

Tesis de Posgrado

Modulación de la funcionalidad y sobrevida de neutrófilos humanos por fibrinógeno a través de beta sub 2 integrinas : análisis de los caminos transduccionales involucrados

Rubel, Carolina Julieta

2002

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

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

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Rubel, Carolina Julieta. (2002). Modulación de la funcionalidad y sobrevida de neutrófilos humanos por fibrinógeno a través de beta sub 2 integrinas : análisis de los caminos transduccionales involucrados. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3522_Rubel.pdf

Cita tipo Chicago:

Rubel, Carolina Julieta. "Modulación de la funcionalidad y sobrevida de neutrófilos humanos por fibrinógeno a través de beta sub 2 integrinas : análisis de los caminos transduccionales involucrados". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2002. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3522_Rubel.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

MODULACION DE LA FUNCIONALIDAD Y SOBREVIVENCIA DE
NEUTROFILOS HUMANOS POR FIBRINOGENO A TRAVES DE β_2
INTEGRINAS.
ANALISIS DE LOS CAMINOS TRANSDUCCIONALES
INVOLUCRADOS.

Autor : Carolina Julieta Rubel

Director: Dra. Marina Sandra Palermo

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

*Sección Inmunología
Instituto de Investigaciones Hematológicas
Academia Nacional de Medicina*

Año 2002

ii

"Para observar tienes que aprender a comparar. Para comparar, necesitas haber observado. La observación genera conocimiento, y el conocimiento es necesario para observar. Observa mal el que no sabe hacer nada con lo que haya observado. No ve exactamente al hombre quien no sepa que el hombre es el destino final del hombre".

Bertolt Brecht (1934).

Agradecimientos

Esta tesis no podría haberla realizado sin la ayuda de mucha gente que de una u otra manera estuvieron cerca de mí, y que tienen un lugarcito en mi corazón.

Por eso gracias...

en especial a Marina, mi directora porque en estos años al lado suyo no sólo aprendí de "ciencia", sino que crecí como persona, porque la admiro y la respeto, y porque gracias a su paciencia, su sonrisa y su generosidad infinitas fue un placer el trabajo de cada día.

a Martín, mi co-director, por estar siempre dispuesto a contestar mis preguntas con ese saber tan inmenso, por enseñarme con el ejemplo, por sus críticas que me ayudaron a mejorar, sobre todo en la prosa Shakespearina...

a mis amigas de mesada Gaby, Sonia y la Colo, UNICAS! siempre leales, sinceras, emocionales y dispuestas a hablar de cualquier cosa que no sean experimentos...

a Fer, por tener siempre una solución a mis problemas.

a Paulita, pura dulzura y transparencia.

a Maca siempre tan racional.

a Ernesto y Romina, sin los cuales probablemente la mitad de mi tesis sería un manchón negro.

a las chicas Kordon, Caro, Albana, y Ana, unas dulces como su jefa Edith.

a Nelly, ya que sin su ayuda hubiese sido muy difícil el trabajo diario.

a Juan, por mimarnos tanto.

a Martita, Nora y Norma de Citometría.

a los chicos del CEMIC: Antonio, Viviana y Sergio.

a Omar por toda su ayuda.

a Jorge porque no sólo aprendí de factores de transcripción sino también que no todos los jefes son iguales.

a la gente del Segundo Mirta, Jorge, Ana, Romi, Moni, Gaby y Paulita por poder contar con ustedes.

a la gente del Tercero, Gaby, Dalia, Tito, Oscar, Antonio, Raúl, Isabel, Irene, Paulita, Pedrito, Vale y Vicky (aunque algunos ya no estén)

a la gente del primero.

a Lauchi, por estar siempre cerca.

a mi mamá y mi papá, por su incondicionalidad y sobre todo por cuidarme tanto.

a Rodrigo, por compartir cada momento importante de mi vida, por alentarme en los momentos difíciles y festejar los buenos, por darme su confianza y su apoyo, por poder cambiarme la cara con una sola palabra...doblemente gracias...

Índice

	Página
Resumen	1
1- Breve introducción general y objetivos	3
2- Introducción	
2.1.- El neutrófilo.	7
2.2.- Moléculas de Adhesión.	9
2.2.1.- Familia de las integrinas.	10
2.2.1.1.- β_2 integrina CD11b/CD18.	13
2.2.1.1.1.- Ligando natural del CD11b/CD18: Fibrinógeno.	13
2.3.- Los receptores para el fragmento Fc de Inmunoglobulina (RFc).	16
2.3.1.- Receptores para el fragmento Fc de IgG (RFc γ).	16
2.4.- Funciones biológicas de los neutrófilos	17
2.4.1.- Fagocitosis	17
2.4.2.- Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC).	19
2.4.3.- Estallido respiratorio. La producción de reactivos intermediarios del oxígeno.	19
2.4.4.- Sistemas microbicidas independientes del oxígeno.	21
2.4.5.- Degranulación.	21
2.4.5.1.- Vesículas secretorias.	23
2.4.5.2.- Gránulos específicos o secundarios.	24
2.4.6.- Producción de citoquinas	24
2.4.7.- Muerte celular programada o Apoptosis	25
2.5.- Transducción de señales a través de integrinas	26
2.5.1.- Quinasa de Adhesión Focal y MAP quinasas	26
2.5.2.- Factor de transcripción NF- κ B.	28
2.5.3.- Cooperación con otros receptores.	30
3- Materiales y Métodos	
3.1.- Reactivos generales	32
3.2.- Soluciones	32
3.2.1.- Solución de Ficoll-Hypaque.	32
3.2.2.- Solución de dextran	33
3.2.3.- Tampón fosfato salino (PBS).	33
3.2.4.- Solución de Türk para el recuento de células	33
3.2.5.- Solución de azul tripan.	33
3.2.6.- Medio de cultivo completo (MCC).	34

3.2.7.-Solución RIPA modificado.	34
3.2.8.-Solución A y B para la preparación de extractos citoplasmáticos y nucleares.	34
3.3.-Purificación de PMN.	34
3.4.-Cultivo de células.	35
3.5.-Preparación de fibrinógeno adherido a placas.	35
3.6.-Preparación de complejos inmunes (CI).	35
3.6.1.-Antígenos empleados para la preparación de los CI.	35
3.6.2.-Obtención de IgG de conejo anti-Ovaalbumina (IgG anti-OA).	35
3.6.3.-Formación de los Complejos Inmunes (CI).	36
3.7.-Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC).	36
3.7.1.-Células blanco.	36
3.7.2.-Marcación de células blanco con cromato de sodio radioactivo.	36
3.7.3.-Sensibilización de las células blanco.	37
3.7.4.-Reacción de ADCC.	37
3.8.-Fagocitosis.	37
3.8.1.-Células blanco.	37
3.8.2.-Sensibilización de células blanco.	38
3.8.3.-Ensayo de Fagocitosis.	38
3.9.-Citotoxicidad celular mediada por radicales libres.	38
3.9.1.-Células blanco.	38
3.9.2.-Marcación de células blanco con cromato de sodio radioactivo.	39
3.9.3.-Reacción de citotoxicidad.	39
3.10.-Citometría de Flujo.	39
3.10.1.-Evaluación de la expresión de, FcγRII y FcγRIII.	39
3.10.2.-Evaluación de la movilización de calcio intracelular [Ca ²⁺].:	40
3.10.2.1.-Marcación de células con Fluo-3AM.	40
3.10.2.2.-Análisis de los datos obtenidos.	40
3.10.3.-Evaluación de la degranulación.	41
3.10.4.-Evaluación de la apoptosis por incorporación de ioduro de Propidio.	41
3.10.5.-Evaluación de la apoptosis por activación de Caspasa 3.	42
3.10.6.-Análisis del efecto del sFbg en sangre entera.	42
3.11.-Evaluación de la apoptosis por microscopía de fluorescencia.	43
3.12.-Western Blot de lisados celulares y ensayos de actividad quinasa.	43
3.13.-Inmunoprecipitación.	44
3.14.-Preparación de extractos citoplasmáticos y nucleares.	44
3.15.-Ensayo de Movilidad Electroforética (EMSA).	45

3.16.-Análisis estadístico de los datos obtenidos.	45
4- Resultados	
4.1.-Análisis de los efectos del fibrinógeno soluble sobre la funcionalidad y supervivencia de los neutrófilos humanos.	46
4.1.1.-El fibrinógeno soluble induce un aumento transiente en la concentración de Calcio intracelular en neutrófilos.	46
4.1.2.-El fibrinógeno soluble induce la degranulación de neutrófilos	48
4.1.2.1.-Degranulación de gránulos secundarios	48
4.1.2.2.-Degranulación de vesículas secretorias	50
4.1.3.-El fibrinógeno soluble aumenta la actividad funcional de neutrófilos	52
4.1.4.-El fibrinógeno soluble retarda la apoptosis de neutrófilos	55
4.1.5.-El fibrinógeno soluble induce la completa activación de neutrófilos luego de ser primados	56
4.1.6.-Efecto de los productos de degradación del fibrinógeno soluble sobre neutrófilos	58
4.2.-Análisis de los caminos transduccionales intracelulares activados por fibrinógeno soluble en neutrófilos humanos	60
4.2.1.-Análisis temporal de los efectos del fibrinógeno soluble sobre la movilización de gránulos citoplasmáticos de neutrófilos	60
4.2.2.-Efecto de inhibidores de proteínas quinasas sobre la degranulación de neutrófilos inducida por fibrinógeno soluble.	61
4.2.3.-El fibrinógeno soluble induce la fosforilación de proteínas en residuos tirosina.	62
4.2.4.-Comparación entre el patrón de fosforilación de proteínas producido por el fibrinógeno en su forma soluble y el adherido a placas.	64
4.2.5.-El fibrinógeno soluble induce la fosforilación de la proteína "Quinasa de Adhesión Focal" o "Focal Adhesion Kinase" (FAK).	65
4.2.6.-El fibrinógeno soluble induce la activación de MAPquinasas	66
4.2.7.-Efecto de inhibidores de MAPK sobre la degranulación inducida por el fibrinógeno soluble humano.	68
4.2.8.-Efecto de inhibidores de proteínas quinasas sobre el aumento de la fagocitosis inducida por fibrinógeno soluble.	70
4.2.9.-El fibrinógeno soluble humano reduce la activación de caspasa 3 en neutrófilos	71
4.2.10.-Efecto de inhibidores de proteínas quinasas sobre el retraso de la apoptosis inducida por fibrinógeno soluble.	72
4.2.11.-El fibrinógeno soluble induce la activación del factor nuclear	73

<i>κB (NF-κB) en neutrófilos.</i>	
<i>4.2.12.-Inhibidores de NF-κB contrarrestan los efectos del fibrinógeno soluble sobre la activación de caspasa 3.</i>	<i>75</i>
<i>4.2.13.-Efectos de inhibidores de MAPK ERK1/2 y la familia Src sobre la modulación por el fibrinógeno soluble de la activación de la caspasa 3 y el NF-κB.</i>	<i>76</i>
<i>4.2.14.-Efecto del fibrinógeno soluble sobre la activación de la caspasa 3 y el NF-κB en células HL-60 diferenciadas con DMSO.</i>	<i>78</i>
<i>5- Discusión y Conclusiones</i>	<i>81</i>
<i>6- Referencias</i>	<i>91</i>

Abreviaturas

[Ca ²⁺] _i	Concentración de Calcio intracelular
⁵¹ Cr-Ep	Eritrocitos de pollo marcados con ⁵¹ Cr
⁵¹ Cr-Ec	Eritrocitos de carnero marcados con ⁵¹ Cr
mAb	Anticuerpo monoclonal
ADCC	Citotoxicidad celular mediada por anticuerpos
BSA	Seroalbúmina Bovina
C3b	Producto del clivaje del factor C3 del Complemento
C3bi	Producto de clivaje del factor C3 del Complemento
CI	Complejos inmunes.
CR3	Receptor de Complemento tipo 3
DMSO	Dimetil Sulfoxido
DTT	Ditritiotreitol
Ec	Eritrocitos de carnero
EMSA	<i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i> o Ensayo de Movilidad Electroforética
Ep	Eritrocitos de pollo
ERK1/2	<i>Extracellular-signal-regulated kinases</i> o Quinasas reguladas por señales extracelulares
FAK	<i>Focal Adhesion Kinase</i> o Quinasa de Adhesión Focal
Fcy	Fragmento Fc de IgG
Fbg	Fibrinógeno
FITC	Isotiocianato de Fluoresceína
FII	Fluorescencia
FMLP	N- Formil metionil leucil fenilalanina
FSC	<i>Forward Side Scatter</i>
GM-CSF	Factor estimulador de colonias granulocíticas macrofágicas
GPI	Glicosil fosfatidil inositol
h	hora
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrógeno
IgG	Inmunoglobulina G
IMF	Intensidad Media de Fluorescencia
IL-1β	Interleuquina 1-β

IL-1	Interleuquina-1
IL-6	Interleuquina-6
IL-4	Interleuquina-4
IL-8	Interleuquina- 8
ICAM-1	<i>Intercellular Adhesion Molecule-1</i> o Molécula de Adhesión entre células-1
I κ B	Proteína Inhibitoria de NF- κ B
IKK	Quinasa de I κ B
INF- γ	Interferon- γ
IP	Ioduro de Propidio
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>
kDa	kiloDalton
LAD	<i>Leukocyte Adhesion Deficiency</i> o Deficiencia en la adhesión de leucocitos
LBP	Proteína que une Lipopolisacáridos bacterianos
LFA-1	Antígeno asociado a la función linfocitaria-1
LPS	Lipopolisacáridos bacterianos
MAPK	<i>Mitogen activated protein kinase</i> o Proteína quinasa activada por mitógenos
MCC	Medio de cultivo completo
MEK	Quinasa de ERK1/2
MEKK	Quinasa de MEK
min	minutos
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido
NF- κ B	Factor nuclear <i>kappa</i> B
NK	células <i>natural killer</i>
O $_2^{\cdot-}$	Anión superóxido
OA	Ovoalbúmina
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PBS	Solución salina tamponada
PI3K	Fosfatidil Inositol 3 Quinasa
PMA	<i>Phorbol 12-Myristate 13-Acetate</i>
PMN	Neutrófilos polimorfonucleares

RFc γ	Receptor para el fragmento Fc de IgG
RFc	Receptor para región Fc de Inmunoglobulinas
RFMLP	Receptor de N- Formil metionil leucil fenilalanina
RGD	Secuencia peptídica Arg-Gly-Asp
RHD	<i>Rel Homology Domain</i>
SEM	Desvío standard muestral
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
sFbg	Fibrinógeno soluble
SOD	Superóxido dismutasa
SSC	<i>Side scatter light</i>
TNF- α	Factor de Necrosis Tumoral- α
VLA	<i>Very Late Antigen</i>

Resumen

La regulación de los procesos inflamatorios ocupa un lugar central en el mantenimiento de la homeostasis, ya sea durante el proceso de eliminación del agente agresor, durante las etapas posteriores de reparación de tejidos, o durante los procesos inflamatorios crónicos. El evento más importante en un proceso inflamatorio agudo lo constituye el acúmulo de neutrófilos (PMN) en el tejido injuriado. Durante estos procesos diversos factores como citoquinas, quemoquinas, agentes quimiotácticos (C5a, C3a), productos generados de la destrucción de las bacterias y factores del sistema de coagulación generan en los PMN una serie de cambios fenotípicos y morfológicos que llevan a la activación de los mismos y a su migración hacia los focos inflamatorios: en un primer momento los PMN interactúan con el endotelio capilar a través de moléculas de adhesión denominadas L-selectinas, que les permiten unirse a sus paredes; luego dicha interacción se hace más firme a través de otras moléculas de adhesión como son las β_2 integrinas. Aunque este es proceso fisiológico que tiende a mantener la homeostasis, bajo ciertas circunstancias, la interacción del endotelio con los PMN, células con un alto potencial citotóxico, puede llevar al daño endotelial y tisular. Por otra parte, las integrinas no sólo son responsables del reclutamiento leucocitario sino que desencadenan también diversas señales intracelulares. El fibrinógeno (Fbg), componente central del sistema de coagulación y proteína de fase aguda, es uno de los ligandos fisiológicos de la β_2 integrina Mac-1, CR3 o CD11b/CD18, presente en la superficie de los PMN. El objetivo del trabajo fue analizar si la interacción del Fbg soluble (sFbg) con los PMN activados durante un proceso inflamatorio, es capaz de modular su funcionalidad y sobrevivencia. Los resultados obtenidos permiten concluir que cuando los PMN han recibido señales inflamatorias se modifica la conformación del CD11b/CD18, de tal forma que aumenta su afección por el sFbg, presente en el plasma o que ha transudado a sitios inflamatorios. Dicha interacción resulta en la activación funcional de los PMN y en la inhibición de su mecanismo apoptótico. Así los PMN presentan una mayor actividad fagocítica y citotóxica y una mayor capacidad para volcar el contenido de sus gránulos con enzimas microbicidas y líticas. Estos resultados implican una conexión entre la cascada de coagulación y la respuesta inflamatoria. Sin embargo, los productos de degradación del sFbg pierden su actividad reguladora, resguardando procesos que descontrolados pueden tornarse

sumamente dañinos para el huésped. Esta modulación de la actividad biológica no es más que la expresión de señales intracelulares específicas que resultan del balance de los distintos estímulos recibidos por las células. Aquí también se demuestra que la modulación de los PMN por el sFbg está mediada por una secuencia ordenada de fosforilaciones en residuos de tirosina de distintas proteínas, fundamentalmente la "*Focal Adhesion Kinase*" o Quinasa de Adhesión Focal (FAK) y la "*extracellular regulated kinase*" ERK1/2, proteína perteneciente a la familia de las "*mitogen activated protein kinases*" o proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK). La activación de esta cascada juega un papel central en la inducción de degranulación, el aumento de la fagocitosis y el retardo de la apoptosis. Estos hallazgos aportan evidencias a favor de que la activación de la proteína ERK1/2 está asociada con un aumento en la actividad biológica y una disminución en los procesos de muerte celular en los PMN. El mecanismo apoptótico involucra además otras señales intracelulares, como la inducción de distintos factores nucleares y genes. Los factores de transcripción NF- κ B son una familia de proteínas capaces de unirse a sitios reguladores del DNA modulando la expresión de diferentes genes entre ellos varios anti-apoptóticos. En esta tesis se demuestra que en los PMN el sFbg también activa el NF- κ B, en forma secuencial a la activación de la ERK1/2 y que la translocación al núcleo del NF- κ B, es responsable de la inhibición de la apoptosis. El conocimiento detallado de estos caminos intracelulares es de suma importancia para entender y, eventualmente, intervenir farmacológicamente en enfermedades con un componente inflamatorio importante.

1. Breve Introducción General y Objetivos.

1. Breve Introducción General y Objetivos.

Los fenómenos inflamatorios se caracterizan esencialmente por la rápida activación de mecanismos complejos y multisistémicos que se desencadenan luego de una injuria tisular producida por infecciones microbianas o procesos traumáticos de distinta naturaleza. Al principio, la inflamación es un evento exclusivamente local que se manifiesta por dolor e hinchazón y que se acompaña de calor y rubor. La evolución de la respuesta inflamatoria dependerá de la capacidad para erradicar el agente invasor y de la extensión del daño ocasionado por el microorganismo infectante o por la propia respuesta inflamatoria. De esta manera los mecanismos inflamatorios pueden entenderse como un sistema integral de defensa y/o reparación de tejidos cuyo objetivo final es el restablecimiento de la homeostasis de un organismo. Los neutrófilos son las primeras células que arriban a los sitios inflamatorios atraídos por agentes quimiotácticos y citoquinas liberadas por los fagocitos. Dichas citoquinas, sumadas a la acción del sistema complemento producen la dilatación y el aumento de la permeabilidad de vasos sanguíneos locales, lo que lleva al aumento local del flujo sanguíneo y al pasaje de fluidos, provocando calor, rubor e hinchazón. Los efectos de las citoquinas modifican también las propiedades de adhesión al endotelio, causando la unión de leucocitos circulantes a las células endoteliales y la migración de los mismos al sitio de la infección provocando el dolor. La inflamación debida a microorganismos también produce la activación de la cascada de coagulación. Estos estímulos generan en los neutrófilos una serie de cambios fenotípicos y morfológicos que permiten esta migración hacia los focos inflamatorios a través de moléculas de adhesión dentro de las cuales se encuentran las selectinas y las integrinas. En un primer momento los neutrófilos interactúan con el endotelio capilar a través de glicoproteínas denominadas L-selectinas, lo que les permite unirse a sus paredes. A continuación se induce la eliminación o *shedding* de las selectinas de la membrana de los neutrófilos, y simultáneamente se producen cambios cualitativos y cuantitativos en otras proteínas de adhesión denominadas β_2 integrinas como el receptor para el factor C3bi del complemento (CR3 o Mac-1 o CD11b/CD18) que llevan a un aumento de la avidéz por su ligando. A su vez las células endoteliales expresan en su membrana plasmática moléculas de adhesión llamadas ICAM-1 que actúan como contrareceptores de las β_2 integrinas (Dustin *et al.*, 1986). Así, ocurrida la adhesión al capilar, los neutrófilos se movilizan hacia los sitios de unión entre las células endoteliales, las cuales cambian su arquitectura en dicho punto para facilitar el pasaje de los neutrófilos.

1. Breve Introducción General y Objetivos.

Mientras ocurre la migración de los neutrófilos, los microorganismos patógenos son opsonizados recubriéndose principalmente de inmunoglobulinas G (IgG) y componentes del sistema complemento activado como C3b y C3bi para poder ser reconocidos y fagocitados por los neutrófilos a través de receptores específicos como son los receptores para la porción Fc de las inmunoglobulinas (RFc γ), CD35 y CD11b/CD18 (Daëron *et al.*, 1997; Wrigth *et al.*, 1983). Tanto las moléculas del complemento como las de anticuerpo, son ligandos que favorecen la unión de los patógenos a la superficie celular, incrementando la eficiencia del proceso de fagocitosis. Por otra parte, en el foco inflamatorio los PMN sufren 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, contribuye a la muerte y digestión del patógeno. Por otra parte los neutrófilos son células terminales que tienen en circulación una vida media corta controlada a través del proceso de muerte celular programada o apoptosis (Haslett *et al.*, 1991). Dicho programa puede ser modificado por diferentes agentes producidos en una respuesta inflamatoria retrasando o acelerando la apoptosis espontánea de PMN.

En los últimos años, se ha esclarecido el concepto de que las integrinas no sólo están involucradas en la adhesión celular sino también en la transducción de señales. Existen en realidad dos tipos de transducción de señales relacionadas con las integrinas (Keely *et al.*, 1998). La primera, es una señalización directa, en donde la estimulación de las integrinas por componentes de la matriz extracelular o por anticuerpos dispara eventos intracelulares que constituyen señales químicas y transmiten *stress* mecánico al citoesqueleto (Fredreck *et al.*, 1993; Clarck *et al.*, 1995). La segunda, consiste en la modulación por parte de las integrinas de señales disparadas por factores de crecimiento, inmunoglobulinas, mitógenos, etc. En este caso el anclaje celular mediado por las integrinas influencia los mecanismos de transducción de señales activados por otros ligandos (Keely *et al.*, 1998).

Dentro de la superfamilia de las integrinas, se encuentra la familia de las β_2 (CD18) integrinas conocidas como LeuCAMs (Springer *et al.*, 1990; Carlos *et al.*, 1994; Bevilacqua *et al.*, 1994; Rosales *et al.*, 1995; Walhl *et al.*, 1996). Esta familia comprende 4

1. Breve Introducción General y Objetivos.

heterodímeros homólogos: LFA-1 (CD11a/CD18), el receptor de complemento tipo 3 (CR3, Mac-1, CD11b/CD18), gp150,95 (CR4, CD11c/CD18) y CD11d/CD18. La importancia fisiológica de las β_2 integrinas está ejemplificada por la forma severa de la deficiencia congénita de β_2 integrinas conocida como *leukocyte adhesion deficiency* o LAD. Los pacientes que padecen dicho síndrome sufren severas infecciones a repetición que amenazan su vida. (Graham *et al.*,1989; Bogomolski-Yahalom *et al.*,1995).

En particular la β_2 integrina CD11b/CD18 presente en la superficie celular de los PMN reconoce una variedad de sustancias endógenas y exógenas incluyendo el factor de complemento C3bi, el fibrinógeno, el factor X, Zymosan, β -glucanos, *Escherichia coli* y *Leishmania* (Petty *et al.*,1996).

El fibrinógeno es una proteína de fase aguda que desempeña tres papeles reconocidos en los mecanismos hemostáticos. Primero, como precursor de la fibrina, el fibrinógeno actúa sellando vasos sanguíneos y evitando hemorragias, ya que participa en el proceso intra y extravascular de coagulación. El fibrinógeno una vez clivado por la trombina se auto ensambla para formar una matriz de fibrina (llamada fibrina I o monómero de fibrina) que luego a través del factor XIIIa forma una estructura macromolecular de uniones covalentes (llamada fibrina o fibrina II) que constituye el trombo. Segundo, el fibrinógeno supe, como un complemento de la estructura de la fibrina, una matriz para la organización espacial de las células que participan en la cura de heridas: eritrocitos, plaquetas, macrófagos y fibroblastos. Tercero, el fibrinógeno es uno de los principales determinantes de la viscosidad de la sangre. Un aumento en la viscosidad de la misma contribuye a la patogenicidad y severidad de desórdenes cardiovasculares a través de hipoxia localizada, *stress* endotelial, los cuales aceleran un proceso de aterosclerosis (Handley *et al.*, *et al.*, 1997).

Los productos de la cascada de coagulación y la respuesta inflamatoria se influncian recíprocamente en diversos aspectos: por un lado, el fibrinógeno, la fibrina y los productos de degradación de estas proteínas plasmáticas presentan importantes efectos en la agregación plaquetaria, el citoesqueleto, la inducción de quimiotaxis en PMN entre otras (Kazura *et al.*,1989) y contribuyen al perfil de riesgo de los pacientes con diabetes y aterosclerosis (Handley *et al.*,1997). Asimismo, la interleuquina 6 (IL-6) una citoquina inflamatoria, aumenta marcada y sostenidamente la biosíntesis del fibrinógeno (Handley *et al.*,1997). Además la IL-1 y el factor de necrosis tumoral (TNF- α) inducen la expresión de ICAM-1 sobre células endoteliales. Considerando que el Fbg tiene la capacidad de unirse

1. Breve Introducción General y Objetivos.

simultáneamente al CD11b/CD18 presente en los leucocitos y a otros receptores en el endotelio y plaquetas, durante una respuesta inflamatoria a través del Fbg aumentan las interacciones leucocitos-endotelio, leucocito-plaqueta, plaqueta-plaqueta (Altieri *et al.*, 1990).

Debido a que el control del reclutamiento de neutrófilos al sitio inflamatorio y de las subsiguientes reacciones es clave para la resolución del proceso patológico y que en definitiva la funcionalidad de los mismos no es más que un reflejo del balance de los caminos transduccionales activados, los objetivos de la presente tesis son:

- ✓ *Analizar los efectos del fibrinógeno soluble sobre la funcionalidad y sobrevivencia de los neutrófilos humanos.*
- ✓ *Estudiar los caminos transduccionales involucrados en la activación de neutrófilos humanos por fibrinógeno soluble.*

2. Introducción

2.1.- El neutrófilo.

Los neutrófilos son células fagocíticas que constituyen la primera línea de defensa durante los procesos inflamatorios. Son células de vida media corta 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* o reservorios 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 permanecen allí por un período de entre 6 y 48 horas hasta su muerte por apoptosis (Sigal *et al.*, 1994).

Los neutrófilos sufren una serie de cambios fenotípicos y morfológicos en respuesta a una gran variedad de estímulos que llevan a la activación de los mismos. Dichos cambios ocurren secuencialmente y permiten su migración hacia los focos inflamatorios. En un primer momento interaccionan con el endotelio capilar a través de glicoproteínas denominadas L-selectinas, que les permiten unirse a sus paredes. Por otra parte, las células endoteliales expresan dos glicoproteínas que aumentan la eficiencia de la interacción célula-célula, las P y E-selectinas. La expresión de 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 induce la eliminación o *shedding* de las selectinas de la membrana de los neutrófilos, y cambios cualitativos y cuantitativos en la expresión de otras proteínas de adhesión denominadas β_2 integrinas como lo son el Mac-1 (CD11b/CD18 o CR3) 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 estímulos inflamatorios 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 como la *Intercellular Adhesión*

Molecule-1 o Molécula de Adhesión entre células 1 (ICAM-1), que actúan como contrareceptores 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. La extensión del reclutamiento de neutrófilos y la acción proinflamatoria de los mismos determina la intensidad de la respuesta inflamatoria. Más aún el reclutamiento de neutrófilos está íntimamente relacionado con la activación y supervivencia de los mismos. Es por esta razón que el control de la vida media de los PMN es considerado un mecanismo clave para la resolución de la situación inflamatoria (Haslett, 1992).

Mientras ocurre la migración de los neutrófilos, los microorganismos patógenos son opsonizados, recubriéndose principalmente de inmunoglobulinas G (IgG) y componentes activados del sistema complemento como C3b y C3bi para poder ser reconocidos por los neutrófilos, quienes poseen en su membrana plasmática receptores para tales moléculas, RFc γ , CD35 y CD11b/CD18 respectivamente (Wright *et al.*, 1983; Daéron *et al.*, 1997). Tanto las moléculas del complemento como las de anticuerpo, son ligandos que favorecen la unión de los microorganismos patógenos a la superficie celular, incrementando la eficiencia de dichas interacciones 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 del microorganismo patógeno. Todos estos procesos se describen detalladamente en las secciones siguientes.

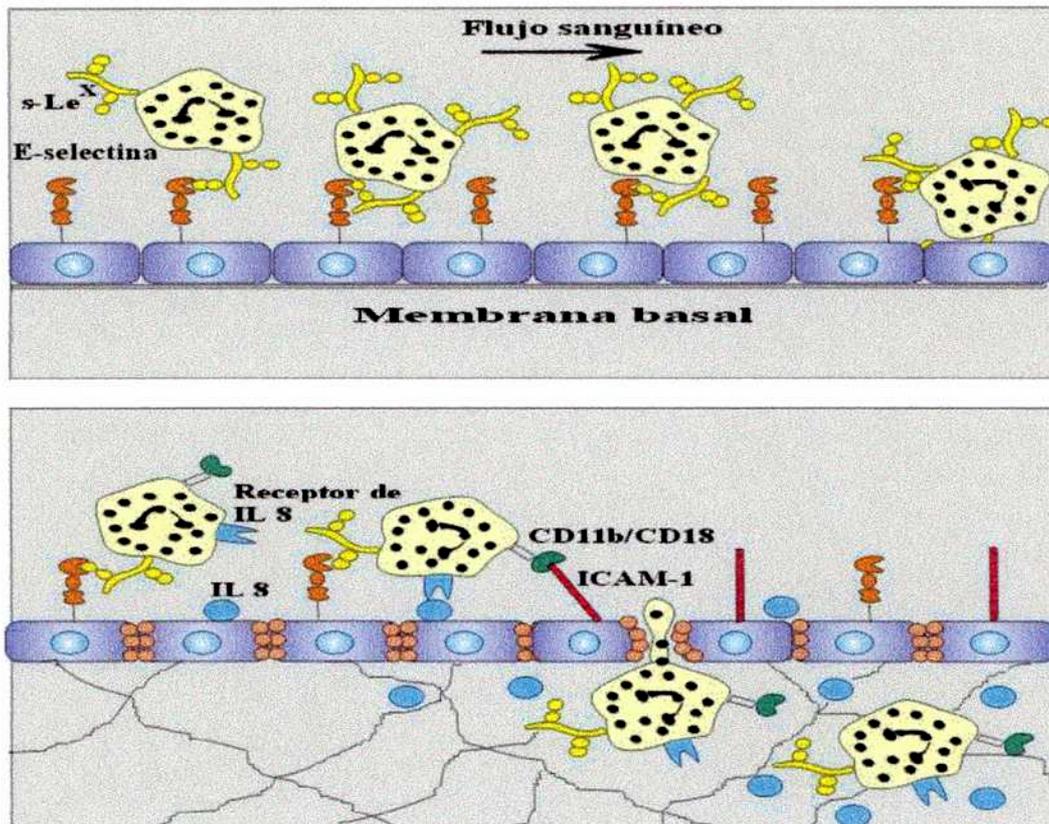


Figura 2.1. Migración de células polimorfonucleares neutrófilas a sitios inflamatorios a través de moléculas de adhesión. El primer paso involucra la unión reversible de neutrófilos al endotelio vascular a través de slectinas presentes en el endotelio y carbohidratos (s-Lewis^x) en el neutrófilo. Esta unión favorece interacciones más fuertes que ocurren como resultado de la inducción en la expresión de ICAM-1 y MAC-1 en el endotelio y los neutrófilos respectivamente. De esta manera los neutrófilos dejan de rodar y pueden extravasar a los sitios inflamatorios.

2.2.-Moléculas de Adhesión.

Las propiedades migratorias de los leucocitos juegan un papel crítico en la fisiología de la respuesta inmune. La mayor parte de los leucocitos maduros están en continua recirculación entre la sangre y los tejidos. Los monocitos y neutrófilos emigran desde el lecho vascular en respuesta, en primera instancia, a modificaciones en la expresión y/o actividad de moléculas presentes en la superficie del endotelio de vénulas post-capilares, generadas en respuesta a un proceso inflamatorio vecino (Cahill *et al.*, 1979; Springer *et al.*, 1990; Carlos *et al.*, 1994; Springer *et al.*, 1995).

Las moléculas responsables de establecer un sistema de comunicación efectivo entre leucocitos, células endoteliales y matriz extracelular, las adhesinas, pueden ser agrupadas en 3 familias diferentes: la familia de las selectinas, la superfamilia de las inmunoglobulinas y la familia de las integrinas. Las adhesinas pueden expresarse en forma constitutiva y/o ser inducidas por diversos mediadores inflamatorios (Springer *et al.*, 1990; Bevilacqua *et al.*, 1994; Carlos *et al.*, 1994; Rosales *et al.*, 1995; Walhl *et al.*, 1996).

Los leucocitos salen del torrente circulatorio atravesando las vénulas del endotelio alto y en una primera etapa se produce una adhesión primaria: los leucocitos que se encuentran circulando se unen a ligandos endoteliales o contrareceptores a través de moléculas expresadas constitutivamente en los leucocitos, denominadas selectinas. Luego la adhesión secundaria requiere de la interacción entre moléculas activadas de la familia de las β_2 integrinas y sus ligandos de la super familia de las inmunoglobulinas. La tercera etapa consiste en la extravasación de linfocitos y la cuarta en la producción de factores que regulan la retención de leucocitos en los tejidos.

2.2.1. Familia de las integrinas.

Las integrinas son una superfamilia de glicoproteínas transmembrana que median interacciones célula-célula y célula-sustrato (Petty *et al.*, 1996). Se encuentran en la mayoría de los tipos celulares y tienen así un papel esencial en casi todos los aspectos de la biología celular desde el desarrollo embrionario hasta la formación de la memoria, participando en procesos inflamatorios, desórdenes cardiovasculares y enfermedades como el cáncer (Clemetson *et al.*, 1998)

Son heterodímeros formados por 2 cadenas polipeptídicas denominadas α y β unidas de modo no covalente, las cuales son requeridas para la normal expresión y funcionalidad de estos receptores. Han sido caracterizadas hasta el presente más de 15 cadenas α distintas y al menos 8 cadenas β diferentes. La mayoría de las cadenas β presentan la capacidad de combinarse con distintas cadenas α , dando lugar a una amplia variedad de heterodímeros, hasta el momento 22, que expresan diferente funcionalidad. La clasificación de las integrinas refleja su composición en cadenas β . Las subunidades α presenta un dominio citoplasmático corto, un dominio transmembrana y un dominio extracelular grande de

aproximadamente 1000 aminoácidos, con un dominio I de unión al ligando y otros dominios (V-VII) que contienen un sitio de unión de cationes bivalentes. Las cadenas β presentan 750 aminoácidos con un dominio citoplasmático corto, a excepción de la β_4 (Longhurst *et al.*, 1998). Aquellas integrinas que involucran la cadena β_1 (CD29) pertenecen a la superfamilia VLA (*very late activation antigen*), en la cual se han caracterizado 6 miembros: VLA1 a VLA6. Aquellas que contienen la cadena β_2 (CD18) son conocidas como LeuCAMs (Springer *et al.*, 1990; Bevilacqua *et al.*, 1994; Carlos *et al.*, 1994; Rosales *et al.*, 1995; Walhl *et al.*, 1996). Esta familia comprende 4 heterodímeros homólogos: LFA-1 (CD11a/CD18), receptor de complemento tipo 3 (CR3, Mac-1, CD11b/CD18), gp150,95 (CR4, CD11c/CD18) y CD11d/CD18 (*Figura 2.2*). Dentro de la familia de las β_3 está la integrina prototipo para estudios de activación, la α IIb β_3 (CD41/CD61, gpIIb/IIIa) presente en plaquetas, que une trombina o colágeno en su estado de baja afinidad y fibrinógeno en su estado de alta afinidad. Dentro de la familia β_4 se encuentra el receptor para lamininas, en la de β_6 , el receptor de fibronectina y tenascina, siendo estas sólo algunas de las integrinas más conocidas (Keely *et al.*, 1998).

Las integrinas reconocen secuencias aminoacídicas en sus ligandos que contengan un residuo ácido esencial para la unión al receptor. Un ejemplo de esto es la secuencia peptídica Arg-Gly-Asp (RGD) que está presente en un gran número de ligandos de integrinas (Longhurst *et al.*, 1998).

Los cationes bivalentes juegan un papel importante en la unión de la mayoría de los ligandos a las integrinas. La adhesión celular mediada por integrinas como la unión de ligandos a receptores purificados es dependiente de concentraciones milimolares de calcio (Longhurst *et al.*, 1998). En general el sitio de unión del ligando en la subunidad α se encuentra alrededor del sitio de unión de cationes y de esta manera la unión de cationes bivalentes durante la interacción ligando-receptor puede desencadenar cambios conformacionales a través de la membrana.

Por otra parte las integrinas se presentan en la superficie de los distintos tipos celulares en forma inactiva, con una baja afinidad por sus ligandos, mientras que en respuesta a estímulos apropiados, sufren cambios cualitativos que llevan a la expresión de epitopes de activación y al consecuente cambio en la afinidad de las mismas por sus ligandos (Longhurst *et al.*, 1998). Se ha propuesto que este cambio en el estado de activación de las integrinas es mediado por los dominios citoplasmáticos en respuesta a eventos intracelulares

desencadenados tal vez por otros agonistas (Longhurst *et al.*, 1998). Otro elemento intracelular que se une a los dominios citoplasmáticos de las integrinas para crear los complejos activadores de integrina son las proteínas talina y α -actinina. Esta función particular permite a las integrinas modular las propiedades de adhesión celular sin cambios en la expresión génica de las integrinas. Por otra parte la capacidad de adaptación y rápida modulación de la interacción ligando-integrina las transforma en coordinadores ideales de los dinámicos procesos celulares.

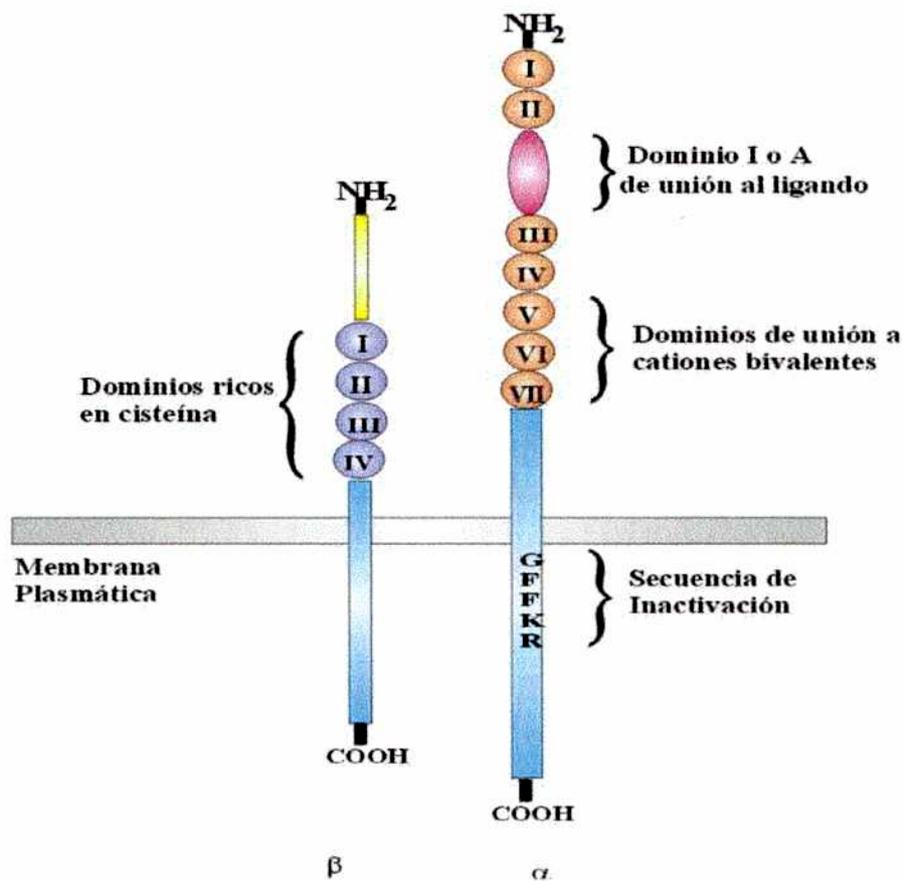


Figura 2.2. Estructura esquemática de la integrina CD11/CD18. La cadena α CD11 contiene el dominio de unión al ligando I y los dominios de unión a cationes bivalentes. La cadena β_2 CD18 está asociada no covalentemente con la cadena α para formar un complejo funcional.

2.2.1.1.- β_2 integrina CD11b/CD18.

La relevancia de las β_2 integrinas se manifiesta con claridad al observar el curso clínico de los pacientes que sufren LAD (*leukocyte adhesion deficiency*). En estos pacientes hay una producción o maduración deficiente de la cadena β . A consecuencia de esto, los leucocitos presentan una expresión deficiente de β_2 integrinas por lo que los procesos de quimiotaxis, agregación, adherencia, fagocitosis y unión de C3bi se ven afectados. De esta manera los leucocitos no pueden llegar al sitio de la infección y el pus no se forma (Springer *et al.*, 1990). Esta combinación de disfunciones lleva, en la mayoría de los casos, a un cuadro clínico severo en el cual se manifiesta una marcada susceptibilidad y predisposición a infecciones bacterianas graves (Graham *et al.*, 1989; Bogomolski-Yahalom *et al.*, 1995). Dichas infecciones recurrentes son generalmente fatales durante la niñez si no es corregido el problema por un trasplante de médula ósea (Springer *et al.*, 1990). Este es uno de los ejemplos más determinantes del papel de las moléculas de adhesión en la localización de los leucocitos *in vivo*.

La β_2 integrina CD11b/CD18 es particularmente importante en la adhesión de células mieloides a otras células y a ligandos generados por la activación de la cascada del complemento y de la coagulación (Springer 1990).

El CD11b/CD18 reconoce una variedad de sustancias endógenas y exógenas incluyendo el factor de complemento C3bi, ICAM-1, el fibrinógeno, el factor X, Zymosan, β -glucanos, *Escherichia coli* y *Leishmania* (Petty *et al.*, 1996).

2.2.1.1.1.-Fibrinógeno: Ligando natural del CD11b/CD18.

Diferentes productos de coagulación y fibrinólisis afectan profundamente distintas facetas de la respuesta inflamatoria, como la activación plaquetaria (Peerschke *et al.*, 1980), la producción de citoquinas por fagocitos mononucleares (Fan *et al.*, 1991; Perez *et al.*, 1991; Fan *et al.*, 1993), agregación de neutrófilos y quimiotaxis (Berliner *et al.*, 1987 Skogen *et al.*, 1988, Kasura *et al.*, 1989); sin embargo, los efectos del fibrinógeno soluble sobre células inflamatorias no fueron investigados anteriormente.

El fibrinógeno es un homodímero de tres cadenas polipeptídicas ($\text{A}\alpha$, $\text{B}\beta$ y γ) unido por 29 puentes disulfuro inter e intracatenarios. Tiene un peso molecular de 340 kDa con un nódulo central (dominio E) y dos nódulos flanqueantes (dominios D). El hígado constituye el único órgano encargado de su síntesis y la concentración plasmática normal se encuentra entre los 200–400 mg/dl (6–12 μM). La vida media en circulación es de aproximadamente 80 horas en individuos sanos y su degradación es un proceso que sigue una cinética de primer orden en donde el número de moléculas degradadas por unidad de tiempo es proporcional a su concentración, manteniendo así su concentración plasmática dentro de límites estrechos (Handley *et al.*, 1997).

El fibrinógeno tiene por lo menos tres funciones en los mecanismos hemostáticos. Primero, como precursor de la fibrina, el fibrinógeno actúa sellando vasos sanguíneos y evitando hemorragias, ya que participa en el proceso intra y extravascular de coagulación. El fibrinógeno una vez clivado por la trombina se autoensambla para formar una matriz de fibrina (llamada fibrina I o monómero de fibrina) que luego a través del factor XIIIa forma una estructura macromolecular de uniones covalentes (llamada fibrina o fibrina II) que constituye el trombo (*Figura 2.3*). Segundo, el fibrinógeno provee, como un complemento de la estructura de la fibrina, una matriz para la organización espacial de células que participan en la cura de heridas como ser eritrocitos, plaquetas, macrófagos y fibroblastos. Tercero y tal vez el más importante, el fibrinógeno es uno de los principales determinantes de la viscosidad de la sangre. Un aumento en la misma contribuye a la patogenicidad y severidad de desórdenes cardiovasculares a través de hipoxia localizada y *stress* endotelial, los cuales aceleran un proceso de aterosclerosis (Handley *et al.*, 1997).

El fibrinógeno presenta diversas interacciones ligando-receptor con células de la sangre. Así los dominios que contienen la secuencia Arg-Gly-Asp (RGD) del fibrinógeno se unen a la integrina gpIIb/IIIa presente en plaquetas. Otra secuencia, presente en el extremo COOH-terminal de la cadena γ (KQAGDV) también promueve la adhesión plaquetaria. Además, el fibrinógeno se une a las moléculas ICAM-1, adhesinas pertenecientes a la familia de las Igs presentes constitutivamente en el endotelio. De esta manera el fibrinógeno puede actuar de puente entre leucocitos, plaquetas y endotelio. Recientemente fue demostrado que la integrina CD11b/CD18 es un receptor de fibrinógeno y reconoce una secuencia peptídica interna diferente en la cadena γ que no involucra ni la región RGD ni el extremo COOH-terminal (Gross *et al.*, 1997).

Desde el punto de vista funcional, el fibrinógeno, la fibrina y los productos de degradación de estas proteínas plasmáticas presentan importantes efectos en diferentes aspectos de los procesos inflamatorios como ser la agregación de plaquetas, alteraciones en el citoesqueleto e inducción de quimiotaxis en PMN entre otras (Kazura *et al.*, 1989) y contribuyen al perfil de riesgo de los pacientes con diabetes y aterosclerosis (Handley *et al.*, 1997). Por ejemplo, los lipopolisacáridos bacterianos (LPS) inducen la producción de IL-6, lo que lleva a un aumento marcado y sostenido de la biosíntesis del fibrinógeno (Handley *et al.*, 1997). La IL-1 y el TNF- α inducen la expresión de ICAM-1 sobre células endoteliales. Los fragmentos de bajo peso molecular producidos por una digestión exhaustiva de la plasmina producen, entre otras cosas, disfunción plaquetaria, alteraciones en el citoesqueleto y acción quimiotáctica sobre los PMN (Handley *et al.*, 1997).

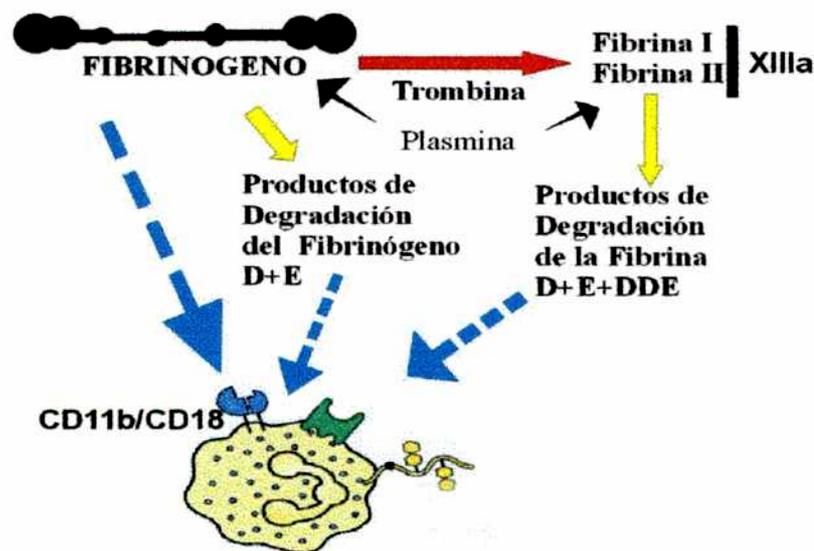


Figura 2.3. Modelo de los caminos de degradación del fibrinógeno. La degradación del fibrinógeno y la fibrina por la plasmina libera fragmentos discretos que pueden unirse al igual que el fibrinógeno a la molécula CD11b/CD18 presente en neutrófilos.

2.3.- Los receptores para el fragmento Fc de Inmunoglobulinas (RFc).

Los anticuerpos, producidos durante la respuesta inmune contra microorganismos invasores constituyen un importante mecanismo inflamatorio de defensa. Estas moléculas forman complejos inmunes (CI) cuando se unen a antígenos microbianos y juegan un papel preponderante como opsoninas y activadores de otras funciones efectoras celulares. La porción Fc de la molécula de anticuerpo es la responsable de iniciar diversas respuestas celulares a través de la interacción con receptores específicos (RFc) (Rosales *et al.*, 1993; Ravetch *et al.*, 1997).

2.3.1.- Receptores para el fragmento Fc de IgG (RFcy).

Existen 3 clases diferentes de RFcy descritos en humanos (Fridman *et al.*, 1992) relacionados estructuralmente pero funcionalmente diferentes.

EL RFcyI es una glicoproteína de 70kDa que une IgG₁ e IgG₃ monomérica humana con gran afinidad. También puede unir CI debido a la presencia de tres dominios extracelulares *Ig-like*, en vez de dos como ocurre en las otras dos clases de RFcy (Ravetch *et al.*, 1997). La expresión de estos receptores está restringida a fagocitos mononucleares en donde la interacción del receptor con su ligando desencadena una fuerte actividad citotóxica (Wallace *et al.*, 1994).

El RFcyII es una glicoproteína que une IgG monomérica con baja afinidad y CI, que se encuentran en PMN, plaquetas, linfocitos de gránulos grandes, células *natural killer* y linfocitos B, así como también en monocitos y macrófagos (Ravetch *et al.*, 1997).

El RFcyIII es una glicoproteína de 50-70 kDa que une IgG monomérica con baja afinidad y CI. Está presente en macrófagos, PMN, linfocitos de gránulos grandes, células *natural killer*. Existen 2 tipos de estos receptores: RFcyIIIA con un dominio transmembrana e intracitoplasmático convencional presente en células *natural killer* y el RFcyIIIB unido a la superficie vía un fosfatidilglicano (GPI) incapaz de generar una señal intracelular por sí mismo, que se encuentra en los PMN (Ravetch *et al.*, 1997).

La diversidad de los RFcy y la amplitud de tipos celulares en los que se expresan constituye la base de la multiplicidad de funciones de gran implicancia biológica mediadas por estos receptores para la porción Fc, tales como:

- i. Depuración o *clearance* de CI (Michel *et al.*, 1983; Finbloom *et al.*, 1985).
- ii. Activación del estallido respiratorio mediado por CI. (Gresham *et al.*, 1988).
- iii. Fagocitosis (Gresham *et al.*, 1986; Gresham *et al.*, 1988).
- iv. Secreción de mediadores inflamatorios como al ácido araquidónico, el factor de activación plaquetario (PAF), prostaglandinas (PG), tromboxanos (Tx) y lipoxigenasas (5-, 12- y 15-lipoxigenasas) generadoras de leucotrienos (LT), lipoxinas e hidroxiácidos (Larsen *et al.*, 1983; Powell *et al.*, 1996).
- 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 dependiente de anticuerpos (ADCC) (Karpovsky *et al.*, 1984; Graziano *et al.*, 1987).
- vii. Cooperación en funciones mediadas por otros receptores para Fc de Ig o bien por otros receptores no relacionados con Igs (Ej. CD11b/CD18) (Zhou *et al.*, 1994; Daëron *et al.*, 1997).

2.4.- Funciones biológicas de los neutrófilos.

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.

2.4.1.- Fagocitosis.

La fagocitosis, descrita por Metchnikoff en el siglo pasado (Metchnikoff *et al.*, 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 (LFA-1) y CR3 (CD11b/CD18) respectivamente.

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 FcγR, induce tanto la adhesión como su ingestión (Metzger *et al.*, 1987). Así, la expresión 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 dependientes 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 halla inmovilizada, 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.

2.4.2.- 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 RFcys 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.

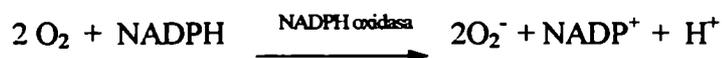
En la mayor parte de los casos, el anticuerpo que participa en la ADCC es de la clase IgG, por lo que los receptores que intervienen en dicha función son los RFcy. Existe evidencia que indica que el FcyRIIIB no es capaz de mediar la ADCC pero sí de cooperar en el proceso total en neutrófilos, mientras que el RFcyII sí es capaz de activar este sistema citolítico (Fanger *et al.*, 1989).

2.4.3.- Estallido respiratorio. La producción de reactivos intermediarios del oxígeno.

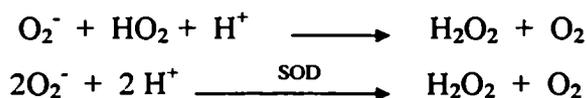
Ante la activación de los fagocitos por diversos estímulos, se genera un grupo complejo de agentes químicos altamente reactivos que destruyen a los microorganismos invasores a través de un proceso de oxidación inespecífico (Babior *et al.*, 1992). Estos agentes químicos cumplen un papel importante tanto 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 genera un aumento 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.*, 1992). Este proceso es denominado “estallido respiratorio” y la regulación de dicho proceso es sumamente importante ya que es altamente tóxico y debe ser restringido a los límites de la vacuola fagocítica, y actuar en forma breve cuando los microorganismos son ingeridos (Segal *et al.*, 1996).

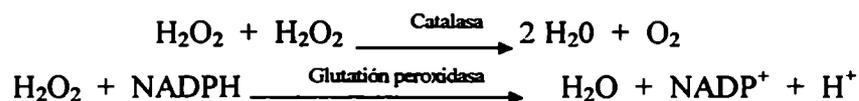
El estallido respiratorio resulta de la activación de la enzima NADPH oxidasa, que cataliza la reducción del oxígeno a O_2^- a expensas de NADPH:



El anión superóxido es capaz de reaccionar con una 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 sí mismo un papel crítico en las respuestas citotóxicas desarrolladas hacia microorganismos. El superóxido producido es subsecuentemente convertido en H_2O_2 ya sea en forma espontánea o a través de la enzima superóxido dismutasa (SOD):



Por otra parte, concentraciones altas de H_2O_2 ($>0.5\mu M$) 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



2.4.4.-Sistemas microbicidas independientes del oxígeno.

Los fagocitos, además de poseer sistemas citotóxicos dependientes del O₂, cuentan con sistemas microbicidas que actúan en forma independiente del O₂. 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 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).

2.4.5.-Degranulación.

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. Estas organelas no son simples contenedores de proteínas proteolíticas y bactericidas que son liberadas a la vacuola fagocítica para la muerte de los patógenos ingeridos, sino que también son importantes reservorios de proteínas de membrana las que son incorporadas a la membrana plasmática cuando las organelas se fusionan con la misma. De esta manera los gránulos y vesículas secretorias cambian fundamentalmente la habilidad de los neutrófilos para interactuar con el ambiente (Borregaard *et al.*, 1997)

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 2.1* indica el contenido de las tres especies de gránulos así como también de las vesículas secretorias.

Tabla 2.1 Contenido de los gránulos y vesículas secretorias de los neutrófilos humanos.

Gránulos azurófilos	Gránulos específicos	Gránulos de gelatinasa	Vesículas secretorias
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		

o 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 (Lew *et al.*, 1984; Sengeløv *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 hallan 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.

2.4.5.1.- 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 un aumento de la expresión de proteínas en la membrana celular (Mac-1, CR1, FMLP-R, FcγRIII entre otros) en respuesta al estímulo de mediadores

inflamatorios, todos ellos incapaces de mediar “per se” la exocitosis de otros tipos de gránulos (Tosi *et al.*, 1992; Borregard *et al.*, 1997).

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

2.4.5.2.- Gránulos específicos o secundarios.

Estos gránulos están definidos por su contenido en lactoferrina en su matriz y constituyen un reservorio importante de citocromo b₅₅₈ y 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 Ca²⁺ (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 y la molécula CD66b. Si bien existen datos que indican 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).

2.4.6.- 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 , el antagonista del receptor para IL-1 (Malyak *et al.*, 1994), IL-6 e IL-8 (Fujishima *et al.*, 1994). 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.

2.4.7.- Muerte celular programada o Apoptosis.

La necrosis y la apoptosis son dos tipos de muerte celular que ocurren en los organismos vivos. La necrosis es una muerte no fisiológica provocada por un daño celular severo que no puede ser reparado, en donde hay disgregación de organelas, rotura de membrana plasmática y el vertido del contenido celular al exterior, desencadenando la reacción inflamatoria en el tejido. La apoptosis, por otro lado, es la modalidad fisiológica de la muerte celular, en donde las células no deseadas son eliminadas a través de un proceso que implica síntesis activa de nuevas moléculas. La célula se achica, se condensa la cromatina nuclear, y se fragmenta el DNA (García Bermejo *et al.*, 2000). La mayoría de las organelas permanecen intactas, las proteínas son clivadas y degradadas por cistein proteasas, conocidas como caspasas (Alnemri *et al.*, 1996), las cuales son sintetizadas como precursores inactivos y clivadas en respuesta a estímulos apoptóticos para activarse (Akgul *et al.*, 2001). En una etapa más avanzada la membrana plasmática se fragmenta y se forman los cuerpos apoptóticos, los cuales exponen en la cara externa de la membrana glicoproteínas y fosfolípidos típicos que sirven como señales de reconocimiento para macrófagos encargados de su eliminación (García Bermejo *et al.*, 2000).

Los neutrófilos son células terminales que tienen una vida media corta en circulación. En ausencia de estímulos apropiados, los PMN sufren una serie de cambios indicativos de muerte celular programada o apoptosis, los que incluyen achicamiento de la célula, condensación de la cromatina nuclear, y fragmentación del DNA (Haslett *et al.*, 1991). Dicho programa puede ser modificado por diferentes agentes producidos en una respuesta inflamatoria. Por ejemplo LPS, GM-CSF o IL-8 son capaces de retrasar la apoptosis espontánea de PMN mientras que estímulos como TNF- α o FMLP la aceleran. La apoptosis entonces, no sólo representa una alternativa a la muerte por necrosis sino que está asociada con la pérdida de las funciones del PMN, como quimiotaxis, fagocitosis, degranulación y estallido respiratorio. Por estas razones, la apoptosis de los PMN puede ser considerada como un mecanismo que contribuye a la resolución del foco inflamatorio (Haslett, 1992; Whyte *et al.*, 1993).

Por otro lado a pesar de que los PMN expresan una variedad de caspasas regulatorias y efectoras, incluyendo caspasas -1, -3,-4 y -8, en PMN la apoptosis es estrictamente dependiente de caspasa 3 (Yamashita *et al.*, 1999). Además, los PMN expresan proteínas de la familia Bcl-2 como Bax, Bid, Bak y Bad con efectos pro-apoptóticos pero no Bcl-2 que es principalmente anti-apoptótica, lo que explicaría la vida media relativamente corta de los PMN (Akgul *et al.*, 2001).

2.5.-Transducción de señales a través de integrinas.

En los últimos años, se ha esclarecido el concepto de que las integrinas no sólo están involucradas en la adhesión celular sino también en la transducción de señales. Existen en realidad dos tipos de transducción de señales relacionadas con las integrinas (Keely *et al.*, 1998). La primera, es una señalización directa, en donde la estimulación de las integrinas por componentes de la matriz extracelular o por anticuerpos dispara eventos intracelulares que constituyen señales químicas y transmiten *stress* mecánico al citoesqueleto (Fredreck *et al.*, 1993; Clarck *et al.*, 1995). La segunda, consiste en la modulación por parte de las integrinas de señales disparadas por diferentes ligandos como TNF- α , CI, etc. En este caso el anclaje celular mediado por las integrinas influencia los mecanismos de transducción de señales activados por factores de crecimiento (Keely *et al.*, 1998).

2.5.1.-Quinasa de Adhesión Focal y MAP quinasas.

Estudios realizados en fibroblastos muestran que la unión del ligando y el reclutamiento subsecuente de integrinas dispara la activación de proteínquinasas intracelulares la cual lleva a la formación de estructuras especializadas denominadas focos de adhesión. En los focos de adhesión se encuentran diferentes proteínas como la quinasa citoplasmática de tirosina denominada *Focal-Adhesion Kinase* o Quinasa de Adhesión Focal (FAK) de 125 kDa (Buridge *et al.*, 1988) (*Figura 2.4*). La FAK se encuentra altamente conservada y puede ser detectada en la mayoría de los tipos celulares. Sin embargo en fibroblastos la fosforilación en tirosina de la FAK requiere la adhesión de las células a proteínas de la matriz extracelular, la cual se ve disminuída en células en suspensión (Miyamoto *et al.*, 1995; Longhurst *et al.*,

1998;). La FAK no presenta dominios SH2 o SH3 que medien interacciones proteína-proteína. El extremo NH2 puede interactuar con los dominios citoplasmáticos de las integrinas, proveyendo un medio para la activación de FAK (Burrige *et al.*, 1988). El extremo C-terminal se requiere para la localización de los focos de adhesión, sugiriendo que dicha secuencia interactúa con una o más proteínas focales de adhesión y proteínas del citoesqueleto como paxilina (Hildebrand *et al.*, 1995) o proteínas de la familia *Src* (Longhust *et al.*, 1998). La autofosforilación de FAK genera un estado de alta afinidad para la unión de proteínas de la familia *Src*, lo cual a su vez causa una máxima activación de FAK (Calalb *et al.*, 1996). Este evento genera fosforilaciones adicionales que llevan a la fosforilación en tirosina de proteínas que se pueden asociar con FAK por diversos mecanismos, incluyendo proteínas del citoesqueleto y proteínas adaptadoras como Grb2 y p130Cas (Clarck *et al.*, 1995). Las primeras evidencias de señalización a través de β_2 integrinas en PMN fueron observadas en neutrófilos adheridos y estimulados con TNF α . En dichas condiciones se observó la fosforilación de proteínas como *Syk* y *Hck*, *Fgr* y *Lyn* de la familia *Src* (Fuortes *et al.*, 1993; Yan *et al.*, 1996; Yan *et al.*, 1997; Mócsai *et al.*, 1999). Por otra parte a pesar de que los neutrófilos no forman verdaderas estructuras focales, se han identificado FAK fosforilada y paxilina en neutrófilos adheridos (Fernández *et al.*, 1998).

El reclutamiento de integrinas puede, además de activar a FAK, llevar a la activación de elementos de la cascada de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (*Mitogen-Activated Protein Kinases* o MAPKs), tanto en forma dependiente como independiente de FAK (Keely *et al.*, 1998). En células de mamíferos se han descrito tres familias de MAPKs: la familia de *c-Jun N-terminal kinases* (JNKs), de *extracellular signal-regulated kinases* (ERK1/2) y de p38. ERK1/2 y p38 son activadas en neutrófilos humanos en respuesta a citoquinas (McLeish *et al.*, 1998), quimioattractantes (Rane *et al.*, 1997; Nick *et al.*, 1997; Zu *et al.*, 1998) y LPS bacteriano (Nick *et al.*, 1996). A pesar de que la JNK está presente en PMN, los estímulos proinflamatorios no son capaces de aumentar su actividad (Nick *et al.*, 1997; McLeish *et al.*, 1998). La activación a través de la fosforilación de una MAPK es el paso final de una cascada de señalización intracelular en el cual la quinasa de la quinasa de la MAPK fosforila a la quinasa de la MAPK la cual fosforilación a la MAPK en residuos específicos de tirosina y treonina (Nick *et al.*, 1997). Una vez activada la MAPK es capaz de activar factores de transcripción a través de la fosforilación y así regular la expresión

génica. La elucidación de factores específicos responsables de la regulación mediada por integrinas puede ayudar a resolver la complejidad de dicho sistema.

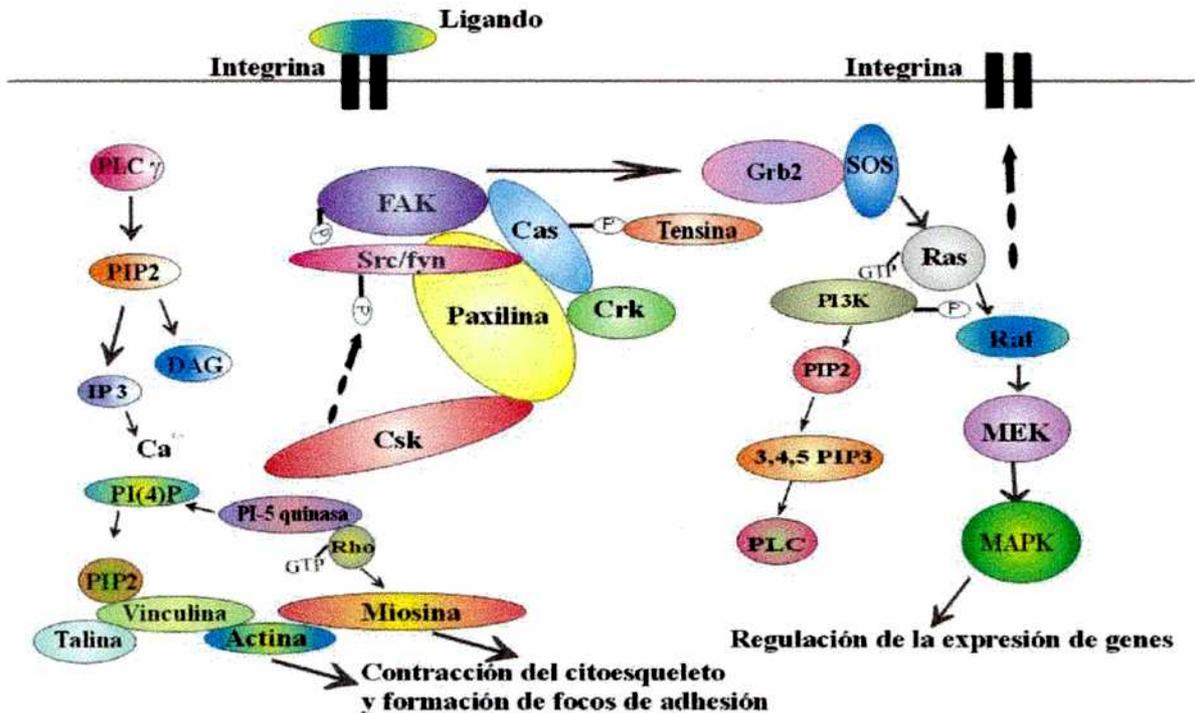


Figura 2.4 La interacción entre integrinas y sus ligandos promueve la autofosforilación de FAK, facilitando la unión de *Src-Fyn*, lo cual resulta en la fosforilación y activación de FAK. El complejo FAK-*Src* fosforila a *Cas* y posiblemente a paxilina y tensina. Otras proteínas serían reclutadas al complejo como *Grb2*, activando el camino de las MAPKs. El PIP2 generado por la acción de la PI5 quinasa, se acompleja con α -actinina y vinculina generando sitios de unión en vinculina para actina y talina. PIP2 también sería responsable de la liberación de reservorios intracelulares de calcio.

2.5.2.- Factor de transcripción NF- κ B.

El NF- κ B es un factor de transcripción eucariota que existe en casi todos los tipos celulares. Fue descrito por primera vez en 1986 como un factor nuclear necesario para la transcripción de la cadena liviana *kappa* de las inmunoglobulinas en células B (Sen *et al.*, 1986) sin embargo existen evidencias de que regula genes de la repuesta inflamatoria, de diferenciación celular y apoptosis (Baldwin, 1996).

El NF- κ B existe en el citoplasma en forma de homo o heterodímeros de una familia de proteínas estructuralmente relacionadas. Cada miembro de la familia contiene una región NH₂ terminal denominada *Rel homology domain* (RHD) dentro de la cual se encuentra el dominio de unión al DNA y el de dimerización y la señal de localización nuclear (NLS). Hasta el momento se han identificado 5 proteínas pertenecientes a la familia NF- κ B en células de mamíferos: p65, c-Rel, Rel B, p50/p105 y p52/p100. Mientras que las tres primeras son producidas como proteínas activas, las últimas son sintetizadas como precursores de 105 y 100 kDa respectivamente y luego procesadas a formas transcripcionales activas más pequeñas (Caamaño, 2000).

Los dímeros de NF- κ B se encuentran secuestrados en el citosol de células en reposo a través de uniones no covalentes por una clase de proteínas inhibitorias denominadas I κ B (Figura 2.5). Las proteínas de esta familia también se encuentran relacionadas funcional y estructuralmente, y hasta el momento se han identificado siete miembros: I κ B- α , I κ B- β , I κ B- γ , I κ B- ϵ , Bcl-3, p100 y p105. Todos ellos presentan secuencias repetidas denominadas anquirinas, las cuales se unen a la secuencia RHD presente en el NF- κ B y enmascaran de esta manera la señal de localización nuclear impidiendo la translocación al núcleo del factor de transcripción (Baeuerle *et al.*, 1994). Las señales de activación del NF- κ B causan la disociación y consecuente degradación de las proteínas I κ B, permitiendo a los dímeros de NF- κ B entrar al núcleo y regular la expresión génica (Griscavage *et al.*, 1996). En respuesta a la activación de NF- κ B las proteínas I κ B son fosforiladas en los residuos Ser 32 y Ser 36 por la quinasa de I κ B (IKK) lo cual lleva a la poliubiquitinilación en los residuos Lys 21 y Lys 22 y a la posterior degradación de las mismas por el complejo multicatalítico, dependiente de ATP, proteosoma 26S (Karin *et al.*, 2000).

Uno de los aspectos más interesantes del NF- κ B es la variedad y la naturaleza de los inductores de su activación. Algunos inductores son LPS, proteínas virales, RNA doble cadena, ROI, IL-1, TNF- α , esfingomiélin, ionóforos de calcio, etc. De esta manera el NF- κ B juega un papel crítico en la respuesta inmune innata regulando la expresión génica de citoquinas y proteínas como IL-1, IL-6, TNF- α , linfotóxina e IFN γ . También es capaz de regular diversas proteínas de fase aguda como la proteína amiloide sérica A1, glicoproteína ácida α 1, angiotensinógeno, factor de complemento B (Bf), y el factor de complemento C3 y moléculas de adhesión como ICAM-1, VCAM-1 y E-selectina (Ghosh *et al.*, 1998).

Sin embargo muy poco se sabe de las señales directamente próximas al NF- κ B. Estudios previos muestran que en respuesta al TNF- α se activa la protein quinasa MEKK-1 (*Mitogen Activated Protein Kinase/Extracellular signal Regulated Kinase Kinase*) la cual activa a NF- κ B además de JNK (Hirano *et al.*,1996). Más aún, la quinasa que fosforila la quinasa de la ERK1/2 puede activar a la quinasa de I κ B y regular la activación de NF- κ B (Karin *et al.*,2000).

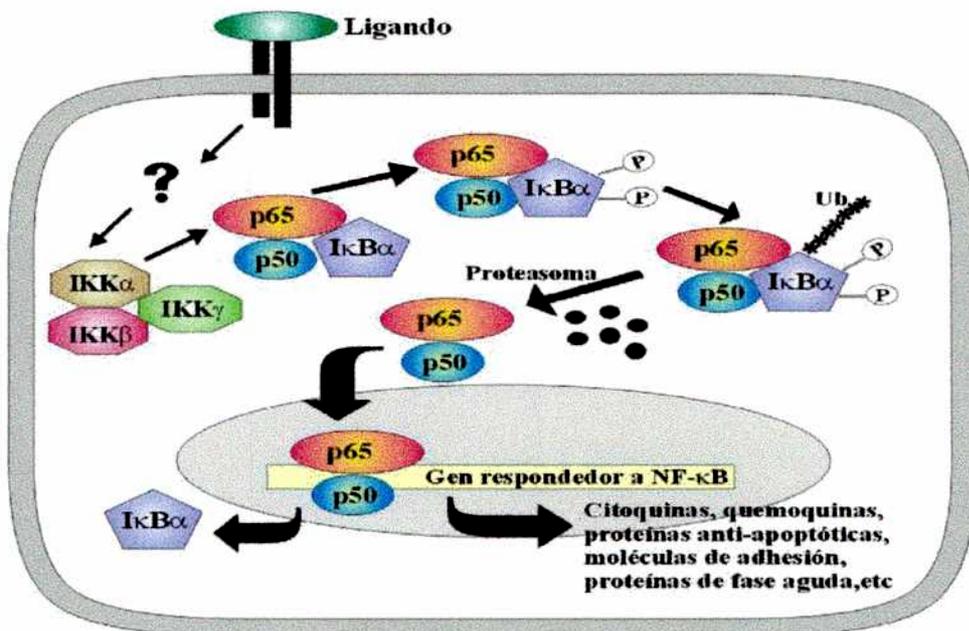


Figura 2.5. Modelo esquemático de la activación de NF- κ B. Diversos estímulos, activan IKK a través de un mecanismo no dilucidado hasta el momento. Una vez activada IKK, IKK fosforila I κ B- α , lo que resulta en la poliubiquitinación de I κ B- α . Esto lleva a la rápida degradación de I κ B- α por el complejo proteosoma. De esta manera queda expuesta una secuencia de localización nuclear presente en el NF- κ B lo que permite la translocación del mismo al núcleo. En el núcleo el NF- κ B regula la transcripción de diversos genes entre los que se encuentran citoquinas, proteínas anti-apoptóticas, proteínas de fase aguda y su propia proteína inhibitoria I κ B- α .

2.5.3.-Cooperación con otros receptores.

Existen evidencias de que la unión entre integrinas y Fc receptores es capaz de iniciar un complejo camino de transducción de señales que contribuye a la activación de ciertas funciones efectoras de los leucocitos como ser el estallido respiratorio (Zhou *et*

al.,1994) y la degranulación (Huizinga *et al.*,1990), necesarias para la muerte efectiva del blanco. Se observó que la β_2 integrina CD11b/CD18 es capaz de hacer *co-capping* con el RFc γ III en la superficie de los neutrófilos (Zhou *et al.*,1993) y que juntos priman al RFc γ II para la generación de intermediarios reactivos del oxígeno (Amnenkov *et al.*,1996). Existen datos concretos de que si bien el CD11b/CD18 no induce lisis celular por sí solo, puede mediar un aumento de la fagocitosis vía Fc γ R (Detmers *et al.*,1994) y de la ADCC (Rubel *et al.*,1999). También existen evidencias de que fibroblastos transfectados con RFc γ II defectuosos en su dominio intracelular sólo son capaces de fagocitar partículas opsonizadas con IgG en la presencia del CD11b/CD18 (Worth *et al.*, 1996). Por otro lado, transfectantes expresando sólo RFc γ IIIb, el cual no es competente para mediar la función de fagocitosis, son capaces de hacerlo en presencia de CD11b/CD18 (Worth *et al.*,1996).

Diversos trabajos afirman que la unión de un región particular de la cadena α del CD11b/CD18 por un anticuerpo monoclonal induce la polimerización de actina, el aumento de la adhesividad y el aumento de la expresión del CD11b/CD18 en granulocitos humanos (Stockl *et al.*,1995). Esto proveería un mecanismo para unir el citoesqueleto de actina a la membrana de los neutrófilos, lo cual es necesario para el aumento de la adhesión y trans migración endotelial. La molécula CD11b/CD18 no solo actuaría junto con los RFc γ (RFc γ II, RFc γ IIIb), sino que también lo haría junto con el receptor para LPS (CD14) en donde la unión de LPS-LBP (*lipopolysaccharide-binding protein*) al CD14 y su asociación con el CD11b/18 produce un aumento de la adherencia; con el receptor para el activador de plasminógeno tipo-uroquinasa (uPAR) el mecanismo propuesto es semejante al CD14 y al RFc ϵ II para activar células hematopoyéticas (Petty *et al.*,1996).

Hoy en día existen considerables evidencias para avalar la idea de que ciertos receptores unidos a GPI interactúan físicamente con las β_2 integrinas para mediar funciones celulares. Estos receptores unidos a GPI depositan la función de transducción de señales a las β_2 integrinas, las cuales están en directa comunicación mecánica y química con el interior de la célula. Sin embargo este paradigma no está limitado a los receptores unidos a GPI, ya que ciertos receptores transmembrana y solubles también interactúan con el CD11b/CD18 (Petty *et al.*,1996).

3. Materiales y Métodos

3.1.-Reactivos generales.

Se utilizaron los siguientes reactivos: naranja de acridina, bromuro de etidio, yoduro de propidio (IP), ionomicina, phorbol 12-Myristate 13-Acetate (PMA), formyl methionyl leucyl phenilalanine (FMLP), Fluo 3-AM, IgG de conejo anti-eritrocito de carnero (Ec), Ovoalbúmina (OA) (gradoV), Lipopolisacárido (LPS) de *Escherichia coli* 0111:B4 y polimixina B (Sigma St. Louis, MO, USA), Fibrinógeno humano y albúmina humana (Baxter Inunno, Buenos Aires, Argentina. Trombina bovina TT (Diagnostics Grifolds, Buenos Aires, Argentina). Pepstatina, Leupeptina, phenylmethylsulfonyl Fluoride (PMSF), Herbimycin, Genistein, 1-(5-isoquinolinyisulfonyl)2-methylpiperazine (H7), PD98059, SB203580, MG132, Lactacystina, y Inhibidor de Calpaína I&II (Cambiochem-Novabiochem, La Jolla, CA, USA). Anticuerpo monoclonal (mAb) murino anti FcγII humano (CD32) (C1KM5) conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC), mAb murino anti FcγIII humano (CD16) (3G8) conjugado con ficoeritrina (PE), mAb murino anti CD11b/CD18 humano (Mac-1) (Bear-1) conjugado con FITC, mAb murino anti CD66b humano (CD66b) (80H3) conjugado con FITC y anticuerpo control de isotipo IgG1 murina conjugado con FITC y/o PE fueron obtenidos de CALTAG Lab (Burlingame, CA, USA). mAb libre de azida anti-CD11b (IgG1) (Bear 1) y control de isotipo de IgG1 murina fueron obtenidos de Immunotech (Marseilles, Francia). El mAb anti-CD11c humano (clon 3.9) fue obtenido de Caltag. El mAb anti-fosfotirosina (4G10) fue obtenido de Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY, USA), los mAbs anti-fosfoERK1/2, fosfo38 y FAK como los policlonales anti p38 y anti ERK2 y el anti-p65 y anti-p50 se compraron en Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). El anticuerpo anti-IκB-α se obtuvo de New England BioRabs (MA). El mAb anticaspasa-3 activa se obtuvo de BD Pharmingen (San Diego, CA, USA).

3.2.-Soluciones.

3.2.1.-Solución de Ficoll-Hypaque.

Los PMN fueron purificados mediante el empleo de una solución de Ficoll-Triptom preparada en forma similar al método descrito por Böyum (Böyum *et al*, 1968). A

3. Materiales y Métodos

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.-Tampón fosfato salino (PBS).

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

3.2.4.-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.

3.2.5.-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. Materiales y Métodos

3.2.6.-Medio de cultivo completo (MCC).

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

3.2.7.-Solución RIPA modificado.

Se preparó una solución con una concentración final de Tris-HCl 50 mM, pH 7.4, NP-40 1%, Na-Deoxicolato 0.25 %, NaCl 150 mM, EDTA 1mM, PMSF 1mM, Leupeptina y Pepstatina 1mg/ml cada una, Na₃VO₄ 1mM y NaF 1mM.

3.2.8.-Solución A y B para la preparación de extractos citoplasmáticos y nucleares.

Se prepararon dos soluciones: A) 10 mM de Hepes (pH 7.9), 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 1mM de ditioneitol (DTT), y mezcla de inhibidores de proteasas (P-8340) (Sigma) B) 20 mM de Hepes (pH 7.9), 0.4 M NaCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM EGTA, 1 mM DTT y mezcla de inhibidores de proteasas (P-8340) (Sigma).

3.3.-Purificación de PMN.

Sangre de donadores normales voluntarios (Sección Hemoterapia-CEMIC) fue recogida en tubos con citrato de sodio. La sangre fue diluida al medio con PBS y sembrada sobre una solución de Ficoll- Triosom formando un sistema bifásico, el cual fue centrifugado a 1550 rpm durante 40 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 PBS. 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

3. Materiales y Métodos

granulocitos y se lavó con PBS. 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.- Cultivo de células.

La línea celular hematopoyética humana HL-60 se cultivó en medio RPMI 1640 suplementado con 10% de SFB, 1% de glutamina y 1% de streptomicina y penicilina (Gibco Lab) a 37°C en un ambiente de 5% de CO₂.

3.5.- Preparación de fibrinógeno adherido a placas.

0.3 ml de una solución de fibrinógeno de 250µg/ml se dispusieron en cada pocillo de una placa de 24 pocillos y se lo dejó secar a 37°C. Luego se realizaron 3 lavados con PBS y se guardó en heladera hasta su uso.

3.6.- Preparación de complejos inmunes (CI).

3.6.1.- Antígenos empleados para la preparación de los CI.

Se empleó OA purificada cromatográficamente.

3.6.2.- Obtención de IgG de conejo anti-Ovoalbumina (IgG anti-OA).

El antisuero se obtuvo por inmunización de conejos con OA purificada cromatográficamente. 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

3. Materiales y Métodos

de la primera inoculación. Cuarenta días después de la primera inoculación, el conejo fue sangrado, el suero inactivado y la IgG fue obtenida por precipitación con sulfato de amonio al 50% y cromatografía en DE-52 celulosa (Whatman Paper Co). Posteriormente, se pasó la IgG de conejo 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.

3.6.3.-Formación de 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 37^o C y 18 hs a 4^o C. Para los cálculos, se consideró un peso molecular de 150kDa para la IgG de conejo y de 40kDa para la OA.

3.7.-Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC).

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 sangre de pollo heparinizada fue diluída 1:10 en MCC y 100µl de esta suspensión fueron incubados con 50-100µCi Na₂⁵¹CrO₄ (New England Nuclear, Boston, MA, USA), 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. Materiales y Métodos

3.7.3.-Sensibilización de las células blanco.

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

3.7.4.-Reacción de ADCC.

Esta reacción se realizó en placas de 96 pozos de fondo plano según se describió previamente (Geffner *et al*, 1987). Brevemente, PMN a 3×10^6 cél./ml (100 μ l) fueron incubados con 1×10^5 ^{51}Cr -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 CO_2 y 95% de aire húmedo, la placa de cultivo fue centrifugada y el porcentaje de citotoxicidad fue calculado como:

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

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 triplicado.

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

3.8.-Fagocitosis.

3.8.1.-Células blanco.

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

3. Materiales y Métodos

3.8.2.-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 (200µg/ml) durante 30 min. a 37^o C (Ec_{óptima}). La sensibilización subóptima fue llevada a cabo por incubación de Ec con IgG de conejo anti-Ec (50µg/ml) durante 30 min. 37^o C (Ec_{subóptima}).

3.8.3.-Ensayo de Fagocitosis.

El ensayo de fagocitosis se realizó como se describió anteriormente (Gresham *et al.*, 1988). 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^o C en MCC. Luego de este período, se efectuó un shock hipotónico a 4^o 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%.

3.9.-Citotoxicidad celular mediada por radicales libres.

3.9.1.-Células blanco

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

3.9.2.-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.

3.9.3.-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). 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 3.7.4.

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).

3.10.-Citometría de Flujo.

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

3.10.1.-Evaluación de la expresión de, RFc γ II y RFc γ III.

Células tratadas con sFbg y controles fueron centrifugadas y resuspendidas en una concentración de 2.5×10^6 cél./ml. Luego, se incubaron 200 μ l de dicha suspensión 30 min. a 4°C con mAb anti- Fc γ RII, o anti- Fc γ RIIB, ambos conjugados con FITC, o controles

3. Materiales y Métodos

de isotipo irrelevantes IgG2b murina. Los PMN fueron lavados dos veces y resuspendidos en 0.3 ml de ISOFLOW. Se cuantificó la intensidad de fluorescencia de 20.000 células por muestra. Los resultados fueron expresados como la Intensidad Media de Fluorescencia (IMF) (expresada en unidades arbitrarias). La intensidad de fluorescencia inespecífica se obtuvo a partir del control de isotipo irrelevante (IgG1ó IgG2b).

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

3.10.2.1.-Marcación de células con Fluo-3AM.

Los cambios en los niveles de $[Ca^{2+}]_i$ fueron evaluados empleando el compuesto Fluo 3-acetometil éster (AM), el cual al atravesar la membrana plasmática se torna irreversiblemente impermeable debido a la acción de las esterasas celulares. El Fluo 3AM fluoresce al interactuar con Ca^{2+} libre intracelular ($[Ca^{2+}]_i$). Ello permite el monitoreo de cambios en los niveles de $[Ca^{2+}]_i$ con posterioridad a un estímulo dado.

La suspensión de PMNs se marcó según se ha descripto previamente (Merrit *et al*, 1990). Brevemente, los PMN, en una concentración de 5×10^6 cél./ml, se incubaron con Fluo 3-AM $4 \mu M$ en PBS durante 30 min. a $37^\circ C$. Posteriormente, las células fueron lavadas 3 veces y resuspendidas en una concentración final de 5×10^5 cél./ ml. en MCC. Las células permanecieron a $37^\circ C$ hasta su estimulación donde alícuotas de $500 \mu l$ fueron tratadas con sFbg, FMLP, CI o albúmina y la fluorescencia intracelular monitoreada por citometría de flujo.

3.10.2.2.-Análisis de los datos obtenidos.

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

Para el análisis de los datos obtenidos, se realizó un gráfico de puntos: FII vs. tiempo, donde se registra la intensidad de fluorescencia de cada PMN en el momento en que es impactado por el rayo láser 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 marcador que abarcara el 97% de dichas células. Así, los PMN que incrementaron su fluorescencia en valores superiores al delimitado por el marcador fueron considerados como respondedores.

3.10.3.-Evaluación de la degranulación.

La expresión de los marcadores de superficie CD11b/CD18 y CD66b sobre la superficie del PMN se usaron como indicadores de la degranulación de vesículas secretorias y gránulos secundarios, respectivamente (Niessen *et al.*, 1992). Células tratadas con sFbg y controles fueron centrifugadas y resuspendidas en una concentración de 2.5×10^6 cél./ml. Luego, 200 μ l de dicha suspensión se incubaron 30 min. a 4⁰ C con mAbs anti-CD11b/CD18 o anti-CD66b ambos conjugados con FITC o controles de isotipo irrelevantes IgG2b murina. Los PMN se lavaron dos veces y se resuspendieron en 0.3 ml de ISOFLOW. Se cuantificó la intensidad de fluorescencia de 20.000 células por muestra. Los resultados fueron expresados como IMF (expresada en unidades arbitrarias). La intensidad de fluorescencia inespecífica se obtuvo a partir del control de isotipo irrelevante (IgG1ó IgG2b).

3.10.4.-Evaluación de la apoptosis por incorporación de ioduro de Propidio.

Las células apoptóticas presentan un contenido de DNA menor que las células no apoptóticas o diploides. Como el ioduro de propidio (IP) es un compuesto que se intercala entre las bases del DNA las células apoptóticas presentan un nivel de fluorescencia menor. La proporción de PMN apoptóticos se determinó usando un protocolo modificado del método de Nicoletti (Nicoletti *et al.*, 1991). Brevemente, el pellet de PMNs (2.5×10^6 cél./ml) se suspendió en 400 μ l de solución hipotónica con fluorocromo (50 μ g/ml IP en 0.1% de citrato de sodio con 0.1% de Tritón X100) y se incubó durante 2 h a 4⁰C. La fluorescencia roja del IP de cada núcleo fue medida a través de un citómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson). Se

midió simultáneamente el tamaño y el grado de complejidad de las partículas. La fluorescencia roja del pico de los neutrófilos con contenido de DNA normal (diploide) fue convenido en el canal 250 del modo logarítmico.

3.10.5.-Evaluación de la apoptosis por activación de Caspasa-3.

La activación de caspasa 3 se realizó a través de un ensayo de inmunofluorescencia indirecta. Luego de 18 h de cultivo en presencia de sFbg (6 μ M), las células (0.5x10⁶) fueron suspendidas en 100 μ l de PBS con 2% BSA y 450 μ l de Permeafix e incubadas a temperatura ambiente durante 45 min. Luego las células fueron lavadas e incubadas con mAb anti caspasa 3 activa durante 30 min en hielo en presencia de concentraciones saturantes de IgG bloqueante (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA). Luego de lavar las células dos veces, las mismas se incubaron con anticuerpo anti IgG de conejo conjugado con FITC. En paralelo se llevó el control de isotipo. Luego las células se lavaron y se resuspendieron en 50 μ l de ISOFLOW y 250 μ l de PBS. Se cuantificó la intensidad de fluorescencia de 20.000 células por muestra.

3.10.6.-Análisis del efecto del sFbg en sangre entera.

Se utilizaron muestras de sangre que fueron manejadas en forma rápida e idéntica. La sangre se colocó en tubos heparinizados, los cuales se invirtieron rápidamente para homogeneizar. Alícuotas de sangre fresca, cada una conteniendo 2.5x10⁵ leucocitos, se incubaron con medio o 5 ng/ml de TNF- α a 37^oC. durante 60 min. Luego se adicionó medio o diferentes concentraciones de sFbg. Luego de 1 h se marcaron las células con el mAb específico anti CD66b o anti CD11b durante 30 min a 4^oC. Luego se lisaron los glóbulos rojos usando una solución de lisado de FACS (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA), las células se lavaron con PBS frío y se suspendieron en 0.4 ml de ISOFLOW (International Link, Buenos Aires, Argentina). Se cuantificó la intensidad de fluorescencia de 20.000 células por muestra.

3.11.- Evaluación de la apoptosis por microscopía de fluorescencia.

La cuantificación se realizó como se describió anteriormente (Coxon *et al.*, 1996), usando un colorante fluorescente que se une al DNA como es el naranja de acridina (100µg/ml) para determinar el porcentaje de células que se encuentran en apoptosis y el bromuro de etidio (100µg/ml) para diferenciar entre células viables y no viables. A través de este método núcleos de células no apoptóticas muestran variaciones en la intensidad de fluorescencia que reflejan la distribución de la eucromatina y de la heterocromatina. Por contraste, los núcleos apoptóticos exhiben una cromatina más condensada que es uniformemente marcada por el naranja de acridina. Para determinar el porcentaje de células apoptóticas por morfología, se observaron al menos 200 células en cada experimento.

3.12.- Western Blot de lisados celulares y ensayos de actividad quinasa.

Para cada condición, se utilizaron 2×10^7 cél/ml de PMN. Luego del tratamiento experimental, se lavaron las células con PBS y se lisaron utilizando 0.650ml de solución de RIPA modificada con agitación constante durante 20 min a 4°C. Los lisados fueron centrifugados durante 15 min a 14,000 x g. Se determinó la concentración de proteínas utilizando el ensayo de Bradford (Pierce, Rockford, IL). Luego los sobrenadantes fueron preparados para un SDS-PAGE en condiciones reductoras.

El SDS PAGE se corrió en minigeles al 10% acrilamida-bisacrilamida usando soluciones estándar de Tris-Glicina. Se transfirieron las proteínas a una membrana de PVDF (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) durante 1 h a 300mA y luego se bloqueó dicha membrana con PBS 10% de leche descremada durante 1 h. La membrana se incubó con el primer anticuerpo en PBS 0.4% BSA para el mAb 4G10 (1µg/ml) o en PBS 1% leche descremada para los demás anticuerpos utilizados durante toda la noche. Luego de lavar la membrana tres veces con PBS-0.2% Tween-20, se incubó la misma con el segundo anticuerpo anti IgG de conejo o anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa de rabanito (HRP) (Amersham, Aylesbury, UK). La inmunoreactividad fue detectada utilizando un sistema denominado ECL (Amersham). Para los ensayos de IκB-α se utilizaron extractos citoplasmáticos en vez de lisados totales.

3. Materiales y Métodos

La actividad de MAPK ERK1/2 se midió a través de un ensayo enzimático de actividad kinasa (Amersham). Se incubaron lisados totales de células con 5 µl de solución con Magnesio [γ -³²P]ATP (200 µCi/ml) y 10 µl de solución de sustrato. Luego de una incubación de 30 min a 30°C, se terminó la reacción adicionando 10 µl de reactivo stop. Para separar los péptidos fosforilados, 30 µl de la mezcla de reacción se adicionaron a los papeles de unión del péptido. Luego de lavar dos veces con ácido acético 1% y dos veces con agua destilada, se agregó 10 ml de líquido de centelleo en cada vial y se midió la radioactividad en un contador β .

3.13.-Inmunoprecipitación.

Se lisaron PMN con RIPA modificado como se describió en 3.12. luego los lisados se centrifugaron y se midió la concentración de proteínas como se especificó anteriormente. Los lisados (100-200 µg de proteína) se incubaron durante toda la noche a 4°C con 3 µg de mAb anti-FAK o 2 µg de mAb a anti-fosfotirosina y proteína G-Sepharosa (previamente adsorbidas con IgG de Conejo anti ratón) con rotación. Las proteínas G-Sepharosa se lavaron con solución RIPA, las proteínas adsorbidas fueron solubilizadas en RIPA y separadas en un minigel 8% SDS-PAGE. Las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF y la misma se reveló con mAb anti-FAK.

3.14.-Preparación de extractos citoplasmáticos y nucleares.

Se prepararon extractos citoplasmáticos y nucleares a partir de 2.5×10^7 células como se describió anteriormente (Vancurova *et al.*, 2001). El pellet de células se suspendió en 400 µl de solución hipotónica A y luego de 15 min de incubación en hielo, se adicionaron 16.7 µl de Nonidet P-40. Las células se centrifugaron a 4,000 rpm durante 5 min a 4°C y los sobrenadantes (extractos citoplasmáticos) se recolectaron, alicuataron y guardaron a -70°C.

Los pellets de núcleos fueron resuspendidos en 50 µl de solución B fría. Luego de 15 min de incubación en hielo, las muestras fueron centrifugadas a 15,000 rpm durante 15 min a 4°C. Los sobrenadantes (extractos nucleares) fueron alicuutados y guardados a -70°C. Se

3. Materiales y Métodos

determinó la concentración de proteínas utilizando un ensayo Bio Rad Dc Protein Assay (Bio Rad Laboratories, Hercules, CA, USA).

3.15.-Ensayo de Movilidad Electroforética (EMSA).

Para este ensayo se utilizaron los oligonucleótidos de doble cadena correspondientes a la secuencia palindrómica κ B (5'-TCGAGAGAGGGGAATCCCTGCCGT-3'). 10 pm de oligonucleótidos se marcaron utilizando el fragmento de Klenow de la DNA polimerasa I y [α - 32 P]dCTP. Los nucleótidos no incorporados fueron removidos y 20 fmol de oligonucleótido marcado (100,000 cpm) se incubaron con 5 μ g de extractos nucleares, 2 μ g de poly(dI-dC), en una solución conteniendo 20 mM de Hepes (pH7.9), 100 mM de NaCl, 5 mM MgCl₂, 1mM DTT y 17% de glicerol en un volumen final de 22 μ l durante 15 min a 20⁰C. Se separaron los complejos en un gel 5.5% de poliacrilamida en una solución Tris-borato EDTA. Luego se secó el gel y se lo expuso a un film Kodak-X-Omat (Rochester, NY) a -70⁰C.

3.16.-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). Los valores de $p < 0,05$ fueron considerados significativamente diferentes.

4. Resultados

4.1.-Análisis de los efectos del fibrinógeno soluble sobre la funcionalidad y sobrevivencia de los neutrófilos humanos.

4.1.1.-El fibrinógeno soluble induce un aumento transiente en la concentración de Calcio intracelular en neutrófilos.

Previamente se describió que el entrecruzamiento o *cross-linking* de la molécula CD11b/CD18 por anticuerpos monoclonales induce un aumento transiente en la concentración de calcio intracelular $[Ca^{2+}]_i$ en PMN (Jaconi *et al.*, 1991; Petersen *et al.*, 1993). Se investigó entonces si el Fbg soluble humano es capaz de activar dicho mecanismo de señalización. La $[Ca^{2+}]_i$ se midió en neutrófilos expuestos a diferentes concentraciones de sFbg usando un colorante sensible a la movilización de Ca^{2+} llamado Fluo 3/AM. Como se observa en la *Figura 1*, el sFbg indujo la movilización de Ca^{2+} en PMN purificados, mostrando una curva de respuesta dependiente de la dosis. La concentración máxima de sFbg utilizada ($6\mu M$, equivalente a 2 mg/ml), la cual se encuentra dentro del rango fisiológico en plasma (Handley *et al.*, 1997), causó un incremento rápido y transiente del calcio citosólico, similar al producido en respuesta a FMLP (10^{-7} M) o 20 μg de complejos inmunes (dato no mostrado), dos estímulos que movilizan Ca^{2+} . Este aumento en la $[Ca^{2+}]_i$ por sFbg es dependiente de la molécula de adhesión CD11b/CD18 ya que su efecto puede ser bloqueado por el mAb anti-CD11b clon *Bear1* (*Figura 1*), pero no por un mAb irrelevante de igual isotipo (IgG1) o por un mAb anti-CD11c (dato no mostrado). Se utilizó como control, albúmina humana en concentraciones fisiológicas para descartar un efecto proteína no específico

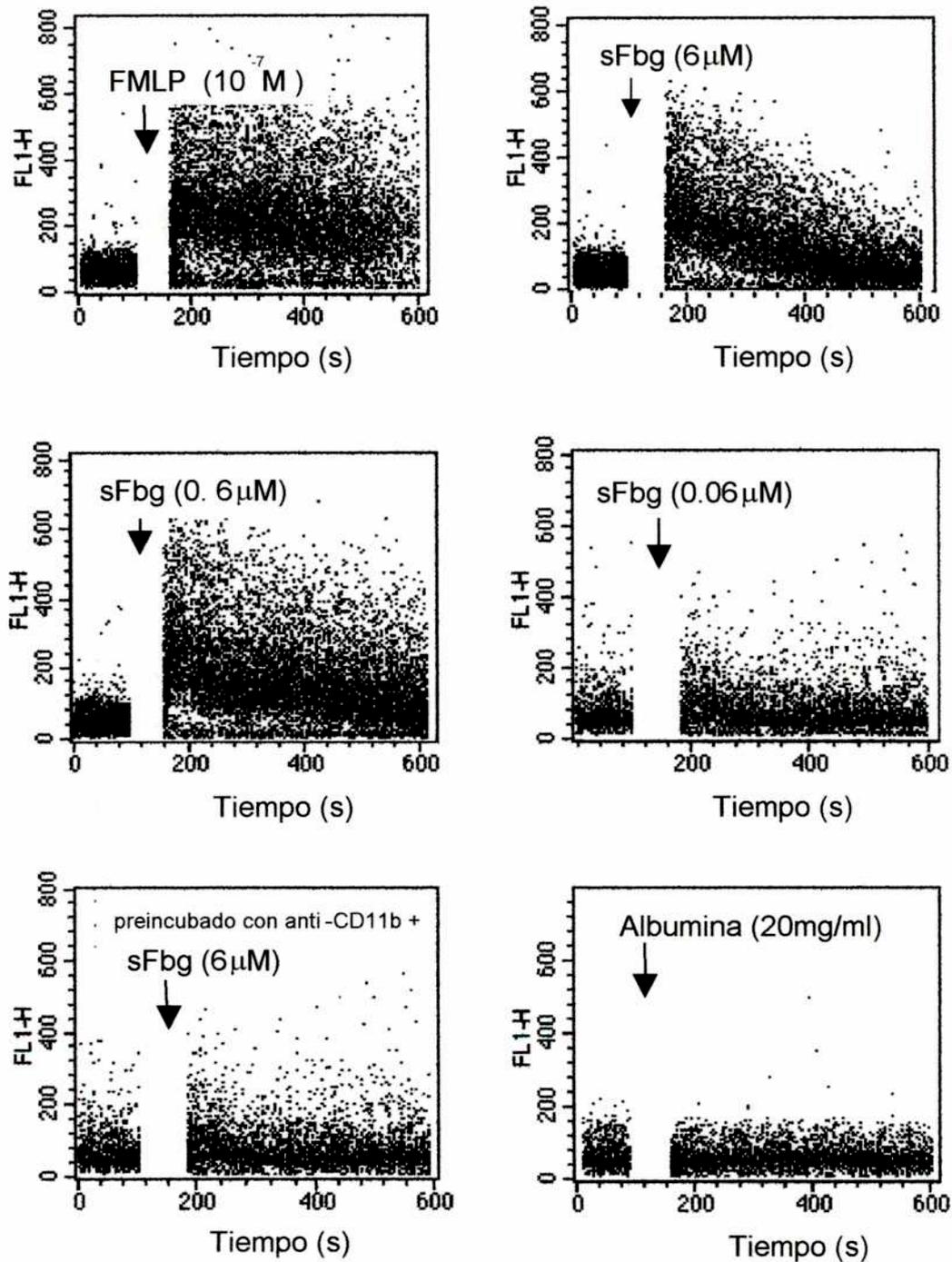


Figura 1. Fluctuaciones en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducida por sFbg. La suspensión de PMN se marcó con Fluo 3-AM según se describió en *Materiales y Métodos*. El nivel basal de la fluorescencia de Fluo 3-AM (FL1-H) se registró durante 30 s. Luego se adicionó FMLP (10^{-7}M) o diferentes concentraciones de sFbg o albúmina como se indica en la figura, y la fluorescencia se registró durante 400 s. El aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ se registra como un aumento en la fluorescencia de Fluo 3-AM. Se muestra un experimento representativo de 5.

4.1.2.- El fibrinógeno soluble induce la degranulación de neutrófilos.

Debido a que la movilización de gránulos intracitoplasmáticos es un evento inflamatorio importante, secundario a la activación de los PMN, se midió la degranulación de los mismos luego de la incubación con sFbg.

4.1.2.1.- Degranulación de gránulos secundarios.

La movilización de los gránulos secundarios en los PMN se estudió fenotípicamente a través del aumento de la expresión en membrana de la molécula CD66b. Dicha molécula reside en el interior de los gránulos específicos en PMN en estado basal o reposo y aparece en membrana luego de la degranulación (Madjic, 1989; Niessen *et al.*, 1992). Considerando el patrón de dosis-respuesta de la movilización de Ca^{2+} inducido por el sFbg, en los siguientes experimentos se utilizó la concentración efectiva más baja dentro del rango fisiológico ($6\mu M$). La incubación de PMN con sFbg resultó en el aumento de la expresión de la molécula CD66b de un modo dependiente del tiempo, encontrándose una respuesta máxima a los 60 min (aprox.100% *Figura 2*). La incubación de PMN con albúmina humana (20 mg/ml) o con el mAb anti-CD11b no ejerció ningún efecto respecto de la expresión basal del CD66b. Sin embargo, el entrecruzamiento de la molécula CD11b con el mAb anti-CD11b y un segundo anticuerpo $F(ab')_2$ anti-IgG de ratón aumentó la expresión del CD66b a los mismos niveles que los alcanzados con la incubación del sFbg. Por otra parte, la preincubación de las células con el mAb anti-CD11b abolió el efecto del sFbg sobre la expresión del CD66b, confirmando que los efectos del sFbg son dependientes del CD11b.

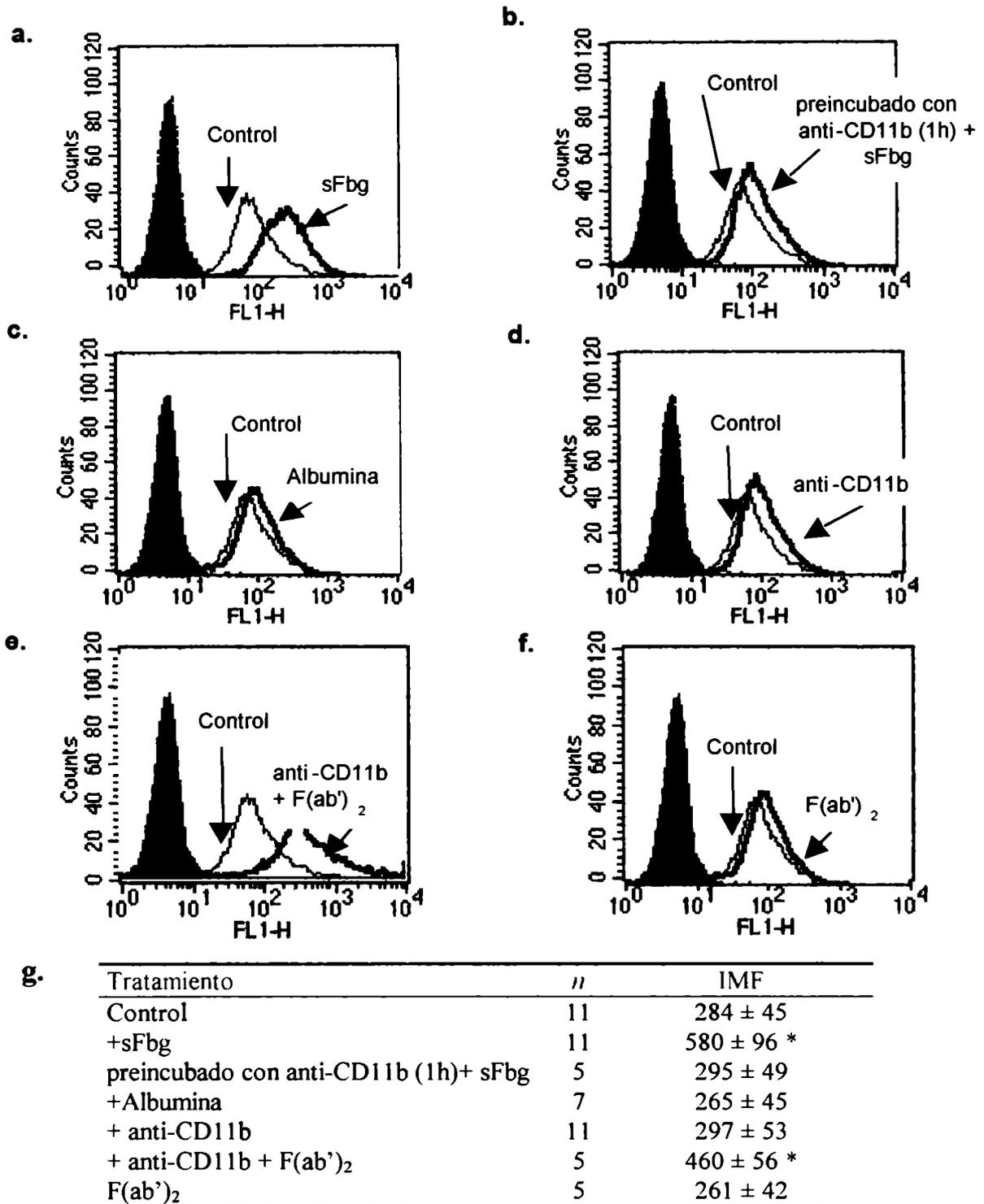
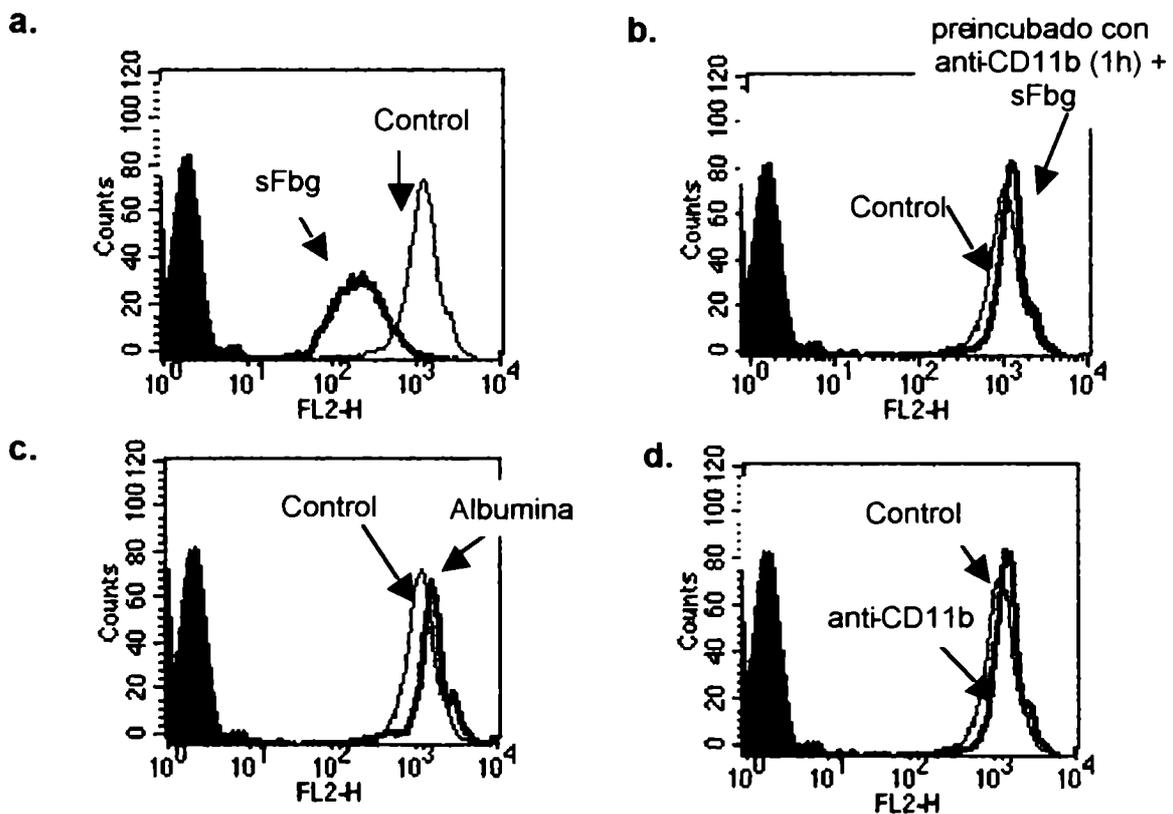


Figura 2. Efecto del sFbg sobre la expresión de CD66b en neutrófilos. PMN ($2.5 \times 10^6/\text{ml}$) fueron incubados durante 1 h a 37°C en presencia de sFbg ($6\mu\text{M}$) o diferentes estímulos utilizados como control. Las células fueron centrifugadas, lavadas y marcadas con un mA b específico anti-CD66b según se describió en *Materiales y Métodos*. Se muestran histogramas representativos de la expresión del CD66b luego de los diferentes tratamientos. El histograma lleno representa el control de isotipo. La línea fina indica el control de la expresión basal del CD66b en neutrófilos incubados durante 1 h con medio a 37°C . La ordenada y la abscisa representan el número de células y la intensidad de fluorescencia (FL1-H), respectivamente. En g. los datos representan la media \pm SEM de la IMF en *n* experimentos. * Significancia estadística ($p < 0.005$) comparado con el control.

4.1.2.2.- Degranelación de vesículas secretorias.

La movilización de vesículas secretorias en los PMN se estudió fenotípicamente a través del aumento en la expresión en membrana de la molécula CD11b y de la disminución del RFcγIII. Se incubaron neutrófilos purificados con sFbg (6μM) durante 1 h a 37⁰C o medio (control). Es importante destacar que este tiempo representa en general, el tiempo óptimo para observar la disminución en la expresión del RFcγIII, a pesar de que algunos individuos muestran una disminución máxima a tiempos menores. Subsecuentemente, alícuotas de las células (5x10⁵/50μl) se incubaron con mAbs o controles de isotipo. Luego, las células se analizaron por citometría de flujo como se describe en *Materiales y Métodos*. Como se observa en la *Figura 3* en respuesta al sFbg se produce una pérdida de los RFcγIII comparados con los controles. El entrecruzamiento del CD11b con el mAb anti-CD11b y un segundo anticuerpo mostró resultados similares y la preincubación de las células con mAb anti-CD11b abolió el efecto del sFbg sobre la expresión del RFcγIII.



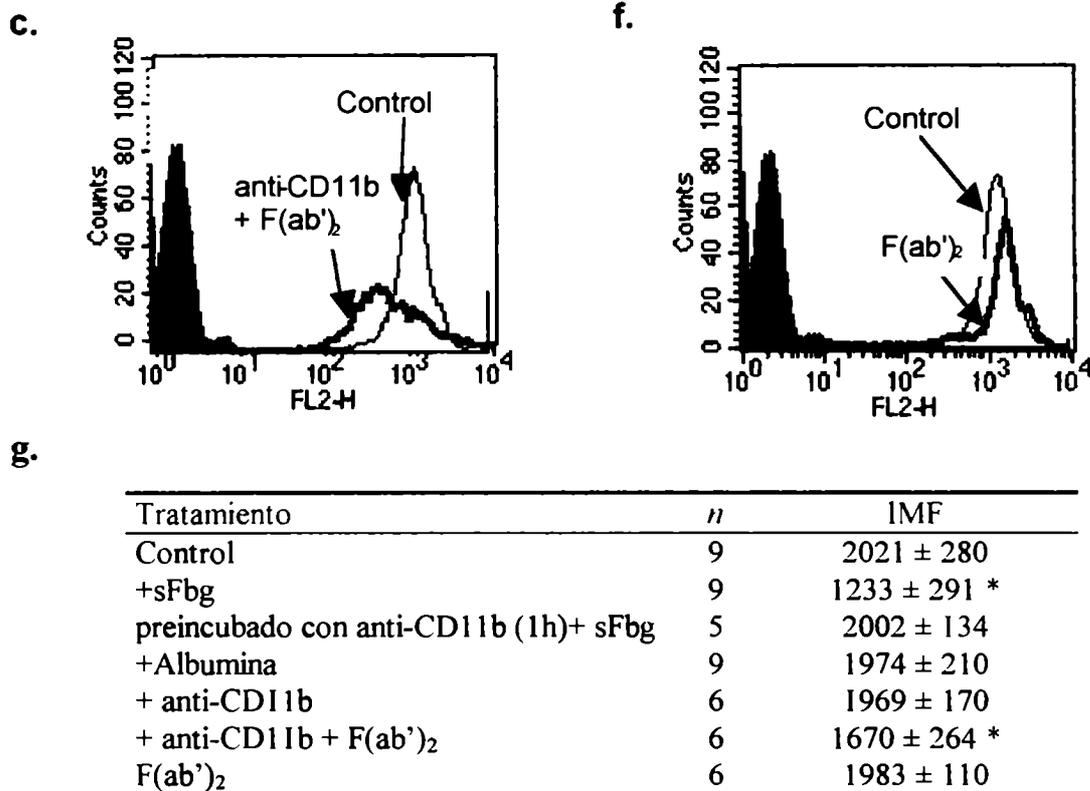


Figura 3. Efecto del sFbg sobre la expresión de RFcyIII en neutrófilos. PMN ($2.5 \times 10^6/\text{ml}$) fueron incubados durante 1 h a 37°C en presencia de sFbg ($6\mu\text{M}$) o diferentes estímulos utilizados como control. Luego las células fueron centrifugadas, lavadas y marcadas con un mAb específico anti-RFcyIII según se describió en *Materiales y Métodos*. Se muestran histogramas representativos de la expresión del RFcyIII luego de los diferentes tratamientos. El histograma lleno representa el control de isotipo. La línea fina indica el control de la expresión basal del RFcyIII en neutrófilos incubados durante 1 h con medio a 37°C . La ordenada y la abscisa representan el número de células y la intensidad de fluorescencia (FL2-H), respectivamente. En g. los datos representan la media \pm SEM de la IMF en n experimentos. *Significancia estadística ($p < 0.005$) comparado con el control.

Cuando se evaluó la expresión de la molécula CD11b por citometría de flujo, se observó que la incubación con sFbg ($6\mu\text{M}$) indujo un aumento en la expresión de dicha molécula en PMN purificados, alcanzando una meseta desde los 30 a los 60 min. (Figura 4). Cuando se utilizó albúmina humana (20 mg/ml) como control no se observó ninguna alteración en la expresión de los RFcys o CD11b.

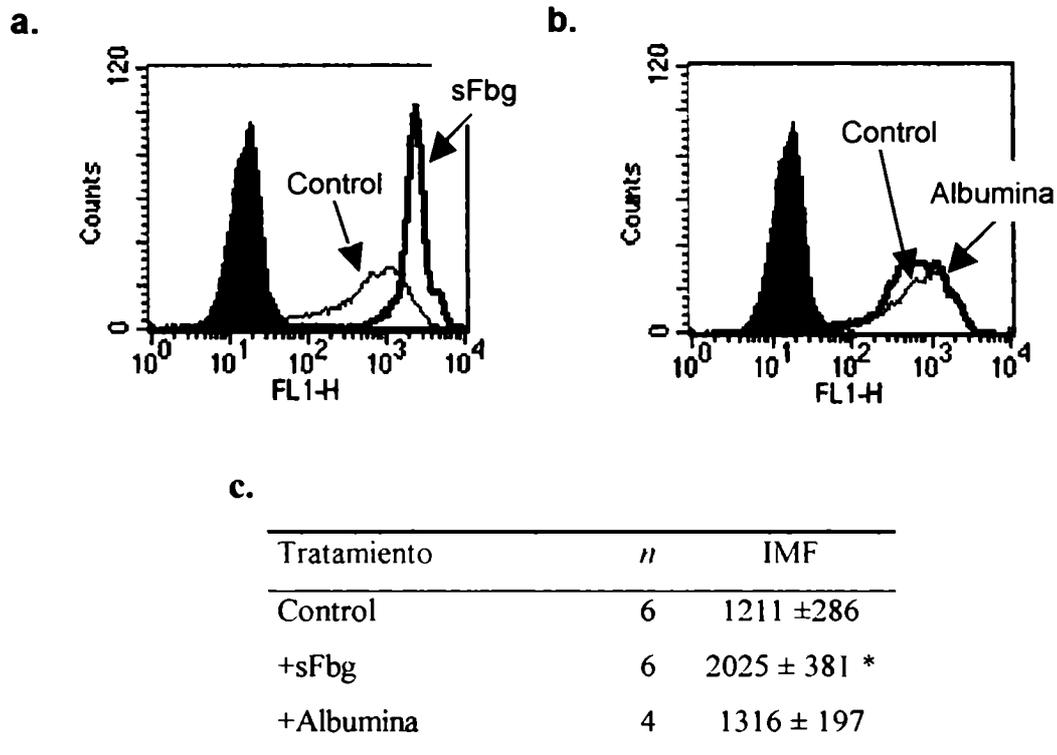


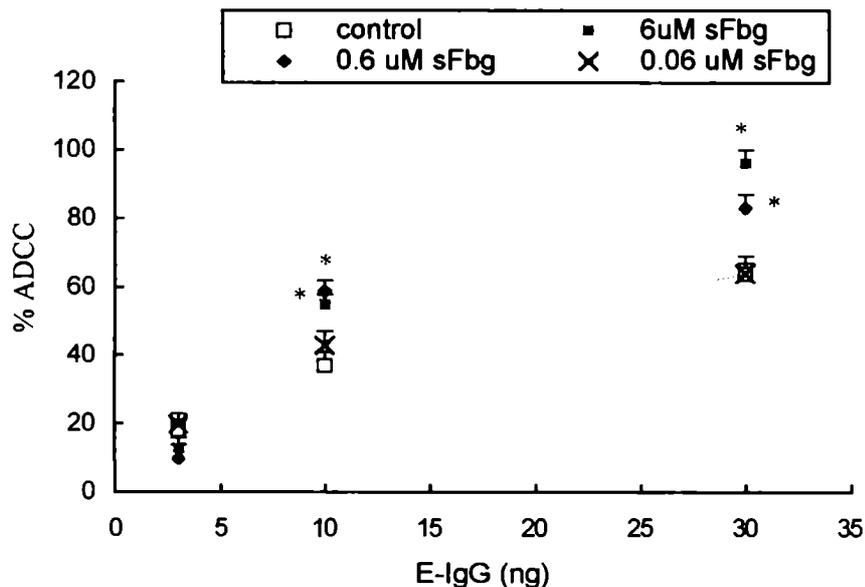
Figura 4. Efecto del sFbg sobre la expresión de CD11b en neutrófilos. PMN ($2.5 \times 10^6/\text{ml}$) fueron incubados durante 1 h a 37°C en presencia de sFbg ($6\mu\text{M}$) (a) o albúmina (20 mg/ml) (b). Luego las células se centrifugaron, lavaron y marcaron con un mAb específico anti-CD11b según se describió en *Materiales y Métodos*. Se muestran histogramas representativos de la expresión del CD11b luego de los diferentes tratamientos. El histograma lleno representa el control de isotipo. La línea fina indica el control de la expresión basal del CD11b en neutrófilos incubados durante 1 h con medio a 37°C . La ordenada y la abscisa representan el número de células y la intensidad de fluorescencia (FL1-H), respectivamente. En c. los datos representan la media \pm SEM de la IMF en n experimentos. *Significancia estadística ($p < 0.005$) comparado con el control.

4.1.3.- El fibrinógeno soluble aumenta la actividad funcional de neutrófilos.

Considerando que los RFc γ y las β_2 integrinas son requeridos para diversas funciones inflamatorias mediadas por los PMN (Däeron, 1997) y que la incubación *in vitro* de PMN con sFbg modificó la expresión en superficie de RFc γ III y el CD11b, sin

modificar la expresión del RFc γ II (dato no mostrado), se determinaron tres funciones dependientes de los RFc γ s como son la citotoxicidad dependientes de anticuerpos (ADCC), la fagocitosis y la citotoxicidad celular mediada por radicales libres desencadenada por CI (Ctx-CI). Se eligieron estas tres funciones para abarcar un amplio espectro de respuestas ya que la fagocitosis es una función rápida y la ADCC y la Ctx-CI no, además de involucrar diferentes mecanismos líticos. Los tres ensayos fueron medidos luego de la incubación de las células efectoras con sFbg durante 1h, tiempo óptimo en el cual la modulación de receptores en membrana es máxima. Como se muestra en la *Figura 5*, tanto la fagocitosis como la ADCC, ambas funciones llevadas a cabo por los PMN contra células blanco óptimamente sensibilizadas, se encontraron aumentadas por la incubación de las células con sFbg (6 μ M). Se observaron resultados similares cuando se realizó el entrecruzamiento de la molécula CD11b. En ambas reacciones, el aumento dependiente del sFbg fue abolido por la incubación previa con el mAb anti-CD11b (*Figura 5b*). Sin embargo, a concentraciones subóptimas de Ab para sensibilizar las células blanco (3ng), la ADCC no fue modificada por la incubación con sFbg (dato no mostrado). Respecto de la Ctx-CI no se observó ninguna modulación por parte de sFbg, aún ensayando diferentes concentraciones de CI como agente desencadenante (*Figura 5c*).

a.



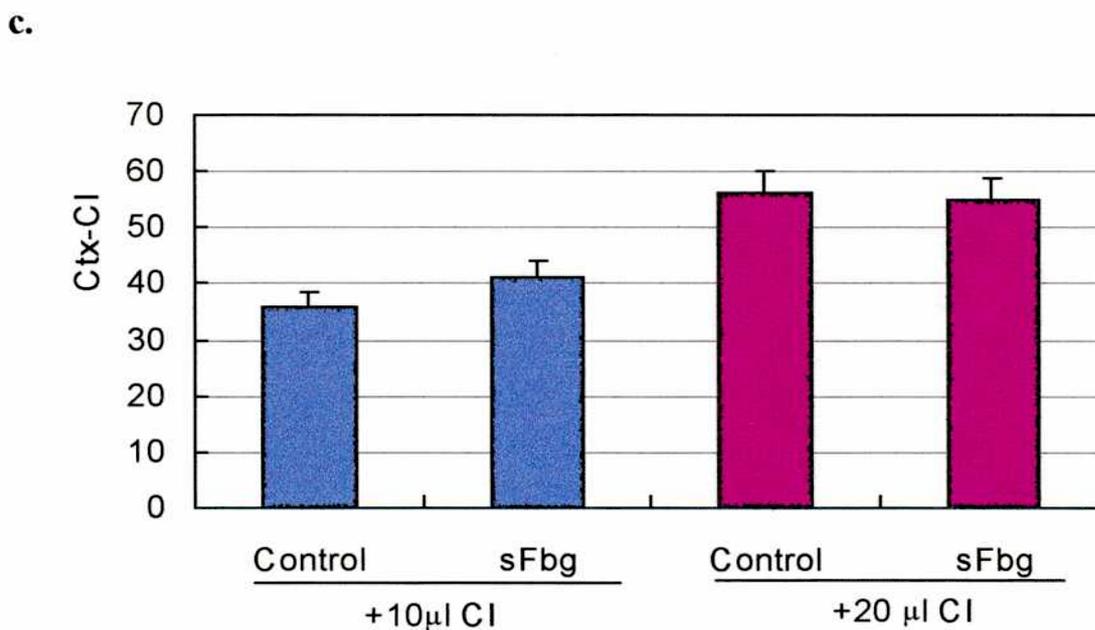
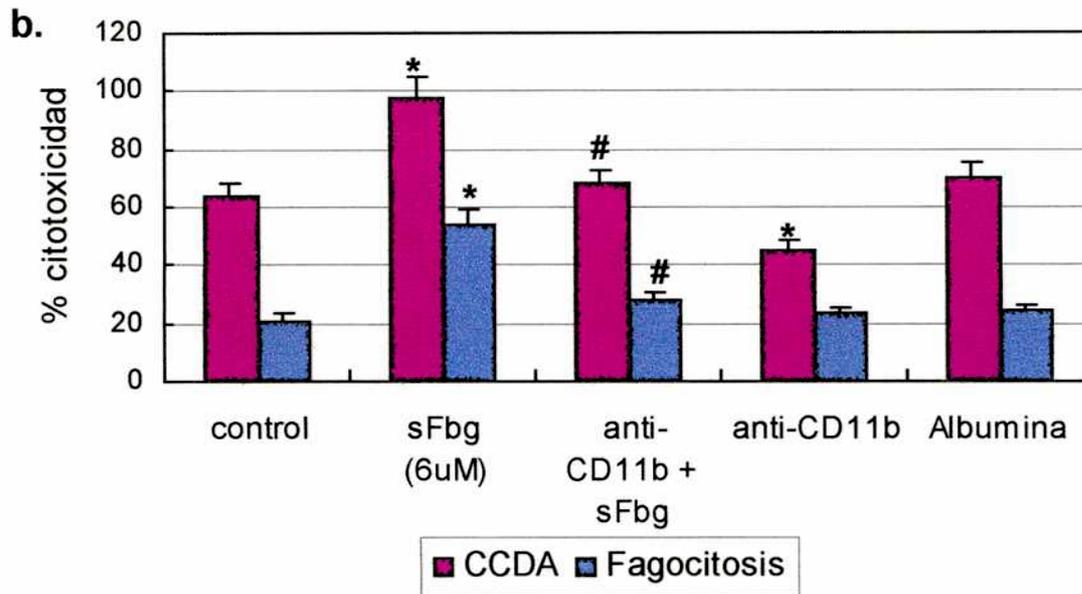


Figura 5. Efecto del sFbg sobre la ADCC, fagocitosis, y Ctx-CI en neutrófilos. *a.* PMN ($2.5 \times 10^6/\text{ml}$) fueron incubados durante 1 h a 37°C en presencia de diferentes concentraciones de sFbg (línea sólida) o medio (control, línea punteada). Luego de lavar las células, se llevaron a cabo los ensayos de ADCC con Eritrocitos de pollo (E) como células blanco y diferentes concentraciones de IgG anti-E. *b.* PMN ($2.5 \times 10^6/\text{ml}$) fueron incubados durante 1 h a 37°C en presencia de medio (control), sFbg ($6\mu\text{M}$), albúmina (20mg/ml), anti-CD11b ($4\mu\text{g/ml}$) o anti-CD11b ($4\mu\text{g/ml}$) más sFbg ($6\mu\text{M}$). Se lavaron las células y se llevaron a cabo los ensayos de ADCC y fagocitosis con células blanco óptimamente sensibilizadas (30 ng y 20 ug de IgG anti-pollo (ADCC) o cabra (fagocitosis)). *c.* PMN ($2.5 \times 10^6/\text{ml}$) fueron incubados durante 1 h a 37°C en presencia de medio (control), sFbg ($6\mu\text{M}$), y luego se agregaron 10 o 20 μl de CI. Se evaluó la ADCC, la fagocitosis y la Ctx-CI según se describió en *Materiales y Métodos*. Los datos representan la media \pm SEM de triplicados determinados en 10 dadores. * Significancia estadística ($p < 0.005$) comparado con el control. # Significancia estadística ($p < 0.005$) comparado con el tratamiento con sFbg ($6\mu\text{M}$).

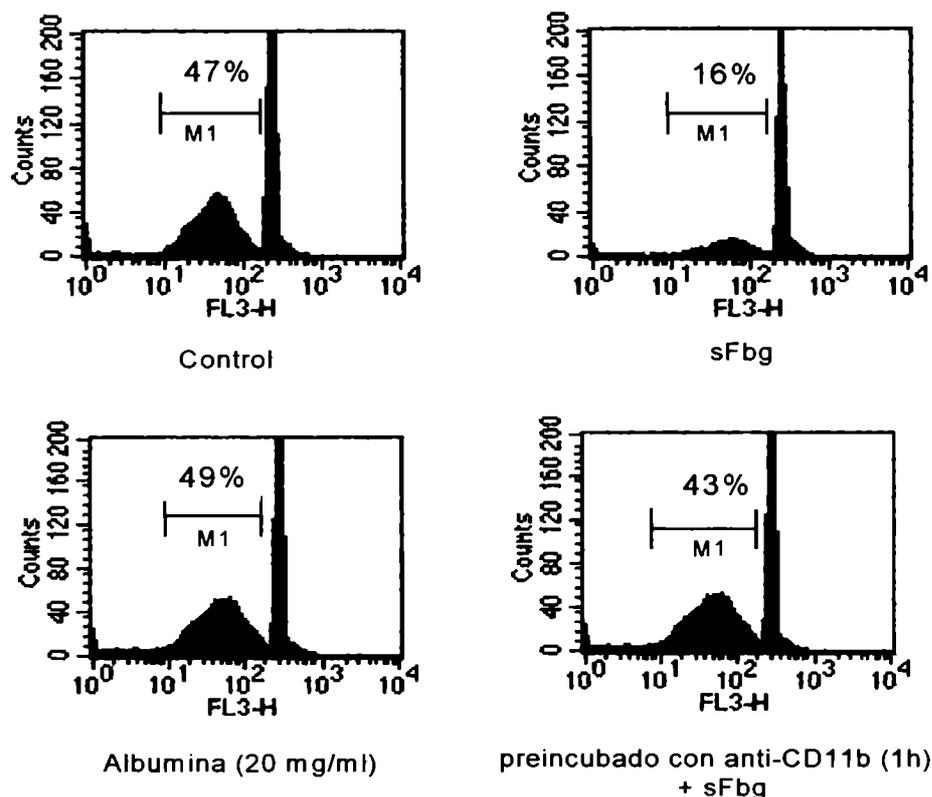
4.1.4.- El fibrinógeno soluble retarda la apoptosis de neutrófilos.

El aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ (Whyte *et al.*, 1993) y diferentes estímulos activadores (Colotta *et al.*, 1992; Cox *et al.*, 1992; Lee *et al.*, 1993), generan un efecto inhibitorio en la apoptosis de los PMN. Sin embargo, otros mediadores aceleran la muerte celular por apoptosis de dichas células (Afford *et al.*, 1992; Takeda *et al.*, 1993; Watson *et al.*, 1996). Tomando estos datos en cuenta, se estudió si la incubación con sFbg induce la modulación de la apoptosis de los neutrófilos.

La apoptosis se midió a través de la pérdida del contenido de DNA por citometría de flujo usando células permeabilizadas y marcadas con IP luego de 18 h de cultivo. Como se muestra en la *Figura 6*, la preincubación de 1h con 6 μ M de sFbg redujo la población de células apoptóticas de un 40% (control) a un 12%.

La preincubación de las células con mAb anti-CD11b abolió el efecto del sFbg sobre la apoptosis espontánea, sin embargo el anticuerpo por sí solo a concentraciones saturantes no ejerció ningún efecto. Por el contrario, el entrecruzamiento de la molécula CD11b con el mAb anti-CD11b y un segundo anticuerpo $F(ab')_2$ anti-IgG de ratón aumentó significativamente la apoptosis espontánea (*Figura 6*).

a.



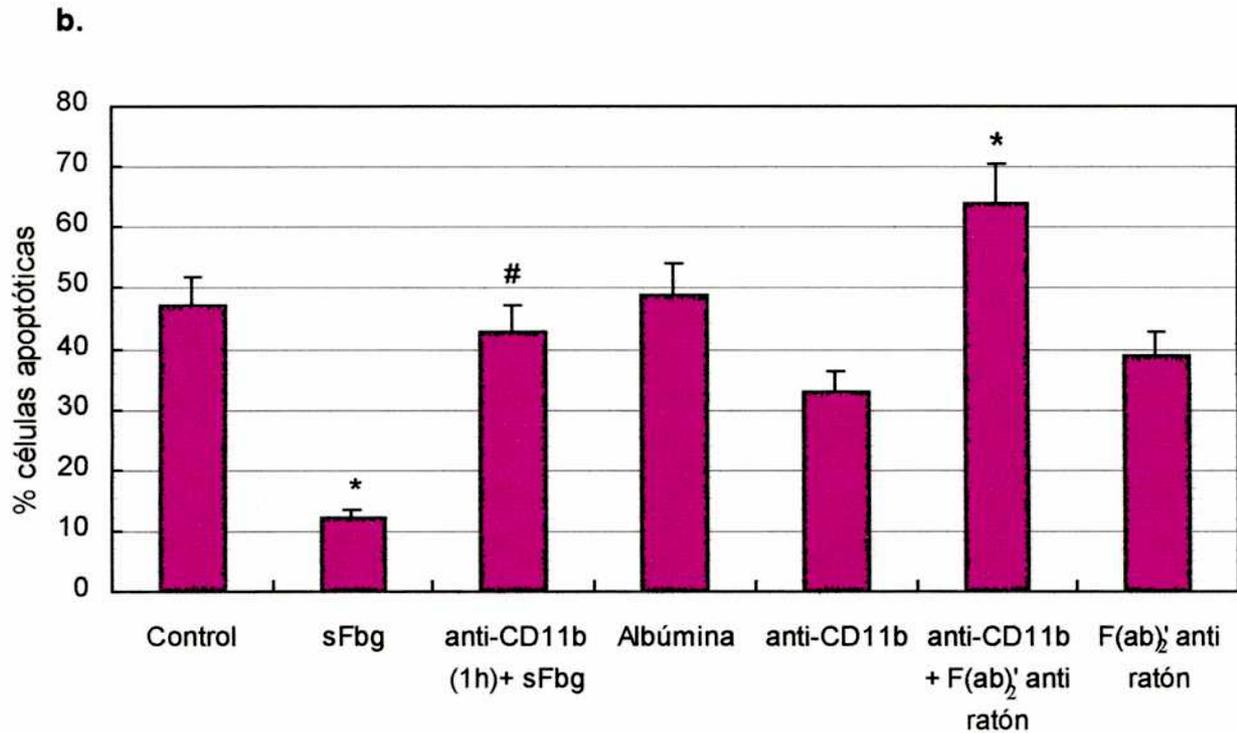


Figura 6. Modulación de la apoptosis en neutrófilos por sFbg. PMN ($2.5 \times 10^6/\text{ml}$) se incubaron durante 1 h a 37°C en presencia de sFbg ($6\mu\text{M}$) o diferentes estímulos utilizados como control, como se indica. Luego las células se centrifugaron, lavaron y cultivaron durante 18 h a 37°C . Se determinó el porcentaje de células apoptóticas por citometría de flujo y microscopía de fluorescencia. *a.* Histogramas de un experimento representativo ($n=9$), revelado luego de 18 h de incubación, mostrando el porcentaje (M1) de los núcleos con contenido haploide de DNA. *b.* Los datos representan la media \pm SEM de 7 experimentos. *Significancia estadística ($p<0.005$) comparado con el control. # Significancia estadística ($p<0.005$) comparado con el tratamiento con sFbg ($6\mu\text{M}$).

4.1.5.-El fibrinógeno soluble induce la completa activación de neutrófilos luego de ser primados.

Considerando los resultados descriptos anteriormente, los neutrófilos circulantes se encontrarían expuestos a concentraciones activantes de fibrinógeno continuamente. Para comprender el significado biológico de los resultados obtenidos y teniendo en cuenta que las técnicas preparativas de purificación de PMN a través de un gradiente de Ficoll-Hypaque pueden primar los neutrófilos (Haslett *et al.*, 1985), se hipotetizó que el sFbg no podría ejercer sus efectos activadores hasta que los PMN no sean primados. Para probar esta posibilidad se realizaron experimentos *ex vivo* llevados a cabo en sangre entera como se describieron en otros trabajos (Rosenbloom *et al.*, 1999). El

estado *primado* de los neutrófilos purificados se confirmó a través del aumento en la expresión de la molécula CD66b

Tabla 1

Tratamiento	n	IMF (media \pm SEM)
PMN en sangre entera	6	147 \pm 12
PMN purificados	6	284 \pm 45 *
PMN sangre entera + TNF- α	6	340 \pm 37 *

Efecto del proceso de purificación de PMN en la expresión de CD66b. Muestras de sangre entera (0.2 ml) incubadas con medio o TNF- α (5 ng/ml) 1 h a 37°C o PMN purificados (2.5 x 10⁶/ml) se centrifugaron, lavaron y marcaron con un mAb específico anti-CD66b. Luego se lisaron los glóbulos rojos según se describió en *Materiales y Métodos*. Los datos representan la media \pm SEM de la IMF en n experimentos. * Significancia estadística (p<0.005) comparado con el control.

Luego se evaluó el efecto de sFbg en PMN de sangre entera basales y *primados* con TNF- α . Como se muestra en la *Figura 7*, el agregado de sFbg exógeno aumentó en forma dosis-dependiente la expresión en superficie de la molécula CD66b sólo en los PMN preincubados con TNF- α . Como estos experimentos fueron llevados a cabo en sangre entera, la concentración de sFbg indicada en la figura corresponde al fibrinógeno agregado a la concentración basal plasmática. Teniendo en cuenta estas observaciones, no es sorprendente que una concentración de 0.75 μ M de sFbg sea capaz de aumentar la expresión del CD66b en neutrófilos *primados*. Resultados similares fueron obtenidos cuando se midió la expresión de la molécula CD11b (dato no mostrado).

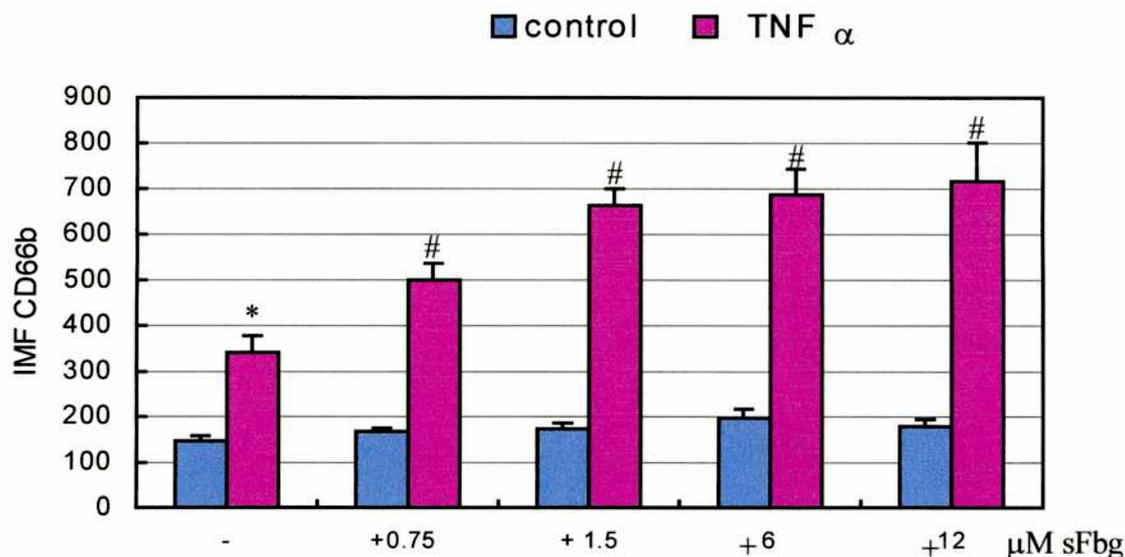


Figura 7. Efecto del sFbg sobre la expresión de CD66b en neutrófilos en estado basal y primados. Muestras de sangre entera (0.2 ml) se incubaron con medio (control) o TNF- α (5 ng/ml) 1 h a 37°C. Se adicionaron diferentes concentraciones de sFbg según se indica y las muestras se incubaron durante 1 h a 37°C. Luego las células fueron marcadas con un mAb específico anti-CD66b durante 30 min y los glóbulos rojos lisados según lo descrito en *Materiales y Métodos*. Los datos representan la media \pm SEM de la IMF de 6 experimentos. *Significancia estadística ($p < 0.005$) comparado con el control. #Significancia estadística ($p < 0.005$) comparado con el tratamiento con TNF- α (5 ng/ml).

4.1.6.- Efecto de los productos de degradación del fibrinógeno soluble sobre neutrófilos.

Otra pregunta biológicamente relevante es si los productos de degradación del fibrinógeno retienen la capacidad activadora del sFbg. En consecuencia, PMN purificados fueron tratados con plasma autólogo o sFbg previamente incubados con 0.05 U/ml de trombina durante 60 min para asegurarse una total conversión del fibrinógeno en fibrina (Doolittle, 1973). Cuando se midió la expresión de la molécula CD66b en membrana se observó que el tratamiento con trombina revirtió eficientemente el efecto del sFbg o el plasma.

Tabla 2

Tratamiento	n	IMF (media \pm SEM)
Control	6	225 \pm 36
+ sFbg	6	504 \pm 42 *
+ sFbg + Trombina	6	240 \pm 34 #
+ plasma	6	468 \pm 35 *
+ plasma + Trombina	6	186 \pm 22 #

Efecto de los productos de degradación del sFbg sobre la expresión del CD66b en neutrófilos. PMN (2.5×10^6 /ml) fueron incubados con plasma autólogo o sFbg ($6\mu\text{M}$) previamente incubados con 0.05 U/ml de trombina durante 1 h a 37°C para asegurarse una total conversión del fibrinógeno en fibrina. Luego las células fueron centrifugadas, lavadas y marcadas con un mAb específico anti-CD66b según se describió en *Materiales y Métodos*. Los datos representan la media \pm SEM de la IMF en *n* experimentos. *Significancia estadística ($p < 0.005$) comparado con el control. # Significancia estadística ($p < 0.001$) comparado con su respectivo tratamiento sin trombina.

Se puede concluir que los productos de degradación derivados del sFbg o el plasma no son capaces de activar a los PMN, evaluado por la expresión del CD66b sobre la superficie de los mismos.

4.2.- Análisis de los caminos transduccionales intracelulares activados por fibrinógeno soluble en neutrófilos humanos.

4.2.1.- Análisis temporal de los efectos del fibrinógeno soluble sobre la movilización de gránulos citoplasmáticos de neutrófilos.

Para investigar los mecanismos intracelulares que llevan a la movilización de gránulos por sFbg, se estudió en primer lugar, la cinética de degranulación inducida por sFbg. Los PMN fueron incubados en presencia de sFbg ($6\mu\text{M}$) a diferentes tiempos hasta 60 min a 37°C . Luego se analizó la expresión en membrana de las moléculas CD11b y CD66b, como marcadores de vesículas secretorias y gránulos secundarios respectivamente. Como se muestra en la *Figura 8*, se hizo evidente un aumento significativo de la expresión del CD11b a los 15 min de incubación con sFbg, alcanzando una meseta entre los 30 y 60 min. Si embargo, la movilización de gránulos secundarios se presentó más retardada. El aumento de la expresión del CD66b fue significativa a los 30 min, pero máxima a los 60 min de incubación con sFbg.

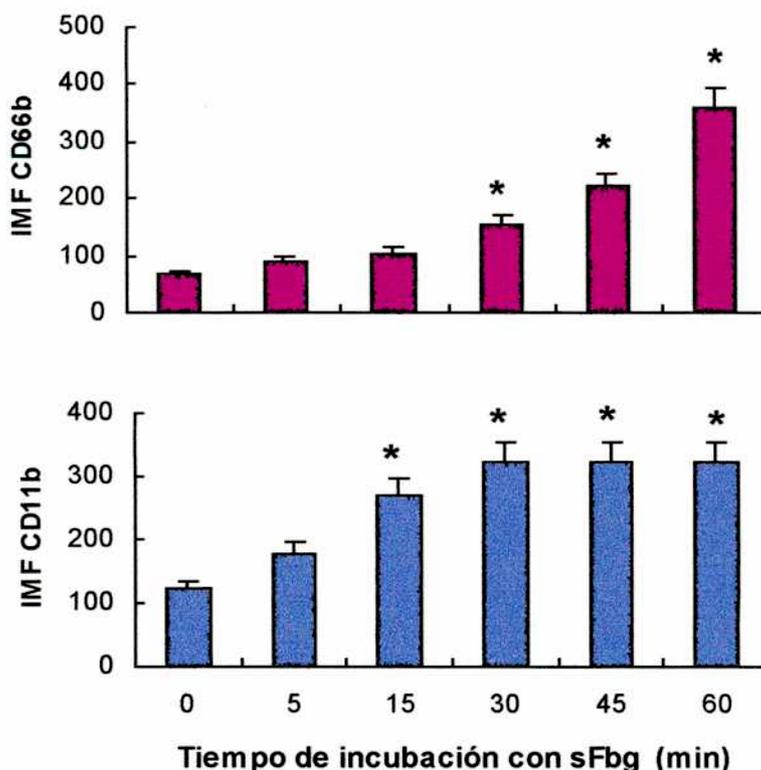


Figura 8. Cinética de degranulación de PMN inducida por sFbg. PMN ($2.5 \times 10^6/\text{ml}$) se incubaron diferentes tiempos como se indica en la figura a 37°C en presencia de sFbg ($6\mu\text{M}$). Luego las células se centrifugaron, y marcaron con un mAb específico anti-CD66b o anti-CD11b según se describió en *Materiales y Métodos*. Los datos representan la media \pm SEM de la IMF de 6 dadores. *Significancia estadística ($p < 0.005$) comparado con el control.

4.2.2.-Efecto de inhibidores de proteínas quinasas sobre la degranulación de neutrófilos inducida por fibrinógeno soluble.

La activación de proteínas tirosina quinasas media diferentes funciones dependientes de β_2 integrinas, como la producción de intermediarios reactivos del oxígeno, la adhesión, etc. (Lowell *et al.*, 1996; Fernandez *et al.*, 1998). De acuerdo a esto, se examinó si los efectos dependientes del sFbg eran mediados por proteínas tirosina quinasas usando los inhibidores herbimicina y genisteína. Estos dos agentes tienen diferentes mecanismos de acción: mientras la genisteína es un inhibidor competitivo respecto del ATP (Akiyama *et al.*, 1987), la herbimicina interactúa con los grupos sulfhidrilo presentes en las proteínas tirosina quinasas (Uehara *et al.*, 1991). Como se muestra en la *Figura 9*, 100 μ M de genisteína y 5 μ M de herbimicina causan una fuerte inhibición de la exocitosis de los gránulos secundarios (CD66b) inducida por el sFbg. El uso de H7, un inhibidor de las proteínas serina/treonina quinasas A, C y G (Evangelista *et al.*, 1999) no afectó significativamente el aumento de la expresión del CD66b. Por el contrario, el aumento en la expresión del CD11b inducido por sFbg no fue significativamente revertido por ninguno de los inhibidores utilizados. Por otra parte, la incubación simultánea de sFbg y H7 indujo una expresión aún mayor que la producida por sFbg solo.

Diferentes autores han descrito la participación de las proteínas tirosina quinasas de la familia *Src* como ser *Syk* y *Fgr* en los fenómenos de adherencia (Berton, 1999). Mas aún, agonistas como FMLP, PMA y TNF- α aumentan la actividad quinasa de *Fgr* a través de un mecanismo dependiente de β_2 integrinas (Berton *et al.*, 1994; Gutkind *et al.*, 1989). A partir de estos resultados, se investigó los efectos del sFbg en presencia de 10 μ M de PP2, un inhibidor selectivo de la familia *Src* (Hanke *et al.*, 1996). Como se muestra en la *Figura 9*, el PP2 fue capaz de disminuir la exocitosis de los gránulos secundarios inducida por sFbg pero no afectó la degranulación de las vesículas secretorias. Estos datos en su conjunto sugieren que la movilización de gránulos secundarios inducida por sFbg involucra la fosforilación de proteínas en residuos de tirosina, mientras que el contenido de las vesículas secretorias se moviliza rápida e independientemente de este camino transduccional. Además, miembros de la familia *Src* participarían en la movilización de gránulos secundarios pero no en la de vesículas secretorias.

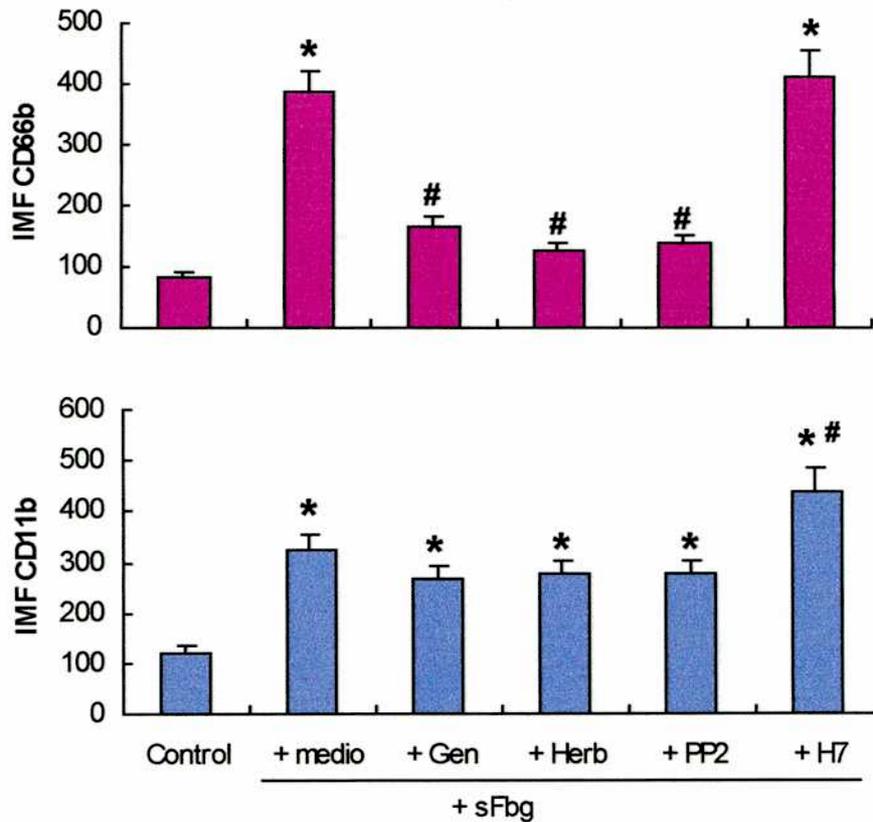


Figura 9. Efecto de inhibidores de tirosina quinasa en la degranulación de PMN inducida por sFbg. PMN (2.5×10^6 /ml) preincubados 1 h a 37°C con medio (control), genisteina ($100 \mu\text{M}$), herbimicina ($5 \mu\text{M}$), PP2 ($10 \mu\text{M}$) o H-7 ($10 \mu\text{M}$), fueron estimulados durante 1 h en presencia de sFbg ($6 \mu\text{M}$) a 37°C . Las células fueron lavadas y marcadas con un mAb específico anti-CD66b o anti-CD11b según se describió en *Materiales y Métodos*. Los datos representan la media \pm SEM de la IMF de 8 dadores. * Significancia estadística ($p < 0.005$) comparado con el control. # Significancia estadística ($p < 0.005$) comparado con el tratamiento con sFbg ($6 \mu\text{M}$).

4.2.3.- El fibrinógeno soluble induce la fosforilación de proteínas en residuos tirosina.

Considerando los resultados anteriores se investigó en PMN el patrón de fosforilación de proteínas inducido por el sFbg. Los PMN se incubaron durante diferentes tiempos con $6 \mu\text{M}$ de sFbg, las células luego se lisaron y se sembró igual cantidad de proteína en cada calle del gel SDS-PAGE. Luego el western blot fue revelado con un mAb anti-fosfotirosina. Como se puede observar a través del gel, la activación de PMN por sFbg

indujo la fosforilación rápida y reversible de diversas proteínas en tirosina. Principalmente se observaron dos bandas de aproximadamente 120 y 40 kDa de peso molecular (Figura 10 a). Dicha fosforilación se hizo evidente entre lo 5-15 min de adición del sFbg. Luego de los 60 min ambas bandas presentaron una disminución en su grado de fosforilación.

Para determinar si la fosforilación en tirosina en respuesta al sFbg es dependiente de la concentración, en forma semejante a lo observado en los efectos biológicos, los PMN se expusieron a concentraciones crecientes de sFbg desde 1.5 a 6 μ M durante 5 min. La Figura 10b muestra que la fosforilación de ambas proteínas es dependiente de la dosis, y que el mayor efecto se alcanzó con una concentración de 6 μ M. Sin embargo, la proteína de 120 kDa alcanzó un máximo de fosforilación con una concentración de 1.5 μ M. La fosforilación de proteínas en respuesta a sFbg se bloqueó completamente por la preincubación con el mAb anti-CD11b (Figura 10b), confirmando que el sFbg actúa a través de una interacción específica con el receptor CD11b.

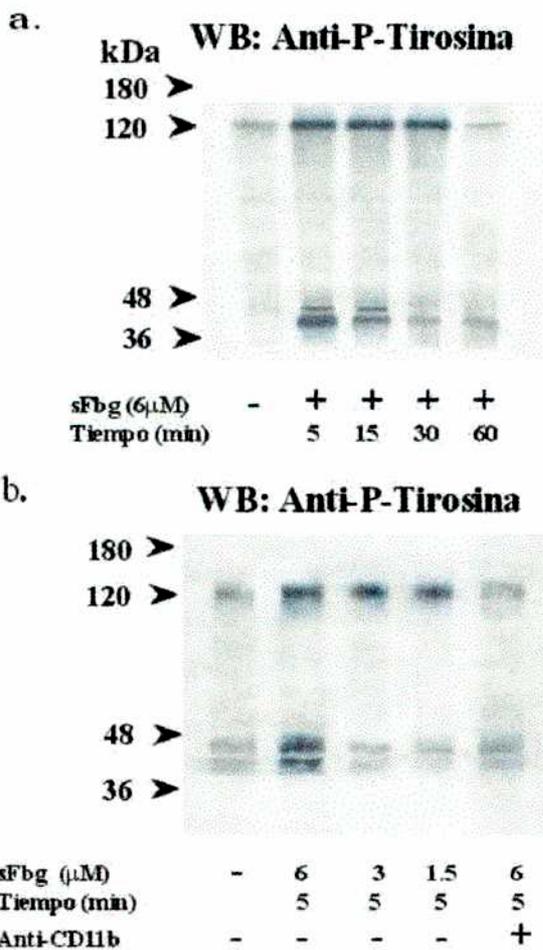


Figura 10. sFbg induce la fosforilación de proteínas en tirosina en PMN. a. PMN se incubaron con sFbg (6 μ M) a 37 $^{\circ}$ C durante los tiempos indicados en la figura. Las proteínas se extrajeron con la solución de RIPA, y luego de una electroforesis en gel de poliacrilamida, se transfirieron a una membrana de PVDF, la que se reveló con un mAb 4G10 anti-fosfotirosina (1 μ g/ml) según se describió en *Materiales y Métodos*. En los experimentos en que la incubación con 4G10 se realizó en presencia de 1mM de fosfotirosina no se observó reactividad (dato no mostrado). Los números de la izquierda muestran la migración de los marcadores de peso molecular. b. PMN se preincubaron en presencia o ausencia de anti-CD11b (1.8 mg/ml) a 37 $^{\circ}$ C durante 30 min seguidos de la incubación con diferentes concentraciones de sFbg por 5 min. Las proteínas se extrajeron y analizaron como se describió en la Figura 10 a y en *Materiales y Métodos*

4.2.4.- Comparación entre el patrón de fosforilación de proteínas producido por el fibrinógeno en su forma soluble y el adherido a placa.

Considerando que el patrón de fosforilación descrito discrepa del presentado en bibliografía utilizando PMN adheridos a placas recubiertas con fibrinógeno, se evaluó la hipótesis de que tales diferencias podrían adjudicarse a las formas diferentes de presentación del Fbg . Para esto se incubaron durante 15 min, PMN con fibrinógeno soluble (6 μ M) o en placas con fibrinógeno adherido preparadas según se describió en *Materiales y Métodos*. Luego las células se lavaron y se lisaron como se describió en la sección 4.2.3. Se sembró igual cantidad de proteína en cada calle del gel SDS-PAGE y el western blot se reveló con un mAb anti-fosfotirosina. Como se puede observar en la *Figura 11* mientras que el fibrinógeno soluble indujo principalmente la fosforilación de dos proteínas, en PMN adheridos a placas recubiertas con Fbg se produjo la fosforilación de al menos 10 proteínas de diferente peso molecular, confirmando resultados previos (Fuortes *et al.*, 1993; Yan *et al.*, 1996; Yan *et al.*, 1997; Mócsai *et al.*, 1999; Willeke *et al.*, 2000).

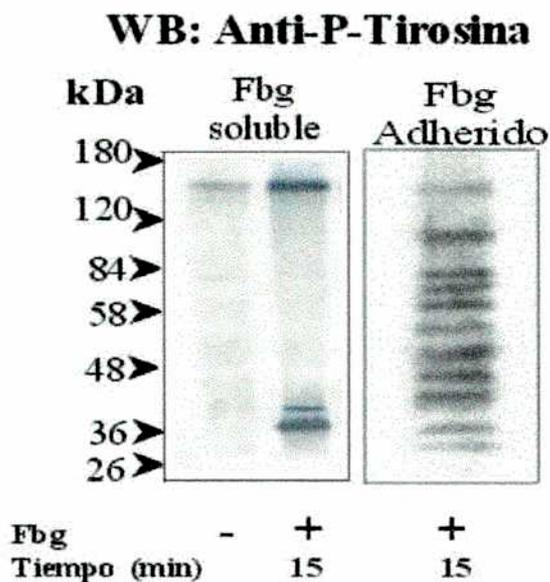


Figura 11. Comparación entre el patrón de fosforilación de proteínas producido por el fibrinógeno soluble y el adherido a placas. PMN fueron incubados con sFbg (6 μ M) o con fibrinógeno adherido a placas a 37 $^{\circ}$ C durante los tiempos indicados en la figura. Luego las células se lavaron y las proteínas se extrajeron con la solución de RIPA. Después de una electroforesis en gel de poliacrilamida, las proteínas fueron transferidas a una membrana de PVDF y reveladas con mAb 4G10 anti-fosfotirosina (1 μ g/ml) según lo descrito en *Materiales y Métodos*

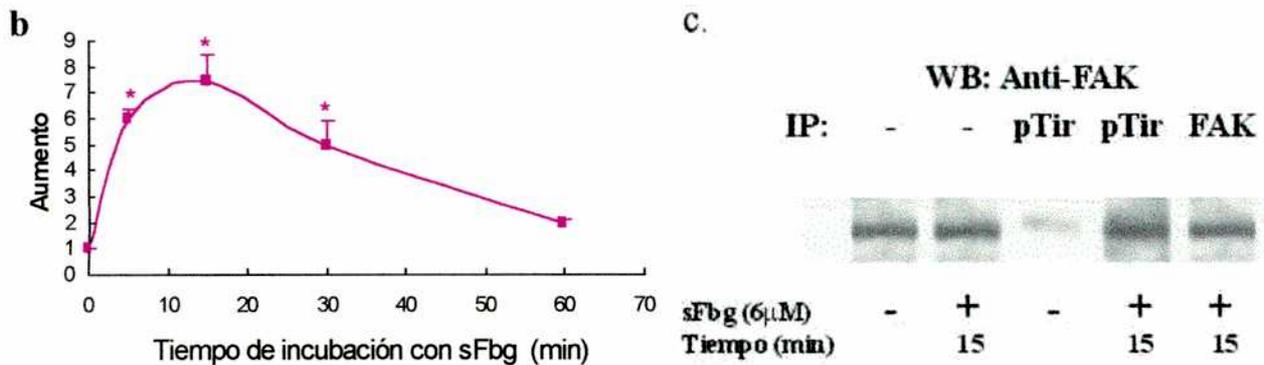


Figura 12. *sFbg* induce la fosforilación de FAK en PMN. *a.* Lisados celulares de PMN incubados con *sFbg* (6μM) a 37°C durante los tiempos indicados en la figura fueron inmunoprecipitados con mAb 4G10 anti-fosfotirosina (1μg/ml) según se describió en *Materiales y Métodos* y luego sometidos al análisis por western blot con mAb anti-FAK. *b.* Los resultados obtenidos en *a.* se *scanearon* y la intensidad de las bandas se cuantificó a través del programa Image 1.56b9 (Instituto Nacional de Salud, Bethesda, MD, USA). Los datos representan la media ± SEM de 3 experimentos independientes y se expresan como el incremento respecto del control. * Significancia estadística (p<0.005) comparado con el control. *c.* Lisados totales de PMN incubados con medio o *sFbg* (6μM) fueron analizados en paralelo con el producto de la inmunoprecipitación con anti-fosfotirosina (1μg/ml) o anti-FAK y sujetos a análisis por western blot con anti-FAK mAb.

4.2.6.- El fibrinógeno soluble induce la activación de MAPquinasas.

Debido a su peso molecular, la proteína de aproximadamente 40 kDa probablemente represente una MAPK. En neutrófilos, ha sido demostrada la activación de p38 y ERK 1/2 en respuesta a diversos estímulos inflamatorios (Nick *et al.*, 1996; Rane *et al.*, 1997; Nick *et al.*, 1997; McLeish *et al.*, 1998; Zu *et al.*, 1998). Ya que la fosforilación de MAPK se correlaciona con su activación (Payne *et al.*, 1991), se midió este parámetro en extractos de PMN sometidos a western blot y revelados con mAb específico para las formas fosforiladas de las respectivas MAPK. Como se muestra en la *Figura 13 a y b*, el *sFbg* indujo la fosforilación de ERK1/2 pero no de p38 entre lo 5-15 min de incubación. Se llevó en paralelo como control positivo de la activación de p38, un lisado de PMN activados por stress osmótico. Se reprobaron las membranas con anti-ERK2 y anti-p38 Abs para demostrar igual cantidad de proteína total sembrada en cada calle del gel.

La capacidad de sFbg de activar ERK de una manera dependiente del tiempo se confirmó a través de un ensayo *in vitro* de la actividad quinasa. Como se muestra en la *Figura 13c*, la actividad quinasa de la ERK se incrementó a los 5 min luego de la adición de sFbg retornando a los niveles basales a los 60 min. Mas aún, el pretratamiento con mAb anti-CD11b bloqueó completamente el aumento en la actividad de ERK por sFbg.

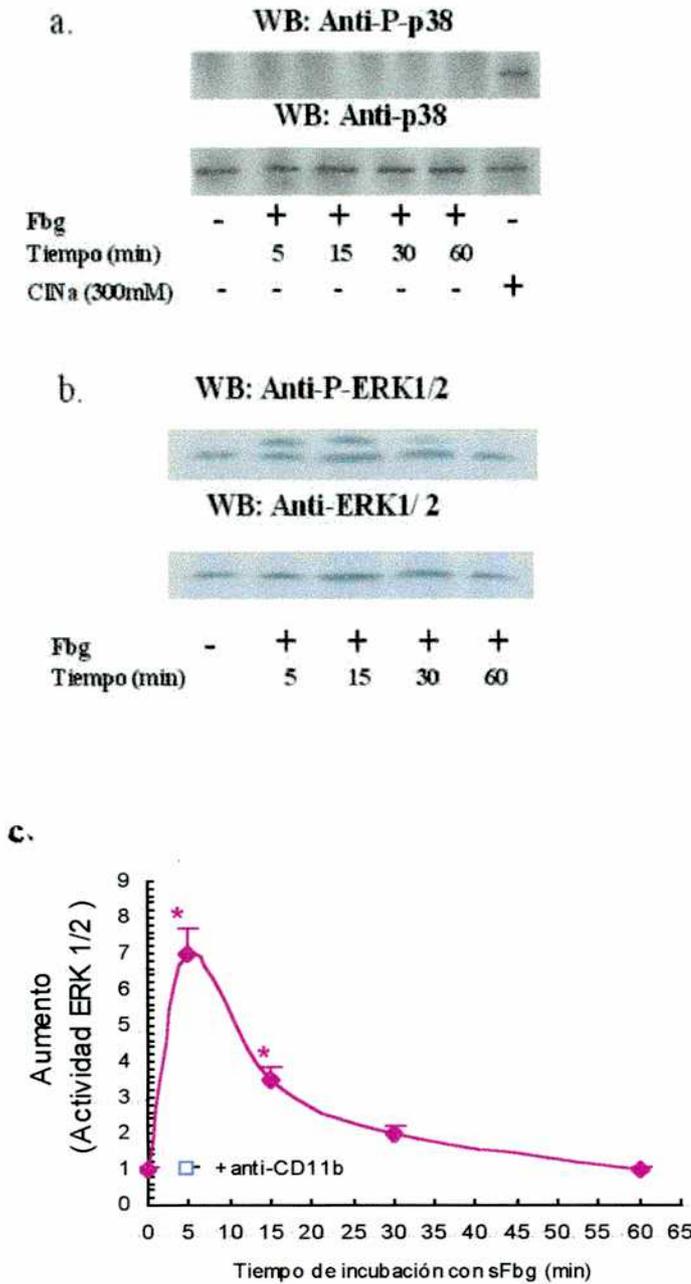


Figura 13. sFbg induce la fosforilación de MAPK en PMN. PMN fueron incubados con medio o sFbg (6µM) a 37°C durante los tiempos indicados en la figura. Se realizó además un control adicional con NaCl (300 mM). Se extrajeron las proteínas con la solución de RIPA, y luego de una electroforesis en gel de poliacrilamida, las proteínas fueron transferidas a una membrana de PVDF y reveladas con Ab anti-fosfo-p38 (a) o anti-fosfo ERK1/2 (b). Se reprobó la membrana con anti-p38 y anti-ERK2 Ab para confirmar que la misma cantidad de proteína se sembró en cada calle del gel. C. La actividad quinasa de ERK se midió a través de un ensayo *in vitro* como se describe en *Materiales y Métodos*. Los datos representan la media ± SEM del aumento respecto del control en la actividad de ERK medido en 6 dadores. *Significancia estadística (p<0.05) comparado con el control.

4.2.7.-Efecto de inhibidores de MAPK sobre la degranulación inducida por el fibrinógeno soluble humano.

Para determinar la participación de la cascada de señalización que concluye en la activación de la ERK1/2 en la capacidad exocítica del sFbg, se investigó el efecto de la inhibición farmacológica de ERK y p38 en la degranulación inducida por sFbg. Se utilizó PD98059, un inhibidor de la "mitogen-activated protein/ERK kinase" o quinasa que fosforila a ERK1/2: MEK 1 y 2. Este compuesto bloquea la fosforilación de ERK a través de un mecanismo alostérico que no involucra la inhibición de la unión de ATP (Alessi *et al.*, 1996). En forma paralela, se investigó el papel de la MAPK p38 en la degranulación inducida por sFbg usando el compuesto SB203580, un inhibidor de su actividad (Cuenda *et al.*, 1995). Como se muestra en la *Figura 14a*, 50 μM de PD98059 redujo significativamente la degranulación inducida por sFbg de gránulos secundarios pero no afectó el aumento de la expresión del CD11b. Por el contrario, 10 μM de SB203580 no modificó el patrón de degranulación inducido por sFbg. Bajo las mismas condiciones, se confirmó que el PD98059 inhibe específicamente la quinasa de ERK a través de la técnica de western blot utilizando un mAb anti-fosfo ERK (*Figura 14b*). En dicha figura también se muestra que la activación de ERK1/2 es bloqueada por 100 μM de genisteina y 10 μM de PP2. Los datos de la activación de ERK se confirmaron con un ensayo *in vitro* de su actividad enzimática (*Figura 14c*).

Estos datos en su conjunto indican que el camino de la MAPK ERK se encuentra involucrado en la degranulación inducida por sFbg de los gránulos secundarios pero no de las vesículas secretorias.

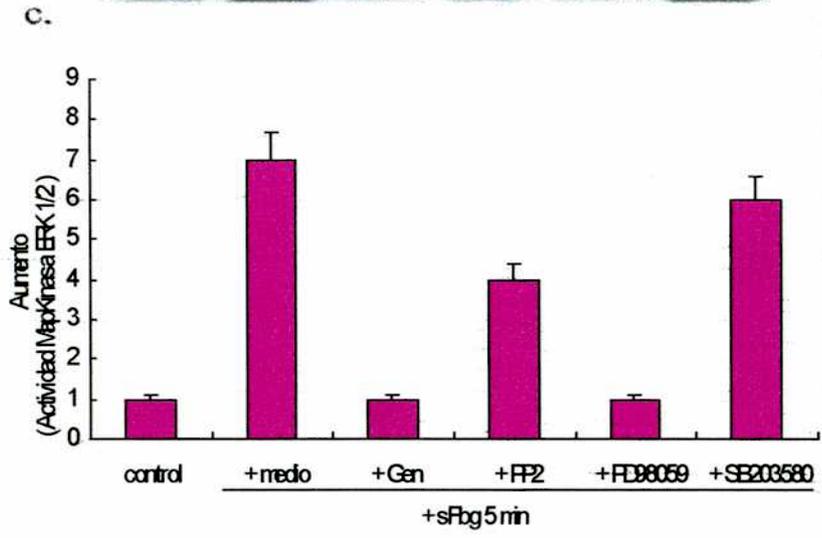
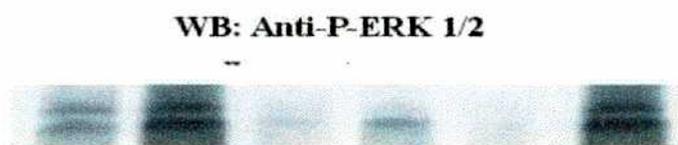
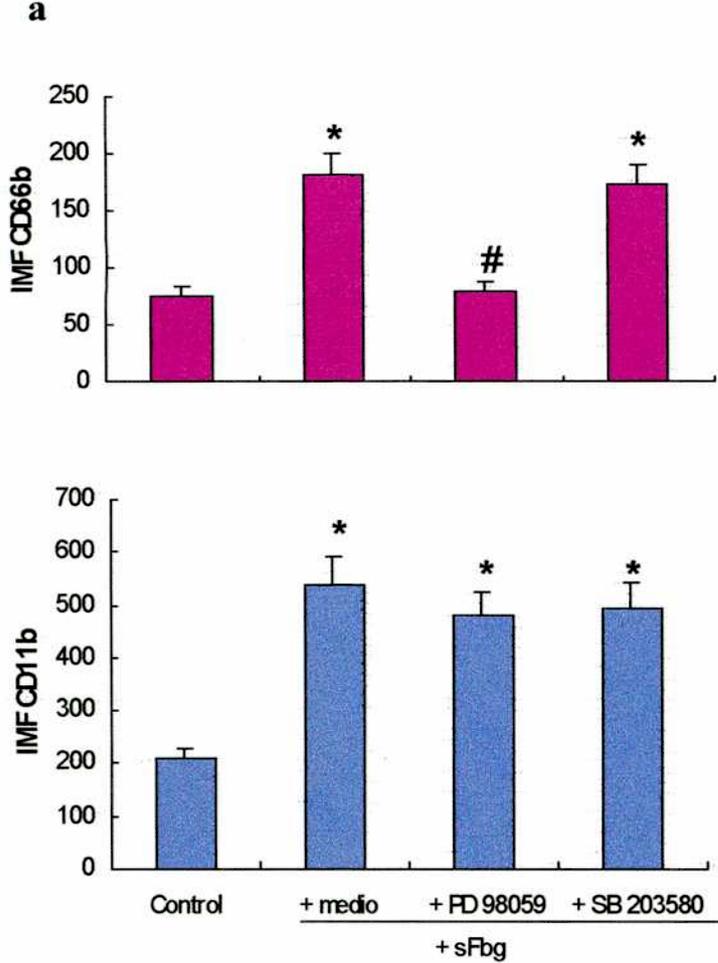


Figura 14. Efecto de inhibidores de MAPK en la degranulación de PMN inducida por sFbg. *a.* PMN ($2.5 \times 10^6/ml$) se preincubaron 1h a $37^\circ C$ con medio (control), PD98059 ($50 \mu M$), o SB203580 ($10 \mu M$), seguido de la estimulación con sFbg ($6 \mu M$) a $37^\circ C$ 1 h. Las células se lavaron y marcaron con un mAb específico anti-CD66b o mAb específico anti-CD11b según lo descrito en *Materiales y Métodos.* Los datos representan la media \pm SEM de la IMF de 8 dadores. *Significancia estadística ($p < 0.005$) comparado con el control. #Significancia estadística ($p < 0.005$) comparado con el tratamiento con sFbg ($6 \mu M$). *b.* PMN fueron preincubados 1h a $37^\circ C$ con medio (control), genisteina ($100 \mu M$), PP2 ($10 \mu M$), PD98059 ($50 \mu M$), o SB203580 ($10 \mu M$), seguido de la estimulación en presencia de sFbg ($6 \mu M$) a $37^\circ C$ 5 min. Los lisados de PMN fueron analizados por western blot con mAb anti-fosfo-ERK1/2 y la membrana reprobanda con Ab anti-ERK2 para confirmar que la misma cantidad de proteína se sembró en cada calle del gel (dato no mostrado). *c.* La actividad quinasa de ERK se midió a través de un ensayo *in vitro* como se describe en *Materiales y Métodos.* Los datos representan la media \pm SEM del incremento respecto del control en la actividad de ERK medido en 5 dadores. *Significancia estadística ($p < 0.05$) comparado con el control. #Significancia estadística ($p < 0.005$) comparado con el tratamiento con sFbg (6

4.2.8.- Efecto de inhibidores de proteínas quinasas sobre el aumento de la fagocitosis inducida por fibrinógeno soluble.

A pesar de que la utilización del camino de la ERK1/2 o de la p38 depende de la naturaleza del estímulo en cuestión, la relevancia funcional de la activación de dicha cascada de transducción de señales puede variar dependiendo de la respuesta analizada. En este sentido, se demostró previamente que el sFbg induce el aumento de la fagocitosis dependiente de los RFc γ , por lo que se investigó la participación de la MAPK ERK1/2 en la modulación de dicha función por el sFbg. Como se muestra en la *Figura 15*, la inhibición farmacológica de las tirosina quinasas por genisteína revirtió completamente el efecto estimulador del sFbg sobre la fagocitosis, mientras que la inhibición de la familia *Src* por PP2 o la inhibición de la ERK1/2 por el PD98059 sólo bloqueó parcialmente dicha función. Por el contrario, la inhibición de serina quinasas por el H7 o de la MAPK p38 por SB203580 no interfirió con el efecto del sFbg sobre la fagocitosis. Ninguno de los inhibidores utilizados modificó los niveles basales de la fagocitosis.

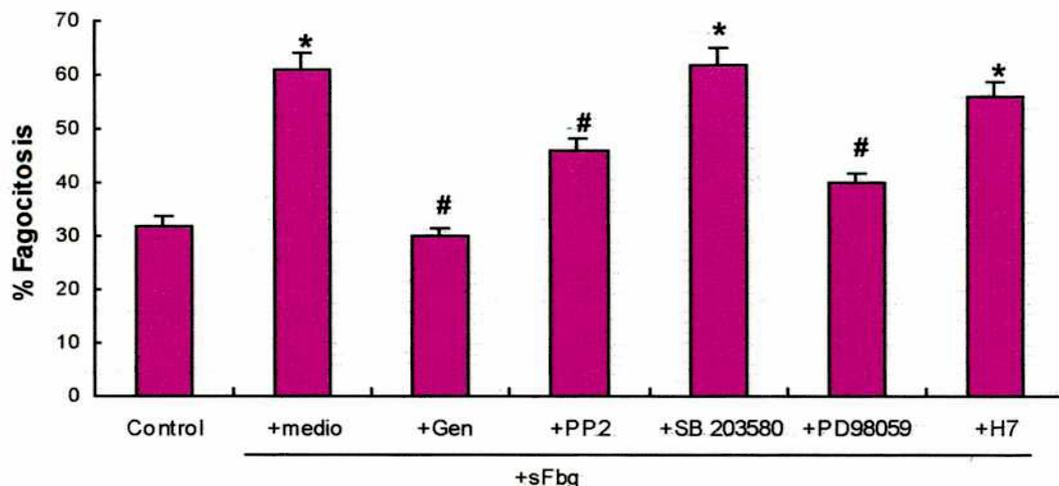
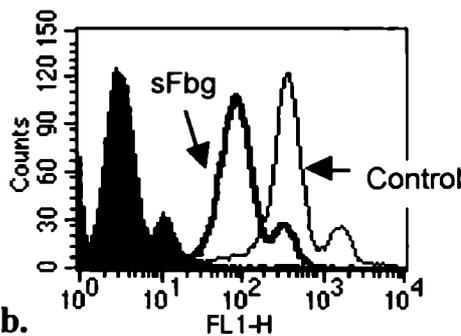


Figura 15. Efecto de inhibidores de tirosina quinasas en la fagocitosis inducida por sFbg. PMN (3.5×10^6 /ml) fueron preincubados 1h a 37°C con medio (control), o diferentes inhibidores de quinasas como se indica, seguido de la estimulación durante 1 h en presencia de sFbg ($6\mu\text{M}$) a 37°C . Luego las células fueron centrifugadas, lavadas y el ensayo de fagocitosis se llevó a cabo utilizando células óptimamente sensibilizadas según se describió en *Materiales y Métodos*. Los datos representan la media \pm SEM de 6 dadores. *Significancia estadística ($p < 0.05$) comparado con el control. # Significancia estadística ($p < 0.05$) comparado con el tratamiento con sFbg ($6\mu\text{M}$).

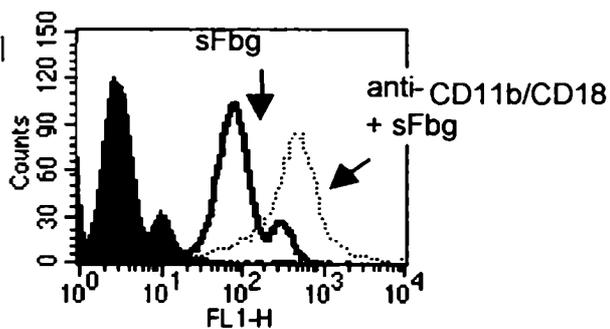
4.2.9.-El fibrinógeno soluble humano reduce la activación de caspasa 3 en neutrófilos.

Trabajos anteriores indican que la activación de caspasa 3 está involucrada en la apoptosis de neutrófilos como el evento final en la cascada de caspasas (Akgul *et al.*, 2001). De acuerdo a esto se determinaron los efectos del sFbg sobre la activación de caspasa 3. El análisis por citometría de flujo mostró que la incubación durante 1 h con sFbg (6 μ M) redujo significativamente la activación de caspasa 3 luego de 18 h de cultivo de los PMN y que la preincubación de las células con mAb anti-CD11b revirtió el efecto del sFbg (Figura 16)

a.



b.



c.

Tratamiento	n	IMF
Control	5	504 \pm 13
+ sFbg	5	182 \pm 26 *
+ antiCD11b +sFbg	5	460 \pm 17

Figura 16. sFbg reduce la activación de la caspasa 3 en neutrófilos. PMN (2.5 x 10⁶/ml) fueron incubados durante 1 h a 37°C en presencia de medio (control) o sFbg (6 μ M) (a) o preincubados con anti-CD11b (1.8 mg/ml) (b). Luego las células fueron centrifugadas, lavadas, permeabilizadas y marcadas con un mAb específico anti-caspasa 3 activa según lo descrito en *Materiales y Métodos*. Se muestran histogramas representativos de la activación de caspasa 3 luego de los diferentes tratamientos. El histograma lleno representa el control de isotipo. La ordenada y la abscisa representan el número de células y la intensidad de fluorescencia (FL1-H), respectivamente. En c. los datos representan la media \pm SEM de la IMF en n experimentos. * Significancia estadística (p<0.005) comparado con el control.

4.2.10.-Efecto de inhibidores de proteínas quinasas sobre el retraso de la apoptosis inducida por fibrinógeno soluble.

A continuación se evaluó la participación de proteínas quinasas, en especial la cascada FAK/ERK en la modulación de la apoptosis por el sFbg. Con este propósito, se incubaron neutrófilos con o sin sFbg (6 μ M), en presencia de inhibidores específicos de tirosina quinasas, serina quinasas, ERK1/2 quinasa (MEK) y p38. El porcentaje de células apoptóticas se determinó por citometría de flujo (*Figura 17*) y se confirmó por microscopía óptica. Los resultados presentados en la *Figura 17* muestran claramente que el efecto inhibitorio del sFbg sobre la apoptosis de los neutrófilos es dependiente de la fosforilación en residuos de tirosina y de la activación de la ERK1/2. La inhibición farmacológica de la MAPK p38 no impidió el efecto del sFbg. Sin embargo, el inhibidor de las serina quinasas (H7) induce un aumento en el porcentaje de células apoptóticas, tanto en presencia como en ausencia del sFbg, sugiriendo la participación de las serina quinasas en la modulación de la apoptosis espontánea de neutrófilos.

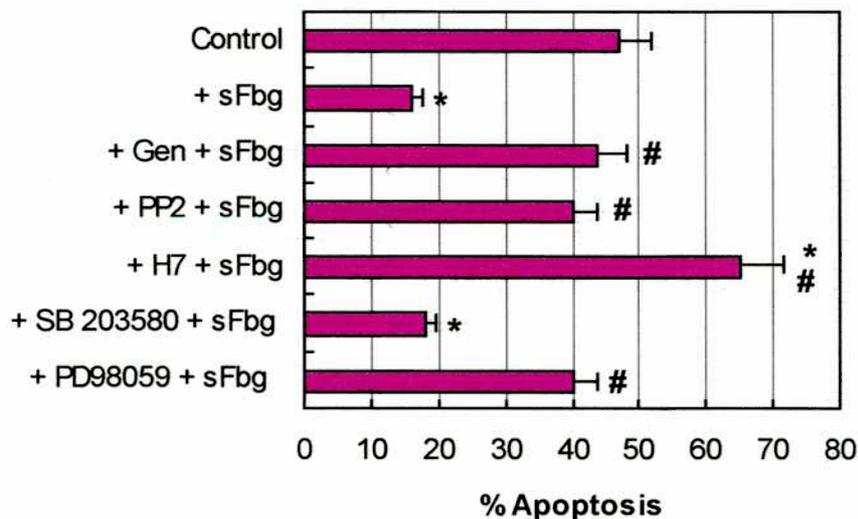


Figura 17. Efecto de inhibidores de tirosina quinasas en el retraso de la apoptosis inducido por sFbg. PMN (2.5×10^6 /ml) preincubados 1h a 37°C con medio (control), o diferentes inhibidores de quinasas como se indica, seguido de la estimulación durante 1 h en presencia de sFbg (6 μ M) a 37°C. Luego las células fueron centrifugadas, lavadas y cultivadas durante 18 h a 37°C. El porcentaje de células apoptóticas se determinó por citometría de flujo según lo descrito en *Materiales y Métodos*. Los datos representan la media \pm SEM de 8 dadores. * Significancia estadística ($p < 0.005$) comparado con el control. # Significancia estadística ($p < 0.005$) vs tratamiento con sFbg (6 μ M).

4.2.11.- El fibrinógeno soluble induce la activación del factor nuclear κB (NF- κB) en neutrófilos.

Debido a que la degranulación y la fagocitosis son dos reacciones a corto plazo, se analizó, también, la participación de las señales intracelulares desencadenadas por el sFbg en la regulación de reacciones a largo plazo con inducción de genes como es la apoptosis. En particular el factor de transcripción NF- κB , el cual ha sido descrito como factor anti-apoptótico ante diversos estímulos inflamatorios como TNF- α o FMLP (McDonald *et al.*, 1997). Por lo tanto, se evaluó si el sFbg inducía la activación del NF- κB en PMN. En primer lugar se analizó la cinética de degradación de la proteína inhibitoria I κB - α en extractos citoplasmáticos de células tratadas con sFbg (6 μM) por la técnica de western blot (*Figura 18 a*). Los niveles de I κB - α decrecieron a la hora de incubación con el estímulo, recuperándose parcialmente luego de 6 h y alcanzando los niveles basales a las 18 h. La membrana se reprobó con un anticuerpo anti-actina como control, demostrando que se sembró en el gel igual cantidad de proteína en cada calle.

Para confirmar la activación del NF- κB inducida por sFbg, se realizó un ensayo de EMSA para detectar la actividad de unión del NF- κB al DNA en PMN. Como se muestra en la *Figura 18b*, luego de 1 h de incubación con sFbg, ya se observa translocación de dicho factor de transcripción al núcleo, alcanzando un máximo a las 2 h. Luego de las 18 h los niveles de activación retornan a la situación basal. La incubación simultánea con polymixina B (10 ng/ml) no afecta los niveles de activación del NF- κB por sFbg pero reduce significativamente la magnitud de la respuesta al LPS (100 ng/ml), demostrando que una contaminación con LPS no es responsable de la activación del NF- κB por sFbg. La identidad de los complejos que son translocados al núcleo se estudió utilizando ensayos de competición y supershift. Como se muestra en la *Figura 18c* la estimulación de PMN con sFbg indujo la activación tanto de heterodímeros p50/p65 como de homodímeros p50/p50.

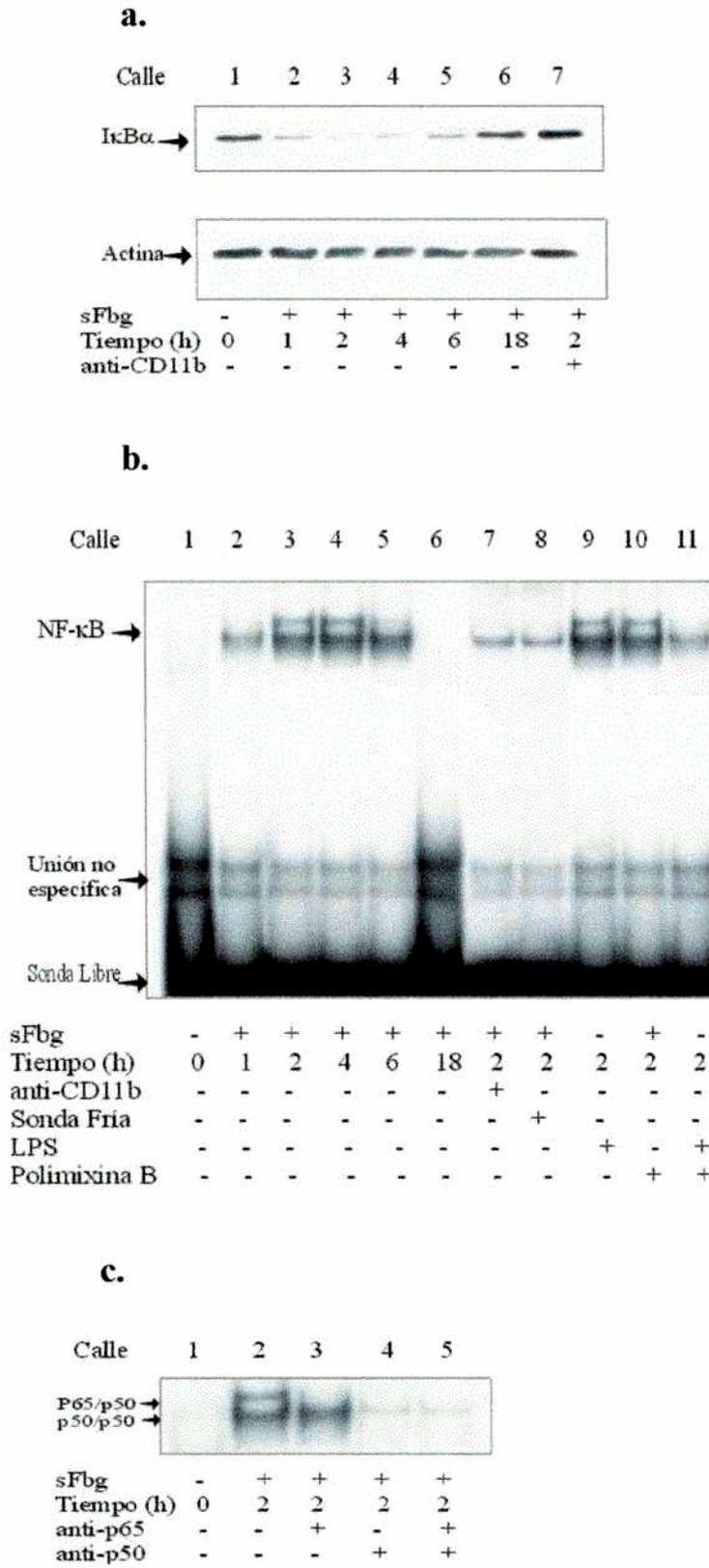
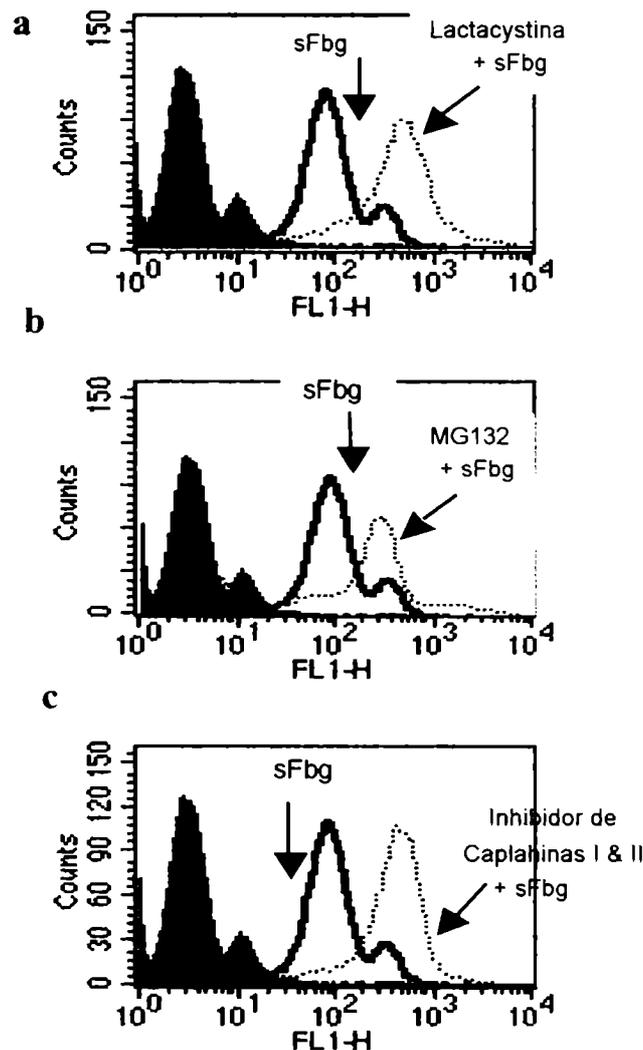


Figura 18. *sFbg* induce la activación de *NF-κB* en neutrófilos. **a.** Western blot de extractos citoplasmáticos de PMN ($25 \times 10^6/\text{ml}$) incubados a 37°C en presencia *sFbg* ($6\mu\text{M}$) durante los tiempos indicados. La expresión de $\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$ se visualizó utilizando un Ab anti- $\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$ específico (panel superior) según lo descrito en *Materiales y Métodos*. La membrana fue reprobada con Ab anti-actina (panel inferior). Ambos paneles son representativos de 3 experimentos. **b.** La unión del *NF-κB* al DNA se analizó a través de un ensayo de EMSA. Se muestran extractos nucleares de PMN estimulados con *sFbg* ($6\mu\text{M}$) durante los tiempos indicados (calles 1-6). Diferentes controles de especificidad fueron evaluados en forma paralela: PMN preincubados con anti-CD11b seguido de *sFbg* 2 h (calle 7), o en presencia de 50 veces en exceso de oligonucleótido no marcado (calle 8) o PMN incubados con *sFbg* y polimixina B (calle 11) o PMN con LPS (100ng/ml) solo o en presencia de polimixina B (calles 9 y 10 respectivamente). Los resultados son representativos de 3 experimentos. **c.** Ensayos de supershift de complejos de unión de *NF-κB* al DNA en extractos nucleares de PMN estimulados con *sFbg* ($6\mu\text{M}$). Se utilizaron en estos estudios anticuerpos anti-p65 (calle3), y anti-p50 (calle 4) o una mezcla de ambos (calle 5). Este experimento es representativo de 3.

4.2.12.- Inhibidores de NF- κ B contrarrestan los efectos del fibrinógeno soluble sobre la activación de caspasa 3.

Para determinar si la activación del NF- κ B está involucrada en el retraso de la apoptosis por sFbg, se evaluaron los efectos de inhibidores específicos del NF- κ B sobre la reducción en la activación de la caspasa 3. Se usaron 3 inhibidores del NF- κ B: lactacystina, el péptido aldehído MG132 y el Inhibidor de Calpahinas I&II (Coxon 1999). Estos tres inhibidores previenen la translocación del NF- κ B al núcleo a las concentraciones utilizadas ya que inhiben al proteosoma. El tratamiento de PMN estimulados con sFbg con 40 μ M de lactacystina restituyó la activación de la caspasa 3 a los niveles basales. Resultados similares fueron obtenidos cuando se utilizaron los otros dos inhibidores (Figura 19).



d.

Tratamiento	n	IMF
Control	5	504 ± 13
sFbg	5	182 ± 26 *
Lactacystina + sFbg	4	524 ± 38
MG132 + sFbg	4	402 ± 35
Inh Calpahinas I&II + sFbg	4	434 ± 23

Figura 19. Inhibidores de NF- κ B contrarrestan los efectos del sFbg sobre la activación de la caspasa. PMN (2.5×10^6 /ml) fueron preincubados durante 1 h a 37°C en presencia de medio (control) o lactacystina (40 μ M) (a) o MG132 (20 μ M) (b) o Inhibidor de Calpahinas I & II (100 μ g/ml) (c) seguido de la estimulación con sFbg (6 μ M) 1 h a 37°C. Luego las células fueron centrifugadas, lavadas, permeabilizadas y marcadas con un mAb específico anti-caspasa 3 activa según lo descrito en *Materiales y Métodos*. Se muestran histogramas representativos de la activación de caspasa 3 luego de los diferentes tratamientos. El histograma lleno representa el control de isotipo. La ordenada y la abscisa representan el número de células y la intensidad de fluorescencia (FL1-H), respectivamente. En d. los datos representan la media \pm SEM de la IMF en n experimentos. * Significancia estadística ($p < 0.005$) comparado con el control.

4.2.13.- Efectos de inhibidores de MAPK ERK1/2 y la familia Src

sobre la modulación por el fibrinógeno soluble de la activación de la caspasa 3 y el NF- κ B.

Evidencias recientes sugieren que la activación de ERK resulta en la generación de señales de supervivencia en diversos tipos celulares, incluyendo los neutrófilos (Akgul *et al.*, 2001). Considerando los resultados previos que indicaban que la ERK1/2 y la familia Src mediaban los efectos del sFbg sobre la apoptosis, se analizó sus efectos sobre la activación del NF- κ B para determinar si son dos vías independientes o no. Se utilizaron entonces, inhibidores específicos de la familia Src (PP2) y de la ERK (PD98059) y se midió la activación de caspasa 3 y NF- κ B en respuesta al sFbg. Como se muestra en la *Figura 20a*, mientras que el pretratamiento de PMN con PD98059 (50 μ M) durante 30 min restauró la activación de la caspasa 3 a los niveles basales, el PP2 (10 μ M)

sólo bloqueó parcialmente los efectos del sFbg. Cuando los niveles de I κ B- α fueron estudiados en los extractos citoplasmáticos de células pretratadas con PD98059 (50 μ M) o PP2 (10 μ M) seguidas de la estimulación con 6 μ M de sFbg durante 2 h, no se observó degradación de I κ B- α (Figura 20b). Estos resultados fueron confirmados a través del análisis de extractos nucleares por EMSA (Figura 20c).

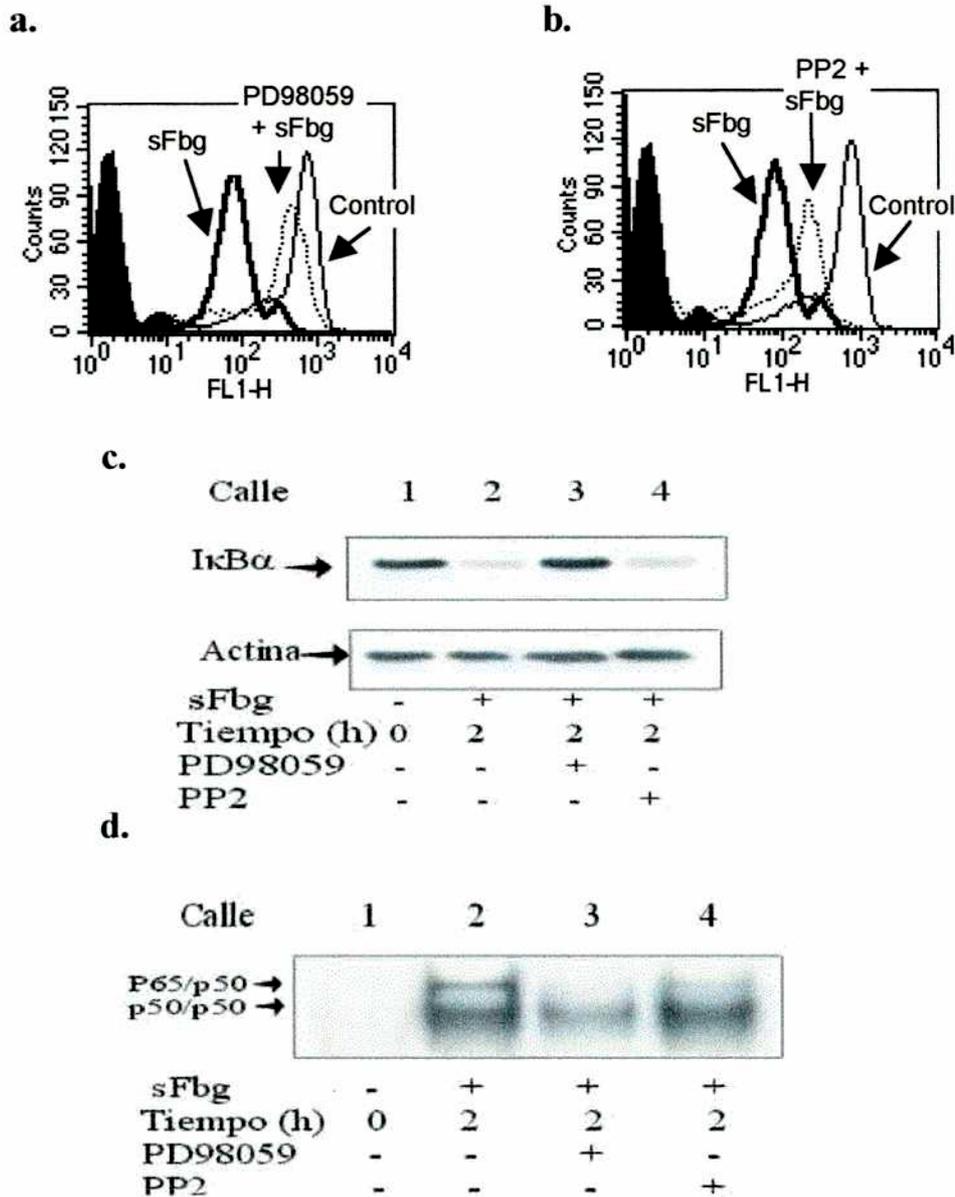


Figura 20. Efecto de inhibidores de la MAPK ERK1/2 y de la familia Src en la activación de la caspasa 3 y el NF- κ B por el sFbg a. PMN (2.5×10^6 /ml) fueron preincubados durante 1 h a 37°C en presencia de medio (control) o PD98059 (50 μ M) o PP2 (10 μ M) seguido de la estimulación con sFbg (6 μ M) 1 h a 37°C. Se muestran histogramas representativos de la activación de caspasa 3 luego de los diferentes tratamientos. El histograma lleno representa el control de isotipo. La ordenada y la abscisa representan el número de células y la intensidad

de fluorescencia (FL1-H), respectivamente. En *b*. los datos representan la media \pm SEM de la IMF en *n* experimentos. *Significancia estadística ($p < 0.005$) comparado con el control. *c*. Análisis por western blot de extractos citoplasmáticos de PMN ($25 \times 10^6/\text{ml}$) preincubados durante 1 h a 37°C en presencia de medio (control) o PD98059 ($50\mu\text{M}$) o PP2 ($10\mu\text{M}$) seguido de la estimulación con sFbg ($6\mu\text{M}$) 2 h a 37°C . La expresión de I κ B- α se visualizó utilizando un Ab anti- I κ B- α específico (panel superior) según lo descrito en *Materiales y Métodos*. Para confirmar que se sembró la misma cantidad de proteína en cada calle del gel la membrana fue reprobada con Ab anti-actina (panel inferior). Ambos paneles son representativos de 3 experimentos. *d*. La unión del NF- κ B al DNA se analizó a través de un ensayo de EMSA en extractos nucleares de PMN fueron preincubados durante 1 h a 37°C en presencia de medio (control) o PD98059 ($50\mu\text{M}$) o PP2 ($10\mu\text{M}$) seguido de la estimulación con sFbg ($6\mu\text{M}$) 2 h a 37°C .

4.2.14.-Efecto del fibrinógeno soluble sobre la activación de la caspasa 3 y el NF- κ B en células HL-60 diferenciadas con DMSO.

Las células HL-60 se pueden diferenciar a granulocitos por diferentes agentes, incluyendo el DMSO (Collins, 1987). Estudios anteriores indican que en las células HL-60 diferenciadas a granulocitos con DMSO se observa un aumento en la expresión del CD11b. Por esta razón confirmamos el aumento de este parámetro de diferenciación a través de citometría de flujo con mAb anti-CD11b conjugado con FITC (dato no mostrado).

Con el objeto de estudiar si los efectos del sFbg sobre los PMN eran reproducidos en células HL-60 diferenciadas, se analizó el nivel de activación de la caspasa 3 y NF- κ B en dichas células en respuesta al sFbg. El análisis por citometría de flujo mostró que el tratamiento con $6\mu\text{M}$ de sFbg redujo la activación de caspasa 3 comparada con el control. Cuando se utilizaron inhibidores de NF- κ B sobre células HL-60 diferenciadas los niveles de activación de caspasa 3 fueron restituidos a los valores basales (*Figura 21 a*). Mas aún, células HL-60 diferenciadas con DMSO estimuladas con sFbg durante 2 h muestran niveles de I κ B- α en el citoplasma substancialmente reducidos, los cuales retornan a sus niveles basales a las 6 horas. Por otra parte se evidencia una fuerte activación del NF- κ B en el núcleo ya a la hora de incubación con sFbg. (*Figura 21 b y c*). En forma similar a lo que ocurre en los PMN, la preincubación con mAb anti-CD11b revirtió los efectos del sFbg. Cabe destacar que en forma paralela se realizaron los experimentos en células no diferenciadas, en donde el sFbg no ejerció ningún efecto.

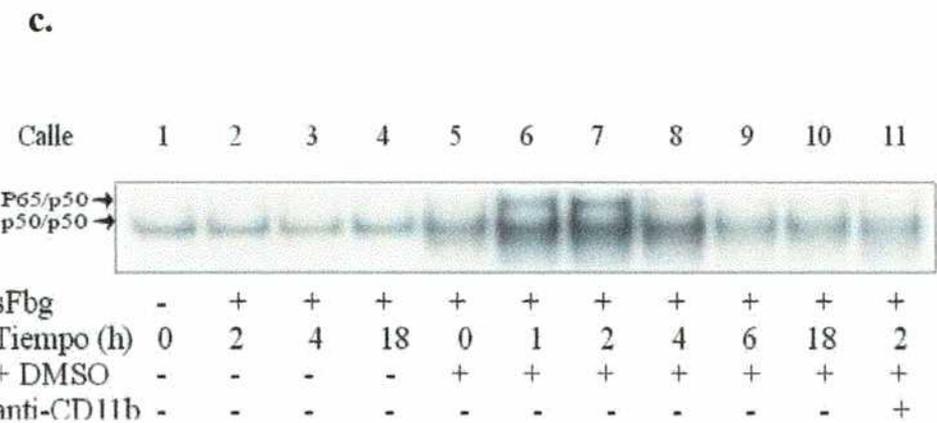
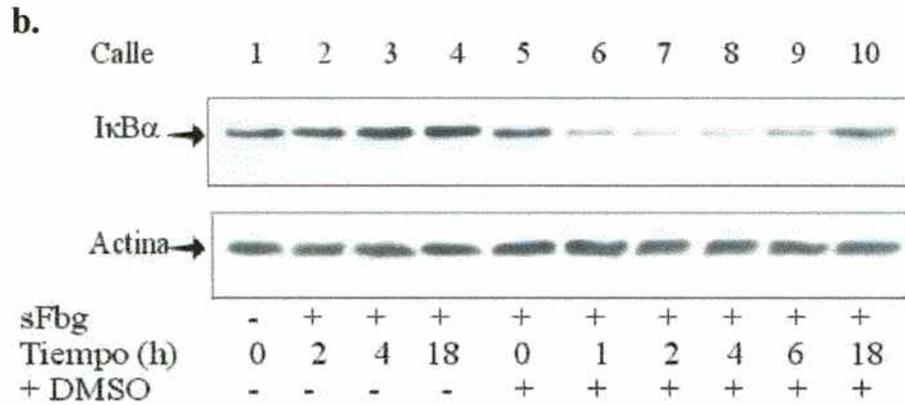
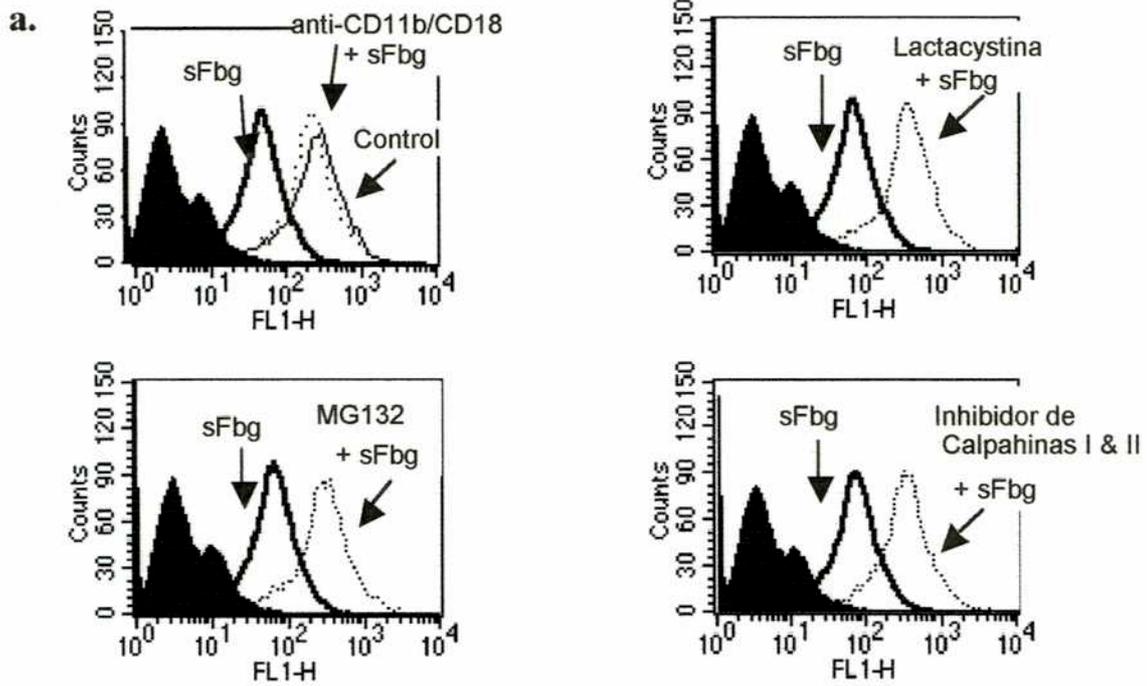


Figura 21. Efectos del sFbg sobre la activación de la caspasa 3 y el NF- κ B en células HL-60 diferenciadas con DMSO. **a.** Células HL-60 (2.5×10^6 /ml) tratadas con 1.25% de DMSO durante 5 días fueron preincubados durante 1 h a 37°C en presencia de medio (control) o lactacystina (40 μ M) o MG132 (20 μ M) o Inhibidor de calpahas I y II (100 μ g/ml) seguido de

la estimulación con sFbg ($6\mu\text{M}$) 1 h a 37°C . Se muestran histogramas representativos de la activación de caspasa 3 luego de los diferentes tratamientos. El histograma lleno representa el control de isotipo. La ordenada y la abscisa representan el número de células y la intensidad de fluorescencia (FL1-H), respectivamente. En *b*. los datos representan la media \pm SEM de la IMF en *n* experimentos. * Significancia estadística ($p < 0.005$) comparado con el control. *C*. Análisis por western blot de extractos citoplasmáticos de células HL-60 indiferenciadas (calle 1-4) o tratadas con 1.25% de DMSO durante 5 días (calle 5-11) incubados a 37°C en presencia de medio (control) o sFbg ($6\mu\text{M}$) durante diferentes tiempos. La expresión de I κ B- α se visualizó utilizando un Ab anti- I κ B- α específico (panel superior) según lo descrito en *Materiales y Métodos*. Para confirmar que se sembró la misma cantidad de proteína en cada calle del gel la membrana fue reprobada con Ab anti-actina (panel inferior). Ambos paneles son representativos de 3 experimentos. *c*. La unión del NF- κ B al DNA se analizó a través de un ensayo de EMSA en extractos nucleares de PMN que fueron incubados durante a 37°C en presencia de medio (control) o sFbg ($6\mu\text{M}$) durante diferentes tiempos. Tanto en *b* como en *c* se llevó como control extractos citoplasmáticos y nucleares respectivamente preincubados con anti-CD11b seguidos de la estimulación con sFbg ($6\mu\text{M}$) durante 2h.

5. Discusión y Conclusiones

Durante los procesos fisiopatológicos, los neutrófilos circulantes reciben señales provenientes de los focos inflamatorios y migran hacia ellos sufriendo una serie de cambios que llevan a la activación de los mismos. Este proceso implica mecanismos de reconocimiento célula-célula, que conducen a la adhesión, extravasación del endotelio capilar y migración hacia el foco inflamatorio. Las funciones efectoras desempeñadas por los PMN ocurren en un microambiente modificado por citoquinas, mediadores de inflamación, proteínas de la cascada de coagulación así como también factores humorales como anticuerpos de tipo IgG o componentes activados del sistema complemento. De esta manera los polimorfonucleares neutrófilos son células de vital importancia en la resolución de dichos focos infecciosos así como también en la generación de la fase aguda de la respuesta inflamatoria. Sin embargo, la exacerbación de dicha respuesta puede ser contraproducente para el individuo debido al alto potencial citotóxico de los PMN.

Inicialmente las β_2 integrinas, presentes en células mieloides, fueron identificadas como estructuras de la superficie celular que mediaban sólo el tráfico y la localización de células inmunes circulantes (Springer, 1990). Sin embargo luego se observó que también son capaces de regular múltiples funciones celulares en respuesta a estímulos ambientales, como crecimiento, diferenciación, expresión de genes y apoptosis a través de una comunicación bidireccional entre el interior de la célula y su entorno (Hynes, 1992). Los diferentes caminos transduccionales que se activan en respuesta a un estímulo, determinan, en definitiva, el patrón de acción de la célula. El conocimiento y la elucidación de los mismos permitirá pensar eventualmente en intervenciones terapéuticas a este nivel.

Tres datos adicionales enfatizan la importancia de los estudios acerca de los efectos del fibrinógeno soluble sobre los PMN: 1) los neutrófilos activados *in vitro* con PMA unen de 3 a 5 veces más fibrinógeno que células en reposo (Gustafson *et al.*, 1998); 2) los leucocitos de pacientes con diversas situaciones inflamatorias como hipersensibilidad retardada y aterosclerosis, presentan fibrinógeno sobre su superficie (Altieri *et al.*, 1990); y 3) la existencia de una correlación positiva entre los niveles de fibrinógeno plasmático y la activación leucocitaria (elastasa plasmática) en pacientes con problemas arteriales periféricos (Lowe *et al.*, 1993). Estos datos sugieren que la unión del fibrinógeno a PMN ocurre efectivamente en los sitios inflamatorios y podría asociarse a la activación de los mismos.

En esta tesis se demuestra un efecto nuevo para el fibrinógeno en su forma soluble (sFbg), el cual contribuye a la activación secuencial de neutrófilos circulantes a través de un

mecanismo dependiente de la molécula CD11b/CD18. Más interesante aún, se demuestra que el sFbg ejerce sus efectos moduladores sólo en PMN previamente *primados* por el proceso de purificación (Haslett *et al.*, 1985) o TNF- α (Rosenbloom *et al.*, 1999). Estos resultados concuerdan con trabajos previos que demuestran que las β_2 integrinas no son capaces de interactuar con sus ligandos fisiológicos en leucocitos sin estimular, un mecanismo de seguridad que controla la respuesta inflamatoria aguda y crónica (Blouin *et al.*, 1999). Se puede hipotetizar que durante un proceso inflamatorio, quimioattractantes, adhesión primaria, o citoquinas *priman* a los PMN en circulación o en sitios extravasculares, no sólo aumentando la expresión del CD11b en su superficie, sino también generando un cambio cualitativo en el mismo (Diamond *et al.*, 1993). De esta manera al expresar epitopes de activación, el CD11b puede unir sus ligandos y el sFbg podría ejercer su acción (*Figura 5.1*). Por otra parte durante la cascada fibrinolítica, el fibrinógeno es rápidamente clivado generando productos de degradación (Handley *et al.*, 1997), limitando la acción del fibrinógeno sobre los neutrófilos. En ese sentido también se describe en este trabajo que el agregado de trombina elimina el efecto del sFbg sobre la activación de los PMN, a pesar de que el sitio de unión al sFbg se mantiene después de la digestión, lo que indica la necesidad de una estructura tridimensional y tal vez la agregación de receptores para generar una señal intracelular.

El hecho de que el sFbg sea capaz de producir sus efectos sólo en presencia de cationes bivalentes sugiere que una integrina es el receptor responsable. Si bien la integrina CD11b/CD18 es el receptor de fibrinógeno predominante en fagocitos (Wright *et al.*, 1988, Altieri *et al.*, 1990) trabajos previos demuestran que el CD11c/CD18 también puede unir fibrinógeno (Loike *et al.*, 1991). En forma coincidente con estos antecedentes el anticuerpo monoclonal anti-CD11b revirtió los efectos del sFbg observados en los PMN, pero no el anticuerpo monoclonal anti-CD11c, indicando que la integrina CD11b es el receptor responsable de dichos efectos.

La movilización de gránulos intracitoplasmáticos, en particular vesículas secretorias y gránulos secundarios, es un evento inflamatorio rápido, secundario a la activación de los PMN. De esta manera la expresión de la molécula CD11b aumenta en cuestión de minutos en respuesta a mediadores inflamatorios como TNF- α , IL-8, C5a, leucotrieno B4 y factor activador de plaquetas (Rosenbloom *et al.*, 1999). La unión de β_2 integrinas en neutrófilos por proteínas de la matriz extracelular o contra-receptores endoteliales dispara la liberación del contenido de los gránulos citoplasmáticos y el selectivo aumento de la expresión de moléculas

de membrana presentes en los gránulos (Mócsai *et al.*, 1991; Niessen *et al.*, 1992). Similarmente la unión del CD11b por el sFbg induce un aumento en la expresión de las moléculas CD11b y CD66b en la superficie de los PMN.

Contrariamente al aumento observado en la expresión del CD11b y el CD66b, el sFbg induce una disminución en la expresión del RFcyIII, mientras que la expresión del RFcyII no se ve modificada. El RFcyIII se encuentra en las vesículas secretorias por lo cual en un primer momento aumenta su expresión, sin embargo luego sufre un clivaje proteolítico lo que explica dicha disminución. En ese sentido diversos trabajos demostraron que agentes proinflamatorios, como FMLP o PMA, disminuyen la expresión del RFcyIII a través de un evento secretorio que involucra el clivaje proteolítico del receptor (Huizinga *et al.*, 1988; Alves-Rosa *et al.*, 1997). Más aún, una concentración elevada en plasma de RFcyIII soluble en pacientes sépticos ha sido asociada con la activación de neutrófilos *in vivo* (Walzog *et al.*, 1997; Müller Kobold *et al.*, 1998).

La capacidad citotóxica es uno de los mecanismos centrales para combatir microorganismos patógenos, la cual se ve representada en los PMN por diferentes funciones como la fagocitosis, la ADCC y la citotoxicidad por CI, que involucran diversos caminos líticos. El sFbg resultó en el aumento de la capacidad citotóxica de los PMN medida a través de las funciones ADCC y fagocitosis. A pesar de que la disminución en la expresión de RFcyIII puede sugerir una disminución en las funciones mediadas por los RFcy, el fibrinógeno indujo un aumento en la ADCC contra células óptimamente sensibilizadas. Siendo la ADCC una reacción que implica el cultivo de las células durante 18 h, el aumento en la misma puede deberse a un menor porcentaje de células apoptóticas, sin embargo se obtuvieron resultados similares al evaluar un ensayo a corto plazo que no implica más de 60 min como es la fagocitosis. Considerando el aumento de dichas funciones por el tratamiento con sFbg, la disminución en la expresión del RFcyIII parece irrelevante. Sin embargo el aumento en la expresión del CD11b podría compensar este efecto contribuyendo al aumento de la fagocitosis y la ADCC en un sistema con células blanco óptimamente sensibilizadas. En ese sentido existen trabajos que proponen que el CD11b podría colaborar con otros receptores como RFcy para mediar numerosas respuestas en PMN como la fagocitosis, la adhesión y la fosforilación en tirosina de proteínas (Kushner *et al.*, 1992; Kusunoki *et al.*, 1994; Tang *et al.*, 1997; Rubel *et al.*, 1999). Por otro lado, la pérdida de RFcyIII puede afectar la capacidad citotóxica de los PMN cuando dicha función es llevada a cabo contra células blanco

subóptimamente sensibilizadas. Estos resultados son concordantes con otros (Kushner *et al.*, 1992; Kusunoki *et al.*, 1994; Tang *et al.*, 1997) que presentan que el RFc γ III, una molécula asociada a glicosilfosfatidilinositol, contribuye a la unión eficiente del ligando a su receptor y a su posterior internalización. La alta densidad de RFc γ III y su rápida movilidad en la membrana favorece la captura de complejos inmunes, mientras que el RFc γ II tiene el papel fundamental en el disparo de la señal citotóxica (Selvary *et al.*, 1988).

Si bien los neutrófilos de sangre periférica tienen una vida media corta ($t_{1/2}$ =6-8h) y sufren un proceso de apoptosis espontánea cuando se las mantiene en cultivo (Payne *et al.*, 1994), es sabido que en focos inflamatorios citoquinas como GM-CSF o IL-6 pueden retardar dicho proceso apoptótico (Brach *et al.*, 1992; Gardner *et al.*, 1996), contribuyendo de esta manera a la defensa del huésped, o en otras circunstancias al daño endotelial. En esta tesis se demuestra que el sFbg retrasa significativamente la apoptosis en PMN evidenciada a través de su morfología, del contenido de DNA y del estado de activación de la caspasa-3. Sin embargo el entrecruzamiento del CD11b con anticuerpos monoclonales anti-CD11b (clon Bear-1) y el fragmento F(ab')₂ genera un aumento en la apoptosis de los PMN. Similarmente con estos resultados pero en contraposición a lo observado para el sFbg diversos autores demostraron que el entrecruzamiento del CD18 con anticuerpos monoclonales resulta en una aceleración del proceso apoptótico (Walzog *et al.*, 1997). Ha sido ampliamente demostrado que la ocupación de integrinas puede vincular varios caminos transduccionales (Rosales *et al.*, 1995). Una posible explicación para estos efectos contrapuestos es que el fibrinógeno y los anticuerpos generen diferentes grados de agregación del CD11b sobre la superficie celular, lo cual induce diferentes señales intracelulares y por lo tanto distintos efectos biológicos.

De esta manera el fibrinógeno puede influenciar el desarrollo y la resolución del foco inflamatorio a través de la regulación de la funcionalidad y la sobrevivencia del neutrófilo. Sin embargo tanto la funcionalidad como la sobrevivencia del mismo no son más que un reflejo del balance de los caminos transduccionales activados.

En esta tesis se demuestra que el sFbg induce en neutrófilos un aumento en la concentración de calcio intracelular, la fosforilación rápida y transiente de al menos dos proteínas en residuos tirosina: la FAK y la MAPK ERK1/2 y la activación del factor de transcripción NF- κ B; y que estas vías transduccionales están involucradas en la modulación de la funcionalidad y sobrevivencia de los PMN (*Figura 5.1*).

La movilización de calcio intracelular es un mecanismo importante en la activación de neutrófilos mediada por receptor. Es sabido que estímulos como el FMLP, leucotrieno B4 o IL-1, inducen la degranulación y el estallido respiratorio, ambas funciones precedidas por un aumento en la $[Ca^{2+}]_i$ (Smith *et al.*, 1987). Más aún, ionóforos de calcio son capaces de inducir la activación de PMN, evaluada por la generación de anión superóxido y degranulación (Korchack *et al.*, 1988). Considerando que el aumento en $[Ca^{2+}]_i$ es una reacción instantánea y que los parámetros fenotípicos se midieron a nivel celular por análisis de citometría de flujo, se pueden excluir eventos de adhesión de fibrinógeno a la superficie de los tubos plásticos e interacciones PMN-PMN con fibrinógeno como puente, como responsables de los efectos observados.

La activación de la MAPK ERK1/2 en PMN a través de la interacción del fibrinógeno con la integrina CD11b/CD18, no había sido demostrada anteriormente. Más aún, las siguientes observaciones indican que la fosforilación y la consecuente activación de la MAPK ERK1/2 por el sFbg, representa un elemento central en sus efectos funcionales: 1) la activación rápida y específica de ERK1/2, luego de la unión de sFbg al CD11b, precede a la degranulación de gránulos secundarios. 2) los inhibidores de proteínas tirosina quinasas y de la familia *Src* inhiben similarmente la fosforilación de la MAPK ERK y la degranulación, fagocitosis y apoptosis. 3) la inhibición directa de la quinasa que fosforila la MAPK ERK1/2 por el compuesto PD98059 inhibe la degranulación así como la fagocitosis y la apoptosis inducida por sFbg.

Por el contrario, no se obtuvo ninguna evidencia de la participación de la MAPK p38 en la respuesta generada por el sFbg, ya que no se observó fosforilación de la MAPK p38, ni inhibición de los efectos inducidos por el sFbg por el inhibidor específico SB203580. Es necesario aclarar que además de la isoforma clásica de la p38 (conocida como p38 α o Proteína Quinasa activada por *stress* 2) existe una nueva isoforma de la MAPK p38, denominada p38 δ (Proteína Quinasa activada por *stress* 4) presente en neutrófilos, la cual es activada por H₂O₂. A diferencia de la p38 α , p38 δ no es sensible al compuesto SB203580. De ahí que los experimentos farmacológicos de inhibición sólo provean información del papel de la isoforma clásica, p38 α (Goedert *et al.*, 1997).

La proteína FAK no es un receptor, pero se asocia con integrinas (Schlaepfer *et al.*, 1997) y participa de la señalización a través de las mismas en células de carcinoma, fibroblastos y plaquetas (Burrige *et al.*, 1992; Longhurst *et al.*, 1998). En este trabajo se

demuestra que la FAK también está involucrada en la señalización intracelular inducida por fibrinógeno en PMN. Debido a que las integrinas carecen de actividad catalítica, la activación de FAK puede ser un evento importante en el proceso de transducción de señales mediado por integrinas. El dominio NH₂ de FAK interactúa con el dominio citoplasmático de las integrinas, proveyendo un medio de activación para FAK luego de la unión por su ligando de integrinas (Burrige *et al.*, 1992). La región COOH terminal de la FAK interactúa con varias proteínas focales de adhesión como paxilina (Hildebrand *et al.*, 1995) y proteínas de la familia *Src* (Longhurst *et al.*, 1998). De esta manera, la interacción de las proteínas de la familia *Src* con FAK, causa la máxima activación de FAK (Hanke *et al.*, 1996). En las condiciones experimentales de este trabajo, la familia *Src* parece participar en los procesos exocíticos inducidos por sFbg ya que su inhibidor específico disminuye significativamente la liberación de gránulos secundarios en respuesta al sFbg, aunque no se observó la fosforilación de ninguna proteína de la familia *Src*. La observación de que el inhibidor de la familia *Src* previno la activación de ERK1/2 posiciona a las proteínas quinasas de la familia *Src* entre el receptor y la MAPK ERK1/2 (Figura 5.1). En forma similar Mócsai y colaboradores (Mócsai *et al.*, 2000) demostraron que en PMN la exocitosis de gránulos primarios y secundarios en respuesta a FMLP involucra un mecanismo dependiente de la MAPK p38 a través de la familia *Src*. En ese sentido Schlaepfer y colaboradores (Schlaepfer *et al.*, 1994) mostraron que la fosforilación de FAK por *Src* permite interactuar a FAK con la vía Ras/MAPK.

Diversos trabajos analizaron la respuesta de PMN adheridos a CD11b y estimulados con diferentes mediadores inflamatorios. Dichos trabajos demostraron la fosforilación de diversas proteínas, la mayoría pertenecientes a la familia *Src* (Fuortes *et al.*, 1993; Yan *et al.*, 1996; Yan *et al.*, 1997; Mócsai *et al.*, 1999; Willeke *et al.*, 2000). Considerando estos antecedentes, se comparó el patrón de fosforilación en respuesta al fibrinógeno en su forma soluble y el inducido por fibrinógeno adherido a placas. Mientras que el fibrinógeno soluble induce principalmente la fosforilación de las dos proteínas FAK y ERK1/2, PMN adheridos a placas recubiertas con Fbg muestran la fosforilación de al menos 10 proteínas de diferente peso molecular, confirmando resultados previos (Fuortes *et al.*, 1993; Yan *et al.*, 1996; Yan *et al.*, 1997; Mócsai *et al.*, 1999). Este patrón de activación diferencial dependiendo de la presentación del ligando se observó en plaquetas (Huang *et al.*, 1993; Shatil *et al.*, 1994; Miyamoto *et al.*, 1995). Una posible interpretación de estas observaciones es que una ocupación y agregación limitada de las integrinas puede generar una respuesta rápida,

mientras que la agregación de integrinas por ligandos inmovilizados lleva a disparar caminos transduccionales más complejos (Miyamoto *et al.*, 1995).

Cuando se analizó la participación de los diferentes caminos intracelulares en la funcionalidad de las PMN se observó que no todas las funciones inducidas por el sFbg estaban mediadas por los mismos caminos transduccionales. Mientras que la actividad tirosina quinasa y MAPK constituyen un evento central en la cascada de señalización que lleva a la degranulación de gránulos secundarios, éstas no están involucradas en la liberación de vesículas secretorias en respuesta al sFbg (*Figura 5.1*). En forma similar Mócsai y colaboradores (Mócsai *et al.*, 2000) y Capodici y colaboradores (Capodici *et al.*, 1998) demostraron que la degranulación de vesículas secretorias en respuesta a FMLP es independiente de la fosforilación de proteínas en residuos tirosina y de la activación de la fosfatidil-inositol 3 quinasa (PI-3K), respectivamente. Estos resultados sugieren que otras señales intracelulares tempranas y simultáneas deben estar implicadas en la movilización de vesículas secretorias. Se necesitarán experimentos complementarios para definir por ejemplo, el papel de la movilización de calcio inducida por sFbg en la exocitosis de vesículas secretorias. Con respecto al aumento de la fagocitosis dependiente de RFc γ por sFbg, en el mismo está involucrada la activación de ERK. En forma similar, Downey y colaboradores (Downey *et al.*, 1998) demostraron que la inhibición de ERK en PMN inhibe la fagocitosis de zymosan opsonizado sin afectar la capacidad de unión. Además, un trabajo reciente muestra que es necesaria la activación de ERK para la polimerización de actina en PMN en respuesta al entrecruzamiento de RsFc γ (Coxon *et al.*, 2000).

Durante el proceso apoptótico de los PMN, la activación de las caspasas juega un papel determinante regulando la proteólisis selectiva de proteínas internas de la célula que culmina en la condensación nuclear y citoplasmática y en la fragmentación del DNA (Alnemri *et al.*, 1996). En este trabajo se demuestra que el sFbg retrasa significativamente la apoptosis en PMN inhibiendo la activación de la caspasa 3. A su vez, la actividad de las caspasas está regulada por distintos componentes de la cascada de las MAPquinasas (Shiguekazu, 2000). En distintos tipos celulares, se ha descrito que la MAPK ERK1/2 está involucrada en señales de supervivencia celular y prevención o retardo de la apoptosis (Waterman *et al.*, 1995, Cuvillier *et al.*, 1996, Frasch *et al.*, 1998). A través de este trabajo, se demuestra que el sFbg activa la MAPK ERK1/2, y que su inhibidor específico revierte el efecto del sFbg sobre la apoptosis, sugiriendo que en neutrófilos, la activación de ERK lleva a una extensión en su

vida media. Sin embargo el proceso apoptótico es complejo e involucra la inducción de genes. Si bien el papel del NF- κ B en la regulación de la apoptosis no presenta todavía un panorama claro, existen numerosos ejemplos que lo muestran como un factor con efectos anti-apoptóticos: ratones que carecen de la subunidad p65 del NF- κ B mueren durante el desarrollo embrionario como resultado de una masiva muerte de células hepáticas por apoptosis (Beg *et al.*, 1995). Uno de los eventos intracelulares más importantes para la activación del NF- κ B es la fosforilación, poliubiquitinación y clivaje proteolítico de las proteínas inhibitorias I κ B- α por el proteosoma (Griscavage *et al.*, 1996; Karin *et al.*, 2000). A pesar de que Sitrin y colaboradores (Sitrin *et al.*, 1998) demostraron que el fibrinógeno activa el NF- κ B en una línea celular monocítica U937 y Rezzonico y colaboradores (Rezzonico *et al.*, 2001) observaron que el entrecruzamiento del CD11b por anticuerpos monoclonales en monocitos humanos no adherentes dispara la activación de dicho factor, los resultados presentados en este trabajo son los primeros en demostrar que la estimulación de neutrófilos humanos con sFbg induce la degradación de I κ B- α y la activación del NF- κ B a través de la β_2 integrina CD11b. La actividad del NF- κ B inducida por el sFbg consiste en homodímeros p50/p50 y en heterodímeros p65/p50, similar a lo observado por Vancurova y colaboradores (Vancurova *et al.*, 2001) en PMN estimulados con TNF- α . Cuando se utilizaron inhibidores del proteosoma los efectos protectores del sFbg sobre la apoptosis de neutrófilos se vieron bloqueados. Estos resultados sugieren que la actividad del NF- κ B media dicha función. Es importante aclarar que ninguno de los inhibidores utilizados indujo muerte celular por sí solo, sugiriendo que el control de la apoptosis espontánea en PMN no es mediada por el factor NF- κ B.

Se puede descartar la posibilidad de que una contaminación con endotoxinas contribuya a la activación del NF- κ B por sFbg ya que el agregado de polimixina B, el cual se une al LPS y lo neutraliza (Duff *et al.*, 1982) no reduce los efectos del sFbg pero si bloquea la respuesta a LPS.

Durante los últimos años diversos estudios demostraron que la cascada de MAPK contribuye a la transmisión de señales extracelulares que resultan en la fosforilación directa o indirecta de varios factores de transcripción y en la alteración de la expresión génica (Treisman *et al.*, 1996). En ese sentido Berghe y colaboradores (Berghe *et al.*, 1998) demostraron la participación de la cascada de p38 y ERK1/2 en la activación del NF- κ B en respuesta a TNF- α . Además MEKK-1, MEKK-2 y MEKK-3 pueden activar la quinasa que

fosforila I κ B α y de esa manera jugar un papel en el camino anti-apoptótico del NF- κ B (Karin *et al.*, 2000). En ese sentido la inhibición selectiva de la ERK1/2 es suficiente para contrarrestar los efectos del sFbg sobre la activación de caspasa 3, degradación de I κ B y translocación de NF- κ B al núcleo, sugiriendo que la no fosforilación de ERK reduce notablemente la concatenación de señales que permiten la completa activación del NF- κ B en respuesta al sFbg. La participación de la familia *Src* en los efectos mediados por sFbg no son absolutamente claros, ya que el inhibidor de dicha familia reduce parcialmente los efectos del sFbg sobre la activación de caspasa 3, en forma similar a lo observado sobre la fagocitosis y degranulación inducidas por sFbg, sin embargo no afecta la degradación de I κ B y la translocación del NF- κ B al núcleo. Se puede especular que la familia *Src* puede interactuar con otros componentes de la cascada de señalización que generen señales anti-apoptóticas independientes de la activación de NF- κ B.

La línea celular mieloide humana HL-60, caracterizada originalmente como células promielocíticas, representan un modelo apropiado para el estudio de proliferación de células mieloides, diferenciación y regulación de mecanismos intracelulares. Dichas células se pueden diferenciar a granulocitos o monocitos/macrófagos dependiendo del estímulo agregado (Kozibik *et al.*, 1997). Específicamente, el tratamiento con DMSO favorece la diferenciación a granulocitos con un aumento en la expresión de la molécula CD11b, receptor de sFbg. Los resultados obtenidos en PMN se reprodujeron completamente en células HL-60 diferenciadas con DMSO confirmando que el sFbg induce la activación del NF- κ B a través de la interacción con el CD11b, y que dicha activación está involucrada en el retraso de la apoptosis producido por sFbg. La baja expresión basal de NF- κ B en esta línea celular, combinado con un fenotipo diferenciado (expresión relativamente alta de integrinas) y la preservación de una respuesta a la subsiguiente estimulación (fibrinógeno/Mn²⁺), hace de este un modelo altamente atractivo para el estudio de efecto de integrinas en la expresión génica en PMN.

En conclusión, las integrinas son responsables de la adhesión y migración de neutrófilos al sitio inflamatorio, pero además contribuyen al proceso de señalización intracelular. Estas señales proveen la información necesaria para determinar una respuesta biológica: proliferativa, citotóxica, de supervivencia, o de muerte celular. Alteraciones en dichos mecanismos de transducción de señales pueden causar profundos cambios en el comportamiento celular, pudiendo desencadenar procesos patológicos variados como el

cáncer, procesos inflamatorios, asma, enfermedades cardiovasculares, etc. La identificación y caracterización de las moléculas que participan en el proceso de transmisión de señales probablemente permita identificar potenciales blancos de intervención terapéutica y por consiguiente la posibilidad de modular e influenciar los procesos fisiopatológicos.

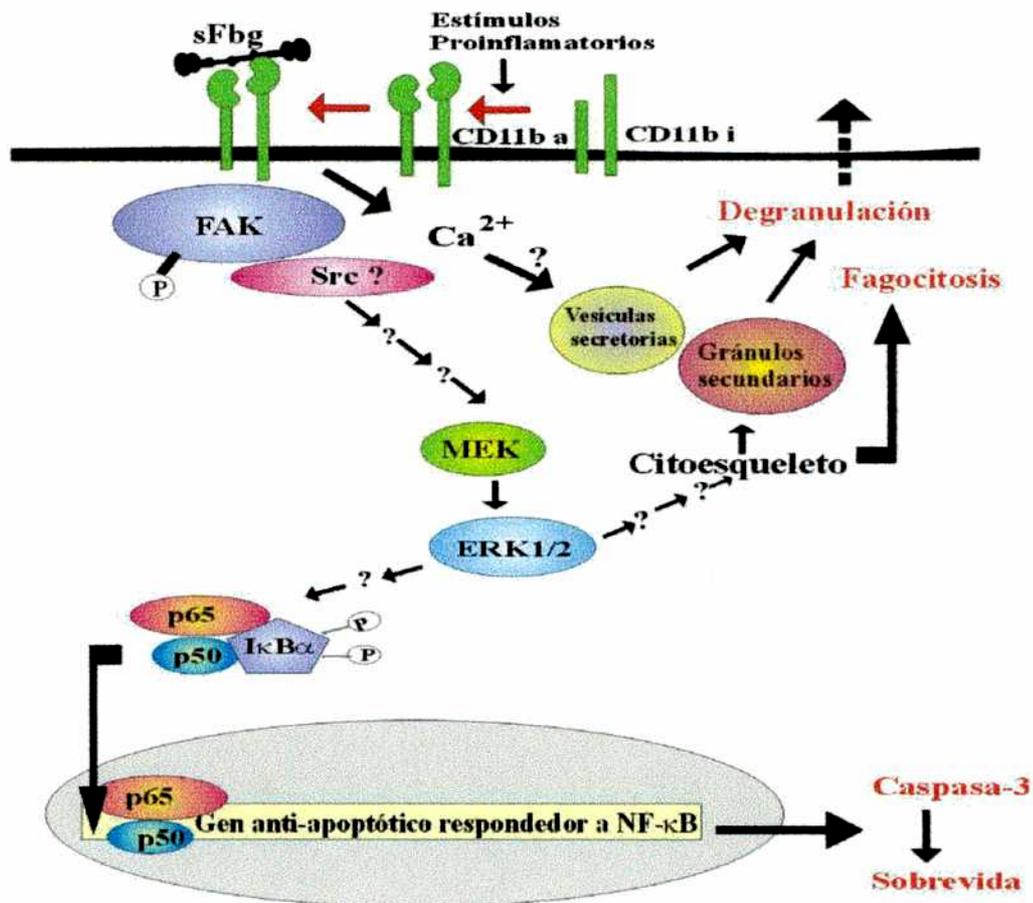


Figura 5.1. Modelo propuesto para la acción del fibrinógeno soluble sobre los neutrófilos humanos a través de la molécula de adhesión CD11b/CD18. En un proceso inflamatorio, estímulos generados en el mismo inducen la activación de la integrina CD11b, permitiendo la unión del fibrinógeno. Esto lleva al reclutamiento de diferentes proteínas incluyendo la FAK, la cual se fosforila y activa tal vez generando una respuesta máxima vía proteínas de la familia Src. Esto lleva a la fosforilación de la MAPK ERK1/2 lo que regula la degranulación de gránulos secundarios, un aumento de la fagocitosis y un retraso en la apoptosis en respuesta al sFbg. Además el sFbg induce la translocación del factor de transcripción NF- κ B vía la MAPK ERK1/2 al núcleo el cual también está involucrado en la modulación del proceso apoptótico. Por otro lado la unión del sFbg a la integrina CD11b produce un aumento en la $[Ca^{2+}]_i$, el cual podría participar de la regulación de la exocitosis de vesículas secretorias.

Carolina Rubel
CAROLINA RUBEL

Marina Pizarro
MARINA PIZARRO

6. Referencias

- ✓ Afford, S.C., Pongracz, J., Stockley, R.A., Croker, J., Burnett D. (1992). *J. Biol. Chem.* **267**:21612.
- ✓ Akgul, C., Moulding, D.A., Edwards, S.W. (2001). *FEBS Letters* **487**: 318.
- ✓ Akiyama, T., Ishida, J., Nagakawa, S., Ogawara, H., Watanabe, S., Itoh, N., Shibuya, M., Fukami Y. (1987). *J. Biol. Chem.* **262**:5592.
- ✓ Alessi, D.R., Cuenda, A., Cohen, P., Dudley, D.T., Saltiel, A.R.. (1996). *J. Biol. Chem.* **270**:27489.
- ✓ Alnemri, E.S., Livingston, D.J., Nicholson, D.W., Slavesen, G., Thornberry, N.A., Wong, W.W., Ynan, J. (1996). *Cell* **87**: 171.
- ✓ Altieri, D.C., Agbanyo, F.R., Plescia, J., Ginsberg, M.H., Edgington, T.S., Plow, E.F. (1990). *J. Biol. Chem.* **265**:12119.
- ✓ Alves-Rosa, F., Vulcano, M., Minnucci, F.S., di Gianni, P., Isturiz, M.A. (1997). *Clin. Immunol. Immunopathol.* **83**:147.
- ✓ Annenkov, A., Ortlepp, S., Hogg, N.(1996). *Eur.J.Immunol.* **26**:207.
- ✓ Avrameas S., Terny, T. (1969). *Immunochemistry* **6**:53.
- ✓ Babior, B. (1992) *Advances in Enzymology* **65**: 49.
- ✓ Baeuerle, P.A., Henkel, T. (1994). *Annu.Rev.Immunol.* **12**: 141.
- ✓ Baldwin, A. (1996). *Annu.Rev.Immunol.* **14**: 649.
- ✓ Beg, A.A, Sha, W.C., Bronson, R.T., Ghosh, S., Baltimore, D. (1995). *Nature* **376**: 167.
- ✓ Berghe, W.V., Pllaisance, S., Boone, E., De Bosscher, K., Schmitz, M.L., Fiers, W., and Haegeman, G. (1998). *J.Biol.Chem.* **273**: 3285.
- ✓ Berliner, S., Fuchs, J., Seligsohn, V., Kariv, N., Hazaz, B., Rotemberg, Z., Weinberger, I., Agmon, J. Pinkhas J., Aronson M. (1987). *Tromb. Haemost.* **58**: 749.
- ✓ Berton G., Fumagalli, L., Laudanna C., Sorio C. (1994). *J. Cell. Biol.* **126**: 1111.
- ✓ Bevilacqua, M.P., Nelson, R.M., Mannori, G., Cecconi, O.L. (1994). *Annu.Rev.Med.* **45**:361.
- ✓ Blouin, E., Halbwachs-Mecarelli L., Rieu, P. (1999). *Eur. J. Immunol.* **29**:3419.
- ✓ Bogomolski-Yahalom, V., Matzner, Y.(1995). *Blood Reviews* **9**: 183.
- ✓ Borregaard, N., Cowland, J.B. (1997). *Blood* **89**:3503.
- ✓ Borregaard, N., Lollike, K., Kjelsen, L., Sengeløv, H., Bastholm, L., Nielsen, MH., Bainton, D.F. (1993). *Eur J. Haematol.* **51**:187.
- ✓ Boyum, A. (1968). *Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl.* **97**: 7.

- ✓ Brach, M., deVos, S., Gruss, H., Herrmann, F. (1992). *Blood* **80**: 2920.
- ✓ Burridge, K., Fath, K., Kelly, T., Nuckolls, G., Turner C. (1988). *Annu. Rev. Cell. Biol.* **4**:487.
- ✓ Burridge, K., Turner, C.E., Romer, L.H.. (1992). *J. Cell. Biol.* **118**:893.
- ✓ Caamaño, J. (2000). En *Farmacología Molecular* pp291. Ed Universidad Nacional de Quilmes.
- ✓ Cahill, R.N.P., Poskitt, D.C., Hay, J.B., Heron, Y., Trnka, Z. (1979). *Eur.J.Immunol.* **9**:251.
- ✓ Calalb, M.B., Zhang, X., Polte, T.R., Hanks, S.K. (1996). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **228**:662.
- ✓ Capodici, C., Hanft, S., Feoktistov, M., Pillinger, M.H. (1998). *J. Immunol.* **160**:1901.
- ✓ Carlos, T.M., Harlan, J.M. (1994). *Blood* **84**:2068.
- ✓ Cassatella, M.A., Bazzoni, F., Ceska, M., Ferro, I., Baggiolini, M., Berton, G.(1992). *J.Immunol.* **148**: 3216.
- ✓ Clarck, E.A., Brugge, J.S.(1995). *Science* **268**:233.
- ✓ Clemetson, K.J. (1998). *Cell.Mol.Life Sci.* **54**:499.
- ✓ Colotta, F., Re, F., Polentarutti, N., Sozzani S., Mantovani A. (1992). *Blood* **80**:2012.
- ✓ Collins, S.J. (1987). *Blood* **70**: 1233.
- ✓ Cox, G., Gauldie, J., Jordana, M. (1992). *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **7**:507.
- ✓ Coxon, A., Tang, T., Mayadas, T.N. (1999). *J.Exp.Med.* **190**: 923.
- ✓ Coxon, P.Y., Rane, M.J., Powell, D.W., Klein, J.B., McLeish, K.R. (2000). *J. Immunol* **164**:6530.
- ✓ Crockett-Torabi, E., Fantone, J.C. (1995) *Immunologic Research* **14**: 237.
- ✓ Cuenda, A., Rouse, J., Doza, Y. N., Meier, R., Cohen, P., Gallagher, T.F., Young, P.R., Lee, J.C. (1995). *FEBS Lett.* **364**:229.
- ✓ Cuvillier, O., Pirianov, G., Bleuser, B., Vanck, P.G., Coso, O.A., Gutkind, S., Spiegel, S. (1996). *Nature* **381**:800.
- ✓ Däeron, M. (1997). *Annu. Rev. Immunol.* **15**:203.
- ✓ Detmers, P.A., Zhou, D., Powell, D.E.(1994) *J.Immunol.* **153**: 2137.
- ✓ Diamond, M.S., Springer, T.A. (1993). *J.Cell Biol.* **120**:454.
- ✓ Doolittle, R.F. (1973). *Adv.Protein.Chem.* **27**:1.
- ✓ Downey, G.P., Butler, J.R., Tapper, H., Fialkow, L., Saitiel, A.R., Rubin B.B.,

- Grinstein, S. (1998). *J. Immunol.* **160**:434.
- ✓ Duff, G.W., Atkins E. (1982). *J. Immunol. Methods.* **52**: 333.
 - ✓ Dustin, M.L., Rothelein, R., Bhan, A.K., Dinarello, C.A., Springer, T.A. (1986). *J. Immunol* **137**: 245.
 - ✓ 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. Raven Press, New York.
 - ✓ Evangelista, V., Manarini, S., Sideri, R., Rotondo, S., Martelli, N., Piccoli, A., Totani, L., Piccardoni, P., Vestweber, D., de Gaetano, G., Cerletti, C. (1999). *Blood* **93**:876.
 - ✓ Fan, S.T, Edgington, T.S. (1991). *J. Clin. Invest.* **87**:50.
 - ✓ Fan, S.T., Edgington, T.S. (1993). *J. Immunol.* **150**:2972.
 - ✓ Fanger, M.W., Shen, L., Graziano, R.F., Guyre, P.M. (1989). *Immunol. Today* **10**: 92.
 - ✓ Fava, R.A., Olsen, N.J., Postlethwaite, A.E., Broadley, K.N., Davidson, J.M., Nanney, L.B., Lucas, C., Townes, A.S.(1993) *J.Exp. Med.* **173**: 1121.
 - ✓ Fernandez, R., Suchard, S.J. (1998). *J. Immunol.* **160**:5154.
 - ✓ Finbloom, D.S. (1985). *Clin. Immunol. Immunophatol.* **36**: 275.
 - ✓ Frasch, S.C., Nick, J.A., Fadok, V.A., Bratton, D.L., Worthen, G.S., Henson P.M. (1998). *J. Biol. Chem.* **273**:8389.
 - ✓ Fredreck, M., Pavalko, F.M., La Roche, S.M. (1993) *J.Immunol.* **151**:3795.
 - ✓ Fridman, W.H., Bonnerot, C., Daéron, M., Amigorena, S., Teillud, J.L. 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., Raffin, T.A. (1993) *J.Cell. Physiol.* **154**: 478.
 - ✓ Fuortes, M., Jin, W-W., Nathan C. (1993). *J. Cell. Biol.* **120**:777.
 - ✓ García Bermejo, M.L., Kasanietz, M.G. (2000). En *Farmacología Molecular* pp325. Ed Universidad Nacional de Quilmes.
 - ✓ Gardner, A. M., Johnson, G.L. (1996). *J. Biol.Chem.* **271**: 14560.
 - ✓ Geffner, J.R, Giordano, M., Palermo M.S, Prat, A., Serebrinsky, G., Isturiz, M.A. (1987). *Clin.Exp.Immunol.* **69**: 668.
 - ✓ Ghosh S., May, M.J. Koop, E.B. (1998). *Annu. Rev. Immunol.* **16**:225.
 - ✓ Goedert, M., Cuenda, A., Craxton, M., Jakes, R., Cohen, P. (1997). *EMBO J.* **16**:3563.

- ✓ Graham, I.L., Gresham, H.D., Brown, E.J.(1989). *J. Immunol.* **142**:2352.
- ✓ Graziano, R.F., Fanger, M.W. (1987). *J. Immunol.* **138**: 945.
- ✓ Gresham, H.D, Mc Garr, J.A, Shackelford, G., Brown, W.J. (1988). *J. Clin. Invest.* **82**:1192.
- ✓ Gresham, H.D., Clement, L.T., Lehmeyer, J.E., Griffin, F.M., Volañaski, J.E. (1986). *J. Immunol.* **137**: 868.
- ✓ Gresham, J.A., McGarr, P.G., Shackelford, P.G., Brown, E.J. (1988). *J. Clin. Invest.* **82**:1192.
- ✓ Griscavage, J.M., Wilk, S., Ignarro, L.J. (1996). *Proc. Natl.Acad.Sci. USA.* **93**: 3308.
- ✓ Gross, T. J., Leavell, K.J., Peterson, M.W.. (1997). *Thromb. Res.* **77**:894.
- ✓ Gustafson, E.J., Lukasiewicz, H., Wachfogel, H.T., Norton, K.J., Schmaier, A.H., Niewiarowski, S., Colman, R.W. (1989). *J. Cell. Biol.* **109**:377.
- ✓ Gutkind, J.S., Robbins, K.C. (1989). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **86**:8783.
- ✓ Handley, D.A., Hughes, T.E. (1997). *Thromb. Res.* **87**:1.
- ✓ Hanke, J.H., Gardner, J.P., Dow, R.L., Changelian, S., Brissette, W.H., Weringer, E.J., Pollok, B.A., Connelly, P.A. (1996). *J. Biol. Chem.* **271**:695.
- ✓ Haslett, C. (1992). *Clin. Sci.* **83**:639.
- ✓ Haslett, C., Guthrie, L.A., Kopniak, M.M., Johnston, R.B., Henson, P.M. (1985). *Am. J. Pathol.* **119**:101.
- ✓ Haziot, A., Tsuberi, B.Z., Goyert, S.M.(1993). *Immunol.* **150**: 5556.
- ✓ Hildebrand, J.D., Schaller, M.D., Parsons, J.T. (1995). *Mol. Biol. Cell.* **6**:637.
- ✓ Hirano, M., Osada, S., Aoki, T., Hirai, S., Hosaka, M., Inoue, J., Ohno, S. (1996). *J. Biol. Chem.* **271**:13234.
- ✓ Hirsch, J.G., Cohn, Z.A. (1960). *J. Exp. Med.* **112**: 1005.
- ✓ Huang, M.M., Lipfert, L., Cunningham, M., Brugge, J.S., Ginsberg, M.H., Shattil, S.J. (1993). *J. Cell. Biol.* **122**:473.
- ✓ Huizinga, T.W.J., Dolman, K.M, van der Linden, N.J., Kleijer, M., Nuijens, J.H., von dem Borne, A.E.G.Kr., Roos, D. (1990). *J.Immunol.* **144**: 14332.
- ✓ Huizinga, T.W.J., van der Schoo, C.E., Jost, C., Klaassen, R., Kleijer, M., von dem Borne, A.E.G.Kr., Roos, D., Tetteroo, P.A.T.(1988). *Nature (Lond.)* **333**:667.
- ✓ Hynes, R.O. (1992). *Cell.* **69**:11.

- ✓ Isturiz M.A., Giordano, M. (1990). En: Inmunología e Inmunoquímica 4ta Edición. pp: 284. Ed: Margni RA. Ed Panamericana.
- ✓ Jaconi, M.E.E., Theler, J.M., Schlegel, W., Appel, R.D., Wright, S.D., Lew, P.D.(1991). *J. Cell. Biol.* **112**:1249.
- ✓ Karin, M., Ben-Neriah, Y. (2000). *Annu.Rev.Immunol.* **18**: 621.
- ✓ Karpovsky, B., Titus, J.A., Stephany, D.A., Segal, D.M. (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.
- ✓ Kazura, J.W., Wenger, J.D., Salata, R.A., Budzynski, A.Z., Goldsmith, G.H. (1989). *J.Clin.Invest.* **83**:1916.
- ✓ Keely, P., Parise, L., Juliano,R.(1998). *Trends in Cell.Biol.* **8**:101.
- ✓ Key, M.E., Haskill, S. (1983). En: Macrophage mediated ADCC.pp:237. Ed. Koren, H.S.Marcel Dekker, Inc.
- ✓ Klebanoff, S.J (1975). *Semin Hematol.* **12**, 1717. En the Phagocytic Cell in Hoss Resistance, eds JA Bellanti, DH Dayton New York. Raven presss.
- ✓ Korchack, H.M., Vossball, L.B., Haines, K.A., Wilkenfeld, C., Lundquist, K.F., Weissman G. (1988). *J. Biol. Chem.* **263**:11098.
- ✓ Kozubík, A., Hofmanová, J., Dusek, L., Musilová, E. (1997). *J.Leukoc.Biol* **62**: 240.
- ✓ Kushner, B. H., Cheung, V. (1992). *Blood* **79**:1484.
- ✓ Kusunoki, T., Tsuruta, S., Higashi, H., Hosoi, S., Hata, D., Sugie, K., Mayumi, M., Mikawa, H. (1994). *J. Leuk Biol.* **55**:735.
- ✓ Larsen, G.L., Henson, P.M. (1983). *Ann. Rev. Immunol.* **1**: 335.
- ✓ Lee, A., Whyte, M.K.B., Haslett, C.(1993). *J. Leuk Biol.* **54**:283.
- ✓ Lew, P.D., Wollheim, C., Waldvogel, F.A., Pozzan, T. (1984). *J. Cell Biology.* **99**: 1212.
- ✓ Loike, J., Sodeik, B., Cao, L., Leueona, S., Weitz, J., Detmers, P., Wright, S., Silverstein, S. (1991). *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* **88**:1044.
- ✓ Longhurst, C.M., Jennings, L.K. (1998). *Cell. Mol. Life Sci.* **54**:514.
- ✓ Lowe, G.O.D., Fowkes, F.G.R., Dawes, J., Donnan, P.T., Lennie, S.E., Biol, M.I., Housley E. (1993). *Circulation* **87**:1915.
- ✓ Lowell C. A., Furnagalli, L., Berton, G. (1996). *J. Cell. Biol.* **133**:895.

- ✓ Loyd, A.R., Oppenheim, J.J. (1992). *Immunol. Today* **13**: 169.
- ✓ Madjic O. 1989. En *Leucocyte typing IV*. p. 582. W. Knapp B. Dörken, W. R. Gilks, E. P. Rieber, R. E. Schmidt, H. Stein., A. E. G. K von dem Borne. Oxford University Press, Oxford.
- ✓ Malyak, M., Smith, M.F., Abel, A.A., Arend, W.P. (1994). *J.Clin. Immunol.* **14**: 20.
- ✓ McDonald, P.P., Bald, A., Cassatella, M.A. (1997). *Blood* **89**: 3421.
- ✓ McLeish, K.R., Knall, C., Ward, R.A., Gerwins, P., Coxon, P.Y., Klein, J.B., Johnson J. (1998). *J. Leukocyte Biol.* **64**:537.
- ✓ 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.
- ✓ Michel, J. Unkeless, J.C., Pieczonka, M.M., Silverstein, S.C. (1983). *J. Exp. Med.* **157**: 1746.
- ✓ Miyamoto, S., Teramoto, H., Coso, O.A., Gutkind, J.S., Burbelo, P.D., Akiyama, S.K., Yamada, K.M. (1995). *J. Cell. Biol.* **131**:791.
- ✓ Mócsai, A., Jakus, Z., Vántus, T., Berton, G., Lowell, C.A., Ligeti, E.. (2000). *J. Immunol.* **164**:4321.
- ✓ Mócsai, A., Ligeti, E., Lowell, C.A., Berton, G. (1999). *J. Immunol.* **162**:1120.
- ✓ Müller Kobold, A.C., Zijlstra, J.G., Koene, H.R., de Haas, M., Kallenberg, C.G.M., Cohen Tervaert J.W. (1998). *Clin. Exp. Immunol.* **114**:220.
- ✓ Nathan, C.F. (1982): En: *Macrophage-mediated antibody-dependent cellular cytotoxicity*, edited by HS Koren. Plenum Press, New York
- ✓ Nick, J.A., Avdi, N.J., Gerwins, P., Johnson, G.L., Worthen, G.S. (1996). *J. Immunol.* **156**:4867.
- ✓ Nick, J.A., Avdi, N.J., Young, S.K., Knall, C., Gerwins, P., Johnson, G.L., Worthen, G.S. (1997). *J. Clin. Invest.* **99**:975.
- ✓ Nicoletti, I., Magliorati, G., Pagliacci, M.C., Grgnani, F., Ricciardi, C. (1991). *J. Immunol. Methods.* **139**:27.
- ✓ Niessen, H.W., Verhoeven, A.J. (1992). *Cell. Signal* **4**:501.
- ✓ Payne, C.M., Glasser, L., Tischler, M.E., Wyckoff, D., Cromey, D., Fiederlein, R., Bohnert, O. (1994). *Microsc. Res. Tech.* **28**:327.

- ✓ Payne, D.M., Rossomando, A.J., Martino, P., Erikson, A.K., Her, J.H., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., Weber, M.J., Sturgill, T.W. (1991). *EMBO J.* 10:85.
- ✓ Peerschke, E.L., Zucker, M.G., Grant, R.A., Egan, J.J., Johnson, M.M. (1980). *Blood* 55:84.
- ✓ Perez, R., Roman, J. (1991). *J. Immunol.* 154:1879.
- ✓ Petersen, M., Williams, J.D., Hallet, M.B. (1993). *Immunol.* 80:157.
- ✓ Petty, H.R., Todd III, R.F. (1996). *Immuno. Today* 17: 209.
- ✓ Powell, W.S., MacLeod, R.J., Gravel, S., Gravelle, F., Bhakar A. (1996). *J. Immunol.* 156: 336.
- ✓ Rane, M.J., Carrithers, S.L., Arthur, J.M., Klein, J.B., McLeish, K.R. (1997). *J. Immunol.* 159:5070.
- ✓ Ravetch, J.V. (1994). *Cell.* 78: 553.
- ✓ Rezzonico, R., Imbert, V., Chicheportiche, R., Dayer, J-M. (2001). *Blood* 97: 2932.
- ✓ Rosales, C., Brown, E.J. (1993). En: The natural Immunes System. The neutrophil. pp: 23. De Abramson JSA and J. Gary Wheeler. IRL Press Oxford University Press.
- ✓ Rosales, C., Juliano, R. (1995). *J. Leukocyte Biol.* 57:189.
- ✓ Rosenbloom, A.J., Pinsky, M.R., Napolitano, C., Nguyen, T-S., Levann, D., Pencosky, N., Dorrance, A., Ray, B.K., Whitejide T. (1999). *J. Leukoc. Biol.* 65: 83.
- ✓ Rossi, F. (1986). *Biochimica et Biophysica Acta* 65: 89.
- ✓ Rotrosen, D., Gallin, J.I., Spiegel, A.M., Malech, H.L. (1988). *J. Biol. Chem.* 263: 10958.
- ✓ Rotrosen, D., Yeung, C.L. Leto, T.L., Malech, H.L., Kwon, C.H. (1992). *Science* 256: 1459.
- ✓ Rubel, C., Miliari de Marval, P., Vermeulen, M., Isturiz M.A., Palermo, M.S. (1999). *Immunology* 97:429.
- ✓ Sato M., Nakamura, T., Koyama, J. (1987). *FASEB letters* 224:29.
- ✓ Schlaepfer, D.D., Hanks, S.K., Hunter, T., van der Geer, P. (1994). *Nature* 372:786.
- ✓ Schlaepfer, D.D., Hunter, T. (1997). *J. Biol. Chem.* 272:13189.
- ✓ Sehgal, A.W. (1996) *Molecular Medicine Today* 3: 129.
- ✓ Selvary, P., Rosse, W.F., Silber, R., Springer, T.A. (1988). *Nature* 333:565.

- ✓ Sen R., Baltimore, D. (1986). *Cell* **446**: 705.
- ✓ Sengeløv, H., Kjeldsen, L., Borregaard, N. (1993). *J. Immunol.* **15**: 1535.
- ✓ Shattil, S.J., Ginsberg, M.H., Brugge, J.S. (1994). *Curr. Opin. Cell. Biol.* **6**:695.
- ✓ Shiguekazu N. (2000). *Exp.Cell Research* **256**:12.
- ✓ Sigal, J., Ron, L.(1994) En: Immunology and Inflammation. Mechanism and clinical consequences.
- ✓ Sitrin, R.G., Pan, P.M., Srikanth, S., Todd III, R.F. (1998). *J. Immunol.* **161**:1462.
- ✓ Skogen, W.F., Senior, R.M., Griffin, G.L., Wilner, G.D. (1988). *Blood* **71**:1475.
- ✓ Smith, R.J., Epps, D.E., Justen, J.M., Sam, L.M., Wynalda, F., Fitzpatrick, A., Yein, F.S. (1987). *Biochem Pharmacol* **36**:3851.
- ✓ Springer, T.A.(1990). *Nature* **346**: 425.
- ✓ Springer,T.A.(1995). *Annu.Rev.Physio.* **57**:827.
- ✓ Stockl, J., Madjic, O., Pickl, W.F., Rosenkranz, A., Prager, E., Gschwantler, E., Knapp,W.(1995). *J.Immunol.* **154**:5452.
- ✓ Takeda, Y., Watanabe, H., Yonehara, S., Yamashita, T., Saito S., Sento F. (1993). *Int. Immunol.* **5**:691.
- ✓ Tang, T., Rosenkrany, A., Assmann, K.J.M., Goodman, M.J., Gutierrez-Ramos, J.C., Carroll, M.C., Cotran, R.S., Mayadas, T.N. (1997). *J. Exp. Med.* **186**:1853.
- ✓ Tosi, M.F., Zakem, H (1992). *J. Clin. Invest.* **90**:462.
- ✓ Treisman, R. (1996). *Curr.Opin. Cell.Biol.* **8**: 205.
- ✓ Uehara, Y., K. Fukazawa. (1991). *Methods Enzymol.* **201**:370.
- ✓ Vancurova, I., Miskolci, V., Davidson, D. (2001). *J. Biol. Chem.* **276**: 19746.
- ✓ Verhoef J., Visser, M.R. (1993) En: The natural Immune system.The neutrophil. pp: 110. Edited by JSA Abramsom and JG Wheeler . J. Oxford University Press Inc, Nueva York.
- ✓ Walhl, S.M., Feldman, G.M., McCarthy, J.B.(1996). *J.Leuk.Biol.* **59**:789.
- ✓ Walzog, B., Jeblonski, F., Zakrzewicz, A., Gaehtgens, P. (1997). *FASEB J.* **11**:1117.
- ✓ Wallace, P.K., Howell, A.L., Fanger, M.W. (1994). *J. Leukocyte Biol.* **55**: 816.
- ✓ Waterman, W.H., Sha'afi, R.I. (1995). *Biochem. J.* **307**:39.
- ✓ Watson, R.W.G., Redmond, H.P, Wang, J.H., Condron, C., Bouchier-Hays, D. (1996). *J. Immunol.* **156**:39.

6. Referencias

- ✓ Whyte, M.K.B., Hardwick, S.J., Meagher, L.C., Savill, J.S., Haslett, C. (1993). *J. Clin. Invest.* **92**:446.
- ✓ Whyte, M.K.B., Meagher, L.C., Mc.Dermot, J., Haslett C. (1993). *J.Immunol.* **150**: 5124.
- ✓ Willeke, T., Behrens, S., Scharffetter-Kochanek, K., Gaehtgens, P., Walzog B. (2000). *J. Leuk. Biol.* **68**:284.
- ✓ Worth, R.G., Mayo-Bond, L., van de Winkel, J.G.J., Todd III, R.F., Petty, H.R.(1996). *J.Immunol.* **157**:5660.
- ✓ Wright, S., Weitz, J., Huang, A., Levin, S., Silverstein, S., Loike, J. (1988). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**:7734.
- ✓ Wright, S.D., Rao, P.E., Van Voorhis, W.C., Craigmyle, L.S., Lida, K., Talle, M.A., Westberg, E.F., Goldstein, G.W., Silverstein, S.C. (1983). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**:5699.
- ✓ Yamashita, K., Takahaashi, A., Kobayashi, S., Hirata, H., Mesner, P.W., Kaufmann, S.H., Yonehara, S., Yamamoto, K., Uchiyama, T., Sasada, M. (1999). *Blood* **93**: 674.
- ✓ Yan, S.R., Berton, G. (1996). *J. Biol. Chem.* **271**:23464.
- ✓ Yan, S.R., Huang, M., Berton, G. (1997). *J. Immunol.* **158**: 1902.
- ✓ Zhou, M., Brown, E.J. (1994). *J. Cell Biol.* **125**: 1407.
- ✓ Zhou, M., Todd III, R.F., van de Winkel, J.G.J., Petty, H.R.(1993). *J.Immunol.* **150**:3030.
- ✓ Zu, Y.L., Qi, J., Gilchrist, A., Fernandez, G.A., Vazquez-Abad, D., Kreutzer, D.L., Haung, C.K., Sha'afi, R.I.. (1998). *J. Immunol.* **160**:1982.

