

Tesis de Posgrado

TNF-alfa y modulación del fenómeno apoptótico en neutrófilos humanos

Salamone, Gabriela V.

2003

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:

Salamone, Gabriela V.. (2003). TNF-alfa y modulación del fenómeno apoptótico en neutrófilos humanos. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3546_Salamone.pdf

Cita tipo Chicago:

Salamone, Gabriela V.. "TNF-alfa y modulación del fenómeno apoptótico en neutrófilos humanos". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2003. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3546_Salamone.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

**Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales**

**& $TNF-\alpha$ y modulación del
fenómeno
apoptótico en neutrófilos
humanos &**

Autor: Lic. Gabriela V. Salamone

**Director: Dr. Jorge Geffner
Co-Director: Dra. Analía Trevani**

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

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

Año 2003

Nº 3546

A Mary:

*por haberme regalado los recuerdos mas lindos de mi vida,
por haberme protegido en todo momento con la inmensidad de su fuerza,
por ser nada más y nada menos, la persona a quien le debo todo lo que soy.*

A Marce:

*por empeñar cada segundo de su vida
simplemente en hacerme feliz.*

A mis padres y hermano

A Juli y Andre

Agradecimientos

Al Dr. Jorge Geffner

Por haberme guiado en estos cinco años,
tanto en lo profesional como en diferentes
aspectos de mi vida.

A la Dra. Analía Trevani

Por enseñarme todo lo que sabe y brindarme
siempre el más cálido de
los consejos

A la Dra. Mirta Giordano

Por su excelente predisposición

A la Dra. Mónica Costas

Por abrirme las puertas de su laboratorio
como si fuera un miembro más de su grupo.

A mis compañeros de la Academia:

**Julieta Sanjurjo, Karen Nahmod, Mónica Vermeulen,
Romina Gamberale, Paula Fernandez Calotti,
Fernanda Palacios y Luciano Vellón.**

Por hacer especial el trabajo de todos los días.

A mi familia:

A Marce y a Mary

A mis padres y a mi hermano:

Por apoyarme siempre.

A Andre y Juli:

Por regalarme en todo momento, la más dulce de las
sonrisas y el más lindo de los abrazos.

A los Echeveste:

Por haberme brindado toda su ayuda para la realización
de este trabajo, y estar conmigo siempre que los necesite. Por hacerme sentir a cada
instante como un miembro más de su familia.

A mis Amigos

**Flor, Vani, Machi, Anita, Fer,
Lauri, Vane, Chulu, Claudia y Pablo**

Por simplemente estar siempre.

Índice

<i>Resumen</i>	<i>I</i>
<i>Summary</i>	<i>III</i>
<i>Abreviaturas</i>	<i>IV</i>
<i>Introducción</i>	<i>1</i>
<i>1. Producción de granulocitos neutrófilos</i>	<i>2</i>
<i>2. Migración del neutrófilo al focos inflamatorios</i>	<i>3</i>
<i>3. Mecanismos de defensa antimicrobianos mediados por neutrófilos</i>	<i>6</i>
<i>3.1. Fagocitosis</i>	<i>6</i>
<i>3.2. Mecanismos citotóxicos dependientes del oxígeno: producción de intermediarios reactivos del oxígeno</i>	<i>7</i>
<i>3.3. Mecanismos citotóxicos independientes del oxígeno</i>	<i>13</i>
<i>3.4. Producción de citoquinas</i>	<i>15</i>
<i>4. Apoptosis</i>	<i>16</i>
<i>4.1. Propiedades generales</i>	<i>17</i>
<i>4.2. Alteraciones morfológicas observadas en las células apoptóticas</i>	<i>17</i>
<i>4.3. Caspasas</i>	<i>18</i>
<i>4.4. Vías de activación del proceso apoptótico</i>	<i>20</i>
<i>4.5. Apoptosis independiente de caspasas</i>	<i>24</i>
<i>4.6. Apoptosis del neutrófilo: su papel en la resolución de los procesos inflamatorios agudos</i>	<i>25</i>
<i>5. Factor de Necrosis Tumoral alfa</i>	<i>27</i>
<i>6. Transducción de señales a través de los Receptores para TNF-α</i>	<i>30</i>
<i>7. TNF-α y apoptosis del neutrófilo</i>	<i>33</i>
<i>Objetivos</i>	<i>34</i>

Materiales y Métodos	36
1. Reactivos	37
2. Purificación de células mononucleares periféricas	37
3. Purificación de neutrófilos	38
4. Purificación de monocitos	38
5. Medio de cultivo	38
6. Evaluación de la apoptosis	38
a) Por microscopía de fluorescencia	38
b) Por medida del contenido de DNA por citometría de flujo	39
c) Por unión de anexina V y citometría de flujo	39
7. Marcación de antígenos celulares	40
a) Antígenos de membrana celular	40
b) Antígenos citoplasmáticos (Bcl-2)	40
c) Detección de antígenos desnaturalizados (Mcl-1)	40
8. Evaluación de la pérdida del potencial de membrana mitocondrial	41
9. Cambio de forma del neutrófilo	41
10. Cultivo de sangre entera	41
11. Cultivo de células dendríticas	41
12. Cultivo de células endoteliales obtenidas de vena de cordón umbilical humano (HUVEC)	42
13. Ensayo de translocación de NF-κB: ensayos de gel shift o retardo en geles de poliacrilamida	43
14. Líneas celulares	45
15. Purificación de células de mononucleares de pacientes con Leucemia Mieloide Aguda	46
16. Análisis estadístico de los datos	47

Resultados	48
1. El TNF-α media un efecto "priming" sobre la apoptosis de neutrófilos	49
2. Actividad promotora de la apoptosis de neutrófilos mediada por TNF-α: análisis por el test de anexina V y evaluación del contenido de ADN	52
3. Rango de concentraciones en el cual se expresa la actividad promotora de la apoptosis de neutrófilos mediada por TNF-α	54
4. Actividad promotora de la apoptosis de neutrófilos mediada por TNF-α: experiencias realizadas en sangre entera	55
5. Cinética de la actividad promotora de la apoptosis de neutrófilos mediada por TNF-α	57
6. La actividad promotora de la apoptosis de neutrófilos mediada por TNF-α no es reversible	58
7. La capacidad del TNF-α de "primar" la apoptosis de los neutrófilos no es compartida por otras citoquinas	58
8. La actividad promotora de la apoptosis de neutrófilos mediada por TNF-α es ejercida sobre neutrófilos en reposo	59
9. El pretratamiento con TNF-α promueve la apoptosis en neutrófilos que migran a través de una monocapa confluyente de células endoteliales	61
10. La promoción de la apoptosis mediada por TNF-α no involucra la participación del sistema Fas/FasL ni tampoco la producción de intermediarios reactivos del oxígeno	63
11. Análisis de la participación del factor de transcripción nuclear $\kappa\beta$ (NF-$\kappa\beta$) en la promoción de la apoptosis de neutrófilos mediada por TNF-α	66
12. Participación de la vía extrínseca en la promoción del proceso apoptótico por TNF-α en neutrófilos	69
13. Participación de la vía intrínseca en la promoción del proceso apoptótico por TNF-α en neutrófilos	71
14. Análisis de la participación de proteínas quinasas activadas por mitógeno (MAPK) en la promoción de la apoptosis de neutrófilos por TNF-α	72

15. Análisis de la participación de Mcl-1 en la promoción de la apoptosis de neutrófilos mediada por TNF-α	74
16. Es capaz el TNF-α de ejercer un efecto "priming" sobre la apoptosis de otros tipos celulares? Experiencias llevadas a cabo con monocitos y células dendríticas	75
17. Es capaz el TNFα de ejercer un efecto promotor de la apoptosis sobre células leucémicas provenientes de pacientes con leucemia mieloide aguda (LMA)?	76
18. Las líneas celulares mieloides no constituyen un modelo adecuado para el análisis de la acción del TNF-α sobre la apoptosis de células leucémicas en pacientes LMA	81
Discusión	83
Apéndice	93
Bibliografía	97

Resumen

El presente trabajo examinó la capacidad del TNF- α de modular la apoptosis de neutrófilos humanos. Observamos que los neutrófilos cultivados sólo con TNF- α sufren un pequeño pero significativo incremento en sus porcentajes de apoptosis. Llamativamente, observamos además que aquellos neutrófilos pretratados con TNF- α por 1-2 minutos a 37°C y expuestos luego a una variedad de agentes tales como IgG inmovilizada (IgGi), eritrocitos recubiertos por anticuerpos IgG (IgG-E), eritrocitos tratados con complemento (EC), zimosán (Z), ácido forbol mirístico (PMA), suero activado por zimosán (ZAS), N-formilmetionil-leucil-fenilalanina (fMLP), *Escherichia coli*, y factor estimulador de la formación de colonias para granulocitos y macrófagos (GM-CSF) por 3 horas a 37°C, experimentaron un marcado incremento en sus porcentajes de apoptosis. Resultados similares fueron obtenidos en neutrófilos pretratados con TNF- α por 30 minutos, 1, 3 y 18 horas. Las concentraciones a las cuales el TNF- α medió este efecto promotor de la apoptosis se hallaron comprendidas entre 1 y 100 ng/ml. En contraste con las observaciones realizadas en neutrófilos pretratados con TNF- α , no observamos promoción alguna de la apoptosis cuando el TNF- α fue añadido a neutrófilos previamente activados por agonistas convencionales. Las experiencias realizadas a fin de determinar el mecanismo responsable de la promoción de apoptosis por TNF- α mostraron que el mismo no es dependiente de la generación de intermediarios reactivos del oxígeno (IRO) ni de la participación del sistema Fas/FasL. Por el contrario, pareciera involucrar la activación de las vías intrínseca y extrínseca del mecanismo apoptótico y asociarse a una dramática disminución en la expresión de la proteína anti-apoptótica Mcl-1. Nuestros resultados sugieren que el TNF- α juega un papel crítico en el control de la sobrevivencia del

neutrófilo en virtud de su capacidad de inducir la puesta en marcha del proceso apoptótico, proceso que es "gatillado" por una amplia variedad de agonistas convencionales.

This work examined the ability of TNF- α to modulate human neutrophil apoptosis. Neutrophils cultured with TNF- α alone undergo a low but significant increase in the number of apoptotic cells. More interestingly, when neutrophils were pretreated with TNF- α for 1-2 min at 37°C, and then were exposed to a variety of agents such as immobilized IgG (ilgG), IgG-coated erythrocytes (IgG-E), complement-treated erythrocytes (CE), zymosan (Z), phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), zymosan-activated serum (ZAS), N-formylmethionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP), *Escherichia coli*, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) for 3 h at 37°C, a marked stimulation of apoptosis was observed. Similar results were obtained in neutrophils pretreated with TNF- α for 30 min, 1 h, 3 h, and 18 h. Dose-dependent studies showed that TNF- α enhances neutrophil apoptosis at concentrations ranging from 1 to 100 ng/ml. In contrast to the observations made in neutrophils pretreated with TNF- α , there was no stimulation of apoptosis when TNF- α was added to neutrophils previously activated by conventional agonists. Experiments performed to establish the mechanism through which TNF- α promotes neutrophil apoptosis showed that: a) it was not dependent on the generation of reactive oxygen intermediates (ROI) nor the participation of the Fas/FasL system, b) it appears to involve the activation of both, the extrinsic and intrinsic pathway of apoptosis, and c) it was associated to a dramatic down regulation of the expression of anti-apoptotic protein Mcl-1. Our results suggest that TNF- α plays a critical role in the control of neutrophil survival by virtue of its ability to induce an apoptotic death program which could be triggered by a variety of conventional agonists.

IL: Interleuquina

TNF- α : Factor de Necrosis Tumoral alfa

GM-CSF: Factor estimulante de la formación de colonias de granulocitos y macrófagos

IgGi: Inmunoglobulina G inmovilizada

fMLP: Péptidos formilados bacterianos

IgG-E: Eritrocitos recubiertos por anticuerpos IgG

***E.coli*:** Escherichia coli

LPS: Lipopolisacarido bacteriano

ConA: Concanavalina A:

EC: Eritrocitos recubiertos por IgM-C3b, eritrocitos sensibilizados por anticuerpos IgM y tratados con suero deficiente de C5

Z: Zimosán (levaduras, *Saccharomyces cerevisiae*)

SAZ: Suero humano activado por zimosán (es empleado usualmente como fuente de C5a)

PMA: Acido forbol mirístico

TNFR55 o TNFR1: Receptor de TNF- α de 55KD o receptor 1

TNFR75 o TNFR2: Receptor de TNF- α de 75KD o receptor 2

HUVEC: Células endoteliales obtenidas de cordón umbilical humano

ECG: Enfermedad granulomatosa crónica

NF- κ B: Factor de transcripción nuclear κ B

MAPK: Proteínas quinasas activadas por mitógeno

& Introducción &

1. Producción de granulocitos neutrófilos

El ciclo de vida de los neutrófilos y sus progenitores transcurre en tres compartimentos: médula ósea, sangre y tejidos periféricos. Su producción y normal distribución involucra diferentes *pools* celulares interconectados dinámicamente. El *pool* progenitor, localizado en médula ósea, constituye el más primitivo y contiene *stem cells* y diferentes progenitores no relacionados unívocamente con la producción de neutrófilos: CFU-GEMM (unidades formadoras de colonias de granulocitos, eritrocitos, monocitos y megacariocitos), CFU-GM (unidades formadoras de colonias de granulocitos y macrófagos) y CFU-G (unidades formadoras de colonias de granulocitos). Los diferentes tipos celulares suelen distinguirse en función de la expresión de distintos antígenos de superficie, entre ellos: CD34, CD38, CD45RA, CD54, CD71, HLA-DR y C-KIT (1-3).

El *pool* proliferativo, compuesto aproximadamente por $2-3 \times 10^9$ células/kg peso, contiene mieloblastos, promielocitos y mielocitos. Los mieloblastos son formas celulares inmaduras que carecen normalmente de gránulos. Maduran a promielocitos, los cuales presentan gránulos azurófilos o primarios, peroxidasa-positivos y posteriormente, a mielocitos, donde se desarrolla un segundo tipo de gránulos, los gránulos específicos o secundarios, peroxidasa-negativos. La expansión proliferativa en este *pool* consiste, normalmente, en cinco o seis divisiones celulares (1-3).

Los metamielocitos y los neutrófilos en banda constituyen los antecesores inmediatos de los neutrófilos maduros. Estos tres tipos celulares no sufren divisiones mitóticas, presentan en su citoplasma gránulos azurófilos y específicos en una relación 1:2 y constituyen el *pool* de maduración y reserva que, contiene aproximadamente, $5-7 \times 10^9$ células/kg peso (1-3).

La cinética normal de liberación de neutrófilos desde el *pool* de reserva, en médula ósea, a la circulación es de $1-4 \times 10^9$ /kg peso/día. En condiciones normales, el lapso requerido para la transformación del mielocito en neutrófilo maduro circulante es de 5-7 días. La existencia de procesos infecciosos, no obstante, puede reducirlo a 48 hs. Los neutrófilos en sangre se concentran en dos *pools* de similar tamaño, el circulante y el marginal. Este último, comprende a aquellas células adheridas a endotelio y contiene aproximadamente 0.3×10^9 células/kg peso. Luego de 6 a 7 hs en circulación, los neutrófilos abandonan el lecho vascular, accediendo a tejidos periféricos en respuesta a la producción de estímulos quimiotácticos (1-3). Allí sobreviven por un período de 6 a 48 hs. Numerosas evidencias,

obtenidas en modelos desarrollados in vitro e in vivo, sugieren que la muerte de los neutrófilos en tejidos periféricos involucra un mecanismo de tipo apoptótico (4-9).

La producción de neutrófilos se encuentra regulada por una compleja red de citoquinas, actuante a diferentes niveles en el proceso de diferenciación y expansión de células mieloides y/o de sus precursores. Entre ellas, se destacan un amplio conjunto de interleuquinas (IL): IL-1, IL-3 (multi-CSF), IL-6, IL-7, IL-8, IL-11 e IL-12; los factores estimuladores de la formación de colonias para granulocitos (G-CSF), macrófagos (M-CSF) y para granulocitos y macrófagos (GM-CSF) y el ligando del producto del oncogen celular c-Kit, denominado factor de células Stem (SCF) (10-14).

2. Migración del neutrófilo al foco inflamatorio

Las propiedades migratorias de los leucocitos juegan un papel crítico en la fisiología de la respuesta inmune. Dichas propiedades difieren para distintos tipos de leucocitos. Los linfocitos T y B maduros y vírgenes patrullan en forma constante el organismo a través de mecanismos de recirculación, que involucran su tránsito por sangre, sistema linfático y su retorno al torrente circulatorio. Los granulocitos y monocitos no presentan la capacidad de recircular. Ellos emigran desde el lecho vascular en respuesta a la acción de factores y citoquinas quimiotácticas (quimoquinas) y a modificaciones en la expresión y/o actividad de moléculas presentes en su membrana y en la superficie del endotelio plano de vénulas post-capilares, modificaciones generadas en respuesta a un proceso inflamatorio vecino. Los neutrófilos constituyen el tipo celular predominante en las respuestas inflamatorias agudas (15-18).

Las moléculas de adhesión son las responsables de establecer un sistema de comunicación efectivo entre leucocitos, células endoteliales y matriz extracelular. Estas pueden ser agrupadas en cinco familias diferentes: integrinas, cadherinas, selectinas, moléculas pertenecientes a la superfamilia de las inmunoglobulinas y sialomucinas. Las moléculas de adhesión pueden expresarse en forma constitutiva y/o ser inducidas por diversos mediadores inflamatorios. Es importante destacar que la actividad de las adhesinas no guarda relación únicamente con el número de moléculas expresadas sobre la superficie celular, sino también en ciertos casos, se ha demostrado que la activación celular conduce a cambios conformacionales de la molécula que potencian su actividad (17-22).

Como se mencionara anteriormente, ante la presencia de estímulos proinflamatorios (infecciones, daño tisular, etc.), el endotelio que irriga el tejido inflamado sufre modificaciones en el patrón de expresión de moléculas de adhesión, modificaciones que constituyen la señal desencadenante de la adhesión de los neutrófilos al endotelio. La extravasación de los neutrófilos ocurre, fundamentalmente, en las vénulas post-capilares, sitios donde se establece un conjunto de interacciones entre receptores expresados por neutrófilos y células endoteliales (19-21, 23,24).

El proceso de extravasación comprende tres etapas bien definidas. La primera etapa consiste en la **adherencia transitoria** o *rolling*. Esta etapa se ve favorecida por las perturbaciones hemodinámicas que ocurren como consecuencia de la inflamación local. La vasodilatación incrementa el flujo sanguíneo local y el aflujo leucocitario, ocasionando una disminución del flujo laminar, favoreciendo la marginación leucocitaria. Los neutrófilos marginados interactúan con el endotelio a través de una unión reversible mediada por la L-selectina en el neutrófilo y P , E-selectina y sialomucinas (glicoproteínas fucosiladas y sialiladas) en el endotelio, moléculas expresadas exclusivamente por células endoteliales activadas. Estas interacciones reversibles permiten a los neutrófilos enlentecer su velocidad de circulación y rodar sobre el endotelio (*rolling*) (25) (**Figura 1**).

El *rolling* de neutrófilos cesa cuando estos se adhieren firmemente al endotelio, proceso que involucra la interacción de las integrinas de la subfamilia $\beta 2$ del neutrófilo (CD11a, CD11b y CD11c/CD18) con moléculas de la superfamilia de las inmunoglobulinas expresadas en el endotelio. Particularmente, Mac-1 (CD11b/CD18) interactúa con alta afección con su ligando, la molécula ICAM-1 (CD54), cuya expresión es rápidamente incrementada en el endotelio a consecuencia de la exposición a citoquinas inflamatorias o ciertos productos bacterianos. La interacción Mac-1/ICAM-1 es, en la mayoría de los modelos analizados, la principal responsable de la **adherencia estable** de los neutrófilos al endotelio (segunda etapa del proceso de extravasación). Ella constituye un requerimiento crítico respecto a la posterior trans migración celular (19- 21, 23-25). Sin embargo para que este acontecimiento tenga lugar, es necesario que las integrinas sean activadas, es decir, sufran una transición a un estado de alta afinidad, fenómeno que representa un mecanismo adicional de control en el desarrollo de respuestas inflamatorias. Diversos agonistas, como IL-8, el factor activador de plaquetas (PAF), C5a, citoquinas (TNF- α , GM-CSF) y componentes bacterianos (LPS y fMLP) son capaces de inducir la activación de las integrinas (25).

Por último, durante la **migración transendotelial**, la molécula PECAM-1 (CD31), parece jugar un papel crítico. PECAM-1 se expresa preferencialmente, no en la superficie apical del endotelio, sino en las superficies laterales, comprometidas en la unión de células endoteliales adyacentes. A través de interacciones homofílicas, que involucran a las moléculas PECAM-1 expresadas tanto por el endotelio como por el neutrófilo, como a través de interacciones heterofílicas, que involucran a las moléculas PECAM-1 expresadas por el endotelio y ligandos aún no caracterizados en el neutrófilo, tiene lugar el proceso de migración transendotelial. El pasaje a través del endotelio, se describe como un mecanismo tipo cierre relámpago, capaz de evitar alteraciones en la permeabilidad de la barrera del endotelio vascular (17-22,23-27). En el **tránsito extravascular**, por último, parecerían jugar un papel relevante las $\beta 1$, $\beta 2$ y $\beta 3$ integrinas, merced a su capacidad de reconocer diferentes moléculas propias de la matriz extracelular (25,27) (Figura 1).

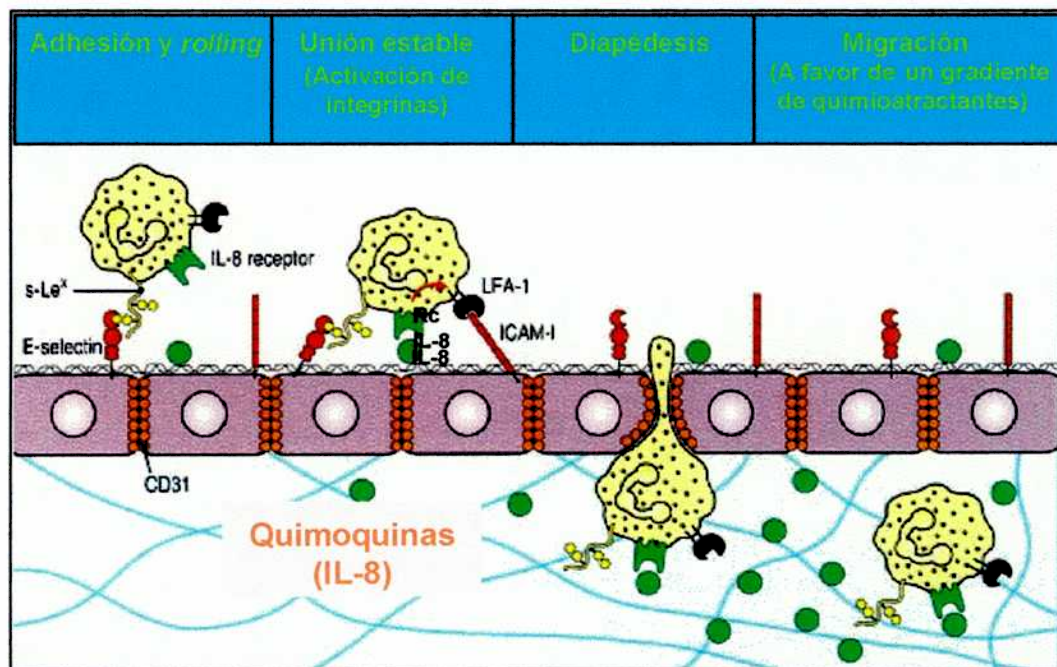


Figura 1: Trans migración de granulocitos neutrófilos. El primer paso (adhesión transitoria o *rolling*) involucra la unión reversible de los leucocitos al endotelio vascular a través de la interacción entre selectinas (sobre el endotelio) y sialomucinas (leucocitos). Posteriormente, se produce una interacción estable dada por las moléculas LFA-1 y Mac-1 (sobre el leucocito) con ICAM-1 (en el endotelio). Finalmente, la interacción entre moléculas CD31 (en ambos tipos celulares) favorece la diapédesis, que tendrá como consecuencia la migración del neutrófilo al foco inflamatorio.

Gráfico tomado de Inmunobiology. Yaneway-Travers. 3ra edición. Página 9: 16

Tanto la capacidad de migrar como el sentido de la migración de los neutrófilos se halla determinada por la producción local de un amplio conjunto de quimioattractantes tales como: el factor de activación plaquetario (PAF), producido por plaquetas, células endoteliales, leucocitos polimorfonucleares y monocitos/macrófagos; el componente C5a del sistema complemento, el leucotrieno B₄, producido a través del metabolismo del ácido araquidónico; los péptidos formilados bacterianos y un amplio conjunto de quimoquinas, particularmente la IL-8, producidas por diferentes tipos celulares (25).

3. Mecanismos de defensa antimicrobianos mediados por neutrófilos

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

3.1. Fagocitosis

Los fagocitos, al arribar a un foco inflamatorio, reconocen al microorganismo invasor, se adhieren a él y lo internalizan (28). La eficiencia de este proceso, denominado fagocitosis, depende tanto del linaje de la célula fagocítica y su estado de activación, como de la presencia, sobre la superficie del microorganismo, de moléculas que puedan ser reconocidas por receptores expresados por los fagocitos. Estas moléculas pueden clasificarse en dos grupos diferentes, según sean propias al microorganismo o se depositen sobre su superficie a consecuencia de la interacción del agente infeccioso con el sistema inmune del huésped. Este segundo grupo de moléculas incluye a la IgG y a los factores C3b y C3bi y reciben, colectivamente, el nombre de opsoninas (28). Ellas facilitan el reconocimiento de los microorganismos por los fagocitos, a través de su interacción con receptores para los componentes C3b y C3bi: CR1 (CD35) y CR3 (CD11b-CD18) y los receptores para la IgG (RFc γ). Para la mayoría de las partículas opsonizadas, las interacciones establecidas entre C3b o C3bi y CR1 y/o CR3 promueven la adhesión del agente invasor al fagocito pero no su ingestión, mientras que la unión IgG-RFc γ induce la adhesión e internalización (29). La presencia de ambos tipos de receptores en los fagocitos, permite a las opsoninas actuar en forma cooperativa. De este modo, la presencia de C3b o

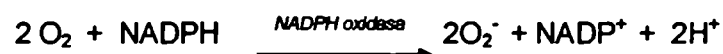
C3bi sobre un microorganismo ha demostrado disminuir, marcadamente, la cantidad de anticuerpos IgG requerida para inducir su ingestión (30).

La unión del microorganismo promueve en el fagocito la polimerización de actina en la zona subyacente al sitio de contacto, lo que conduce a la extensión de pseudópodos que envuelven a la partícula dando origen a una vacuola fagocítica o fagosoma. En forma simultánea a estos eventos, los lisosomas primarios se unen al fagosoma naciente dando origen a un fagolisosoma. Dentro del mismo, el patógeno es sometido a la acción de dos sistemas citotóxicos de distinta naturaleza (28), uno dependiente de la producción de especies oxidantes derivadas del oxígeno y el segundo dependiente de la acción de diversos tipos enzimáticos.

3.2. Mecanismos citotóxicos dependientes del oxígeno: producción de intermediarios reactivos del oxígeno

La activación de las células fagocíticas por diversos estímulos suele conducir a la producción de intermediarios reactivos del oxígeno (IRO) (31). Ellos cumplen un papel relevante no sólo en la destrucción de microorganismos invasores, sino también en la generación de lesiones tisulares asociadas a manifestaciones autoinmunes de diferente etiología. Los IRO incluyen, básicamente: anión superóxido, peróxido de hidrógeno, halógenos oxidados, radical hidroxilo y oxígeno singlete. Los mismos son generados por reducción parcial del oxígeno molecular a través de un proceso denominado *estallido respiratorio* (31), el cual se caracteriza por un incremento abrupto en el consumo de oxígeno y la activación de la vía metabólica denominada *desviación de las hexosas monofosfato*, generadora de potencial de reducción bajo la forma de NADPH (31-35). (Figura 2)

Todos los IRO producidos por los fagocitos derivan del anión superóxido (O_2^-) (31). La enzima responsable de su generación es la NADPH oxidasa, que cataliza la reducción univalente del oxígeno molecular utilizando NADPH como dador de electrones, según la siguiente reacción:



El complejo enzimático NADPH oxidasa, inactivo en condiciones basales, consta de componentes citoplasmáticos, p40-phox, p47-phox, p67-phox y componentes de membrana p22-phox y gp91-phox, estas últimas forman una *flavohemoproteína* heterodimérica

conocida como citocromo *b₅₅₈*. La gp91-*phox* contiene sitios de unión para FAD y NADPH. Por otra parte, se han caracterizado, dos proteínas de bajo peso molecular que se encuentran involucradas en la formación del complejo enzimático. Estas enzimas fueron descritas como proteínas capaces de unir nucleótidos de guanina y se denominan Rac-2 y Rap-1A. La primera de ellas se localiza en citoplasma formando un complejo dimérico con una proteína inhibitoria RhoDGI (*guanine nucleotide dissociation inhibitor*), mientras que la segunda se encuentra en membrana plasmática (25,34) (**Figura 2**).

La estimulación de los granulocitos neutrófilos conduce a la activación del complejo enzimático NADPH oxidasa. La misma, involucra la fosforilación de p47-*phox* y su translocación, junto con el resto de los componentes citoplasmáticos, a la membrana plasmática, donde se ensambla con el citocromo *b₅₅₈* y la proteína G monomérica (Rac2) (25,34,35). Mutaciones en cualquiera de los cuatro genes que codifican a los componentes de la NADPH oxidasa dan origen a una patología conocida como enfermedad granulomatosa crónica, caracterizada por la incapacidad de los fagocitos para mediar el estallido respiratorio (36,37). Ello se asocia a infecciones bacterianas y micóticas recurrentes, las cuales pueden conducir a la muerte del paciente. El defecto más frecuente se manifiesta en el gen que codifica para gp91-*phox* (patología ligada al cromosoma X), con una incidencia relativa del 60 al 80%. Las mutaciones en el gen p47-*phox* (enfermedad autosómica recesiva), presentes en un 30% de los casos, presentan un mejor pronóstico respecto de la deficiencia gp91-*phox*. Por último, en muy bajo porcentaje (2 a 3%), se han detectado mutaciones en los genes que codifican para p22-*phox* y p67-*phox* (37). En los últimos años, se han desarrollado protocolos de terapia génica para la corrección de formas deficientes de p47-*phox* en pacientes con enfermedad granulomatosa crónica (37) (**Figura 2**).

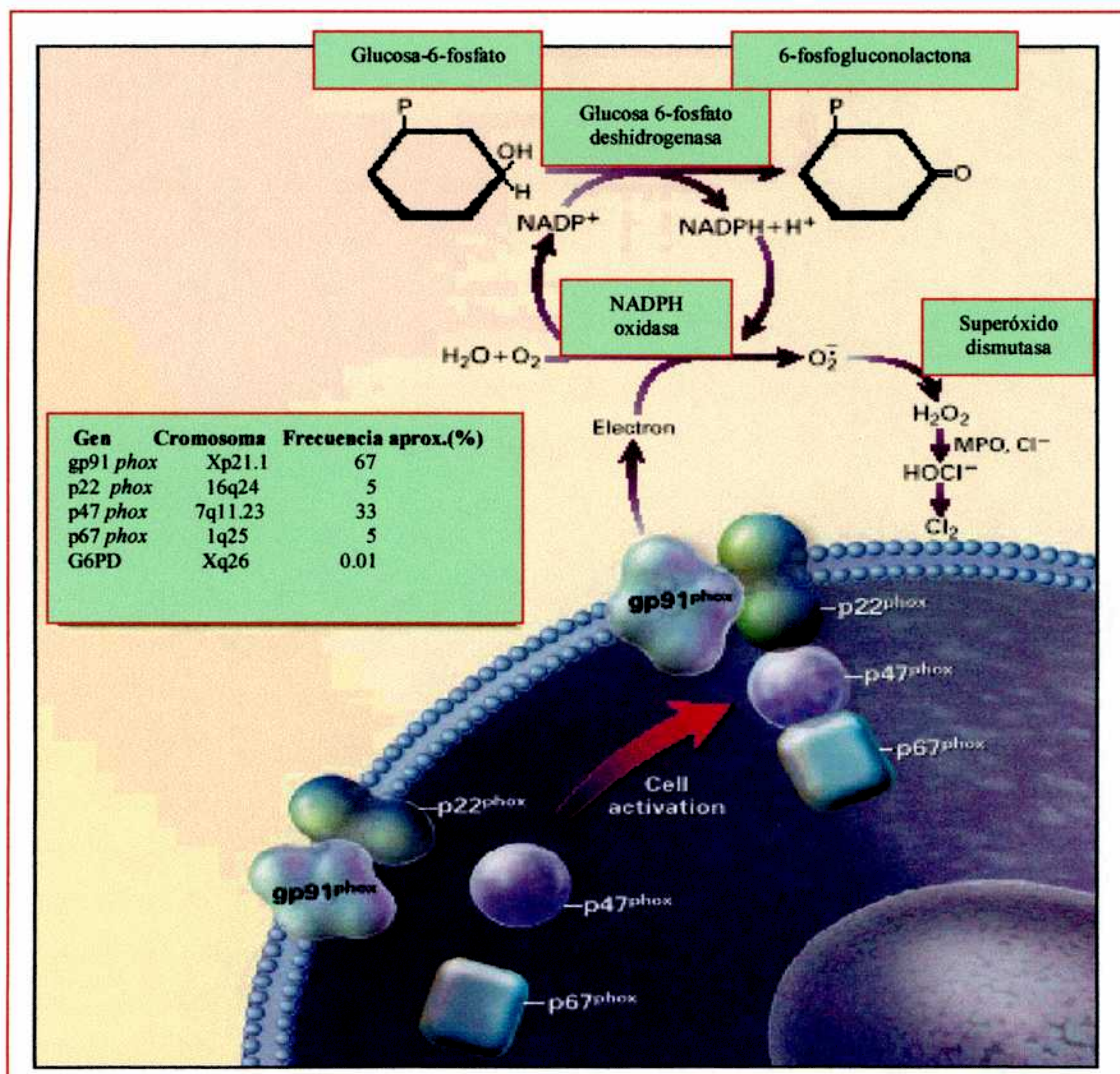
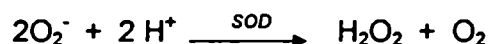
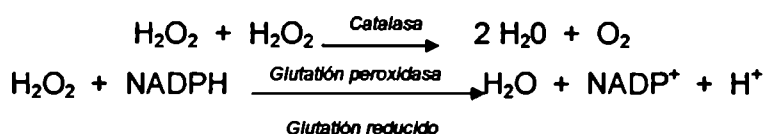


Figura 2: Interacción de los componentes de la NADPH oxidasa y enfermedad granulomatosa crónica. Los componentes citoplasmáticos de la NADPH oxidasa (p47-*phox* y p67-*phox*) interaccionan con los componentes anclados en membrana plasmática (gp91-*phox* y p22-*phox*), luego que se produce la activación del fagocito. La glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) convierte a la glucosa-6-fosfato a 6-fosfogluconolactona, generando NADPH e iones hidrógeno provenientes de NADP⁺. NADPH oxidasa cataliza la reducción monovalente de O₂ a anión superóxido (O₂⁻), el cual subsecuentemente se convierte en peróxido de hidrógeno (H₂O₂) por acción de la superóxido dismutasa (SOD). Finalmente, la mieloperoxidasa (MPO) cataliza la reacción de H₂O₂ a aniones hipocloritos (HOCl⁻). La figura muestra además, mutaciones asociadas a la enfermedad granulomatosa crónica. Gráfico tomado de The New England Journal of Medicine (2000) 343-página 1703.

El anión superóxido es capaz de reaccionar con una amplia variedad de sustratos biológicos. No obstante, no cumpliría por si mismo un papel crítico en las respuestas citotóxicas desarrolladas hacia microorganismos y/o células propias del huésped dado: a) su escaso potencial oxidante (38) y b) la velocidad y eficiencia con la cual dos moléculas de anión superóxido interactúan para formar peróxido de hidrógeno (39). Esta reacción puede desarrollarse espontáneamente o ser catalizada por la enzima superóxido dismutasa (SOD), según:



La dismutación espontánea ocurre lentamente a pH neutro ($K = 4,5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). Se acelera notoriamente a valores ácidos de pH, similares a los encontrados dentro del fagolisosoma ($K = 8,5 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (40, 41). Por otra parte, la SOD, presente en células eucariotas en dos isoformas, mitocondrial y citoplasmática, cataliza la reacción de dismutación con una $K = 1,9 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (42, 43). El H_2O_2 es un oxidante estable capaz de ejercer efectos tóxicos en distintos sistemas biológicos (44). No obstante, muchos tipos celulares, entre ellos los propios fagocitos y numerosos microorganismos, suelen contener potentes enzimas que detoxifican el H_2O_2 , tales como la catalasa y/o la glutatión peroxidasa (45), que actúan a través de las siguientes reacciones:



La presencia de estas enzimas, en microorganismos y fagocitos, redundan en una resistencia marcada a los efectos tóxicos del peróxido de hidrógeno.

La inhabilidad relativa del anión superóxido y del peróxido de hidrógeno de actuar *per se* como agentes citotóxicos, sugiere que son otras las especies que dan cuenta del potencial citotóxico de los fagocitos. El mismo estaría dado por la producción de oxidantes más poderosos tales como los hipohalitos (XO^-) y el radical hidroxilo ($\text{OH}^\cdot$) (39).

La producción de hipohalitos involucra la acción de peroxidases, las que pueden ser liberadas al medio extracelular cuando la célula es estimulada. Ellas incluyen a la mieloperoxidasa (MPO), que se encuentra tanto en neutrófilos como en monocitos (constituyendo en los neutrófilos el 5% de su peso seco) (39,40) y a la peroxidasa de eosinófilos (EPO). Ambas enzimas catalizan la oxidación de haluros (Cl^- , Br^- y/o I^-) por el H_2O_2 , generando aniones hipohalitos según la siguiente reacción:



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

Mientras que la MPO emplea como sustrato fisiológico el Cl^- , cuya concentración plasmática es mil veces superior respecto de los otros haluros, la EPO emplea Br^- , no pudiendo oxidar el Cl^- (46).

Siendo la capacidad oxidante del hipoclorito extremadamente alta, una vez producido interactúa rápidamente con diversas moléculas tales como aminas, aminoácidos, tioles, tioéteres, nucleótidos y hemoproteínas (47). Se ha estimado que a pH neutro, 10^6 neutrófilos generan 2×10^{-7} moles de OCl^- , suficientes para destruir 150 millones de organismos de *E. coli* en milisegundos (39, 47). Los efectos citotóxicos atribuibles al hipoclorito incluyen la oxidación y/o decarboxilación de proteínas de membrana, conducente al incremento de la permeabilidad celular (48); oxidación de componentes de la cadena respiratoria bacteriana (48, 49) y peroxidación de membranas (50).

El hipoclorito puede reaccionar en forma espontánea con aminas primarias o secundarias dando origen a las cloraminas, de acuerdo a la siguiente reacción:



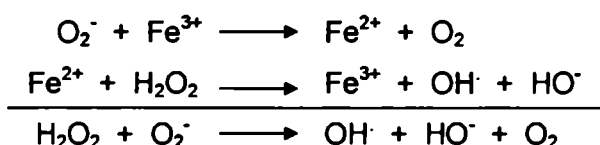
Si bien las cloraminas son menos reactivas que el hipoclorito, sus vidas medias suelen ser más prolongadas. Algunas de ellas pueden ser recuperadas de sobrenadantes de neutrófilos luego de 16 horas de ocurrida la activación celular (39).

El hipoclorito, merced a su alta reactividad, ejercería sus efectos tóxicos sobre *blancos* asociados a membrana (39). La naturaleza catiónica de la MPO facilitaría, por otra parte, su adherencia a las superficies celulares (40,46,49). Por su parte, las cloraminas, especialmente aquellas con características lipofílicas, difundirían a través de la membrana plasmática actuando sobre componentes citosólicos (39). Deficiencias en MPO se caracterizan por infecciones recurrentes por *Cándida*. Estudios poblacionales han determinado un gran número de individuos asintomáticos para la deficiencia en esta proteína, quedando de manifiesto que la actividad del sistema $\text{MPO}/\text{H}_2\text{O}_2$ no es indispensable para la actividad microbicida de los granulocitos neutrofilos. Su defecto se manifestaría particularmente en pacientes con diabetes mellitus (25,37). Los oxidantes derivados de la actividad MPO ha sido implicado en otros procesos no relacionados con la

defensa del huesped, incluyendo carcinogenesis, arteriosclerosis e inducción de fallas renales crónicas (25).

Mientras persista la producción continua de H_2O_2 por los fagocitos (los neutrófilos humanos son capaces de generar peróxido de hidrógeno durante varias horas posteriores a su estimulación), la MPO podrá generar HOCl hasta que el *pool* de blancos susceptibles se haya agotado, luego de lo cual los oxidantes reaccionarán e inactivarán a la propia MPO (47).

Los fagocitos son capaces de incrementar la potencialidad tóxica del O_2^- y el H_2O_2 a través de un mecanismo alternativo, consistente en la producción de un oxidante extremadamente reactivo y destructivo, el $\text{OH}^\cdot$. Este se origina por la interacción de O_2^- y H_2O_2 en una reacción catalizada por Fe^{3+} (reacción de Haber-Weiss) (46):

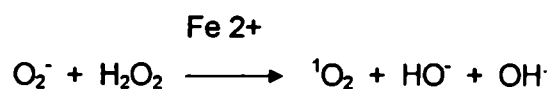


El papel del $\text{OH}^\cdot$ en los mecanismos citotóxicos mediados por fagocitos no ha sido definido con precisión. El $\text{OH}^\cdot$ es capaz de reaccionar rápidamente con una amplia variedad de enlaces químicos, causando daño en regiones próximas al sitio de producción (46). Su participación en los mecanismos citotóxicos fue sugerido originalmente basándose en el efecto inhibitorio inducido por catalasa, SOD y agentes *secuestradores* del $\text{OH}^\cdot$ tales como manitol y benzoato de sodio. Los experimentos tendientes a determinar, en forma directa, la producción de $\text{OH}^\cdot$ por fagocitos han arrojado, sin embargo, resultados controvertidos (46).

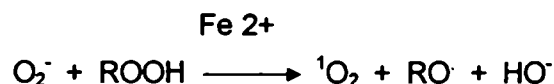
Los fagocitos son capaces también, de producir una especie sumamente agresiva denominada oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$). El mismo no constituye por definición un radical libre ya que no presenta electrones desapareados (33). Se han propuesto diversas reacciones para explicar su producción *in vivo*. De acuerdo a Kahn (51), la reacción procedería según:



Para Kellogg y Fridovich (52), su producción involucraría a la reacción de Haber-Weiss según:



también podría producirse según:



Hasta el momento, la evidencia obtenida no es concluyente en relación al papel del ${}^1\text{O}_2$ en la actividad citotóxica mediada por fagocitos.

3.3 Mecanismos citotóxicos independientes del oxígeno

Los fagocitos contienen, además de su sistema generador de IRO, cuatro tipos de gránulos citoplasmáticos, algunos de estos gránulos contienen además, agentes antimicrobianos capaces de destruir a los microorganismos invasores. No difieren solamente en su contenido sino también en el estadio de maduración en el cual se originan y en las circunstancias en que son movilizados. A continuación se describe brevemente, las principales características de los diferentes tipos de gránulos: 1) los *gránulos azurófilos* (son los primeros en desarrollarse en el estadio de promielocito), se caracterizan por contener mieloperoxidasa, serino proteasas y péptidos antimicrobianos. Estos gránulos son considerados verdaderos compartimentos microbicidas que se movilizan luego de la fagocitosis. En segundo lugar se originan los *gránulos específicos* (en el estadio de metamielocito), que contienen lactoferrina y colagenasa, seguidos inmediatamente por la formación de *gránulos terciarios* ricos en gelatinasa. Por último, un cuarto tipo de gránulos se desarrolla en neutrófilos ya maduros, denominados *vesículas secretorias*, cuyo origen podría ser endocítico debido a que contienen principalmente proteínas plasmáticas, como por ejemplo albúmina. Estos últimos tres tipos de gránulos contienen en su membrana un alto contenido de la integrina Mac-1 (25,53-55).

La movilización de los diferentes gránulos de los neutrófilos, tiene una secuencia estricta relacionada con su participación en la migración y la fagocitosis. En primer lugar se produce la liberación de las vesículas secretorias, para favorecer la adherencia estable en el proceso de trans migración. Posteriormente se liberan los gránulos de gelatinasa, a efectos de favorecer la migración de los neutrófilos a través de la membrana basal, seguidos por los gránulos específicos. Tanto los gránulos de gelatinasa como los gránulos

específicos estarían implicados en el desarrollo de respuestas microbicidas, debido a que son depósitos de Mac-1 (CD11b/CD18) y de citocromo b₅₅₈. Finalmente, son exocitados los gránulos azurófilos. (25,53-55)

Se describen a continuación las principales proteínas involucradas en los mecanismos microbicidas independientes del oxígeno. Las proteasas de mayor relevancia incluyen a la elastasa, la catepsina G, la colagenasa y la gelatinasa (53-59).

La **elastasa** es una serino proteasa que se encuentra en altas concentraciones en los gránulos azurófilos de los neutrófilos. Es activa sobre una amplia variedad de sustratos que incluyen a casi todas las proteínas de la matriz extracelular, proteínas plasmáticas (inmunoglobulinas, componentes del complemento, factores de coagulación) y numerosas proteínas expresadas sobre la superficie de células intactas (54). Además de contribuir a la degradación de los microorganismos fagocitados, sería importante para la locomoción de los neutrófilos, dado que al degradar componentes de la matriz extracelular facilitaría la penetración de los mismos en los tejidos. Su relevancia fisiopatológica ha sido cuestionada debido a que el plasma contiene altas concentraciones de inhibidores tales como la α 1-antitripsina, la β 2 -macroglobulina y el inhibidor de la leucoproteinasa secretoria (25). Sin embargo, se ha demostrado que estos tres inhibidores pueden ser inactivados por los IRO producidos por los propios fagocitos. Ello permitiría a la elastasa mediar su actividad proteolítica (25,54).

Las **metaloproteasas** incluyen a la **colagenasa**, que degrada al colágeno intersticial tipo I, II y III y a la **gelatinasa**, que cliva colágenos tipo IV V y XI (56). Probablemente, la exocitosis de los gránulos de gelatinasa sea un requisito para la migración a través de la membrana basal, debido a que la misma se encuentra formada principalmente por colágeno tipo IV, y a través de los tejidos intersticiales, que contienen colágeno tipo V (25). Estas enzimas son sintetizadas y liberadas como proenzimas, es decir, en forma inactiva. El mecanismo de activación no ha sido del todo esclarecido, sin embargo se ha demostrado que los propios neutrófilos son capaces de inducir su activación, a través de mecanismos de naturaleza oxidativa, que involucrarían la acción del OCl⁻ y/o las cloraminas (57, 58). Estos hallazgos han sido confirmados en estudios llevados a cabo con neutrófilos provenientes de pacientes con enfermedad granulomatosa crónica, los que se muestran incapaces de activar a la colagenasa (57).

La **catepsina G**, constituye en realidad una familia de isoenzimas catiónicas contenidas en los gránulos azurófilos de los neutrófilos. Son serino proteasas que presentan una especificidad hidrolítica semejante a la quimotripsina. Su actividad bactericida sería

independiente de la funcionalidad enzimática, pues su acción antimicrobiana persiste luego de ser inactivada por calor (59).

Otras proteínas que forman parte del arsenal destructivo de los fagocitos son la **lisozima** y la **lactoferrina**. La lisozima es una enzima catiónica presente en altas concentraciones en los gránulos azurófilos y específicos de los neutrófilos y también en macrófagos (60). Ejerce sus propiedades bacteriolíticas al hidrolizar uniones α 1-4 glucosídicas de los mucopéptidos de la pared celular bacteriana. Es capaz, además, de ejercer efectos antimicrobianos a través de mecanismos no enzimáticos (60). Por su parte, la lactoferrina media un efecto bacteriostático al fijar y retener hierro, necesario para el metabolismo bacteriano normal (60).

Los fagocitos contienen, además, proteínas tales como la B/PI de neutrófilos (proteína bactericida incrementadora de la permeabilidad) y los péptidos catiónicos 1 y 2 de los macrófagos, capaces de permeabilizar las membranas bacterianas a través de mecanismos no enzimáticos (61). Presentan también “defensinas”, péptidos moderadamente catiónicos, muy abundantes en los gránulos azurófilos de los neutrófilos, los que actúan induciendo alteraciones en la integridad de las membranas de bacterias, hongos y ciertos virus envueltos (60).

3.4 Producción de citoquinas

Contrastando con ideas sostenidas tradicionalmente, trabajos llevados a cabo en los últimos años han mostrado que la producción de citoquinas por parte de los neutrófilos juega un papel relevante en el desarrollo de ciertas respuestas inflamatorias (62). Diferentes grupos han demostrado la capacidad de los neutrófilos de producir TNF- α (63-65), IL-1 β (63,66-68), el antagonista del receptor para IL-1 (68-71), IL-8 (72-75), el factor transformador de crecimiento β 1 (TGF- β 1) (76,77) y las proteínas inflamatorias 1 α y 1 β de macrófagos (MIP-1 α y MIP-1 β) (78, 79, 80). Si bien es evidente, desde el punto de vista cuantitativo, que la cantidad de citoquinas producida 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 de citoquinas de gran impacto.

La producción de IL-8, MIP-1 α y MIP-1 β podría jugar un papel importante en el reclutamiento de leucocitos en el foco inflamatorio. Mientras que la IL-8 actúa como agente quimiotáctico para los neutrófilos (81), las MIP-1 α y MIP-1 β presentan una potente actividad

quimioattractante para monocitos (78) y ciertas subpoblaciones de linfocitos T (80). Estas últimas dos citoquinas participarían en la inducción del *switch* en el tipo de infiltrado leucocitario, observado durante la evolución de una respuesta inflamatoria, desde un estadio agudo a un estadio crónico. Ha sido sugerido, por otra parte, que la secreción de citoquinas por parte de neutrófilos podría influenciar la dirección y evolución de la respuesta inmunológica adaptativa, particularmente en lo referido a la inducción de respuestas de tipo Th1 o Th2 (68, 71, 82,83).

4. Apoptosis

4.1 Propiedades generales

Dos formas diferentes de muerte celular han sido descritas: necrosis y apoptosis. La necrosis, resulta usualmente de la exposición celular a procesos de injuria severos tales como aquellos inducidos por isquemia, hipertermia sostenida o trauma químico. Es referida también como muerte accidental y se asocia generalmente a la existencia de procesos extensivos de daño tisular severo. Si bien no resulta sencillo establecer un patrón común de cambios en la célula necrótica, la membrana plasmática constituiría el sitio crítico donde se produce la injuria temprana, merced a la cual la célula pierde, en forma irreversible, la capacidad de regular su medio interno. El proceso necrótico involucra la lisis celular con la consiguiente liberación del contenido citoplasmático al medio extracelular, hecho que provoca una exacerbación en respuestas de naturaleza inflamatoria (84-86).

La apoptosis, caracterizada originalmente por Kerr y colaboradores en el año 1972 (84), deviene de la activación de un mecanismo intrínseco suicida, programado genéticamente. Conduce en última instancia, a la eliminación de células potencialmente perjudiciales para el organismo (86-91). Todas las células presentes en mamíferos poseen la capacidad de activar este programa suicida. La ejecución del mismo suele asociarse a cambios morfológicos y bioquímicos que presentan un patrón común en diferentes tipos celulares. A diferencia de la necrosis, la apoptosis se relaciona con procesos de homeostasis observables en condiciones fisiológicas (86,90,91). Cumple un papel crítico en procesos fisiológicos tan diversos como desarrollo embrionario, reparación tisular y en la homeostasis del sistema inmune. En este último aspecto, se halla involucrada en la delección de clones autorreactivos y en la regulación de las respuestas proliferativas que acompañan a la expansión clonal (86,91,92).

Es interesante destacar, por último, el alto grado de conservación que ha mostrado el mecanismo apoptótico a lo largo de la evolución. El gen *reaper*, esencial en todos los procesos apoptóticos en *Drosophila melanogaster* es homólogo al gen *Fas* humano, el cual cumple un papel fundamental en la homeostasis de la respuesta inmune y en ciertas respuestas citotóxicas mediadas por linfocitos CD8⁺. Los genes *ced-9* y *ced-3* del nematode *Caenorhabditis elegans*, por otra parte, son homólogos a los genes *bcl-2* y enzima convertidora de IL-1 (ICE) o caspasa-1, expresados en mamíferos (87,91,93,94).

4.2. Alteraciones morfológicas observadas en las células apoptóticas

Durante el desarrollo del proceso apoptótico se manifiestan un conjunto de alteraciones morfológicas, comunes en diversos tipos celulares. Ya en etapas tempranas, se observa una disminución en el tamaño de la célula, proceso asociado a la pérdida de agua intracelular. Los mecanismos responsables del proceso de extrusión de agua no han sido dilucidados. Se sabe, no obstante, que los mismos no conducen a alteraciones en la presión osmótica de sus compartimentos internos. Estudios realizados en timocitos, luego generalizados a otros tipos de linfocitos, han demostrado una reducción en el volumen celular cercana al 30%. Este proceso de condensación celular determina que las diferentes organelas manteniendo una morfología inalterada, se muestren francamente agrupadas al estudiarlas por microscopía electrónica (84-86,91).

El colapso nuclear constituye un fenómeno crítico en el proceso apoptótico, observándose una marcada condensación de la cromatina, en áreas que muestran una clara asociación con la envoltura nuclear (84-86,91).

Respecto a la membrana citoplasmática, se observan profundos pliegues y arrugas, generadas a través de un proceso denominado *zeiosis*. Es importante destacar, no obstante, que la membrana citoplasmática no muestra pérdida de integridad o alteraciones mayores en su permeabilidad (84-86,91), pero si experimenta un proceso denominado *Flip-Flop* (translocación) de sus componentes, siendo fundamentalmente relevante la externalización de la molécula de fosfatidilserina (95).

Por último, suele observarse en etapas tardías, fragmentación del DNA, fenómeno que se revela en una corrida electroforética en la forma de un patrón característico (*nucleosomal ladder*), que corresponde al clivaje del DNA entre nucleosomas (84-86,91,94).

El destino final de la célula apoptótica es ser endocitada por fagocitos profesionales u otros tipos celulares, tales como fibroblastos y células epiteliales, a través de un proceso no

conducente a la liberación de mediadores inflamatorios (5, 6). Este proceso de remoción de células apoptóticas es sumamente eficiente. Ello explica que, en preparados histológicos, las células apoptóticas suelen observarse, preferencialmente, en el citoplasma de otros tipos celulares (5-8,96-97), en especial macrófagos. El reconocimiento de la célula apoptótica depende principalmente de la externalización de la molécula de fosfatidilserina (95).

Es importante destacar que, en franca oposición a lo observado en la necrosis, durante el desarrollo del proceso apoptótico la membrana citoplásmica permanece intacta, por lo tanto, el contenido celular no es liberado al medio circundante (84-86,91,95).

4.3. Caspasas

La mayoría de las alteraciones morfológicas observadas en las células apoptóticas son causadas por un conjunto de cistein-proteasas activadas específicamente en células apoptóticas denominadas caspasas (98). Las caspasas son enzimas sumamente conservadas en la evolución (99-101). En humanos han sido descritas 14 caspasas diferentes, 8 de las cuales han demostrado participar en el proceso de apoptosis. Las caspasas presentan 3 dominios y son capaces de clivar uniones de tipo Asp-Xxxx (uniones posteriores al aspártico). La especificidad de sustrato está determinada por los 4 aminoácidos en posición amino terminal, respecto del sitio de clivaje (102). Se subdividen en familias, dependiendo de patrones de especificidad, identidad en su secuencia aminoacídica y similitud estructural. Existe un amplio consenso en considerar a las caspasas como ejecutoras del proceso apoptótico (103).

Las caspasas son sintetizadas como proenzimas no activas. Su activación puede involucrar tres grandes mecanismos: a) clivaje proteolítico, el cual está mediado por otras caspasas. Este mecanismo de activación prevalece en las caspasas 3, 6 y 7, y es también probablemente utilizado, por otras proteasas no caspasas, tal como la granzima B; b) el reclutamiento o agregación de múltiples procaspasas dentro de un área muy estrecha, resultando en la cross-activación de las mismas a través de un mecanismo autocatalítico (caspasa-8) y c) la asociación con un cofactor (formación de holoenzima), mecanismo que explicaría la activación de la caspasa 9 merced a su unión al cofactor Apaf-1. El complejo caspasa 9/Apaf-1 constituiría, en realidad, la forma activa de caspasa 9 (103) (**Figura 3**).

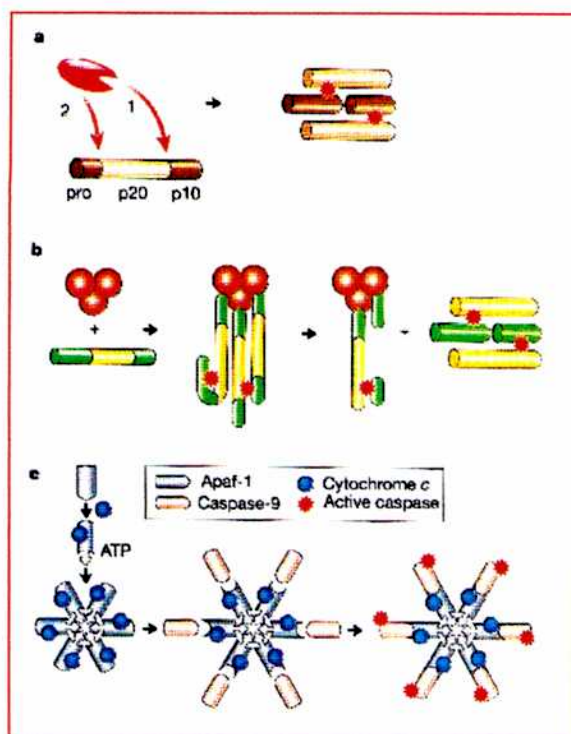


Figura 3: Mecanismo de activación de caspasa.

El mecanismo de activación de caspasas incluye:
a) clivaje proteolítico
b) clivaje autocatalítico
c) formación de holoenzima
 Gráfico tomado de Nature (2000) 407-página 770.

Las caspasas también pueden ser clasificadas en base a la presencia de dominios que van a determinar su función. Las caspasas 8 y 10 se caracterizan por poseer un dominio efector de muerte (DED), mientras que las caspasas 2 y 9 contienen un dominio de reclutamiento y activación de caspasas (CARD). Estos dominios tienen en común la formación de pliegues característicos, a pesar de no poseer alta homología en su secuencia aminoacídica, pliegues que también se presentan en los dominios de muerte de CD95 y FADD (se describen más adelante) (103,104).

La activación de caspasas **iniciadoras** (pro-caspasas-8, -9 y -10) conduce a la proteólisis de caspasas **efectoras** (pro-caspasas -3, -6, -7), proceso que culmina en la degradación de un *set* específico de proteínas, integrado al menos por 100 moléculas diferentes. En la mayoría de los casos, la acción de las caspasas se traduce en la inactivación de la proteína blanco, como sucede en el clivaje de proteínas del citoesqueleto (citoqueratina, actina, gelsolina, entre otras) (103). No obstante, para algunos sustratos de las caspasas, el ataque proteolítico resulta en la adquisición de una actividad enzimática

(103). Tal es el caso de la DNAsa responsable de clivar al ADN en un patrón característico (*nucleosomal ladder*), cuya evidencia denota la existencia de un proceso apoptótico (94, 105). La enzima responsable de este proceso denominada CAD (DNAsa activada por caspasa) se presenta en forma de un complejo inactivo, asociado a una subunidad inhibitoria denominada ICAD (inhibidor de la DNAsa activada por caspasas). La activación de CAD ocurre a través de caspasa-3 quien media el clivaje de la subunidad inhibitoria y la liberación y activación de la subunidad catalítica (106-108). Finalmente, las caspasas pueden producir el clivaje de PAK2, un miembro de las familias de kinasas que activa p21, siendo esta acción de las caspasas la responsable del fenómeno de *blebbing* (burbujeo), observado en las células apoptóticas. En este último punto, el clivaje ocurre entre la subunidad regulatoria y la subunidad catalítica, y resulta en la activación de PAK2 (109)

Finalmente es importante destacar, que no todas las caspasas cumplen su función como promotoras del proceso apoptótico. Algunas tienen relevancia como caspasas proinflamatorias, como es el caso de la caspasa 1 o ICE (enzima convertidora de IL-1 β e IL-18). La IL-1 β es inicialmente sintetizada como un precursor inactivo (pro-IL-1 β), que carece de un péptido señal. La caspasa 1 cliva el precursor inactiva produciendo la forma madura de la IL-1 β . Esta es posteriormente secretada al compartimento extracelular por una vía de exocitosis no clásica (110,111).

4.4 Vías de activación del proceso apoptótico

Han sido caracterizadas dos vías principales conducentes al desarrollo del proceso apoptótico. La vía extrínseca (o vía mediada por receptores con dominio de muerte) es iniciada por receptores transmembrana que expresan un dominio de muerte celular (CD95, receptores de TNF α y receptores TRAIL) y conduce a la activación de las caspasas 8 y 10 (a través de la interacción con proteínas adaptadoras tales como FADD-dominio de muerte asociado a FAS o TRADD-dominio de muerte asociado al receptor de TNF α), quienes luego clivan a las caspasas 3, 6 y 7. La vía intrínseca (vía mitocondrial), involucra la inducción de alteraciones en la permeabilidad de la membrana externa mitocondrial y la liberación de proteínas mitocondriales: Smac/Diablo ("second mitochondria-derived activator of caspases/direct IAP-binding protein with a low isoelectric point"), HtRA2 y citocromo c (103,112,113). El citocromo c, en forma conjunta con Apaf-1, y procaspasa 9 genera la forma activa de esta caspasa, que en presencia de ATP forma el apoptosoma, iniciando la cascada de activación de caspasas, mientras que

Smac/Diablo y Htr2 antagonizan a las moléculas antiapoptóticas IAPs (inhibidor de proteínas apoptóticas), quienes inhiben tanto la actividad de las caspasas 3 y 7, como la activación de caspasa 9 por Apaf-1-citocromo c (113,114). La vía intrínseca puede ser activada por oncoproteínas, daño directo al ADN, hipoxia, privación de factores de supervivencia, entre otros factores (115) (**Figura 4**).

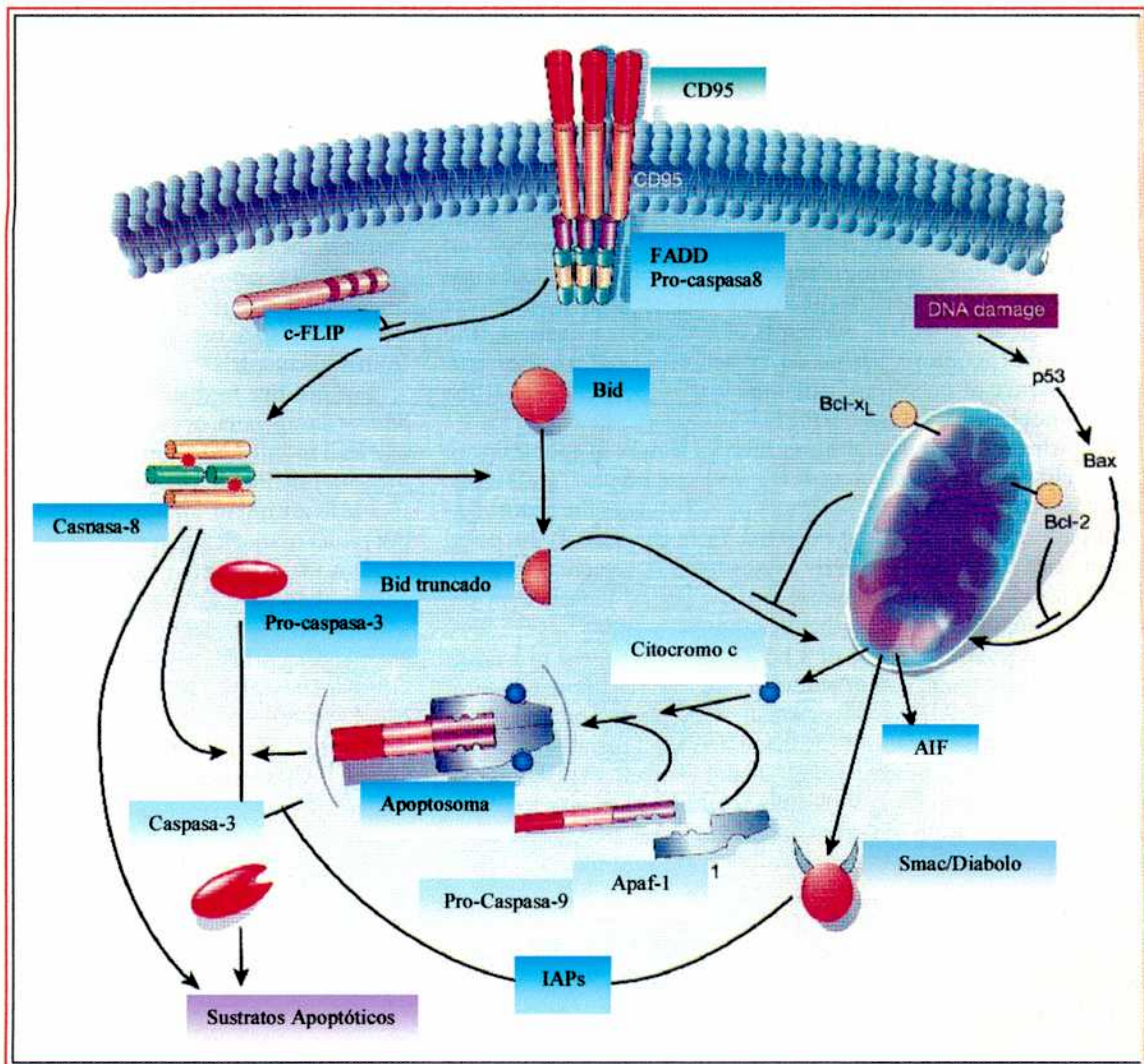


Figura 4: Descripción de la vía extrínseca e intrínseca de la apoptosis. La unión de CD95L a CD95 induce la agregación del receptor y el complejo de señalización inductor de muerte. El complejo recluta vía la molécula adaptadora (FADD), múltiples moléculas de procaspasa-8 resultando en la forma activa de caspasa-8. La activación de caspasa-8 puede ser bloqueada por el reclutamiento de una caspasa degenerada (c-FLIP) o bien inducir el clivaje de caspasas efectoras (caspasa-3, 6 y 7). La vía mitocondrial (derecha en la figura) puede activarse por daño al ADN o por alteraciones en el medio extracelular. Ambas situaciones convergen en la mitocondria generalmente a través de la activación de miembros proapoptóticos de la familia Bcl-2, provocando la destabilización de la membrana mitocondrial. Se liberan de esta manera varias proteínas del espacio intermembrana de la mitocondria, entre ellas citocromo c y smac/DIABLO. Citocromo c se asocia con Apaf-1 y procaspasa-9 que en presencia de ATP forman el apoptosoma (complejo capaz de clivar también caspasas efectoras), mientras smac/DIABLO antagoniza el efecto de las IAPs. El entrecruzamiento de ambas vías es a través de la activación de Bid, (miembro de la familia Bcl-2), por caspasa 8. Gráfico tomado de Nature (2000) 407-página 770.

La permeabilidad de la membrana mitocondrial es regulada por miembros de la familia Bcl-2. Esta familia ha sido dividida en tres grupos, considerando aspectos relativos a similitud estructural y funcional. Los miembros del grupo 1 poseen actividad antiapoptótica (Bcl-2, Bcl-X_L, Mcl-1, Bfl-1/A1, Bcl-W, Bcl-G), mientras que los del grupo II y III promueven la muerte celular (Bax, Bak, Bok, Bad, Bid, Bik, Bim, Bcl-Xs, Krk, Mtd, Nip3, Nix, Noxa, Bcl-B) (**Figura 5**). Pueden formar homodímeros pero, más interesante aún, miembros de esta familia, con actividad proapoptótica y antiapoptótica pueden formar heterodímeros. Dado que cada miembro de la familia Bcl-2 puede interactuar con muchos de los otros miembros de esta familia, es usual que se establezca un gran número de heterodímeros diferentes en una célula en particular. En una primera aproximación puede afirmarse que la dimerización de miembros con actividades proapoptótica y antiapoptótica conduce a la neutralización de ambas actividades. Por lo tanto, un aspecto crítico en cuanto al resultado final que impone la familia Bcl-2 sobre el proceso de apoptosis (prevención vs promoción) esta dado por los niveles celulares globales de elementos proapoptóticos y antiapoptóticos pertenecientes a la familia Bcl-2 (116-117).

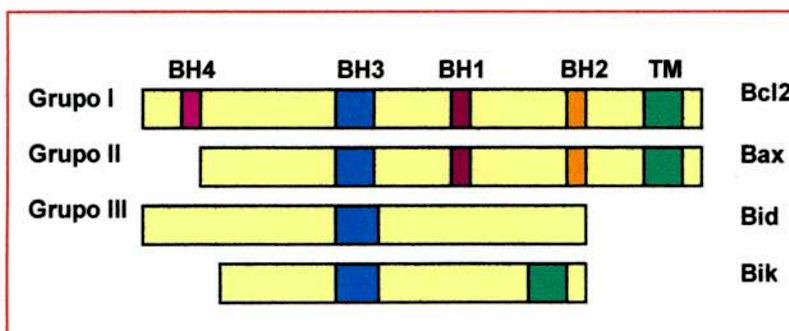


Figura 5: Miembros de la familia Bcl-2. Los miembros del primer grupo se caracterizan por cuatro dominios (BH) cortos (BH1-BH4) y una cola hidrofóbica que localiza a la proteína en la superficie mitocondrial externa. Los miembros del segundo grupo tienen una estructura similar a la del grupo I pero carecen del dominio N-terminal BH4. El tercer grupo difiere bastante de los anteriores, compartiendo únicamente el dominio BH3.

Los miembros de la familia Bcl-2 estarían involucrados como mediadores de la liberación de los factores pro-apoptóticos, principalmente citocromo c, del compartimento intermembrana mitocondrial hacia el citosol. Cuál es la forma en que los miembros de la familia Bcl-2 regulan la liberación del citocromo c? Aún cuando se han postulado varias hipótesis a fin de responder a este interrogante, todavía no se ha alcanzado una respuesta satisfactoria. Se ha propuesto que los miembros de la familia Bcl-2 forman canales (poros) transmembrana, o que los mismos puedan ocasionar la ruptura de la membrana externa de la mitocondria, que facilitaría la liberación de proteínas mitocondriales. Se ha especulado también, que proteínas pro-apoptóticas de la familia

Bcl-2 puedan interaccionar con la proteína de canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC), la cual forma canales transmembrana de pequeño calibre que serían amplificados por miembros de la familia Bcl-2 (103).

Finalmente es importante aclarar que han sido demostrados caminos interactivos establecidos entre la vía extrínseca e intrínseca de activación de la apoptosis. Así, caspasa 8 es capaz de inducir la activación de Bid, facilitando de este modo la liberación de citocromo c, produciendo una amplificación de las señales apoptóticas (112,113).

4.5 Apoptosis independiente de caspasas

Es conocido que agentes capaces de inducir stress oxidativo median también la inducción de apoptosis. Por ejemplo, la radiación ionizante y la radiación ultravioleta son capaces de inducir apoptosis y ambos generan IRO tales como H_2O_2 y $OH^\bullet$. La exposición a bajas dosis (10-100 μ M) de H_2O_2 induce apoptosis en varios tipos celulares (quedando de manifiesto que el stress oxidativo puede inducir apoptosis), mientras que altas concentraciones de este oxidante generan necrosis. Es importante recordar que no sólo la enzima NADPH-oxidasa puede producir IRO, la cadena transportadora de electrones de la mitocondria también puede realizarlos (118,119).

Se han postulado en los últimos años, formas de muerte celular donde la activación de caspasas parece ser dispensable. Por ejemplo, experimentos realizados en linfocitos T aislados de ratones tratados con superantígenos, manifiestan un alto porcentaje de apoptosis. Cuando este mismo experimento fue realizado en presencia de inhibidores de caspasas, sólo se observó prevención de la degradación del ADN pero no de la muerte celular. Por otra parte, también se observó que en neutrófilos humanos estimulados con ácido forbol mirístico (PMA), la actividad de la NADPH oxidasa suprimía la activación de caspasas, pero promovía la rápida externalización de fosfatidilserina, quedando nuevamente de manifiesto que los signos característicos de la apoptosis podían visualizarse en ausencia de actividad de caspasas (109,118,119).

4.6 Apoptosis del neutrófilo: su papel en la resolución de los procesos inflamatorios agudos

Los granulocitos neutrófilos constituyen el tipo celular preponderante en los procesos inflamatorios agudos de diferente etiología. Ya hemos mencionado que cumplen un papel crítico en la inmunidad antimicrobiana y también en diversos procesos de hipersensibilidad y/o autoinmunidad. La fisiología de los neutrófilos, como así también la de cada uno de los elementos celulares y humorales que integran la respuesta inmune, debe atenerse a un principio dual: a) demostrar alta eficiencia en su capacidad de mediar una respuesta de protección frente a noxas externas y b) ser sensibles a la acción de mecanismos, autócrinos, parácrinos y/o endócrinos, que tiendan a modular los mecanismos efectores puestos en marcha, de modo de lograr que la agresión tisular en el huésped sea mínima. Así, respecto a los mecanismos propios a la inmunidad adaptativa, se observa que la expansión clonal de los linfocitos T encuentra un mecanismo eficiente de control en la actividad inhibitoria de la dupla CTLA4-B7-1/B7-2 y en la actividad proapoptótica del sistema Fas/FasL. En relación a los mecanismos propios de la inmunidad innata, observamos que la activación del macrófago es modulada vía la acción de citoquinas inhibitorias, básicamente, IL-10 y TGF β (120).

Cómo se regula la actividad del neutrófilo en el foco inflamatorio? Esta pregunta no tiene aún una respuesta certera. Es conocido que hay ciertas citoquinas como la IL-10 y el TGF β que median un efecto inhibitorio sobre la actividad inflamógena del neutrófilo (120). Un amplio consenso, no obstante, sugiere que el control de la actividad inflamógena del neutrófilo, en contraste con el macrófago, es ejercida, básicamente, a través de mecanismos que operan promoviendo su apoptosis. La apoptosis de los neutrófilos parece jugar un papel crítico en la resolución de los fenómenos inflamatorios agudos. Los neutrófilos apoptóticos, a diferencia de los necróticos, mantienen la integridad de su membrana celular, evitando así que su tremendo potencial histotóxico sea ejercido sobre el tejido circundante en el foco inflamatorio. En este mismo sentido, debe destacarse la rápida depuración "in vivo" de los neutrófilos apoptóticos los cuales, a través de mecanismos de reconocimiento redundantes, son rápidamente fagocitados por macrófagos tisulares y fagocitos no profesionales (células epiteliales, fibroblastos, y diversas tipos celulares parenquimatosos). Se han identificado diversos receptores que participan del reconocimiento y fagocitosis de las células apoptóticas. Entre ellos

podemos mencionar al receptor *scavenger* tipo A, al CD36, al receptor de fosfatidilserina y al CD14 (120, 121, 122, 123, 124).

Por otra parte, ha sido demostrado que la progresión temprana del fenómeno apoptótico en el neutrófilo se asocia con una pérdida dramática en su funcionalidad (123-124).

Numerosos mediadores inflamatorios han sido involucrados en la modulación de la apoptosis del neutrófilo. Los péptidos formilados bacterianos, los LPS, así como también la IL-2, la IL-6, la IL-8 y el GM-CSF, han demostrado capacidad de retardar la apoptosis. Entre ellos, es el GM-CSF aquel que media un efecto más dramático, prolongando la vida media del neutrófilo "in vitro" de 24-36 hs a 120 hs. Por otra parte, agentes tales como proteasas extracelulares y bacterias han mostrado capacidad de promover la apoptosis del neutrófilo (122-125)

Es sabido también, que los genes *bcl-2*, *bcl-x*, *c-myc* y *p53* no se expresan en neutrófilos maduros, pero si se expresan constitutivamente las proteínas pro-apoptóticas *bax*, *bid*, *bak* y *bad*. Se ha descripto recientemente la expresión de proteínas anti-apoptóticas, pertenecientes a la familia *Bcl-2*, denominadas *Mcl-1* y *A1*. La proteína *Mcl-1* se encuentra en neutrófilos de sangre periférica y sus niveles decrecen cuando se ha iniciado el proceso apoptótico (126,127,128).

En el año 1996 Klebanoff y colaboradores (129) demostraron que los neutrófilos, a diferencia de los eosinófilos y monocitos expresan no sólo *Fas* sino también *FasL*. El sistema *Fas/FasL* actuaría como un potente promotor de la apoptosis de los neutrófilos. Merece destacarse que a diferencia de lo observado en linfocitos T, en donde la activación celular induce la expresión de *FasL*, la expresión del sistema *Fas/FasL* en neutrófilos es constitutiva. Ello sugiere una posible participación del mismo en el control de la sobrevivencia del neutrófilo (129).

Pese al consenso prácticamente unánime, respecto de la relevancia de la apoptosis en la fisiología del neutrófilo, los mecanismos básicos que la regulan no han sido dilucidados. Cuál es el impacto de la vía intrínseca en la modulación de la apoptosis del neutrófilo? por qué el neutrófilo tiene, entre todos los diferentes tipos leucocitarios, la vida media más corta? cuál es el papel de las proteínas de la familia *Bcl-2* en el control de la apoptosis del neutrófilo?. Estas preguntas no han encontrado aún una respuesta satisfactoria. Es de esperar que un mejor conocimiento de los mecanismos involucrados en la inducción y modulación del fenómeno apoptótico en el neutrófilo permita el

desarrollo de estrategias terapéuticas racionales, aptas para modular farmacológicamente el curso de la respuesta inflamatoria aguda en beneficio del huésped.

5. Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α)

En el año 1985, Lloyd Old encuentra en el plasma de ratones inoculados con LPS un factor capaz de inducir, *in vivo* e *in vitro*, la necrosis de ciertos tumores murinos. Poco después, A. Cerami y B. Beutler, descubren que el estado de caquexia, observado en conejos infectados crónicamente con *Trypanosoma brucei*, resulta de la presencia de una sustancia en el suero, a la que los autores denominan "cachectin". Rápidamente, ambas observaciones condujeron a trabajos que identificaron una nueva citoquina, que se presenta bajo la forma de un homotrímero de 157 aminoácidos, el TNF- α . En años recientes se ha demostrado que el TNF- α juega un papel central en los mecanismos efectores y regulatorios de la respuesta inmune. Así, la producción defectuosa de TNF- α , como también una producción exacerbada del mismo, ha sido involucrada en la etiopatogénesis de numerosas enfermedades: sepsis, malaria cerebral, diabetes, cancer, osteoporosis, rechazo de aloinjertos y enfermedades autoinmunes tales como esclerosis múltiple y artritis reumatoidea (130-133).

Los macrófagos activados constituyen, sin lugar a dudas, desde el punto de vista cuantitativo, la fuente de producción de TNF- α de mayor relevancia. El estímulo más potente para la inducción de su producción es el LPS bacteriano. Por otra parte, diversas citoquinas han demostrado la capacidad de inducir su producción: interferón- γ , IL-2, GM-CSF, CSF-1, y el propio TNF- α , a través de un mecanismo autócrino y/o parácrino. Otros tipos celulares capaces de producir TNF- α son: linfocitos T, particularmente, aquellos diferenciados en un perfil TH1; células NK, mastocitos (quienes muestran depósitos granulares de TNF- α); neutrófilos, queratinocitos, astrocitos, células de la microglía, células musculares lisas, células intestinales de Paneth y diversos tipos de células tumorales. (134)

En los fagocitos mononucleares, el TNF- α es sintetizado como una proteína de membrana no-glicosilada, con una porción amino-terminal intracelular y una gran porción c-terminal extracelular. El TNF- α es expresado en la membrana de los macrófagos como un homotrímero, hasta que un fragmento de 17KD de cada subunidad es clivado por proteólisis mediada por una metalloproteasa de la matriz celular, generando la forma

secretoria del TNF- α , que circula como un homotrímero estable de 51KD. El TNF- α asume una estructura espacial piramidal de tres lados (donde cada uno de los lados está formado por una subunidad) (135,136).

Una función crítica del TNF- α es estimular el reclutamiento de los neutrófilos y monocitos en el sitio de injuria, y activar a estas células a fin de erradicar a los agentes patógenos causantes de la injuria tisular. El TNF- α , puede mediar esta acción induciendo la activación del endotelio vascular y los leucocitos (136), como se describe en la **Figura 6**.

Prácticamente todas las células nucleadas pueden responder al TNF- α , ya que suelen expresar alguno de los dos tipos de receptores que han sido definidos: TNFR1 (55 kDa) y TNFR2 (75 kDa)(ver más adelante) (136). Las principales actividades del TNF- α se ilustran también en la **Figura 6**.

Particularmente, en relación a los granulocitos neutrófilos se ha demostrado que el TNF- α es capaz de mediar una serie de respuestas tales como: a) incrementar la expresión de CD11b/CD18 (MAC-1) facilitando la adherencia de neutrófilos al endotelio; b) inducir/facilitar la degranulación celular; c) incrementar la capacidad fagocítica y la generación de IRO en respuesta a agonistas convencionales; d) potenciar la actividad citotóxica dependiente de anticuerpos y e) potenciar su respuesta migratoria inducida por ciertos quimioattractantes. Estas observaciones sugieren para el TNF- α un papel amplificador de la capacidad inflamógena del neutrófilo (137-141).

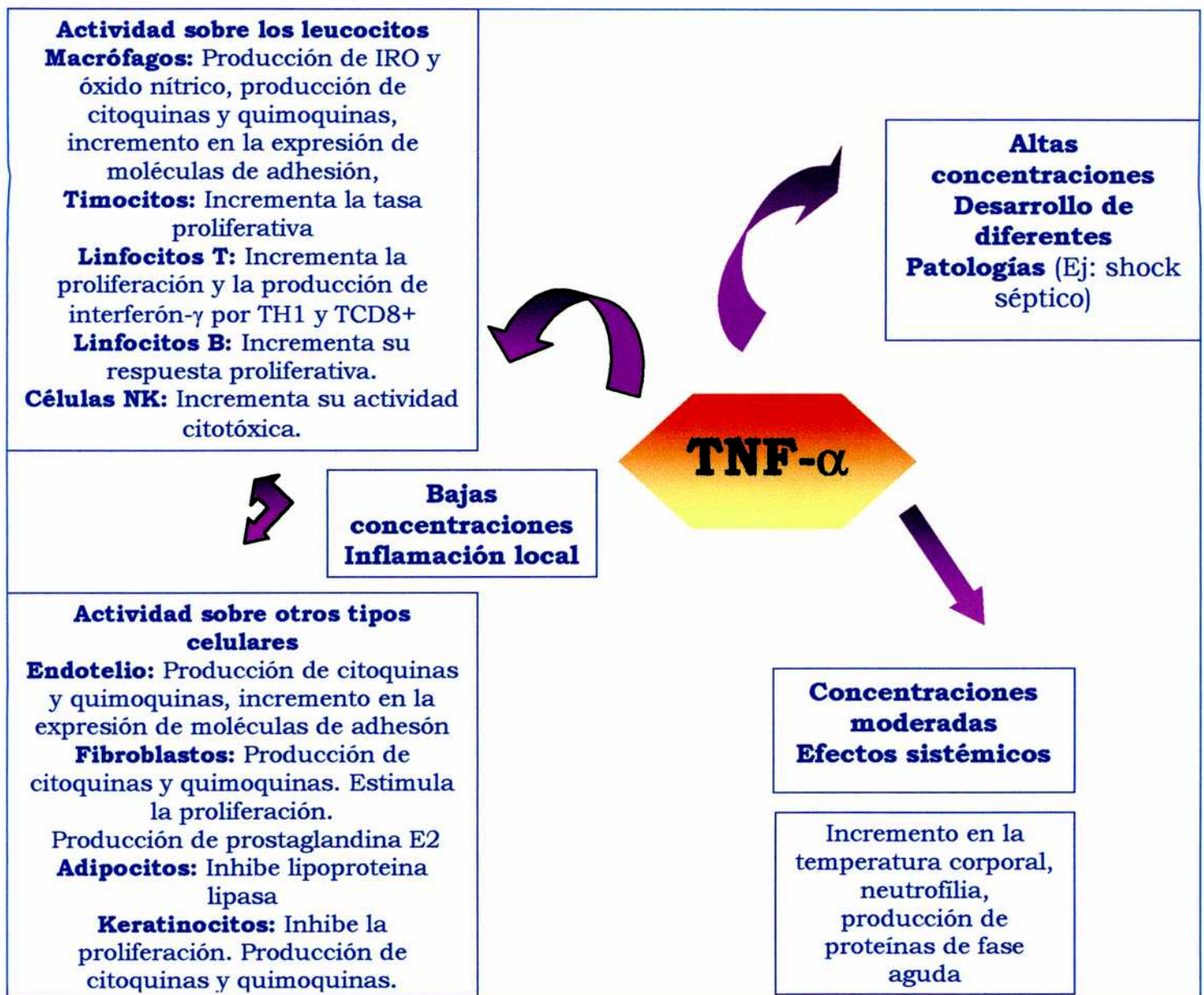


Figura 6: Principales funciones del TNF- α en diferentes poblaciones celulares.

6. Transducción de señales a través de los receptores para TNF- α (TNF-R)

Los receptores de TNF- α forman parte de una gran familia de proteínas denominada TNF/NGF (nerve growth factor), familia que presenta dominios extracelulares altamente conservados y ricos en cisteína. Entre los miembros de esta familia podemos mencionar: el receptor de linfotóxina β (LT β), Fas (CD95, Apo-1) y CD40. Estos receptores se diferencian estructuralmente en sus dominios citoplasmáticos, y se caracterizan porque ninguno de ellos exhibe alguna función enzimática, todas las señales resultan enteramente del reclutamiento de proteínas adaptadoras (142).

Se han descrito, dos receptores para el TNF- α : uno de 55KD (llamado receptor de tipo 1, TNF-R1) y otro de 75KD (llamado receptor de tipo 2, TNF-R2). Ambos receptores difieren significativamente en sus afinidades al TNF- α , siendo el TNF-R1 el que presenta mayor afinidad. Por otra parte, el TNF-R1 muestra mayor homología con el Fas/CD95, que con el TNF-R2, a nivel de sus dominios intracelulares (135,136). La unión del ligando a su receptor induce trimerización, o más comúnmente *oligomerización* del receptor sobre la superficie celular, y esto permite la interacción de diferentes moléculas adaptadoras con los dominios citoplasmáticos del receptor de TNF- α (142).

Las funciones biológicas del TNF- α están mediadas, fundamentalmente, a través del TNF-R1. La interacción TNF- α -TNF-R1 gatilla una serie de eventos intracelulares que resultan, finalmente, en la activación de dos factores de transcripción: NF- κ B y c-Jun, o bien en la inducción de muerte celular programada. Estos factores de transcripción son los responsables de la expresión de una serie de genes, cuya actividad resulta crítica en procesos tan diversos como crecimiento celular y apoptosis, desarrollo embrionario, oncogénesis, inmunidad innata y adaptativa (143-146).

La etapa inicial en el proceso de señalización resulta de la unión del TNF- α al dominio extracelular del TNF-R1, con la consecuente liberación de la proteína inhibitoria silenciadora de los dominios de muerte (SODD) desde el dominio intracelular del receptor (ICD) (143-144). La microagregación de los ICD conduce al reconocimiento por la proteína adaptadora del dominio de muerte asociado al TNF-R1 (TRADD), el cual recluta proteínas adicionales: RIP (*receptor-interacting protein*), TRAF2 (*TNFR associated factor 2*) y FADD (dominio de muerte asociado a Fas) (**Figura 7**). Esta última proteína recluta a caspasa 8, quien es activada, posiblemente, a través de un proceso autocatalítico,

conduciendo a la activación de la cascada de caspasas. La proteína TRAF-2 recluta cIAP-1 y cIAP-2, dos proteínas antiapoptóticas. Esta misma proteína activa MAPKKK (*mitogen activated protein kinase kinase kinase*) o ASK1 (*apoptosis-stimulated kinase 1*), activando así la cascada de kinasas conducente a la activación de la c-Jun kinasa, una kinasa que fosforila c-Jun y AP-1, incrementando su actividad transcripcional (143-144). Por último, la protein kinasa RIP resulta crítica en relación a la tercer vía transduccional, gatillada a través de TNF-R1, la cual conduce a la activación de NF- κ B. La translocación al núcleo del factor de transcripción NF- κ B depende de la ubiquitinización y degradación del inhibidor de κ B (I κ B), quien retiene a NF- κ B en el citoplasma. Esta ubiquitinización es dependiente de la fosforilación de I κ B por un complejo multiproteico (IKK-quinasa), cuyo core se compone de dos subunidades catalíticas, IKK α e IKK β y una subunidad regulatoria denominada NEMO (*NF- κ B essential modulator*). Además, el complejo IKK contiene una *chaperona* kinasa específica compuesta de Cdc37 y Hsp90, la que juega un papel importante en el arrastre del complejo desde el citoplasma a la membrana (147-150).

Un aspecto particularmente interesante de la señalización inducida a través del TNF-R1 es el concerniente a la interacción entre sus tres vías de señalización: la vía apoptótica (FADD), la conducente a la activación de NF- κ B y aquella asociada a la activación de c-Jun. Así, el impedimento en la activación de NF- κ B resulta en un incremento en la actividad proapoptótica mediada por TNF- α a través de FADD, como así también en la potenciación de la vía c-Jun. No obstante, es muy poco lo que se conoce respecto de estos procesos interactivos. Su análisis permitirá comprender las múltiples y frecuentemente opuestas funciones traducidas por el TNF-R1 en diferentes tipos celulares y/o en diferentes condiciones experimentales (147-151)

En lo que respecta al TNFR2, es conocido que participa en las señales proinflamatorias inducidas por el TNF- α , a través de la activación de TRAF-2, el cual media la activación de NF- κ B, c-Jun. La mayoría de los autores coinciden en que este receptor cumple un papel de menor relevancia en la defensa del huésped respecto del TNF-R1, afirmación sustentada en las observaciones realizadas en ratones *knockout* para el TNF-R2. Estos manifiestan un menor compromiso inmunológico, respecto de los ratones *knockout* para TNF-R1 (135).

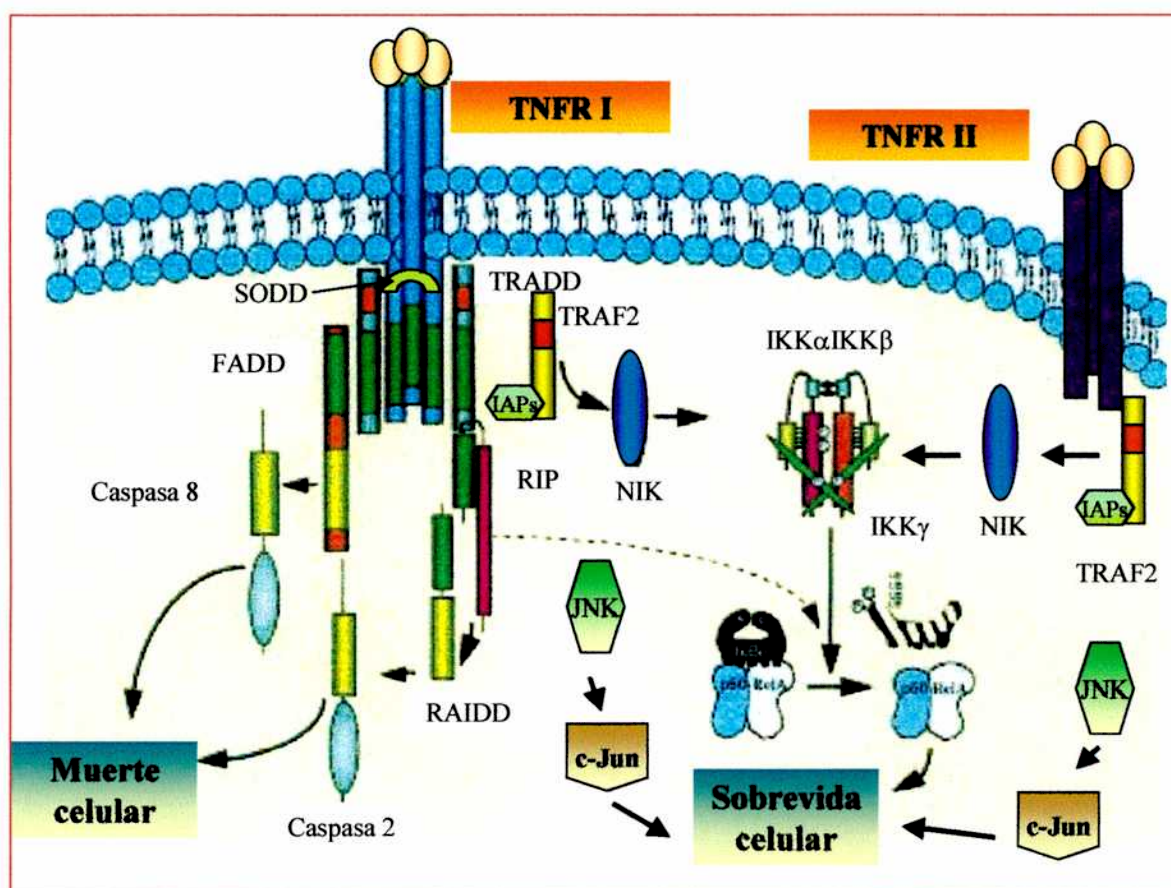


Figura 7: Vías de señalización del TNF-R1 y del TNF-R2. La unión del TNF- α induce la trimerización de los TNFR. Respecto al TNF-R1 esto promueve el reclutamiento de TRADD que interacciona con TRAF-2 conduciendo a la activación de la vía de NF- κ B y de JNK (el TNF-R2 utiliza las mismas vías pero sin la participación de TRADD). Por otra parte, el TNF-R1, a través del reclutamiento de FADD, activa la vía conducente a la apoptosis. Gráfico tomado de Cytokine Growth Factor Rev. (1999) 10 página 235-253.

7. *TNF- α* y apoptosis del neutrófilo

Trabajos previos han examinado el efecto del TNF- α sobre la apoptosis del neutrófilo. No obstante, los resultados obtenidos no son coincidentes. Colotta y colaboradores (124) observaron que el TNF- α prolonga la sobrevivencia del neutrófilo encontrando, a las 48 hs de cultivo, un porcentaje de células viables del 40% en los controles vs 85% en los tratados con TNF- α . Kettritz y colaboradores (152) por el contrario, mostraron que el tratamiento con TNF- α induce un leve pero rápido incremento en los porcentajes de apoptosis, que alcanza una meseta a las 4 hs de cultivo (11 vs 23%, controles vs células tratadas con TNF- α). Resultados similares fueron descritos por Yamashita y colaboradores (153), quienes observaron incrementos leves y rápidos en los porcentajes de apoptosis de neutrófilos a las 3 hs de cultivo (10 vs 30%, controles vs células tratadas con TNF- α). Si bien los resultados expuestos por Colotta y colaboradores (124), parecen contradecir los presentados por Kettritz y por Yamashita (152,153), esta aparente contradicción parece obedecer, en última instancia al momento en el cual se evalúa la apoptosis: 3-4 hs vs 48 hs. En efecto, un estudio reciente realizado por Murray y colaboradores (154), demostró que el TNF- α ejerce una acción bifásica sobre la apoptosis de los neutrófilos en cultivo. Induce una leve, pero rápida estimulación de la apoptosis, evidenciable a las 3 hs de cultivo pero, por el contrario, retrasa la misma cuando es evaluada luego de 18 hs de cultivo. Las razones subyacentes a este particular comportamiento no han sido aún definidas.

& Objetivos &

El TNF- α es una citoquina proinflamatoria que juega un rol crítico en los mecanismos de defensa anti-microbianos, como así también en la fisiopatología de diferentes enfermedades tales como sepsis bacteriana, artritis reumatoidea y síndrome de distress-respiratorio, en las cuales se observa la inducción de una respuesta inflamatoria autotóxica. Estudios recientes desarrollados en ratones deficientes en TNF- α sugieren que esta citoquina participaría, además, en la correcta y necesaria resolución de los procesos inflamatorios agudos (155), no obstante, los mecanismos involucrados no han sido aún definidos. Atendiendo a la posibilidad de que esta participación guarde relación con una posible actividad moduladora ejercida sobre la apoptosis del neutrófilo, en la presente Tesis examinamos de que modo el TNF- α afecta la sobrevivencia de los granulocitos neutrófilos. Intentamos, por otra parte, extender las observaciones realizadas en el neutrófilo a otros tipos celulares.

⌘ Materiales y Métodos ⌘

1. Reactivos

Se utilizaron las siguientes citoquinas: TNF- α , IL-2, IL-4, IL-6, IL-12 e IFN- γ todas ellas de Sigma (St Louis, MO, USA). Las citoquinas IL-1 α , IL-8, IL-10, IL-18 y GM-CSF fueron compradas a R & D Systems (Minneapolis, USA). Por otra parte se utilizó: zimosán, ácido forbol mirístico (PMA), el péptido quimiotáctico fMLP, LPS (*Escherichia coli* 055: B5), Concanavalina A (Con A), naranja de acridina, bromuro de etidio, yoduro de propidio, catalasa (proveniente de hígado de bovino, 50.000 U/mg) y superóxido dismutasa (proveniente de eritrocitos bovinos, 5.000 u/mg) (Sigma, St Louis, MO, USA). Inhibidor de NF κ B, sulfasalazina (Calbiochem., San Diego, USA), inhibidores de caspasas 3, 8 (Z-VAD-OME y Granzima B, respectivamente) (Bachem, Suiza), inhibidor de MEK1, U0126 (Calbiochem, San Diego, USA) y el inhibidor de p38: SB203580 (Calbiochem, San Diego, USA). El anticuerpo anti-TNF- α humano neutralizante policlonal, obtenido en conejo, fue comprado a R & D systems (NY, USA). Los anticuerpos IgG1 anti-FasL bloqueante (clon NOK-1), IgM anti-Fas (clon CH11) e IgG1 anti-Mcl-1, fueron comprados a Pharmingen (San Diego, USA). Los anticuerpos anti-receptor de TNF 75 (clon utr1) y anti-receptor TNF 55 (htr9), fueron obtenidos del V Workshop de antígenos de diferenciación leucocitarias. El anticuerpo anti-Bcl-2 fue comprado a Santa Cruz Techn. (CA, USA). El anticuerpo IgG1 anti-CD34 e IgG1 anti-CD18 fueron obtenidos de Immunotech (Francia).

2. Purificación de células mononucleares periféricas

Las células mononucleares periféricas (CMPH) o aquellas obtenidas de médula ósea, fueron purificados por centrifugación sobre Ficoll-Hypaque, de acuerdo al método descrito por Boyum (156). La solución de Ficoll-Hypaque se preparó agregando a 2,4 volúmenes de Ficoll 400 (Pharmacia, Uppsala, Suecia) al 9% en agua destilada, un volumen de Hypaque al 34% (Gobby-Novag, Argentina), siendo la densidad final de la solución a 4°C de 1,077 g/l.

3. Purificación de neutrófilos

Los neutrófilos fueron purificados a partir de sangre periférica de donadores voluntarios (IIHEMA, Academia Nacional de Medicina), por centrifugación en gradientes de Ficoll-Hypaque, sedimentación en dextrán y lisis de eritrocitos contaminantes. La solución de dextrán consistió en Dextrán (266 kD) al 6% en solución fisiológica (Sigma, St. Louis, USA).

4. Purificación de monocitos

Los monocitos fueron purificados por centrifugación en gradiente de Percoll discontinuo, con modificaciones respecto de un método previamente publicado (157). Para ello, las células mononucleares provenientes del gradiente de Ficoll-Hypaque fueron resuspendidos en 2ml de buffer Tyrode's (T10), diluido 1/10 a razón de 3×10^6 células/ml. Posteriormente las células fueron incubadas durante 10 min a 37°C en baño termostático, y se agregaron 8 µl/ml de solución de NaCl 9%. Las células fueron incubadas durante 25 min a 37°C y posteriormente se adicionaron 24 µl/ml de solución de NaCl 9% e igual volumen de T1 (2 ml). Las células mononucleares fueron sembradas sobre el gradiente discontinuo de Percoll con pipeta Pasteur de punta fina. Finalmente las células fueron centrifugadas a 1600 rpm durante 25 minutos y se recolectó el halo de monocitos, el cual mostró una pureza mayor al 85%.

5. Medio de cultivo

Salvo mención particular, los neutrófilos fueron cultivados en medio RPMI 1640 (Invitrogen Life Technologies, Grand Island, USA), suplementado con 1-5% de suero fetal bovino (SBF) (Invitrogen Life Technologies, Grand Island, USA) inactivado por calentamiento a 56°C durante 30 minutos y gentamicina (50 mg/ml).

6. Evaluación de la apoptosis

a) Evaluación de apoptosis y viabilidad por microscopía de fluorescencia

Fue realizada de acuerdo a protocolos descriptos previamente (158), empleando naranja de acridina (100 µg/ml), a fin de identificar a las células apoptóticas y bromuro de etidio (100

$\mu\text{g/ml}$), con el objeto de discriminar células viables y no viables. Con esta metodología, los núcleos de células no apoptóticas muestran variaciones en su intensidad de fluorescencia, reflejando la distribución de eucromatina y heterocromatina. Por el contrario, los núcleos apoptóticos se caracterizan por presentar una cromatina marcadamente condensada, la cual es uniformemente teñida por la naranja de acridina. A fin de establecer los porcentajes de células apoptóticas, al menos 200 células fueron examinadas en cada experimento.

b) Evaluación de apoptosis por medida del contenido de DNA por citometría de flujo

Los porcentajes de núcleos con contenido de ADN hipodiploide, fueron determinados de acuerdo al protocolo de Nicoletti (159), con ligeras modificaciones. Los pellets celulares (2.5×10^6 neutrófilos), fueron resuspendidos en 400 μl de una solución hipotónica de fluorocromo, conteniendo 50 $\mu\text{g/ml}$ de ioduro de propidio (IP), 0.1 % de citrato de sodio y 0.1% de Triton X-100. Luego de una incubación de 2 horas a 4°C, la fluorescencia de núcleos individuales coloreados por el IP fue determinada por citometría de flujo. La fluorescencia emitida por núcleos con contenido de ADN diploide, fue fijada a nivel del canal 250 en la escala logarítmica. Los núcleos apoptóticos (hipodiploides), emitieron fluorescencia en los canales 4 a 200 de la misma escala.

c) Evaluación de apoptosis por unión de anexina V y citometría de flujo

La unión de la anexina V a neutrófilos fue ensayada empleando un kit comercial (Immunotech). Los neutrófilos (2.5×10^5), tratados o no, fueron marcados con anexina V conjugada con fluoresceína e ioduro de propidio por 20 min a 4°C y analizados luego por citometría de flujo (doble marcación) empleando el software CellQuest (Becton Dickinson Immunocytometry System, San Jose, CA, USA) (160).

7. Marcación de antígenos celulares

a) Antígenos de membrana celular

Las células fueron incubadas con anticuerpos monoclonales (AcMo) específicos durante 20 min a 4°C. Luego de lavar las células 2 veces con PBS 1x con 1% de SBF, en el caso de marcaciones indirectas, las células fueron incubadas con inmunoglobulina de cabra-anti-ratón conjugada con isotiocianato de fluoresceína (fracción F(ab')₂) (CALTAG, Ca, USA) durante 20 min adicionales a 4°C. Finalmente se repitieron los lavados con PBS 1x suplementado con 1% de SBF.

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

b) Antígenos citoplasmáticos (Bcl-2)

Las marcaciones de antígenos citoplasmáticos, fueron realizadas de acuerdo a las instrucciones del fabricante del Kit de Fix and Per (CALTAG) con pequeñas modificaciones. Se procedió a incubar 1×10^6 células con 50 µl de solución A (fijadora), durante 15min. a 4°C. Posteriormente se realizaron 2 lavados con PBS 1x y se resuspendieron las células con glicina/PBS (0.1mg/ml) durante 15min. a 4°C, a fin de evitar uniones inespecíficas. Finalmente se repitieron los lavados con PBS 1x y las células fueron incubadas en 50µl de solución B (permeabilizadora) junto al Ac.Mo correspondiente durante 15min. a 4°C.

c) Detección de antígenos desnaturalizados (Mcl-1)

Fueron fijadas 10^6 células en un solución al 2% de formol en PBS durante 15min. a 4°C. Posteriormente se realizaron 2 lavados con PBS 1X y se resuspendieron las células en metanol frío durante 15 min a 4°C; se repitieron los lavados y se incubaron las células, en las mismas condiciones previamente descriptas, con glicina/PBS (0.1mg/ml). Finalmente se realizó la inmunomarcación convencional (161).

8. Evaluación de la pérdida del potencial de membrana mitocondrial

Los neutrófilos, tratados o no con TNF- α y los agonistas, fueron incubados por 15 minutos a 37°C con Rhodamina 123 (Sigma, St Louis, MO, USA) (0.3 μ g/ml), colorante catiónico lipofílico que tiende a acumularse principalmente en mitocondrias. Luego de lavados, los neutrófilos fueron cultivados con diferentes agonistas, posteriormente, la fluorescencia emitida por las células fue determinada por citometría de flujo (Becton Dickinson Immunocytometry System, San Jose, CA, USA).

9. Cambio de forma del neutrófilo

Los neutrófilos, estimulados o no, fueron incubados por 15 minutos a 37°C con agitación. Luego, las células fueron lavadas, resuspendidas en PBS y fijadas por el agregado de un volumen igual de glutaraldehído al 0,5% en PBS. El cambio de forma fue determinado por citometría de flujo y los resultados expresados como valor medio de FSC (parámetro forward side scatter).

10. Cultivo de sangre entera

En un grupo de experimentos se evaluó el efecto del TNF- α sobre la apoptosis de neutrófilos en cultivos de sangre entera. La sangre fue diluida (20% v/v) en medio RPMI 1640 y una alícuota de 0.10 ml de la suspensión fue cultivada en microplacas de 96 pozos de fondo plano. Las muestras de sangre fueron tratadas con TNF- α y estimuladas con diferentes agonistas, evaluándose la apoptosis por microscopía de fluorescencia como se describe en la sección 6a.

11. Cultivo de células dendríticas

La obtención de células dendríticas a partir de sangre periférica fue realizada según la metodología descrita por Romani y colaboradores (163). Se tomaron 20-30 ml de sangre periférica de donantes normales y se realizó un gradiente de Ficoll-Hypaque. Las células mononucleares fueron resuspendidas en RPMI 1640, 2mM de L-glutamina (Invitrogen Life Technologies, Grand Island, USA) y 20 μ g/ml de gentamicina. Se sembraron 1×10^6 – 3×10^6

células mononucleares/ml sobre placas de Petri 100 x 20 mm. Se dejaron 2hs a 37 °C para permitir la adherencia. Luego se lavó con solución fisiológica para retirar las células no adheridas (linfocitos). Las células adheridas (mayormente monocitos) fueron cultivadas en estufa a 37° C en una atmósfera con 5% de CO₂ durante 7 días, con medio RPMI 1640 suplementado con 10% SBF + 800 U/ml de GM-CSF y 500 U/ml IL-4, 2mM de L-glutamina y 20µg/ml 2-β Mercaptoetanol. Los cultivos fueron suplementados cada 2 días con 1ml de medio de cultivo con las citoquinas indicadas.

12. Cultivo de células endoteliales obtenidas de vena de cordón umbilical humano (HUVEC)

Se colocaron gasas estériles en una placa de Petri, se humedecieron con buffer RL (Ringer- Lactato) y se incubaron en la estufa a 37 °C hasta ser utilizadas. Se procedió a limpiar con solución fisiológica el cordón umbilical y se cortaron los extremos del mismo. Posteriormente se localizó la vena umbilical, se colocó una llave de 3 vías a la que se acoplo un filtro de 0.2µm.

Se perfundió el cordón umbilical con el buffer RL (para eliminar pequeños coágulos), se repitió el procedimiento con colagenasa (0.5mg/ml en medio RPMI 1640) y se cerró el cordón con un *clump*, luego se continuó agregando colagenasa hasta completar aproximadamente 20ml. Se incubó el mismo durante 20 min en estufa de cultivo con 5% de CO₂ a 37 °C. Por último se recolectó el contenido del cordón umbilical mediante la apertura de llaves de tres vías y se inactivó la colagenasa por el agregado de medio suplementado con 10% de SBF (164).

Las células fueron lavadas e incubadas con medio de crecimiento para células endoteliales en botellas de cultivo previamente tratadas con gelatina al 2% en agua destilada. En los caso que se utilizaron filtros transwell de 3µm (Costar, USA), estos fueron pretratados con gelatina 0.1% y fibronectina 1% 2 hs antes de ser utilizados.

El medio de crecimiento para HUVEC fue preparado con medio RPMI 1640, 20% de SBF, 50µg/ml suplemento de crecimiento para células endoteliales (ECGS, Sigma), 2 mM de L-glutamina (Sigma), 45 µg/ml de heparina (Invitrogen Life Technologies, Grand Island, USA), 50µM de 2-β Mercaptoetanol (Sigma) y 50 µg/ml de penicilina-estreptomicina (Invitrogen Life Technologies, Grand Island, USA).

13. Ensayo de translocación de NF- κ B: ensayos de gel shift o retardo en geles de poliacrilamida

a) Preparación de extractos nucleares

La estimulación de los neutrófilos fue realizada con 10 ng/ml de TNF- α humano y/o zimósán (Z, 100 μ g/ml). Las células fueron incubadas durante 40 min a 37°C y lavadas 2 veces con PBS 1X. Luego se les agregó 800 μ l de Buffer A, previamente enfriado (ver Tabla). Se procedió a resuspenderlas y se las dejó en hielo durante 10 min., homogeneizando cada 2 min por inversión. Luego se les agregó 50 μ l de Nonidet P-40 (NP-40) (0.5%). Se agitó durante 10 segundos y se centrifugaron durante 10 min. a 3500 rpm a 4 °C, para decantar los núcleos celulares. El pellet fue lavado con 800 μ l de Buffer A sin NP-40 y centrifugado, nuevamente, durante 5 minutos a 3500 rpm a 4 °C. Finalmente, se resuspendió el pellet en 300 μ l de Buffer B y se incubó durante 15 minutos a 4 °C con agitación, se centrifugó durante 15 minutos a 15.000 rpm a 4 °C (165).

Luego de la extracción de las proteínas nucleares, éstas se cuantificaron por el método de Bradford (Bradford, 1976). En el momento de realizar el ensayo de unión al DNA, los extractos se diluyeron en buffer C.

Soluciones utilizadas

<i>Buffer A</i>		<i>Buffer B</i>	
<i>HEPES</i>	<i>10 mM</i>	<i>HEPES</i>	<i>10 mM</i>
<i>(pH=7.9)</i>		<i>(pH=7.9)</i>	
<i>MgCl₂</i>	<i>1.5 mM</i>	<i>MgCl₂</i>	<i>1.5 mM</i>
<i>KCl</i>	<i>10 mM</i>	<i>KCl</i>	<i>0.42 M</i>
<i>NP-40</i>	<i>0.5%</i>	<i>EDTA</i>	<i>0.2 mM</i>
		<i>Glicerol</i>	<i>25 %</i>

En el momento de usar los buffers (A y B) se agregó la mezcla espermina/espermidina y un cóctel de inhibidores de proteasas.

Espermina	0.15 mM
Espermidina	0.5 mM

Cóctel de inhibidores de proteasas

DTT	0.5 mM
PMSF	0.5 mM
Benzamidina	2 mM
Aprotinina	5 µg/ml
Leupeptina	5 µg/ml
Pepstatina	5 µg/ml

<i>Buffer C)</i>	
<i>Hepes/KOH</i>	<i>20 mM</i>
<i>pH 7.9</i>	
<i>KCl</i>	<i>60 mM</i>
<i>Glicerol</i>	<i>20 %</i>
<i>EDTA</i>	<i>0.25 mM</i>
<i>EGTA</i>	<i>0.125 mM</i>

b) Marcación de oligonucleótidos sintéticos doble cadena en 5'

Para realizar el ensayo de *gel shift* debe marcarse radioactivamente el oligonucleótido NF-κB (Santa Cruz Biotech.) conteniendo la secuencia κB: GGG GAC TTT CCC. Se marcaron 200 ng de oligonucleótido doble cadena con 100 µCi de $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP µCi/µl y 1 UE (unidad enzimática) de polinucleótido kinasa del fago T4 (PNK de Promega) en 25 µl finales (30 minutos a temperatura ambiente). Luego se precipitaron los oligonucleótidos marcados utilizando 1 µl de tRNA, 25 µl de agua, 5 µl de NaAcO 3 M y 2.5 volúmenes de etanol 100%. Se incubó 30 minutos a -70 °C, y se centrifugaron a 15.000 rpm durante 10 minutos. Por último se secó el pellet y se resuspendió en 200-400 µl de agua.

Como un control de unión inespecífica y para la normalización de las cantidades de las cantidades de proteínas unida al oligonucleótido que se comparan, se utilizó un oligonucleótido no relacionado a κ B y que une una familia de factores diferentes, tal es el caso del oligonucleótido CCAAT. En estos experimentos se utilizó el consenso correspondiente al promotor de fibronectina conteniendo la secuencia 5' GATCCCGGA GCCCGGGCCAATCGGCGCA. El mismo fue marcado utilizando el protocolo descripto para el oligonucleotido κ B (165).

c) Ensayos de retardo de la movilidad en geles nativos o gel shift

El extracto nuclear crudo fue incubado durante 15 min. en presencia de la sonda de DNA poli deoxiinosina-deoxicitidina, (dIdC) (DNA doble cadena, SIGMA) para evitar el exceso unión de proteínas inespecíficas. Para determinar la especificidad de los complejos obtenidos se realizaron ensayos de competición con oligonucleótidos conteniendo la secuencia específica κ B o bien CCAAT.

Mg ⁺⁺ /Espermidina 10 mM	2 μ l
Poli dIdC 400 ng/ μ l	1 μ l
Oligonucleótido competidor o anticuerpo	0-2 μ l
Extracto nuclear (3-6 μ g) en buffer C	10 μ l
Se completa con agua hasta 20 μ l finales.	

Se sembró inmediatamente en un gel de poliacrilamida 6% en TBE 0.25X (baja fuerza iónica para no interferir con la unión de las proteínas al DNA) y fue corrido a 200 V. Se utilizó azul de bromo-fenol sembrado en paralelo como control de la migración. El gel fue secado y expuesto a una película radiográfica el tiempo suficiente para visualizar los complejos formados (165)

14. Líneas celulares

Las líneas celulares: HL-60 (leucemia promielocítica humana) y U937 (monocítica) fueron cultivadas en medio RPMI 1640 suplementado con 10% de SFB. Las mismas fueron mantenidas a 37°C bajo una atmósfera de 5% de CO₂ y 95% de aire húmedo, realizando 2-3 pasajes semanales.

15. Purificación de células mononucleares de pacientes con Leucemia Mieloide Aguda (LMA)

Muestras de médula ósea provenientes de pacientes con diagnóstico de LMA confirmado, fueron obtenidas del IIHEMA, Academia Nacional de Medicina. Las muestras de médula ósea fueron diluidas en solución fisiológica y se purificaron las células mononucleares por centrifugación en gradientes de Ficoll-Hypaque, como se describió previamente. En la Tabla siguiente se describen las características clínicas de los pacientes estudiados.

Características de los pacientes con LMA

Paciente	Sexo	Edad	% de Blastos	FAB
1	<i>Femenino</i>	28	87%	M1 o M2
2	<i>Masculino</i>	73	60%	M1 o M2
3	<i>Femenino</i>	16	30%	M4
4	<i>Femenino</i>	8	30%	M4
5	<i>Masculino</i>	8	30%	M4
6	<i>Femenino</i>	29	50%	M3
7	<i>Masculino</i>	54	47%	M4 o M5
8	<i>Masculino</i>	—	40%	M4 o M5
9	<i>Femenino</i>	15	30%	M4
10	<i>Femenino</i>	73	83%	M3
11	<i>Femenino</i>	—	40%	M4
12	<i>Femenino</i>	—	—	M3
13	<i>Femenino</i>	21 meses	92%	M4 o M5
14	<i>Masculino</i>	76	97%	M3
15	<i>Femenino</i>	23	40%	M1 o M2
16	<i>Masculino</i>	—	30%	LMA 2

Para los estudios de inducción de apoptosis se utilizaron drogas quimioterapéuticas: Idarubicina (Zavedos-Pharmacia), Etopósido (Etocris- Kampel Martian).

16. Análisis estadístico de los datos

Las diferencias entre datos con distribución normal fueron analizados a través del test de t de Student. Los datos con distribución no normal, fueron comparados por el test no paramétrico de Wilcoxon y el test de Friedman para comparaciones entre grupos múltiples. Los valores de $P < 0,05$ fueron considerados significativamente diferentes.

& Resultados &

1. El $TNF-\alpha$ media un efecto "priming" sobre la apoptosis de neutrófilos

En un primer grupo de experimentos, examinamos los niveles de apoptosis en neutrófilos cultivados con $TNF-\alpha$, valorados a las 3 y 18 hs de cultivo, por microscopía de fluorescencia. Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 1**. Encontramos, en acuerdo con observaciones previas (124, 152-154), que el $TNF-\alpha$ indujo un leve pero significativo incremento en los porcentajes de apoptosis a las 3 hs de cultivo, en un rango de concentraciones comprendido entre 1 y 100 ng/ml. Por el contrario, no se observaron diferencias respecto de las células controles, al evaluar los niveles de apoptosis a las 18 hs de cultivo.

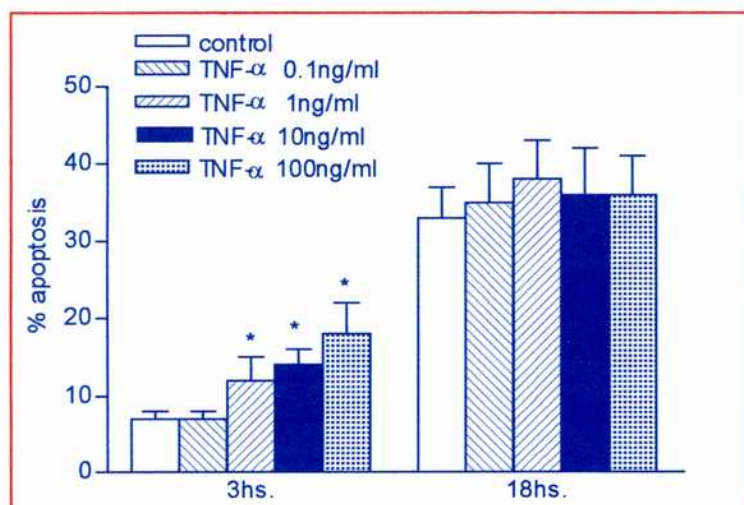


Figura 1. Efecto del $TNF-\alpha$ sobre la apoptosis de neutrófilos. Los neutrófilos (2.5×10^6 /ml) fueron cultivados con diferentes concentraciones de $TNF-\alpha$. (0.1, 1.0, 10 y 100ng/ml) durante 3 y 18 hs a 37° C. La apoptosis fue luego revelada por microscopía de fluorescencia. Los resultados se expresan como la media $\pm$ ES de 4 experimentos, * $p < 0.05$ comparado con los controles.

La apoptosis de los neutrófilos puede ser modulada por un amplio conjunto de agentes y citoquinas. Algunos de ellos han demostrado capacidad para retardar el proceso apoptótico, entre ellos el fragmento C5a, derivado de la activación del sistema complemento, el péptido quimiotáctico fMLP, la IL-8 y el factor estimulante de la formación de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF). Otros median una actividad promotora de la apoptosis como la IgG inmovilizada (IgGi), los eritrocitos recubiertos por anticuerpos IgG (IgG-E), el ácido forbol mirístico (PMA), el zimosán (Z) y bacterias como *Escherichia coli* (*E.coli*) (122-125,166). Nos preguntamos luego si, más allá del leve efecto promotor de la apoptosis mediado por el TNF- α , esta citoquina podría modular la acción preventiva o promotora de la apoptosis mediada por otros agentes. Con el objeto de examinar este aspecto, los neutrófilos fueron preincubados con TNF- α por 1-2 min y, posteriormente, fueron expuestos a un amplio conjunto de agonistas y citoquinas, valorándose la apoptosis a las 3 hs de cultivo. Los resultados obtenidos se ilustran en la **Figura 2a**. Ellos muestran, inesperadamente, que el TNF- α media un dramático efecto promotor de la apoptosis en neutrófilos expuestos a IgGi, IgG-E, eritrocitos recubiertos por IgM-C3b (CE), PMA, suero humano activado por zimosán (SAZ), Z, fMLP, *E.coli* y GM-CSF. Es interesante destacar, que la acción promotora de la apoptosis mediada por el TNF- α se evidencia, tanto por estímulos que individualmente median un efecto preventivo (GM-CSF) como por aquellos que promueven la apoptosis (IgGi, IgG-E, PMA, Z y *E.coli*). Por otra parte, cabe aclarar que la acción preventiva o promotora de la apoptosis mediada individualmente por estos agentes no se evidencia en la Figura 2, pues la apoptosis es revelada en forma muy temprana (3 hs de cultivo). En todos los casos, la acción *primante* de la apoptosis mediada por el TNF- α fue inhibida en porcentajes superiores al 86%, mediante el pretratamiento del TNF- α con concentraciones saturantes de un anticuerpo bloqueante, obtenido en conejo. Utilizamos como controles anticuerpos bloqueantes de interferón- γ , también obtenidos en conejo, los cuales no ejercieron efectos inhibitorios (datos no mostrados).

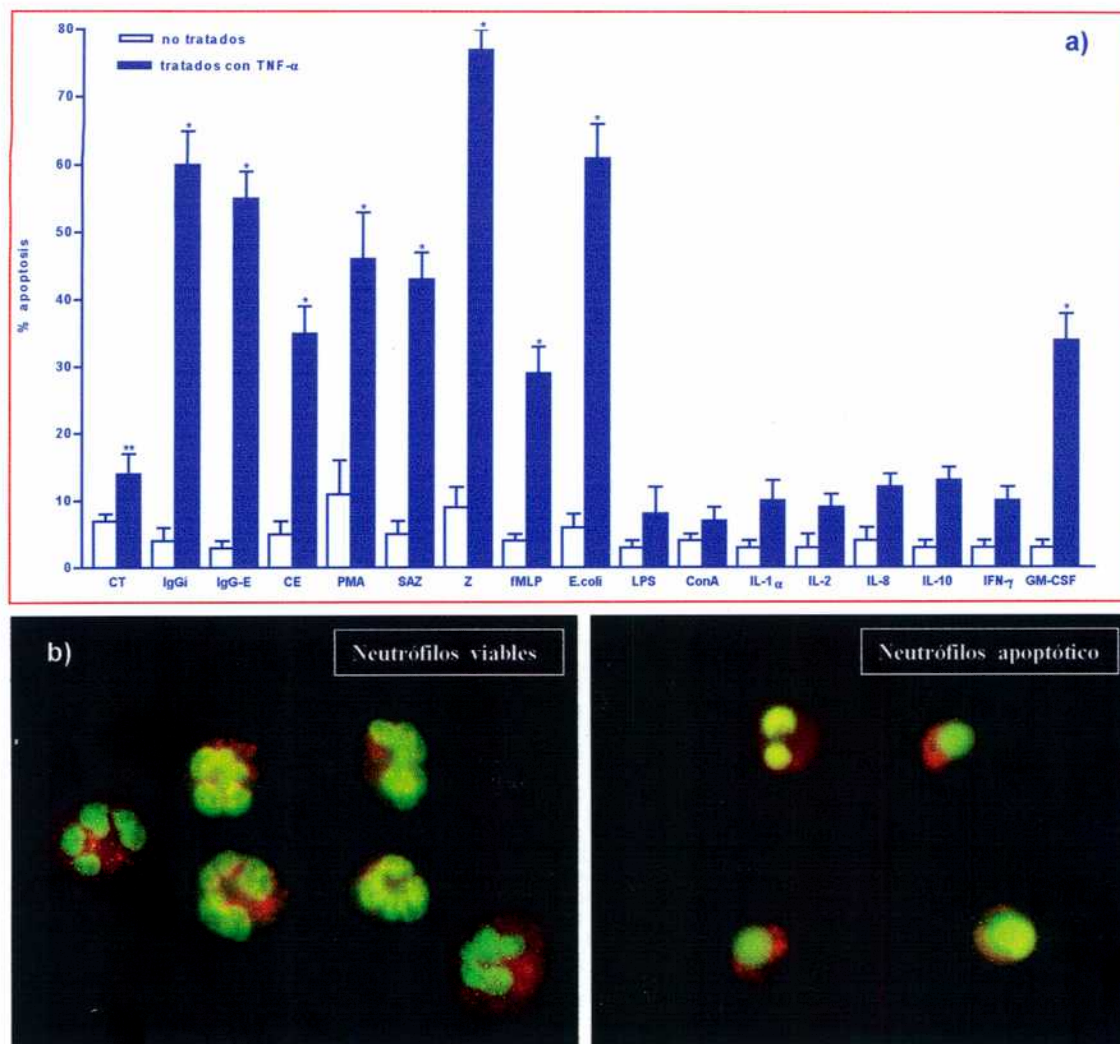


Figura 2 : a) El TNF-α media un efecto "priming" sobre la apoptosis del neutrófilo. Los neutrófilos (2.5×10^6 /ml) fueron cultivados en presencia o ausencia de TNF-α (10ng/ml) durante 1-2 min a 37° C. Posteriormente las células fueron tratadas con IgGi, IgG-E (0.25%v/v), CE (0.25%v/v), PMA (0.5-2.5ng/ml), ZAS (1/10), Z (50μg/ml), fMLP (10ng/ml), E.coli (neutrófilos: E. coli en relación 1:25), LPS (1μg/ml), Con A (10μg/ml) y diferentes citoquinas: IL-1α, IL-2, IL-8, IL-10, IFN-γ, GM-CFS (100ng/ml). Luego de 3 horas de cultivo, el porcentaje de células apoptóticas fue determinado por microscopía de fluorescencia. Los resultados son expresados como la media $\pm$ ES de 5-10 experimentos, *p < 0.01, vs neutrófilos cultivados, sólo con TNF-α, **p < 0.05, vs neutrófilos controles.

b) Imagen de microscopía de fluorescencia de neutrófilos viables y apoptóticos. Evaluación morfológica de núcleos viables y apoptóticos utilizando la técnica de naranja de acridina y bromuro de etidio

La Figura 2 muestra, por otra parte, que el efecto *priming* de la apoptosis ejercida por el TNF- α no se evidencia en neutrófilos expuestos a lipopolisacárido bacteriano (LPS) o concavalina A (Con A). A fin de confirmar que aún cuando bajo nuestras condiciones experimentales, el LPS y la Con A no evidenciaran el efecto *primante* de la apoptosis, pero sí fuesen capaces de inducir la activación celular de los granulocitos neutrófilos, evaluamos, la capacidad de los mismos de incrementar la expresión de la adhesina CD18 e inducir el cambio de forma celular, dos parámetros empleados usualmente para monitorear la activación del neutrófilo. Los resultados obtenidos se ilustran en la **Tabla 1**. Ellos indican que ambos agentes inducen la activación celular.

Tabla 1

	Expresión de CD18 (IMF)	Cambio de forma (MFSC)
Control	175 $\pm$ 23	312 $\pm$ 31
LPS	312 $\pm$ 27*	487 $\pm$ 29*
Con A	299 $\pm$ 16*	415 $\pm$ 21*

Neutrófilos no tratados vs células tratadas con LPS y Con A, respectivamente, media $\pm$ ES de 5 experimentos realizados, * p < 0.01 vs control.

2. Actividad promotora de la apoptosis de neutrófilos mediada por TNF- α : análisis por el test de anexina V y evaluación del contenido de ADN

Durante el transcurso del proceso apoptótico la fosfatidilserina, molécula normalmente presente en la capa interna de la membrana plasmática en una célula viable, comienza a expresarse a nivel de la superficie externa de la membrana plasmática. Esta molécula presenta una notable avidez por anexina V, fenómeno que permite monitorear los niveles de apoptosis en una población celular mediante el empleo de anexina V-FITC, por citometría de flujo (160). La acción proapoptótica mediada por el TNF- α , fue evaluada por el test de anexina V realizado en presencia de Ioduro de propidio, a fin de detectar células necróticas. Los resultados obtenidos (**Figura 3**) concuerdan con los descriptos en la Figura 2, donde la apoptosis fue evaluada por microscopía de fluorescencia.

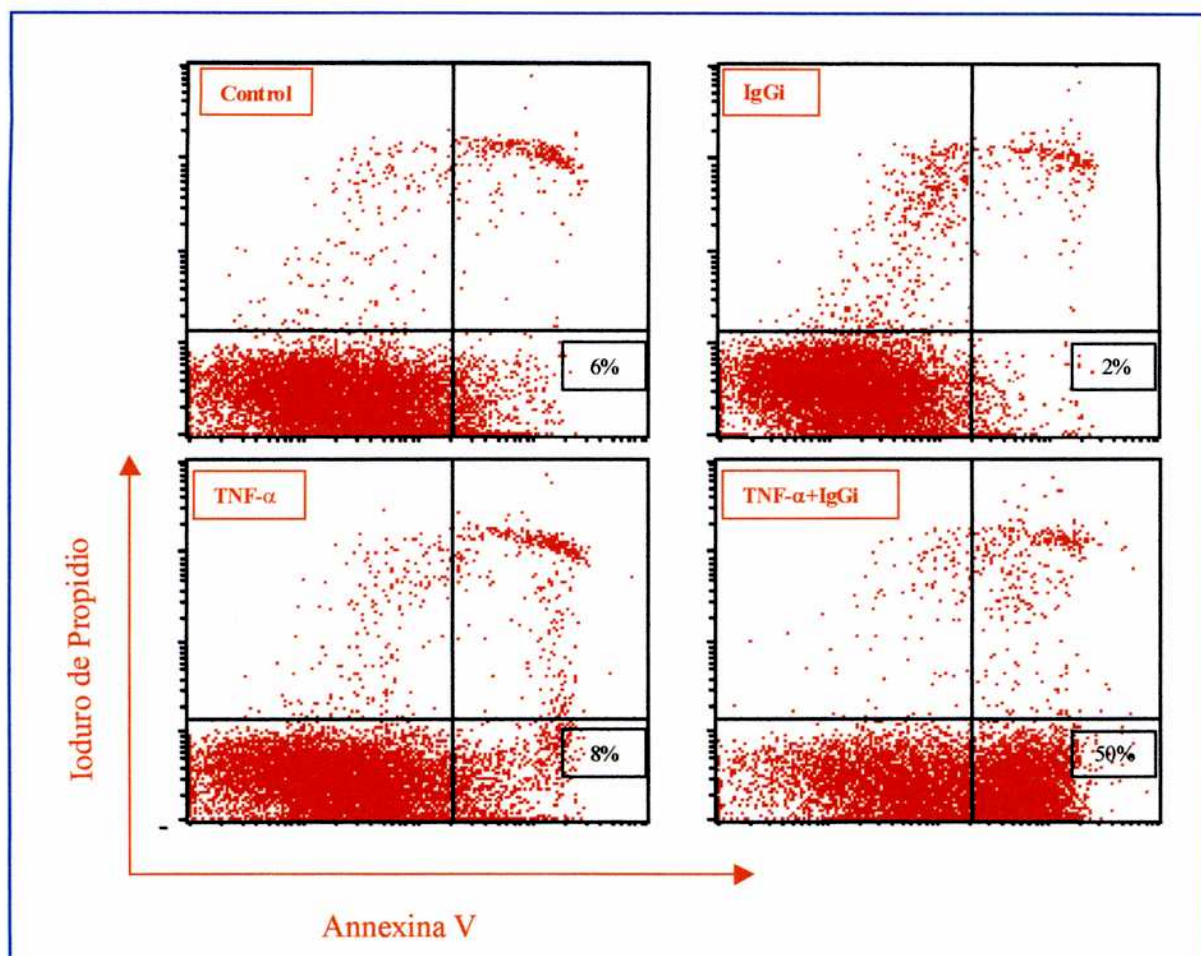


Figura 3: "Priming" de la apoptosis de neutrófilos por TNF- α : análisis por el test de anexina V. Los neutrófilos ($2.5 \times 10^6/\text{ml}$) fueron cultivados en presencia o ausencia de TNF- α (10ng/ml) durante 1-2 min a 37°C, posteriormente las células fueron tratadas con o sin IgG, (como se describe en la figura) durante un período de 3 horas. La apoptosis fue analizada usando la combinación de anexina V marcada con FITC e ioduro de propidio. La figura muestra un experimento representativo de 3 realizados. Los resultados se expresan como porcentajes de células apoptóticas.

Analizamos luego la apoptosis a través de una tercer metodología, tinción de núcleos celulares con ioduro de propidio. Esta técnica permite evaluar el porcentaje de núcleos con contenido de ADN hipodiploide, por citometría de flujo. Los resultados ilustrados en la **Figura 4** son coincidentes con aquellos obtenidos tanto por microscopía de fluorescencia como por el test de anexina V.

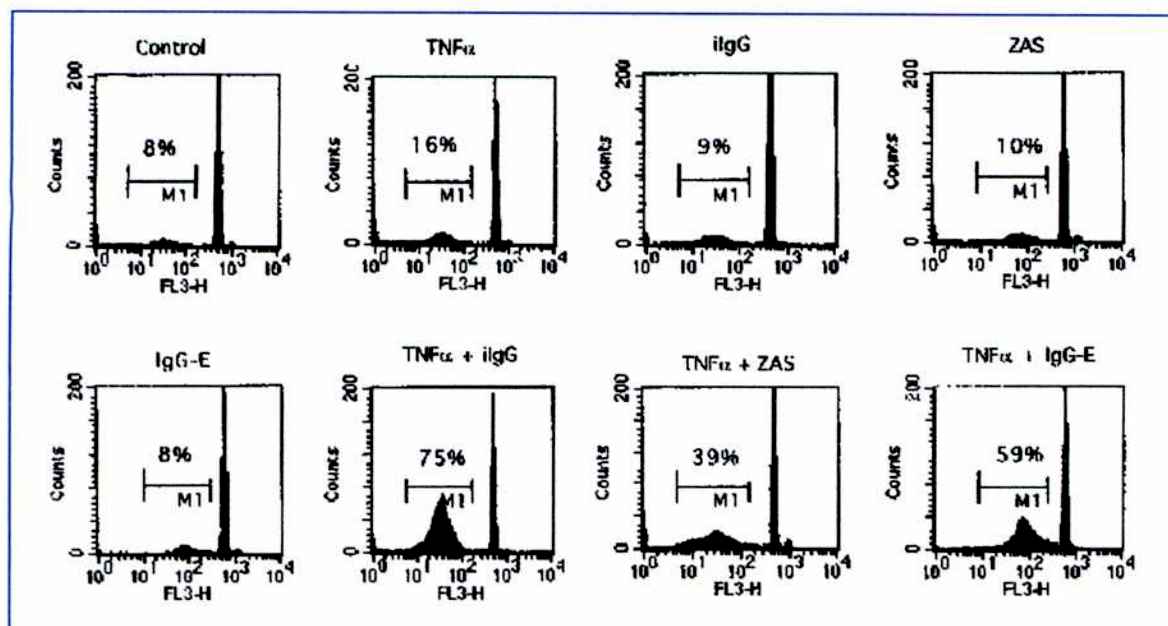


Figura 4: "Priming" de la apoptosis de neutrófilos por TNF- α : análisis de núcleos con contenido hipodiploide de ADN. Los neutrófilos ($2.5 \times 10^6/\text{ml}$) fueron cultivados en presencia o ausencia de TNF- α (10 ng/ml) durante 1-2 min a 37° C, luego las células fueron incubadas con IgGi, ZAS (1/10) o IgG-E (0.25 % v/v). Luego de 3 horas el porcentaje de células apoptóticas fue evaluado por citometría de flujo como se describe en materiales y métodos. La Figura muestra un experimento representativos de 6 realizados. Se indica el porcentaje (M1) de los núcleos con contenido de ADN hipodiploide.

3. Rango de concentraciones de TNF- α en el cual se expresa la actividad promotora de la apoptosis de neutrófilos

Examinamos posteriormente el rango de concentraciones en el cual el TNF- α ejerce su efecto proapoptótico. Para ello las células fueron cultivadas por 1-2 min a 37°C con diferentes concentraciones de TNF- α . Posteriormente, fueron expuestas a IgGi y SAZ, y el porcentaje de células apoptóticas fue evaluado tanto por microscopía de fluorescencia como por citometría de flujo, por tinción con ioduro de propidio, a fin de determinar los porcentajes de núcleos con contenido de ADN hipodiploide. Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 5**. Ellos indican que el TNF- α promueve la apoptosis de los neutrófilos en un rango de concentraciones comprendido entre 1 y 100 ng/ml.

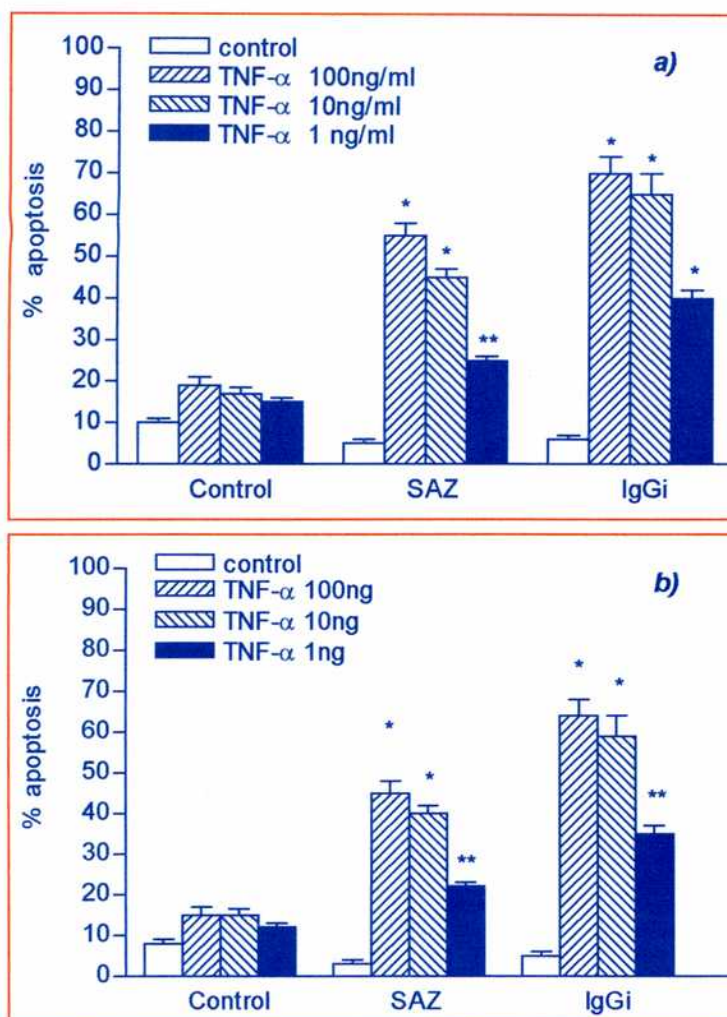


Figura 5: Rango de actividad del TNF- α en relación a su capacidad promotora de la apoptosis. Los neutrófilos (2.5×10^6 /ml) fueron cultivados con diferentes concentraciones de TNF- α (1, 10 y 100 ng/ml) durante 1-2 min a 37°C. Luego las células fueron estimuladas con ZAS (1/10) o IgGi, y la apoptosis fue revelada luego de 3 horas de cultivo por microscopía de fluorescencia (a) o tinción con yoduro de propidio por citometría de flujo (b). Los resultados se expresan como la media $\pm$ ES de 4-6 experimentos, * y ** $p < 0.01$ y $p < 0.05$, respectivamente, comparado con neutrófilos cultivados sólo con TNF- α .

4. Actividad promotora de la apoptosis de neutrófilos mediada por TNF- α : experiencias realizadas en sangre entera

Las experiencias descriptas en el presente trabajo fueron todas realizadas empleando neutrófilos purificados. No obstante, observaciones previas sugieren que los métodos aplicados usualmente para la purificación de neutrófilos pueden resultar en la activación de los mismos y/o en el compromiso de la integridad de la membrana citoplasmática (167). Es por ello que a fin de descartar que la acción promotora de la apoptosis mediada por el TNF- α pudiese deberse a alteraciones producidas en el neutrófilo durante el proceso de purificación, realizamos un conjunto de experiencias empleando sangre entera (diluida 20% v/v en medio de cultivo). Los resultados ilustrados en la **Figura 6**, muestran

que la promoción de la apoptosis por $\text{TNF-}\alpha$ se evidencia en sangre entera en forma coincidente con la observada en neutrófilos purificados (Figura 2).

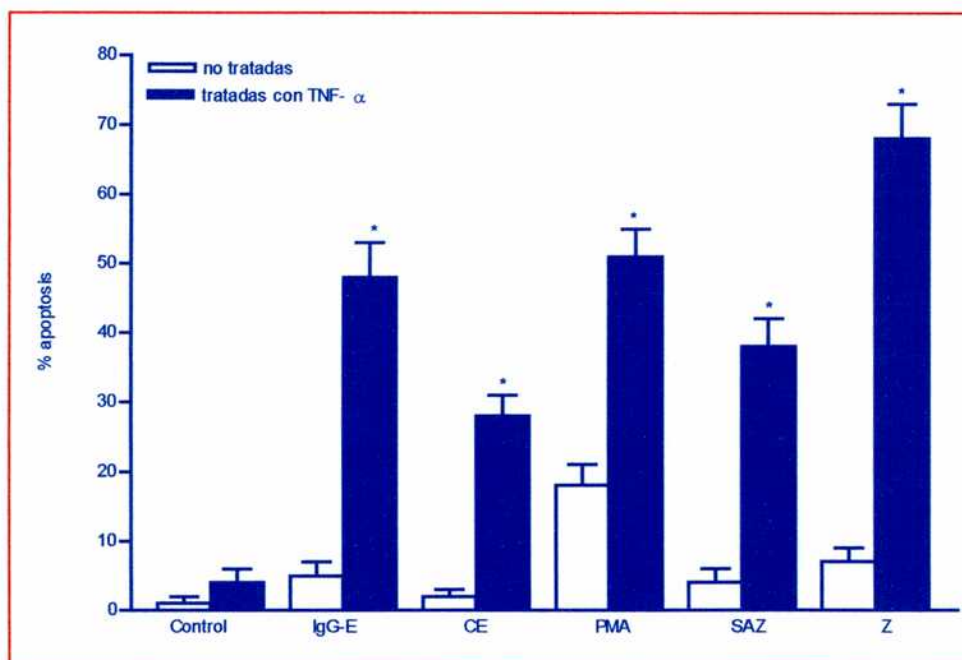


Figura 6: "Priming" de la apoptosis de neutrófilos por $\text{TNF-}\alpha$ en cultivos de sangre entera. Las muestras de sangre fueron diluidas (20% v/v) y tratadas con $\text{TNF-}\alpha$ (10 ng/ml) por 1- 2 min a 37 °C, posteriormente las células fueron cultivadas con IgG-E (1% v/v), CE (1% v/v), PMA (0.5-2.5 ng/ml), ZAS (1/10), o Z (50 $\mu\text{g/ml}$). Luego de 3 horas de cultivo, el porcentaje de células apoptóticas fue determinado por microscopía de fluorescencia. Los resultados se expresan como la media $\pm$ ES de 5 experimentos, * $p < 0.01$ comparado con neutrófilos cultivados sólo con $\text{TNF-}\alpha$.

5. Cinética de la actividad promotora de la apoptosis de neutrófilos mediada por $\text{TNF-}\alpha$

Los experimentos descriptos previamente fueron realizados con neutrófilos pretratados con $\text{TNF-}\alpha$ durante 1-2 min. Analizamos luego si el efecto promotor de la apoptosis mediado por el $\text{TNF-}\alpha$ se evidenciaba también con pretratamientos más prolongados. A tal efecto, los neutrófilos fueron cultivados por diferentes tiempos (30 min, 1, 3 y 18 hs) y luego expuestos a IgGi durante 3 hs adicionales, analizándose la apoptosis por microscopía de fluorescencia. Como se observa en la **Figura 7**, el efecto promotor de la apoptosis mediado por el $\text{TNF-}\alpha$ se evidencia tanto a tiempos cortos (30 min) como prolongados (18 hs).

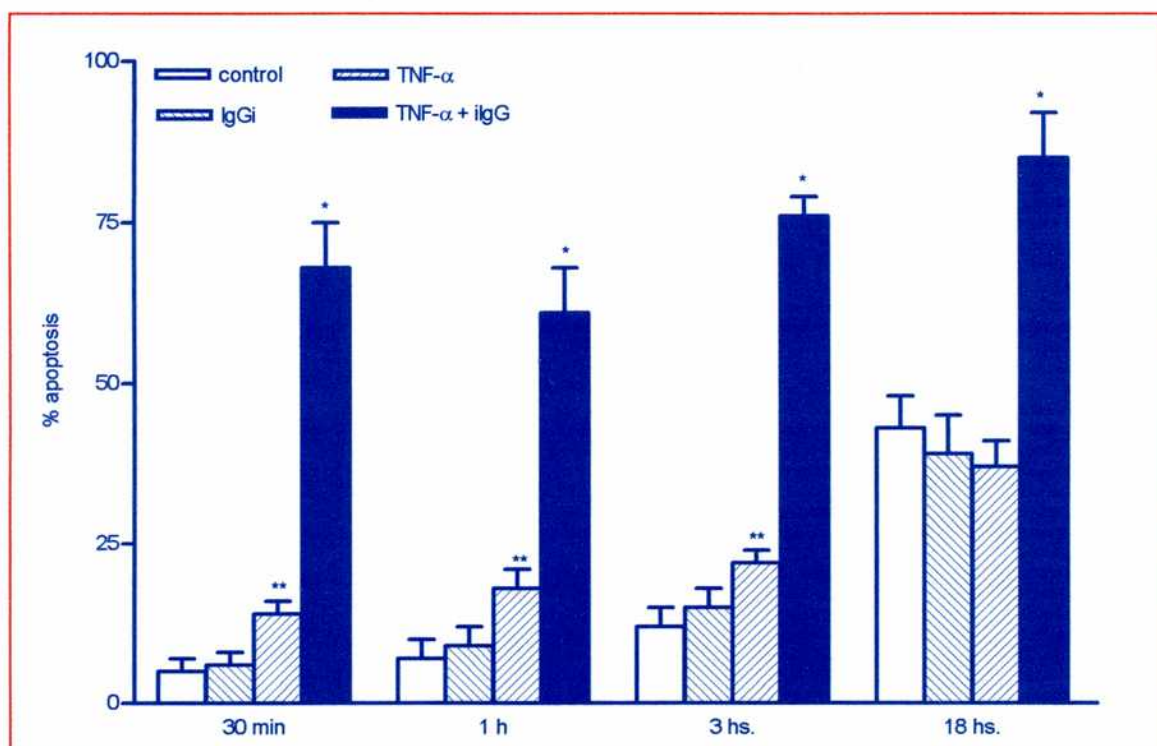


Figura 7: Análisis de la apoptosis de neutrófilos luego de diferentes tiempos de preincubación con $\text{TNF-}\alpha$. Los neutrófilos ($2.5 \times 10^6/\text{ml}$) fueron cultivados con o sin $\text{TNF-}\alpha$ (10 ng/ml) por diferentes tiempos (30 min, 1, 3 y 18 horas) a 37°C . Las células fueron cultivadas posteriormente en presencia o ausencia de IgGi por un periodo de 3 horas y la apoptosis fue revelada por microscopía de fluorescencia. Los resultados se expresan como la media $\pm$ ES de 4-5 experimentos, * $p < 0.01$ comparado con neutrófilos cultivados sólo con $\text{TNF-}\alpha$, en cada tiempo evaluado, ** $p < 0.05$ comparado con células controles.

6. La actividad promotora de la apoptosis de neutrófilos mediada por $TNF-\alpha$ no es reversible

Estudiamos luego si la actividad promotora de la apoptosis ejercida por $TNF-\alpha$ era reversible. Para ello, realizamos una serie de experimentos en los cuales el $TNF-\alpha$ fue removido por lavado luego de preincubar a los neutrófilos por 2 minutos a $37^{\circ}C$, finalmente las células fueron enfrentadas con Z. La apoptosis fue valorada por microscopía de fluorescencia a las 3 hs de cultivo. Los resultados obtenidos (Tabla 2) indican que la remoción del $TNF-\alpha$ del medio de cultivo luego de 2 min de tratamiento no inhibe su actividad promotora de la apoptosis.

Tabla 2:

	% de apoptosis	Los resultado se expresan como la media $\pm$ ES, n=6, * $p < 0.05$ vs control y ** $p < 0.01$ vs células tratadas sólo con $TNF-\alpha$.
Control	3 $\pm$ 2	
$TNF-\alpha$ (10ng/ml)	11 $\pm$ 2*	
Z (50 μ g/ml)	4 $\pm$ 2	
$TNF-\alpha$ +Z	61 $\pm$ 7**	

7. La capacidad del $TNF-\alpha$ de “primar” la apoptosis de los neutrófilos no es compartida por otras citoquinas

Analizamos luego si otras citoquinas podían ejercer también un efecto *priming* sobre la apoptosis, similar al mediado por el $TNF-\alpha$. Para ello incubamos a los neutrófilos durante 1-2 min con las siguientes citoquinas: IL-1 α , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-18, IFN γ y GM-CSF (100 ng/ml), las cuales no fueron luego removidas del medio de cultivo. Posteriormente, los neutrófilos fueron cultivados por 3 hs con Z o IgG-E a $37^{\circ}C$, revelándose la apoptosis por microscopía de fluorescencia. Como se observa en la Figura 8, ninguna de las citoquinas ensayadas fue capaz de mediar un efecto similar al $TNF-\alpha$.

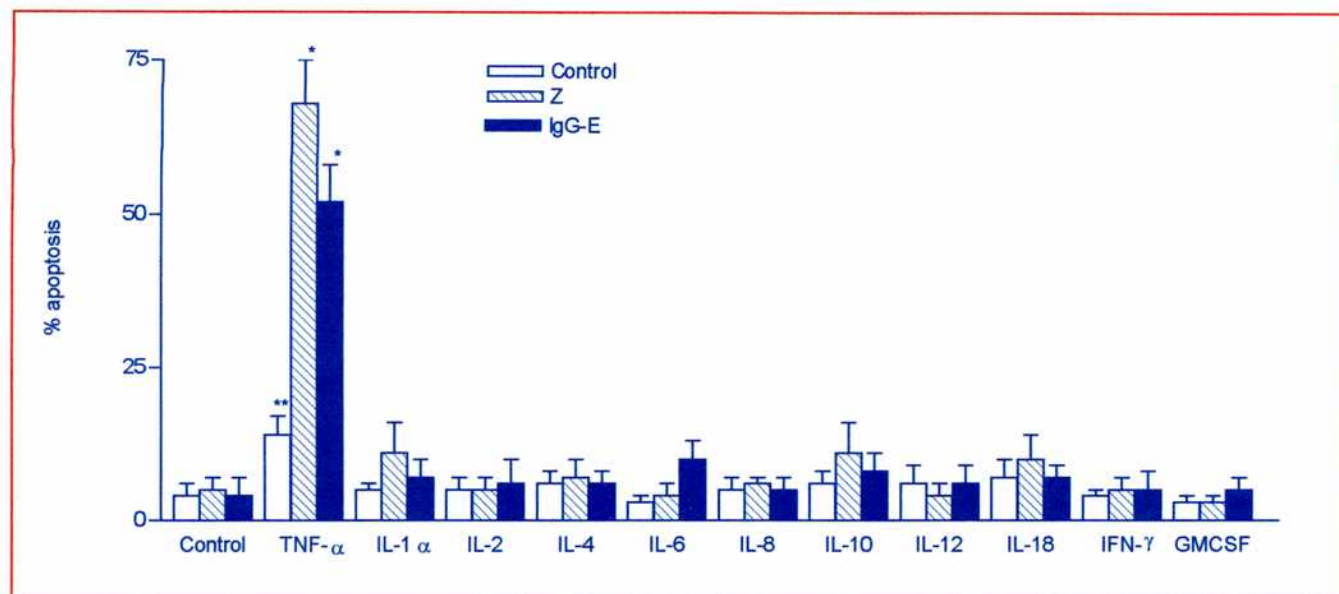


Figura 8: Análisis de la capacidad de diferentes citoquinas de mediar un efecto "priming" sobre la apoptosis de neutrófilos. Los neutrófilos ($2.5 \times 10^6/\text{ml}$) fueron cultivados en presencia o ausencia de $\text{TNF-}\alpha$ (10ng/ml), $\text{IL-1}\alpha$, IL-2 , IL-8 , IL-10 , $\text{IFN-}\gamma$, GM-CFS (100 ng/ml) durante 1-2 min a 37°C . Posteriormente las células fueron tratadas con IgG-E (0.25%v/v) o Z (50 $\mu\text{g/ml}$) por 3 horas, y el porcentaje de células apoptóticas fue determinado por microscopía de fluorescencia. Los resultados son expresados como la media $\pm$ ES de 4-7 experimentos, * $p < 0.01$ comparado con neutrófilos cultivados sólo con $\text{TNF-}\alpha$, ** $p < 0.05$ comparado con neutrófilos controles.

8. La actividad promotora de la apoptosis de neutrófilos mediada por $\text{TNF-}\alpha$ es ejercida sobre neutrófilos en reposo

En las experiencias descritas en los párrafos precedentes, los neutrófilos fueron tratados primero con $\text{TNF-}\alpha$ y luego estimulados por diferentes agonistas. Analizamos luego que sucedía si los neutrófilos eran primero tratados con el agonista y luego expuestos al $\text{TNF-}\alpha$. Los resultados obtenidos se ilustran en la **Figura 9**. Se observa que aquellos neutrófilos enfrentados a IgGi, IgG-E, ZAS, GM-CSF o fMLP, y luego expuestos a la acción del $\text{TNF-}\alpha$, no evidencian incremento en los niveles de apoptosis. Ello sugiere que la acción promotora de la apoptosis mediada por el $\text{TNF-}\alpha$ es ejercida sólo sobre neutrófilos en reposo.

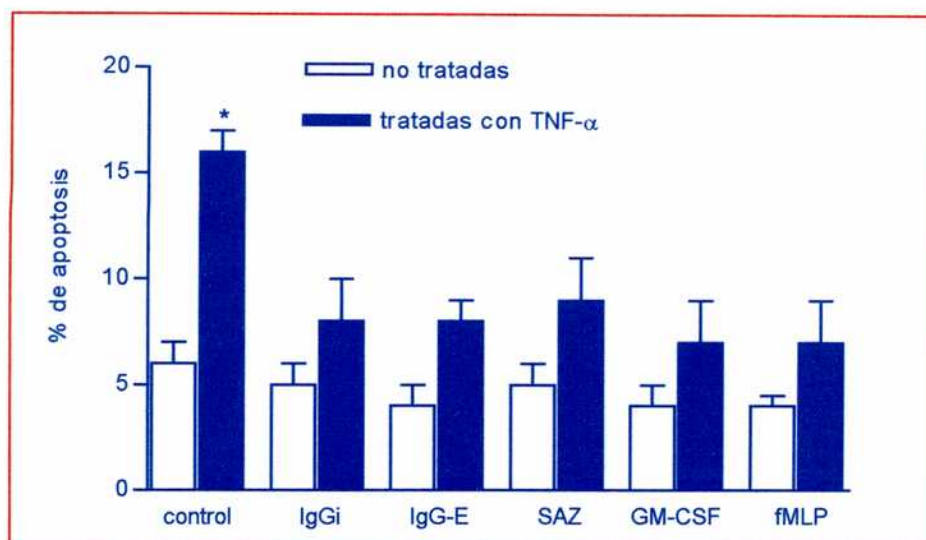


Figura 9: *TNF- α no incrementa la apoptosis de neutrófilos previamente activados por agonistas convencionales.* Los neutrófilos (2.5×10^6 /ml) fueron cultivados con o sin IgGi, IgG-E (0.25% v/v) ZAS (1/10), GM-CSF (100 ng/ml) o fMLP (10ng/ml) por 15 min a 37°C. Luego las células fueron incubadas en presencia o ausencia de TNF- α (10ng/ml) por 3 horas y la apoptosis fue revelada por microscopía de fluorescencia. Los resultados se expresan como la media $\pm$ ES de 5 experimentos, * $p < 0.05$ comparado con neutrófilos controles.

Observaciones realizadas por Nathan y colaboradores (168), han mostrado que la activación de los neutrófilos por diferentes agonistas conduce a una marcada reducción en los niveles de expresión de los dos receptores para TNF- α (TNFR55 o TNFR1 y TNFR75 o TNFR2), fenómeno que involucra el *shedding* de estos receptores. A fin de analizar si este fenómeno podría explicar la incapacidad del TNF- α de promover la apoptosis en neutrófilos previamente activados, analizamos la expresión de los receptores TNFR55 y TNFR75 por citometría de flujo, en neutrófilos previamente expuestos a ilgG o fMLP. Observamos, que el tratamiento de los neutrófilos por 15 min con ilgG, pero no con fMLP, resultó en una marcada reducción en la expresión de los dos receptores para TNF- α (**Figura 10**). Resultados similares al observado para IgGi se encontraron al emplear ZAS y GM-CSF (resultados no mostrados).

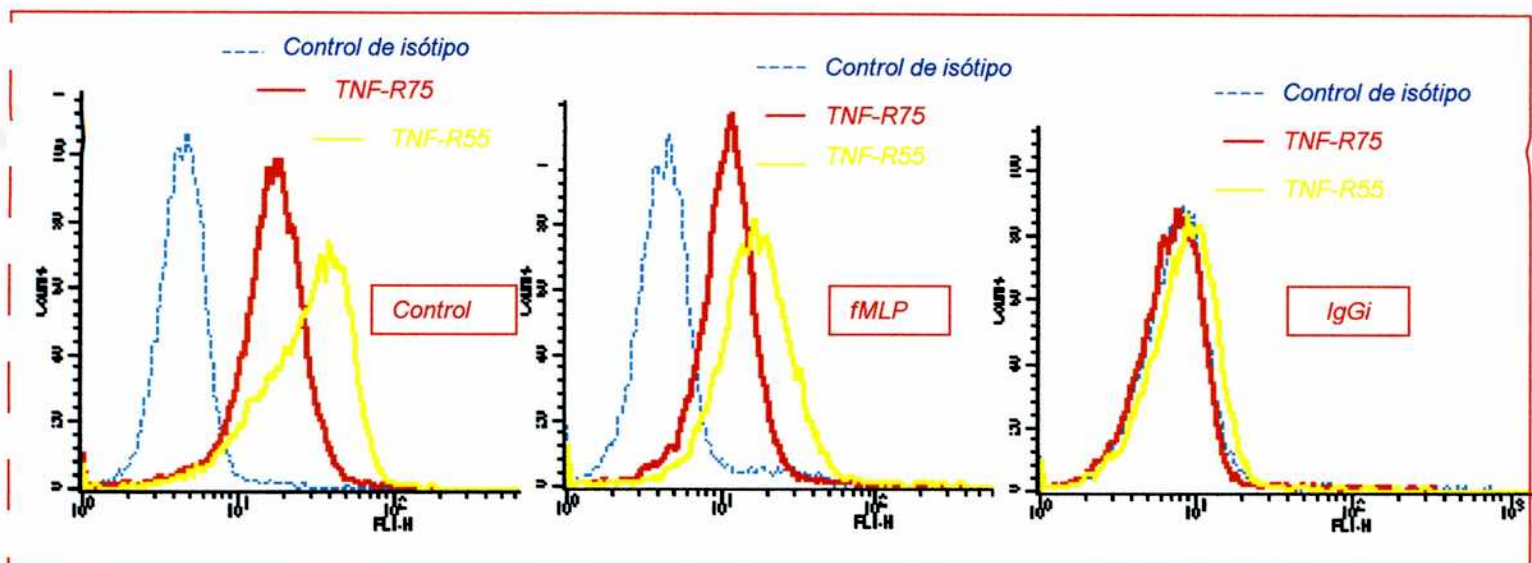


Figura 10: Expresión de los receptores de $TNF-\alpha$ (TNF-R55 y TNF-R75) en neutrófilos activados con diferentes agonistas. Los neutrófilos ($2.5 \times 10^6/ml$) fueron cultivados en presencia de IgGi o fMLP durante 15 min. La expresión de los receptores fue analizada por citometría de flujo. La figura muestra un experimento representativo de 6 realizados.

9. El pretratamiento con $TNF-\alpha$ promueve la apoptosis en neutrófilos que migran a través de una monocapa confluyente de células endoteliales

La extravasación de los neutrófilos a través del endotelio vascular induce cambios en la fisiología del neutrófilo. En este sentido, se ha demostrado que el pasaje de los neutrófilos a través de monocapas confluentes de células endoteliales, crecidas en filtro transwell, retarda el proceso apoptótico (169). Empleando monocapas de células endoteliales obtenidas de cordón umbilical humano (HUVEC) crecidas en filtros "transwell", analizamos si la previa exposición de los neutrófilos a $TNF-\alpha$ ejercía un efecto promotor sobre la apoptosis de los neutrófilos transmigrados. A tal efecto las HUVEC fueron estimuladas con $TNF-\alpha$ (10ng/ml) o LPS (1 μ g/ml) durante 4hs. Posteriormente los neutrófilos fueron tratados con $TNF-\alpha$ durante 1-2min, e incubados sobre las células endoteliales en estufa con 5% de CO_2 a 37°C. Los neutrófilos que atravesaron el endotelio fueron recolectados a diferentes tiempos (3, 5 y 18 hs) y se evaluó la apoptosis por microscopía de

fluorescencia (**Figura 11**). Observamos que el efecto promotor de la apoptosis mediado por $\text{TNF-}\alpha$ se evidenció también en los neutrófilos transmigrados.

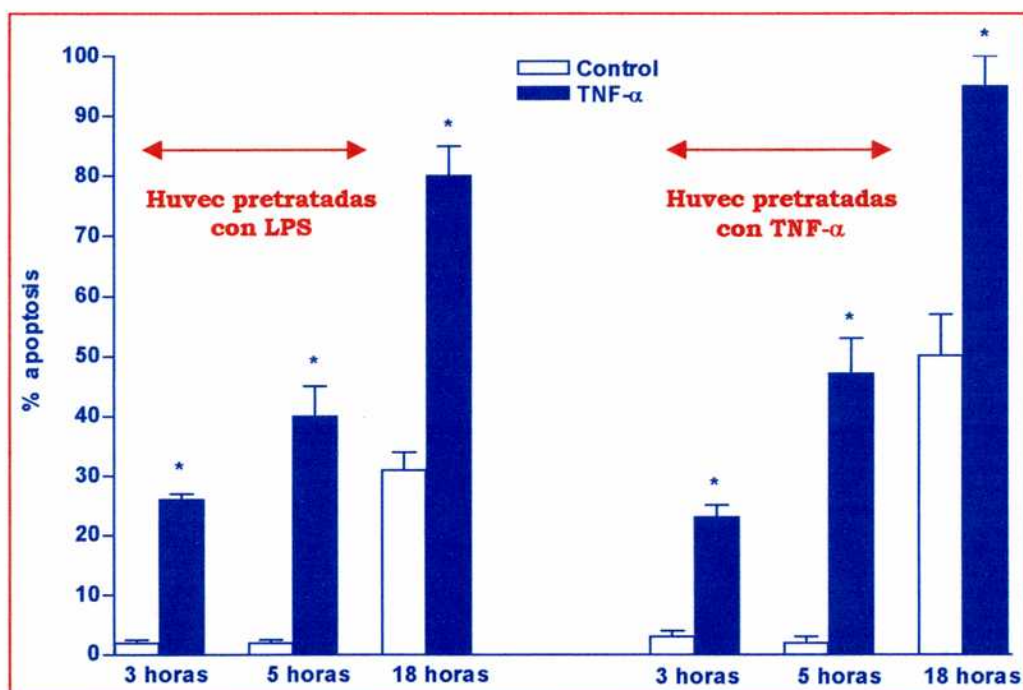


Figura 11: Efecto del $\text{TNF-}\alpha$ sobre la apoptosis de neutrófilos que migran a través de células HUVEC. Monocapas de células endoteliales obtenidas de cordón umbilical humano (células HUVEC) fueron estimuladas con $\text{TNF-}\alpha$ (10ng/ml) o con LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) durante 4hs. Posteriormente los neutrófilos ($2 \times 10^5/\text{ml}$) fueron tratados con $\text{TNF-}\alpha$ durante 1-2 min, e incubados sobre las células endoteliales en estufa con 5% de CO_2 a 37°C. Finalmente, los neutrófilos que atravesaron el endotelio vascular fueron recolectados a diferentes tiempos (3, 5 y 18 hs) y se evaluó la apoptosis por microscopía de fluorescencia. Los resultados se expresan como la media $\pm$ ES de 3 experimentos, $p < 0.05$ comparado con neutrófilos controles, en cada tiempo evaluado.

10. La promoción de la apoptosis mediada por $TNF-\alpha$ no involucra la participación del sistema Fas/FasL ni tampoco la producción de intermediarios reactivos del oxígeno

A fin de investigar los mecanismos subyacentes a la acción proapoptótica mediada por el $TNF-\alpha$ analizamos si el pretratamiento de los neutrófilos con $TNF-\alpha$ inducía cambios en la expresión del sistema Fas/FasL, sistema que ha demostrado jugar un papel relevante en el control de la vida media del neutrófilo maduro (129). A tal efecto, los neutrófilos fueron incubados por 1-2 min con $TNF-\alpha$ y luego expuestos a IgGi. Luego de 2 hs de cultivo, se evaluó la expresión de Fas y FasL, mediante citometría de flujo, empleando los anticuerpos monoclonales CH-11 (anti-Fas) y G247-4 (anti-FasL). Como se observa en la **Figura 11**, no se produjeron cambios en la expresión del sistema Fas/FasL, sugiriendo así que este sistema no se halla involucrado en la promoción de la apoptosis mediada por $TNF-\alpha$.

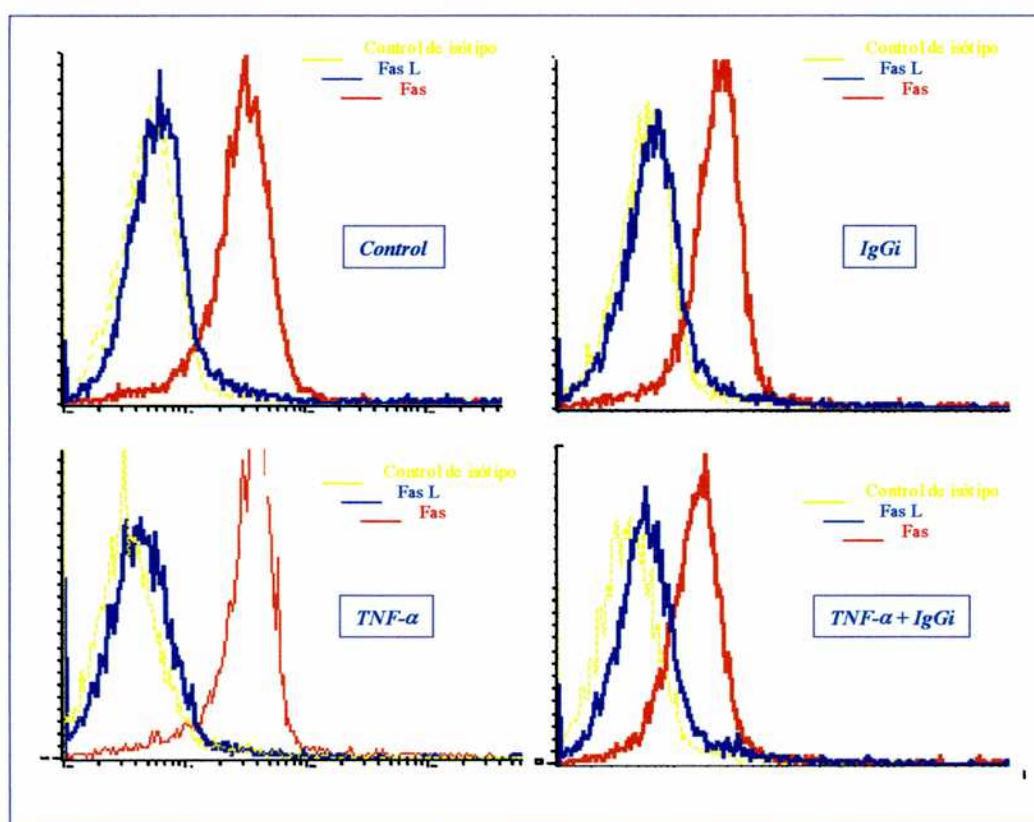


Figura 12: Expresión de Fas y FasL en neutrófilos primados con $TNF-\alpha$. Los neutrófilos ($2.5 \times 10^6/ml$) fueron cultivados en presencia o ausencia de $TNF-\alpha$ (10ng/ml), durante 1-2min y luego expuestos a IgGi por 2 hs. La expresión del sistema Fas/FasL fue analizada por citometría de flujo. La figura muestra un experimento representativo de 4 realizados.

A fin de corroborar que el sistema Fas/FasL no se encuentra involucrado en la acción promotora de la apoptosis mediada por el TNF- α , realizamos un conjunto de experiencias empleando un anticuerpo monoclonal bloqueante dirigido contra FasL (anticuerpo NOK-1), en concentraciones 5 veces superiores a las necesarias para saturar todos sus sitios de unión, de acuerdo a observaciones realizadas por citometría de flujo. Observamos que el anticuerpo NOK-1 no previno la aceleración de la apoptosis inducida por TNF- α : % de apoptosis a 3 hs de cultivo; 74 ± 11 vs 68 ± 7 , para neutrófilos *primados* con TNF- α e incubados con IgG, en ausencia y presencia de NOK-1, respectivamente (n=3).

Observaciones previas realizadas en nuestro laboratorio (166), mostraron que el tratamiento de los neutrófilos con IgG-E durante 12 hs promovía dramáticamente la apoptosis de los neutrófilos y que esta acción era prevenida completamente por la presencia de catalasa en el medio de cultivo, indicando un papel crítico para el peróxido de hidrógeno en el desarrollo del proceso apoptótico (170). Es necesario reiterar que en el presente trabajo no observamos promoción de la apoptosis por tratamiento de los neutrófilos con IgG-E, puesto que en todos los casos la apoptosis fue revelada en forma muy temprana (3 h de cultivo). Con el objeto de determinar si la promoción de la apoptosis por TNF- α involucraba también un mecanismo dependiente de la producción de peróxido de hidrógeno, evaluamos la capacidad de las enzimas catalasa y superóxido dismutasa (SOD) de disminuir la apoptosis promovida por TNF- α . En contraste con las observaciones realizadas en neutrófilos tratados con IgG-E por largos períodos, encontramos que el efecto *priming* mediado por el TNF- α sobre el proceso apoptótico en el neutrófilo no resultó inhibido por la presencia de catalasa y SOD en el medio de cultivo (Figura 13). Ello sugiere que la acción promotora de la apoptosis mediada por el TNF- α no involucra la participación del peróxido de hidrógeno.

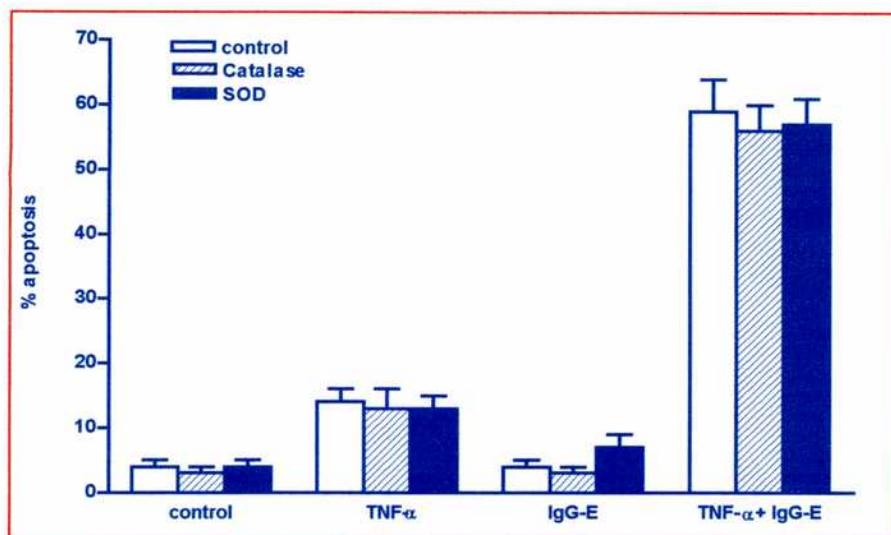


Figura 13: La catalasa y la superóxido dismutasa no previenen el incremento de la apoptosis mediada por TNF- α . Los neutrófilos (2.5×10^6 /ml) fueron cultivados en presencia o ausencia de TNF- α con o sin catalasa o SOD (200 U/ml). Posteriormente se agregó IgG-E (0.25% v/v) y la apoptosis fue revelada por microscopía de fluorescencia luego de 3 horas de cultivo. Los resultados son expresados como la media $\pm$ ES de 5 experimentos.

Para corroborar que la producción de intermediarios reactivos del oxígeno (IRO) no se hallara involucrada en la promoción de la apoptosis mediada por TNF- α , se realizaron estudios adicionales empleando neutrófilos provenientes de 3 pacientes con enfermedad granulomatosa crónica (EGC), un desorden hereditario poco frecuente, caracterizado por una producción de IRO disminuida o ausente, provocado por una mutación en alguno de los componentes de la NADPH oxidasa (36, 37). Análisis preliminares realizados en nuestro laboratorio indicaron que los neutrófilos de estos pacientes produjeron niveles de O_2^- menores al 1%, en respuesta a fMLP o Z, en comparación con los niveles observados en neutrófilos normales. Al analizar la actividad promotora de la apoptosis mediada por TNF- α sobre neutrófilos EGC, encontramos niveles de promoción similares a aquellos observados en los neutrófilos controles (**Figura 14**), sugiriendo que el proceso subyacente no involucra un mecanismo de tipo oxidativo.

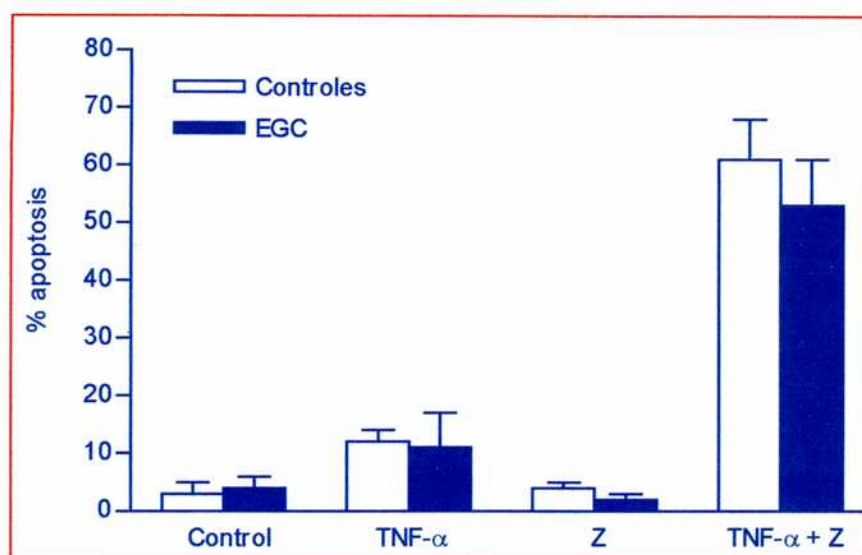


Figura 14: El TNF- α prima la apoptosis de neutrófilos EGC. Los neutrófilos (2.5×10^6 /ml) fueron cultivados en presencia o ausencia de TNF- α (10 ng/ml) por 1-2 min y luego fueron estimulados con Z (50 μ g/ml). La apoptosis fue revelada por microscopía de fluorescencia luego de 3 horas de cultivo. Los resultados son expresados como la media $\pm$ ES de 3 experimentos.

11. Análisis de la participación del factor de transcripción nuclear κ B (NF- κ B) en la promoción de la apoptosis de neutrófilos mediada por TNF- α

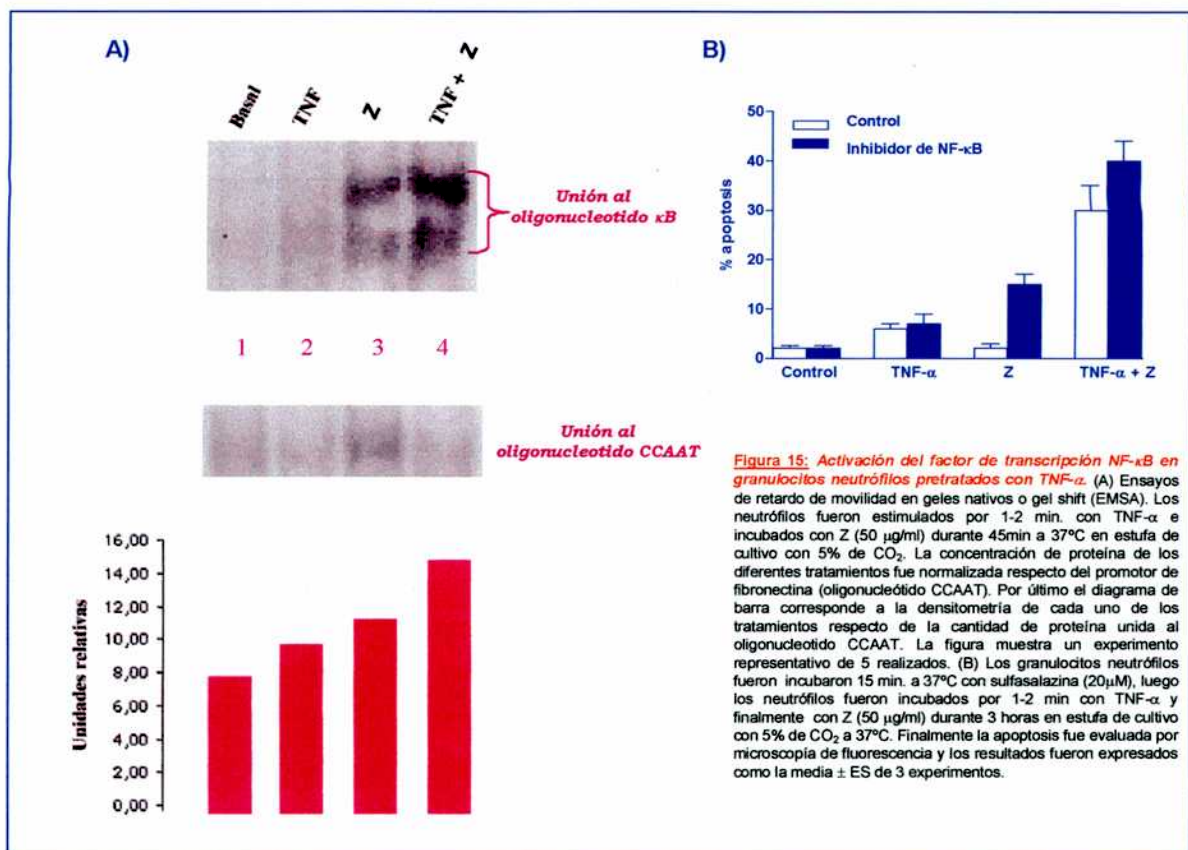
El TNF- α modula la expresión de distintos genes a través de la activación de diferentes vías transduccionales, las cuales involucran proteínas kinasas, fosfatasa, IRO, fosfolipasas, proteasas y factores de transcripción, entre ellos el factor de transcripción NF- κ B (147). El mismo parece jugar un papel relevante como inhibidor del proceso apoptótico en diferentes tipos celulares (148,149,150).

A fin de investigar si la promoción de la apoptosis mediada por TNF- α se asociaba a un impedimento en la translocación del factor antiapoptótico NF- κ B, evaluamos la translocación del mismo a través de ensayos de retardo de movilidad en geles nativos o gel shift (EMSA). A tal efecto, los neutrófilos fueron estimulados por 1-2 min con TNF- α e incubados con Z durante 45 min a 37°C en estufa de cultivo con 5% de CO₂.

Posteriormente, analizamos la translocación de NF- κ B, de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos (sección 13). Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 15a**. Observamos, que la translocación de NF- κ B al núcleo se incrementa cuando las células son estimuladas por TNF- α o Z (2da y 3ra calle) y un incremento aún mayor se observa en células pretratadas con TNF- α y luego expuestas a Z (calle 4).

Con el objeto de analizar el papel que desempeñaba en este sistema el incremento en la translocación de NF- κ B al núcleo, evaluamos el efecto de un inhibidor específico del mismo, la sulfasalazina. Para ello se preincubó a las células 15 min a 37°C con sulfasalazina (20 μ M), luego se expusieron con TNF- α y finalmente se enfrentaron con Z durante 3 horas en estufa de cultivo con 5% de CO₂ a 37°C, evaluándose luego la apoptosis por microscopía de fluorescencia. Como se observa en la **Figura 15b**, la inhibición de la activación de NF- κ B produce un incremento en el porcentaje de células apoptóticas, sugiriendo que en este modelo NF- κ B tendría un rol protector de la apoptosis como ha sido previamente descrito por otros autores (171,172).

En conclusión, los resultados mencionados sugieren que la actividad promotora de la apoptosis mediada por el TNF- α no involucra un impedimento en la translocación de NF- κ B. Por el contrario se induce apoptosis a pesar de un notable incremento en la activación de este factor de transcripción nuclear.

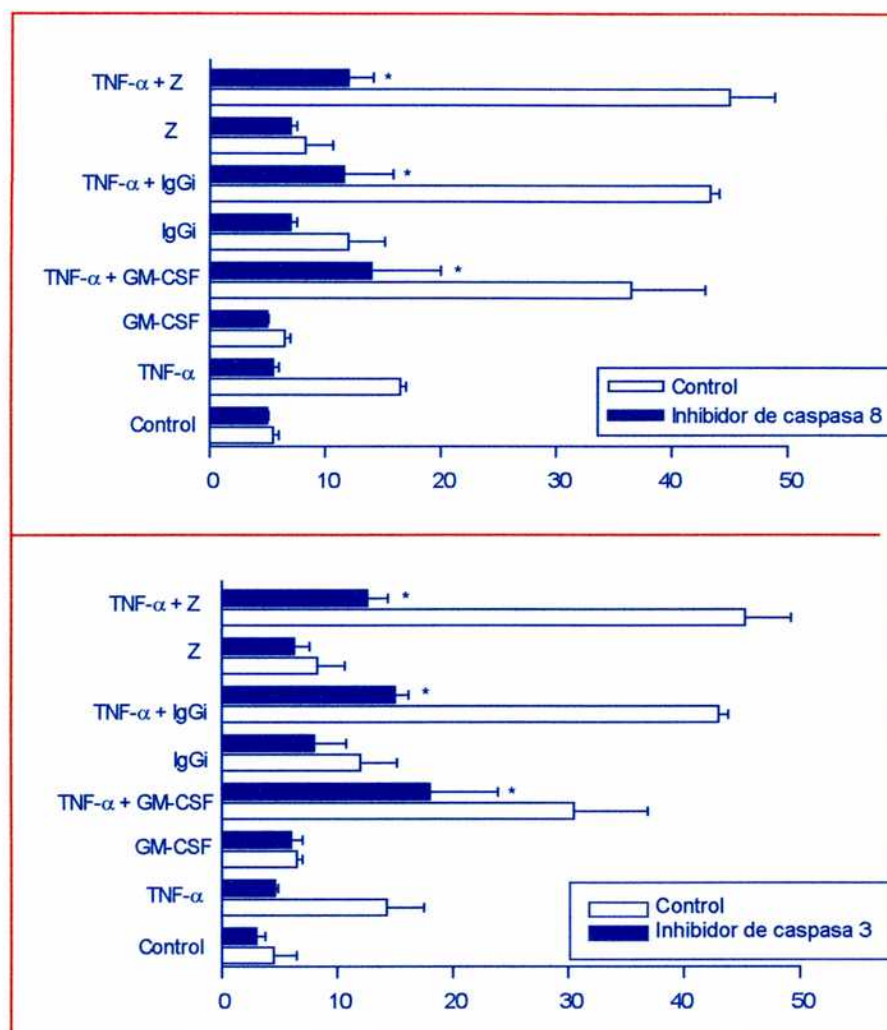


12. Participación de la vía extrínseca en la promoción del proceso apoptótico por $TNF-\alpha$ en neutrófilos

Existen dos vías involucradas en el desarrollo del proceso apoptótico (como se ha descrito en la introducción), la vía extrínseca (o vía mediada por receptores con dominios de muerte) y la vía intrínseca (o mitocondrial). La primera de ellas es iniciada por receptores transmembrana que expresan dominio de muerte celular (CD95, receptores de $TNF\alpha$ y receptores TRAIL) y conduce a la activación de las caspasas iniciadoras 8 y 10, quienes luego clivan a las caspasas efectoras 3, 6 y 7 (103,112,113).

Con el objetivo de evaluar la participación de la vía extrínseca en la promoción del proceso apoptótico mediado por $TNF-\alpha$, utilizamos inhibidores específicos que bloquean la acción de las caspasas 8 y 3, dos caspasas críticas para el desarrollo de esta vía. Incubamos a las células durante 30 min con un inhibidor específico de caspasa 8 (Granzima B, 50 μ M) o con un inhibidor específico de caspasa 3 (Z-VAD-OME, 50 μ M). Luego los neutrófilos fueron primados con $TNF-\alpha$ y expuestos a diferentes agonistas: Z, IgG y GM-CSF durante 3 hs a 37°C en estufa gaseada con 5% de CO_2 . La apoptosis fue evaluada por microscopía de fluorescencia con la técnica de naranja de acridina y bromuro de etidio.

Como se observa en las Figuras 16a y 16b, los inhibidores de caspasa 3 y 8 previnieron la promoción de la apoptosis ejercida por $TNF-\alpha$ en forma significativa. Ello sugiere la participación de la vía extrínseca en la promoción de la apoptosis mediada por $TNF-\alpha$.



Figuras 16a y b: Los inhibidores de caspasa 8 y 3 previenen el incremento de la apoptosis mediada por TNF- α . Los neutrófilos (2.5×10^6 /ml) fueron cultivados en presencia o ausencia de TNF- α con o sin inhibidores de caspasas ($50 \mu\text{M}$). Posteriormente se incubó a las células con diferentes agonistas: Z ($50 \mu\text{g/ml}$), GM-CFS (100ng/ml) e IgGi, y la apoptosis fue revelada por microscopía de fluorescencia luego de 3 horas de cultivo. Los resultados son expresados como la media $\pm$ ES de 5 experimentos realizados. * $p < 0.01$ neutrófilos cultivados con el inhibidor vs neutrófilos tratados con TNF- α + los agonistas.

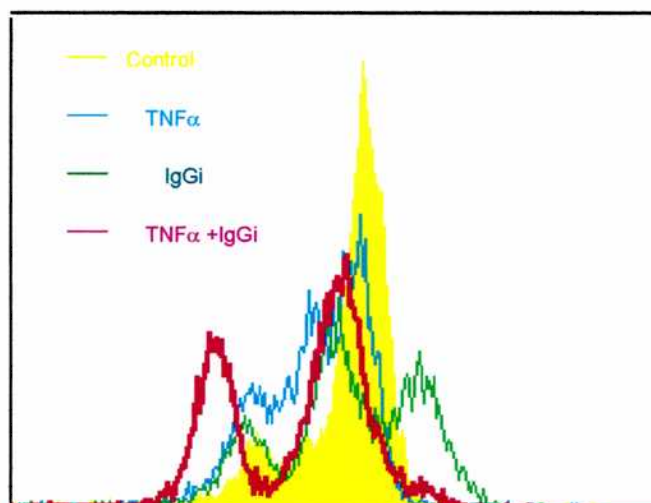
13. Participación de la vía intrínseca en la promoción del proceso apoptótico por $TNF-\alpha$ en neutrófilos

La vía intrínseca (o vía mitocondrial), involucra alteraciones en la permeabilidad de la membrana externa mitocondrial y la liberación de proteínas mitocondriales, entre las que figura principalmente citocromo c (como se describe en la introducción) (103,112,113). El citocromo c, en forma conjunta con Apaf-1 y la procaspasa 9, en presencia de ATP forman el apoptosoma. Este complejo es capaz de inducir la activación de caspasa 9, iniciando la cascada de activación de proteasas, conducentes al desarrollo del proceso apoptótico, (113,114). La activación de la vía mitocondrial se lleva a cabo, en general a través de la acumulación en citoplasma de miembros proapoptóticos de la familia Bcl-2 (173).

Existen caminos interactivos establecidos entre la vía extrínseca e intrínseca del mecanismo apoptótico. Así, caspasa 8 es capaz de inducir la activación de Bid (produciendo Bid truncado), facilitando la liberación de citocromo c, del espacio intermembrana de la mitocondria, generando una amplificación de las señales apoptóticas (113,112).

A fin de evaluar si la vía mitocondrial se encontraba involucrada en el desarrollo del proceso apoptótico de neutrófilos mediado por $TNF-\alpha$, incubamos a las células con $TNF-\alpha$ durante 1 o 2 min y luego los expusimos a IgGi por 90 min. Finalmente, los neutrófilos fueron incubados durante 15 min más, con Rhodamina 123 (colorante catiónico lipofílico, que se acumula principalmente en mitocondrias), a 37°C en estufa gaseada con 5% de CO₂. La disminución del potencial de membrana mitocondrial fue evaluada por citometría de flujo, como disminución en la intensidad de fluorescencia. Como observamos en la **Figura 17** las células tratadas con $TNF-\alpha$ e IgGi muestran una disminución en la intensidad media de fluorescencia (menor contenido de Rhodamina mitocondrial), que es característico de células que han sufrido disminución del potencial de membrana mitocondrial. El aumento observado en la incorporación de Rodamina en aquellas células tratadas con IgGi, podría ser consecuencia de la activación celular inducida por este agonista (174).

Figura 17: Pérdida del potencial de membrana mitocondrial de neutrófilos, utilizando Rodamina 123. Los neutrófilos ($2.5 \times 10^6/\text{ml}$) fueron cultivados en presencia o ausencia de $\text{TNF-}\alpha$, con o sin IgGi. Finalmente, los neutrófilos fueron incubados durante 15min más con Rodamina 123. La figura muestra un gráfico representativo de 3 realizados.

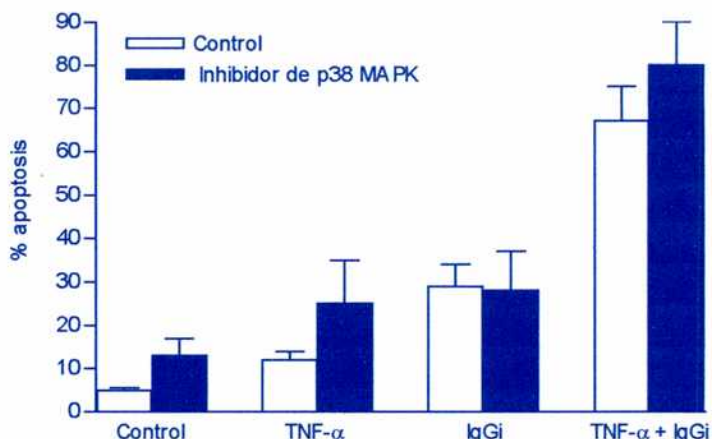


14. Análisis de la participación de proteínas quinasas activadas por mitógeno (MAPK) en la promoción de la apoptosis de neutrófilos por $\text{TNF-}\alpha$

Las isoformas de proteínas quinasas activadas por mitógeno (MAPK) parecen jugar un papel relevante en la señalización del proceso apoptótico en el neutrófilo. Se han descrito tres subfamilias para las MAPK en células de mamíferos: 1) **ERK**, quinasas relacionada a señales extracelulares, las cuales son activadas por fosforilación de MEK-1, 2) **p38 MAPK** y 3) **JNK**, MAPK activada por estrés /quinasa N-terminal c-Jun. Los tres tipos de quinasas han sido identificadas en neutrófilos pero sólo ERK y p38MAPK han sido implicadas en el proceso apoptótico (128,175)

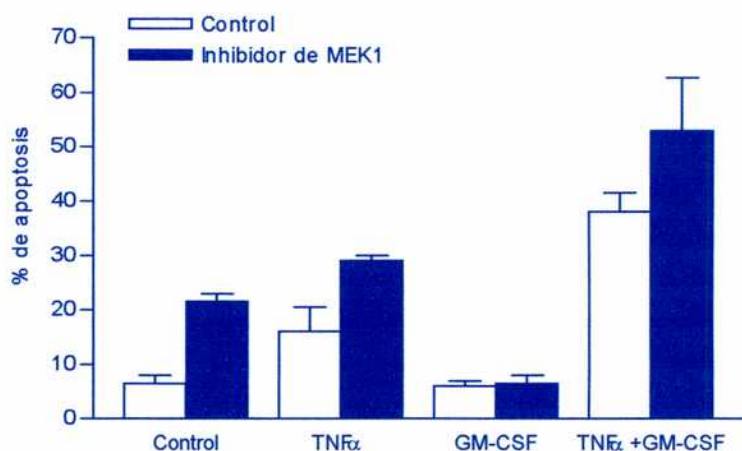
A fin de investigar si p38MAPK se hallaba involucrada en la promoción de la apoptosis mediada por $\text{TNF-}\alpha$, evaluamos el efecto de un inhibidor específico de p38MAPK (SB 203580). Para ello se incubaron a las células 15 min a 37°C con el inhibidor (30 μM), luego se "primaron" los neutrófilos con $\text{TNF-}\alpha$ y finalmente se enfrentaron con IgGi durante 3 horas en estufa de cultivo con 5% de CO_2 a 37°C , evaluándose luego la apoptosis por microscopía de fluorescencia. Como se observa en la **Figura 18**, el SB 203580 no previno la acción promotora de la apoptosis mediada por $\text{TNF-}\alpha$.

Figura 18: El inhibidor de p38MAPK no previene el incremento de la apoptosis mediada por TNF- α . Los neutrófilos (2.5×10^6 /ml) fueron pre-tratados con o sin SB20580 ($30\mu\text{M}$) durante 15min. Posteriormente fueron primados con TNF- α durante 1-2min. y expuestos a IgGi durante 3 horas. La apoptosis fue revelada por microscopía de fluorescencia. Los resultados son expresados como la media $\pm$ ES de 3 experimentos realizados.



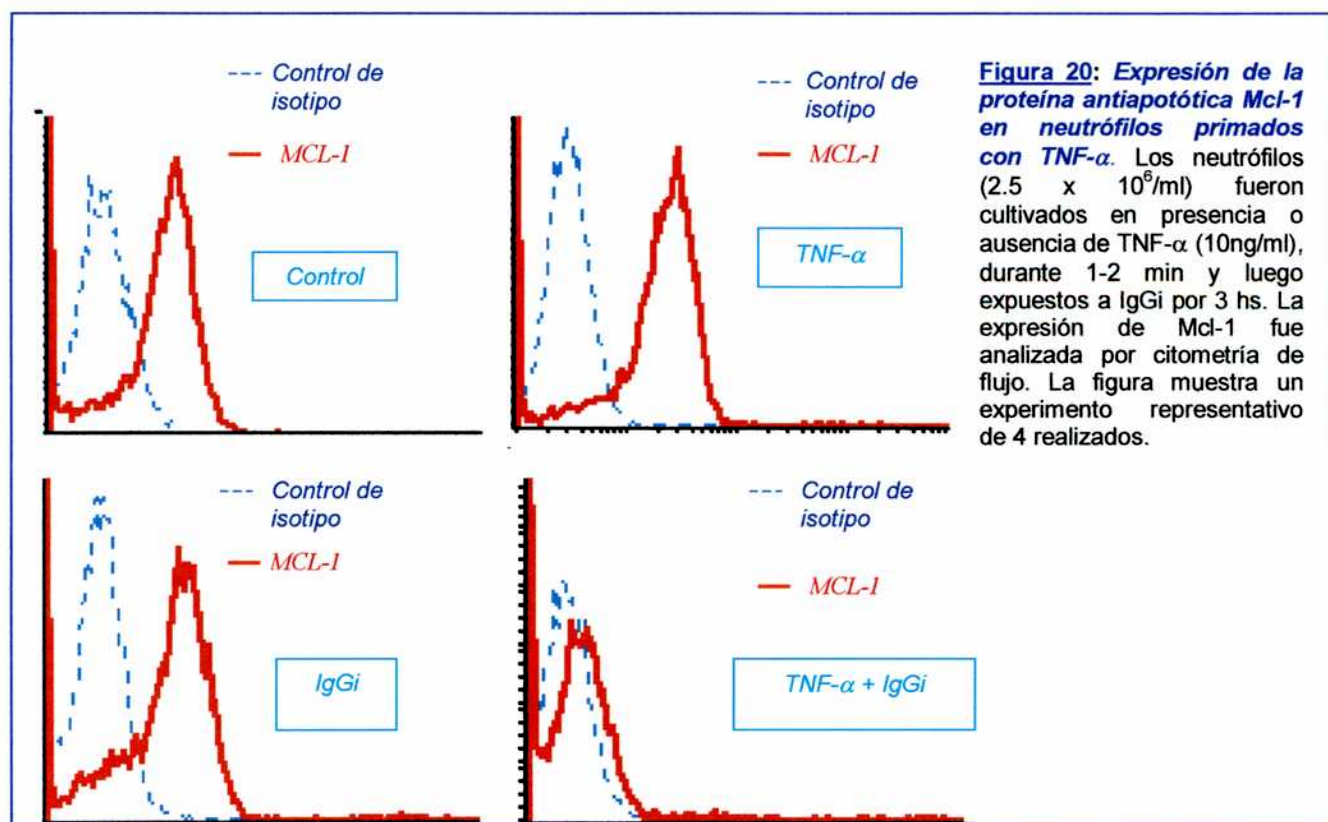
A fin de evaluar de que manera la subfamilia ERK participaba en la promoción de la apoptosis de los neutrófilos por TNF- α , incubamos a las células durante 15min, con un inhibidor de MEK 1 (U0126, 5nM), quinasa encontrada *upstream* en la cascada de fosforilación que actúa sobre ERK. Luego primamos a las células con TNF- α y las expusimos durante 3hs a GM-CSF. Como se puede observar en la **Figura 19**, el U0126 tampoco previno la acción promotora de la apoptosis mediada por TNF- α . Estos resultados sugieren que las MAPK no juegan un papel relevante en la promoción de la apoptosis de neutrófilos por TNF- α .

Figura 19: El inhibidor de MEK1 no previene el incremento de la apoptosis mediada por TNF- α . Los neutrófilos (2.5×10^6 /ml) fueron pre-tratados con o sin U0126 (5nM) durante 15min. Posteriormente fueron primados con TNF- α durante 1-2min. y expuestos a GM-CSF durante 3 horas. La apoptosis fue revelada por microscopía de fluorescencia. Los resultados son expresados como la media $\pm$ ES de 3 experimentos realizados.



15. Análisis de la participación de Mcl-1 en la promoción de la apoptosis de neutrófilos mediada por TNF- α

La familia de proteínas Bcl-2 desempeña un papel relevante en el control del proceso apoptótico. Mientras que algunos de sus miembros actúan como promotores de la apoptosis (Bax, Bcl-Xs y Bad) otros ejercen un efecto preventivo (Bcl-2, BclXI y Mcl-1). Los granulocitos neutrófilos no expresan Bcl-2 o BclXI, pero si expresan constitutivamente Bax, sin embargo los niveles de Bax no suelen afectarse por agentes que aceleren o retrasen la apoptosis del neutrófilo. Por el contrario, los niveles de la proteína anti-apoptótica Mcl-1, suelen disminuir en forma temprana en respuesta a tratamientos que imponen una promoción de la apoptosis en el neutrófilo (126-128). En base a estas consideraciones, analizamos la expresión de Mcl-1 en neutrófilos pretratados con TNF- α por 1-2 min y luego expuestos a IgGi por 3 hs, mediante inmunomarcación citoplasmática y citometría de flujo. Los resultados obtenidos se ilustran en la **Figura 20**. Ellos muestran una marcada disminución en los niveles de Mcl-1 en células pretratadas con TNF- α y expuestas luego a IgGi.



16. Es capaz el $TNF\alpha$ de ejercer un efecto "priming" sobre la apoptosis de otros tipos celulares? Experiencias llevadas a cabo con monocitos y células dendríticas

Los monocitos fueron purificados por gradientes de Percoll, y las células dendríticas fueron diferenciadas a partir de monocitos, por cultivo con GM-CSF + IL-4 (como se describe en Materiales y Métodos, secciones 4 y 11). En ambos casos, las células fueron preincubadas con $TNF-\alpha$ por 1-2 min y luego expuestas a diferentes agentes: IgG, Z y/o GM-CSF. Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 21**. No observamos promoción del fenómeno apoptótico en ninguna de las dos poblaciones celulares estudiadas, incluso al prolongar los tiempos de cultivo a 96 hs (datos no mostrados).

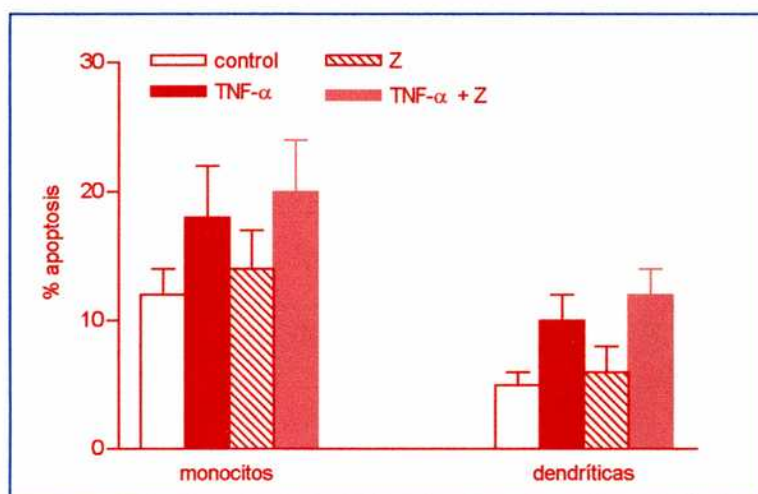


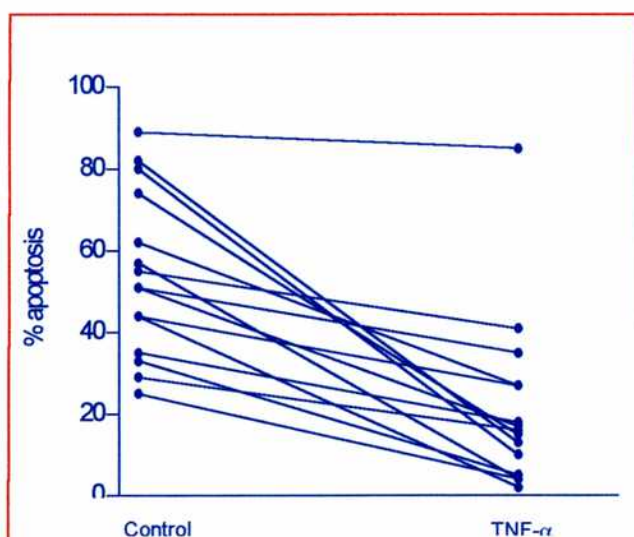
Figura 21: El $TNF-\alpha$ no ejerce una acción "priming" sobre la apoptosis de monocitos y células dendríticas. Los monocitos y células dendríticas ($2 \times 10^5/ml$), obtenidos de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos, fueron preincubados por 1-2 min a $37^\circ C$ con $TNF-\alpha$ (10 ng/ml) y luego expuestos a Z (50 $\mu g/ml$) durante 48 hs, evaluándose luego la apoptosis por microscopía de fluorescencia. Los resultados representan la media $\pm$ ES de 5 experimentos.

17. Es capaz el $TNF\alpha$ de ejercer un efecto promotor de la apoptosis sobre células leucémicas provenientes de pacientes con leucemia mieloide aguda (LMA)?

Células mononucleares obtenidas de médula ósea de pacientes con LMA, con porcentajes de blastos comprendidos entre el 30 y el 90%, fueron cultivadas con $TNF-\alpha$ durante varios días en estufa gaseada a 37°C, evaluándose los porcentajes de apoptosis por microscopía de fluorescencia durante 7 días consecutivos. Debido a la gran variabilidad que se observa en la cinética espontánea de progresión de la apoptosis en diferentes dadores, los resultados que se presentan en la **Figura 22** no corresponden a un único día de cultivo, sino al día en el cual los porcentajes de apoptosis espontánea superaron el 25%. Las muestras evaluadas corresponden a subtipos de LMA comprendidos entre M1 y M5 según la clasificación FAB (ver Apéndice y Materiales y Métodos).

En contraste con las observaciones realizadas en neutrófilos, encontramos que el $TNF-\alpha$ ejerció un notorio efecto preventivo sobre la apoptosis espontánea de las células mononucleares de los pacientes con LMA. Como se observa en la **Figura 22**; el $TNF-\alpha$ medió un efecto inhibitorio sobre la apoptosis en 15 de los 16 pacientes analizados. La media de inhibición fue de $69\% \pm 6$ ($p < 0.001$ vs controles), en los 15 pacientes respondedores.

Figura 22: El $TNF-\alpha$ previene la apoptosis espontánea de células mononucleares de médula ósea provenientes de pacientes con LMA. Las células mononucleares fueron cultivados en presencia o ausencia de $TNF-\alpha$ (10 ng/ml). Luego, los porcentajes de apoptosis fueron evaluados por microscopía de fluorescencia durante 7 días consecutivos. Los resultados presentados corresponden al día en el cual las células controles mostraron niveles de apoptosis superiores al 25%.



Los agentes quimioterapéuticos idarubicina y etopósido (inhibidores de topoisomerasa II), son ampliamente utilizados en tratamiento de patologías oncohematológicas (176). Evaluamos luego si el efecto preventivo de la apoptosis mediado por el TNF- α sobre las células mononucleares de pacientes LMA era observable aún al realizar los cultivos en presencia de estas drogas, las cuales han demostrado promover en forma notoria la apoptosis de células LMA. En experiencias preliminares encontramos resultados coincidentes con la literatura, referidas a la acción proapoptótica mediada por las drogas analizadas (datos no mostrados). Los resultados presentados en la **Figura 23** corresponden al día en el cual las células tratadas con idarubicina mostraron niveles de apoptosis superiores al 25%, observándose que aún en presencia de idarubicina el TNF- α media un efecto preventivo sobre la apoptosis. La media de inhibición de apoptosis de los pacientes respondedores (10 de 13) fue del $62 \pm 7\%$ ($p < 0.01$ vs controles).

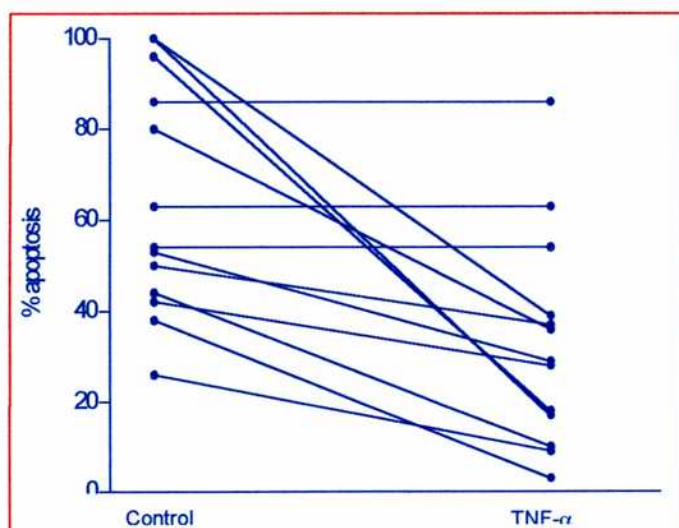
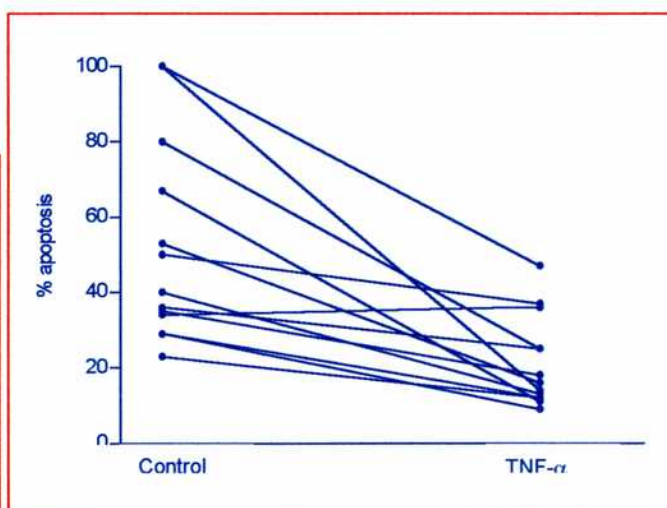


Figura 23: El TNF- α previene la apoptosis inducida por idarubicina (100ng/ml-10ng/ml) en células mononucleares provenientes de pacientes con LMA. Las células fueron cultivadas con idarubicina en presencia o ausencia de TNF- α (10 ng/ml). Luego los porcentajes de apoptosis fueron evaluados por microscopia de fluorescencia durante 5 días consecutivos. Los resultados presentados corresponden al día en el cual las células tratadas con idarubicina mostraron niveles de apoptosis superiores al 25%.

Los resultados presentados en la **Figura 24** corresponden al día en el cual las células tratadas con etopósido mostraron niveles de apoptosis superiores al 25%. Nuevamente, observamos un efecto preventivo sobre la apoptosis mediado por TNF- α . La media de inhibición de apoptosis de los pacientes respondedores (11 de 12) fue del 59% $\pm$ 6% ($p < 0.01$ vs controles).

Figura 24: El TNF- α previene la apoptosis inducida por etopósido (1 μ g/ml) en células mononucleares provenientes de pacientes con LMA. Las células fueron cultivadas con etopósido en presencia o ausencia de TNF- α (10ng/ml). Luego los porcentajes de apoptosis fueron evaluados por microscopia de fluorescencia durante 5 días consecutivos. Los resultados presentados corresponden al día en el cual las células tratadas con etopósido mostraron niveles de apoptosis superiores al 25%.



La capacidad del TNF- α de prevenir la apoptosis de células mononucleares de pacientes LMA, cultivadas en presencia de idarubicina, fue evaluada también por citometría de flujo, por el test de anexina V en presencia de yoduro de propidio. En acuerdo con los resultados descriptos previamente, observamos que el TNF- α medió un efecto preventivo sobre el proceso apoptótico (**Figura 25**).

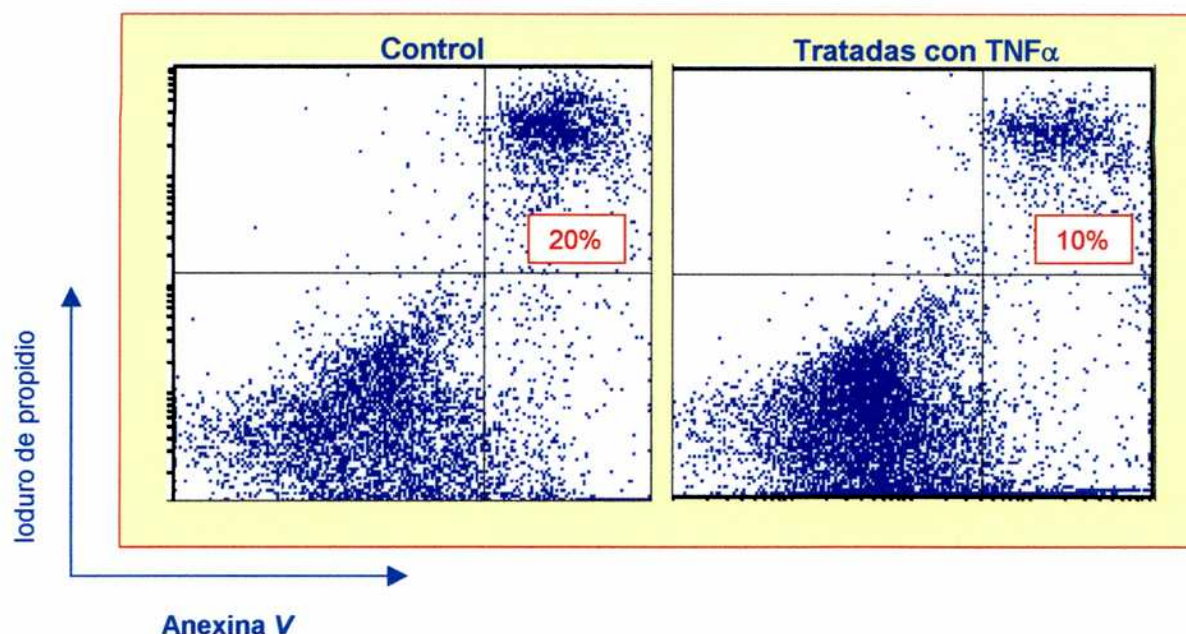


Figura 25: Prevención de la apoptosis por $\text{TNF-}\alpha$ analizada por citometría de flujo. Las células fueron cultivadas con idarubicina (10 ng/ml) en presencia o ausencia de $\text{TNF-}\alpha$ (10 ng/ml). El porcentaje de apoptosis fue analizada por citometría de flujo, empleando anexina V marcada con FITC e ioduro de propidio, luego de 3 días de cultivo. La figura muestra un experimento representativo de 2 realizados.

En los experimentos descriptos previamente, en los cuales caracterizamos el efecto del $\text{TNF-}\alpha$ sobre la apoptosis de células mononucleares de pacientes con LMA, se realizó la cuantificación del porcentaje de células apoptóticas sin discriminar células leucémicas de aquellas células no leucémicas. No obstante, las observaciones realizadas en las muestras que contenían porcentajes de blastos superiores al 70%, sugerían que la acción antiapoptótica del $\text{TNF-}\alpha$ era ejercida, básicamente, sobre células leucémicas. A fin de corroborar esta observación se realizaron experiencias adicionales en las cuales se reveló la apoptosis por el test de anexina V, empleando como marcador de células leucémicas un anticuerpo monoclonal anti-CD34, marcado con ficoeritrina. Como se observa en la **Figura 26**, la prevención de la apoptosis se relaciona, fundamentalmente, con una acción ejercida sobre las células CD34+.

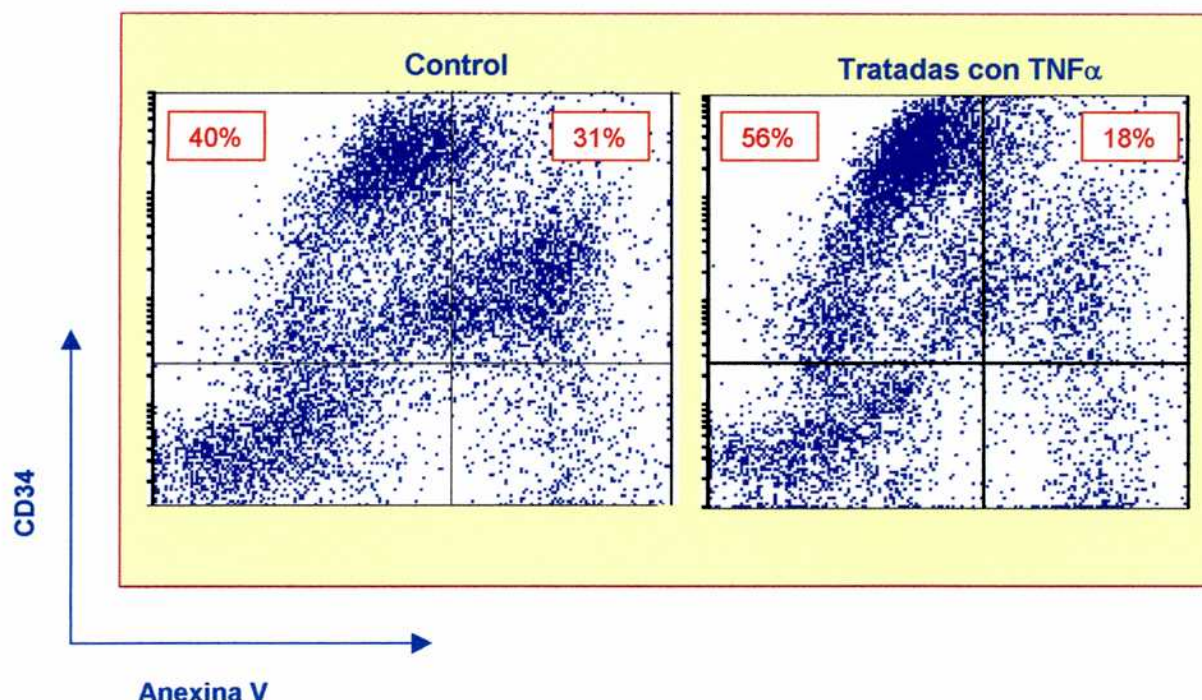


Figura 26 : La acción preventiva de la apoptosis mediada por el TNF- α es ejercida, básicamente, sobre las células CD34+. Las células fueron cultivados con idarubicina 10 ng/ml, en presencia o ausencia de TNF- α (10 ng/ml). Se evaluó el porcentaje de apoptosis de células CD34+ (marcadas con un anticuerpo anti-CD34 PE) por citometría de flujo, empleando anexina V marcada con FITC, luego de 3 días de cultivo. La figura muestra un experimento representativo de 3 realizados.

La proteína antiapoptótica Bcl-2 juega un papel crítico en la inhibición del proceso apoptótico en células leucémicas provenientes de pacientes con LMA (177,178) . Realizamos experiencias adicionales a fin de investigar si la prevención de la apoptosis mediada por TNF- α sobre las células leucémicas se relacionaba con un incremento en la expresión de Bcl-2. No observamos modificaciones en la expresión de Bcl-2 inducidas a consecuencia del tratamiento con TNF- α (**Figura 27**).

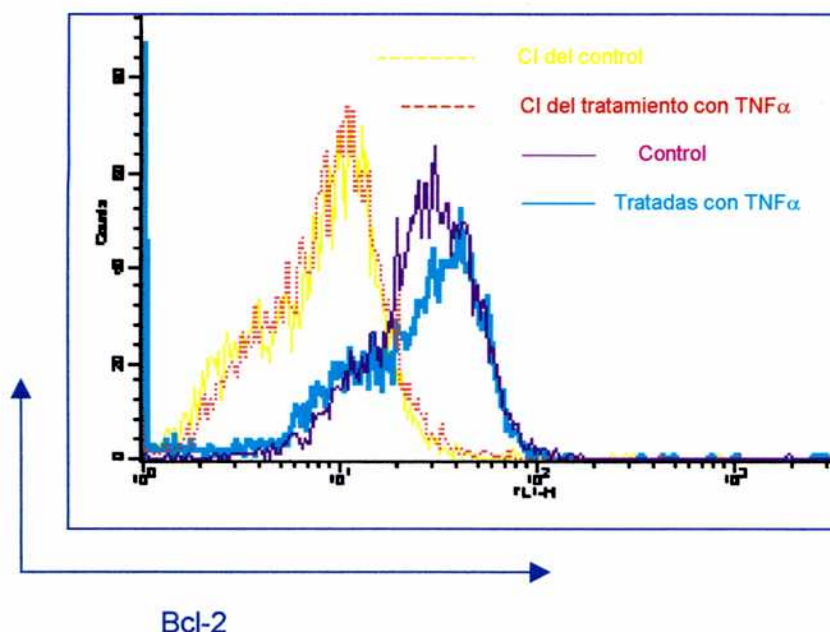


Figura 27: La expresión de Bcl-2 en células mononucleares provenientes de pacientes con LMA no se modifica por el tratamiento con TNF- α . Las células (> 70% blastos) fueron cultivados en presencia o ausencia de TNF- α (10 ng/ml). La apoptosis fue inducida por etopósido (1 μ g/ml) y la expresión de Bcl-2 fue evaluada por citometría de flujo. La figura muestra un experimento representativo de 3 realizados.

18. Las líneas celulares mieloides no constituyen un modelo adecuado para el análisis de la acción del TNF α sobre la apoptosis de células leucémicas en pacientes LMA

Considerando las dificultades que impone el trabajo con muestras de médula ósea provenientes de pacientes LMA, analizamos si la acción inhibitoria de la apoptosis ejercida por el TNF- α sobre células leucémicas podría ser estudiada empleando líneas celulares mieloides. Con este objetivo evaluamos la acción del TNF- α sobre las líneas celulares mieloides HLA-60 (promielocítica) y U937 (mielomonocítica). Observamos que el TNF- α media en estas líneas celulares un efecto opuesto al observado en las muestras de los pacientes LMA (**Figuras 28**). Tanto para HL-60 como para U937 observamos que el TNF- α no sólo incrementó los porcentajes de apoptosis espontánea (observaciones realizadas previamente por otros autores) (179), sino también aquella inducida por

idarubicina y etopósido. Estos resultados indican que estas líneas celulares mieloides no constituyen un modelo de estudio adecuado para el análisis de los mecanismos a través de los cuales el TNF- α modula el proceso apoptótico en LMA.

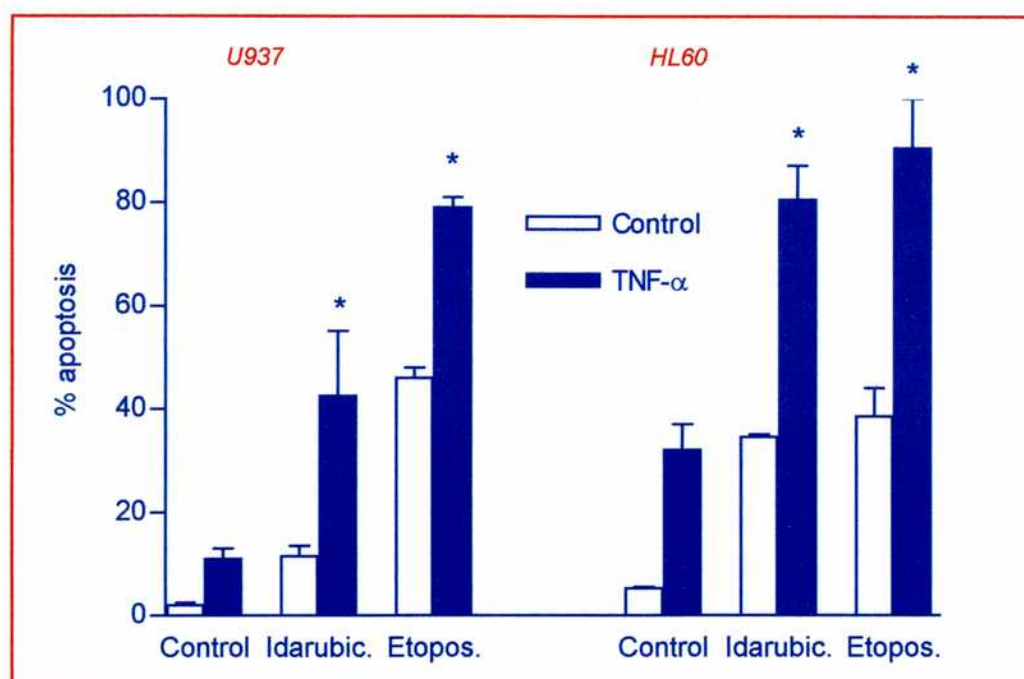


Figura 28: El TNF- α incrementa la apoptosis inducida por idarubicina y etopósido en la línea celular HL-60 y U937. Las células fueron cultivadas durante 48 hs y 72 hs a 37°C con medio, idarubicina (10 ng/ml) o etopósido (1 μ g/ml) en presencia o ausencia de TNF- α (10 ng/ml). * p < 0.05 vs controles.

& Discusión &

Los resultados presentados en esta Tesis muestran que el TNF- α es capaz de mediar un efecto *priming* sobre la apoptosis de los granulocitos neutrófilos. De este modo, aquellos neutrófilos expuestos al TNF- α sufren un cambio que se traduce, no en una franca inducción de apoptosis, sino en un estado que permite a un amplio conjunto de agonistas *gatillar* una dramática aceleración del proceso apoptótico. Si bien el concepto de *priming* ha sido tradicionalmente empleado en relación a la inducción de respuestas que denotan activación celular (producción de IRO o capacidad quimiotáctica, para el caso de los neutrófilos) creemos que refleja adecuadamente el cambio que impone el TNF- α al comportamiento proapoptótico del neutrófilo. Es importante también recalcar que este efecto *priming* del TNF- α es encontrado en un rango de concentraciones (1 a 100 ng/ml) compatible con los niveles observados *in vivo* (180).

A efectos de analizar qué agentes eran capaces de gatillar la apoptosis en los neutrófilos tratados con TNF- α , empleamos un amplio panel de agonistas. En este sentido es necesario destacar que algunos de los agonistas empleados han demostrado previamente promover la apoptosis del neutrófilo, mientras que otros ejercieren un efecto preventivo sobre la misma (122-125,166). No obstante, esta acción individual no se encuentra reflejada en nuestras experiencias ya que la actividad moduladora ejercida por los diferentes agonistas sobre la apoptosis del neutrófilo requiere tiempos de cultivo comprendidos entre 12 y 18 hs y nuestras experiencias, dada la notable actividad proapoptótica que impone el tratamiento con TNF- α a los neutrófilos, fueron todas desarrolladas en cultivos de 3 hs de duración.

Al examinar la capacidad de los agentes mencionados de gatillar la apoptosis de neutrófilos expuestos a TNF- α encontramos tres patrones de respuesta diferentes, que nos permiten agrupar a los agentes empleados en tres categorías: (1) **inductores potentes de apoptosis** (rango de apoptosis evaluada a las 3 hs de cultivo = 55-75%); (2) **inductores moderados de apoptosis** (rango de apoptosis = 30-45%); y (3) **agentes incapaces de promover la apoptosis**. El primer grupo incluye a E-IgG, IgGi, E.coli, y Z; el segundo a fMLP, SAZ, EC, PMA, y GM-CSF; mientras que el tercero incluye a LPS, ConA, IL-2, IL-8, IL-10, interferón- γ e IL-1 α . Los motivos subyacentes a este comportamiento diferencial no han sido aún definidos. En la **Tabla 1** se describen algunas de las características de los agentes empleados.

Tabla 1: Características principales de los agonistas utilizados en esta Tesis.

Agonistas	Función	Receptor	Efecto sobre la apoptosis del neutrófilo
Complejos inmunes: eritrocitos sensibilizados por anticuerpos IgG (IgG-E) e IgG inmovilizada al fondo de las placas de cultivo (IgGi)	Activan respuestas secretoras y citotóxicas	FcγR-Receptores para el fragmento Fc de IgG	Promueven la apoptosis (166)
fMLP: péptidos formilados bacterianos	Activan respuestas quimiotácticas y secretoras	FPR-Receptor de alta afinidad para péptidos formilados bacterianos (181)	Retarda la progresión de la apoptosis (124)
Bacterias (<i>E.coli</i>):	Activan una respuesta fagocítica	Receptores tipo Toll y receptores Scavenger (182)	Promueven la apoptosis (183)
Lipopolisacárido bacteriano (LPS)	Lectina que activa respuestas secretoras y citotóxicas	Receptores tipo-Toll 4 (TLR4) (184)	Retarda la progresión de la apoptosis (124)
Concanavalina A (ConA):	Lectina que activa respuestas secretoras y citotóxicas	No definidos	Retarda la progresión de la apoptosis (resultados propios no mostrados).
Eritrocitos recubiertos por IgM-C3b (EC): eritrocitos sensibilizados por anticuerpos IgM y tratados con suero deficiente de C5	Priman la activación celular	CD11b/CD18 (Mac-1) (120)	No afecta el proceso apoptótico (resultados propios no mostrados).
Zimosán (Z, levaduras, <i>Saccharomyces cerevisiae</i>):	Activan respuestas secretoras y citotóxicas	CD11b/CD18 (Mac-1) y Receptores tipo-Toll 2 (TLR2) (184 y 185)	Promueve la apoptosis (resultados propios no mostrados)
Suero humano activado por zimosán (SAZ): es empleado usualmente como fuente de C5a.	Activa respuestas quimiotácticas y secretoras	C5aR Receptor de alta afinidad para C5a (186)	Retarda la progresión de la apoptosis (resultados propios no mostrados)
Ácido forbol mirístico (PMA):	Activa respuestas secretoras y citotóxicas	Proteína quinasa C (184)	Promueve la apoptosis (187)
Citoquinas. IL-2, IL-8 y GM-CSF	Diferentes respuestas	Receptores específicos	Retardan la progresión de la apoptosis (122-125)
Citoquinas. IL-6 e IL-10	Diferentes respuestas	Receptores específicos	Promueven la apoptosis (122-125)

Encontramos, además, que cuando los neutrófilos son pretratados con TNF- α , su migración a través de un cultivo confluyente de células endoteliales se acompaña de una marcada promoción de la apoptosis. En este sentido, cabe señalar que, de acuerdo con descripciones previas (169), encontramos que la migración transendotelial de neutrófilos no pretratados con TNF- α no se asoció a la inducción de apoptosis sino, por el contrario, mostró un significativo efecto preventivo sobre el fenómeno apoptótico (datos no mostrados).

Como hemos demostrado, la acción promotora de la apoptosis mediada por el TNF- α es ejercida sobre neutrófilos en reposo, pero no sobre neutrófilos activados. Esta observación podría explicarse considerando resultados previos publicados por Porteu y Nathan (168), los cuales muestran que la activación de los neutrófilos por diferentes agonistas resulta en el *shedding* de los TNF-R hacia el medio extracelular. En concordancia con estos resultados, nosotros encontramos que la activación de los neutrófilos por IgGi, E-IgG y GM-CSF conduce a una pérdida dramática en la expresión de los TNF-R1 y TNF-R2. Por el contrario, no observamos disminución en la expresión de los TNF-R a consecuencia de la exposición al fMLP. Sin embargo, pese a encontrarse preservada la expresión de los TNF-R, aquellas células expuestas a fMLP no experimentaron promoción de la apoptosis al ser luego tratadas con TNF- α . Ello sugiere que la refractariedad a la acción proapoptótica impuesta por el TNF- α , observada en neutrófilos activados, no guarda sólo relación con el *shedding* de los TNF-R.

La particular actividad *priming* que ejerce el TNF- α sobre el proceso apoptótico no parece ser compartida por otras citoquinas. En este sentido, nosotros evaluamos las actividades de IL-1 α , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-18, GM-CSF e interferón- γ , y no encontramos una actividad de carácter análoga, aún en aquellas citoquinas como las IL-1 α e IL-6, quienes comparten un amplio conjunto de actividades con el TNF- α . Si bien no es posible concluir que la acción del TNF- α no pueda ser reproducida por otras citoquinas no contempladas en nuestro estudio, si es posible afirmar que la misma es, al menos, altamente selectiva para el TNF- α .

Cuál es el mecanismo a través del cual el TNF- α ejerce un efecto *priming* sobre el proceso apoptótico en el neutrófilo? Esta pregunta no tiene aún una respuesta satisfactoria. Al respecto, sin embargo, las experiencias descriptas en esta Tesis permiten ir delineando un mecanismo, aún no completamente definido.

Trabajos previos han examinado el papel de los IRO en la inducción de la apoptosis del neutrófilo. Kasahara y colaboradores (188) han demostrado que la apoptosis espontánea de los neutrófilos, así como también la aceleración del proceso apoptótico inducido por entrecruzamiento de Fas, son inhibidos parcialmente por la enzima catalasa, sugiriendo de este modo la participación del peróxido de hidrógeno. En el mismo sentido, los autores demostraron que la progresión a la apoptosis es más lenta en neutrófilos provenientes de pacientes CGD, que en neutrófilos provenientes de dadores sanos. Hannah y colaboradores (170), por otra parte, demostraron que en condiciones de hipoxia, la apoptosis de los neutrófilos progresa más lentamente. Finalmente, diferentes autores han mostrado que luego de la fagocitosis, los neutrófilos experimentan un incremento en sus porcentajes de apoptosis, a través de mecanismos dependientes de la generación de IRO (170,189,190). Considerando que el TNF- α es capaz de potenciar la generación de IRO inducida por diferentes agonistas en el neutrófilo (139-141), examinamos la posibilidad de que la acción promotora de la apoptosis mediada por TNF- α involucrase la participación de especies oxidantes. Los resultados obtenidos muestran, no sólo que la catalasa y la superóxido dismutasa no previnieron la acción proapoptótica mediada por el TNF- α , sino que la misma fue observada, en niveles comparables a los controles, en neutrófilos provenientes de pacientes con CGD. Estos resultados indican que los IRO no participan en el efecto promotor de la apoptosis mediado por TNF- α .

Por otra parte, es interesante destacar observaciones previas realizadas por nuestro grupo indicando que los complejos inmunes aceleran la apoptosis de los neutrófilos a través de un mecanismo dependiente de la activación del estallido respiratorio, fenómeno evidente a partir de las 12 hs de cultivo (166). En contraste, los hallazgos presentados en esta Tesis indican que la capacidad de los complejos inmunes de gatillar la apoptosis de neutrófilos previamente expuestos a TNF- α no se relaciona con la activación de un mecanismo oxígeno-dependiente. Ello sugiere que la exposición a TNF- α no sólo permite a un importante grupo de estímulos actuar como poderosos promotores de la apoptosis, sino que además condiciona la naturaleza de las vías de señalización a través de las cuales estos estímulos promueven el fenómeno apoptótico.

El sistema Fas/FasL constituye el sistema fisiológico más eficiente en la promoción de apoptosis. Los neutrófilos, a diferencia de otras poblaciones leucocitarias, expresan constitutivamente, no sólo Fas, sino también FasL (129). Esta expresión constitutiva parecería explicar, al menos parcialmente, la corta vida media del neutrófilo. Nuestras

observaciones indican que el tratamiento con TNF- α no modula la expresión del sistema Fas/FasL (Figura 12), sumada a la manifiesta incapacidad de anticuerpos bloqueantes anti-FasL y anti-Fas de prevenir la acción promotora de la apoptosis mediada por el TNF- α , indican que este sistema no es responsable de la actividad proapoptótica impuesta por esta citoquina.

Es conocido que el tratamiento de diferentes tipos celulares, entre ellos el neutrófilo, con TNF- α , conduce a la activación y consecuente translocación al núcleo del factor de transcripción NF- κ B, quien media, como ha sido descrito en la mayoría de los sistemas celulares analizados, un claro efecto anti-apoptótico (149,150,171,172). Examinamos la posibilidad de que los agentes promotores de la apoptosis, en células pretratadas con TNF- α , pudiesen interferir en la activación de NF- κ B. Los resultados presentados en la Figura 15 descartan esta posibilidad. En efecto, empleando Z como agonista, observamos que la translocación de NF- κ B no se encuentra inhibida, por el contrario, se manifiesta exacerbada en células tratadas con TNF- α + Z, respecto de lo observado en células tratadas sólo con TNF- α , revelando que, a pesar del aumento en la translocación de NF- κ B, la promoción de la apoptosis no es prevenida.

La señalización inducida a través del TNF-R1 comprende diferentes etapas (ver Figura 7 en la Introducción). En una primera etapa, el trímero TNF- α es reconocido por el dominio extracelular del TNF-R1. Este reconocimiento conduce a la liberación de la proteína silenciadora de los dominios de muerte (SODD) desde el dominio intracelular del receptor. La microagregación de los dominios intracelulares del TNF-R1 induce la interacción de los mismos con la proteína adaptadora TRADD (proteína adaptadora de los dominios de muerte asociados al TNF-R1), proteína que recluta moléculas adaptadoras adicionales, tales como RIP, TRAF2 y FADD (dominio de muerte asociado a Fas). Estas proteínas adaptadoras reclutan enzimas claves en la señalización del TNF-R1 y, por otra parte, merced a la actividad de FADD, reclutan y activan caspasa 8, a través de un mecanismo autocatalítico, dando inicio a la activación de las caspasas propias a la vía extrínseca, que comprenden no sólo a la caspasa 8, sino también a la caspasa 10. Por último, caspasa 8 activa a caspasa 3, caspasa donde confluyen las vías extrínseca e intrínseca inductoras de apoptosis (103,112-113). Nuestros resultados muestran que los inhibidores de caspasa 8 y 3 reducen significativamente el efecto *priming* inducido por el TNF- α sobre el proceso apoptótico en el neutrófilo, indicando que el mismo se halla mediado, en gran medida, por la activación de la vía extrínseca. Nos preguntamos,

además, si la vía intrínseca podría colaborar en este proceso apoptótico? Si bien nosotros no hemos examinado el efecto inducido por inhibidores de caspasa 9 (caspasa responsable de la activación de la vía intrínseca) sí hemos observado que el efecto *priming* ejercido por el TNF- α sobre la apoptosis del neutrófilo se asocia a la inducción temprana de una pérdida en el potencial de membrana mitocondrial, evaluado por citometría de flujo, mediante el empleo de Rhodamina 123. Ello indicaría que esta vía se encuentra involucrada también en la promoción del proceso apoptótico ejercido por el TNF- α , muy probablemente como un mecanismo amplificador de las señales apoptóticas ejercidas por la vía extrínseca. De este modo, ambas vías parecerían estar involucradas en el efecto proapoptótico mediado por TNF- α .

Trabajos previos han demostrado que los neutrófilos humanos no expresan Bcl-2 pero sí Mcl-1, Bad, Bax, Bak, y Bik (126-128). La expresión de la proteína anti-apoptótica Mcl-1 ha mostrado inhibirse en respuesta a tratamientos que imponen una promoción de la apoptosis en el neutrófilo y ha sido sugerido que tal disminución juega un papel causal en la progresión del fenómeno apoptótico (126-128). Esta rápida disminución en la expresión de Mcl-1 podría explicarse en función de la presencia de motivos PEST (residuos de prolina, glutamato, serina y treonina), motivos que facilitan la degradación proteolítica de Mcl-1 (126). Nosotros examinamos si la actividad promotora de la apoptosis mediada por el TNF- α se asociaba a una inhibición en la expresión de Mcl-1. Encontramos, en los neutrófilos pretratados con TNF- α y luego expuestos a IgG_i, una dramática disminución en los niveles intracelulares de Mcl-1, fenómeno que podría predisponer a la progresión de la apoptosis en el neutrófilo. No obstante, no hemos definido aún en qué medida la disminución en la expresión intracelular de Mcl-1 es causal de la exacerbación de la respuesta apoptótica mediada por el TNF- α , o sólo refleja un evento tardío que la acompaña.

Cómo evaluar la relevancia de nuestros resultados? Podrían nuestras observaciones realizadas "in vitro" explicar observaciones "in vivo" relativas al impacto del TNF- α en los procesos inflamatorios agudos? El TNF- α es, básicamente, una citoquina proinflamatoria. Su liberación, por parte de macrófagos activados, conjuntamente con IL-1 α e IL-6, pone en marcha una variedad de mecanismos proinflamógenos que actúan tanto en forma local, como sistémica. En relación a los neutrófilos, ya hemos mencionado en la presente Tesis, su capacidad de inducir la puesta en marcha de diversos mecanismos inflamatorios. No obstante, no ha sido definido aún el papel del TNF- α en relación al curso de los fenómenos inflamatorios agudos, fenómenos que tienen al

neutrófilo como figura celular preponderante. En este sentido, es importante considerar hallazgos recientes publicados por Skerrett y colaboradores (191), quienes examinaron el papel de los TNF-R en la inflamación pulmonar aguda. Ellos encontraron que la presencia de neutrófilos infiltrantes en el parénquima pulmonar, luego de la exposición de ratones a *Pseudomonas aeruginosa* aerolizada, se encontraba incrementada en ratones deficientes de TNF-R, en comparación con lo observado en los ratones controles. La mayor presencia de neutrófilos infiltrantes no se asoció a una mayor producción local de quimoquinas atrayentes del neutrófilo, por el contrario, los ratones deficientes de TNF-R mostraron una menor concentración de quimoquinas frente a sus contrapartes salvajes, en el líquido de lavado bronqueoalveolar. A la luz de nuestros resultados, la mayor infiltración de neutrófilos presente en los ratones deficientes de TNF-R podría explicarse no por cambios en la velocidad con la cual los neutrófilos acceden al parénquima pulmonar, sino merced a una mayor resistencia de los mismos a sufrir apoptosis, resistencia conferida por la ausencia de receptores para TNF-R1 en los propios neutrófilos. Por otra parte, observaciones de Marino M y colaboradores (155), demostraron un desarrollo exacerbado en procesos inflamatorios agudos en ratones deficientes en la producción de TNF- α , fenómeno que podría explicarse de modo similar a lo descrito para ratones deficientes en el receptor de TNF- α .

Las experiencias descritas en la primera parte de esta Tesis componen la parte sustancial de un trabajo publicado por nosotros en abril del 2001 (192). Posteriormente, Daigle y colaboradores (193), confirmaron algunos de nuestros hallazgos, particularmente, el referido a la acción proapoptótica que impone el pretratamiento con TNF- α a la actividad del GM-CSF ejercida sobre el neutrófilo. Estos autores demuestran que la activación de receptores que portan dominios de muerte, entre ellos el TNF-R1, no sólo anula la acción anti-apoptótica mediada por el GM-CSF, sino que le confiere una actividad proapoptótica.

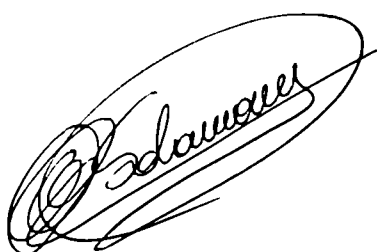
En la presente Tesis analizamos, además, si otras poblaciones leucocitarias mieloides eran también susceptibles a la acción *priming* ejercida por el TNF- α sobre el proceso apoptótico. Los estudios fueron llevados a cabo en monocitos y células dendríticas. En estas poblaciones celulares, el TNF- α fue incapaz de ejercer un efecto promotor de la apoptosis, incluso al extender los cultivos por 7 días. Realizamos también un conjunto de experiencias empleando granulocitos eosinófilos, en poblaciones con un índice de pureza superior al 85%. No encontramos tampoco en los eosinófilos, promoción

alguna de la apoptosis por tratamiento con TNF- α y posterior exposición a un amplio panel de agonistas (resultados no mostrados).

Las observaciones realizadas en eosinófilos nos permitieron comprender resultados obtenidos previamente por nuestro grupo, en relación al modo a través del cual las plaquetas modulan el fenómeno apoptótico en granulocitos neutrófilos y eosinófilos. Trabajos previos realizados por nuestro laboratorio, mostraron que las plaquetas prevenían, dramáticamente, la apoptosis de los neutrófilos (194) y eosinófilos (195). No obstante, encontramos que los mecanismos que operan en la prevención de la apoptosis difieren para neutrófilos y eosinófilos. Para el caso de los neutrófilos, observamos que las plaquetas, a efectos de mediar un efecto preventivo sobre la apoptosis, debían contactar en forma directa con los neutrófilos, no observándose efecto preventivo mediado por los sobrenadantes plaquetarios. Por el contrario, para el caso de los eosinófilos, observamos que los sobrenadantes plaquetarios mediaban un notable efecto antiapoptótico. Al examinar los mecanismos subyacentes a esta actividad, encontramos que la misma era atribuible a la presencia del GM-CSF producido por las propias plaquetas. Considerando que el GM-CSF constituye el agente que media el efecto más potente en la prevención de la apoptosis de neutrófilos y eosinófilos, no resultaba claro el motivo por el cual los sobrenadantes plaquetarios, ricos en GM-CSF, se mostraban incapaces de prevenir la apoptosis de los neutrófilos. Los estudios presentados en esta Tesis permiten explicar este resultado, aparentemente contradictorio. Los sobrenadantes plaquetarios mostraron contener, no sólo GM-CSF, sino también TNF- α , citoquina que modifica el perfil de acción del GM-CSF, transformándola en una citoquina proapoptótica para el neutrófilo, pero no para el eosinófilo.

El papel del TNF- α en la hematopoyesis ha sido extensivamente investigado y efectos claramente antagónicos han sido demostrados. Ciertamente, no existen eventos más discrepantes en la fisiología celular que la proliferación y la apoptosis, sin embargo, el TNF- α puede mediar ambos procesos, dependiendo del sistema y el tipo celular en el cual se evalúe su accionar (196). Diversos trabajos han analizado el efecto del TNF- α en leucemia mieloide aguda (LMA). Los hallazgos reportados no arrojan una visión coincidente. Ha sido mostrado que el TNF- α es un potente factor de crecimiento de los blastos mieloides, en presencia de IL-3 o GM-CSF (197). Otros trabajos, en contraste, muestran para el TNF- α una acción claramente proapoptótica, postulándolo como una herramienta terapéutica de potencial utilidad en el tratamiento de las LMA (198).

Nuestros resultados demuestran que el TNF- α media un claro efecto antiapoptótico en las células LMA. El efecto preventivo sobre la apoptosis se manifiesta, no sólo en relación a la apoptosis espontánea, sino también en relación a aquella inducida por agentes quimioterapéuticos como idarubicina y etopósido. El efecto inducido sobre células LMA es, por lo tanto, opuesto al observado para los neutrófilos. Podría postularse que estas acciones opuestas guardarían relación con la participación diferencial de los dos tipos de TNF-R, en cada uno de los sistemas celulares analizados. No obstante, resultados obtenidos mediante el empleo de anticuerpos bloqueantes de los TNFR1 y TNFR-2 muestran que, la modulación del fenómeno apoptótico en ambos sistemas es mediada a través del TNFR1 (154,198). Es lógico suponer, por lo tanto, que las diferencias observadas en los dos sistemas analizados guardarían relación con la particular señalización inducida a través del TNF-R1 en neutrófilos y en blastos LMA. No obstante, resulta muy difícil analizar este aspecto basándose en los trabajos previos publicados, ya que son parciales y sumamente contradictorios. El análisis de los mecanismos transduccionales gatillados a través del TNF-R1 que le permiten al TNF- α mediar efectos opuestos sobre el proceso de apoptosis, en diferentes sistemas celulares, constituye la base de un proyecto de investigación que desarrollaremos durante los próximos meses en nuestro laboratorio.



Salanone
@ alarich.

Dr. JORGE GEFNER
INVEST. INDEPENDIENTE
PROF. REGULAR ADJUNTO
INMUNOLOGÍA - FAC. MEDICINA - UNL

JORGE GEFNER



ANALÍA TREVANI

⌘ Apéndice ⌘

Leucemia Mielóide Aguda

Las leucemias mieloides agudas (LMA) se definen como una expansión clonal maligna de precursores mieloides, que se caracteriza por la proliferación de blastos leucémicos, principalmente en médula ósea, y una producción alterada de las poblaciones normales del tejido hematopoyético. Una mutación de un proto-oncogen (reguladores estrictos de la proliferación celular) en una única célula conduce a una hemopoyesis clonal. La posterior progresión de la LMA se encuentra acompañada por nuevos cambios genéticos involucrando uno o más oncogenes o genes supresores de tumores, finalizando con la aparición de aberraciones cromosómicas (199-200).

Variantes en LMA

El French-American-British (FAB) ha clasificado a las LMA en 8 subtipos mayores, bajo las denominaciones de M0 a M7.

Leucemia Mieloblástica aguda. Puede desarrollarse a predominio de mieloblastos que se encuentren en un grados de diferenciación particular. La LMA-M1, presenta una proporción de blastos menor al 10%, los que muestran una maduración granulocítica. Al menos 15% de los blastos contienen MPO (mieloperoxidasa). La LMA-M2 representa la forma típica de la leucemia mieloblástica, con un nivel de diferenciación mayor al del promielocito. Es frecuente en este subtipo la presencia de bastoncitos de Auer, neutrófilos hipogranulares, e importante reactividad con la MPO (200-202).

La LMA-M0, presenta blastos morfológicamente indiferenciados, carentes de gránulos azurófilos y bastoncillos de Auer. No manifiestan actividad de MPO (203)

Leucemia promielocítica aguda (LMA-3). Presenta blastos fuertemente granulares. La MPO es fuertemente positiva y las células presentan núcleo bilobulado no reniforme y pocos gránulos citoplasmáticos (200-202).

Leucemia mielomonocítica: (LMA-M4). Expresa signos de diferenciación granulocítica y monocítica. A menudo expresan monocitosis periférica, existiendo una variante (M4eo que se asocia a eosinofilia en médula ósea.

Leucemia monocítica (LMA-M5). Existen dos formas de este tipo de leucemia, la forma inmadura M5a frecuente en los niños de corta edad (menores de 1 año), y la más madura o diferenciada. En el caso de la M5a, los blastos presentan actividad esterasa inespecífica

y los monoblastos no contienen lisozima . Por el contrario la LMA-M5b se asocia con altos niveles de lisozima, existiendo una excreción importante en la orina (200-202).

Eritroleucemia (LMA-M6). Presentan caracteres mielodisplásicos de estirpe triple: diseritropoyesis, disgranulopoyesis y megacariocitos morfológicamente atípicos. Por esta razón y por presentar menos del 30% de blastos en el recuento de mononucleares de médula ósea (200-202).

Leucemia Megacarioblástica (LMA-M7). Las células leucémicas se presentan como megacarioblastos, los cuales expresan glicoproteínas plaquetarias (204).

En la siguiente Tabla se presentari las translocaciones cromosómicas predominantes en cada subtipo (200-204).

Clasificación FAB	Aberraciones cromosómicas
M2	t(8;21) (q22;q22)
M1 y M2	t (9;21) (q32;q11)
M3	t(15;17) (q22;q11-12)
M2 y M4	t (6;9) (q21,q34)
M4eo	Inversión/delesión (16) (q22)
M5a	t(11) (q23)
M7	t(1;22)(p13;q13)

Los marcadores mieloides que predominan en los diferentes subtipos de LMA se indican en la siguiente Tabla (205).

Subtipos de LMA	Marcadores positivos	Marcadores negativos
Mieloblástica	CD11,CD13,CD15,CD33, HLA-DR	CD14,CD10,antígenos de células B
Mielomonocítica	CD11, CD13, CD14, CD15, CD32, CD33, HLA-DR	CD10, antígenos de células B
Eritroblástica	Glicoforina, HLA-DR	CD10, antígenos de células B
Promielocítica	CD11,CD13,CD15,CD33,	CD14,HLA-DR,CD10, antígenos de células B
Monocítica	CD11, CD13, CD14, CD33, HLA-DR	CD10, antígenos de células B
Megacariocítica	Glicoproteína Ib, IIb, IIa,	CD10, antígenos de células B

& Bibliografía &

- 1.-Kanwar, V.S. y Cairo, M.S.
Neonatal neutrophil maturation, kinetics, and function.
En: The natural immune system: The neutrophil. Ed. Abramson, J. y Gary
Wheeler, J.Oxford University Press Inc, Nueva York, pp. 63, 1993.
- 2.-Bavior, B.M. y Golde, D.W.
Production, distribution and fate of neutrophils.
En: Hematology, 5th ed. Ed. Williams.
McGraw-Hill, New York, pp.773, 1995.
- 3.-Athens, J.W.
Granulocitos- Neutrófilos
En: Hematología clínica, 9th ed. Ed. Wintrobe.
Inter-Medica, pp. 189, 1994.
- 4.-Yamamoto, C., Yoshida, S., Taniguchi, H., Qin, M.H., Miyamoto, H. y Mizuguchi, Y.
Lipopolysaccharide and granulocyte colony-stimulating factor delay neutrophil apoptosis
and ingestion by guinea pig macrophages.
Infect. Immun. 61: 1972, 1993.
- 5.-Savill, J.
The innate immune system: recognition of apoptotic cells.
En: Apoptosis and the immune response, ed. Gregory C.D.
Wiley-Liss, New York, pp 341, 1995.
- 6.-Savill, J., Fadok, V., Henson, P. y Haslett, C.
Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis.
Immunol. Today 14: 131, 1993.
- 7.-Savill, J.S., Wyllie, A.H., Henson, J.E., Walport, M.J., Henson, P.M. y Haslett, C.
Macrophage phagocytosis of aging neutrophils in inflammation. Programmed cell death in
the neutrophil leads to recognition by macrophages.
J. Clin. Invest. 83: 865, 1989.
- 8.-Grigg, J.M., Savill, J.S., Sarraf, C.E., Haslett, C. y Silverman, M.
Neutrophil apoptosis and clearance from neonatal lungs.
Lancet 338: 720, 1991.
- 9.-Savill, J., Smith, J., Sarraf, C., Ren, Y., Abbott, F. y Rees, A.J.
Glomerular mesangial cells and inflammatory macrophages ingest neutrophils undergoing
apoptosis.
Kidney Int. 42: 924, 1992.
- 10.-Moore, A.S.M.
Expansion of myeloid stem cells in culture.
Semin. Hematol. 32: 183, 1995.
- 11.-Sakamoto, K.M., Golde, D.W. y Gasson, J.C.
The biology and clinical applications of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor.
Pediatr. 118: 517, 1991.

- 12.-Appelbaum, F.R.
The clinical use of hematopoietic growth factors.
Semin. Hematol. 26 (Supl.3): 7, 1989.
- 13.-Holyoake, T.L.
Cytokines at the research-clinical interface: potential applications.
Blood Rev. 10: 189, 1996.
- 14.-Price, T.H., Chatta, G.S. y Dale, D.C.
Effect of recombinant granulocyte colony-stimulating factor on neutrophil kinetics in normal young and elderly humans.
Blood 88: 335, 1996.
- 15.-Cahill, R.N.P., Poskitt, D.C., Frost, H., Tmka, Z.
Two distinct pools of recirculating T lymphocytes: Migratory characteristics of nodal and intestinal T lymphocytes.
J.Exp. Med. 145: 420, 1977.
- 16.-Cahill, R.N.P., Poskitt, D.C., Hay, J.B., Heron, Y., Tmka, Z.
The migration of lymphocytes in the fetal lamb.
Eur. J. Immunol. 9: 251, 1979.
- 17.-Springer, T.A.
Adhesion receptors of the immune system.
Nature 346: 425, 1990.
- 18.-Springer, T.
Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration.
Annu.Rev. Physiol. 57: 827, 1995.
- 19.-Carlos, T.M. y Harlan, J.M.
Leukocyte-endothelial adhesion molecules.
Blood 84: 2068, 1994.
- 20.-Rosales, C. y Juliano, R.L.
Signal transduction by cell adhesion receptors in leukocytes.
J. Leuk. Biol. 57: 189, 1995.
- 21.-Wahl, S.M., Feldman, G.M. y McCarthy, J.B.
Regulation of leukocyte adhesion and signaling in inflammation and disease.
J.Leuk. Biol. 59: 789, 1996.
- 22.-Bevilacqua, M.P., Nelson, R.M., Mannori, G. y Cecconi, O.L
Endothelial-leukocyte adhesion molecules in human disease.
Annu. Rev. Med. 45: 361, 1994.
- 23.-Hogg, N. y Cornelia, B.
Structure and function of adhesion receptors in leukocyte trafficking.
Immunol. Today 16: 327, 1995.
- 24.-Luscinkas, F.W. y Gimbrone, M.A.

Endothelial-dependent mechanisms in chronic inflammatory leukocyte recruitment.
Annu. Rev. Med. 47: 413, 1996.

25. Witko-Sarsat, V, Rieu, P, Descamps-Latscha B, Lesavre P, and Mecarelli-Halbwachs L
Neutrophils Molecules, functions and pathophysiological aspects
Lab.Invest.,80:617, 2000

26.-Bevilacqua, M.P.
Endothelial-leukocyte adhesion molecules.
Annu.Rev. Immunol. 11: 767, 1993.

27.-Martin-Padura I., Lostaglio S., Schneemann M., Williams L., Romano M., Fruscella P., Panzeri C., Stoppacciaro A., Ruco L., Villa A., Simmons D., Dejana E.,
Junctional adhesion molecule, a novel member of immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junction and modulates monocyte transmigration.
J.Cell.Biol.142:117, 1998

28.- Verhoef, J. y Visser, M.R.
Neutrophil phagocytosis and killing.
En: The natural immune system: The neutrophil. Ed. Abramson, J. y Gary Wheeler, J.
Oxford University Press Inc, Nueva York, pp.109, 1993.

29.-Metzger, H.
Fc receptors and the action of antibodies. Ed. Metzger, H.
ASM Publications, Washington DC, 1987.

30.-Shaw, D.R. y Griffin, F.M.
Phagocytes require repeated triggering of macrophage phagocytic receptor during particle ingestion.
Nature 289: 409, 1981.

31.-Babior, B.M.
The respiratory burst oxidase.
Advances in Enzymology 65: 49, 1992.

32.-Rosen, G., Pou, S., Ramos, C., Cohen, M. y Britigan, B.
Free radicals and phagocytic cells.
Faseb J. 9: 200,1995.

33.-Flohé, L., Beckmann, H. y Loschen, G.
Oxygen-centered free radicals as mediators of inflammation.
En: Oxidative stress. Ed. Sies, H.
Academic Press Inc, Londres, pp.403, 1985.

34.-Bastian, N. y Hibbs, J.
Assembly and regulation of NADPH oxidase and nitric oxide synthase.
Curr. Op. Immunol. 6:131, 1994.

35.-McPhail, L.
SH3-dependent assembly of the phagocytes NADPH oxidase.
J.Exp. Med. 180: 2011, 1994.

- 36.-Mills, E.L. y Noya, F.J.D.
Congenital neutrophils deficiencies.
En: The natural immune system: The neutrophil. Ed. Abramson, J. y Gary Wheeler, J.
Oxford University Press Inc, Nueva York, pp.194, 1993.
- 37.-Mackay, I and Rosen F.
Immunodeficiency diseases caused by defects in phagocytes.
N. Engl.J.Med.343 (23):1703, 2000
- 38.-Ganz, T., Selsted, M., Babior, B. y Cumutte, J.
Neutrophils and host defense.
Ann. Intern. Med. 109: 127,1988.
- 39.-Weiss, S.
Tissue destruction by neutrophils
N.Engl. J. Med. 320: 365, 1989.
- 40.-Klebanoff, S.J.
Myeloperoxidase-mediated cytotoxic system.
En: The reticuloendothelial system. Vol. 2: Biochemistry and metabolism.
Ed. Sbarra, A.J. y Strauss, R.R.
Plenum Press, New York, pp.279, 1980.
- 41.-Bielsky, B.H. y Allen, A.O.
Mechanism of dismutation of superoxide radicals.
J.Phys. Chem. 81: 1048, 1977.
- 42.-Jensen, M.S. y Bainton, D.F.
Temporal changes in pH within the phagocytic vacuole of the polymorphonuclear neutrophilic leukocytes.
J.Cell. Biol. 56: 379,1973.
- 43.-Chance, B., Sies, H. y Boveris, A.
Hidroperoxide metabolism in mammalian organs.
Physiol. Rev. 59: 527, 1979.
- 44.-Hyslop, P.A., Hinshaw, D.B. y Halsey W.A.
Mechanisms of oxidant mediated-cell injury: the glycolytic and mitochondrial pathways of ADP phosphorylation are major intracellular targets inactivated by hydrogen peroxide.
J.Biol. Chem. 263: 1665,1988.
- 45.-Thomas, L.T. y Lehrer, R.I.
Human neutrophil antimicrobial activity.
Rev. Infect. Dis. 10, suppl. 2: S450, 1988.
- 46.-Rosen, G., Pou, S., Ramos, C., Cohen, M. y Britigan, B.
Free radicals and phagocytic cells.
Faseb J. 9: 200, 1995.
- 47.-Test, S.T. y Weiss, S.J.

The generation of utilization of chlorinated oxidants by human neutrophils.
Adv. Free Radical Biol. Med. 2: 91, 1986.

48.-Albrich, R.J., Gilbaugh, J.H., Callahan, K.B. y Hurst, J.K.
Effect of the putative neutrophil-generated toxin, hypochlorous acid on membrane permeability and transport systems of *Escherichia coli*.
J.Clin. Invest. 78: 177, 1986.

49.-Rakita, R.M., Michel, B.R. y Rosen, H.
Mieloperoxidase mediated inhibition of microbial respiration: damage to *Escherichia coli* ubiquinol oxidase.
Biochemistry 28: 3031, 1989.

50.-Winterbourn, C.C., van der Berg, J.J. Roltman, E. y Kuipers, F.A.
Chlorohydrin formation from unsaturated fatty acids reacted with hypochlorous acid.
Arch. Biochem. Biophys. 296: 547, 1992.

51.-Kahn, A.V. y Kasha, M.
Red chemiluminescence of molecular oxygen in aqueous solution.
Chem. Phys. 39: 2105, 1963.

52.-Kellog, E.W. y Fridovich, I.
Superoxide, hydrogen peroxide and singlet oxygen in lipid peroxidation by a xantine oxidase system.
J.Biol. Chem 250: 8812, 1975.

53.-Borregard Niels and Cowland Jack.
Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leucocyte
Blood, 89 (10):3503, 1997

54.-Janoff, A.
Elastase in tissue injury.
Annu. Rev. Med. 36: 207, 1985.

55.-Miller L., Baiton D, Borregard N, Springer T,
Stimulated mobilization of monocyte Mac-1 and p150,95 adhesion proteins from an intracellular vesicular compartment to the cell surface.
J. Clin. Invest. 80:535,1987

56.-Weiss, S.J. y Peppin, G.J.
Collagenolytic metalloenzymes of the human neutrophil: characteristics, regulation and potential function in vivo.
Biochem. Pharmacol. 35: 3189,1986.

57.-Weiss, S.J., Peppin, G.J., Ortiz, X., Ragsdale, C. y Test, S.T.
Oxidative autoactivation of latent collagenase by human neutrophils.
Science 227: 747,1985.

58.-Peppin, G.J. y Weiss, S.J.
Activation of the endogenous metalloproteinase, gelatinase, by triggered human neutrophils.
Proc. Nac. Acad. Sci. USA 83:4322-6,1986.

- 59.-Odeberg, H. y Olsson, I.
Mechanisms for the microbicidal activity of cationic proteins of human granulocytes.
Infect. Immun. 14: 1269, 1976.
- 60.-Ganz, T., Selsted, M., Babior, B. y Cumutte, J.
Neutrophils and host defense.
Ann. Intern. Med. 109: 127, 1988.
- 61.-Weiss, J., Elsbach, P., Olsson, I. y Odeberg, H.
Purification and characterization of a potent microbicidal and membrane active protein from the granules of human polymorphonuclear leukocytes.
J. Biol. Chem. 253: 2664, 1978.
- 62.-Cassatella, M.A.
The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils.
Immunol. Today 16: 21, 1995.
- 63.-Lloyd, A.R. y Oppenheim, J.J.
Poly's lament: the neglected role of the polymorphonuclear neutrophil in the afferent limb of the immune response.
Immunol. Today 13: 169, 1992.
- 64.-Bazzoni, F., Cassatella, M.A., Laudanna, C. y Rossi, F.
Phagocytosis of opsonized yeast induces tumor necrosis factor- α mRNA accumulation and protein release by human polymorphonuclear leukocytes.
J. Leuk. Biol. 50: 223, 1991.
- 65.-Haziot, A., Tsuberi, B.Z. y Goyert, S.M.
Neutrophil CD 14: biochemical properties and role in the secretion of tumor necrosis factor- α in response to lipopolysaccharide.
J. Immunol. 150: 5556, 1993.
- 66.-Casatella, M.A., Gasparini S., Russo M.
Cytokine expression and release by neutrophils
An. NY. Acad. Sci. 15,832:233-42, 1997
- 67.- Palma, C., Cassone, A., Serbousek, D., Pearson, C.A. y Djeu, J.Y.
Lactoferrin release and interleukin-1, interleukin-6, and tumor necrosis factor production by human polymorphonuclear cells stimulated by various lipopolysaccharides: relationship to growth inhibition of *Candida albicans*.
Infect. Immun. 60: 4604, 1992.
- 68.-Malyak, M., Smith, M.F., Abel, A.A. y Arend, W.P.
Peripheral blood neutrophil production of interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-1 beta.
J. Clin. Immunol. 14: 20, 1994.
- 69.-Ulich, T.R., Guo, K., Yin, S., del Castillo, J., Yi, E.S., Thompson, R. y Eisenberg, S.P.

Endotoxin-induced cytokine gene expression in vivo. IV Expression of interleukin-1 α/β and interleukin-1 receptor antagonist mRNA during endotoxemia and during endotoxin-initiated local acute inflammation.

Am. J. Pathol. 141: 61, 1992.

70.-McColl, S.R., Paquin, R., Ménard, C. y Beaulieu, A.D.

Human neutrophils produce high levels of the interleukin-1 receptor antagonist in response to granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and tumor necrosis factor α .

J. Exp. Med. 176: 593, 1992.

71.-Re, F., Mengozzi, M., Muzio, M., Dinarello, C.A., Mantovani, A. y Colotta, A.

Expression of interleukin-1 receptor antagonist (IL-1ra) by human circulating polymorphonuclear cells.

Eur. J. Immunol. 23: 570, 1993.

72.-Cassatella, M.A., Bazzoni, F., Ceska, M., Ferro, I., Baggiolini, M. y Berton, G.

IL-8 production by human polymorphonuclear leukocytes. The chemoattractant formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine induces the gene expression and release of IL-8 through a Pertussis toxin-sensitive pathway.

J. Immunol. 148: 3216, 1992.

73.-Strieter, R.M., Kasahara, K., Allen, R.M. y Standiford, T.J., Rolfe, M.W., Becker, F.S., Chensue, S.W. y Kunkel, S.L.

Cytokine-induced neutrophil-derived interleukin-8.

Am. J. Pathol. 141: 397, 1992.

74.-Takahashi, G.W., Andrews, D.F., Lilly, M.B., Singer, J.W. y Alderson, M.R.

Effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-3 on interleukin-8 production by human neutrophils and monocytes.

Blood 81: 357, 1993.

75.-Fujishima, S., Hoffman, A.R., Vu, T., Kim, K.J., Zheng, H., Daniel, D., Kim, Y., Wallace, E.F., Larrick, J.W. y Raffin, T.A.

Regulation of neutrophil interleukin 8 gene expression and protein secretion by LPS, TNF- α , and IL-1 β .

J. Cell. Physiol. 154: 478, 1993.

76.-Grotendorst, G.R., Smale, G. y Pancev, D.

Production of transforming growth factor beta by human peripheral blood monocytes and neutrophils.

J. Cell. Physiol. 140: 396, 1989.

77.-Fava, R.A., Olsen, N.J., Postlethwaite, A.E., Broadley, K.N., Davidson, J.M., Nanney, L.B., Lucas, C. y Townes, A.S.

Transforming growth factor β 1 (TGF- β 1) induced neutrophil recruitment to synovial tissues: implications for TGF- β -driven synovial inflammation and hyperplasia.

J. Exp. Med. 173: 1121, 1993.

78.-Kasama, T., Strieter, R.M., Standiford, T.J., Burdick, M.D. y Kunkel, S.L.

Expression and regulation of human neutrophil-derived macrophage inflammatory

- protein 1 α .
J.Exp. Med. 178: 63, 1993.
- 79.-Kasama, T., Strieter, R.M., Lukacs, N.W., Burdick, M.D. y Kunkel, S.L.
Regulation of neutrophil-derived chemokine expression by IL-10.
J.Immunol. 152: 3559, 1994.
- 80.-Taub, D., Conlon, K., Lloyd, A.R., Oppenheim, J.J. y Kelvin, D.J.
Preferential migration of activated CD4⁺ and CD8⁺ Tcells in response to
MIP-1 α and MIP-1 β .
Science 260: 355, 1993.
- 81.-Oppenheim, J.J., Zachariae, C.O.C., Mukaida, N. y Matsushima, K.
Properties of the novel proinflammatory supergene "intercrine" cytokine family.
Annu. Rev. Immunol. 9: 617, 1991.
- 82.-Wang, P., Wu, P., Anthes, J.C., Siegel, M.I., Egan, R.W. y Billah, M.M.
Interleukin-10 inhibits interleukin-8 production in human neutrophils.
Blood 83: 2678, 1994.
- 83.-Wertheim, W.A., Kunkel, S.L., Standiford, T.J., Burdick, M.D., Becker, F.S., Wilke, C.A., Gilbert, A.R. y Strieter, R.M.
Regulation of neutrophil-derived IL-8: the role of prostaglandin E₂, dexamethasone, and IL-4.
J.Immunol. 151: 2166, 1993.
- 84.-Kerr J.F.R., Wyllie A.H. y Currie A.R.
Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics.
Br. J. Cancer 26: 239, 1972.
- 85.-Williams G.T., Smith C.A., McCarthy N.J. y Grimes E.A.
Apoptosis: final control point in cell biology.
Trends Cell Biol. 2: 263, 1992.
- 86.-Cohen J.J.
Apoptosis.
Immunol. Today 14:126, 1993.
- 87.-Steller H.
Mechanisms and genes of cellular suicide.
Science 267: 1445, 1995.
- 88.-Savill J., Fadok V., Henson P. y Haslett C.
Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis.
Immunol. Today 14: 131, 1993.
- 89.-Ellis R.E., Yuan J. y Horvity H.R.
Mechanisms and functions of cell death.
Annu. Rev. Cell. Biol. 7: 663, 1991.
- 90.-Thompson, C.B.

Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease.
Science 267: 1456, 1995.

91.-Abastado, J.P.
Apoptosis: function and regulation of cell death.
Res. Immunol. 147: 443, 1996.

92.-Osborne, B.A.
Apoptosis and the maintenance of homeostasis in the immune system.
Curr. Opin Immunol. 8: 245, 1996.

93.-White, K., Tahaoglu, E. y Steller, H.
Cell killing by the Drosophila gene reaper.
Science 271: 805, 1996.

94.-Chang H and Yang X.
Proteases for cell suicide: Functions and regulation of caspases
Microb.Molec.Biol.64 (4):821, 2000

95.-Fadok V., Cathelineau A., Daleke D., Henson P., and Bratton D
Loss of phospholipid asymmetry and surface exposure of phosphatidylserine is required for phagocytosis of apoptotic cells by macrophages and fibroblast.
J.Biol.Chem.,276:1071, 2001

96.-Wyllie, A.H., Kerr, J.F.R. y Currie, A.R.
Cell death: The significance of apoptosis.
Int. Rev. Cytol. 68: 251, 1980.

97.-Duvall, E. y Wyllie, A.H.
Death and the cell.
Immunol. Today 7: 115, 1986.

98.- Alnemri, E.S
Human ICE/CED-3 protease nomenclature
Cell. 87:171,1996

99.- Budijhardjo I., Oliver H., Lutter M., Luo X. and Wang
Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis
Annu.Rev.Cell Dev. Biol 15:269-293, 1999

100.-Cikala M., Wilm B., Hobmayer, E., Bottger A, and David, C.N.
Identification of caspases: Structure, of caspase and apoptosis
in the simple metazoan Hydra.
Curr Biol. 9:959-962,1999

101.- Earnshaw, W.C, Martins, L M and Kaufmann, S. H.
Mammalian caspase: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis
Annu.Rev.Biochem. 68:383-424, 1999

102.- Thorberry, N

A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationship established for key mediators of apoptosis.
J.Biol.Chem. 272:17907-17911, 1997

103.- Hengartner M. O.
The biochemistry of apoptosis
Nature. 407: 770-776, 2000

104.- Hoffmann K.
The modular nature of apoptotic signaling proteins
Cell Mol.Life Sci.,55:1113,1999

105.- Nagata S.
Apoptotic DNA fragmentation.
Exp.Cell Res. 256:12-18, 2000

106.- Liu. X, Zou H, Slaughter and Wang X
DFF heterodimeric protein that function downstream of caspase 3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis
Cell 89:175-184, 1997

107.- Enari, M.
A caspase activated Dnase that degrades DNA during apoptosis and its inhibitor ICAD
Nature391:43-50, 1998

108.-Sakashira H., Enari, M and Nagata S.,
Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis.
Nature.391:96-99,1998.

109.- Herr I., Debatin M
Cellular stress response and apoptosis in cancer therapy.
Blood, 98:2603, 2001

110.- Zeuner A., Eramo A., Peschele C. And De Maria R
Caspase activation without death
Cell Death Differ. 6:1075, 1999

111 – Fantuzzi G and Dinarrello C
Interleukin-18 and Interleukin-1 β : two cytokine substrates for ICE (caspase-1)
J.Clin.Immunol.,19:1, 1999

112.-Green D. R.
Apoptotic pathway:paper wraps stone blunts scissors
Cell 102:1-4, 2000

113.-Wang X.,
The expanding role of mitochondria in apoptosis
Genes Dev.15:2922-2933, 2001

114.-Susuki I., Imai Y., Nakashashi K., Takio K., and Takashashi R.,

A serine protease, Htr2 is released from the mitochondria and interacts with IAPs, inducing cell death.

Mol.Cell 8:613-621,2001

115.-Lowe S, and Lin A

Apoptosis in cancer

Carcinogenesis 21:485-495, 2000

116.-Reed J,

Double identity for protein of the Bcl-2 family

Nature 387:773-776, 1997

117.-Adams J, and Cory

The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival

Science 281:1322-1326, 1998

118.-Buttke T., Sandstrom P.,

Oxidative stress as a mediator of apoptosis

Imunol. Tod.,15(1):7, 1994

119. Bogdan C., Rollinghoff M and Diefenbach

Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity

Curr.Opin.Immunol.,12:64, 2000

120.-Faimboim L, Satz L, Geffner J

Capítulo 10: Mecanismos efectores de la respuesta inmune, propios de la inmunidad innata

Introducción a la inmunología humana

Edición el autor

4ta edición, 202-266, 1999

121.Savill.J, Hogg N, Ren. Y., and Haslett., C

Trombospondin cooperates with CD36 and vitronectin receptor in macrophage recognition of neutrophils undergoing apoptosis.

J.Clin.Inv., 90:1513, 1992

122.-Haslett, C., Lee, A., Savill, J.S., Meagher, L. y Whyte, M.K.

Apoptosis (programmed cell death) and functional changes in aging neutrophils. Modulation by inflammatory mediators.

Chest 99: 6S, 1991.

123.-Squier, M.K.T., Sehnert, A.J. y Cohen, H.J.

Apoptosis in leukocytes

J.Leukoc. Biol. 57: 2, 1995.

124.-Colotta, F., Polentarutti, N., Sozzani, S. y Montovani, A.

Modulation of granulocyte survival and programmed cell death by cytokines and bacterial products.

Blood 80: 2012, 1992.

125.-Haslett C.

Resolution of acute inflammation and the role of apoptosis in the tissue fate of granulocytes.

Clin. Sci. 83: 639, 1992.

126.-Moulding D, Quayle J, Hart A and Edwards S

Mcl-1 expression in human neutrophil: regulation by cytokines and correlation with cell survival

Blood 92 (7):2495-2502, 1998

127.-Leuenroth J., Grutkoski, P., Ayala A., Simms H.,

The loss of Mcl-1 expression in human polymorphonuclear leucocytes promotes apoptosis.

J.Leuk.Biol., 68:158, 2000

128.- Akgul C., Moulding., Edwards S.,

Molecular control of neutrophil apoptosis

FEBS Lett., 487:318, 2001

129.- Liles, W.C., Kiener, P.A., Ledbetter, J.A., Aruffo, A. y Klebanoff S.J.

Differential expression of Fas (CD95) and Fas Ligand on normal human phagocytes: implications for the regulation of apoptosis in neutrophils.

J.Exp. Med. 184: 429, 1996.

130.-Beutler B, Cerami A

Tumor Necrosis, cachexia, shock, and inflammation: a common mediator

Annu. Rev. Biochem.57:505-18,1988

131.-Beutler B, Cerami A

The biology of cachexia/TNF- α primary mediator of the host response.

Annu. Immunol. 7:625-55,1989

132.-Fong Y, et al.

Antibodies to cachectin/tumor necrosis factor reduce interleukin 1 β and interleukin 6 appearance during lethal bacteremia.

J.Exp.Med 170:1627,1989

133.-Feldmann M, Brennan F, Maini R

Rheumatoid arthritis

Cell 85:307,1996

134.-Pierre Vassalli

The pathophysiology of tumor necrosis factor

Annu.Rev.Immunol 10:411-52, 1992

135.-Oberholzer C., Oberholzer A., Clare-Salzier M., and Moldawer

Apoptosis in sepsis : a new target for therapeutic exploration.

J. FASEB, 15:879, 2001

136.- Abbas A., Litchman A., Pober J

Capítulo 11: Cytokines

Cellular and molecular immunology

Editor William Schmitt.
4ta.edición., 235-270, 200

137.- Gamble, J. R., Harlan, J. M., S. J. Klebanoff, and M. A. Vadas.
Stimulation of the adherence of neutrophils to umbilical vein endothelium by human recombinant tumor necrosis factor.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82:8667, 1985.

138.- Shalaby, M. R., B. B. Aggarwal, E. Rinderknecht, L. P. Svedersky, B. S. Finkle, and M. A. Palladino, Jr.
Activation of human polymorphonuclear neutrophil function by interferon- γ and tumor necrosis factor.
J. Immunol. 135:2069, 1985.

139.-Klebanoff, S. J., M. A. Vadas, J. M. Harlam, L. M. Sparks, J. R. Gamble, J. M. Agosti, and A. M. Waltersdorff.
Stimulation of neutrophils by tumor necrosis factor.
J. Immunol. 136:4220, 1986.

140.-Nathan, C. F.
Neutrophil activation on biological surfaces. Massive secretion of hydrogen peroxide in response to products of macrophages and lymphocytes.
J. Clin. Invest. 80:1550, 1987.

141.-Nathan, C., S. Srima, C. Farber, E. Sanchez, L. Kabbash, A. Asch, J. Gailit, and S. D. Wright.
Cytokine-induced respiratory burst of human neutrophils: dependence on extracellular matrix proteins and CD11/CD18 integrins.
J. Cell Biol. 109:1341, 1989.

142. DeLuca C, Hakju Kwon, Rongtuan Lin, Weimber M., Hiscott
NF- κ B activation and HIV-1 induced apoptosis
Cytokine Growth Factor Rev.10:235, 1999

143.-Chen G, Goeddel D
TNF-R1 signaling: A beautiful pathway
Science 296:1634, 2002

144.-G.Chen, D Goeddel
TNF pathway
Science's (connections map 2002)

145.-Locksley M, Killen M, Leonardo M,
The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology
Cell 104:487, 2001

146.-Feldmann M, Maini N
Anti-TNF α therapy of rheumatoid arthritis: what have we learned
Ann. Rev. Immunol.19: 163,2001

147.-Bryant G, Damay and Bharat B. Aggarwal

Early events in TNF signaling: a story of association and dissociations.
J. Leuk. Biol. 61:559-566, 1997

148.-Baeurle PA, Henkel T.
Function and activation of NFkB in the immune system.
Annu Rev Immunol 12:141-79, 1994

149.-Baichwal V Baeurle P
Apoptosis: activate NFkB or die?
Cur. Biol 7:R94-R96, 1996

150.- Ghosh A, Karin M
Missing pieces in NF-kB puzzle
Cell 109:581, 2002

151.-Baker S, Reddy E
Transducers of life and death: TNF receptor superfamily and associated protein
Oncogen 12:1-9, 1996

152.- Kettritz, R., M. L. Gaido, H. Haller, F. C. Luft, C. J. Jennete, and R. J. Falk.
Interleukin-8 delays spontaneous and tumor necrosis factor- α mediated apoptosis of human neutrophils.
Kidney Int. 53:84, 1998.

153.- Yamashita, K. Y., A. Takahashi, S. Kobayashi, H. Hirata, P. W. Mesner Jr, S. H. Kaufmann, S. Yonehara, K. Yamamoto, T. Uchiyama, and M. Sasada.
Caspases mediate tumor necrosis factor- α -induced neutrophil apoptosis and downregulation of reactive oxygen production.
Blood 93:674, 1999.

154.-Murray, J., J. A. J. Barbara, S. A. Dunkley, A. F. Lopez, X. Van Ostade, A. M. Condliffe, I. Dransfield, C. Haslett, and E. R. Chilvers.
Regulation of neutrophil apoptosis by Tumor Necrosis Factor- α : requirement for TNFR55 and TNFR75 for induction of apoptosis in vitro.
Blood 90:2772, 1997.

155.-Marino M., Dunn A., Grail D., Inglese M., Noguchi Y., Richards E., Jungbluth A., Wada H., Moore M., Williamson B., Basu S., Old L.;
Characterization of tumor necrosis factor-deficient mice
Prod. Natl. Acad. Sci. 94:8093, 1997

156.- Boyum, A.
Separation of leukocytes from blood and bone marrow.
Scan. J. Clin. Lab. Invest. 21 (Supl. 97): 77, 1968.

157.- Boyum A.
Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood by centrifugation and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1g.
Scand J. Clin Lab. Invest. Suppl. 97:77, 1968

- 158.-Coligan, J.E., Kruijbeek, A.M., Margulies, D.H., Shevach, E.M. y Strober, W.
Morphological and biochemical assays of apoptosis.
En: Current protocols in Immunology. New York: John Wiley & Sons, pp.3171, 1994.
- 159.- Nicoletti, I., Migliorati, G., Pagliacci, M.C., Grignani, F. y Ricciardi, C.
A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry.
J. Immunol. Methods 139: 271, 1991.
- 160.-Vermes I., Haanen C., Steffen s-Nakken and Reutelingsperger C.,
A novel assay for apoptosis flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cell using fluorescein labelled Annexin V
J.Immuno.Meth.184:39, 1995
- 161.- Salamone M, Rabinovich G, Mendiguren A, Salamone G and Fainboim
Activation-induced expression of CD1d antigen on mature T cel
J.Leuk.Biol. 69:207-214 2001
- 162- Bedner E., Xun Li, Gorczyca W., Melamed M., Darzynkiewicz Z.,
Analysis of apoptosis by laser scanning cytometry.
Cytometry 35:181, 1999
- 163.- Romani M, Gruner S, Brang D, Kampgen E, Lenz A, Trockembacher, Konwanica G, Ofritsch P, Steinmang M and Schuler G.
Proliferation dendritic cell progenitor in human blood
J.Exp.Med 180:83-93,1994
- 164.-Haffe E, Nach N, Han R, Bekerc and Mineck
Culter of human endothelial cell derived from umbilical vein
J.Clin.Invest 52:2745, 1973
- 165.-Costas M,et al.
Molecular and functional evidence for in vitro cytoquine enhancement of human murine target cellsensitivity glucocorticoid: proteccionTNF- α priming increases glucocorticoid inhibition of TNF- α induced citotoxicity/apoptosis
J.Clin.Invest 98:1409,1996
- 166.- R.Gamberale, M.Giordano, A.S.Trevani, G.Andonegui & J.Geffner.
Modulation of human neutrophil apoptosis by immune complexes.
Journal of Immunology 161: 3666-74, 1998.
167. Savill J., Wyllie., Henson P., Walport M., Henson M., Haslett. C.,
Macrophage phagocytosis of aging neutrophils in inflammation.
J. Clin.Invest. 83:865, 1989
- 168.- Porteu F, and Nathan C.
Shedding of TNF- α receptor by activation human neutrophil
J.Exp.Med. 172:599,1990
- 169.- Watson R, Rotstein O, Nathens A, Parodo J, and Marshall J

Neutrophil apoptosis is modulated by endothelial transmigration and adhesion molecule engagement
J. of Immunol. 158:945-953, 1997

170.-Hannah, S., K. Mecklenburgh, I. Rahman, G. J. Bellingan, A. Greening, C. Haslett, E. R. Chilvers.
Hypoxia prolongs neutrophil survival in vitro.
FEBS Lett. 372:233, 1997.

171.-McDonal P., Bald A. and Cassatella.
Activation of the NF- κ B pathway by inflammatory stimuli in human neutrophils.
Blood, 89 (9):3421-3433, 1997.

172- Ward C., Chilvers E., Lawson M. M, Pryde J., Fujihara S., Farrow S., Haslett C., and Rossi A.
NF- κ B activation is a critical regulator of human granulocyte apoptosis in vitro.
J.Biol.Chem., 274 (7):4309-4318, 1999

173.-Costantini P., Jacotot E., Decaudin D., Kroemer G.
Mitochondrion as a novel target of anticancer chemotherapy.
J.Nat.Cancer Inst., 92 (13):1042, 2000

174 –Jankowski A., and Grinstein S
A noninvasive fluorimetric procedure for measurement of membrane potential.
J.Biol.Chem., 274(37):26098-26104, 1999

175.-Kristensson-Alvarado M., Pom-Ares I., Grethe S., Smith D., Zheng L., Andersson T.
P38 mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase activities have opposite effects on human neutrophil apoptosis.
FASEB 16:129, 2002

176.-Capítulo 72: Moraleda J., Sanz M.
Tratamiento de leucemias mieloblásticas agudas del adulto
Enciclopedia Iberoamericana de Hematología
Ediciones Universidad Salamanca
Editor. Antonio López Borrascó.
Tomo II, pág. 160-172, 1992

177.-Campos L Rouault J, Sabido O, Oriol P, Roubi N, Vasselon and Guyotat
High expresión of bcl-2 protein in acute myeloid leukaemia cells is associated with poor response to chemotherapy
Blood 81: 3091-3096

178.-Karakas T, Maurer U, Weidmann and Miething
High expression of bcl-2 mRNA as a determinant of poor prognosis in acute myeloid leukemia
An. Of Oncol.9:159-165, 1998

179- Reinhold Munker and Philip Koeffler.
In vitro action of Tumor Necrosis Factor on Myeloid Leukemia Cells
Blood, 69 (4): 1102-1108, 1987

- 180- Chensue S., Ruth J., Warminton K., Lincol P., Kunkel S
In vivo regulation of macrophage IL-12 production during type 1 and type 2 cytokine-mediated granuloma formation.
J. Immunol, 155(7):3546-51, 1995
- 181- Alvares V., Cotto E., Setién F., Gonzáles-Roces S., López-Larrea C.,
Molecular evolution of the N-formyl peptide and C5a receptors in non-human primates.
Immunog., 44:446-452, 1996
- 182 -. Underhill D and Ozinsky A.
Phagocytosis of Microbes: Complexity in action
Annu.Rev.Immunol, 20:825-52, 2002
- 183 -Watson R. W., Redmond, H. P., Wang, J. H., Condrón, C., Bouchier-Hayes, D
Neutrophil undergo apoptosis following ingestion of Escherichia coli.
J. Immunol. 156, 3986-3992, 1996
- 184 – Takeuchi O, Akira S
Toll-like receptors; their physiological role and signal transduction system
Int. Immunopharmacol, 1(4):625-35, 2001
- 185- Sanguedolce, M., Capo C., Bongrand P., and Mege J.
Zymosan-stimulated Tumor Necrosis Factor production by human monocytes.
J. Immunol., 148:2229-2236, 1992
- 186- Nast C., LeDUC L.,
Chemotactic Peptides: mechanisms, functions, and possible role in inflammatory bowel disease.
Digest.Diseas. Scien., 33 :50S-57S, 1988.
- 187-Takei H, Araki A, Watanabe H, Ichinose A, Sendo F.
Rapid killing of human neutrophils by the potent activator phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) accompanied by changes different from typical apoptosis or necrosis.
J.Leukoc.Biol, 59(2):229-40, 1996
- 188- Kasahara, Y., K. Iwai, A. Yachie, K. Ohta, A. Konno, H. Seki, T. Miyawaki, and N. Taniguchi.
Involvement of reactive oxygen intermediates in spontaneous and CD95 (Fas/Apo-1)-mediated apoptosis of neutrophils.
Blood 89:1748, 1997.
- 189.-Cumutte, J. T..
Chronic granulomatous disease: the solving of a clinical riddle at the molecular level.
Clin. Immunol. Immunopathol. 67:2, 1993.
- 190.-Evans, W. H., M. Rechcigl..
Factors influencing myeloperoxidase and catalase activities in polymorphonuclear leucocytes.
Biochim. Biophys. Acta 148:243, 1967

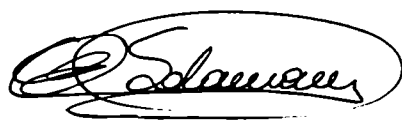
- 191.-Skerret and et.al
Role of type I TNF reprot in inflamation after inhibition of endotoxin on *Pseudonoma auroginosa*
Am.Jof Phisiol.276:L715,1999
- 192- G. V. Salamone, M. Giordano, A. Trevani, R. Gamberale, M. Vermeulen, J. Schettini, and J. Geffner.
Promotion of neutrophil apoptosis by TNF- α
J. Immunol., 166: 3476-3483, 2001
- 193.-Daigle and et.al
Death receptor bind SHP-1 annd block cytokine induced anti-apoptotic signaling in neutrophil
Nat.Med. 8:61,2002
- 194.- G.Andonegui, A.S.Trevani, R.Gamberale, M.Giordano & J.Geffner.
Effect of nitric oxide donors on oxygen-dependent cytotoxic responses mediated by neutrophils.
J of Immunol, 162: 2922-30, 1999.
- 195.-Silvina Raiden, Jorge Schettinni, Gabriela Salamone, Anallá Trevani, Mónica Vermeulen, Romina Gamberale, Mirta Giordano, and Jorge R. Geffner.
Platelets enhance survival of human eosinophils
Enviado a publicar.
- 196.- Budd R
Death receptors couple the both cell proliferation and apoptosis
J.Clin.Invest.109:437,2002
- 197.- Caux C and et al.
Tumor necrosis factor α strongly potentiates interleukin-3 and granubocyte-macrophages colony stimulating factor induced proliferation of human CD34+ hematopoietic progenitor cells
Blood 75:2292-2298,1990
- 198.- Santini V, Gozzini, A, Scappini .B, Ferrini P.
Maturation and apoptosis of primary human acute myeloblastic leukemia cells are determinated by TNF α exclusively through CD120a stimulation.
Haematologica 84:291-297,1999
- 199.-Friedreich N
Ein neuer Fall von Leukamia
Arch Pathol Anat 12:37, 1857
- 200.-Ebstein W
Ueber die acute Leukamia und Pseudoleukamie
Dtsch Arch klin Med 44:343,1889
- 201.-Catovsky D, Matutes E, Bucchini
A classification of acute leukemia for the 1990s,
Ann.Hematol, 62:, 16-21.,1991

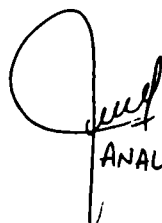
202.-Bain B and Catovsky D,
Practical aspects of the classification of acute leukaemia
J.Clin.Pathol, 43:882-887

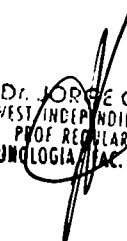
203.-Bennet J. and Catovsky D, :
Proposal for the recognition of minimally differentiated acute leukemia (AML-M0)
Br.J.Haematol, 78:325-329, 1991

204.-Bennet J. and Catovsky D, :
Criteria for the diagnosis of acute leukemia of megacaryocytic lineage (M7)
Ann Intern. Med.103:620-625,1985

205.-Janossy G, Campana, D
Monoclonal antibodies in the diagnosis of acute leukemia
The Leukemic cell (ed Catovsky), Churchill Livingstone, Edinburgh pp196-214, 1991


Salanove
Gabriela


ANALÍA TREVANI


DR. JORGE GEFNER
INVEST. INDEPENDIENTE - CONICET
PROF. REGULAR ADJUNTO
INMUNOLOGIA / FAC. MEDICINA - UBA