos se hayan expuestos a la misma fuerza mecánica de este sistema. Así, cuanto más liviana sea la organela, se movilizará con mayor velocidad. Sin embargo, es posible que moléculas específicas tales como proteínas o fosfolípidos situados en la membrana de las diferentes especies de gránulos medien el control selectivo de su exocitosis.

2.2.3.3.4.2. *Vesículas secretorias.*

Las vesículas secretorias son estructuras intracelulares que se caracterizan por ser livianas y tener alta movilidad. Debido a esta propiedad, dichas vesículas dan cuenta de la *up regulation* de proteínas en la membrana celular (Mac-1, CR1 ó FMLP-R entre otros) en respuesta al estímulo de mediadores inflamatorios, todos ellos incapaces de mediar

“*per se*” la exocitosis de otros tipos gránulos (Borregard *et al*, 1987). Por otra parte debido a su cinética de movilización, es muy probable, que dichas vesículas contengan Fc γ RIII (Tosi *et al*, 1992).

Algunos autores han demostrado que las vesículas secretorias contienen proteínas plasmáticas y por ende son vesículas endocíticas por naturaleza. No obstante, no se conoce el mecanismo por el cual dichas proteínas se incorporan a la membrana de estas vesículas. Se ha mencionado la posibilidad de que dichas proteínas se incorporen durante el proceso de endocitosis o sean transportadas desde el Golgi directamente a las vesículas previamente endocitadas (Borregaard *et al*, 1993) quedando retenidas por la célula sólo hasta el momento de su estimulación.

Finalmente, la extremada sensibilidad con la cual el neutrófilo responde a los estímulos proinflamatorios, a través de la movilización de las vesículas (conduciendo a la *up regulation* de diversas proteínas en la membrana celular), indicaría que dichas estructuras juegan un rol primario en la regulación de los neutrófilos con el endotelio (Borregaard *et al*, 1993; Sengeløv *et al*, 1993).

2.2.3.3.4.3. Gránulos de gelatinasa.

Estos gránulos se caracterizan por su alto contenido en gelatinasa. La estimulación de los neutrófilos con concentraciones nanomolares de mediadores inflamatorios como FMLP, LTB₄, PAF, TNF- α . GM-CSF, IL-8 resulta en la liberación del 15-25% del contenido celular total de gelatinasa. Así, sólo una pequeña fracción de los gránulos de gelatinasa se moviliza en respuesta a un estímulo inflamatorio el cual es susceptible de inducir la liberación de la totalidad de las las vesículas secretorias (Borregaard *et al*, 1987). La significación de la

movilización de dichos gránulos durante la estimulación celular, no se basa específicamente en su aporte de proteínas de membrana, pero si por la liberación de gelatinasa que se haya en muy alta concentración.

2.2.3.3.4.4. Gránulos específicos.

Estos gránulos están definidos por su contenido en lactoferrina en su matriz y constituyen un reservorio importante de citocromo b_{558} , del complejo NADPH oxidasa (Borregaard *et al*, 1984). Se ha mencionado, que la enzima NADPH oxidasa puede ser directamente activada en los gránulos cuando los neutrófilos son estimulados con ionóforos de Ca^{2+} (Rotrosen *et al*, 1992). No obstante, no se ha dilucidado si ello ocurre durante el proceso de fagocitosis.

Otros receptores importantes que están presentes en los gránulos específicos son los receptores para laminina, TNF ó FMLP. Sin embargo, no existe evidencia acerca de la funcionalidad de dichos receptores. Si bien existen datos que indican sobre la existencia de una Proteína G asociada a la membrana de estos gránulos, no se encontraron moléculas de transducción secundaria tales como Fosfolipasa C ó D (Rotrosen *et al*, 1988).

2.2.3.3.4.5. Gránulos azurófilos.

Los gránulos azurófilos constituyen el reservorio de la mayor parte de enzimas proteolíticas y bactericidas (Tabla 2.3). Se caracterizan por moverse lentamente y en muy poca cantidad. Ello obedecería a que su función principal es ejecutada luego de la desintegración del neutrófilo.

2.2.3.3.4.6. Actividad de las moléculas relevantes de los gránulos.

Las proteasas de mayor relevancia incluyen a la catepsina G, a la elastasa, la colagenasa y la gelatinasa (Ganz *et al*, 1988; Henson *et al*, 1988; Weiss *et al*, 1986)

La **catepsina**, es una proteasa neutra presente en los gránulos azurófilos de los PMN. Existen 4 isoenzimas con similar actividad bactericida con especificidad hidrolítica semejante a la quimotripsina. Su actividad microbicida es estable a altas temperaturas (>90°C -100°C) ejerciendo su efecto al inhibir el consumo de oxígeno en las bacterias, la síntesis proteica y la síntesis de RNA/DNA.(Olsson *et al*, 1980)

La **elastasa** es una proteasa de serina que se encuentra en altas concentraciones en los gránulos azurófilos de los neutrófilos. Esta enzima posee diversos sustratos como el colágeno tipo III y IV, inmunoglobulinas, componentes del complemento, proteoglicanos, fibronectinas e incluso células intactas. Además, contribuye a la degradación de los microorganismos fagocitados, y sería importante para la locomoción de los neutrófilos, dado que al degradar componentes de la matriz extracelular facilitaría la penetración de los mismos en los tejidos (Henson *et al*, 1988).

Tanto la **colagenasa** como la **gelatinasa** son capaces de degradar la matriz extracelular. La colagenasa cliva colágeno de tipo I, II y III. En tanto que la gelatinasa, cliva el colágeno de tipo V, XI y posiblemente el IV. Ambas enzimas,son sintetizadas y liberadas en forma inactiva. Sin embargo, se ha demostrado que los neutrófilos pueden activar su propia colagenasa inactiva utilizando radicales libres tales como el HClO (Weiss *et al*, 1986)

La **lisozima** es una enzima catiónica presente en altas concentraciones en los gránulos azurófilos y específicos de los neutrófilos y también en macrófagos. Ejerce sus propiedades bacteriolíticas al hidrolizar uniones β 1-4 glucosídicas de los mucopéptidos de la pared celular bacteriana (Ganz *et al*, 1988). Por su parte, la **lactoferrina** media un efecto

bacteriostático al fijar y retener hierro, necesario para el metabolismo normal de bacterias tanto gram- negativas como positivas (Ganz *et al*, 1988).

Por otra parte se encuentran proteínas tales como la **BPI** de Neutrófilos (proteína bactericida incrementadora de la permeabilidad). Se trata de una proteína de los gránulos azurófilos que contribuye a eliminar bacterias Gram-negativas, debido a un incremento de la permeabilidad de la membrana externa de la bacteria a moléculas hidrofóbicas y a la activación de enzimas capaces de degradar peptidoglicanos y fosfolípidos de las membrana externa. Presentan también **defensinas**, péptidos moderadamente catiónicos, abundantes en los gránulos azurófilos de los neutrófilos, los que actúan induciendo alteraciones en la integridad de las membranas de bacterias, hongos y ciertos virus envueltos

2.2.3.3.5. Producción de mediadores lipídicos de inflamación.

La activación de células fagocíticas conduce también a la liberación de mediadores lipídicos de inflamación, tales como los eicosanoides y el factor de activación plaquetaria (PAF), quienes contribuyen al desarrollo de la respuesta inflamatoria (Sturn *et al*, 1989; Speziale *et al*, 1995). Estas moléculas son sintetizadas *de novo* a expensas de la activación del metabolismo fosfolipídico (Beutler *et al*, 1995) Estos mediadores afectan la fisiología de los componentes celulares de células endoteliales, células musculares lisas, leucocitos y plaquetas.

La producción de los eicosanoides reside, básicamente, en la liberación de ácido araquidónico por acción de la fosfolipasa A₂. La metabolización posterior del ácido araquidónico transcurre, a través de la acción de dos diferentes clases de enzimas: la ciclooxigenasa, generadora de prostaglandinas y tromboxanos y las lipoxigenasas (5-, 12- y 15-lipoxigenasas) generadoras de leucotrienos, lipoxinas e hidroxiácidos.

Uno de los productos de la 5-lipoxigenasa, es el LTB₄ (Ford-Hutchinson *et al*, 1980), el cual constituye un mediador endógeno de la activación leucocitaria. Se trata de un potente inductor de la quimiotaxis, quimioquinesis (migración no dirigida), agregación celular y liberación de enzimas lisosomales por parte de los neutrófilos. La 15-lipoxigenasa, presente en neutrófilos y monocitos, da origen a dos potentes inhibidores de la actividad NK (Ramstedt *et al*, 1985) conocidos como lipoxinas A y B. La lipoxina A es capaz, también, de estimular la degranulación y el estallido respiratorio en neutrófilos (Palmer *et al*, 1980).

El PAF (1-*o*-alquil-2-acetil-*sn*-glicero-3-fosfolina) es un mediador inflamatorio de naturaleza lipídica, (Pinkard *et al*, 1988) que deriva de la activación de la fosfolipasa A₂. El PAF contribuye a la inflamación causando degranulación y agregación plaquetaria, estimulando la adherencia, quimiotaxis, agregación y degranulación leucocitaria, la contracción del músculo liso e incrementando la permeabilidad vascular.

2.2.3.3.6. Producción de citoquinas.

La producción de citoquinas por parte de los neutrófilos juega un papel relevante en el desarrollo de ciertas respuestas inflamatorias. Diferentes grupos han demostrado la capacidad de los neutrófilos de producir TNF- α (Loyd *et al*, 1992), IL-1 β (Malyak *et al*, 1994), el antagonista del receptor para IL-1 (Malyak *et al*, 1994), IL-8 (Fujishima *et al*, 1994), el factor transformador de crecimiento β 1 (Grotendorst *et al*, 1989) y las proteínas inflamatorias 1 α y 1 β de macrófagos (Kasama Malyak *et al*, 1994, 1993). Si bien es evidente, desde el punto de vista cuantitativo, que la producción de citoquinas por célula es menor en los neutrófilos que en los monocitos, debe recordarse que en los fenómenos inflamatorios agudos los neutrófilos constituyen el tipo celular preponderante, por lo tanto, podrían actuar como una fuente importante de citoquinas.

La producción de IL-8 y las proteínas inflamatorias 1α (MIP- 1α) y 1β (MIP- 1β) de macrófagos podría jugar un papel importante en el reclutamiento de leucocitos en el foco inflamatorio. Mientras que la IL-8 actúa como agente quimiotáctico para los neutrófilos (Oppenheim *et al*, 1991), las MIP- 1α y MIP- 1β presentan una potente actividad quimioattractante para monocitos y ciertas subpoblaciones de linfocitos T (Taub *et al*, 1993). Estas últimas dos citoquinas participarían en la inducción del *switch* en el tipo de infiltrado leucocitario, observado durante la evolución de una respuesta inflamatoria, desde un estadio agudo a un estadio crónico.

Se ha sido sugerido, que la secreción de citoquinas por parte de neutrófilos podría influenciar la dirección y evolución de la respuesta inmunológica adaptativa, particularmente en la inducción de respuestas de tipo Th1 o Th2 (Malyak *et al*, 1994).

2.2.3.4. Funciones celulares de neutrófilos mediadas por los Fc γ Rs sin ITAMs.

En el caso particular de Fc γ RIIB, (Ver Fig 2.3), cuando es agregado por ligandos multivalentes, podría mediar los procesos de *capping*, endocitosis y fagocitosis. Por otra parte Fc γ RIIB puede dar lugar a la movilización de Ca²⁺ intracelular y al estallido respiratorio, cuando están agregados en la superficie del neutrófilo.

2.2.3.4.1. Cooperación negativa entre distintos receptores. Inhibición de la activación de funciones mediadas por FcR con ITAMs por Fc γ RIIB.

Diversos estudios han descrito la cooperación negativa entre Fc γ RIIB y el receptor para células B (BCR). Se ha establecido, que la secuencia altamente conservada de los 13 aminoácidos en la cola citoplasmática del Fc γ RIIB (Muta *et al*, 1994) es necesaria y suficiente para

mediar la inhibición de la activación de células B por el BCR. Dicha secuencia es aquella referida en la sección **2.2.1** como ITIM.

Este fenómeno inhibitorio, se manifiesta en aquellos casos donde la secuencia ITIM interacciona con un receptor activado. El mecanismo de inhibición requiere la presencia de tirosinas quinasas activadas (asociadas al FcR con ITAMs) para fosforilar la secuencia de 13 aminoácidos. Se ha observado en un modelo murino que la alteración del Fc γ RIIB, resulta en un fenotipo con elevada cantidad anticuerpos séricos en respuesta a un desafío antigénico y un aumento de la anafilaxis mediada por IgG. Ello demuestra que este receptor es necesario para la inhibición por retroalimentación o *feedback* de la síntesis de anticuerpos así como también para regular la reactividad a complejos inmunes IgG de los mastocitos (Takai *et al*, 1996).

Se ha observado que la coagregación del BCR (Fc con ITAM) con Fc γ RIIB (Fc con ITIM), no afecta el incremento inicial de la concentración de Ca²⁺ intracelular, que resulta de la movilización del calcio intracelular. Sin embargo, no se detectan influjos de Ca²⁺ extracelular posteriores. Por otra parte, se ha observado la fosforilación de substratos intracelulares así como también la fosforilación del BCR y de las proteínas kinasas *syk* no resulta afectada durante el proceso de coagregación (Daëron *et al*, 1997).

2.2.3.4.2. Cooperación positiva entre distintos tipos de receptores.

Algunos estudios han indicado que el Fc γ RIIB es competente para generar señales de transmembrana y funciones efectoras. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que dicho receptor carece de tanto TM como IC, ambos, necesarios para mediar los procesos de señalización convencionales. Sin embargo, la asociación física de estas moléculas con proteínas de transmembrana constituye un mecanismo anexo de señalización. Tal es el caso de Fc γ RIIA y

Fc γ RIIIB, donde se ha descrito que ambos receptores actúan sinérgicamente durante la activación celular. Ello sugeriría que al activarse el Fc γ RIIIB, este generaría señales intracelulares utilizando el sistema de transducción del Fc γ RIIA (Unkeless, Shen *et al*, 1995).

Por otra parte, se ha descrito que los receptores del complemento ejercen un rol directo sobre la transducción de señales de algunas funciones mediadas por los Fc γ Rs. Así, el Fc γ RIIIB interactúa sinérgicamente con CR3 (CD11b/CD18) y con una β_2 -integrina, durante la fagocitosis. Los datos experimentales indicarían que la integrina interacciona con el Fc γ RIIIB al nivel de los dominios EC (Petty *et al*, 1996). Se ha postulado que la unión entre ambos receptores es de tipo lectina debido a que dicha interacción es inhibible por N-acetil D-glucosamina (Shegal *et al*, 1993).

Estudios adicionales han sugerido que CR3 y Fc γ RIIIB actúan cooperativamente con Fc γ RII tanto en el estallido respiratorio como en los procesos de señalización en los que está involucrada la fosforilación de tirosinas. Los datos obtenidos indican que el ligamiento del CR3 es capaz de inducir la asociación del Fc γ RII con el citoesqueleto, pero que la fosforilación de dicho receptor solo es posible cuando Fc γ RIIIB y CR3 se hallan ligados (Zhou *et al*, 1994).

2.2.3.4.3. Rol Protectorio de la IgG monomérica por FcRn.

Se ha propuesto que la larga vida media de la IgG₁ resulta de su reciclado por parte de un receptor protectorio (FcRn) situado en la superficie de las células epiteliales. La saturación de dicho receptor resultaría en la disminución de la vida media de la IgG con el incremento concomitante de la concentración de anticuerpos. Además de expresarse en placenta y

en el intestino del neonato, el FcRn se expresa ampliamente en las células epiteliales. Se trata de heterodímeros compuestos por una subunidad α relacionada con la cadena pesada MHC de clase I y una cadena β_2 microglobulina. La K_a para IgG monomérica del FcRn oscila entre $2-5 \times 10^{-7}$ M a pH 6.0, la cual decrece en dos ordenes de magnitud cuando el pH se eleva a 7.0. Este cambio de afinidades le permite al FcRn unir IgG materna a pH ácido de la leche ingerida por el bebé, y liberar la IgG a pH neutro en el torrente circulatorio del mismo (Daëron *et al*, 1997).

Recientemente se ha hallado que FcRn protege la IgG del catabolismo de las enzimas lisosomales, al unir IgG en vesículas pinocíticas y “redirigirlas” hacia el medio extracelular (Junghans *et al*, 1996).

2.2.3.5. Diversidad y características de los receptores para Fc de Inmunoglobulina G.

2.2.3.5.1. Fc γ RI.

El Fc γ RI (CD64) es un receptor cuya subunidad α está codificada por un único gen, situado en el brazo largo del cromosoma 1(1q21.1). Si bien la subunidad accesoria γ no pertenece a la familia de las inmunoglobulinas, también está codificada por un gen en el mismo cromosoma. Se trata de una glicoproteína de transmembrana de 72kD (Ravetch *et al*, 1991; Unkeless *et al*, 1988) constituida por una cadena α de 374 aminoácidos.

Las subunidades γ poseen secuencias ITAMs acomplejadas en el extremo C-terminal. La cadena α posee tres dominios EC de tipo inmunoglobulina (Figura 2.2). Los dos primeros, son homólogos a los dominios EC de los Fc γ RII y Fc γ RIII, mientras que el tercero

muestra escasa similitud. Se ha sugerido que dicho dominio, da cuenta de la alta afinidad de este receptor ($K_a 10^8 - 10^9$) permitiendo la interacción con inmunoglobulinas monoméricas. De hecho los anticuerpos monoméricos se unen a este receptor antes de interaccionar con antígenos multivalentes (Daëron *et al*, 1997). Por otra parte, su grado de afinidad por la IgG varía de acuerdo al subtipo donde: $IgG_1 = IgG_3 > IgG_4 \gg IgG_2$.

En el caso particular de los neutrófilos, este receptor es inducible por Interferon- γ (INF- γ) (Perussia *et al*, 1983) y el factor estimulador de colonias granulocíticas (G-CSF). La expresión de dichos receptores se incrementa por efecto del IFN- γ , IL-10 y G-CSF, en tanto que disminuye por efecto de la IL-4 y la IL-3 (Deo *et al*, 1997).

El Fc γ RI está centralmente involucrado en la activación celular, induciendo la producción de anión superóxido, la secreción de citoquinas inflamatorias (Anderson *et al*, 1986) en la ADCC y en la endocitosis de ligandos solubles o complejos inmunes particulados.

2.2.3.5.2. Fc γ RIIA, -IIB y -IIC.

El Fc γ RII (CD32) es un receptor codificado por tres genes diferentes, IIA, IIB y IIC, en el cromosoma 1(1q23-24) (Scallon *et al*, 1989). Tanto Fc γ RIIA como Fc γ RIIC son glicoproteínas de transmembrana con dos dominios EC que contienen una secuencia ITAM en el extremo C-terminal. Ambos receptores carecen de subunidades asociadas (Figura 2.2). Mientras que el Fc γ RIIB, es un receptor de cadena única que carece de ITAMs.

En neutrófilos, sólo se expresan IIA y IIC, ambos, glicoproteínas de cadena única constituidas por 325 y 321 aminoácidos respectivamente con un peso molecular de 40 kD (Ravetch *et al*, 1991) (Figura 2.3). En términos generales, el Fc γ RII es un receptor de baja afinidad por su ligando ($K_a < 10^7$) por lo que sólo se une con avidez a complejos inmunes y a IgG agregadas experimentalmente. Este receptor es capaz de disparar el estallido respiratorio en los neutrófilos, la

liberación de mediadores en las plaquetas (Daëron *et al*, 1997) y cumplen un rol importante en la depuración o *clearance* de complejos inmunes *in vivo*. Poseen afinidad variable por los isotipos de IgG, siendo IgG1=IgG3>>IgG2, IgG4 (Ravetch *et al*, 1991; Unkeless *et al*, 1988).

Se han descripto dos variantes alélicas de FcγRIIA, -HR y -LR. La variante HR expresada en el 70% de la población de monocitos, es capaz de mediar la proliferación T inducida por IgG1 murina (HR, *high responder*), mientras que la variante alélica LR presente en la población de monocitos restante, no es capaz de hacerlo (LR *low responder*). La causa del alelismo HR/LR, se debe a la sustitución de un único aminoácido (Qiu *et al*, 1990).

El FcγRIIB es un receptor que carece de ITAMs (Figura 2.3). La particularidad de esta molécula, reside en que el dominio TM es codificado por exones separados. Así, debido al *splicing* alternativo del RNA se generan varias isoformas -IIB1 y -IIB2. La primera retiene las secuencias codificadas por todos los exones, mientras que la segunda carece de secuencias codificadas para la porción IC del receptor. Estas diferencias hacen que -IIB2 pueda mediar la endocitosis de complejos inmunes solubles a través de vesículas recubiertas de clatrina (*coated-pits*). La endocitosis via FcγRIIB2 le permite a las células con MHC de clase 1 presentar con alta eficiencia a antígenos acoplejados con IgG. Por otra parte las secuencias codificadas por el primer exon intracitoplasmático presentes en -IIB1, inhiben los procesos de internalización, por lo que este receptor no puede mediar, la endocitosis ni el *capping* de receptores. Estos receptores cooperan negativamente al interactuar con FcR activados con secuencias ITAMs Ver sección 2.2.3.4.1.

2.2.3.5.3. FcγRIIA y FcγRIIB.

El Fc γ RIII (CD16), es un receptor que se encuentra codificado por dos genes, -IIIA y -IIIB, en el cromosoma 1 (1q23-24). Se trata de un receptor de baja afinidad por IgG monomérica ($K_a < 10^7$) por lo que une preferencialmente complejos inmunes. La afinidad por los isotipos de IgG es variable, siendo $IgG1 = IgG3 \gg IgG2, IgG4$ (Ravetch *et al*, 1991; Unkeless *et al*, 1988).

Los genes Fc γ RIIIA y -IIIB presentan alta homología, pero muestran una diferencia crítica en el aminoácido 203. En dicha posición, Fc γ RIIIB codifica para una serina, lo que conduce a que dicho receptor este unido a la membrana del neutrófilo a través de una enlace GPI (Figura 2.3). Esta característica le confiere alta movilidad en la membrana plasmática. Por otra parte, -IIIB muestra polimorfismo alogeneico, conocido como sistema NA, siendo Fc γ RIIIB NA1 y -NA2 (Ory *et al*, 1991). Este receptor no sólo se encuentra presente en la membrana de los neutrófilos, sino que también está en forma soluble en suero (Huizinga, de Haas *et al*, 1990). El gen Fc γ RIIIA codifica para una fenilalanina en la posición del aminoácido 203, lo que determina su unión a través de un dominio TM (Selvaraj *et al*, 1991; Scallon *et al*, 1989).

Fc γ RIIIB es una glicoproteína de 233 aminoácidos sin subunidades asociadas y de movilidad electroforética bastante amplia en los geles SDS -PAGE donde se denota una banda entre 50-80 kD. Este receptor sólo se expresa en neutrofilos y es incapaz de generar señales de activación celular. No obstante, se ha comprobado su capacidad de cooperar positivamente con otras FcR de transmembrana con secuencias ITAMs así como también con el receptor del componente C3 activado del complemento (CR3, CD11b/CD18) (Petty *et al*, 1996). Otros datos también sugieren que -IIIB es utilizado por el neutrófilo para atrapar complejos inmunes sin dar lugar a la activación celular (Huizinga, TWJ, van del Schoot *et al*, 1988) y que -IIIB actuaría sinérgicamente con -IIA, para mediar la ADCC y la fagocitosis (Ravetch *et al*, 1991).

FcγRIIIA es una glicoproteína de 254 aminoácidos, con un dominio de TM y tres dominios EC. Este receptor está asociado a subunidades complementarias que conforman homodímeros $\gamma\gamma$ o $\zeta\zeta$ o heterodímeros $\gamma\zeta$. Este receptor puede mediar ADCC y fagocitosis en células NK y macrófagos tisulares (Huizinga, de Haas *et al*, 1990).

2.3. Factores quimiotácticos de naturaleza bacteriana: Los péptidos formilados

A partir de observaciones previas que indicaban que los filtrados de cultivos bacterianos poseían actividad quimiotáctica sobre las células del sistema mononuclear-fagocítico, Schiffmann en 1974, describió a los péptidos formilados como las sustancias causantes de tal efecto (Schiffmann *et al*, 1975). La existencia de aminoácidos formilados en su composición se debe a que en los sistemas procarióticos, la síntesis de proteínas se inicia a partir de una metionina formilada. Estudios posteriores, determinaron que dichos péptidos eran de bajo peso molecular (150-1500 daltons), aniónicos a pH neutro y termo-estables (Schiffmann, Showell *et al*, 1975)

Diversos estudios se han llevado a cabo para determinar las características que hacen de dichos péptidos poderosos agentes quimiotácticos. En primer término, se demostró que tan sólo una simple metionina formilada ó bien formilmetionil-dipéptidos ó -tripéptidos tienen actividad quimiotáctica sobre los neutrófilos (Showell *et al*, 1976). Así, se considera a las metioninas formiladas del extremo N-terminal como las responsables de la actividad quimiotáctica. Se ha observado en péptidos sintéticos con estructura f(Met)_n que tal actividad se incrementa linealmente. Si embargo, el máximo de respuesta se logra con un tetrapéptido [f(Met)₄], los pentapéptidos o hexapéptidos de metionina, no inducen mayor actividad (Toniolo *et al*, 1984).

De todos los péptidos formilados conocidos el FMLP, un péptido formilado prototipo, es el que posee mayor actividad. La presencia de un grupo formilado en el residuo de metionina del extremo N-terminal le confiere una actividad quimiotáctica 10.000 más alta que la de su control Metionil-Leucil-Fenilalanina (Becker *et al*, 1979). La dosis efectiva 50% (DE₅₀) para la quimiotaxis es de $7.0 \pm 1.7 \times 10^{-11}$ M.

Se ha encontrado que pequeños cambios estructurales traen aparejados grandes diferencias en la actividad. Tomando como ejemplo el caso del F-Met-Leu-Fen y F-Met-Fen-Leu que difieren en la posición de sus dos últimos aminoácidos, se observó que el primero es 500 veces más activo que el segundo. También, se ha demostrado que la naturaleza hidrofóbica del péptido es de suma importancia para la interacción con su receptor. Así, el pegado ó *binding* de los péptidos se incrementa con la presencia de residuos hidrofóbicos adicionales (Becker *et al*, 1987).

Por otra parte, se ha observado que los grupos con carga positiva situados en el extremo N-terminal, deben ser neutros para que el péptido adquiera mayor actividad. La calidad del aminoácido ubicado en la segunda posición de la cadena peptídica también parecería ser crítica; se observó que la máxima actividad se logra con aminoácidos de cadena lateral no polar (leucinas, fenilalaninas, metioninas), requerimiento que no se hace extensivo al aminoácido ubicado en la tercera posición. Por lo que de ello se desprende que la actividad, no sólo depende de los aminoácidos constituyentes sino también de su ubicación en la cadena peptídica.

2.3.1. Rol biológico de los péptidos formilados.

El hecho de que ciertos componentes bacterianos tengan actividad quimiotáctica sobre células eucariotas tiene grandes implicancias a nivel biológico. Su relevancia reside en que células

eucariotas pueden “percibir” sustancias de naturaleza bacteriana y dirigirse al punto donde su concentración es máxima para ejercer sus funciones efectoras.

Por otra parte, dichas moléculas son capaces de inducir otras funciones celulares como el estallido respiratorio (Snyderman *et al*, 1992; Lundqvist *et al*, 1995), así como promover la secreción diferencial de distintos compartimientos intracelulares de gránulos (Sengeløv *et al*, 1996). Mientras la tasa de movilización es alta para las vesículas secretorias, intermedia para los gránulos de gelatinasa y baja para los específicos, la movilización de gránulos azurófilos inducida por estos agentes quimiotácticos es prácticamente nula (Sengeløv *et al*, 1993; Sengeløv *et al*, 1996). Además, se observa en forma concomitante a los eventos de degranulación, el aumento de la expresión o *up regulation* de moléculas tales como los receptores para los factores C1 (CR1) y C3 del complemento (CD11b/CD18 ó CR3), los receptores para FMLP (FPR), el antígeno asociado a la función linfocitaria (LFA) y CD14 entre otras. La *up regulation* de algunas moléculas de adhesión favorece la interacción célula-célula, permitiendo la agregación celular así como también la fagocitosis de partículas sensibilizadas con IgG (Becker *et al*, 1987; Detmers *et al*, 1991). Estos datos explican la versatilidad de los péptidos formilados en la activación de las diversas funciones celulares, hecho que contribuye al aumento de la eficiencia del sistema inmune para eliminar los agentes exógenos en los focos inflamatorios.

2.3.2. Receptores para péptidos formilados

El receptor para péptidos formilados (FPR) es considerado como el receptor cuya activación media tanto las respuestas migratorias como las respuestas citotóxicas de las células fagocíticas. Mediante ensayos de *binding*, se ha demostrado la presencia de alrededor de 50.000 receptores/célula con un Kd de ~ 20nM (Sklar *et al*, 1984).

Se trata de una proteína de 55-75Kd de peso molecular, de cadena única, compuesta por 350 aminoácidos con sitios potenciales de glicosilación en la cercanía del extremo N-terminal. En la Figura 2.4 se detallan las características descriptas de un modelo propuesto para tal receptor. En primer término, el FPR posee (i) un extremo N-terminal extracelular, (ii) un extremo C-terminal intracelular, (iii) siete dominios transmembrana (DTM) orientados en forma perpendicular a la membrana plasmática con prolinas en los dominios II, IV, V, VI y VII, (iv) seis rulos o *loops* conectores, tres intracelulares y tres extracelulares compuestos por aminoácidos hidrofílicos, (v) un puente disulfuro que une residuos de cisteína entre los *loops* extracelulares 1 y 2. Los siete DTM estarían dispuestos a manera de un canal que podría contener algunos o todos los residuos que interaccionan con el ligando. Por otra parte, poseen sitios de glicosilación en la zona del segmento N-terminal, y en ciertas ocasiones en el segundo *loop*. El extremo C-terminal es rico en treoninas y serinas, que podrían estar fosforiladas en los receptores desensibilizados.

Se han descrito dos isoformas de FPR que difieren en dos aminoácidos y exhiben alta afinidad por su ligando (Boulay et al, 1990). Diversos estudios indican que el sitio de unión de alta afinidad al FMLP, involucra a los tres *loops* extracelulares y zonas adyacentes de los DTM (Gao et al, 1993). Se ha propuesto que la zona de unión al FMLP se comportaría como un “bolsillo” compuesto por dominios hidrofóbicos que involucran a los DTM y otros dominios dadores de electrones situados sobre la faz extracelular del FPR. La histidina de la posición 90 podría considerarse un dador de protones. En este modelo el grupo formilado estaría situado a una limitada profundidad en el canal, mientras que el extremo C-terminal se contactaría con la región de los *loops* extracelulares (Bommakanti et al, 1993). Por otra parte, se definió al

segmento próximo al extremo COOH-terminal del R-FMLP como el sitio de unión de la proteína G a dicho receptor (Figura 2.4).

Los estudios de la respuesta celular en función del *binding* de FMLP indicaron que la misma varía de acuerdo al porcentaje de FPR ocupados. Así la producción de anión superóxido es máxima cuando se logra la máxima ocupación del receptor, en tanto que para el cambio de forma la máxima estimulación de AMPc (AMP cíclico) puede acontecer con sólo el 10% de los receptores ocupados (Sklar et al, 1984).

Figura 2.4

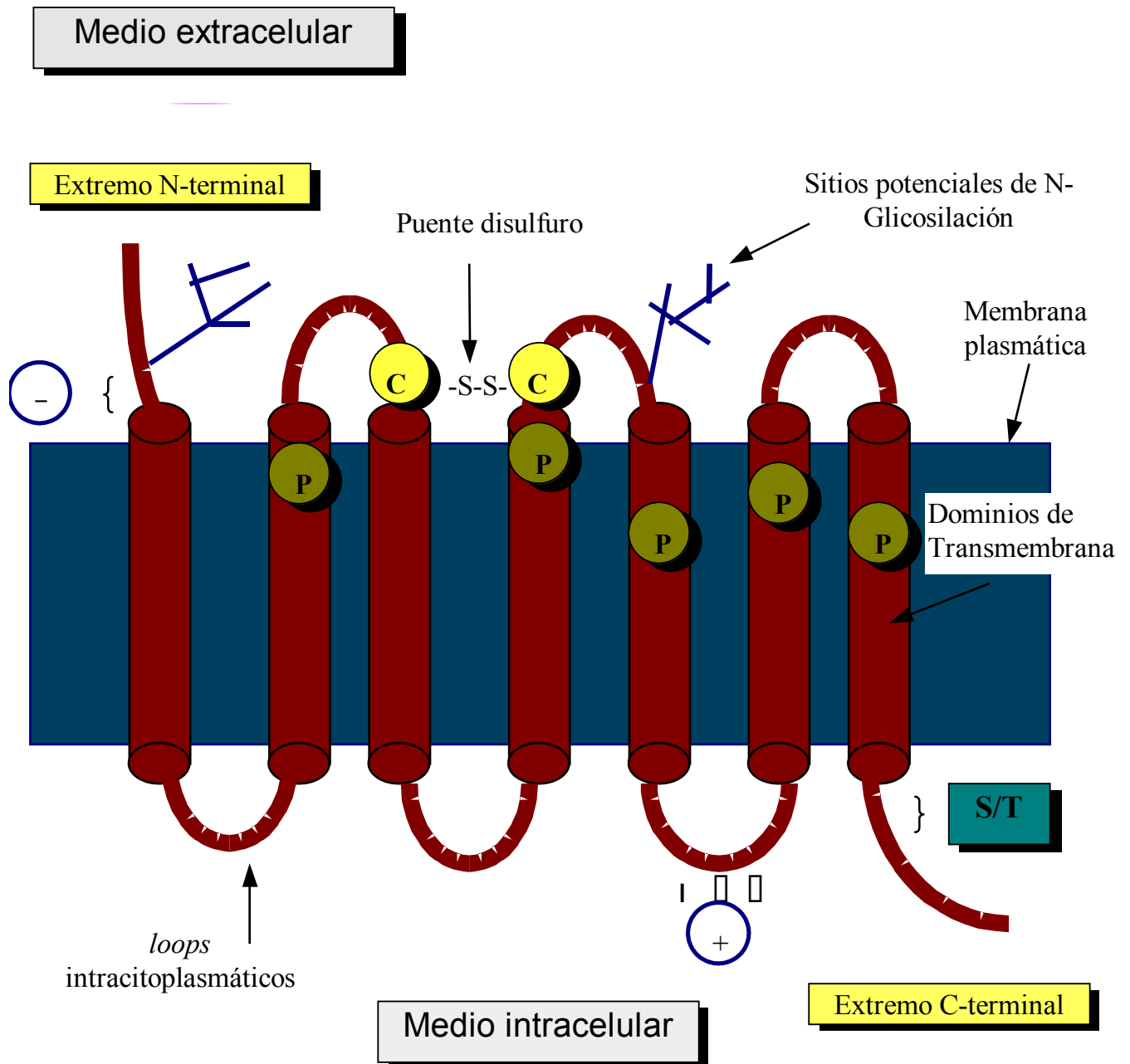


Figura 2.4. Receptor leucocitario para agentes quimiotácticos. (+), *loop* intracelular 3 (i3); (S/T), sitios de fosforilación potencial con múltiples residuos de Serina y Treonina; C ó P, zonas conservadas con Cisteínas y Prolinas.

2.3.2.1. Señales de Transducción en los neutrófilos generadas por activación del FPR.

Se ha propuesto en fagocitos un modelo de transducción de señales intracelulares inducida por agentes quimiotácticos convencionales. El modelo del FPR, involucra un receptor cuya afinidad se ve incrementada por cambios conformacionales debido a la unión de una proteína G sensible a la toxina pertussis (Sklar et al, 1989; Sklar et al, 1990).

En términos generales, las proteínas G son heterotrímeros constituidos por tres subunidades: α , β y γ . Las subunidades $\beta\gamma$, están unidas en forma no covalente a las cadenas α , donde se encuentra la secuencia enzimática y la de interacción con el FPR (Fig 2.6 A). La unión del péptido quimiotáctico al receptor (Fig 2.6.B) estimula el intercambio de GDP por GTP en la cadena α de la proteína G (Fig 2.6.D), lo que conduce a la disociación de las subunidades $\beta\gamma$ de la α . Bajo dichas condiciones el complejo $\beta\gamma$ activa a la Fosfolipasa C (PLC), una fosfodiesterasa con actividad específica para fosfoinosítidos. Como contrapartida se induce la actividad GTPasa de la subunidad α -GTP, por lo que el GTP es hidrolizado a GDP (Fig 2.6 D y A). Esto último, permite que α pueda interaccionar con las subunidades $\beta\gamma$, quedando el receptor inactivado. La activación de la PLC (Fig. 2.7) da lugar a la hidrólisis de fosfatidil inositol originando dos segundos mensajeros, inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3) y 1,2, diacilglicerol (DAG). IP_3 induce la liberación Ca^{2+} de los compartimientos intracelulares en el citoplasma en un mecanismo mediado por receptores para IP_3 situados en la membrana del retículo endoplasmático. La movilización de Ca^{2+} constituye un punto importante para los eventos de degranulación. Por otra parte, el DAG induce la activación de la proteína quinasa C (PKC), la cual contribuye a la activación del complejo NADPH oxidasa (Becker et al, 1987; Murphy et al, 1994).

Algunos autores también han sugerido que tanto el IP_3 y el DAG estarían involucrados en la activación de la fosfolipasa D (PLD). Por otra parte, algunos datos indican que los eventos bioquímicos mediados por PLC y por PLD, correlacionarían con la alta sensibilidad de los neutrófilos para responder a bajas concentraciones de agentes quimiotácticos y la escasa capacidad para activar funciones citotóxicas respectivamente (Snyderman et al, 1992). Por otra parte, se ha postulado que las subunidades $\alpha\beta$ de la proteína G podrían activar a la enzima Fosfatidil inositol (3) quinasa (PI-3), la cual fosforila el fosfatidil inositol difosfato (PIP_2) para originar fosfatidil inositol (3,4,5) trifosfato (PIP_3) al nivel de la membrana plasmática. El PIP_3 estaría implicado en los procesos de reordenamiento del citoesqueleto durante la quimiotaxis (Stephens et al, 1993).

Figura 2.6

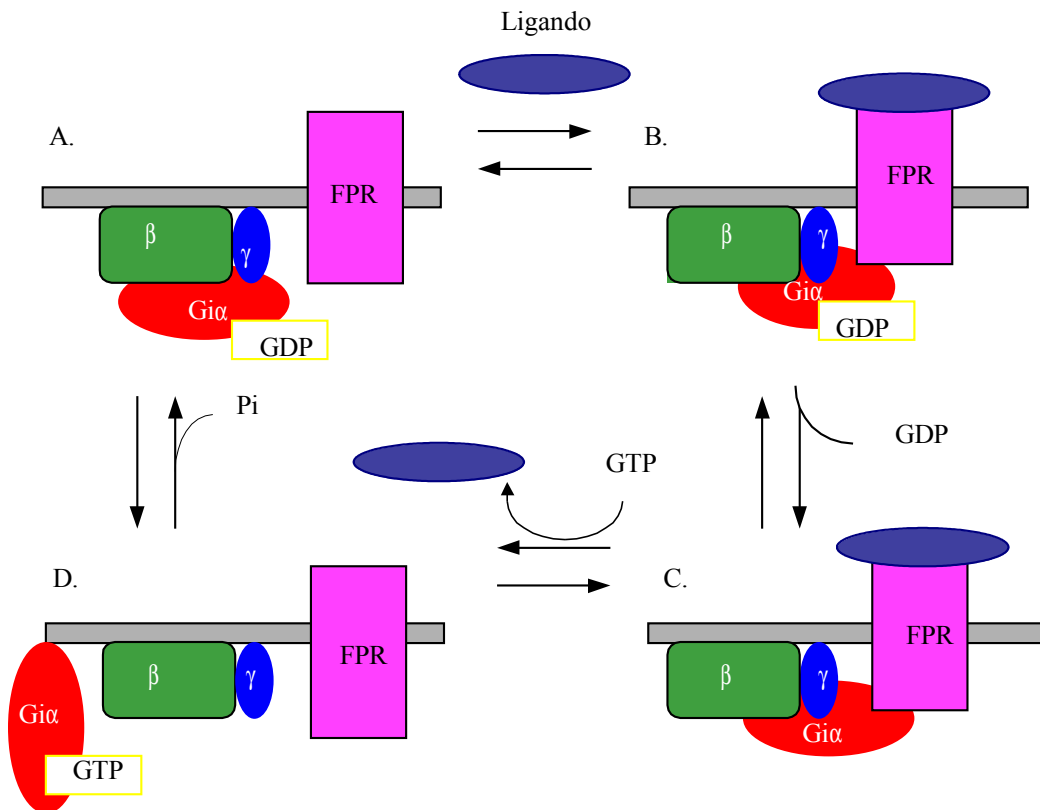


Figura 2. 6. Esquema simplificado de las interacciones potenciales entre el FPR y la Proteína G. El receptor (FPR) disociado de la proteína G, posee baja afinidad por el agente quimiotáctico (A. y D.) mientras que su asociación con la proteína G le confiere alta afinidad por el ligando (B. y C.). la unión del GTP a la subunidad α resulta en la disociación del complejo $\alpha\beta\gamma$ y la actividad GTPasa de la subunidad α (D.) la cual está ausente en las condiciones representadas en A., B. y C. Durante el intercambio de los nucleótidos de guanina, el receptor se encontraría no asociado a nucleótidos (C.)

Figura 2.7

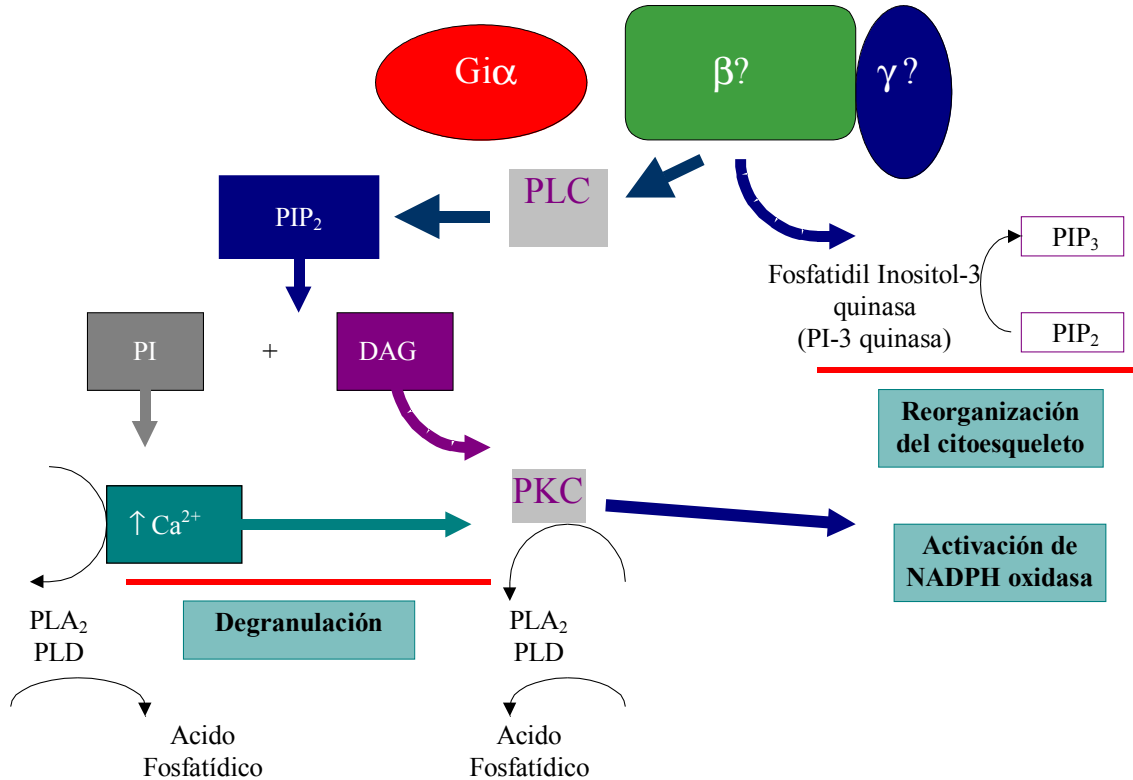


Figura 2.7. Esquema de los diversos pasos de señalización conducentes a la degranulación celular, la reorganización del citoesqueleto y la activación del complejo enzimático NADPH oxidasa. Los eventos más importantes involucran la activación de las enzimas PLC, PKC y la PI-3 quinasa.

Con respecto a la finalización de las señales de activación, aún no se han esclarecido los mecanismos. No obstante, se ha sugerido que la capacidad del complejo ligando-receptor de generar señales de transmembrana, se pierde a partir del momento en que dicho complejo se asocia con el citoesqueleto, un evento que ocurre en forma casi inmediata a la unión del péptido formilado al FPR (Liu et al, 1998). Por otra parte, se ha observado que este tipo de interacción FPR-citoesqueleto, conduce a la desensibilización del receptor para desafíos

posteriores con el ligando (Särnhäl et al, 1996) así como también sería responsable de la inactivación de la NADPH oxidasa (Jesaitis et al, 1993).

2.3.2.2. Reciclado del FPR.

El reciclado de los FPR es un mecanismo crítico por el cual la célula conserva su habilidad para detectar los gradientes de concentración de los agentes quimiotácticos.

Luego de la interacción del FMLP con los FPR situados en la membrana del neutrófilo, dicho complejo formado se agrega, inmoviliza y pinocita (Zigmond et al, 1987). Este proceso conduce a que más del 90% de los FPR desaparezcan de membrana (*down regulation*) luego de 5 minutos de exposición al FMLP (Painter et al, 1995)

Se ha sugerido que tanto el Ca^{2+} como la Proteína Kinasa C (PKC) estarían involucrados en el reclutamiento e internalización de los complejos FMLP-FPR. En el interior de la vesícula pinocítica o *receptosoma* el ligando se disocia del receptor debido a que es degradado por una enzima. Ello, provoca la liberación del FPR quedando disponible para su reutilización (Figura 2.8). Algunos estudios utilizando inhibidores de proteasas indican que la enzima responsable de la degradación del FMLP es una proteasa neutra que se expresa predominantemente en la membrana del neutrófilo, pero que ingresa al receptosoma como consecuencia de la pinocitosis del receptor (Painter et al, 1995).

Una vez liberados del ligando, los FPR se reexpresan en la superficie del neutrófilo conjuntamente con otros FPR preformados en reservorios o *pooles* intracelulares. Este hecho conduce a un incremento de la expresión de dichas moléculas en la superficie celular favoreciendo nuevas interacciones ligando receptor. Así, este mecanismo modula la

disponibilidad de receptores en la membrana del neutrófilo, y por ende la sensibilidad y la respuesta celular frente a su ligando (Sullivan et al, 1980).

Figura 2.8

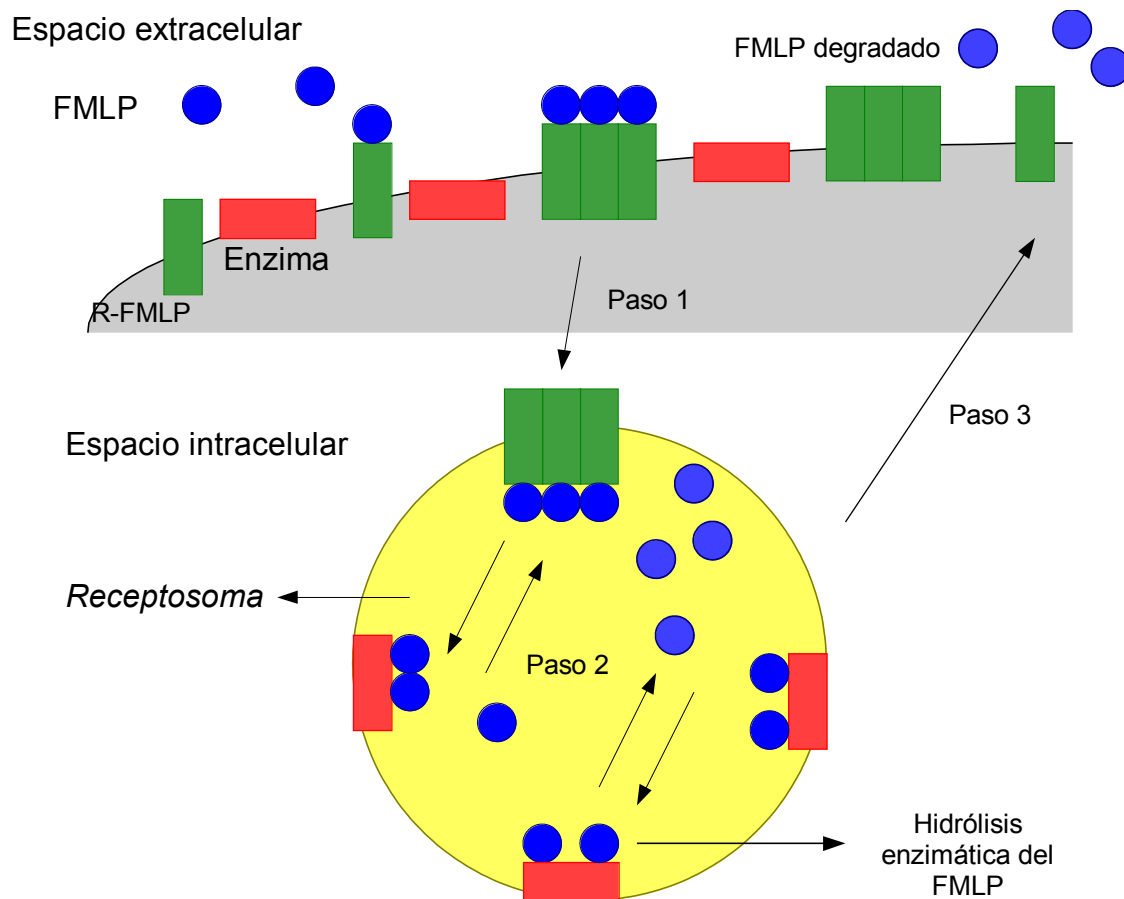


Figura 2.8. Descripción esquemática del reciclado del FPR. Tanto los complejos ligando-receptor como la enzima hidrolítica se co-internalizan a través de un proceso de *down-regulation* inducido por la activación del FPR (Paso 1). En el interior del *receptosoma* se produce la disociación y posterior degradación del ligando por acción enzimática (Paso 2). Los FPR libres de ligando son reciclados a la superficie celular (Paso 3).

2.3.3.- Receptores para moléculas quimiotácticas en la membrana del neutrófilo.

Como se ha dicho previamente, los neutrófilos no sólo responden a los péptidos formilados sino también a una amplia gama de agentes quimiotácticos de naturaleza endógena como el C5a, LTB₄, IL-8 y PAF (Harvath et al, 1991; Mc Phail et al, 1992). En términos generales, se ha identificado a los receptores para las moléculas quimiotácticas como miembros pertenecientes a la superfamilia de los receptores acoplados a GTP-asa los cuales poseen siete dominios de transmembrana (Fig 2.5).

Los receptores para péptidos formilados, C5a e IL-8 poseen 350 aminoácidos que contienen sitios potenciales de glicosilación en la cercanía del extremo N-terminal. El receptor de PAF contiene 342 aminoácidos pero carece de sitios de glicosilación en dicha zona. Los receptores para IL-8 tienen un 77% de homología de aminoácidos y poseen diferentes sitios de unión al ligando con distinta afinidad al mismo. No se conoce si las isoformas de dichos receptores estimulan respuestas celulares diferentes o no. La región C-terminal posee diversos residuos de treonina y serina los cuales podrían ser fosforilados por kinasas específicas. El tercer *loop* intracelular parecería constituir un dominio de unión de una proteína G (Murphy et al 1991). También el mismo tercer *loop*, tanto en el receptor de C5a como de los péptidos formilados, contiene un sitio potencial de fosforilación de una proteína kinasa A (Boulay et al, 1991).

3. MATERIALES Y MÉTODOS.

3.1.- Reactivos generales.

Formyl methionyl leucyl phenilalanine (FMLP, conservado en una solución stock 10^{-2} M en DMSO mantenida a -70°C), Citochalasin B, Acido araquidónico (AA), Peroxidasa de rabano (tipo IV), IgG de conejo anti-eritrocito de carnero (Ec), Ovoalbúmina (gradoV), Luminol, BAPTA-AM, Fluo 3-AM, Phosphoramidon, Pepstatin, Thiorphan, Leupeptin, y phenylmethylsulfonyl Fluoride (PMSF), Phospholipase C de *bacilius cereous*, (tipo 4), saponina y fragmento F(ab')_2 de cabra anti-Fc de ratón conjugado con FITC fueron obtenidos de Sigma (St. Louis, USA. Los anticuerpos monoclonales que reconocen $\text{Fc}\gamma\text{RIIIB}$ (3G8) y el $\text{Fc}\gamma\text{RII}$ (I.V3) fueron obtenidos de Medarex Inc (West Lebanon, NH). Anticuerpos controles de isotipo IgG1 e IgG2b murina fueron obtenidos de CALTAG Lab (Burlingame, CA)

3.2. Soluciones.

3.2.1. Solución de Ficoll-Hypaque.

Los leucocitos polimorfonucleares (PMN) fueron purificados mediante el empleo de una solución de Ficoll-Triyosom preparada en forma similar al método descrito por Böyum (Böyum *et al*, 1968). A 2,4 volúmenes de Ficoll 400 (Pharmacia, Uppsala, Suecia) al 9% en agua destilada, se le agregó un volumen de Triyosom al 34% (Gobby-Novag, Argentina), siendo la densidad final de la solución a 4°C de 1,077 g/l.

3.2.2. Solución de dextran.

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

3.2.3. Solución fisiológica-

La solución fue preparada con NaCl 8.5g/l.

3.2.4. Solución de Hank's (HBSS) 10x.

La solución fue preparada con NaCl 80g/l, KCl 4g/l, glucosa 10g/l, KH₂PO₄ 600mg/l Na₂HPO₄ 475mg/l.

3.2.5. Solución de Türk para el recuento de células

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

3.2.6. Solución de azul tripan

La misma se preparó a partir de dos soluciones madres con el siguiente contenido: solución A, azul tripan: 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 tripan 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).

3.2.7. Medio de cultivo completo (MCC).

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

3.3. Purificación de PMN polimorfonucleares (PMN).

Sangre de donadores normales voluntarios (Sección Hemoterapia-IIIHema-Academia Nacional de Medicina. Sección Hemoterapia del Hospital Bernardino Rivadavia) fue recogida en tubos heparinizados. La sangre fue diluida al medio con solución fisiológica y sembrada sobre una solución de Ficoll- Triosom formando un sistema bifásico, el cual fue centrifugado a 350 g durante 30 minutos a 4°C (Böyum *et al*, 1968). Luego de la centrifugación se obtuvo una interfase conteniendo las células mononucleares periféricas y un sedimento de eritrocitos y granulocitos. Este último fue diluido al medio con solución fisiológica. Luego se agregó dextran al 6%, en una proporción de tres volúmenes de suspensión celular diluida a un volumen de dextran. 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 bidestilada durante 1 minuto a 4°C, restituyendo inmediatamente la isotonicidad. Las preparaciones contuvieron más de 94% de granulocitos, de los cuales el 95-98% fueron PMN. Finalmente, las células fueron resuspendidas en el medio adecuado, de acuerdo al experimento a desarrollar.

3.4. Preparación de complejos inmunes (CI).

3.4.1. Antígenos empleados para la preparación de los CI.

Se empleó Ovoalbúmina purificada cromatográficamente (Sigma, St. Louis, USA).

3.4.2.- Obtención de IgG de conejo anti-Ovoalbúmina (IgGc anti-OA)

El antisuero se obtuvo por inmunización de conejos con Ovoalbúmina (OA) purificada cromatográficamente (Sigma, St. Louis, USA). El esquema de inmunización consistió en una primera inoculación subcutánea de OA, emulsionada en adyuvante de Freund completo y dos inoculaciones subcutáneas de OA, emulsionada en adyuvante de Freund incompleto, 10 y 30 días después de la primera inoculación. Cuarenta días después de la primera inoculación, el conejo fue sangrado y la IgG fue obtenida por precipitación del suero inactivado con sulfato de amonio al 50% y cromatografía en DE-52 celulosa (Whatman Paper Co). Posteriormente, la IgG de conejo fue pasada a través de una columna de afinidad de OA polimerizada con glutaraldehído, preparada según el método descrito por Avrameas y Ternynck (Avrameas *et al*, 1969) . La IgG anti-OA fue eluída de la columna con solución tamponada de glicina-clorhídrico 0,1M pH=2,8 y dializada contra PBS.

3.4.3. Formación de los Complejos Inmunes (CI).

Los CI fueron preparados bajo diferentes relaciones antígeno: anticuerpo incubando volúmenes iguales de IgG de conejo anti-OA (0.9 mg/ml) y diferentes concentraciones de OA durante 1 hora a 37⁰ C y 18 hs a 4⁰ C. Para los cálculos, se consideró un peso molecular de 150kDa para la IgG de conejo y de 40kDa para la OA.

3.5. Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC).

3.5.1.- Células blanco.

Eritrocitos de pollo (Ep).

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

La sangre de pollo heparinizada fue diluída 1:10 en MCC y 100µl de esta suspensión fue incubada con 50-100µCi Na₂⁵¹CrO₄ (New England Nuclear, Boston, MA), durante 1 hora a 37°C, con agitación intermitente. Posteriormente, los eritrocitos de pollo marcados (⁵¹Cr-Ep) fueron lavados 7 veces con medio de cultivo y resuspendidos a la concentración deseada.

3.5.3. Sensibilización de las células blanco.

Los ⁵¹Cr-Ep fueron sensibilizados con concentraciones subaglutinantes de anticuerpos IgG anti-Ep (Sigma, St.Louis, USA), incubando volúmenes iguales de una suspensión de ⁵¹Cr-Ep al 0,5% y diluciones convenientes de anticuerpos IgG anti-Ep.

3.5.4. Reacción de ADCC

Esta reacción (Geffner *et al*, 1987) fue realizada en placas de 96 pozos de fondo plano. PMN a 3x10⁶ cel./ml (100µl) fueron empleados como células efectoras. Dichos PMN fueron incubados con 1x10⁵ ⁵¹Cr-Ep y concentraciones subóptimas de IgG de conejo anti Ep. Luego de un período de incubación de 18 hs. A 37°C, bajo una atmósfera conteniendo 5% de CO₂ y 95% de aire húmedo, la placa de cultivo fue centrifugada y el porcentaje de citotoxicidad fue calculado como:

$$\% \text{ ADCC} = \frac{\text{⁵¹Cr liberado al sobrenadante} \times 100}{\text{Radioactividad total}}$$

Radioactividad total

A este valor le fue sustraído el porcentaje de ^{51}Cr liberado en ausencia de anticuerpo (liberación espontánea, cuyo valor fue siempre menor al 5%). Cada reacción fue realizada en MCC por cuadruplicado.

La radioactividad de las muestras, tanto del sedimento como del sobrenadante, fue determinada en un contador gamma (Beckman Instruments, Inc., Palo Alto, California).

3.6. Fagocitosis.

3.6.1. Células blanco.

Eritrocitos de carnero (Ec) en suspensión estabilizadora de Alsever.

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

Los eritrocitos de carnero (Ec) fueron diluídos 1:10 en MCC y 100 μl de esta suspensión fue incubada con 50-100 μCi $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$, durante 1 hora a 37°C, con agitación intermitente. Posteriormente, los eritrocitos de carnero marcados (^{51}Cr -Ec) fueron lavados 7 veces con medio de cultivo y resuspendidos a la concentración deseada.

3.6.3. Sensibilización de células blanco.

Los eritrocitos de carnero (Ec) en suspensión estabilizadora de Alsever fueron lavados dos veces en PBS y resuspendidos al 0.5% en MCC. Los Ec fueron óptimamente sensibilizados por preincubación de volúmenes iguales de Ec y cantidades subaglutinantes de IgG de conejo anti-Ec (200 $\mu\text{g/ml}$) (Sigma, St Louis) durante 30 min. a 37°C (Ec_{óptima}). La sensibilización subóptima fue llevada a cabo por incubación de Ec con IgG de conejo anti-Ec (50 $\mu\text{g/ml}$) durante 30 min. 37°C (Ec_{subóptima}).

3.6.4. Ensayo de Fagocitosis.

Una suspensión celular de PMN (7×10^6 cél. /ml.) y Ec sensibilizados (relación célula efectora: célula blanco 1:10) fue incubada por 30 min. a 37°C en MCC. Luego de este período, se efectuó un shock hipotónico a 4°C con el fin de remover los Ec no fagocitados y disminuir simultáneamente la actividad metabólica celular. Transcurrido 1 min, la isotonicidad fue restaurada y los PMN fueron resuspendidos en MCC. El porcentaje de células conteniendo Ec (% de fagocitosis) fue evaluado por microscopía óptica. Se cuantificaron por lo menos 100 células/ dador. La ingestión de Ec no sensibilizados fue menor al 2%.

3.6.5. Evaluación de la cinética de lisis de los ^{51}Cr - Ec fagocitados.

La cinética de lisis de lo Ec ingeridos fue evaluada sensibilizando óptimamente ^{51}Cr -Ec según lo indicado en 3.5.3. Una suspensión celular de PMN (7×10^6 cél./ml) y ^{51}Cr -Ec (relación célula efectora: célula blanco 1:10) fue incubada por 30 min. a 37°C . Luego de este período, se efectuó un shock hipotónico a 4°C con el fin de remover los ^{51}Cr -Ec no fagocitados y disminuir simultáneamente el metabolismo celular. Transcurrido 1 min., la isotonicidad fue restaurada y los PMN fueron lavados 5 veces con MCC. Finalmente, la liberación del ^{51}Cr asociado a los ^{51}Cr -Ec fagocitados, fue evaluada a distintos intervalos de tiempo a 37°C , bajo una atmósfera conteniendo 5% de CO_2 y 95% de aire húmedo. El porcentaje de lisis de los ^{51}Cr -Ec ingeridos fue calculado como:

$$\% \text{ lisis de } ^{51}\text{Cr-Ec fagocitados} = \frac{^{51}\text{Cr liberado al sobrenadante} \times 100}{\text{Radioactividad total}}$$

A este valor le fue sustraído el porcentaje de ^{51}Cr liberado por PMN que ingirieron ^{51}Cr -Ec sin sensibilizar (menos del 2%). Cada reacción fue realizada en MCC por cuadruplicado. La

radioactividad de las muestras, tanto de los PMN como del sobrenadante, fue determinada en un contador gamma (Beckman Instruments, Inc., Palo Alto, California).

3.7. Citotoxicidad celular mediada por radicales libres.

3.7.1. Células blanco

Se emplearon eritrocitos de pollo (Ep) como células blanco.

3.7.2. Marcación de células blanco con cromato de sodio radioactivo.

La marcación fue realizada incubando 20 μ l de sangre heparinizada de pollo con 50 μ Ci de ^{51}Cr durante 1 hora a 37°C. Luego, las células fueron lavadas 7 veces con MCC y resuspendidas a la concentración deseada.

3.7.3. Reacción de citotoxicidad.

El ensayo de citotoxicidad fue realizado en placas plásticas de 96 pozos de fondo plano, incubando 100 μ l de PMN en una concentración de 3×10^6 cél./ ml. (células efectoras) y 1×10^5 ^{51}Cr -Ep (células blanco). Ácido araquidónico (AA) o CI en diferentes relaciones antígeno- anticuerpo fueron adicionados en un volumen final de 200 μ l. Luego de un período de incubación de 18 horas a 37°C bajo una atmósfera conteniendo 5% de CO_2 y 95% de aire húmedo las placas fueron centrifugadas y la radioactividad en el sobrenadante cuantificada. Los porcentajes de ^{51}Cr liberados al medio extracelular, fueron calculados de acuerdo a lo descrito en **3.4.4.**

La liberación de ^{51}Cr fue siempre menor al 4%. Ningún reactivo a las dosis empleadas indujo liberación de ^{51}Cr espontánea. La citotoxicidad mediada por los PMN es atribuible casi exclusivamente a peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y es inhibible por catalasa (Geffner *et al*, 1987).

3.8. Emisión de quimioluminiscencia por PMN estimulados.

La respuesta quimioluminiscente de los PMN fue determinada por un Lumi-agregómetro para sangre total (Chrono-Log, Havertown, PA) a 1000 rev./min. a 37°C en MCC con Luminol 10^{-7} M según lo descrito previamente (Geffner *et al*, 1993). A partir de la estabilización del sistema, se registró la emisión de luz en forma continua durante 2 minutos. Los resultados fueron expresados como unidades relativas de quimioluminiscencia (URQL). Definiéndose 1 URQL como el corrimiento de un cm en la emisión de la señal luminosa, la cual fue registrada automáticamente.

3.9. Permeabilización de PMN.

La fijación y permeabilización de los PMN para la detección de $\text{Fc}\gamma\text{RII}$ y $\text{Fc}\gamma\text{RIIIB}$ totales (intracelulares y en membrana), fue realizada según lo descrito previamente (Tosi, *et al*, 1992). Luego del tratamiento con FMLP, las células fueron cosechadas y fijadas por 30 min. con paraformaldeído 0.5%. Alícuotas de estas células fijadas fueron lavadas y resuspendidas en buffer saponina 0.04% / ovoalbúmina 0.1% / PBS / 0.1 M glicina para ser permeabilizadas. Dicho buffer fue utilizado para los sucesivos pasos de marcación celular con anticuerpos monoclonales anti- $\text{Fc}\gamma\text{RIIIB}$ (3G8) o anti- $\text{Fc}\gamma\text{RII}$ (IV.3). Alícuotas de PMN fijados fueron tratados idénticamente en buffer ovoalbúmina 0.1% / PBS / glicina para realizar la marcación de ambos receptores a nivel de

membrana celular. La expresión de ambos Fc γ Rs en PMNs permeabilizados o controles fue evaluada mediante citometría de flujo según lo descrito en **3.11.1**.

3.10. Remoción de los Fc γ RIIIB de la superficie celular de los PMN.

Los PMN en una concentración de 1×10^6 cél./ml. fueron incubados con la enzima Fosfolipasa C (0.1U/ ml) que cliva específicamente enlaces glicosil fosfatidil inositol (Phospholipase C de *Bacillus cereus*, Sigma St, Louis) durante 40 min. 37°C bajo una atmósfera conteniendo 5% de CO₂ y 95% de aire húmedo. Transcurrido dicho tiempo, las células fueron lavadas tres veces para eliminar la enzima. La expresión de Fc γ RIIIB en la membrana de los PMN fue reducida en un 70-80% según los perfiles de citometría de flujo realizada según lo descrito en el apartado **3.11.1**.

3.11. Tratamiento de PMN vírgenes de tratamiento con sobrenadantes de células estimuladas con FMLP o Citochalasin B (CB) + FMLP.

Los PMN en una concentración de 11×10^6 cél./ ml. fueron tratados con FMLP 10^{-6} M o con MCC durante 3 horas. Posteriormente, los sobrenadantes de dichas células (500 μ l) fueron recolectados y centrifugados (10 min. a 6000 g) para eliminar restos celulares y finalmente dializados contra HBSS para excluir el FMLP o CB + FMLP. Posteriormente, PMN vírgenes de tratamiento (3.5×10^6 cél. / ml) fueron expuestos a dichos sobrenadantes durante tres horas y la expresión de ambos Fc γ Rs fue evaluada por citometría de flujo según lo descrito en **3.11.1**.

3.12. Citometría de Flujo.

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

3.12.1. Evaluación de la expresión de $Fc\gamma RII$ y $Fc\gamma RIIB$

Células tratadas con FMLP y controles fueron centrifugadas y resuspendidas en una concentración de 25×10^6 cél./ml. Luego, 20 μ l de dicha suspensión fue incubada por 30 min. a 4° C con 1 μ g de AcMo IV.3 (anti- $Fc\gamma RII$), 3G8 (anti- $Fc\gamma RIIB$) (Medarex, Inc, West Lebanon) ó controles de isotipo irrelevantes IgG1ó IgG2b murina. Los PMN fueron lavados tres veces, y marcados con $F(ab')_2$ de cabra anti-IgG de ratón conjugado con FITC (Sigma, St Louis, USA). Luego de 3 lavados, se cuantificó la intensidad de fluorescencia de 10.000 células por muestra. Los resultados fueron expresados como el porcentaje de la Mediana de Intensidad de Fluorescencia MIF (expresada en unidades arbitrarias) respecto de los grupos controles. La intensidad de *background* de fluorescencia fue obtenida a partir del control de isotipo irrelevante (IgG1ó IgG2b).

3.12.2. Evaluación de la movilización de calcio intracelular $[Ca^{2+}]_i$.

3.12.2.1. Marcación de células con Fluo-3AM.

Los cambios en los niveles de $[Ca^{2+}]_i$ fueron evaluados empleando Fluo 3-acetometil ester (AM) (Sigma, St Louis). Se trata de un compuesto que interacciona con Ca^{2+} libre intracelular ($[Ca^{2+}]_i$) y una vez que es hidrolizado por las esterasas intracelulares permanece dentro de la célula. Ello permite el monitoreo de cambios en los niveles de $[Ca^{2+}]_i$ con posterioridad a un estímulo dado.

El Fluo 3-AM atraviesa la membrana plasmática y la acción de las esterasas lo tornan irreversiblemente impermeable. La suspensión de PMNs fue marcada según se lo descripto previamente (Merrit *et al*, 1990). Brevemente, los PMN en una concentración de 5×10^6 cél./ml fueron incubados con Fluo 3-AM 4 μ M en medio HBSS durante 30 min. a 37° C. Posteriormente, las células fueron lavadas 3 veces y resuspendidas en una concentración final 5×10^5 cél./ ml. en medio

de cultivo HBSS, HBSS suplementado con CaCl_2 1mM o en MCC. Las células permanecieron a temperatura ambiente hasta su estimulación donde alícuotas de 500 μl fueron tratadas con FMLP y la fluorescencia intracelular monitoreada por citometría de flujo.

3.12.2.2- Análisis de los datos obtenidos.

Todo incremento en el valor de fluorescencia celular fue interpretado como un aumento de los niveles $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Así, se evaluaron los valores de intensidad de fluorescencia celular antes (valor basal) y después del estímulo con FMLP 10^{-6} M.

Para el análisis de los datos obtenidos, se realizó un *dot plot*: F11 vs. tiempo, donde se registra la intensidad de fluorescencia de cada PMN en el momento en que es impactado por el rayo laser del citómetro de flujo.

Para establecer el valor de fluorescencia basal, se realizaron histogramas de intensidad de fluorescencia de los PMN no estimulados y posteriormente se estableció un *marker* que abaracara el 97% de dichas células. Así, los PMN que incrementaron su fluorescencia en valores superiores al delimitado por el *marker* fueron consideradas como respondedores.

3.12.3. Evaluación de las variaciones de la complejidad celular como parámetro de degranulación.

La citometría de flujo ha sido empleada también, para la detección de variaciones en los constituyentes intracelulares de las partículas. Así, cuanto más gránulos contenga la partícula

estudiada, dispersará más el haz de luz que la impacta. La intensidad de la llamada *side scatter light* (SSC) (definida como la luz que es desviada por la partícula en un ángulo de 90° respecto de la trayectoria del rayo luminoso del láser), está directamente relacionada con la “textura” de la partícula (24). Así, cualquier cambio en el contenido intracelular de gránulos puede ser detectado por alteraciones en SSC (25).

En un set de experimentos donde los PMN fueron tratados con MCC, FMLP ó Citochalasin B (5µg/ml) 5 minutos previos al estímulo con FMLP, se evaluaron las variaciones en los perfiles de la complejidad celular (SSC) en función del tiempo antes y después de la estimulación celular.

Se realizaron *dot plots* (SSC vs. tiempo) donde se registra la SSC de cada célula en el momento que fue monitoreada por el citómetro de flujo. Para establecer el valor basal de SSC, se realizaron histogramas de SSC (células o *counts* vs. SSC) de los PMN no estimulados y posteriormente se estableció un *marker* que abaracara el 97% de dichas células (no tratadas). Así, los PMNs que disminuyeron su valor de SSC respecto del valor basal delimitado por el *marker* fueron considerados como células que degranularon su contenido intracelular.

3.13. Análisis estadístico de los datos obtenidos.

Todos los experimentos fueron realizados al menos tres veces. La significancia estadística de los resultados fue calculada a través de los tests no paramétrico de Mann-Whitney y Wilcoxon (dos colas), ANOVA y Test de Bonferroni (dos colas). Los valores de $P < 0,05$ fueron considerados significativamente diferentes.

4. RESULTADOS.

4.1. Análisis del efecto del FMLP sobre funciones efectoras celulares de PMNs.

4.1.1 Funciones independientes de los Receptores para Fc de IgG (FcγR).

4.1.1.1. Citotoxicidad celular mediada por radicales libres inducida por FMLP y Complejos Inmunes.

La citotoxicidad celular mediada por radicales libres es un mecanismo efector de los PMNs caracterizado por la liberación de intermediarios reactivos del oxígeno (IRO) al medio extracelular (Geffner *et al*, 1987, Weiss *et al*, 1980). La liberación de dichos metabolitos de alta capacidad oxidativa, obedece a la activación de la enzima NADPH oxidasa en respuesta a un agonista en particular. La acción tóxica de los IRO es inhibida por catalasa, enzima que descompone H_2O_2 en $H_2O + O_2$. El H_2O_2 es el sustrato esencial para la generación de los productos tóxicos derivados de la cadena de formación de radicales del oxígeno (ver sección 2.5.3 de la Introducción).

Se evaluó la acción citotóxica de los PMNs, inducida por el péptido formil-metionil-leucil-fenilalanina (FMLP) y complejos inmunes (CI), ambos agentes capaces de generar IROs a través de los receptores para FMLP y FcγRs respectivamente. Los resultados detallados en la Figura 4.1 reflejan un efecto sinérgico entre FMLP y CI. Esto es, cuando ambos agonistas actúan simultáneamente sobre las células efectoras, los niveles de citotoxicidad son mayores a los obtenidos por la sumatoria del efecto de ambos agonistas por separado. No obstante, la incubación de los PMNs con FMLP por un lapso de 1 hora a 37°C y la posterior adición de los CI al sistema, anuló el sinergismo citotóxico previamente observado.

Estos resultados permitieron concluir que el efecto de los CI y FMLP sobre los PMNs, es dependiente de la secuencia de presentación de ambos agonistas a las células efectoras.

El pretratamiento de PMNs con FMLP 10^{-6} M fue efectivo, mientras que concentraciones entre 10^{-7} M y 10^{-8} M no originaron efecto inhibitorio alguno sobre el sinergismo de la respuesta citotóxica entre FMLP y CI.

Figura 4.1

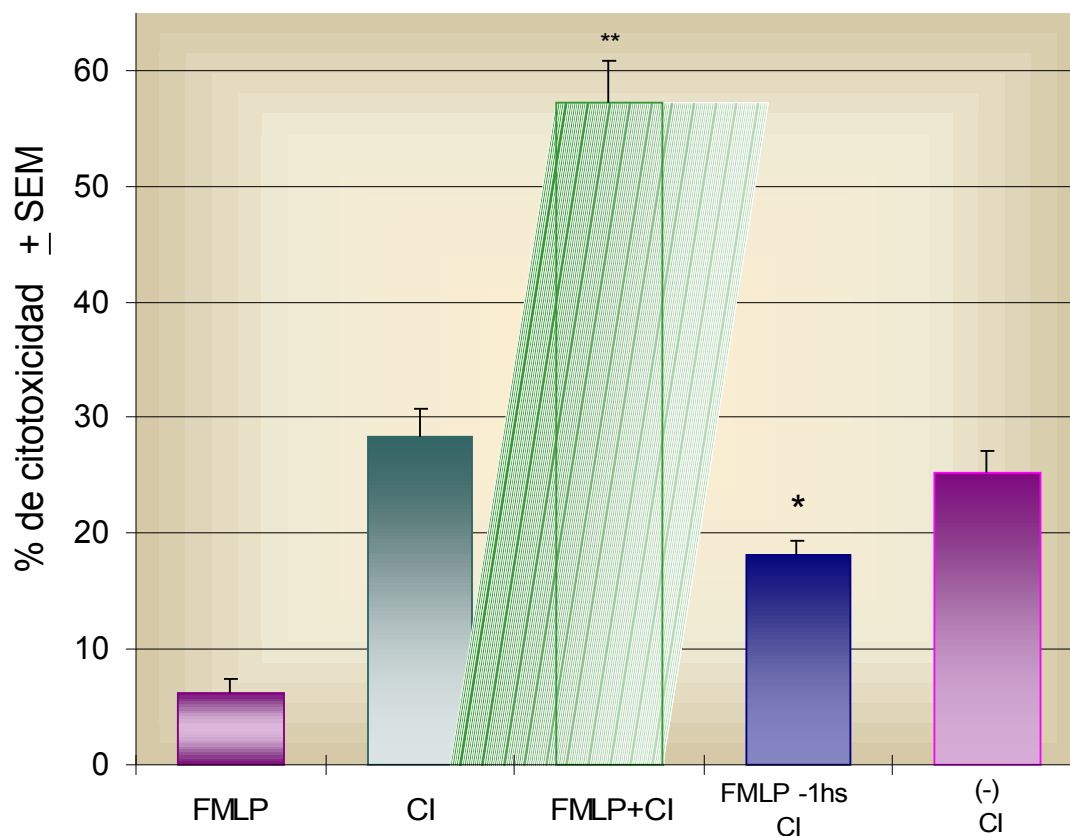


Figura 4.1. Efecto del FMLP y CI sobre la citotoxicidad celular mediada por radicales libres. Neutrófilos (3×10^6 cél./ ml.) fueron estimulados con FMLP, CI ó FMLP + CI (simultáneamente). Otro grupo de PMNs fue tratado con FMLP 10^{-6} M ó MCC durante 60 min. a 37°C luego de lo cual se adicionaron los CI. La citotoxicidad mediada por radicales libres fue evaluada según lo indicado en Materiales y Métodos. La citotoxicidad de los PMN estimulados es expresada como % de citotoxicidad \pm SEM, $n=3$. Test de Wilcoxon (dos colas)

* ($p < 0.001$) significativamente diferente del grupo FMLP + CI, ó CI,.

** ($p < 0.001$) significativamente diferente del grupo FMLP, ó CI.

4.1.1.2. Especificidad de la acción del FMLP.

Para corroborar que los resultados obtenidos eran desencadenados como consecuencia de la interacción del FMLP con su receptor, se realizaron ensayos de citometría de flujo utilizándose FMLP fluoresceinado (FMLP-FITC) y un antagonista del mismo, el péptido N-t-BOC-Phe-Leu-Phe-Leu (N-t-BOC). Dicha molécula, es susceptible de interaccionar con el receptor para FMLP (FPR) del neutrófilo bloqueando las funciones celulares inducidas por el péptido formilado (Freer *et al*, 1979).

La especificidad de la interacción ligando-receptor (FMLP-FPR) fue evaluada al incubar PMNs con cantidades fijas ($10^{-5}M$) de FMLP-FITC y molaridades variables de N-t-BOC. La intensidad de fluorescencia de los PMNs tratados con FMLP-FITC es un valor indicativo del pegado, ya sea específico y/o inespecífico, del FMLP a la membrana del neutrófilo. Así, la disminución de la intensidad de fluorescencia de PMNs tratados con FMLP-FITC y N-t-BOC es interpretada como un desplazamiento del FMLP de su receptor por efecto del antagonista y representa la interacción específica del péptido con su receptor.

Los histogramas de fluorescencia de un experimento representativo se detallan en la Figura 4.2 e indican una disminución del 42% del valor control (FMLP-FITC) en los PMNs tratados con FMLP-FITC y N-t-BOC $10^{-5}M$ (MIF: 58% del valor control). Por otra parte, la especificidad funcional del FMLP fue corroborada por la observación de que la producción de anión superóxido inducida por FMLP es inhibida totalmente por N-t-BOC $10^{-4}M$ (no mostrado). Estos resultados permiten concluir que el FMLP se une específicamente a su receptor y que los efectos observados son atribuibles a señales desencadenadas por dicho péptido.

Figura 4.2

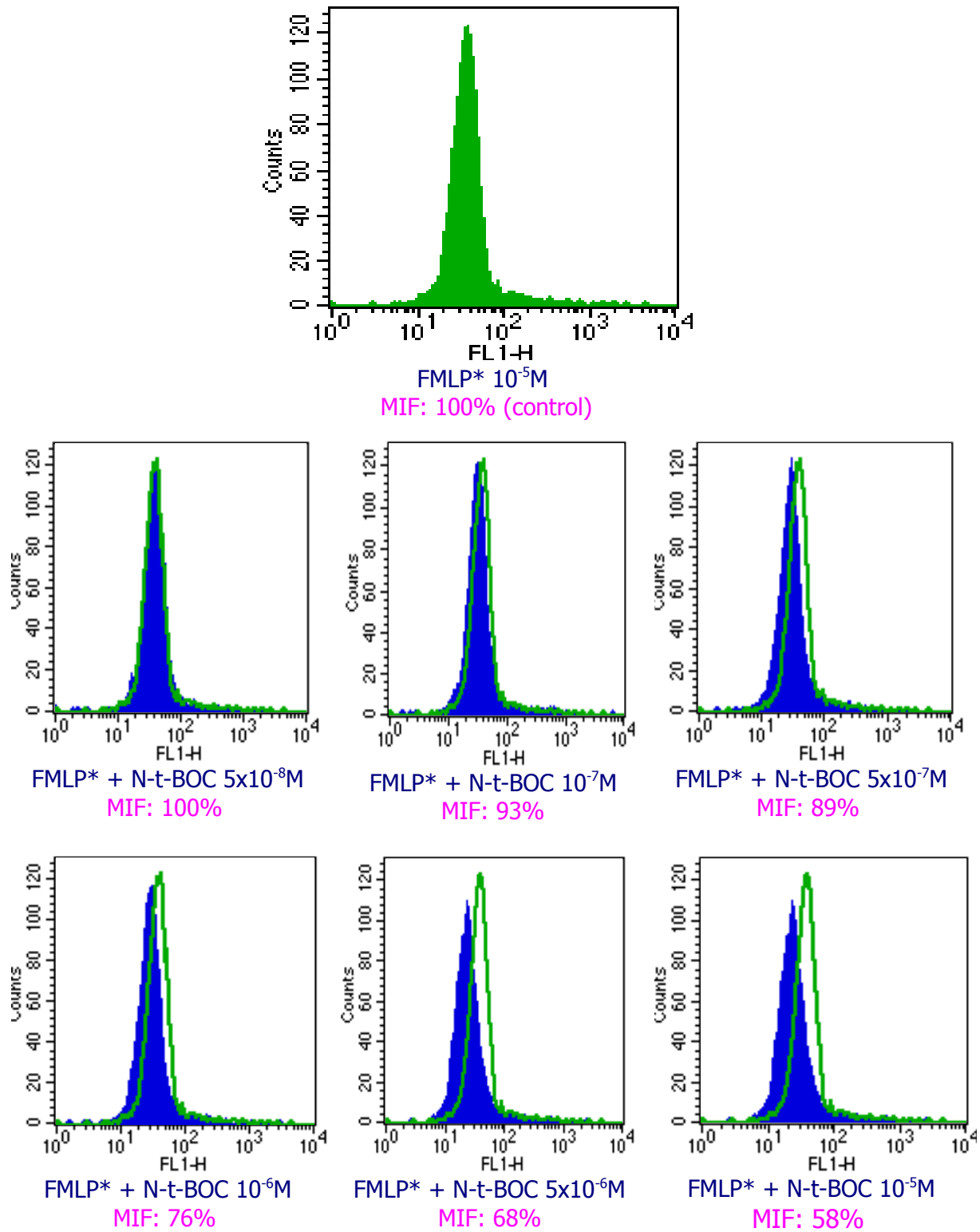


Figura 4.2. Especificidad del FMLP. Neutrófilos (3×10^6 cél./ ml.) fueron incubados simultáneamente con FMLP-FITC (FMLP*) 10^{-6} M y distintas molaridades de N-t-BOC durante 40 min. a 4° C. Posteriormente, las células fueron lavadas, fijadas en paraformaldehído frío y la fluorescencia celular fue evaluada mediante citometría de flujo según lo indicado en Materiales y Métodos. Los datos son expresados como el porcentaje de la Mediana de Intensidad de Fluorescencia (MIF) respecto del grupo control FMLP*. En los histogramas se indican el perfil de fluorescencia de los neutrófilos tratados con el FMLP* + N-t-BOC antagonista (histograma azul) y el de los neutrófilos tratados sólo con FMLP* (histogramas de línea verde). Eje X: intensidad de fluorescencia (en unidades arbitrarias). Eje Y: número de células

4.1.1.3. Evaluación de la actividad de la enzima NADPH oxidasa en PMNs tratados con FMLP.

Los datos obtenidos de los ensayos funcionales indican que el efecto sinérgico del FMLP y los CI sobre la citotoxicidad celular se anula cuando los PMNs son tratados con FMLP durante una hora previa a la adición de los CI.

Aunque la bibliografía es amplia respecto a la activación del complejo NADPH oxidasa por FMLP (Oman *et al*, 1988; Snyderman y Uhing, 1988), se consideró la posibilidad de que la incubación prolongada de los PMNs con dicho péptido inhibiese la actividad de dicha enzima, lo que daría cuenta de la disminución de la producción de radicales libres inducida por los CI.

Para evaluar dicha hipótesis, se realizaron protocolos de incubación de PMNs con FMLP y/ o ácido araquidónico (AA) 150 mM, este último activador directo de la NADPH oxidasa (Uhlinger *et al*, 1993; Henderson *et al*, 1993). Los porcentajes de citotoxicidad inducida por los PMNs tratados con FMLP se detallan en la Tabla 4.1 e indican que la preincubación celular con FMLP no altera la función citotóxica del neutrófilo. Estos resultados señalan que no

existe ‘agotamiento’ del complejo enzimático NADPH oxidasa como consecuencia del tratamiento realizado.

De estos datos se concluye, que el efecto inhibitorio del FMLP sobre la acción de los CI en la generación de IROs, no se debe a un efecto deletéreo de este péptido sobre la estructura de la enzima NADPH oxidasa.

Tabla 4.1. Efecto del ácido araquidónico sobre la citotoxicidad celular dependiente de radicales libres de PMNs pretratados con FMLP.

Tratamiento		% de citotoxicidad \pm SEM
FMLP	AA	
-	+	23.20 \pm 3.25
- 1hr.	+	26.32 \pm 4.15
simultáneo	+	22.30 \pm 1.40

Tabla 4.1. Neutrófilos (3×10^6 cél./ ml.) fueron incubados con MCC o FMLP 10^{-6} M durante 60 min. a 37°C , luego de lo cual, se adicionó AA ó AA + FMLP. La citotoxicidad mediada por radicales libres fue evaluada según lo indicado en Materiales y Métodos. Los valores obtenidos se expresan como % de citotoxicidad \pm SEM, n=4. Los valores obtenidos no difieren significativamente del grupo tratado con AA, Test de Wilcoxon (dos colas).

4.1.2. Análisis del efecto del FMLP sobre funciones efectoras celulares de PMNs dependientes de los receptores para Fc de IgG ($Fc\gamma R$).

Debido a que la disminución de la producción de radicales libres inducida por CI no puede ser atribuida a una pérdida de la actividad potencial de la enzima NADPH oxidasa como consecuencia de la incubación celular con FMLP, se consideró la posibilidad de que este péptido modifique funcionalmente a los $Fc\gamma R$ s presentes en la membrana de los neutrófilos.

Así, se evaluaron algunas funciones celulares estrictamente dependientes de Fc γ Rs tales como la fagocitosis de partículas opsonizadas, la citotoxicidad celular mediada por radicales libres inducida por CI formados en distintas relaciones molares antígeno: anticuerpo, y finalmente la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC).

4.1.2.1. Fagocitosis dependiente de los Fc γ Rs.

La ingestión de partículas opsonizadas es un proceso que depende tanto del grado de sensibilización de la “célula blanco” o *target* como de la disponibilidad de Fc γ R en las células efectoras. La eficacia de dicha función está relacionada directamente con el número de interacciones ligando - receptor (fragmento Fc - Fc γ R) que hacen que el proceso de ingestión sea más o menos eficiente.

Por ello, se evaluó la fagocitosis de eritrocitos de carnero (Ec) (célula *target*) por PMNs tratados con FMLP durante diversos intervalos de tiempo. Los Ec fueron sensibilizados con dos concentraciones subaglutinantes de IgG anti-Ec, obteniendo un grado óptimo (Ec_{óptima}) o sub-óptimo (Ec_{subóptima}) de sensibilización para que la fagocitosis se manifieste.

La Figura 4.3. indica que la incubación de PMNs con FMLP durante 0, 60 y 180 min. no altera la fagocitosis de los Ec sensibilizados en forma óptima (Ec_{óptima}) sugiriendo que el péptido no altera los mecanismos de ingestión de las células sensibilizadas en ningún momento del tratamiento.

Sin embargo, debido al menor grado de sensibilización de las células *target* (Ec_{subóptima}), la actividad fagocítica de los PMNs disminuyó considerablemente. Los PMNs tratados a tiempos cortos con FMLP mostraron un porcentaje de fagocitosis similar a la de los PMNs

controles. Sin embargo, se evidenciaron cambios substanciales a partir de los 60 min. de tratamiento, donde el porcentaje de células *target* fagocitadas se redujo a 10% y 2% respectivamente.

El menor porcentaje de fagocitosis observado en condiciones sub-óptimas de sensibilización se corresponde con una menor densidad de anticuerpos en las células *target*. Así, la disminución de la eficacia fagocítica sería una consecuencia de la reducción del número de interacciones Fc γ - Fc γ R en la membrana del neutrófilo. No obstante, el hecho de que la preincubación con FMLP disminuya aún más el porcentaje de fagocitosis de células *target* igualmente sensibilizadas, sugeriría cambios substanciales en la expresión de los Fc γ R en la membrana del neutrófilo.

Por otra parte, se evaluó la capacidad de los PMNs tratados con FMLP y de los controles de destruir los *targets* ingeridos. La Tabla 4.2., indica que el FMLP no modificó los eventos de citotoxicidad en los fagolisosomas, dado que tanto las células tanto controles como las tratadas mostraron una tasa de liberación de ⁵¹Cr similar.

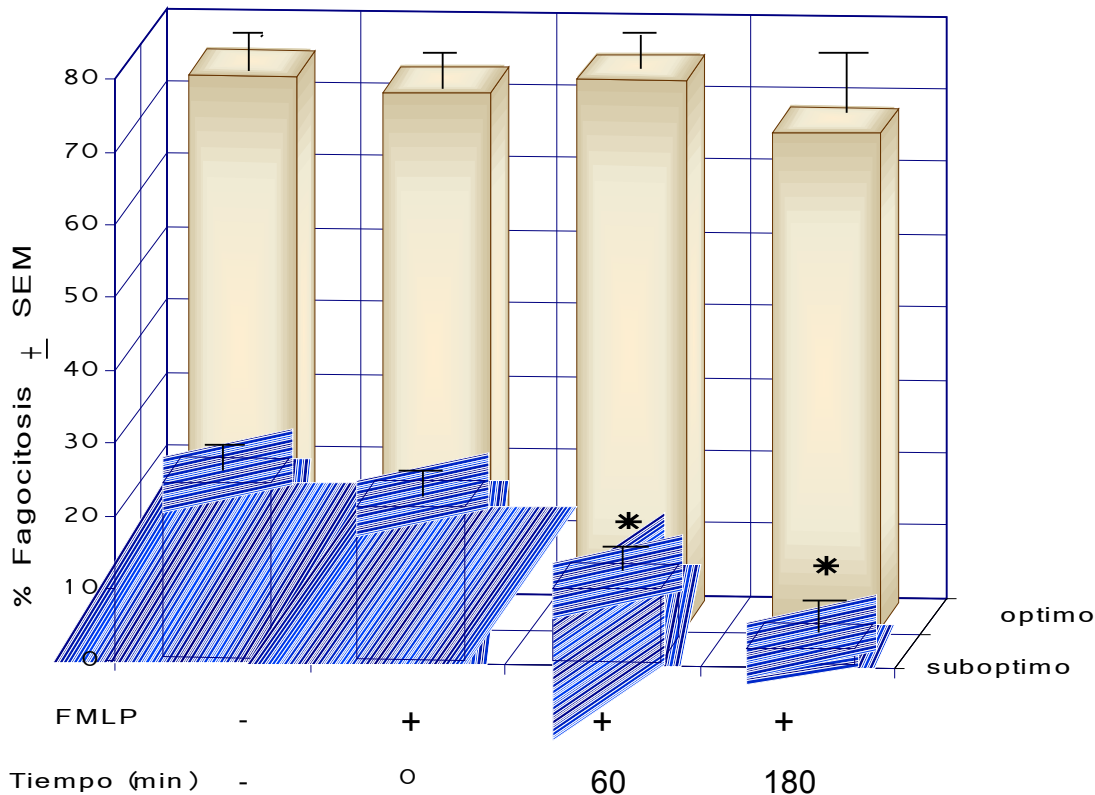
Tabla 4.2. Cinética de lisis de IgG-⁵¹Cr-Ec ingeridos por PMN tratados con FMLP.

Tiempo	RPMI	FMLP
(min.)	(% de lisis \pm SEM)	
15	34.3 \pm 6.9	42.6 \pm 4.8
30	61.6 \pm 5.8	56.2 \pm 5.1
60	67.1 \pm 1.7	74.1 \pm 7.5
90	65.3 \pm 0.5	73.2 \pm 2.5

Tabla 4.2. Neutrófilos (7.5×10^6 cél./ ml.) fueron incubados con FMLP 10^{-6} M por 1 hora a 37°C y posteriormente se realizó un ensayo de fagocitosis de IgG-⁵¹Cr Ec sensibilizados en forma óptima. Al cabo de 30 min. de incubación a 37°C, los IgG-⁵¹Cr Ec no ingeridos fueron lisados por shock hipotónico y el remanente radioactivo fue eliminado por sucesivos lavados con MCC frío. Posteriormente, la liberación del

^{51}Cr intracelular fue evaluada en diferentes intervalos de tiempo (15, 30, 60 y 90 min.) y llevada a cabo según lo descrito en Materiales y Métodos. Los datos son expresados como el porcentaje de ^{51}Cr liberado \pm SEM, $n=3$. Los valores no difieren significativamente de los controles, Test de Wilcoxon (dos colas).

Figura 4.3



Figura

4.3. Efecto del FMLP sobre la fagocitosis. Neutrófilos (7×10^6 cél./ ml.) fueron incubados con FMLP 10^{-6} M durante 0, 60 y 180 min.. Alícuotas de las células tratadas fueron mezcladas con volúmenes iguales de Ec 0.5% y anticuerpo de conejo IgG anti-Ec 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ó 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ lográndose un grado de sensibilización de las células *target* óptima ($E_{c\text{óptima}}$) y sub-óptima ($E_{c\text{subóptima}}$) respectivamente. El ensayo de fagocitosis fue realizado según lo descrito en Materiales y Métodos. Los datos son expresados como % de fagocitosis \pm SEM, $n=3$. Valores significativamente diferentes del control * ($p < 0.01$), Test de Wilcoxon (dos colas).

4.1.2.2. Citotoxicidad celular mediada por radicales libres inducida por CI formados en distintas relaciones molares antígeno: anticuerpo.

Los datos obtenidos de los ensayos de fagocitosis, denotaron la importancia del grado de sensibilización del *target* para la observación del fenómeno inhibitorio del FMLP. Tal característica es indicativa de cambios substanciales en la expresión de Fc γ Rs en la membrana celular. Por lo tanto, se evaluó la citotoxicidad celular inducida por CI formados en relaciones molares antígeno: anticuerpo, donde la cantidad de anticuerpo constituyó la limitante de la reacción.

La Figura 4.4 indica el valor porcentual de la citotoxicidad celular de los PMNs tratados respecto de los controles. Los datos obtenidos revelan que los PMNs tratados con FMLP sólo difieren funcionalmente de los controles cuando son estimulados con CI formados en condiciones tales que la molaridad del antígeno supera entre 4 y 16 veces a la del anticuerpo (exceso de antígeno). Por otra parte, la respuesta celular es normal cuando los PMNs son estimulados con CI formados en relaciones molares óptimas de antígeno y anticuerpo (zona de equivalencia) o bien en defecto de antígeno (exceso de anticuerpo). En forma semejante a lo observado en la fagocitosis, la disminución de la función celular posterior al tratamiento con FMLP se visualiza cuando el complejo inmune posee baja densidad de Ac por molécula de antígeno, lo que determina la mayor ó menor interacción con los Fc γ Rs de la membrana del neutrófilo. Finalmente, la característica del CI agonista es fundamental para la manifestación del efecto inhibitorio inducido por FMLP sobre la funcionalidad de los Fc γ Rs de PMNs.

Figura 4.4

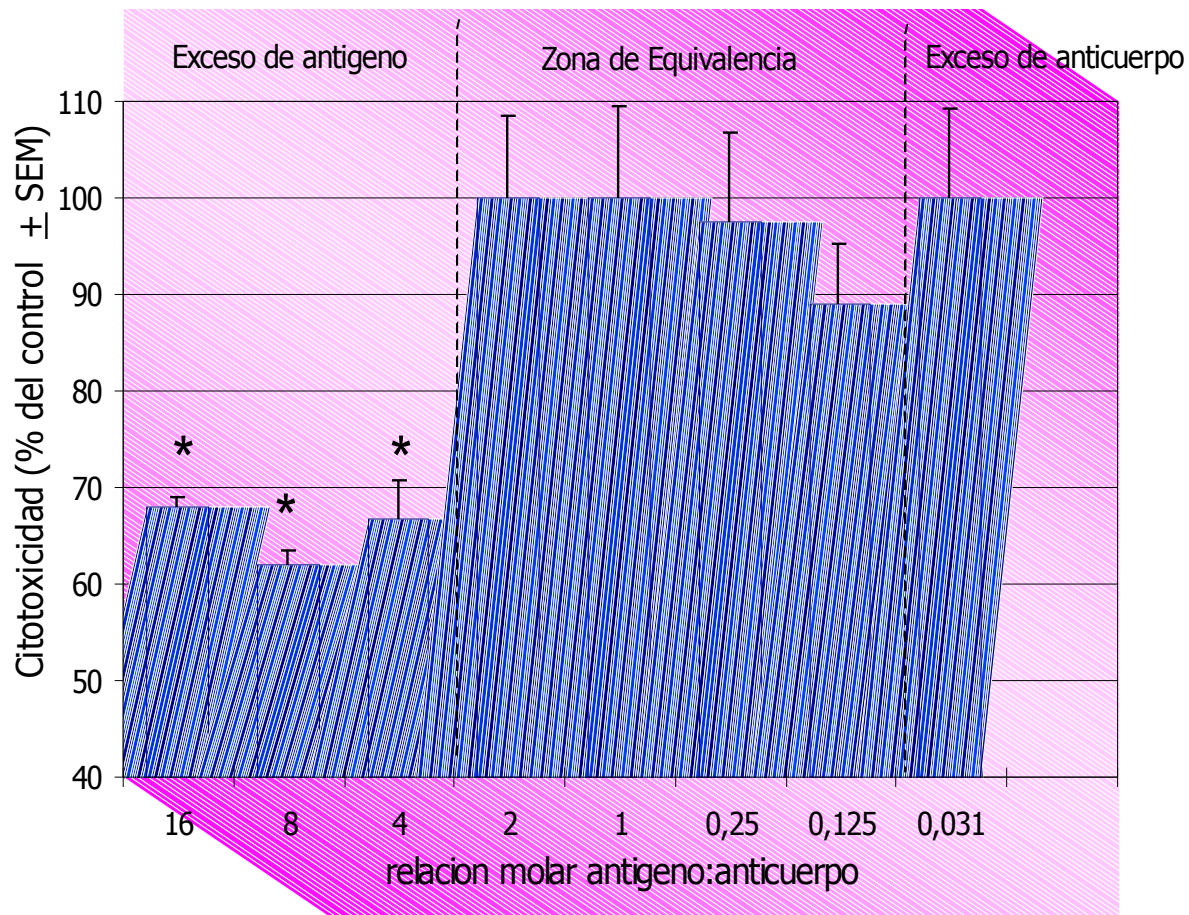


Figura 4.4. Efecto del FMLP sobre la citotoxicidad celular mediada por radicales libres inducida por distintas calidades de CI. Neutrófilos (3×10^6 cél./ ml.) fueron incubados con MCC o FMLP 10^{-6} M durante 60 min. a 37°C . Luego de este período, se adicionaron CI formados en diferentes relaciones antígeno: anticuerpo. La citotoxicidad mediada por radicales libres fue evaluada según lo indicado en Materiales y Métodos. Los valores obtenidos de los PMNs tratados con FMLP se expresa como % del control \pm SEM, $n=3$. Valores significativamente diferentes del control * ($p < 0.05$), Test de Wilcoxon (dos colas).

4.1.2.3 Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC).

La ADCC, es una función dependiente de los Fc γ R_s, pero independiente de la funciones citotóxicas mediadas por la enzima NADPH oxidasa (Fanger *et al*, 1989), por lo cual dicha reacción no es inhibible por catalasa (Isturiz *et al*, 1990). La figura 4.5 demuestra que el FMLP

inhibe la ADCC. Sin embargo, en contraposición a lo observado en las otras funciones celulares analizadas, la inhibición parece ser independiente de los tiempos de incubación con FMLP.

Figura 4.5

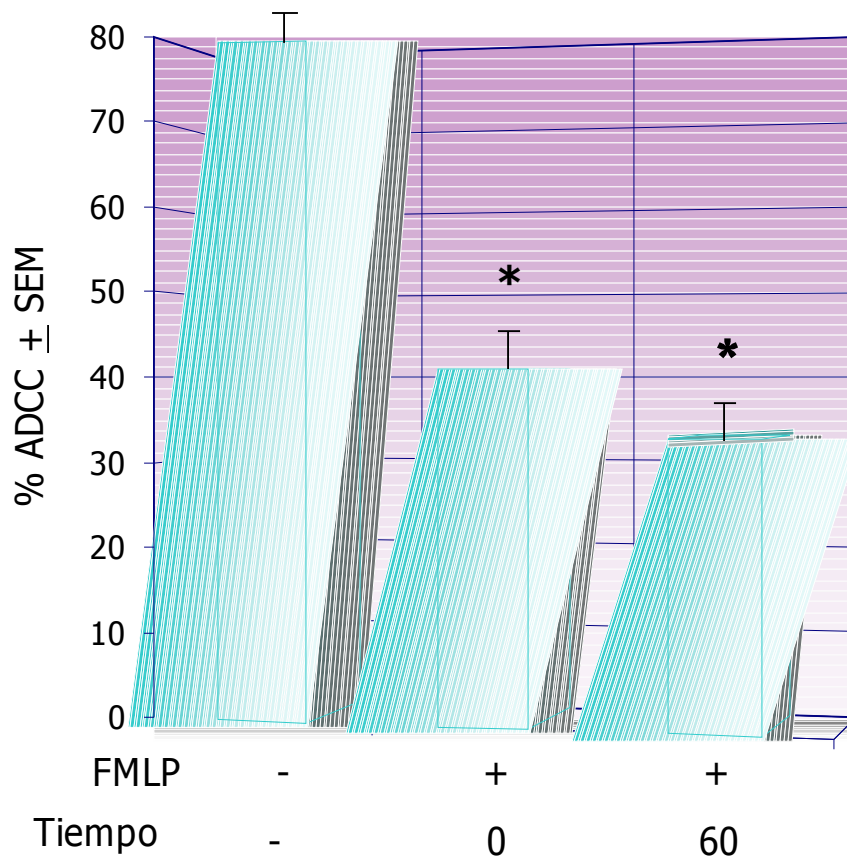


Figura 4. 5. Efecto del FMLP sobre la ADCC. Neutrófilos (3×10^6 cél./ml) fueron estimulados con FMLP 10^{-6} M durante los 60 min. previos ó simultáneamente a la adición de las células *target* sensibilizadas. El ensayo de ADCC fue realizado según se indica en Materiales y Métodos. Los datos son expresados como el % de ADCC \pm SEM, n=4. Valores significativamente diferentes del control *($p < 0.0017$), Test de Wilcoxon (dos colas).

4.2. Expresión de Fc γ RIIIB y Fc γ RII en PMNs tratados con FMLP.

Como consecuencia de la disminución de las funciones dependientes de los Fc γ Rs inducida por FMLP, el paso siguiente fue evaluar la expresión de los Fc γ RIIIB y Fc γ RII en neutrófilos tratados con este péptido.

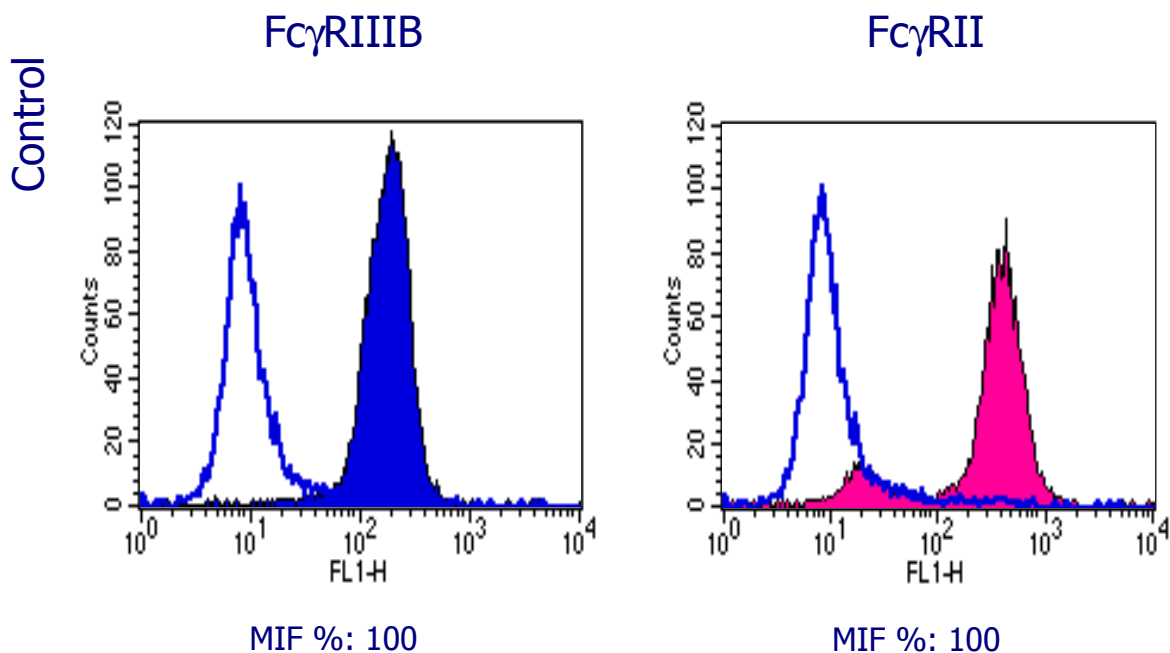
4.2.1 Expresión de Fc γ Rs en la superficie celular de PMN tratados y controles.

Los dos receptores para Fc de IgG -Fc γ RII y Fc γ RIIIB- expresados constitutivamente en los PMNs, están involucrados en las funciones antes mencionadas. Por lo tanto se evaluó por citometría de flujo la expresión de ambos receptores en la superficie celular luego del tratamiento con FMLP.

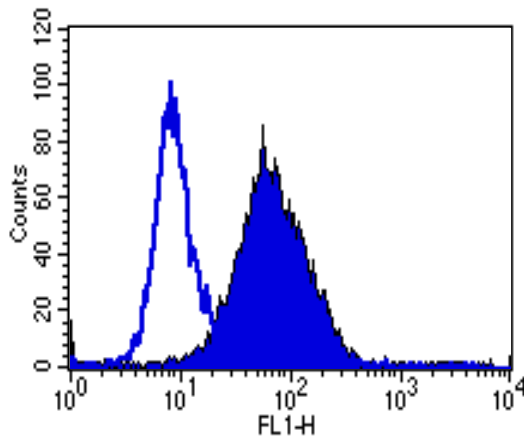
El experimento representativo de la Figura 4.6 indica que la incubación de los PMNs con FMLP durante 60, 120 y 180 min. induce la disminución (*down regulation*) de la expresión de ambos receptores en forma tiempo-dependiente. Concentraciones de FMLP entre 10^{-7} M y 10^{-9} M no provocaron cambios substanciales en la expresión de dichos receptores (no mostrado).

Los valores porcentuales de los Fc γ Rs en la membrana de los PMNs luego de cada período de incubación, varió en forma notoria en cada dador evaluado. Así, el porcentaje de la MIF respecto del grupo control al cabo de 60 minutos de tratamiento fue (MIF \pm SEM, n=16) para Fc γ RIIIB de $78.1 \pm 16.5\%$ (rango 91-34%) y para Fc γ RII de $81.6 \pm 14.7\%$ (rango 100-48%).

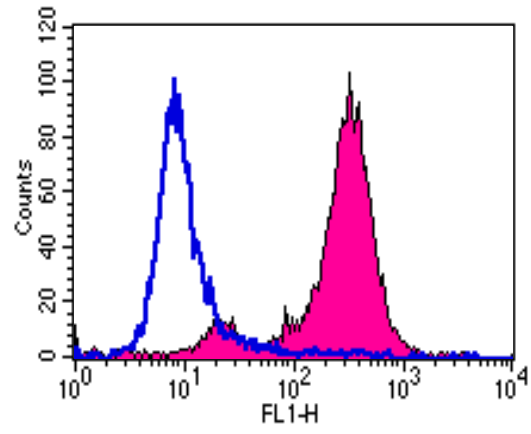
Figura 4.6



FMLP 60 min.

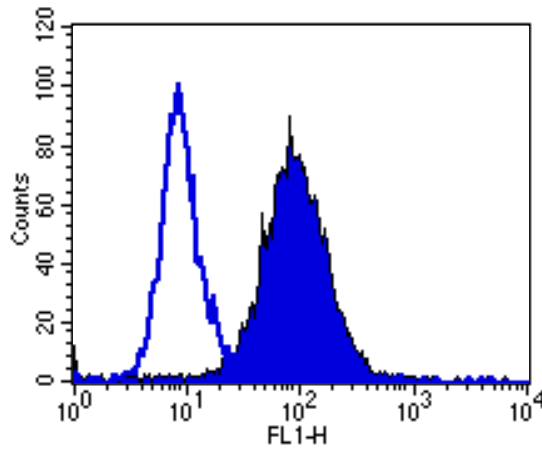


MIF %: 48



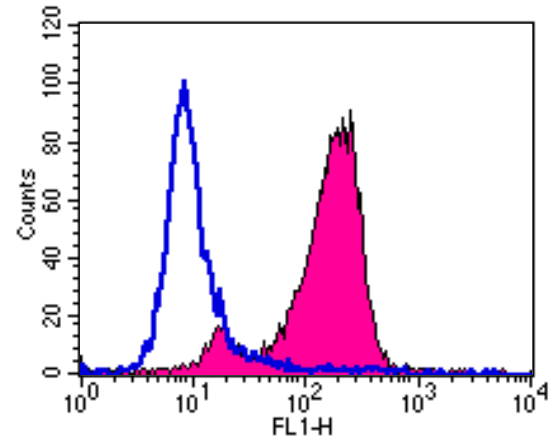
MIF %: 89

FMLP 120 min.



MIF %: 52

MIF %: 36



MIF %: 63

MIF %: 43

FMLP 1800 min.

Figura 4.6. Efecto del FMLP sobre la expresión de los FcγRs en la superficie de los PMNs. Neutrófilos (3×10^6 cél. / ml.) fueron incubados con FMLP 10^{-6} M durante 60, 120 y 180 min.. Posteriormente, las células fueron lavadas y marcadas para citometría de flujo según se indica en Materiales y Métodos. Los datos de un experimento representativo son expresados como el porcentaje de la Mediana de Intensidad de Fluorescencia (MIF) respecto del grupo control. Histograma de línea azul: control de isotipo irrelevante; histograma azul: FcγRIIIB; histograma rosa: FcγRII. Eje X: intensidad de fluorescencia (en unidades arbitrarias). Eje Y: número de células.

4.2.2. Cambios en el contenido intracitoplasmático de FcγRIIIB y FcγRII de PMN tratados y controles.

La bibliografía indica que tanto el FcγRII como el FcγRIIIB están presentes en la superficie celular así como en reservorios o *pooles* intracelulares (Jost *et al*, 1990; Simms *et al*, 1994). Por ello, se evaluó mediante la técnica de citometría de flujo, el efecto del FMLP sobre el contenido total de FcγRs.

La marcación específica con anticuerpos monoclonales anti-FcγRIIIB y anti-FcγRII en células permeabilizadas con saponina, fue considerada como medida del contenido total de cada FcγR. El valor de la intensidad de fluorescencia de los PMNs no permeabilizados indica la cantidad de FcγRs en la superficie del neutrófilo. La diferencia entre ambos valores de fluorescencia es el valor que refiere a la cantidad de FcγRs intracelulares (Tosi *et al*, 1992)

La Tabla 4.3 indica que luego del tratamiento con FMLP, los PMNs muestran una reducción considerable del contenido tanto intracelular como de superficie de ambos FcγRs. Así, la disminución del número de FcγRs en superficie está acompañada de la reducción concomitante del *pool* intracelular de FcγRs.

Tabla 4.3. Niveles de FcγRIIIB y FcγRII intracelular y de membrana posterior al tratamiento de PMNs con FMLP

	membrana citoplasmática	Pool Intracelular
Receptor	(MIF % del control ± SEM)	
FcγRIIIB	65.1 ± 3.3*	64.3 ± 5.1*
FcγRII	58.1 ± 5.2*	78.7 ± 11.4 [#]

Tabla 4.3. Neutrófilos (3×10^6 cél./ ml.) fueron incubados con FMLP 10^{-6} M durante 1 hora a 37°C. Posteriormente, las células fueron lavadas, tratadas con buffer saponina / ovoalbúmina / PBS / glicina (buffer de permeabilización) o buffer ovoalbúmina / PBS / glicina (buffer control) y finalmente marcadas para citometría de flujo según se indica en Materiales y Métodos. Los datos se expresan como el porcentaje de la Mediana de Intensidad de Fluorescencia (MIF) ± SEM respecto de los controles, n= 10, Test de Bonferroni (dos colas).

*p < 0.01 and [#]p < 0.05, significativamente diferente de los PMNs controles.

4.2.3. Efecto del FMLP sobre la expresión de FcγRIIIB intracelular en PMN tratados con GPI-PLC.

Es sabido que el FcγRIIIB está unido a la membrana del PMN a través de un enlace Glicosil Fosfatidil Inositol (GPI), por lo tanto, es factible de ser clivado por una enzima GPI-específica (Huizinga *et al*, 1988).

Esta propiedad del FcγRIIIB fue utilizada para estudiar en PMNs estimulados con FMLP, la expresión del FcγRIIIB en la superficie celular a partir del *pool* intracelular. Para tal fin, el FcγRIIIB fue eliminado de la superficie celular mediante un tratamiento enzimático con Fosfolipasa C, enzima que cliva específicamente enlaces GPI (GPI-PLC) (Tosi *et al*, 1992). Dicho tratamiento disminuyó la expresión del FcγRIIIB al $25 \pm 5\%$ del valor control (fluorescencia residual evaluada por citometría de flujo). Posteriormente, los PMNs fueron incubados con MMC ó FMLP durante

distintos intervalos de tiempo y los niveles de expresión de Fc γ RIIIB en la superficie celular fueron monitoreados mediante citometría de flujo.

Los resultados expuestos en la Tabla 4.4 no reflejan reexpresión de este receptor tanto en tanto en PMNs tratados como en controles. Por lo contrario, ambos grupos mostraron pérdida espontánea del Fc γ RIIIB residual al cabo de 15 min. de incubación a 37°C. No obstante, la expresión de los receptores residuales del grupo tratado con FMLP, disminuyó significativamente respecto de su grupo control en cada intervalo de tiempo evaluado.

Estos datos, sumados a los de la sección 4.2.2 muestran que si bien existe disminución del contenido intracelular de Fc γ RIIIB, es imposible detectar un incremento en la expresión de membrana del neutrófilo. Ello constituiría un parámetro indicativo de que en neutrófilos tratados con FMLP, la cinética de pérdida del Fc γ RIIIB es mayor a la de su expresión en la superficie celular

Tabla 4.4. Evaluación de la cinética de expresión del Fc γ RIIIB en la membrana de PMNs tratados con GPI-PLC y posteriormente con FMLP.

Expresión de Fc γ RIIIB en PMN tratados con GPI-PLC y estimulados con FMLP (MIF % del control \pm SEM)			
Tratamiento	0 min.	15 min.	60 min.
-	25	20.05 \pm 3.9 [‡]	15.12 \pm 2.8 [‡]
FMLP	25	15.05 \pm 4.2 ^{†*}	8.83 \pm 1.7 ^{†*}

Tabla 4.4. Neutrófilos (1x10⁶ cél./ ml.) fueron tratados con 0.1 U/ml GPI-PLC durante 40 min 37°C luego de lo cual, la enzima fue eliminada por sucesivos lavados con MCC. Los neutrófilos (3x10⁶ cél./ ml.) fueron tratados con FMLP 10⁻⁶M o MCC durante 15 y 60 min. y posteriormente marcados para citometría de flujo según se indica en Materiales y Métodos. Los datos se expresan como el porcentaje de la Mediana de

Intensidad de Fluorescencia (MIF) \pm SEM respecto del grupo control (sin tratamiento enzimático), n= 3, Test de Bonferroni (dos colas).

‡ p<0.05, significativamente diferente del grupo tratado con MCC a t= 0 min..

† p<0.05, significativamente diferente del grupo tratado con FMLP a t= 0 min..

*p < 0.05, significativamente diferente del grupo de PMNs incubados con MCC a t=15 min. y t=60 min.

4.3. Mecanismos de eliminación o shedding de los Fc γ Rs en la membrana citoplasmática.

4.3.1. Evaluación del efecto de sobrenadantes de PMNs tratados con FMLP sobre la expresión Fc γ Rs en células libres de tratamiento.

La bibliografía indica que el FMLP induce degranulación y liberación de diversos productos de PMNs, entre los que se encuentran diversos tipos de enzimas (Weissmann *et al*, 1971; Jost *et al*, 1990). Por lo tanto, se consideró la posibilidad de que en respuesta al FMLP, los neutrófilos liberen alguna enzima al medio extracelular que sea responsable de la pérdida de receptores en la membrana de los PMNs. Para esto, se evaluó la capacidad de los sobrenadantes (SN) de PMNs estimulados con FMLP de reproducir el efecto de *down regulation* sobre células vírgenes de tratamiento.

Para ello, los SN obtenidos de PMNs estimuladas con FMLP fueron dializados para eliminar restos del péptido. Posteriormente, PMNs libres de tratamiento fueron expuestos a dichos SN y la expresión de ambos Fc γ Rs fue evaluada por citometría de flujo.

La Tabla 4. 5. indica que los SN de células tratadas con FMLP son capaces de reproducir “*per se*” el efecto del FMLP. Ello indica que durante la estimulación celular se liberan moléculas capaces de alterar la expresión de los Fc γ Rs en la membrana del neutrófilo.

Tabla 4. 5. Sobrenadantes de neutrófilos estimulados con FMLP afectan la expresión de los FcγRs de células vírgenes de tratamiento.

Receptor	Expresión de FcγR en PMNs tratados con SN de PMNs estimulados con FMLP. (MIF % del control ± SEM)
FcγRIIIB	72.3 ± 4.1*
FcγRII	73.7 ± 2.7*

Tabla 4.5. Neutrófilos (11×10^6 cél./ ml.) fueron incubados con FMLP 10^{-6} M por 3 horas a 37°C. Los SN fueron recolectados, centrifugados (10 min 6000 rpm) y dializados contra MCC para eliminar el FMLP remanente. Posteriormente, neutrófilos (3.5×10^6 cél./ ml.) libres de tratamiento fueron expuestos a dichos SN durante 3 horas a 37°C y marcados para citometría de flujo según se indica en Materiales y Métodos. Los datos se expresan como el porcentaje de la Mediana de Intensidad de Fluorescencia (MIF) ± SEM respecto de los controles, n= 5, Test de Bonferroni (dos colas).

*p<0.05, significativamente diferente del grupo de PMNs tratados con sobrenadantes controles.

4.3.2. Tratamiento de PMNs con agentes promotores de secreción.

4.3.2.1. Efecto de citochalasina B sobre la down regulation de FcγRs de PMNs tratados con FMLP.

La citochalasina B (CB) incrementa la secreción de constituyentes intracelulares preformados en células inflamatorias, entre los que se encuentran principalmente enzimas lisosomales (Smolen *et al*, 1981; Goldstein *et al*, 1975). Además, bajo su acción, estímulos con baja o nula actividad secretoria se convierten en estímulos secretorios altamente efectivos (Henson *et al*, 1973; Hawkins *et al*, 1972).

Así, con el propósito de maximizar las respuestas secretorias celulares, los PMNs fueron pretratados con CB 5µg/ml durante los cinco minutos previos a la adición del FMLP. La

Figura 4.7 muestra el gráfico de citometría de flujo de células tratadas con este protocolo experimental. Los datos revelan una disminución substancial de la cantidad de FcγRs en membrana que supera ampliamente a la observada en los grupos tratados sólo con FMLP (Ver también Tabla 4.6). Si bien se encontró que la CB “*per se*” afecta la expresión del FcγRIIIB en algunos dadores, el tratamiento de los PMNs con CB + FMLP disminuyó significativamente la expresión tanto del FcγRIIIB como la del FcγRII.

Tabla 4.6 Efecto del tratamiento CB+ FMLP sobre los FcγRs de PMNs.

Receptor	Tratamiento	
	FMLP	CB + FMLP
	(MIF % del control ± SEM)	
FcγRIIIB	66.85 ± 7.70	21.02 ± 2.39 ^{#‡}
FcγRII	81.87 ± 3.14	40.12 ± 3.35 [#]

Tabla 4.6. Neutrófilos fueron pretratados con CB 5µg/ml durante los cinco minutos previos a la incubación de 3 hs. con FMLP 10⁻⁶ M a 37°C. Posteriormente las células fueron marcadas para citometría de flujo según se indica en Materiales y Métodos. Los datos se expresan como el porcentaje de la Mediana de Intensidad de Fluorescencia (MIF) ± SEM respecto de los controles, n= 10, Test de Bonferroni (dos colas).

[#] p < 0.05, significativamente diferente del grupo tratado con FMLP.

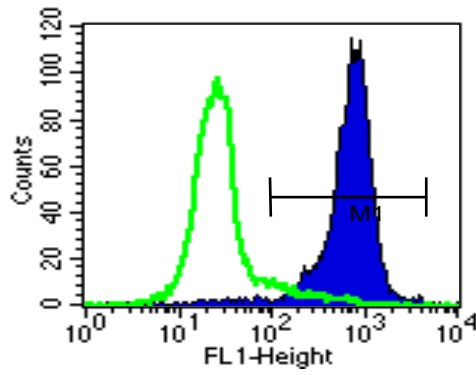
[‡] p < 0.001, significativamente diferente del grupo de tratado con CB + FMLP.

Figura 4.7

| FcγRIIIB FcγRII

MCC

MIF: 100% - CR: 92%



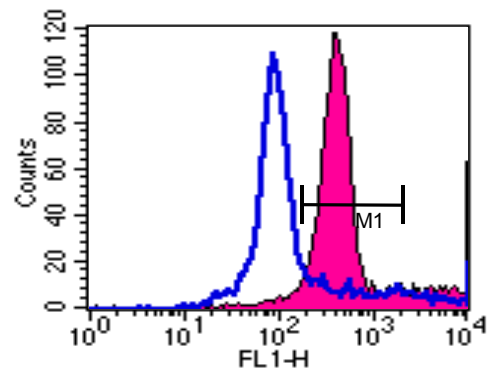
CB

MIF: 100% - CR: 98%
MIF: 80% - CR: 97%

MIF: 100% - CR: 96%

FMLP

MIF: 71% - CR: 96%



MIF: 73% - CR: 82%

CB + FMLP

MIF: 20% - CR: 88%

MIF: 42% - CR: 82%

Figura 4.7. Efecto de la citochalasin B sobre la down regulation de PMNs inducida por FMLP. Neutrófilos (11×10^6 cél./ml.) fueron incubados con CB ($5 \mu\text{g/ml}$) durante los 5 min. previos a la adición de FMLP 10^{-6} M. Luego de tres horas de incubación las células fueron marcadas para citometría de flujo según se indica en Materiales y Métodos. Los datos son expresados como el porcentaje de la Mediana de Intensidad de Fluorescencia (MIF) respecto de cada grupo control. CR: % de células respondedoras. Histogramas de líneas verdes y azules: control de isotipo irrelevante; histograma de color azul (Fc γ RIIB) y rosado (Fc γ RII): neutrófilos tratados con MCC, CB, FMLP ó CB + FMLP. Eje X: intensidad de fluorescencia (en unidades arbitrarias). Eje Y: número de células.

4.3.2.2. Evaluación de la degranulación de PMNs tratados con CB + FMLP mediante la técnica de citometría de flujo.

Es sabido que el contenido de los gránulos intracelulares de los PMNs comprende aproximadamente el 10% de la masa celular total (Jesaitis *et al*, 1983). De ello se deduce que la pérdida de organelas intracelulares llevaría a una alteración de dicho valor porcentual (Sklar *et al*, 1984).

La citometría de flujo ha sido empleada para detectar variaciones en la “*complejidad celular*”. Cuando el rayo laser impacta sobre una célula en particular, parte del haz de luz es desviado en ángulo recto (90^0) respecto de su trayectoria. La luz desviada se denomina *side*

scatter light (SSC) y es detectada por lentes sensoras que determinan su intensidad, la cual guarda relación directa con la granulocidad celular o bien con los constituyentes celulares (Longobardi Givan *et al*,1993).

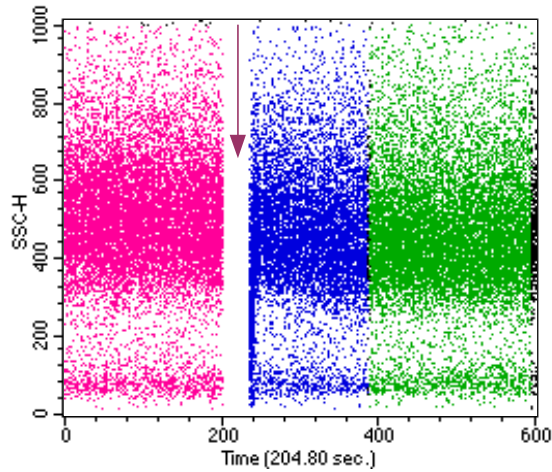
Así, se evaluó la degranulación celular y el porcentaje de células que responden a cada estímulo en particular (Sklar *et al*, 1984). Para ello, los PMNs fueron tratados con FMLP, CB, CB + FMLP y se determinó la variación de SSC en función del tiempo mediante un ensayo de citometría de flujo.

Los gráficos expuestos en la Figura 4.8 indican que no existe degranulación espontánea tanto en neutrófilos controles (4.8.a) como tratados con CB (4.8.b). Por otra parte, el 22% de los PMNs estimulados con FMLP mostraron una modificación poco substancial del SSC (4.8.d) mientras que el 77% de los neutrófilos pretratados con CB modificaron substancialmente dicho parámetro cuando el FMLP fue agregado a la suspensión celular (4.8.c). En este último caso, la respuesta celular fue completada al cabo de 40 segundos.

Las variaciones en la SSC en PMNs tratados con CB + FMLP correlacionaron con un incremento de la secreción de la enzima β -glucuronidasa (control: $2.11 \pm 0.32 \mu\text{g/ ml.}$; CB: $3.22 \pm 0.89 \mu\text{g/ ml.}$; FMLP: $2.32 \pm 0.12 \mu\text{g/ ml.}$; CB + FMLP $12.88 \pm 3.23 \mu\text{g/ ml.}$ CB + FMLP vs. control * $p < 0.01$ Bonferroni Test, dos colas, $n=3$).

Los datos experimentales mostrados en la Figuras 4.7 (sección 4.4.2.1) y 4.8 (esta sección) indican que mientras sólo una parte de los PMNs responden al tratamiento CB + FMLP (Figura 4.8), los Fc γ Rs de la totalidad población celular resultan drásticamente afectados (Figura 4.7). Estos datos sugieren que durante la estimulación celular existen productos de secreción capaces de modular la expresión de ambos Fc γ Rs.

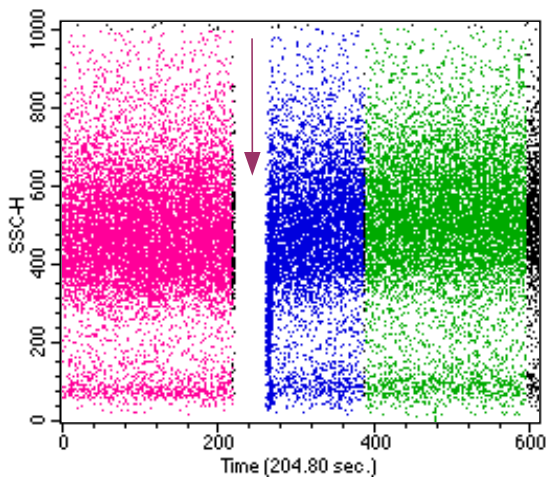
Figura 4.8



Total Events: 40240
 X Parameter: Time Time (204.80 sec.)
 Y Parameter: SSC-H (Linear)

Region	Events	% Total	Y Mean
Rosa: antes del estimulo	14990	37.25	493.81
celeste: estimulo t=0-40seg.	10598	26.34	447.71
verde: estimulo t=40-100 seg	13207	32.82	458.30

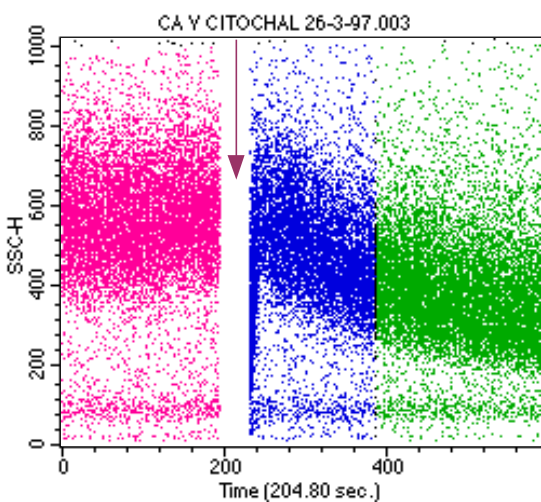
a.



Total Events: 33169
 X Parameter: Time Time (204.80 sec.) (Linear)
 Y Parameter: SSC-H (Linear)

Region	Events	% Total	Y Mean
Rosa: antes del estimulo	12725	38.36	473.49
celeste: estimulo t=0-40seg.	7572	22.83	458.25
verde: estimulo t=40-100 seg	11087	33.43	467.60

b.



Total Events: 42780
 X Parameter: Time Time (204.80 sec.) (Linear)
 Y Parameter: SSC-H (Linear)

Region	Events	% Total	Y Mean
Rosa: antes del estimulo	11243	26.28	541.48
celeste: estimulo t=0-40seg.	10052	23.50	469.70
verde: estimulo t=40-100 seg	12317	28.79	383.01

c.

Figura 4.8. Evaluación de la degranulación de PMNs por efecto del tratamiento CB + FMLP. Los PMNs (5×10^5 cél./ml) fueron sometidos a citometría de flujo para evaluar variaciones de SSC en función del

tiempo (SSC vs. time). Cada punto indica una célula con su correspondiente valor arbitrario de SSC en el momento que es impactada por el rayo laser. Cada región (R_n) está denotada por un color diferente R_1 : rosa, (SCC antes del estímulo) R_2 : azul (SCC estímulo $t=0 - 40$ seg.) R_3 : verde (SCC estímulo $t=40 - 100$ seg.). Cada valor de Y_{mean} es indicativo de la media del valor arbitrario de SSC para cada R_n , *Events*: cantidad de células en cada R_n . *% Total*: porcentaje de la población total que se halla circunscripta a la región R_n . El agonista fue adicionado en el punto indicado por la flecha. a. CB $5\mu\text{g}/\text{ml}$. b. FMLP. c. CB $5\mu\text{g}/\text{ml}$. 5 min. previos al FMLP (en este caso, en R_1 , las células ya se encuentran pretratadas con CB y la flecha indica la adición del estímulo a la suspensión celular. El porcentaje de PMNs respondedores se evaluó según lo indicado en Materiales y Métodos.

4.3.2.3. Evaluación del efecto de sobrenadantes de PMNs tratados con CB+ FMLP.

Los datos previos obtenidos a partir de SN de PMNs tratados con FMLP indican que existen productos de secreción celular responsables en forma total o parcial del fenómeno de *down regulation*. Por lo tanto, los SN de neutrófilos estimulados con CB + FMLP fueron recolectados, centrifugados y dializados contra MCC para eliminar tanto el FMLP como la CB. Posteriormente se evaluó el efecto de dichos SN sobre los $\text{Fc}\gamma\text{Rs}$ de células libres de tratamiento mediante citometría de flujo.

En la Tabla 4.7 se comparan los efectos de los SN de PMNs estimulados con CB + FMLP ó FMLP. Los datos obtenidos indican que los sobrenadantes de PMNs con actividad secretoria maximizada (CB + FMLP), son capaces de ejercer un claro efecto de *down regulation* sobre PMNs libres de tratamiento. Dicho efecto es significativamente mayor al del grupo de células tratado con SN de PMNs estimulados sólo con FMLP. Ello refuerza la idea de que existen elementos de secreción involucrados en la alteración del número de $\text{Fc}\gamma\text{Rs}$ de membrana en los PMNs.

Tabla 4.7. Comparación de la capacidad de *down regulation* de sobrenadantes de PMNs estimulados con CB + FMLP ó FMLP.

Receptor	Tratamiento	
	CB + FMLP	FMLP
	MIF % del control \pm SEM	
Fc γ RIIIB	46.3 \pm 3.3 ^{*#}	72.3 \pm 4.1 [*]
Fc γ RII	48.1 \pm 7.1 ^{*#}	73.7 \pm 2.7 [*]

Tabla 4.7. Neutrófilos (11×10^6 cél. / ml) fueron incubados con CB ($5 \mu\text{g/ml}$) durante los 5 min. previos a la adición de FMLP 10^{-6} M o sólo con FMLP 10^{-6} M por 3 horas a 37°C . Los SN fueron recolectados, centrifugados (10 min 6000 rpm) y dializados contra MCC para eliminar el FMLP ó CB + FMLP remanentes. Posteriormente, neutrófilos (3.5×10^6 cél./ ml.) libres de tratamiento fueron expuestos a dichos SN durante 3 horas a 37°C y marcados para citometría de flujo según se indica en Materiales y Métodos. Los datos se expresan como el porcentaje de la Mediana de Intensidad de Fluorescencia (MIF) \pm SEM respecto de los controles, $n=5$, Test de Bonferroni (dos colas).

* $p < 0.05$, significativamente diferente del grupo de PMNs tratados con sobrenadantes controles. # $p < 0.05$, significativamente diferente de los PMNs tratados con sobrenadantes de PMNs estimulados con FMLP.

4.3.3. Naturaleza del producto(s) de secreción responsable de la “*down regulation*” de los Fc γ Rs.

4.3.3.1. Identificación de la calidad del producto de secreción a través del uso de inhibidores de proteasas.

Con el propósito de evaluar la calidad del producto(s) de secreción de los PMN responsable de la disminución de Fc γ Rs en membrana, los PMNs fueron estimulados con FMLP o CB + FMLP en presencia de diversos inhibidores de proteasas.

Se emplearon, phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) 2mM como inhibidor de proteasas de serina con actividad similar a la tripsina (Ej. tripsina, trombina, plasmina y calicreína) (James *et al*, 1996), Pepstatin 1mM como inhibidor de proteasas aspárticas (Ej., catepsina D, renina

y pepsina) (Eid *et al*, 1981), Thiorphan 10 μ M y Phosphoramidon 10 μ M ambos inhibidores de metaloproteasas (Baznes *et al*, 1996; Y Chin *et al*, 1997) y el inhibidor de proteasas de cisteína, Leupeptin 50 μ M (Savory *et al*, 1993).

Los datos expresados en la Tabla 4.8 indican que la *down regulation* de ambos Fc γ Rs es completamente inhibida por PMSF 2mM confirmando el rol de una proteasa(s) de serina en dicho proceso. La falta de inhibición por parte de los demás inhibidores, permite excluir a un amplio rango de proteasas como responsables de la inducción del proceso de *down regulation* de ambos Fc γ Rs. Se obtuvieron datos similares al estimular a los PMNs con FMLP (no mostrado).

Tabla 4.8.Efecto de los Inhibidores de proteasas sobre la *down regulation* de Fc γ Rs de PMNs estimulados con CB + FMLP.

Tratamiento	Receptor
	MIF % del control \pm SEM

CB + FMLP	Inhibidor	FcγRIIIB	FcγRII
+	-	60.50 ± 3.86*	64.75 ± 1.35*
+	PMSF	93.75 ± 6.025 ^{ns}	98.80 ± 12.2 ^{ns}
+	Thiorphan	71.30 ± 6.97*	59.75 ± 5.73 *
+	Phosphoramidon	64.50 ± 10.86*	65.25 ± 12.56*
+	Pepstatin	55.15 ± 2.32*	58.85 ± 10.14*
+	Leupeptin	44.78 ± 15.72*	55.43 ± 8.31*

Tabla 4.8. Neutrófilos (11×10^6 cél. / ml.) fueron tratados con PMSF (2mM), Phosphoramidón (10 μ M), Pepstatin (1mM), Thiorphan (10 μ M) ó MCC durante los 10 min. previos a la adición de la CB 5 μ g/ ml. y el FMLP 10⁻⁶ M. Luego de tres horas de incubación las células fueron lavadas y marcadas para citometría de flujo según lo indicado en Materiales y Métodos. Los datos son expresados como el porcentaje de la Mediana de Intensidad de Fluorescencia (MIF) \pm SEM respecto de cada grupo control, n= 5, Test de Bonferroni (dos colas).

* p < 0.05, significativamente diferente de los PMNs tratados con FMLP.

^{ns} p > 0.05, no difiere significativamente de los PMNs tratados con FMLP.

4.4. ¿Cómo afecta al pool intracelular de FcγRs el tratamiento de los PMNs con CB + FMLP?

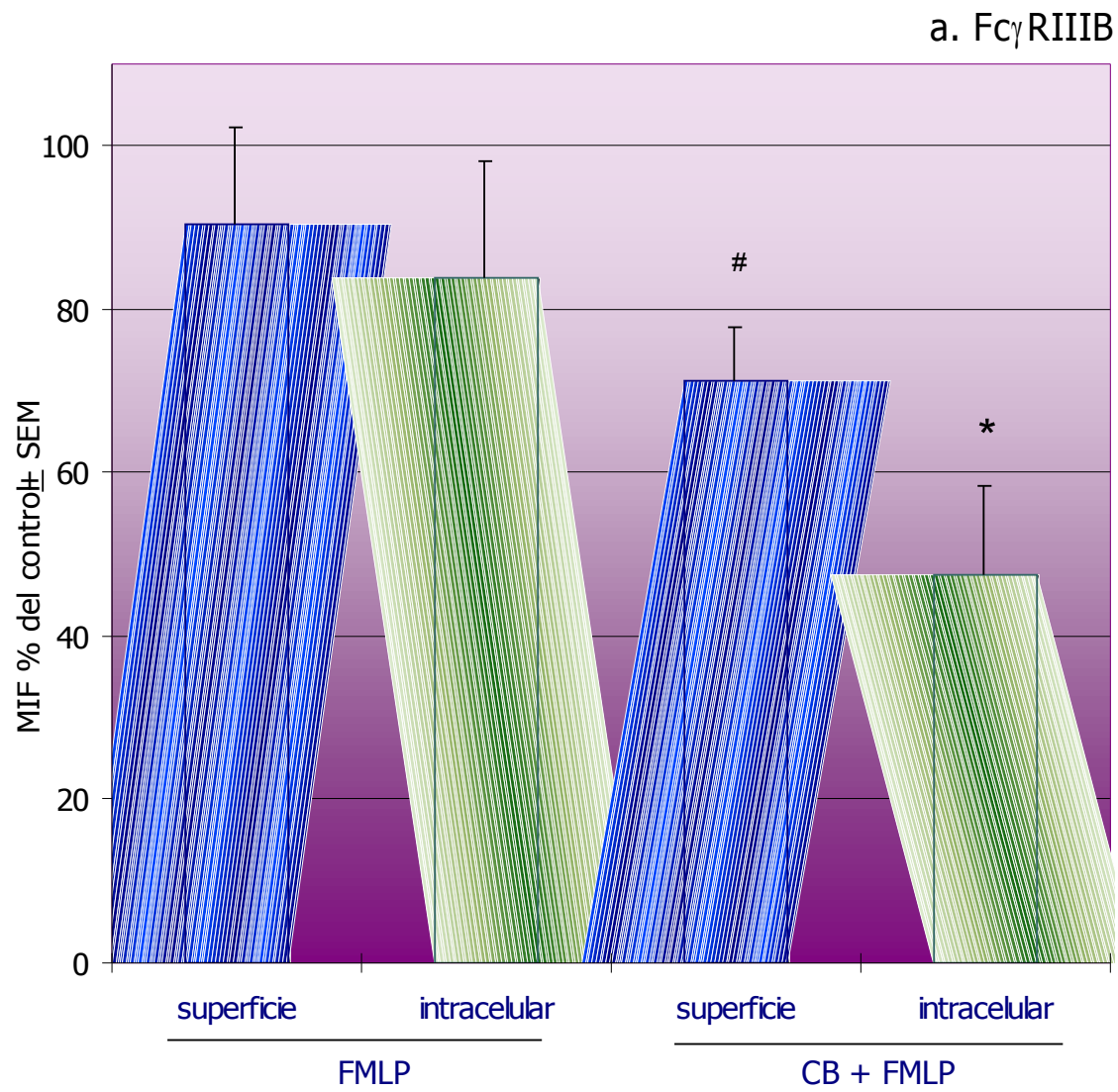
La bibliografía indica que la CB además de exacerbar los fenómenos de secreción celulares, ejerce un efecto disyuntor sobre los microfilamentos de actina (Spudich *et al*, 1973; Smolen *et al*, 1981) afectando funciones celulares como la fagocitosis al inhibir la captación de partículas (Hoffstein *et al*, 1978).

Teniendo en cuenta que la preincubación de los PMNs con CB aumenta significativamente la *down regulation* de ambos FcγRs de membrana inducida por FMLP, se consideró la posibilidad de que este tratamiento afectara de alguna manera la translocación de los FcγRs intracelulares a la membrana de los PMNs. De ser ello factible, quedaría inhibida la recomposición de los FcγRs en superficie, quedando el contenido intracelular de receptores intacto. Para evaluar dicha hipótesis, los PMNs fueron tratados con CB + FMLP, luego de lo cual se evaluó por citometría de flujo el estado tanto del *pool* intracelular como de los FcγRs en la membrana de los PMNs.

La Figura 4.9 indica que en los PMNs tratados con CB + FMLP el contenido del *pool* intracelular disminuye significativamente luego del tratamiento. Al comparar el estado de los *pooles* intracelulares de los PMNs tratados con FMLP ó CB + FMLP, encontramos que este último tratamiento ejerce un efecto más pronunciado respecto del grupo tratado con FMLP. De estos resultados se concluye que el tratamiento con CB + FMLP no altera la translocación tanto del FcγRIIIB (Figura 4.9.a) como del FcγRII (Figura 4.9.b).

Estos datos, junto a aquellos que señalan cambios substanciales en la complejidad celular de los PMNs tratados con CB + FMLP (sección 4.3.2.2), indicarían que tanto los FcγRIIIB como FcγRII intracelulares serían secretados concomitantemente con los gránulos intracelulares.

Figura 4.9



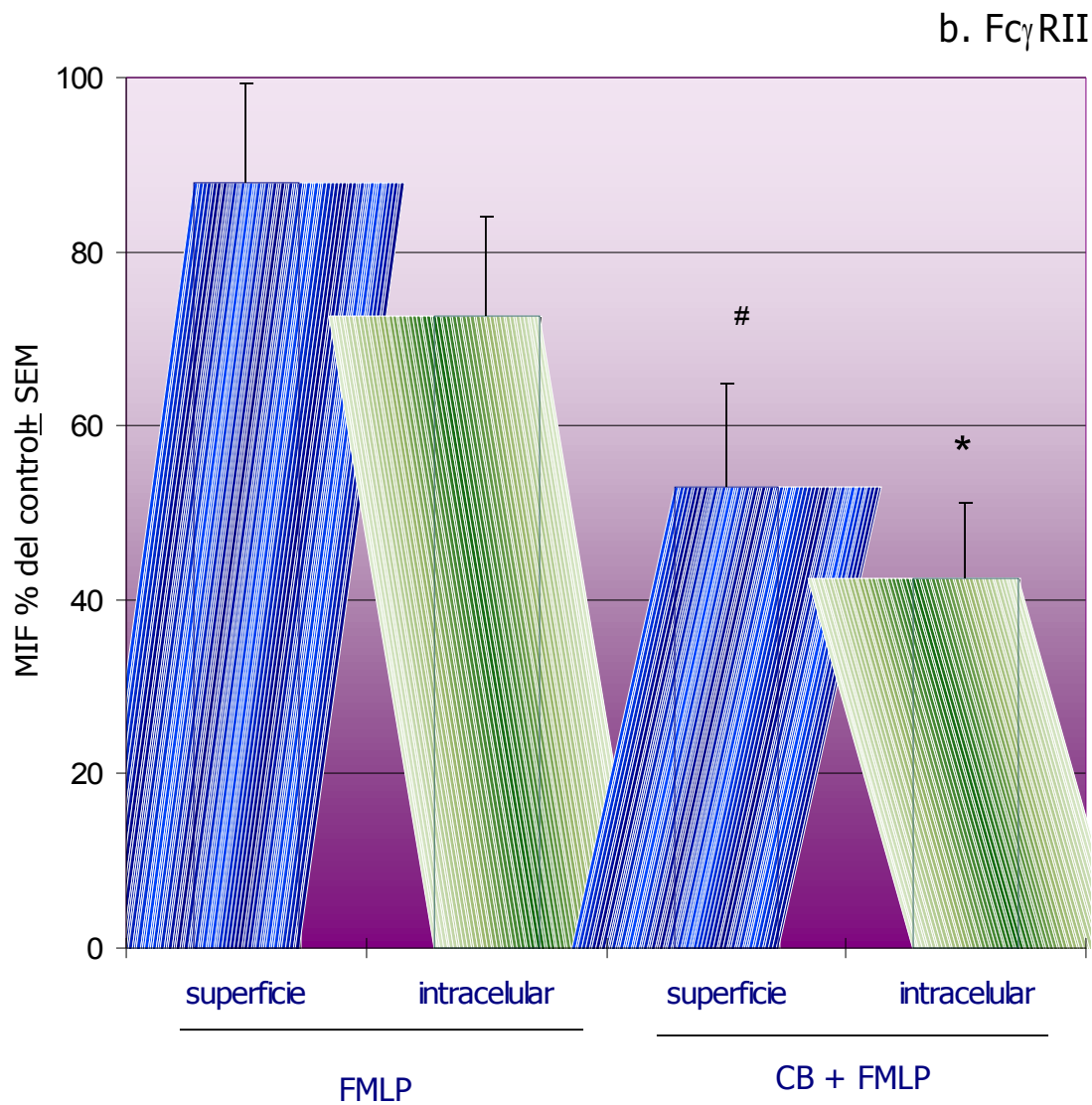


Figura 4.9. Efecto del tratamiento CB + FMLP sobre los *pooles* intracelulares de Fc γ RIIIB y Fc γ RII.

Neutrófilos (11×10^6 cél. /ml) fueron incubados con CB ($5 \mu\text{g/ml}$) durante los 5 min. previos a la adición de FMLP 10^{-6} M. Luego de tres horas de incubación las células fueron lavadas, tratadas con buffer saponina / ovoalbúmina / PBS / glicina (buffer de permeabilización) o buffer ovoalbúmina / PBS / glicina (buffer control) y finalmente marcadas para citometría de flujo según se indica en Materiales y Métodos. Los datos son expresados como el porcentaje de la Mediana de Intensidad de Fluorescencia (MIF) \pm SEM respecto de cada grupo control. 4.9. a. Fc γ RIIIB y 4.9.b Fc γ RII.

* $p < 0.05$ significativamente diferente del pool intracelular de PMNs tratados con FMLP.

$p < 0.05$ significativamente diferente de la expresión de Fc γ Rs de membrana en PMNs tratados con FMLP, $n = 5$, Test de Wilcoxon (dos colas).

4.5. La inhibición de las funciones dependientes de Fc γ Rs se debe sólo a la “down regulation” de ambos Fc γ Rs?

Hemos visto que el FMLP inhibe diversas funciones dependientes de los Fc γ Rs tales como la fagocitosis, el estallido respiratorio y la ADCC. De acuerdo con nuestros resultados, ello podría atribuirse al efecto de *down regulation* de ambos Fc γ Rs ejercido por este péptido formilado.

No obstante, la ADCC, un mecanismo de ataque celular que se desarrolla o activa rápidamente (Scornik *et al*, 1973), fue inhibida por el FMLP sin la necesidad de un tratamiento previo. Ello sugeriría la existencia de un mecanismo inhibitorio de respuesta celular adicional no atribuible a la *down regulation* de ambos Fc γ Rs. Así, podría considerarse que el FMLP es también capaz de modular funciones del PMN alterando mecanismos intracelulares de activación.

4.5.1 Evaluación de la generación de radicales libres a tiempos cortos de tratamiento con FMLP.

Con el propósito de evaluar la capacidad del FMLP de modular las funciones celulares dependientes de los Fc γ Rs en una fase previa a la *down regulation* de ambos Fc γ Rs (entre 0 y 30 min.), se realizaron ensayos de quimioluminiscencia. Esta técnica permite evaluar la función celular en forma rápida e inmediata a la adición de un estímulo en particular.

Así, se determinó la respuesta quimioluminiscente de los PMNs controles o tratados con FMLP por cortos intervalos de tiempo frente a CI. Los resultados de la Figura 4.10 demuestran que

los CI junto al FMLP, ejercen un efecto sinérgico sobre la generación de quimioluminiscencia. Por otra parte, la quimioluminiscencia alcanzó un pico de 20 URQL luego de 5 min de incubación con el péptido. No obstante, la incubación de los PMN durante 15 min., modificó la cinética de la reacción, e inhibió parcialmente la respuesta a los CI.

Ello sugiere que al menos parte del efecto inhibitorio del FMLP puede ser atribuido a la alteración de algún mecanismo(s) intracelular independiente de la expresión de los $Fc\gamma R$ s de superficie de membrana.

Figura 4.10

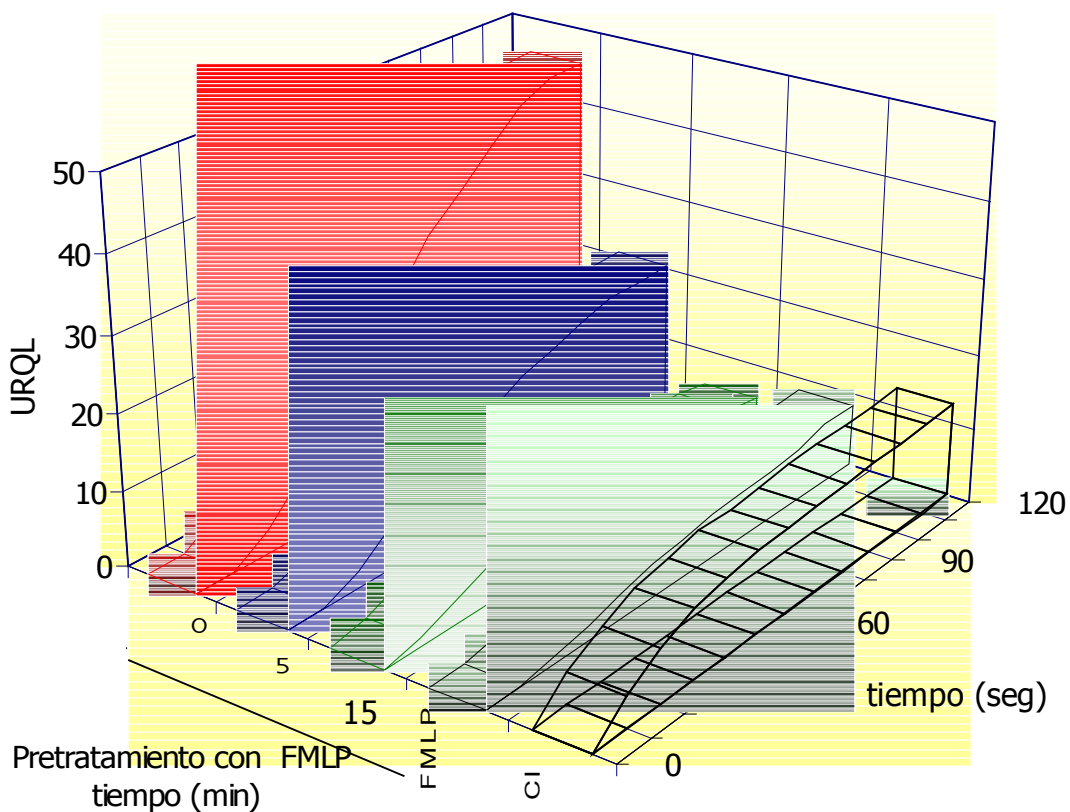


Figura 4.10. Efecto del FMLP en la generación de radicales libres a tiempos cortos de incubación. Neutrófilos (3×10^6 cél. / ml.) fueron tratados con FMLP 10^{-6} M durante 0, 5 y 15 min. la respuesta quimioluminiscente fue evaluada luego de la adición de los CI a la suspensión celular según lo indicado en

Materiales y Métodos. Las células controles fueron estimuladas solo con CI o FMLP. Los datos, expresados en unidades relativas de quimioluminiscencia (URQL), pertenecen a un experimento representativo, n=5.

4.6. Rol del Ca^{2+} extracelular en el proceso de “down regulation”.

4.6.1. Evaluación del efecto del FMLP en medio libre o suplementado con $CaCl_2$ 1mM.

Las respuestas de PMNs a diversos estímulos dependen de la composición del medio extracelular (Smolen *et al*, 1981)). Así, evaluamos el rol del Ca^{2+} extracelular en el proceso de *down regulation* de ambos $Fc\gamma$ Rs. Para ello, los PMNs fueron estimulados con el péptido formilado en medio HBSS suplementado con $CaCl_2$ 1mM (HBSS- Ca^{2+}) o medio HBSS libre de Ca^{2+} (HBSS) y la expresión de ambos $Fc\gamma$ Rs, fue analizada por citometría de flujo.

El experimento representativo, de la Figura 4.11, demuestra que en condiciones libres de Ca^{2+} extracelular, el péptido no induce cambios significativos en los receptores (Figuras 4.11.a-4.11.b). Sin embargo, los PMNs estimulados con FMLP en medio HBSS- Ca^{2+} respondieron homogéneamente al estímulo, detectándose en el 95% de las células una disminución en la intensidad de la fluorescencia celular, indicativa del proceso de *down regulation*. La expresión de $Fc\gamma$ RIIIB y $Fc\gamma$ RII fue el 64% (Figura 4.11.c) y el 61% (Figura 4.11.d) de los controles, respectivamente. Dichos datos son similares a los obtenidos en PMNs estimulados con FMLP en MCC donde el 93% de la población celular responde al estímulo y la expresión de $Fc\gamma$ RIIIB y $Fc\gamma$ RII es el 65% (Figura 4.11.e) y el 68% (Figura 4.11.f) de los controles respectivamente. Los datos expuestos en la Tabla 4.9. indican la significación estadística.

Figura 4.11

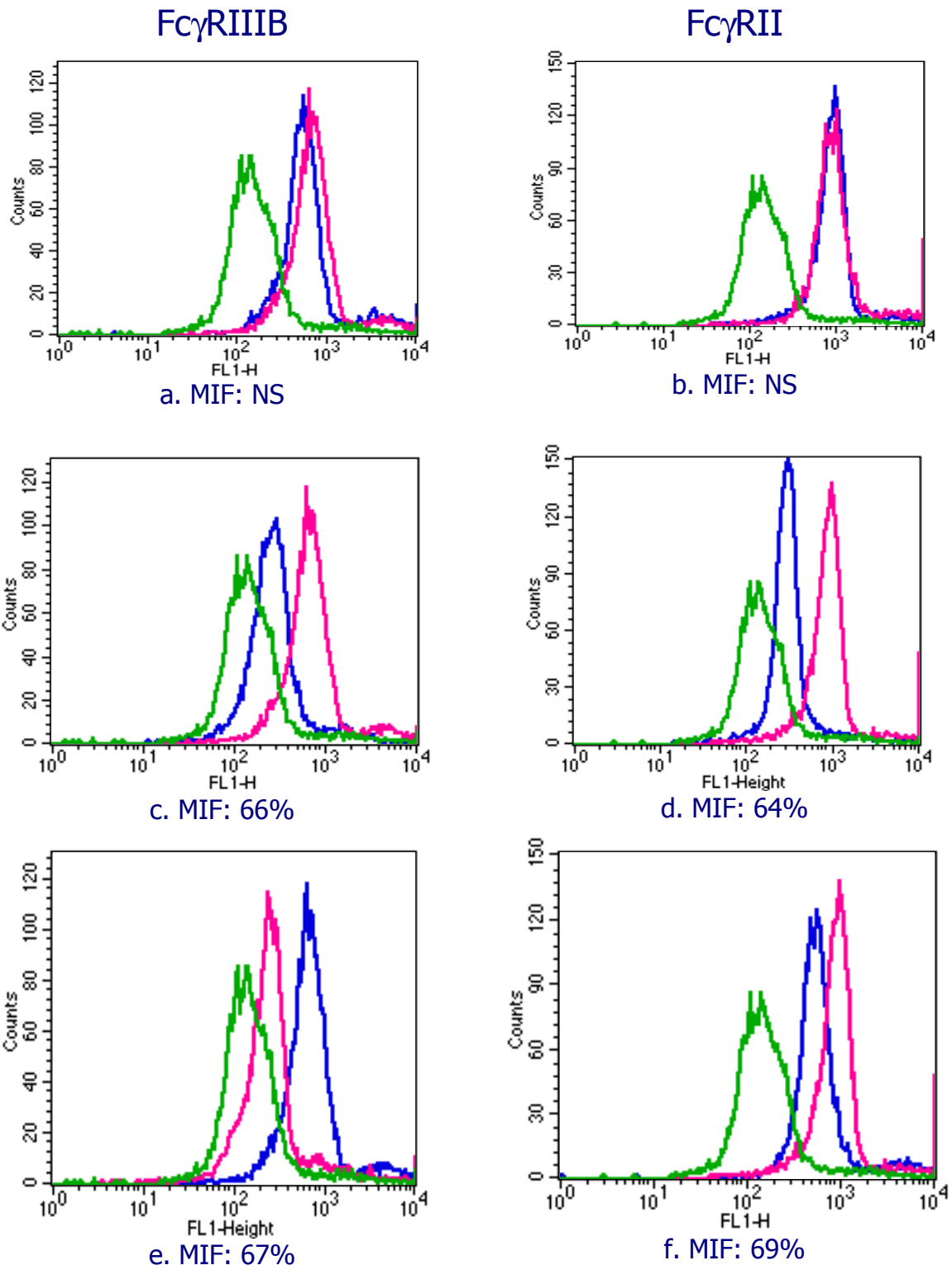


Figura 4.11. Neutrófilos (11×10^6 cel./ ml.) fueron estimulados con FMLP en medio HBSS (a, b), HBSS- Ca^{2+} (c, d) o MCC (e, f). Luego de tres horas de incubación las células fueron lavadas y marcadas para citometría de flujo según se indica en Materiales y Métodos. Los datos son expresados como el porcentaje de la Mediana de Intensidad de Fluorescencia (MIF) respecto de cada grupo control. Fc γ RIIIB (a, c, f). Fc γ RII (b, d, f). Línea verde: control de isotipo irrelevante; línea azul: neutrófilos controles; línea rosa: neutrófilos tratados con FMLP. Eje X: intensidad de fluorescencia (en unidades arbitrarias). Eje Y: número de células.

Tabla 4.9. El Ca^{2+} extracelular es necesario para el proceso de *down regulation* inducido por FMLP.

Condiciones de cultivo	Fc γ RIIIB	Fc γ RII
	MIF % del control \pm SEM	
HBSS	99.5 \pm 0.6 ^{ns}	92.2 \pm 0.9 ^{ns}
Ca^{2+} - HBSS	64.0 \pm 8.1*	65.6 \pm 8.8*
MCC	65.4 \pm 8.2	63.0 \pm 9.6*

Tabla 4.9. Neutrófilos (11×10^6 cel. / ml.) fueron estimulados con FMLP en medio HBSS, HBSS- Ca^{2+} o MCC. Luego de tres horas de incubación las células fueron lavadas y marcadas para citometría de flujo según se indica en Materiales y Métodos. Los datos son expresados como el porcentaje de la Mediana de Intensidad de Fluorescencia (MIF) \pm SEM de los controles, n= 4, Test de Bonferroni (dos colas).

* $p < 0.05$, difiere significativamente de los PMNs controles.

^{ns} $p > 0.05$, no difiere significativamente de los PMNs controles.

4.7. Rol del Ca^{2+} intracelular en la “*down regulation*” de Fc γ Rs por FMLP

4.7.1. Evaluación de la movilización de Ca^{2+} intracelular inducida por FMLP en medio HBSS libre de Ca^{2+} (HBSS) o suplementado con CaCl_2 1mM (HBSS- Ca^{2+})

Es sabido que la estimulación de los PMN con FMLP induce un rápido incremento de los niveles de Ca^{2+} libre intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) (White *et al*, 1983; Elsner *et al*, 1993; Nowak *et al*, 1995) y que dicho fenómeno constituye uno de los primeros eventos en la secuencia de pasos de señalización intracelular (Pozzan *et al*, 1983).

Así, evaluamos los cambios en los niveles de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en células estimuladas con FMLP en medio HBSS (Figura 4.12.a-c) o HBSS- Ca^{2+} (Figura 4.12.b-d). Las variaciones en los niveles de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ fueron estimadas con el marcador Fluo 3-AM, molécula susceptible de fluorescer al interaccionar con $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Merrit *et al*, 1990).

Los histogramas (células o *counts* vs. FL1) representan la movilización del $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en respuesta al FMLP. Se observa que al cabo de 30 seg. de transcurrida la estimulación, ambos grupos muestran un incremento similar de la fluorescencia intracelular, indicativa del aumento de los niveles de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Figura 4.12.1 y Figura 4.12.b). Además, se observó un porcentaje similar de células que respondieron al estímulo (HBSS: 35%, HBSS- Ca^{2+} : 32%).

Se encontraron diferencias significativas a partir de los 300 seg. de tratamiento, donde los niveles de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ fueron significativamente mayores en el grupo estimulado en medio HBSS- Ca^{2+} . La movilización sostenida de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ es indicativa de influjos de Ca^{2+} extracelular (ver Tabla 4.10).

Tabla 4.10. Movilización de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ luego de la estimulación de los neutrófilos con FMLP en medio HBSS o HBSS- Ca^{2+} .

Medio de cultivo	Respuesta de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ [†]	
	t= 30 seg.	t= 300 seg.
HBSS	5.8 ± 0.5 (45.5% \pm 6.7%)	1.8 ± 0.1 (42.2% \pm 5.8%)
HBSS- Ca^{2+}	6.6 ± 0.2 ^{ns} (35.8% \pm 6.1%)	4.1 ± 0.1 [#] (38.3% \pm 6.3%)

Tabla 4.10. † Los datos se expresan como el valor medio del incremento de los niveles de $[Ca^{2+}]_i$ sobre el valor de base \pm SEM. Los datos expresados entre paréntesis constituyen el porcentaje de células que respondieron al estímulo en cada intervalo de tiempo especificado \pm SEM, n=9, Test de Bonferroni (dos colas).^{ns} $p > 0.05$, no difiere significativamente del grupo estimulado con FMLP en medio HBSS a $t = 30$ seg. # $p < 0.05$, difiere significativamente del grupo estimulado con FMLP en medio HBSS a $t = 300$ seg.

Figura 4.12

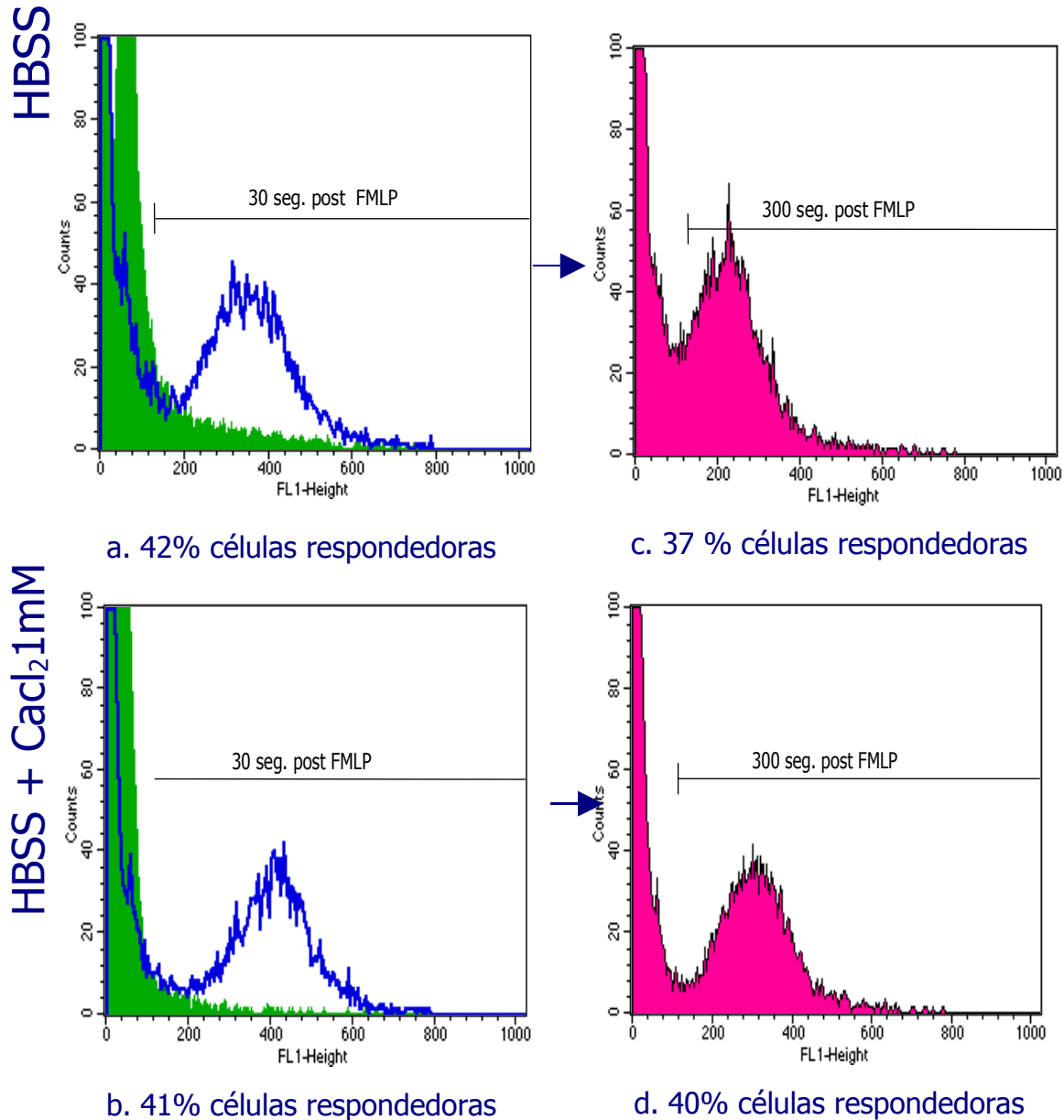


Figura 4.12. Evaluación de la movilización de $[Ca^{2+}]_i$ en neutrófilos estimulados con FMLP en medio HBSS ó HBSS- Ca^{2+} . Neutrófilos (5×10^6 cél. / ml.) fueron tratados con Fluo 3-AM según lo descrito en

Materiales y Métodos. La estimulación celular fue realizada en medio HBSS (a y c) o HBSS- Ca^{2+} (b y d). En la figura se representan histogramas (células o *counts* vs F11) de intensidad de fluorescencia de los neutrófilos no estimulados (histogramas de color), luego de 30 seg. (líneas gruesas) (a b) y 300 seg. post estimulación (histogramas de color) (c y d). Eje X: intensidad de fluorescencia (en unidades arbitrarias). Eje Y: número de células.

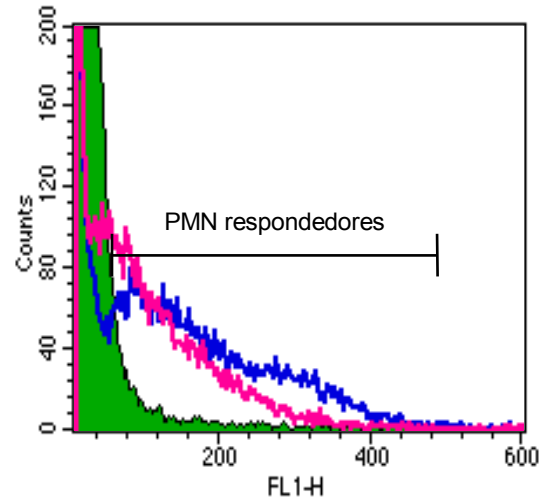
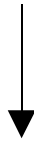
4.7.2. Movilización de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en células pretratadas con el quelante de Ca^{2+} intracelular BAPTA-AM

Para evaluar el rol del Ca^{2+} intracelular en el proceso de *down regulation*, se realizaron ensayos de movilización de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en células pretratadas con el quelante de Ca^{2+} intracelular BAPTA-AM. Las células fueron incubadas con molaridades de BAPTA-AM que oscilaron entre 0.2y 20 μM y posteriormente estimuladas con FMLP.

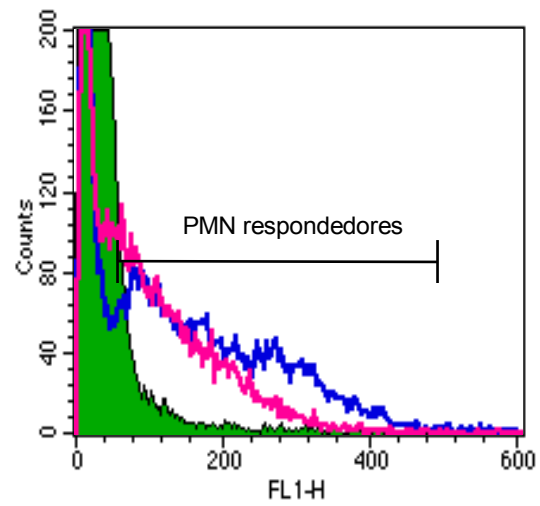
Los gráficos (dot plot: F11 vs tiempo) de la Figura 4.13 pertenecientes a un experimento representativo revelan una disminución de la movilización del $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (interpretada a partir de una disminución de la intensidad de fluorescencia celular) en respuesta a dosis crecientes de quelante. Estos cambios se vieron acompañados, también, por una disminución del número de células respondedoras al estímulo.

Figura 4.13

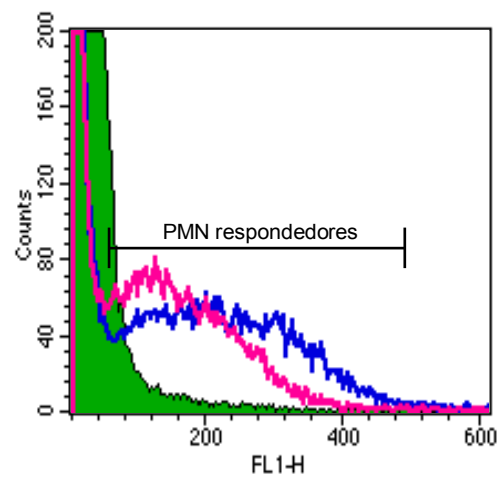
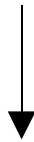
FMLP 10^{-6} M



BAPTA- AM $0.02 \mu\text{M}$ + FMLP 10^{-6} M



BAPTA- AM $0.2 \mu\text{M}$ + FMLP 10^{-6} M



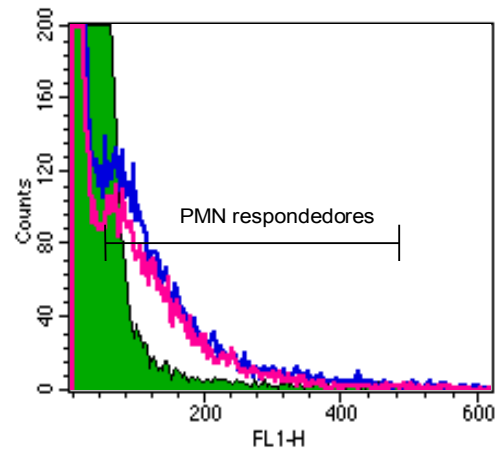
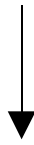
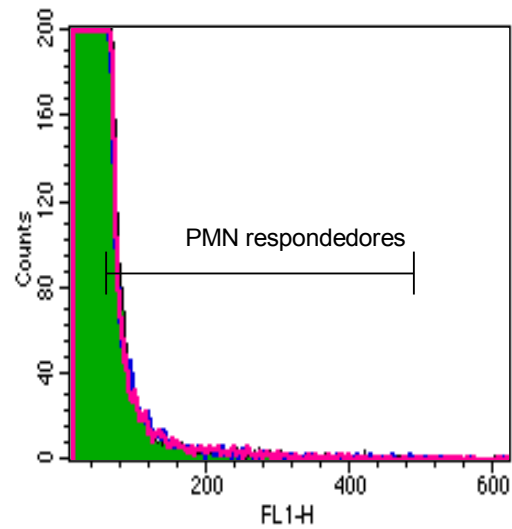
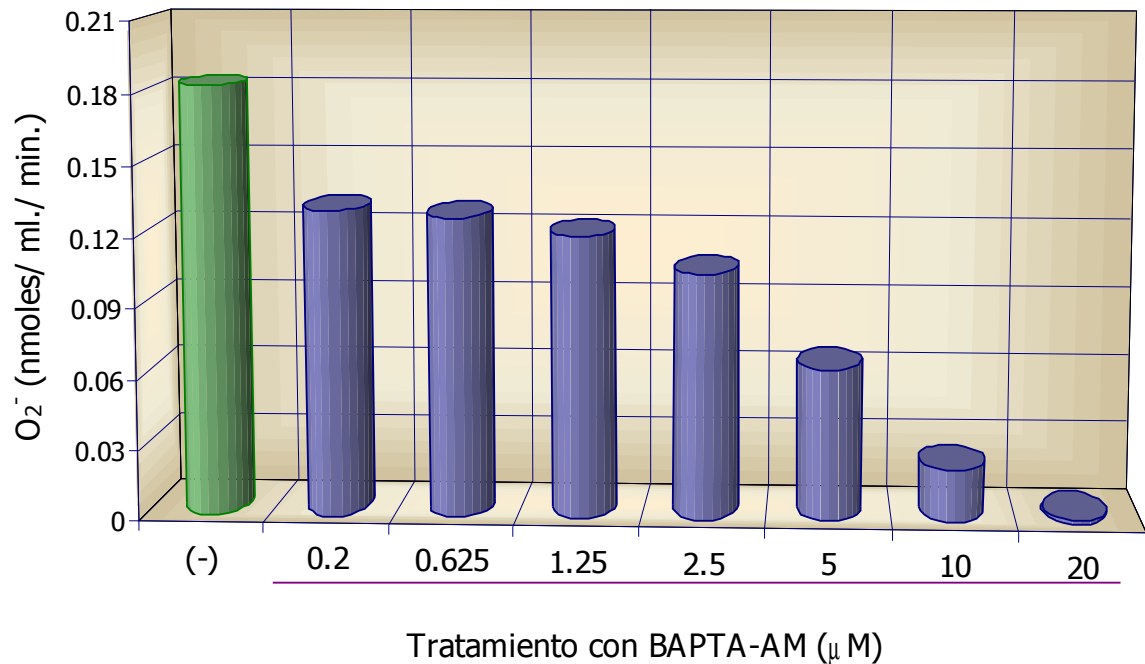
BAPTA- AM 2 μ M + FMLP 10⁻⁶MBAPTA- AM 20 μ M + FMLP 10⁻⁶M

Figura 4.13. Efecto del quelante de Ca^{2+} intracelular BAPTA-AM sobre la movilización de $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Neutrófilos (5×10^6 cél./ ml.) fueron tratados con distintas molaridades de BAPTA-AM y con Fluo 3-AM $4 \mu\text{M}$ según lo descrito en Materiales y Métodos. Posteriormente, las células fueron estimuladas con FMLP. Cada punto indica una célula con su correspondiente valor arbitrario de Fluorescencia (F11) en el momento de ser testeada por el citómetro de flujo (FL1 vs tiempo). Cada Región (R) está denotada por un color diferente: verde, (antes del estímulo), azul (PMN estimulados entre $t= 0-40$ seg.) rosa (PMN estimulados entre $t= 40-100$ seg). El agonista fue adicionado en el punto indicado por la flecha. Los datos también fueron representados en histogramas (células o *counts* vs F11): línea verde (PMN no estimulados), línea azul (PMN estimulados entre $t= 0-40$ seg.) y línea rosa (PMN estimulados entre $t= 40-100$ seg.). El marker que excluye el 100% de las células no estimuladas, señala la población de PMNs respondedores.

4.7.3. Inhibición de respuestas celulares dependientes de la movilización de Ca^{2+} intracelular.

Se evaluó la capacidad del quelante de Ca^{2+} intracelular de inhibir funciones celulares dependientes de la movilización de $[Ca^{2+}]_i$. En este caso particular, la función evaluada fue la producción de anión superóxido en respuesta a FMLP. La Figura 4.14 indica que el quelante inhibe la función en forma dosis- dependiente. El efecto se manifiesta a partir de BAPTA-AM 0.2 μ M, obteniéndose el 100% de inhibición en 20 μ M. Los datos obtenidos de la exclusión del colorante azul tripán, confirman que el 95% de los PMNs mantuvieron su viabilidad. Estos datos corroboran que el BAPTA-AM impide eficazmente el incremento de los niveles $[Ca^{2+}]_i$ en respuesta a un estímulo e inhibe respuestas celulares dependientes de Ca^{2+} .

Figura 4.14



F

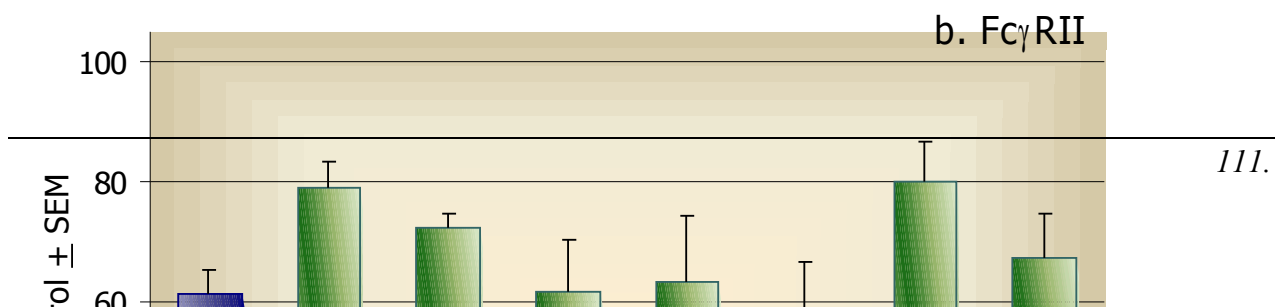
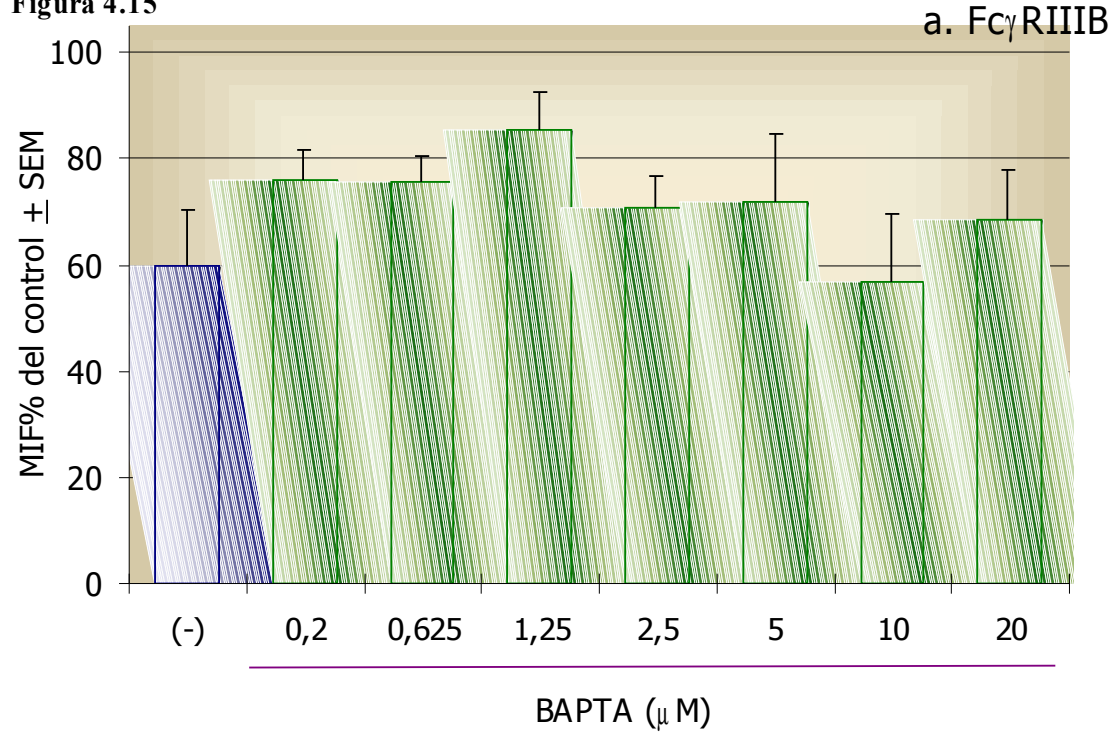
figura 4.14. Efecto de dosis crecientes de BAPTA-AM en la producción de anión superóxido (O_2^-) inducida por FMLP. Neutrófilos (5×10^6 cél./ ml.) fueron tratados con distintas molaridades de BAPTA-AM y con Fluo 3-AM 4μ M según lo descrito en Materiales y Métodos. Posteriormente, las células fueron estimuladas con FMLP y la producción de O_2^- fue evaluada mediante un ensayo de reducción de citocromo C (200μ M), reacción inhibible por superóxido dismutasa (2 mg/ml). Los datos corresponden a un experimento representativo y se expresan como la tasa de nanomoles de O_2^- producidos/ ml/ min.

4.7.3. Expresión de $Fc\gamma$ Rs en PMNs pretratados con BAPTA-AM y estimulados con FMLP.

Los estudios previos indican que molaridades crecientes de BAPTA-AM inhibieron en forma gradual la movilización de $[Ca^{2+}]_i$ inducida por FMLP (Figura 4.13). Dichas observaciones correlacionaron con una disminución en la producción de O_2^- estimulada por el mismo agonista (Figura 4.14). Así, se evaluó el rol de la movilización del Ca^{2+} intracelular sobre la *down regulation* de ambos $Fc\gamma$ Rs.

Los datos que se muestran en la Figuras 4.15.a-b corresponden a un experimento representativo e indican que la *down regulation* tanto del FcγRIIIB como del FcγRII es un proceso relativamente insensible a cambios graduales en los niveles de $[Ca^{2+}]_i$. En efecto, la expresión de ambos FcγRs en PMNs pretratados con BAPTA-AM y posteriormente estimulados con FMLP no resultó significativamente afectada.

Figura 4.15



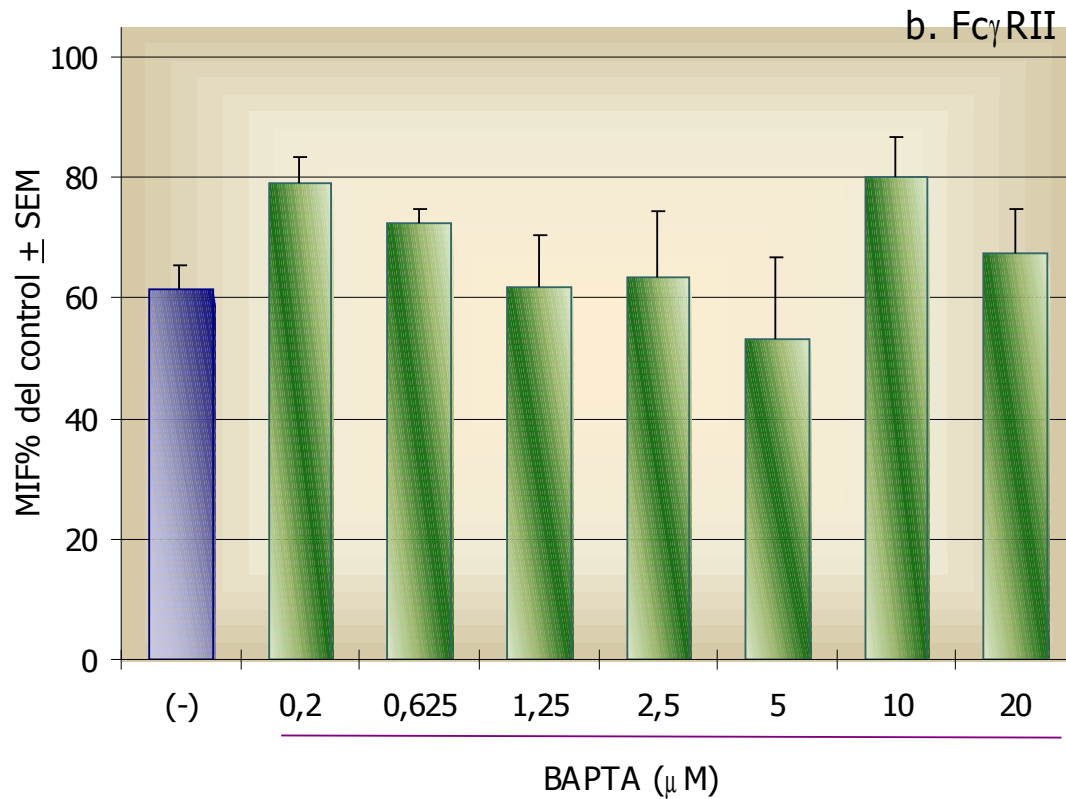


Figura 4.15. Expresión de Fc γ R en PMNs pretratados con BAPTA-AM y estimulados con FMLP. Neutrófilos (11×10^6 cél/ ml.) fueron incubados durante 40 min. con distintas molaridades de BAPTA-AM, según lo indicado en Materiales y Métodos. Posteriormente, los PMNs fueron estimulados con FMLP. Luego de tres horas de incubación las células fueron lavadas y marcadas para citometría de flujo según se indica en Materiales y Métodos. Los datos son expresados como el porcentaje de la Mediana de Intensidad de Fluorescencia (MIF) \pm SEM de los controles, n= 4, Test de Bonferroni (dos colas). (a) Fc γ RIIIB y (b) Fc γ RII

4.8. Evaluación del efecto del FMLP sobre otras moléculas expresadas durante los procesos inflamatorios, la β_2 integrina CD11b-CD18 (Mac-1).

Se ha demostrado que la estimulación celular con agentes pro-inflamatorios como el FMLP, induce la *up regulation* de diversas moléculas de adhesión en escasos minutos, entre las cuales se encuentra Mac-1.

Mientras se desconoce la ubicación específica de Fc γ RII en el compartimento intracelular del neutrófilo, tanto Fc γ RIIIB como Mac-1 están asociadas a la membrana de las vesículas secretorias. Con lo cual es de esperarse que se expresen concomitantemente en la membrana del neutrófilo.

Por otra parte, se ha postulado que las moléculas de adhesión estarían física y funcionalmente asociadas a ambos Fc γ Rs favoreciendo la transducción de señales intracelulares (Petty *et al*, 1996; Stöckl *et al*, 1994; Kohl *et al*, 1986, Sehgal *et al*, 1993; Zhou y Todd, 1991; Zhou *et al*, 1994). Así, debido a la importancia de estas moléculas durante los procesos inflamatorios, se evaluó el efecto del FMLP sobre la expresión de Mac-1 en forma simultánea a la expresión de Fc γ RIIIB y Fc γ RII. Para ello se trataron neutrófilos con FMLP durante 20, 60, 120 y 180 min. y posteriormente se analizó la expresión simultánea de Mac-1, Fc γ RIIIB y Fc γ RII. Los resultados mostrados en la Figura 4.15 indican que el péptido formilado indujo un incremento del $250 \pm 15.3\%$ en la expresión de Mac-1 en sólo 20 min. de tratamiento. Mientras que la expresión de ambos Fc γ Rs se vió disminuída significativamente, la *up regulation* de Mac-1 persistió en el tiempo. Ello indica que la *down regulation* de ambos Fc γ Rs por FMLP (probablemente debida a productos de secreción extracelular), es un evento circunscripto a ambos receptores el cual no involucra el clivaje inespecífico de otras moléculas accesorias a los mismos.

Figura 4.16

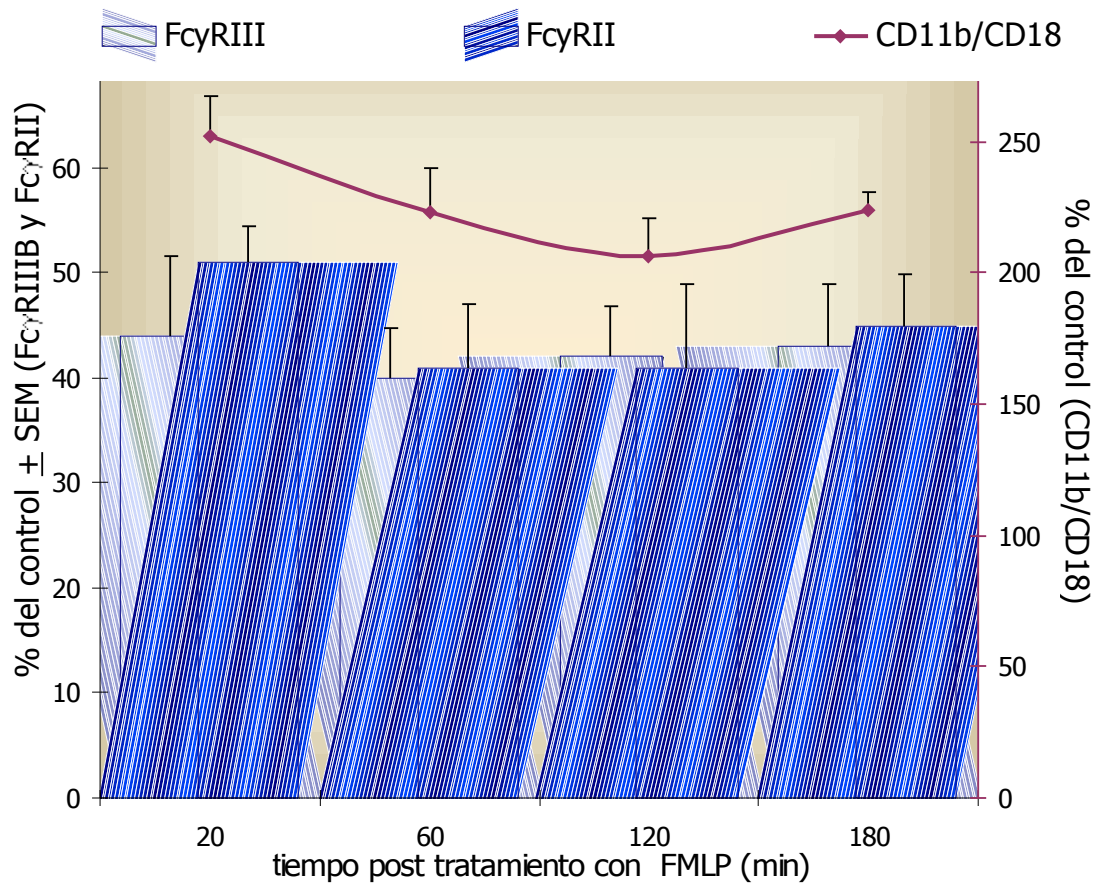


Figura 4. 16 .Efecto del FMLP sobre la expresión de la β_2 integrina, CD11b/CD18 (Mac-1). Neutrófilos (11×10^6 cél./ml.) fueron tratados con FMLP 10^{-6} M por 20, 60, 120 y 180 min.. Luego de tres horas de incubación las células fueron lavadas y marcadas para citometría de flujo según lo indicado en Materiales y Métodos. Los datos son expresados como el porcentaje de la Mediana de Intensidad de Fluorescencia (MIF) \pm SEM del respecto de cada grupo control, n =5. Test de Wilcoxon (dos colas). La expresión de FcγRIII y FcγRII fue significativamente diferente de los PMNs controles en cada tiempo evaluado ($p < 0.05$). idem para CD11b/CD18 ($p < 0.001$).

5. DISCUSION

Los polimorfonucleares neutrófilos son células de vital importancia en la resolución de los focos infecciosos así como también en la generación de la fase aguda de la respuesta inflamatoria.

Los neutrófilos circulantes “perciben” señales provenientes de los focos inflamatorios y migran hacia ellos sufriendo una serie de cambios que vectorizan su movilidad tornándola irreversiblemente unidireccional. Este proceso implica mecanismos de reconocimiento célula-célula, que conducen a la adhesión y extravasación del endotelio capilar y la migración hacia el foco inflamatorio bajo el efecto de diversas moléculas quimiotácticas, ya sea de naturaleza endógena como C5a, PAF, LTB₄, IL-8 o exógena como los péptidos formilados bacterianos. Estos últimos, son probablemente, los agentes quimiotácticos más relevantes del foco infeccioso, siendo extremadamente alta su concentración en dicho punto (0.1- 1μM).

Durante los procesos fisiopatológicos, los neutrófilos desempeñan sus funciones efectoras en un microambiente modificado por citoquinas, mediadores de inflamación, altas concentraciones de péptidos formilados así como también factores humorales como anticuerpos de tipo IgG o componentes activados del sistema complemento. Todos ellos actúan, promoviendo la actividad microbicida del neutrófilo mediante la activación de diversas funciones efectoras mediadas, en gran parte, por los FcγRs. Dichas funciones incluyen la fagocitosis de partículas opsonizadas, la activación del estallido respiratorio, la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y la secreción de gránulos intracelulares, citoquinas y mediadores lipídicos de inflamación.

Como se ha indicado previamente en el apartado *Breve introducción general y Objetivos*, el desarrollo de este trabajo se ha basado en una observación inicial que sugería que los péptidos formilados podían modular las funciones mediadas por los FcγRs en polimorfonucleares neutrófilos.

En principio evaluamos la citotoxicidad celular dependiente de radicales libres ejercida por polimorfonucleares neutrófilos humanos periféricos cuando son expuestos a CI (ligandos naturales de los Fc γ R) ya sea en presencia o ausencia del péptido formilado prototipo, FMLP.

Los resultados obtenidos demostraron que la secuencia de exposición de ambos agonistas a las células efectoras, origina distintas respuestas. En efecto, la interacción simultánea del FMLP y CI con las células efectoras ejerció un efecto sinérgico, en la producción de radicales libres (Figura 4.1). Ello indica que si bien ambos agonistas actúan a través de receptores independientes (Fc γ R y FPR), la señales intracelulares generadas actúan de forma tal que la actividad de la NADPH oxidasa se ve maximizada. No obstante, la incubación de los PMNs con FMLP por un lapso de 1 hora a 37⁰C y la posterior adición de los CI al sistema, no sólo anula el efecto previamente observado sino que conduce a la disminución de la citotoxicidad celular a valores menores que el control. La inferencia inmediata de estos resultados, indica que el efecto de los CI y FMLP sobre los PMNs, es dependiente de la secuencia de presentación de ambos agonistas a la célula efectora.

Si bien el péptido afecta de alguna manera la funcionalidad de complejo enzimático NADPH oxidasa, descartamos un efecto tóxico del FMLP que pueda alterar la estructura de la enzima, debido a que tanto los PMN tratados, como los controles, responden normalmente al ácido araquidónico (AA), un activador directo de dicha enzima (Tabla 4.1) (Uhlinger *et al*, 1993; Henderson *et al*, 1993). Estos datos sugieren que el FMLP inhibe algún mecanismo de transducción de señales intracelulares que da cuenta de la activación de este sistema generador de anión superóxido.

Estos datos nos condujeron a analizar otras funciones dependientes de los Fc γ R como la fagocitosis de partículas opsonizadas, un proceso que depende tanto del grado de sensibilización de la célula blanco o *target* como de la disponibilidad de Fc γ R en las células efectoras. La eficacia

de dicha función está relacionada directamente con el número de interacciones ligando- receptor (Fc de IgG-Fc γ R) que hacen que el proceso de ingestión sea más o menos eficiente.

Los resultados obtenidos en los ensayos de fagocitosis (Figura 4.3) en condiciones óptimas de sensibilización de las células blanco o *target* ($E_{c\text{óptima}}$), permitieron concluir que el tratamiento de los neutrófilos con FMLP no altera los mecanismos de ingestión y destrucción de las partículas sensibilizadas. Sin embargo, al evaluar la fagocitosis de glóbulos rojos sensibilizados con dosis subóptimas de anticuerpos ($E_{c\text{subóptima}}$), advertimos que, a tiempos prolongados de incubación con FMLP (60 y 180 min), la actividad fagocítica disminuye significativamente respecto del control. Esto sugirió la posibilidad de que se operan cambios substanciales en la expresión de los Fc γ Rs en la membrana de los PMN, que modifican en las interacciones ligando- receptor. Estos resultados fueron corroborados en el sistema de citotoxicidad inducida por CI formados en relaciones molares antígeno: anticuerpo de 16:1; 8:1 y 4:1 (exceso de antígeno). Esto es, CI con baja densidad de moléculas de anticuerpo por molécula de antígeno. Sin embargo, la función celular se mantuvo sin cambios respecto del control, cuando las relaciones molares antígeno: anticuerpo fueron óptimas (zona de equivalencia) o bien cuando la densidad de anticuerpos superó a la de las moléculas antígeno (exceso de anticuerpo).

Estos datos permitieron determinar en estos modelos experimentales, que la característica del CI agonista es esencial para la observación del efecto inhibitorio del FMLP sugiriendo probables alteraciones a nivel de los Fc γ R de la membrana del neutrófilo.

5.1 Expresión del los Fc γ RIIIB y Fc γ RII en la membrana del neutrófilo.

El análisis de la expresión de ambos Fc γ Rs en la membrana del neutrófilo mediante la técnica de citometría de flujo aportó datos fundamentales para la comprensión del efecto inducido por el

FMLP. En efecto, la alteración de las funciones dependientes de los FcγRs inducida por FMLP parecen ser una consecuencia de la disminución de la expresión o *down-regulation* de FcγRIIIB y FcγRII en la membrana del neutrófilo (Figura 4.6), ya que ambos receptores desaparecen de la superficie celular a medida que se prolonga el período de incubación con el péptido formilado.

Estudios realizados por Huizinga y col. sugirieron que el FcγRIIIB es liberado al medio extracelular por efecto de concentración de FMLP que oscilan entre 10^{-7} – 10^{-9} M (Huizinga *et al*, 1988), mientras que no se detectaron cambios en la expresión del FcγRII. No obstante, dichos estudios carecen de una evaluación formal de los FcγRIIIB en la membrana del neutrófilo. Mas aún, otros autores sostienen que dicho receptor permanece sin alteraciones en la membrana plasmática, debido a que, en forma concomitante a la liberación del FcγRIIIB al medio extracelular, se opera una translocación del FcγRIIIB desde un reservorio o *pool* intracelular a la membrana del neutrófilo (Tosi *et al*, 1992). No obstante, nosotros observamos una disminución significativa de la expresión del FcγRIIIB luego de la incubación prolongada con FMLP. Estas diferencias podrían deberse a los protocolos experimentales empleados, que involucraron diferentes tiempos de incubación y fundamentalmente a las concentraciones menores de FMLP utilizadas (10^{-7} M- 10^{-8} M) por esos autores, en las cuales nosotros no observamos efecto alguno de este péptido sobre la expresión de ambos FcγRs.

Con respecto al FcγRII, los estudios de Huizinga y col. indicaron que la expresión de este receptor no fue modificada por el FMLP en ninguna de las dosis utilizadas (10^{-7} M – 10^{-9} M) (Huizinga *et al*, 1988), y en nuestro conocimiento no hay estudios posteriores que reporten cambios en la expresión de FcγRII en la membrana de los neutrófilos humanos luego de la activación celular. Sólo se han comunicado alteraciones en la expresión de dicho receptor en la membrana de linfocitos B activados (Sármay *et al*, 1991).

Los resultados experimentales obtenidos indican que la cantidad de Fc γ R_s residuales luego del tratamiento con FMLP varía en forma notoria en cada dador evaluado. Así, el rango de Fc γ RIIIB remanentes al cabo de una hora de tratamiento osciló entre 34- 92 % respecto del control, en tanto que para Fc γ R_{II} los valores obtenidos variaron entre 48-100 %. Estas observaciones correlacionaron con distintos grados de inhibición detectados en las funciones dependientes de dichos receptores.

Diversos autores indican que tanto el Fc γ R_{II} como el Fc γ RIIIB están presentes en la superficie celular así como también en reservorios o *pooles* intracelulares (Jost *et al*, 1990; Simms *et al*, 1994). Con respecto al Fc γ RIIIB, Turner y col. observaron que el Fc γ RIIIB intracelular constituye mas del 50% del contenido total de este receptor (Turner *et al*, 1988). Además, se ha demostrado que tales receptores se encuentran en la membrana de las vesículas secretorias (Borregaard *et al*, 1993), mientras que no se conoce la localización intracitoplasmática de los Fc γ R_{II}.

Debido a que estos reservorios o *pooles* constituirían una “fuente potencial” de receptores de superficie, se evaluaron simultáneamente los cambios cuantitativos de ambos Fc γ R, a nivel intracelular y de membrana luego del tratamiento con FMLP. Los datos obtenidos a partir de la permeabilización celular (Tabla 4.3), indicaron que los reservorios intracelulares disminuyen notablemente con el tratamiento, indicando que los neutrófilos movilizan activamente los Fc γ R_s intracelulares con posterioridad a la activación por parte del péptido formilado.

Con respecto al Fc γ RIIIB, Tosi y col. han sugerido que luego de la pérdida de este receptor en la superficie celular existe un proceso de recomposición que se opera rápidamente (15 min.) como consecuencia del aporte de Fc γ RIIIB desde el *pool* intracelular (Tosi *et al*, 1992). No obstante, los resultados obtenidos en el presente trabajo indican lo contrario (Tabla 4.3). En los neutrófilos tratados con GPI-PLC se observa *down regulation* de los Fc γ RIIIB residuales a partir de los 15

minutos de tratamiento con FMLP y nunca recomposición de dicho receptor en el intervalo de tiempo estudiado (Tabla 4.4). Así, nuestros resultados indican que la *down regulation* tanto de Fc γ RIIIB como de Fc γ RII perdura en el tiempo, a pesar de la disminución del contenido intracelular de ambos Fc γ Rs.

La falta de recomposición en la membrana celular a expensas del *pool* intracelular de receptores, sugiere por lo menos dos posibilidades: que la cinética de remoción del receptor sea igual o mayor a la cinética de reexpresión en la membrana del neutrófilo o bien, en términos más simples, que los Fc γ Rs intracelulares fueran secretados directamente al medio extracelular. En este último caso, podría considerarse que la secreción de los Fc γ Rs intracelulares y la eliminación de los mismos de la membrana del neutrófilo constituirían dos eventos independientes.

Los datos obtenidos de la evaluación simultánea de la expresión de Fc γ RIIIB y la β_2 integrina CD11b/CD18 (Mac-1) con posterioridad a la estimulación con FMLP, indican un comportamiento selectivo del péptido formilado sobre la expresión de receptores de membrana. En efecto, tanto Mac-1 como Fc γ RIIIB forman parte de los constituyentes de membrana de las vesículas secretorias, y son los primeros componentes intracelulares que se movilizan en respuesta al FMLP y otros estímulos quimiotácticos. Así, las diversas moléculas asociadas a sus membranas se sobreexpresan rápidamente en la superficie celular del neutrófilo con posterioridad a la estimulación celular (Chatila *et al*, 1989; Diamond *et al*, 1993; Borregard *et al*, 1993). Sin embargo, las observaciones realizadas indican que mientras la expresión de Mac-1 se incrementa un 200 % a los 20 min. de tratamiento y se mantiene en dichos niveles durante toda la fase experimental, la expresión tanto de Fc γ RIIIB como de Fc γ RII disminuye considerablemente en el mismo intervalo de tiempo.

5.2. Mecanismos de eliminación o shedding de los Fc γ Rs de membrana citoplasmática

Como consecuencia de los resultados obtenidos, se evaluó la posibilidad de que productos de secreción inducidos por FMLP puedan afectar la expresión de ambos Fc γ Rs en el contexto extracelular del neutrófilo. Como es sabido, los neutrófilos poseen una amplia batería de enzimas proteolíticas que se liberan al medio extracelular (Borregard *et al*, 1993). Estas últimas, pueden modificar el microambiente celular causando alteraciones en la expresión de algunas moléculas de la membrana del neutrófilo. Así, diversos autores han reportado que con posterioridad a la estimulación celular, diversas moléculas son clivadas enzimáticamente de la superficie celular, siendo liberadas al medio extracelular (Bâzil, 1995)

La serie de experimentos destinados a investigar los mecanismos de eliminación o *shedding* de ambos Fc γ Rs, permitieron determinar la existencia de un componente de secreción celular como responsable, al menos en parte, del fenómeno de *down regulation* inducido por FMLP. En efecto, los estudios realizados con sobrenadantes de neutrófilos estimulados con FMLP aportaron evidencia acerca de que un producto(s) de secreción es el inductor del fenómeno de *down regulation* de ambos Fc γ Rs (tabla 4.5). Así, encontramos que los sobrenadantes dializados de neutrófilos estimulados con FMLP pueden reproducir el efecto del FMLP en células libres de tratamiento indicando que durante la activación celular se secretan moléculas que actúan específicamente sobre ambos receptores. Estos datos se contraponen a los mencionados por Huizinga y col., quienes postulan que la enzima que da cuenta de la *down regulation* del Fc γ RIIB está unida a la membrana. Este grupo observó *down regulation* del Fc γ RIIB inducida por FMLP en citoplastos, neutrófilos libres de núcleos y gránulos intracelulares capaces de desempeñar funciones de membrana (Ej.: estallido respiratorio) (Huizinga *et al*, 1990).

Por otra parte, los resultados obtenidos luego del tratamiento de los neutrófilos con un agente promotor de la secreción celular como la citochalasina B y la posterior estimulación

celular con FMLP, refuerzan la hipótesis planteada. La citochalasina B incrementa la secreción de los constituyentes intracelulares preformados en células inflamatorias convirtiendo estímulos con escasa o nula actividad secretagoga en poderosos agentes inductores de secreción (Henson *et al*, 1973). La evaluación de los receptores expresados en la membrana de neutrófilos tratados con CB + FMLP refleja cambios cuantitativos altamente significativos al nivel de la membrana plasmática (Tabla 4.6 y Figura 4.7). La expresión de Fc γ RIIB disminuyó un $79.08 \pm 2.39\%$ en tanto que Fc γ RII disminuyó a $59.88 \pm 3.35\%$. Dichos valores porcentuales son significativamente menores a los obtenidos en células tratadas sólo con FMLP, lo que sugiere que la abrupta *down regulation* de ambos Fc γ Rs de membrana se opera como consecuencia de la maximización de la secreción de los constituyentes celulares. Este hecho que fue corroborado al detectar una disminución significativa del contenido intracelular de Fc γ Rs de células estimuladas con CB + FMLP.

Por otra parte, se ha observado que la variabilidad de respuesta al tratamiento CB + FMLP es relativamente baja. En efecto, en contraposición al tratamiento con FMLP, los neutrófilos de diversos donadores tratados con CB + FMLP respondieron homogéneamente a dicho estímulo. Estos datos indican que cuando se maximizan las respuestas secretorias, los neutrófilos se hayan expuestos a la máxima capacidad del sistema para eliminar los Fc γ Rs de superficie. Por otra parte, se observó que la expresión de ambos receptores fue modificada diferencialmente. Ello podría explicarse en términos de una diferencia de susceptibilidades al producto(s) de secreción o bien a la existencia de impedimentos estéricos dados por la conformación molecular de cada Fc γ R (sección 4.2.3 de la Introducción) que restrinja la acción de ese producto(s) sobre los Fc γ Rs (Anderson *et al*, 1986).

La evaluación de la secreción celular mediante ensayos de citometría de flujo permitieron esclarecer aún más este punto. Esta técnica permite detectar variaciones en la complejidad o SSC y correlacionarlas con fenómenos de degranulación celular (Longobardi Givan *et al*, 1993), así como

también determinar el porcentaje de células que responden a un estímulo. Los resultados obtenidos indicaron que sólo el 22% de la población total de neutrófilos degranularon en respuesta al FMLP (Figura 4.8.b). Sin embargo, los datos previos (Figura 4.6) indican que la mayoría de los neutrófilos sufre modificaciones en la expresión de ambos Fc γ Rs como consecuencia de este tratamiento. Por otra parte, cuando los PMNs fueron estimulados con CB + FMLP se detectó no sólo una mayor degranulación celular (Figura 4.8.c) sino también un mayor porcentaje de células respondedoras (77%) dicho estímulo, el cual fue 3.5 veces mayor respecto del grupo tratado sólo con FMLP. Además, el tratamiento CB + FMLP modifica también en forma altamente significativa los Fc γ Rs de la totalidad de la población (Figura 4.7).

Así, el hecho de que el sólo 22% de los neutrófilos respondan al FMLP, mientras que el efecto de *down regulation* sea extensivo al 90% de la población de células, sólo puede explicarse sobre la base de que exista una molécula(s) con actividad enzimática específica para Fc γ Rs que se libera al medio extracelular. Por otra parte, los datos obtenidos con los sobrenadantes de células estimuladas con FMLP donde se observa una pérdida significativa de Fc γ RIIIB y Fc γ RII en células tratadas con dichos sobrenadantes (Tabla 4.7) contribuyen a soportar aún más nuestra hipótesis.

La heterogenidad de respuesta observada hacia el FMLP concuerda con lo observado con otros agonistas. En efecto, si bien diversos estudios realizados *in vitro* sobre neutrófilos evalúan la respuesta de la población celular total, hay evidencias que indican que los neutrófilos no responden homogéneamente a un estímulo particular (Elbin *et al*, 1993, Spangenberg *et al*, 1987).

5.3. Naturaleza del producto(s) de secreción responsable(s) de la down regulation de los Fc γ Rs.

Con respecto a la calidad del producto(s) de secreción responsable de la *down regulation* de ambos Fc γ Rs, el uso de los distintos inhibidores de proteasas permitió verificar que se trata de una

proteasa de serina (Tabla 4.8). En efecto, el fenómeno de *down regulation* es revertido completamente por PMSF, un inhibidor de un amplio espectro de proteasas de serina, que incluyen algunas enzimas de los gránulos azurófilos como la elastasa y las catepsinas.

El hecho de que thiorphan, phosphoramidon, leupeptin y pepstatin no puedan revertir el efecto del tratamiento con FMLP ó con CB + FMLP, permitió descartar a metaloproteasas (thiorphan, phosphoramidon), proteasas aspárticas (pepstatin) y proteasas de cisteína (leupeptin) como responsables de la inducción de tal efecto.

Cabe mencionar que el FMLP no induce la exocitosis de gránulos azurófilos (Huizinga y de Haas, 1990) mientras que neutrófilos primados con CB y expuestos al FMLP si lo hacen (Zurier *et al*, 1973). No obstante, el PMSF revertió el efecto de ambos tratamientos con lo cual, podríamos estimar que se trata de una enzima presente en las vesículas secretorias, en los gránulos de gelatinasa o específicos (ver sección 4.2.3.3.4.1 de la Introducción)

Con respecto a Fc γ RIIIB, diversos autores han postulado que este receptor sería eliminado por la acción de una fosfolipasa C endógena con posterioridad a la activación celular (Huizinga *et al*, 1988) en neutrófilos o bien por la acción de una metaloproteasa en células natural killer (Harrison *et al*, 1991). No obstante, nuestra evidencia sumada a la de otros autores (Bâzil, 1995; Huizinga y de Haas, 1990), indica que una proteasa y no una lipasa es la molécula responsable del clivaje fisiológico del Fc γ RIIIB.

5.4. ¿La inhibición de las funciones dependientes de Fc γ Rs se debe sólo a la “down regulation” de ambos Fc γ Rs?. Efecto del FMLP sobre la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) y la quimioluminiscencia.

Con respecto a la ADCC, los resultados obtenidos indican que la preincubación de los neutrófilos con FMLP no fue necesaria para detectar la inhibición de dicha función. Teniendo en cuenta que la *down regulation* de los Fc γ Rs inducida por FMLP no se observa sino hasta después de los 30 minutos de incubación, y que la ADCC es una función que se inicia rápidamente (Scornik *et al*, 1973), es muy factible que el péptido formilado pueda modificar dicha función a través de la modificación de eventos intracelulares que operan tempranamente. Esto se verificó al evaluar la quimioluminiscencia inducida por los CI, en donde se observó que el pretratamiento de los PMN con FMLP durante 15 minutos, prolongó la fase lag, redujo la pendiente de la curva de respuesta, y disminuyó el pico de quimioluminiscencia, al comparar con las curvas de respuesta controles. Ello sugiere que el FMLP, a tiempos cortos de incubación, conduce a un estado de no-respuesta (anergia) parcial en los neutrófilos para desempeñar ciertas funciones dependientes de los Fc γ Rs, a pesar de la presencia de dichos receptores en la membrana celular.

5.5. Papel del Calcio en el proceso de “down regulation” de Fc γ RIIB y Fc γ RII inducida por FMLP.

La bibliografía indica que las respuestas de los neutrófilos a diversos estímulos son dependientes de la composición del medio extracelular (Smolen *et al*, 1981, Korchak *et al*, 1984; Pozzan,*et al*, 1983). Particularmente, los neutrófilos humanos requieren Ca²⁺ extracelular para llevar a cabo diversas funciones celulares tales como la fagocitosis, quimiotaxis y la liberación de enzimas lisosomales y la generación de radicales del oxígeno (Smolen *et al*, 1981)

El análisis de la expresión de ambos Fc γ Rs por citometría de flujo en neutrófilos tratados con FMLP en presencia o ausencia de Ca²⁺, demuestra que el Ca²⁺ extracelular cumple un rol fundamental en el proceso de *down regulation* de ambos receptores (Tabla 4.9 y Figura 4.11). Estos

datos se contraponen a los obtenidos por Tosi y col. quienes observaron que la liberación del Fc γ RIIB es independiente del Ca²⁺ extracelular dado que el quelante de Ca²⁺ EDTA no anuló el efecto del péptido formilado (Tosi *et al*, 1992) .

Así, teniendo en cuenta la dependencia de Ca²⁺ del fenómeno de *down regulation*, se verificó la posibilidad de que el Ca²⁺ extracelular sea necesario para promover influjos de Ca²⁺ conducentes a la activación celular y así generar el fenómeno de *down regulation* de ambos Fc γ Rs.

Con respecto a los niveles de Ca²⁺ intracelular ([Ca²⁺]_i), es sabido que la estimulación de los neutrófilos con FMLP induce un incremento substancial del [Ca²⁺]_i (White *et al*, 1983; Elsner *et al*, 1983; Nowak *et al*, 1995) y que dicho evento constituye uno de los primeros pasos de señalización conducentes a la activación celular (Pozzan *et al*, 1983). El análisis de la movilización de [Ca²⁺]_i utilizando Fluo 3-AM indica que un porcentaje semejante de neutrófilos estimulados con FMLP en medio HBSS ó HBSS- Ca²⁺ (HBSS: 42.5% \pm 6.7%, HBSS- Ca²⁺: 35.8% \pm 6.1%) movilizan niveles similares de [Ca²⁺]_i durante los primeros 30 seg. de estimulación. Esta observación es acorde con los datos comunicados por Demaurex y col. (Demaurex *et al*, 1994), e indica que esta primera señal de activación es estrictamente dependiente del Ca²⁺ intracelular, por lo que se excluye la posibilidad de que tal señal constituya el paso limitante de la *down regulation* de ambos Fc γ Rs inducida por FMLP.

No obstante, al cabo de 300 seg. de tratamiento, sólo los neutrófilos estimulados en medio HBSS- Ca²⁺ mostraron movilización de [Ca²⁺]_i sostenida en una parte de la población total (38.3 \pm 6.3%) (Tabla 4.10), indicando influjos de Ca²⁺ extracelular en dicha fracción de células. Estos datos son concordantes con aquellos obtenidos al estudiar los eventos de degranulación en neutrófilos estimulados con FMLP ó CB + FMLP (sección 4.3.2.2.), donde sólo parte de la población celular respondió a dichos estímulos.

El hecho de que en un medio suplementado con Ca^{2+} la señal de activación intracelular inducida por FMLP se propage en una parte de la población celular mientras que la mayoría de los neutrófilos tiene la expresión de ambos $\text{Fc}\gamma\text{Rs}$ afectada, refuerza la hipótesis de que tal señal pueda inducir la secreción de alguna molécula difusible capaz de modificar la expresión de $\text{Fc}\gamma\text{RIIIB}$ y $\text{Fc}\gamma\text{RII}$. Este razonamiento está apoyado por las referencias de otros autores que indican que neutrófilos expuestos a FMLP en presencia de Ca^{2+} extracelular liberan cantidades substanciales de enzimas (Smolen *et al*, 1981; Elbin *et al*, 1993; Forehand *et al*, 1989).

Sin embargo, estos datos no explican el hecho de que el 95% de la población de neutrófilos tenga disminuido el contenido intracelular de ambos receptores. No obstante, ello podría explicarse como un efecto compensatorio secundario y que la movilización del *pool* intracelular se opere en respuesta a la *down regulation* de ambos $\text{Fc}\gamma\text{Rs}$ en la superficie celular.

Los estudios en donde el Ca^{2+} intracelular fue quelado por efecto del BAPTA-AM indicaron que esta molécula inhibe eficientemente la movilización de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en respuesta a FMLP en forma dosis dependiente (Figura 4.13). Esto fue corroborado al evaluar la producción de radicales libres inducida por FMLP (Figura 4.14) una función celular que depende de la movilización del $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Smolen *et al*, 1981).

Los datos obtenidos al evaluar la *down regulation* de ambos $\text{Fc}\gamma\text{Rs}$ en neutrófilos pretratados con BAPTA-AM y estimulados con FMLP en medio suplementado con CaCl_2 1mM, indican que la *down regulation* de ambos $\text{Fc}\gamma\text{Rs}$ es un proceso insensible a los cambios en los niveles de $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, la importancia del Ca^{2+} extracelular estaría circunscripta estrictamente al medio externo sugiriendo que este ion estaría involucrado en la activación de las enzimas secretadas por los neutrófilos.

5.5. Implicancia biológica del proceso de down regulation de FcγRIIB y FcγRII.

Hemos observado que el FMLP es capaz de inhibir funciones dependientes de los FcγRs a través de dos mecanismos diferentes. Uno de ellos, y probablemente el más importante, es la *down-regulation* de los FcγRIIB y FcγRII. En tanto que el segundo parecería estar relacionado con la inhibición de eventos intracelulares que se inducen tempranamente.

Hay un punto importante para discutir, la concentración relativamente alta de FMLP necesaria para que se manifieste la *down regulation* de ambos FcγRs. Diversos estudios han indicado que existe saturación del receptor para péptidos formilados (FPR) en concentraciones de FMLP inferiores a las usadas en el presente trabajo (10^{-6} M) (Korchack *et al*, 1984; Sklar *et al*, 1985; Showel *et al*, 1976; Jesaitis *et al*, 1984). Por otra parte, otros autores han descripto también que la regulación de muchas funciones de neutrófilos humanos requiere concentraciones altas de FMLP (10^{-6} M = 1μM). Tal es el caso de la inducción de la secreción de lisozima (Goldman *et al*, 1985), la maximización del pegado o *binding* de la proteína G (GTPγ) a la membrana del neutrófilo o la desensibilización de la actividad GTPasa inducida por C5a (Tomhave *et al*, 1994). También se ha observado en neutrófilos primados con TNF-α, que el estallido respiratorio se maximiza cuando los neutrófilos son estimulados con FMLP 10^{-5} M (Elbin *et al*, 1994) o bien que la máxima liberación de anión superóxido en neutrófilos primados con LPS se induce con FMLP 10^{-6} M y que tal concentración incrementa notablemente los niveles de $[Ca^{2+}]_i$ (Forehand *et al*, 1989).

Este conjunto de resultados, en apariencia contradictorios, nos conducen a formular la siguiente pregunta: **¿Por qué son necesarias concentraciones sobresaturantes de FMLP para observar ciertos efectos biológicos?.**

Si nosotros observamos este fenómeno en forma estática, probablemente no podremos hallar la respuesta. Ella sólo será encontrada analizando dinámicamente el fenómeno de *down regulation*.

En efecto, la unión o *binding* del FMLP a su receptor (FPR) induce en primera instancia la microagregación y endocitosis del complejo FMLP-FPR y posteriormente el reciclado, síntesis y reexpresión del FPR (Norgauer *et al*, 1991), así como también la destrucción del agonista (FMLP) por acción de una endopeptidasa neutra (Yuli *et al*, 1986; Connelly *et al*, 1985). Cabe destacar que todos estos procesos suceden entre los 3 y 5 minutos de exposición al estímulo. Por otra parte, existe evidencia que indica que el reciclado del receptor para FMLP es necesario para que el efecto del péptido se prolongue en el tiempo (Sklar *et al*, 1984; Jesaitis *et al*, 1984). Así, teniendo en cuenta que en nuestro sistema experimental, los neutrófilos están expuestos al FMLP entre 2 y 3 hs. (tiempo en el que ocurren varios ciclos o *rounds* de expresión y *down regulation* de receptores) moléculas “adicionales” de FMLP serían necesarias para ocupar los receptores disponibles y lograr un efecto sostenido.

Si bien no se conoce el efecto de los péptidos formilados *in vivo*, es sabido que la regulación de los FcγRs está afectada en los procesos inflamatorios de naturaleza infecciosa. En efecto Muller Kobold y col. han demostrado que los niveles de FcγRIIIB solubles (sFcγRIIIB) son elevados en los pacientes con septicemia y constituyen un buen marcador de la severidad de los procesos sépticos (Muller Kobold *et al*, 1998). Por otra parte se han encontrado altas concentraciones de sFcγRIIIB en procesos inflamatorios tales como el síndrome de distress respiratorio (ARDS) o la artritis reumatoidea (RA) (Fleit *et al*, 1992; Hollingworth *et al*, 1967). Todos estos datos son consistentes con el concepto de que la liberación de FcγRIIIB está asociada a reacciones inflamatorias, muchas de ellas de origen infeccioso. El papel fisiológico o fisiopatológico de estos sFcγRIIIB no es claro, pero existen trabajos que sugieren que la interacción con IgG modularía las respuestas inflamatorias (Gisler *et al*, 1975; Suemura *et al*, 1980; Thi Bich-Thuy *et al*, 1981; Daëron *et al*, 1985).

La modulación de los FcγRs por parte de los péptidos formilados, podría resultar de suma importancia debido a las funciones centrales de dichos receptores en diversas reacciones inmunológicas/ inflamatorias. La bibliografía indica que el FcγRII, está involucrado en la activación del estallido respiratorio, quimiotaxis, ADCC, fagocitosis, pinocitosis de CI, producción de radicales libres, liberación de enzimas y regulación de la secreción de varios mediadores inflamatorios como prostaglandinas, factor de necrosis tumoral e interleuquina. Con respecto al FcγRIIIB, algunos autores indican que este receptor estaría involucrado sólo en la liberación de gránulos (Huizinga *et al*, 1990; Crockett-Torabi *et al*, 1990) así como también en la estimulación de influjos de Ca²⁺ y la despolarización de la membrana plasmática (Kimeberly *et al*, 1990). Sin embargo, otros autores indican que si bien el FcγRIIIB es un receptor incapaz de transducir señales de activación intracelulares por carecer de dominios intracitoplasmáticos, constituye una molécula de suma importancia en la función fagocítica mediada por el FcγRII. En efecto, debido a la gran capacidad de movilización lateral en la membrana citoplasmática, este receptor permite el acercamiento de los dominios de Fc de las moléculas de IgG, aumentando el número de interacciones ligando- receptor por unidad de superficie celular. Ello conduce a un incremento de la eficiencia de la actividad fagocítica a través de un fenómeno de cooperatividad entre FcγRs.

Con respecto a la pérdida de ambos receptores, si bien no podemos aseverar cual es de mayor importancia, o tiene un mayor significado biológico, sí debemos rescatar la cooperatividad funcional entre ambos receptores. De nuestros resultados se desprende que la eliminación de dichos receptores de la membrana del neutrófilo involucra una disminución en la capacidad de activación de distintas funciones mediadas por los FcγRs.

Así, la resolución de un proceso inflamatorio de origen infeccioso, estaría supeditado no sólo al número de células efectoras involucradas en el mismo, sino paradójicamente a la concentración de

moléculas de reconocida acción proinflamatoria, capaz de ejercer, en determinadas circunstancias, efectos claramente antiinflamatorios sobre estas células.

6. BIBLIOGRAFIA.

- ✓ Albrich, R.J., Gilbaugh, J.H., Callahan, K.B., Hurst, J.K. (1986). *J.Clin. Invest.* **78**: 177.
- ✓ Anderson, C.L., Looney, R.J. (1986). *Immunol. Today* **7**: 264.
- ✓ Avrameas, S., Ternynck, T.H.(1969). *Immunochemistry.* **6**: 53.
- ✓ Babior B. (1984). *J.Clin. Invest.***73**: 599.
- ✓ Babior B. (1992) *Advances in Enzymology* **65**: 49.
- ✓ Baiton, D.F., Miller, L.J., Kishimoto, T.K., Springer, T.A. (1987). *J. Exp. Med.* **166**:1641.
- ✓ Barnes, K., Shimada, K., Takahashi, M., Tanzawa, K., Turner, A.J. (1996). *J Cell Science* **105**: 919.
- ✓ Basian, N., Hibbs, J. (1994).*Curr. Op. Immunol.* **6**:131.
- ✓ Bâzil, V. (1995). *Immunol. Today* **16**: 135.
- ✓ Becker, E.M. (1979). *J. Retticuloendothel. Soc. Suppl.* **83**: 179.
- ✓ Becker, E.M. (1987) *Am. J. Pathol.* **1**: 10.
- ✓ Becker, E.M. (1987). *Am. J. Pathol.* **129**: 16.
- ✓ Beutler, E.. (1995) *En. Hematology.* pp: 767 5th Ed. Williams. Mc Graw –Hill. New York.
- ✓ Blostone, S.D.,Graham I.L., Lindberg F.P., Brown E.J. (1994) *J. Cell Biol.* **127**: 1129.
- ✓ Borregaard, N., Lollike, K., Kjelsen, L., Sengeløv, H., Bastholm, L., Nielsen, M.H., Bainton, D.F. (1993). *Eur J. Haemtalog.* **51**: 187.
- ✓ Borregaard, N., Miller, L., Springer, T.A. (1987). *Science* **237**:1204.
- ✓ Borregaard, N., Tauber, A.I. (1984). *J. Biol. Chem.* **259**: 47.
- ✓ Boulay, F., Mery L., Tardif, M., Brouchon, L and Vignais P (1991). *Biochemistry* **30**: 2993.
- ✓ Boulay, F., Tardif, M., Brouchon, L., Vignais P. (1990). *Biochemistry* **29**: 11123.
- ✓ Böyum, A. (1968). *Scand. J. Lab. Invest.* **22**: 77.
- ✓ Carp, H. (1982) *J. Exp. Med.* **155**: 264.

- ✓ Cassatella, M.A., Bazzoni, F., Ceska, M., Ferro, I., Baggiolini, M. y Berton, G.(1992). *J.Immunol.* **148**: 3216.
- ✓ Cassatella, MA., Aneón, Y., Cuturi, MC., Griskey, P., Trinchieri, G., Perussia, B. (1989). *J. Exp. Med.* **169**: 549.
- ✓ Cassimeris, L. and Zigmond, SH. (1990). *Sem Cell Biol.* **1**: 125.
- ✓ Chatila, TA., Geha, RS., Arnaut, MA. (1989). *J. Cell Biol* **109**: 3435.
- ✓ Crockett-Torabi, E., Fantone (1990). *J. Immunol.* **145**: 3026.
- ✓ Crockett-Torabi, E., Fantone, JC: (1995) *Immunologic Research* **14**: 237.
- ✓ Daerón M. (1997). *Annu. Rev. Immunol.* **15**: 203.
- ✓ Daëron, M., Fridman, WH (1985) *Ann. Inst. Pasteur Immunol.* **136c**: 383.
- ✓ Demaurex, N, Monod, A, lew, DP., Krause, KH. (1994). *Biochem. J.* **297**: 595.
- ✓ Deo, MD., Graziano, RF., Repp. R., van de Winkel, JGJ. (1997). *Immunol. Today.* **3**: 127.
- ✓ Detmers, PA., Powell, DE., Walz, A., Lewis, Y., Baggiolini, M., Cohn, ZA. (1991). *L. Immunol.* **147**: 4211.
- ✓ Devreotes, PN and Zigmon, SH. (1988). *Annu. Rev. Cell Biol.* **4**: 649.
- ✓ Diamond, MS., Springer, TA (1993). *J. Cell Biol.* **120**: 545.
- ✓ Dustin, ML., Rothelein, R., Bhan, AK., Dinarello, CA., Springer, TA. (1986). *J Immunol* **137**: 245.
- ✓ Egleton, P., Fischer, D., Crawford, N. (1992). *J. Leukoc. Biol.* **51**: 617.
- ✓ Ehrenguber,MU.,Geiser, T., Deranleau, DA. (1994) *FEBS Lett.* **346**: 181.
- ✓ Eid, M., Evin, G., Castro, B., Menard, J., Corvol, P. (1981). *Biochem. J.* **197**: 465.
- ✓ Elbin, C., Chollet-Martin, S., Bailly, S., Hakim, J. Gougerot-Pocidaló, M.A. (1993) *Blood* **82**: 633.
- ✓ Elsbach P., Weiss J. (1988). En *Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates*. Edited by J.I.Gallin, I.M.Goldstein and R. Snyderman pp 445-470. Raven Press, New York.

- ✓ Elsner, J., Kaefer, V., Emmendorffer, A., Breidenbach, T., Lohmann- Matthes, M., Roesler, J. (1993). *J. Leuk. Biol.* **51**: 77
- ✓ Fanger MW., Shen L., Graziano RF., Guyre PM. (1989). *Immunol. Today* **10**: 92.
- ✓ Fava, RA., Olsen, NJ., Postlethwaite, AE., Broadley, KN., Davidson, JM., Nanney, LB., Lucas, C., Townes, AS. (1993) *J. Exp. Med.* **173**: 1121.
- ✓ Finbloom, DS. (1985). *Clin. Immunol. Immunopathol.* **36**: 275.
- ✓ Fleit, HB., Kobasiuk, CD., Daly, C., Furie, R., Levy, PC., Webster, RO. (1992) *Blood* **10**: 2721.
- ✓ Flohé, L., Beckmann, H. y Loschen, G. (1985). En: Oxidative stress. Ed. Sies, H. Academic Press Inc, Londres, pp.403.
- ✓ Ford- Hutchinson, AW., Bray, MA., Doig, MB., Shipley, ME., Smith, MJH. (1980) *Crit. Rev. Immunol.* **10**: 1.
- ✓ Ford-Hutchinson, AW., Bray, MA., Doig, MU., Shipley, ME. y Smith, MJH. (1980) *Nature* **286**: 264.
- ✓ Forehand, J.R., Pabst, M.J., Philips, W. A., Johnston R.B.Jr. (1989). *J. Clin. Invest* **83**: 74.
- ✓ Freer R.J. (1979). Proc. Sixth, American Peptide Symposium. pp: 749. Gross, E. and Meienhofer, J. Eds. USA.
- ✓ Fridman, WH., Bonnerot, C., Daéron, M., Amigorena, S., Teillud, JL. Salutes, C. (1992). *Immuol. Rev.* **125**: 49.
- ✓ Fujishima, S., Hoffman, A.R., Vu, T., Kim, K.J., Zheng, H., Daniel, D., Kim, Y., Wallace, E.F., Larrick, J.W. y Raffin, T.A. (1993). *J. Cell. Physiol.* **154**: 478.
- ✓ Gallin, JI. (1988) The neutrophil. En Immunological Diseases 4ta. Edición. Ed. Samter, M., Talmage, DW., Frank, MM., Austen, KF. Little Brown and Co. Boston, MA.
- ✓ Ganz, T., Selsted, M., Babior, B. y Curnutte, J. (1988). *Ann. Intern. Med.* **109**: 127.
- ✓ Gao, J-L., Murphy, PM. (1993). *J. Biol. Chem.* **268**: 25396.
- ✓ Geffner, J.R., Giordano, M., Palermo MS, Prat, A. Serebrinsky, G., Isturiz, M.A. (1987). *Clin. Exp. Immunol.* **69**: 668.

- ✓ Geffner, J.R., Trevani, A.S., Minnucci, F.S., Palermo, M.S., Maugeri, N., Isturiz, M.A. (1993). *Clin. Exp. Immunol.* **91**: 164.
- ✓ Gisler, RH, Fridman WH. (1975). *J. Exp. Med.* **142**: 507.
- ✓ Goldman, D.W., Chang, F.H., Gifford, L.A., Goetzl, E.J., Bourne, H.R. (1985) *J. Exp. Med.* **162**: 145.
- ✓ Goldstein, IM., Roos, D., Kaplan, HB., Weissmann, G.. *J. Clin. Invest.* **56**: 1155.
- ✓ Graziano, RF., Fanger, MW (1987). *J. Immunol.* **138**: 945.
- ✓ Gresham, HD, Mc Garr, JA, Shackelford, G., Brown WJ. (1988). *J. Clin. Invest.* **82**: 1192.
- ✓ Gresham, HD., Clement, LT., Lehmyer, JE., Griffin, FM. Volañaski, JE (1986). *J. Immunol.* **137**: 868.
- ✓ Grotendorst, G.R., Smale, G. y Pancev, D. (1989).*J.Cell. Physiol.* **140**: 396.
- ✓ Harrison, D., Phillips, J.H. Lanier,L.L. (1991). *J Immunol* **147**: 3459.
- ✓ Harvath, L (1991). En Cell motility factors. Ed: ID Golberg pp: 35. Birkhauser Verlag. Basel, Switzerland.
- ✓ Hawknis, D. (1972). *J Immunol* **110**: 294.
- ✓ Haziot, A., Tsuberi, B.Z. y Goyert, S.M.(1993). *Immunol.* **150**: 5556.
- ✓ Hemler, ME. (1988). *Immunol. Today* **9**: 109.
- ✓ Henderson, L., Moule S.K., Chappell, J.B. (1993) *Eur. J. Biochem.* **211**: 157.
- ✓ Henson, PM, Oades, ZG. (1973). *J. Immunol.* **110**: 290.
- ✓ Henson, PM., Henson, JE.,Fitschen C., Kimani G., Bratton,D.L., and Riches, DWH (1988). En Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates. Ed: J.I.Gallin, I.M.Goldstein and R. Snyderman. pp: 363. Raven Press, New York.
- ✓ Hirsch, JG., Cohn, ZA. (1960). *J. Exp. Med.* **112**: 1005.
- ✓ Hoffstein, S., Weissmann G. (1978). *J. Cell Biol.* **78**: 769.
- ✓ Hollingsworth, JW., Siege, ER, Creasey, WA (1967). *Yale J. Biol. Med.* **39**: 289.

- ✓ Huizinga TWJ., de Haas M., Kleijer, M., Nuijens, HH., Roos, D., von dem Borne, AEGKr. (1990) *J. Clin. Invest.* **86**: 416.
- ✓ Huizinga, TWJ, Dolman, KM., van der Linden, NJ., Kleijer, M., Nuijens, JH., AEGKr von dem Borne, Roos D. (1990). *J. Immunol.* **144**: 1432.
- ✓ Huizinga, TWJ, van del Schoot, CE. Jost, C., Klaasen, R., Kleijer, M., von dem Borne, AEG, Roos, D. Tetteroo, PAT. (1988). *Nature.* **333**: 667.
- ✓ Isturiz MA, Giordano M. (1990). Mecanismos citotóxicos mediados por células. En: Inmunología e Inmunoquímica 4ta Edición. pp: 284. Ed: Margni RA. Ed Panamericana. pp 284.
- ✓ James, F., Brouquisse R., Suire, C., Pradet, A., Raymond, P. (1996). *Biochem. J* **320**: 283.
- ✓ Jesaitis, AJ. Naemura, JR Painter, RG, Sklar LA, Cochrane. CG.. (1983) *J. Biol. Chem.* **258**: 1968.
- ✓ Jesaitis A. J. (1982) *Cell Biochem* **20**: 177.
- ✓ Jesaitis, A.J., Naemura, J.R., Sklar, L.A., Cochrane, C.G., Painter, R.G. (1984). *J. Cell Biol* **98**: 1387.
- ✓ Jesaitis, AJ., Ericksson, RW., Klotz, KN., Bommakanti, RK., Siemens, DW. (1993). *J. Immunol.* **151**; 5653.
- ✓ Johanson, B., Wymann, MP:, Holmgren-Peterson, K., Magnusson, KE. (1993) *J. Cell Biology*, **121**: 1281.
- ✓ Jost, CR., Huizinga, T., De Goede, R., Fransen, F.A.M. Tetteroo, P.A.T. , Daha, M.R. and Ginsel, L.A. (1990). *Blood* **75**: 144.
- ✓ Junghans, RP., Anderson, CL. (1996). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**: 5512.
- ✓ Karpovsky, B. Titus, JA., Stephany, DA., Segal, DM. (1984). *J. Exp. Med.* **160**: 1686.
- ✓ Kasama, T., Strieter, R.M., Standiford, T.J., Burdick, M.D., Kunkel, S.L. (1993). *J.Exp. Med.* **178**: 63.
- ✓ Key, M.E. y Haskill, S. (1983). En: Macrophage mediated ADCC. pp:237. Ed. Koren, H.S. Marcel Dekker, Inc.

- ✓ Khayat D., Geffrier, C., Yoon, S., Scigliano, E., Soubrane, C., Weil, M., Unhkeless, JC., Jacquillat, C (1987). *J. Immunol. Methods* **100**: 235.
- ✓ Khayat, D., Soubrane, C., Andrieu, JM., Visonneau, S., Eme, D., Tourani, JM., Beldjord, K., Weilm, M., Fernandez, E., Jacquillat, C. (1990). *J. Infect. Dis.* **161**: 430.
- ✓ Kimberly, RP., Ahlstrom, JW., Click, ME., Edberg, JC. (1990). *J. Exp. Med.* **171**:1239.
- ✓ Klebanoff SJ (1975). *Semin Hematol.* 12, 1717. En the Phagocytic Cell in Hoss Resistance, eds JA Bellanti, DH Dayton New York. Raven presss.
- ✓ Kohl, S., Loo, L.S., Schmalstieg, F.S. Anderson, D.C. (1986). *J. Immunol.* **137**: 1688.
- ✓ Korchack, HM., Wilkenfeld, C., Rich, A.M., Radin, A.R., Vienne, K., Rutherford, L.E. (1984). *J. Biol. Chem.* **259**: 7439.
- ✓ Korchak, HM., Vienne, K., Rutherford,LE., Wilkenfeld, C., Finkelstein, MC., Weissmann (1984). *J. Biol. Chem.* **259**: 4070.
- ✓ Larsen, G.L. y Henson, P.M. (1983).*Ann. Rev. Immunol.* **1**: 335.
- ✓ Le Thi Bich-Thuy, J., Samarut, C., Brochier, J., Revillard JP. (1981). *J. Immunol.* **127**: 1299.
- ✓ Lee-Amm H. Allen and Alan Adermen (1996). *Current Opinion in immunology* **8**: 36.
- ✓ Lew, PD., Wollheim, C., Waldvogel, FA., Pozzan, T. (1984). *J. Cell Biology.* **99**: 1212..
- ✓ Liu, L., Harbecke, O., Elwing, H., Follin, P. Karlsson, A., Dahlgren, C. (1998). *J. Immunol.* **160** : 2463.
- ✓ Longobardi Givan, A. (1993) *Flow cytometry. First Principles.* De Wiley-Lys.New York
- ✓ Loyd, A.R. y Oppenheim, J.J. (1992).*Immunol. Today* **13**: 169.
- ✓ Lundqvist, H., Dahlgren. C. (1995). *Inflamm. Res.* **44**: 510.)
- ✓ Malyak, M., Smith, M.F., Abel, A.A. y Arend, W.P. (1994). *J.Clin. Immunol.* **14**: 20.
- ✓ Mathews, G., Neher,, E. Penner, R. Second messenger-activated calcium influx in rat peritoneal mast cells. 1989. *J. Physiol.* 418: 105-130
- ✓ Mc Phail, LC, Strum, SL, Leone, PA, Sozzani, S. (1992). En *Granulocyte responses to cytokines: basic and clinical research* (ed. R Coffey) pp.47, Marcel Dekker Inc., New York.

- ✓ Merrit, J.E. Mc Carthy, S.A. Davies, M.P.A. Moores, K.E. (1990) *Biochem* **269**: 513.
- ✓ Metchnikoff, E. (1905) *Immunity in Infective Diseases*. Cambridge: Cambridge Press.
- ✓ Metzger, H. (1987). Ed. Metzger, H. ASM Publications, Washington DC.
- ✓ Meyer, T., Holowka, D Stryer, L. (1988). *Science*. **240**: 653.
- ✓ Michel, J. Unkeless, J.C., Pieczonka, M.M Silverstein, S.C. (1983). *J. Exp. Med.* **157**: 1746.
- ✓ Muller Kobold, A.C., Zijlstra, J.G., Koene, H.R., de Haas, M., Kallenberg, C.G., Cohen Tervaert, J.W. (1998). *Clin. Exp. Immunol.* **114**: 220.
- ✓ Murphy P.M. and Tiffany H.L. (1991). *Science* **253**: 1280.
- ✓ Murphy, P.M. (1994). *Annu. Rev. Immunol* **12** : 593.
- ✓ Muta, T., Kurosaki, T., Misulovin, Z., Sanchez, M., Nussenzweig, M.C, Ravetch, J.V. (1994). *Nature*. **368**: 70.
- ✓ Nathan, C.F. (1982): En: *Macrophage-mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity*, edited by H.S. Koren. Plenum Press, New York).
- ✓ Norgauer, J. (1991). *Immunology* **146**: 975.
- ✓ Nowak, D., Bialasiewicz, P., Antczak, A., Krol, M., Piasecka, G. (1995). *Int. J. Clin. Lab. Res.* **25**: 116.
- ✓ Olsson Y., Odeberg, H., Weiss, J., Elsbach P. (1980). En: *Neutral Proteases of Human Polymorphonuclear Leukocytes*, edited by K. Havermann and A. Janoff, pp 18 Urban & Schwarzenberg, Baltimore.
- ✓ Oman G.M., Sklar. (1988). *J. Cell Biol.* **107**:951.
- ✓ Oppenheim, J.J., Zachariae, C.O.C., Mukaida, N., Matsushima, K. (1991). *Annu. Rev. Immunol.* **9**: 617.
- ✓ Ory, P.A., Clark, M.R., Talhouk, A.S., Goldstein, I.M. (1991). *Blood* **77**: 2682.
- ✓ Osborn, L. (1990). *Cell*. **62**:3.
- ✓ Painter, R.G., Aiken, M.L. (1995). *J. Leukoc. Biol.* **58**: 468.
- ✓ Palermo, M.S. ; Alves Rosa, M.F., Fernandez Alonso, G., Isturiz M.A. (1997) *Immunology*. **92** : 536.

- ✓ Palmer, R.M.J., Stepney, R.J. y Eakins, K.E. (1980). *Prostaglandins* **20**: 411
- ✓ Parker, CW. (1987). *Annu. Rev. Immunol.* **2**: 65.
- ✓ Pawloski, NA., Kaplan, G., Hamill, AL., Cohn, Al., Scott, WA. (1983). *J. Exp. Med.* **158**: 393.
- ✓ Perussia, B, Dayton, ET., Lazarus, R., Fanning, V., Trinchieri, G. (1983). *J. Exp. Med.* **158**: 1092.
- ✓ Perussia, B., Dayton, ET., Lazarus, R., Fanning, V., Trinchieri, G. (1983). *J. Exp. Med.* **158**: 1092.
- ✓ Petty, HR., Todd III, R.F. (1996). *Immunol. Today* **17**: 209.
- ✓ Pinkard, RN., Ludwig, JC. y McManus, LM.(1988). En: Inflammation: Basic principles and clinical correlates. Pp 139. Ed. Gallin, J.I., Goldstein, I.M. y Snyderman, R. Raven Press, New York.
- ✓ Portnoy, DA., Hulmes, J., Pan, TC., Unkeless.JC. (1986). *Science* **234**: 718.
- ✓ Powell, W.S., MacLeod, R.J., Gravel, S., Gravelle, F., Bhakar A. (1996). *J.Immunol.* **156**: 336.
- ✓ Pozzan, T., Lew, DP., Wollheim, CB., Tsien, RY. (1983). *Science* **221**: 1413.
- ✓ Qiu, WQ., Bruin, D. Brownstein, BH.. Pearse, R. Ravetch, JV. (1990). *Science* **248**: 732.
- ✓ Rakita, R.M., Michel, B.R. y Rosen, H.(1989). *Biochemistry* **28**: 3031.
- ✓ Ramstedt, U., Ng, J., Wigwell, H., Seaham, CN., Samuelson, B. (1985). *Proc. Acad. Sci. USA.* **81**: 5335.
- ✓ Ravetch, JV. (1994). *Cell.* **78**: 553.
- ✓ Ravetch, JV. (1997) *Curr. Opin. Immunol.* **9**: 121.
- ✓ Ravetch, JV., Kinet.JP. (1991). *Ann. Rev. Immunol.* **9**:457.
- ✓ Rosales, C., Brown, EJ. (1993). En: The natural Immunes System. The neutrophil. pp: 23. De Abramson JSA and J. Gary Wheeler. IRL Press Oxford University Press.
- ✓ Rosen, G., Pou, S., Ramos, C., Cohen, M. y Britigan, B. (1995). *FASEB J.* **9**: 200.
- ✓ Rossi, F. (1986). *Biochimica et Biophysica Acta* **65**: 89.

- ✓ Rotrosen, D., Gallin, JI., Spiegel, AM., Malech, HL. (1988). *J. Biol. Chem.* **263**: 10958.
- ✓ Rotrosen, D., Yeung, CL. Leto, TL., Malech, HL., Kwon, CH.(1992). *Science* **256**: 1459.
- ✓ Ruoslahti, E. (1991). *J. Clin. Invest.* **87**: 1.
- ✓ Sármay, G., Rozsnyay, Z., Szabó, Y., Biró, A. And Gergely, J. (1991) *Eur. J. Immunol.* **21**: 542.
- ✓ Särnhäl, E., Bokoch, GM., Boulay, F., Strendhal, O. Andersson, T. (1996). *J. Biol. Chem.*, **271**:15267.
- ✓ Savory, P.J., Rivet, A.J. (1993). *Biochem J.* **289**: 45.
- ✓ Scallon, BJ., Scigliano, E. Freeman, VH., Miedel. MC., Pan, YCE, Unkeless, JC. Schlondorff, DA. (1989). *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **86**: 5079.
- ✓ Schiffmann, E. Showell, HV., Corcoran, B., Ward, PA., Smith, E., Becker, EL. (1975). *J. Immunol.* **6**:1831
- ✓ Schiffmann, E., Corcoran, BA. (1977). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **72**: 1769.
- ✓ Schiffmann, E., Corcoran, BA.,Wahl, S. (1975) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **72**: 1059.
- ✓ Scornik, JC. (1973) *J. Immunol.* **113**: 1519.
- ✓ Sehgal Anthony W. (1996) *Molecular Medicine Today* **3**: 129.
- ✓ Sehgal, G., Zhang, K., Todd III, R.F., Boxer, L.A., Petty, H.R. (1993). *J. Immunol.* **150**: 4571.
- ✓ Selvaraj, P., Carpen, O., Hibbs, ML, Springer, TA. (1991) *J. Immunol.* **143**, 3283.
- ✓ Sengeløv, H. (1996). *Eur J. Haemat.* **58**: 1.
- ✓ Sengeløv, H., Kjeldsen,L. Borregaard, N. (1993). *J. Immunol.* **15**: 1535.
- ✓ Shen,L., Guyre, PM., Fanger, MW. (1987). *J. Immunol.* **139**: 534.
- ✓ Showel, H.J. Freer, R.J., Zigmund, S. H. Schiffmann, E., Aswanikumar, S., Corcoran, B.A., Becker, E.L. (1976). *J. Exp. Med.* **143**: 1154.
- ✓ Sigal, JL, Ron, (1994) En: Immunology and Inflammation. Mechanism and clinical consequences.
- ✓ Simms, H.H., D'Amico, R. (1994). *Cell.Immunol.* **157**: 525.
- ✓ Sklar AR, Oades, ZG, Finney, DA. (1984). *J. Immunol.* **133**: 1483.

- ✓ Sklar, LA., Cochrane, C.G., Painter, R.G. (1984). *J. Cell Biol* **98**: 1387.
- ✓ Sklar, LA., Hyslop, P.A., Oades, Z.G., Omman, G.M., Jesaitis, A.J. Painter, R.G., Cocchrane, C.G. (1985). *J. Biol. Chem.* **260**: 11461.
- ✓ Sklar, LA., Jesaitis, A.J., Painter, RG. (1984). *Contemp. Top. Immunobiol.* **14**: 29.
- ✓ Sklar, LA., Mueller, H., Omann, G., Oades (1989). *J. Biol. Chem.* **264**: 8483.
- ✓ Sklar, LA., Omann, GM (1990). *Semin. Cell Biol.* **1**: 115.
- ✓ Smolen J.E., Korchak, H.M., Weissmann G. (1981). *Biochem Biophys Acta* **677**: 512.
- ✓ Snyderman y Uhing, RJ. (1988). En *Inflammation*. JI. Gallin, IM. Goldstein, R. Snyderman (editores) Raven Press, New York
- ✓ Snyderman, R. Uhing, RJ. (1992) En *Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates*. pp: 421. 2da. Ed. De. Gallin, JI., Goldstein, IM, Snyderman, R. Eds. Raven Press, New York.
- ✓ Snyderman, R., Pike, C. (1984). *Annu Rev. Immunol.* **2**:257.
- ✓ Spangenberg, P., and Crawford, P. (1987). *Eur J Biochem* **211**: 157.
- ✓ Speziale, N. (1995). En *Inmunología e Inmunoquímica, fundamentos*. Pp: 440. 5^{ta} ed. Ed Margni. Edit. Panamericana, Bs. As.
- ✓ Spudich J.A. (1973). *Cold Spring Harbor Symp* **37**, 585.
- ✓ Stephens, L., Eguino, C., Jackson, T., Hawkins, PT. (1993). *EMBO*. **12**: 2265.
- ✓ Stöckl, J., Majdic, O., Pickl, W.F., Rosenkranz, A., Prager, E., Gschwantler, E., Knapp, W. (1994). *J. Immunol.* **154**: 5452.
- ✓ Sturn, RJ., Chang, JY. (1989). En: *Immunopharmacology*. Pp; 89. Ed. Gilman, SC, Rogers, TJ. The Telford Press. Caldwell, New Jersey.
- ✓ Suemura, M., Yodoi, J., Hirashima, M., Ishizaka, K. (1980) *J. Immunol.* **125**: 148.
- ✓ Sullivan, SJ. Zigmund, SH. (1980). *J. Cell Biology.* **85**: 703.
- ✓ Takai. T., Ono., M., Hikida, M., Ohmori, H., Ravetch., JV. (1996) *Nature* **379**:346.
- ✓ Taub, D., Conlon, K., Lloyd, A.R., Oppenheim, J.J. y Kelvin, D.J. (1993). *Science* **260**: 355.
- ✓ Thomas, M. (1994). *Curr. Opin. Cell Biol.* **6**: 247.

- ✓ Tomhave, E.D., Richardson, R., Didsbury, J.R., Menard, L., Snyderman, R. Hydar, A.. (1994). *J Immunol.* **153**: 3267.
- ✓ Toniolo, C., Bonora, GM., Showell, HJ., Freer, RJ., Becker, EL. (1984). *Biochemistry* **23**: 698.
- ✓ Tosi, M.F., Zakem, H (1992). *J. Clin. Invest.* **90**,:462.
- ✓ Turner, JR., Tartakoff, AM., Berger, M. (1988). *J. Biol. Chem.* **263**: 4914.
- ✓ Uhlinger, D.J., Tyagi, S.R., Inge, K.L., Lambeth, J.J. (1993). *J. Biol.Chem.***268**: 8624.
- ✓ Unkeless, JC., Scigliano, E., Freedman, VH. (1988). *Ann. Rev. Immunol.* **6**: 251.
- ✓ Unkeless, JC., Shen, Z., Lin ZW., De Beus, E. (1995). *Semin. Immunol.* **7**: 37.
- ✓ Van den Herij-Oudijk, IE, Ter Bekke, MWH, Templant MJ., Capel, PJA, Van den Winkel, JGJ. (1995). *Blood* **86**: 3302.
- ✓ Van den Winkel, JGJ, Tax, WJM, Jacobs, CWM, Huizinga, TWJ Willems, PHGM. (1990). *Scan. J. Immunol.* **31**: 315.
- ✓ Verhoef J., Visser, MR. (1993) En: The natural Immune system.The neutrophil. pp: 110. Edited by JSA Abramsom and JG Wheeler . J. Oxford University Press Inc, Nueva York.
- ✓ Vulcano M., Alves Rosa, M.F., Minnucci, F.S., Cheriñasky, A.C., Isturiz, M.A. (1998). *Clin. Exp. Immunol.* **113**: 39.
- ✓ Weiss, S.J. y Peppin, G.J.(1986). *Biochem. Pharmacol.* **35**: 3189.
- ✓ Weiss, SJ, and Lo Buglio, AF (1980). *Blood* **55**:1020.
- ✓ Weissmann, G., Zurier,R.B., Spielen, P.J. Goldstein, I.M. (1971). *J. Exp. Med.* **134**: 149.
- ✓ White, J.R., Naccache, P.H., Molski, T.F.P., Borgeat, P., Sha'afi, R.I. (1983). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **113**: 44.
- ✓ Wright, SD. Silvesrtein., (1983). *J. Exp. Med.* **158**: 2016.
- ✓ Wright, SD., Rao, PE., Wesley, C., (1983). *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **80**: 5699.
- ✓ Y Chin, J.R., Werb, Z. (1997). *Development* **124**: 1519.
- ✓ Yuli I., Snyderman, R. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**: 4902.
- ✓ Zhou, M., Brown, E.J. (1994). *J. Cell Biol.* **125**: 1407.

- ✓ Zhou, M., Todd, J.R.F., Petty, H.R. (1991). *J. Mol. Biol.* **218**: 263.
- ✓ Zigmond, SH., Sullivan, SJ., Lauffenburger, DA. (1987). *J. Cell Biology*, **92**:34.
- ✓ Zurier, RB., Hoffstein, s., Weissmann, G. (1973). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **70**: 844.