

00377



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN
QUÍMICA DE UN RECEPTOR
GLICOSILADO DE NEUTRÓFILOS
POLIMORFONUCLEARES DE HUMANOS

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(ORIENTACIÓN: BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)

P R E S E N T A

MED. CIR. CARLOS JOSUÉ SOLÓRZANO MATA

México, D. F.



MAYO, 2005

m344699

COORDINACIÓN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS COORDINACIÓN

Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 14 de febrero del 2005, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado de Maestría en Ciencias Biológicas (Biología Experimental) del(a) alumno(a) Solórzano Mata Carlos Josué con número de cuenta 94307115 con la tesis titulada: "Identificación y caracterización química de un receptor glicosilado de neutrófilos de humanos", bajo la dirección del(a) Dr. Arturo Edgar Zenteno Galindo.

Presidente: Dr. Luis Felipe Jiménez García
Vocal: Dr. Ricardo Lascurain Ledesma
Secretario: Dr. Arturo Edgar Zenteno Galindo
Suplente: Dra. Luisa Alvarina Alba Lois
Suplente: Dr. Francisco Javier Sánchez García

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F. a, 9 de mayo del 2005

Dr. Juan José Morrone Lupi
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del interesado

Autorizo a la Coordinación de Posgrados de la Universidad
UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el
contenido de mi trabajo recepcional.
NOMBRE: Solórzano Mata Carlos
Josue
FECHA: 30-Mayo-2005
FIRMA:

Mi más sincero agradecimiento a los miembros del comité tutorial:

**Dr. Arturo Edgar Zenteno Galindo.
Dr. Ricardo Lascurain Ledesma.
Dr. Francisco Javier Sánchez García.**

por los comentarios y sugerencias en el desarrollo de esta tesis.

Este trabajo fue financiado por:

**DGAPA PAPIIT-UNAM No. IX232504 e IN213902.
CONACYT (Beca de Maestría) No. 182477.
CONACYT No. G38590.
IMSS, Coordinación de Investigación Clínica.**

La presente tesis se desarrollo en el laboratorio 6 de Inmunología del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, UNAM, bajo la dirección de la Dra. María Concepción Agundis Mata, el Dr. Mohamed Ali Pereyra Morales y el Dr. Arturo Edgar Zenteno Galindo.

Agradecimientos.

- **A la Dra. Concepción Agundis por su paciencia, cariño, conocimientos, disciplina, amistad y por haber sembrado en mí la semilla de la investigación ¡Muchas gracias!**
- **Al Dr. Edgar Zenteno por brindarme la oportunidad de formarme como investigador.**
- **Al Dr. Salvador Martínez-Cairo por su apoyo académico.**
- **A la Dra. Lupita Maldonado, Dra. Yolanda Saldaña, Dr. Raúl Chávez, Dr. Luis Felipe Montaña y al Dr. Ricardo Lascurain por su amistad, recomendaciones y apoyo.**
- **A todos mis profesores de la maestría por enseñarme a disfrutar el conocimiento científico.**
- **Al Dr. Ali Pereyra por compartir sus conocimientos, su amistad y su ejemplo.**
- **A todos los miembros del jurado por los comentarios y sugerencias para el mejoramiento de este trabajo.**
- **A mis Padres (Martha y Carlos), gracias por su presencia y cariño, sin ustedes no lo hubiera logrado.**
- **A Astrid, por ser la mejor hermana que me dieron mis padres.**
- **A mis abuelos (Rufino y Eulalia), por su cariño, consejos y ejemplo, gracias.**
- **A mis queridos amigos de toda la vida: Lucero Ramírez, Ana Ordóñez y Daniel Montante, gracias por estar a mi lado.**
- **A mis amigos del laboratorio: Conchita Agundis, Sandra Suárez, Ali Pereyra, Martha Pedraza, Andrés Oriol, Juan Alpuche, Alfonso de la Mora, por su buen sentido del humor, ayuda y convivencia.**
- **Mil gracias a quien con su apoyo y comprensión me ha dado la fuerza necesaria para seguir en el camino a mis metas.**

A la Fundación Agundis A. C.

INDICE

	PÁGINA
I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCIÓN	3
III. ANTECEDENTES	14
IV. HIPÓTESIS	18
V. OBJETIVOS	18
VI. MATERIAL Y MÉTODOS	19
VII. RESULTADOS	29
VIII. DISCUSIÓN	42
IX. CONCLUSIONES	52
X. PERSPECTIVAS	52
XI. REFERENCIAS	53

I. RESUMEN

Los neutrófilos polimorfonucleares (PMN) representan la primera línea de defensa dentro de los mecanismos de inmunidad innata. Estas células expresan en su membrana plasmática diversos receptores que participan en la activación de la fagocitosis y del estallido respiratorio. Numerosos estudios han demostrado alteraciones en la expresión de carbohidratos de superficie en diversas patologías, por lo que consideramos importante estudiar patrones de glicosilación en condiciones normales. Estudios previos en la literatura reportan que la aglutinina de germen de trigo (WGA) reconoce y activa el estallido respiratorio en PMN. El propósito de este estudio fue identificar en PMN el receptor de (WGA-R) reconocido por WGA con especificidad por N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc). WGA-R fue purificado por cromatografía de afinidad del lisado de PMN, es una glicoproteína que está compuesta por dos subunidades de 78 y 63 kDa con un alto porcentaje de serina y glicina y en su porción sacarídica por Gal, Man, GlcNAc y NeuAc. Por MALDI-TOF se encontró que ambas subunidades presentan semejanza con citoqueratinas de tipo II. WGA (1 μ g) y anticuerpos anti-WGA-R (1:128) estimulan la explosión oxidativa de PMN, este efecto se inhibió con GlcNAc, glicina y dipirona. Se concluye que el WGA-R participa en la activación de la producción de radicales libres mediante señalización intracelular que involucra la movilización de calcio (glicina) y metabolitos del ácido araquidónico (dipirona).

ABSTRAC.

In the innate immunity, the polymorphonuclear (PMN) leucocytes (neutrophil cells) are the first defense line. In his plasmatic membrane, this cells have many surface receptors which triggers the phagocytosis and respiratory burst. In many pathologies, the expression of carbohydrates in the plasmatic membrane are altered, so we studied the glycosylation of normal cells. Previously, an agglutinin from the wheat germ (WGA) was identified, the WGA triggers the respiratory burst in PMN. Our objective was identify an WGA receptor (WGA-r).

The receptor was purified from a cell lysate of PNM by affinity chromatography, WGA-R is composed by two subunits of 78 and 63 kDa, in his amino acid composition have high concentrations of serine and glycine; the oligosaccharides which are presents in their composition are Gal, Man, GlcNAc and NeuAc. By MALDI-TOF. both subunits shown relationship with type II cytokeratin. WGA (1 μ g) and antibodies against WGA-R (1:128) triggers the respiratory burst, however, the respiratory burst was inhibited with GlcNAc, glycine and dipyrone. Our results suggest that the WGA-R triggers the respiratory burst activating the production of free radicals trough calcium channels (glycine) and metabolites of arachidonic acid (dipyrone).

II. INTRODUCCIÓN.

Morfología y función de los neutrófilos polimorfonucleares de humano.

En el ser humano la capacidad del sistema inmune para responder a los agentes infecciosos de forma exitosa, no solamente reside en la respuesta inmune adaptativa contra antígenos específicos mediada por linfocitos T y B, cuenta, además con una primera línea de defensa donde participan mecanismos de inmunidad innata como: quimiotaxis, fagocitosis, interacciones celulares y la acción de citocinas (Ginaldi et al., 1999). Los neutrófilos polimorfonucleares en el torrente circulatorio constituyen entre el 50-60% del total de los leucocitos circulantes, aunque también se les puede encontrar en los tejidos durante procesos inflamatorios de tipo agudo (Robbins et al., 2000); estas células fagocíticas son los primeros leucocitos en llegar al sitio de lesión, predominando en el infiltrado inflamatorio de 6 y hasta 24 h posteriores al inicio de esta respuesta biológica (Peaje et al., 2002); existen evidencias que indican su posible participación en la modulación del proceso inflamatorio, ya que al activarse producen mediadores solubles con posibles efectos reguladores en otras células del sistema inmune.

En la médula ósea se producen 10^{11} neutrófilos polimorfonucleares por día en el adulto sano. Estas células representan el 60% de todas las células nucleadas de la serie mielode, durante el proceso de su desarrollo celular algunos factores de crecimiento juegan un papel importante como el factor estimulador de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF) y el factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF). Ingresan a la circulación como células maduras, presentan como característica morfológica un núcleo multilobulado y tres tipos de

gránulos intracitoplasmáticos: azurófilos, específicos y de gelatinasa (Bjerrum et al., 1993); tienen la capacidad de expresar receptores que participan en la activación de eventos celulares como el estallido respiratorio y la secreción de citocinas (Newburger et al., 2000). El mecanismo primario por el que el organismo elimina microorganismos patógenos es la fagocitosis (Ginaldi et al., 2000); durante este proceso los neutrófilos polimorfonucleares reconocen agentes extraños, para su ingestión y formación de fagosomas, proceso que culmina con la fusión de los lisosomas (contienen un alto contenido en enzimas) para dar lugar al fagolisosoma (Ricevuti et al., 1993) y a la producción de especies reactivas de oxígeno por activación del estallido respiratorio (Bjerrum et al., 1993). Este proceso concluye con la lisis y destrucción de las partículas y/o bacterias ingeridas (Ricevuti et al., 1993).

Producción de especies reactivas de oxígeno como parte de los mecanismos de defensa del neutrófilo polimorfonuclear.

La generación por los neutrófilos polimorfonucleares de oxidantes microbicidas, resulta de la activación de un complejo multienzimático, la NADPH oxidasa (nicotin adenin dinucleótido fosfato oxidasa), responsable de la transferencia de electrones desde el cofactor NADPH al oxígeno molecular (O_2), con formación del anión superóxido (O_2^-), que funciona como sustrato para la formación de otras especies reactivas de oxígeno con funciones microbicidas, como peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y ácido hipocloroso (HOCl) como se muestra en la figura 1. El complejo NADPH oxidasa se encuentra constituido por las subunidades catalíticas de membrana gp91phox (cadena α) y p22phox (cadena β)

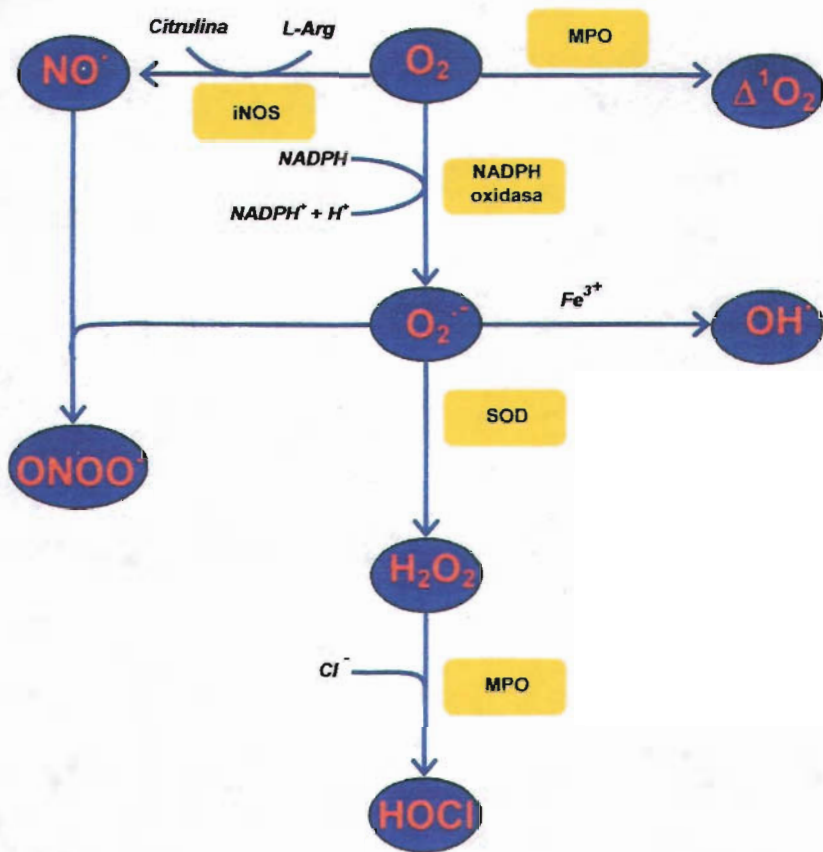


Figura 1. Formación de radicales libres en el estallido respiratorio.

que en conjunto forman el flavocitocromo b_{558} , así como por las subunidades reguladoras citosólicas p47phox, p40phox, p67phox, y las GTPasa (Rac1/2) y Rap1A. Cuando se lleva a cabo la activación de la NADPH oxidasa, la célula experimenta un aumento en el consumo de oxígeno, con traslocación de sus

subunidades citosólicas a la membrana plasmática y/o al fagosoma; en estos organelos estas subunidades se ensamblan alrededor del sitio activo (flavocitocromo b_{558}), a su vez inician o facilitan el transporte de electrones, proceso altamente regulado en donde se involucran reacciones de fosforilación, pérdida de grupos fosfato (PO_4), cambios conformacionales intra y extramoleculares, activación de enzimas movilizadoras de lípidos y de proteínas intercambiadoras de nucleótidos (Quinn et al., 2004).

Durante la formación del complejo enzimático, la fosforilación de la región autoinhibitoria de p47phox ocasiona su activación y su asociación con p22phox; p22phox funciona como regulador en la activación de la oxidasa facilitando la transferencia de electrones desde el FAD al grupo hemo del citocromo b_{558} , por otra parte, p47phox se une a p67phox y funcionan en la organización de proteínas del complejo NADPH oxidasa; los residuos 199-210 de p67phox son importantes en la regulación del flujo de electrones dentro del NADPH al FAD del flavocitocromo b_{558} , por su parte la subunidad p40phox se une a lípidos presentes en la membrana y se considera como un regulador positivo de la oxidasa, a su vez ocasiona un aumento en la traslocación de p47phox y p67phox en células estimuladas, RAC es una subunidad citoplasmática que en forma inactiva está inhibida por GDP y la proteína Rho-GDI. La estimulación celular activa al intercambiador de nucleótidos GEF, que a su vez provoca la disociación de Rho-GDI y la sustitución de GDP por GTP en RAC, posteriormente, el complejo RAC-GTP se asocia a una región TPR de p67phox, lo que facilita el ensamblaje del complejo activo (Dagher et al., 1995; Lambeth et al., 2004). El proceso de activación se ejemplifica en la figura 2.

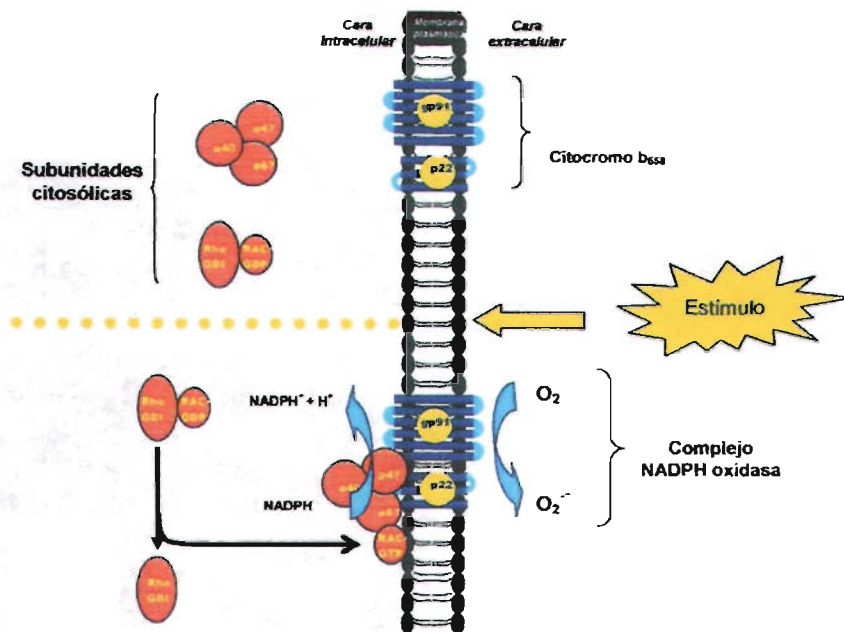


Figura 2. Proceso de activación y ensamblaje del complejo enzimático NADPH oxidasa de neutrófilos polimorfonucleares.

Las especies reactivas del oxígeno producen daño al ADN, a las proteínas y a los lípidos, algunos de ellos ocasionan la pérdida y cambio de bases así como la ruptura de una o dos hebras del DNA. En las proteínas causan daño irreversible en su estructura, generalmente marcándolas para su degradación. Las membranas celulares contienen fosfolípidos con ácidos grasos que contienen varias dobles ligaduras. Estos ácidos grasos poliinsaturados son más lábiles a la oxidación que los saturados y monoinsaturados pues los metilenos entre las dobles ligaduras pueden perder hidrógenos más fácilmente. La peroxidación lipídica en las membranas biológicas ocasiona disminución de la fluidez, que se traduce en alteraciones en la permeabilidad y pérdida de la integridad, que

provocaría destrucción de células, bacterias, hongos y parásitos por lisis (Hansberg, 2002)

Receptores involucrados en la activación de los neutrófilos.

Los neutrófilos polimorfonucleares presentan en su superficie diversos receptores que son importantes para desencadenar la función fagocítica y la explosión oxidativa, como son los receptores para la fracción Fc de inmunoglobulinas (IgG, IgA e IgE) y para complemento.

Los receptores que reconocen la región Fc de la IgG pertenecientes a la super familia de las inmunoglobulinas son: Fc γ RI (CD64), Fc γ RIIa (CD32a), Fc γ RIIIb (CD16b) y para IgA, Fc α RI (CD89). Poseen la capacidad de activar los neutrófilos polimorfonucleares y favorecen la fagocitosis, la citotoxicidad dependiente de anticuerpos, el estallido respiratorio y la liberación de mediadores inflamatorios. Los receptores para IgG que se expresan constitutivamente son: Fc γ RIIa (CD32a) con un peso de 40kDa y Fc γ RIIIb (CD16b) de 48 kDa, los dos están altamente glicosilados y se unen con baja afinidad a la porción Fc de la IgG. CD16B es un receptor anclado a GPI (fosfatidil inositol glicano) mientras que CD32a es un receptor con una sola cadena transmembranal que posee en su cola citoplasmática un dominio de inmunoreceptor con dominios de activación basados en tirosina (ITAM). Por otro lado, Fc γ RI (CD64) es un receptor de IgG restringido a células mieloides, tiene un peso molecular de 70 kDa y gran afinidad a monómeros de IgG. El receptor para IgA en neutrófilos es Fc α RI (CD89) con un peso entre 50-89 kDa y posee en su estructura 6 dominios potenciales de N-glicosilación (Radaev et al., 2001)

Los receptores del complemento juegan un papel importante en la activación del neutrófilo, entre ellos se encuentran el C5aR (CD88), C3aR, CR1 (CD35), CR2 (CD21), CR3 (MAC-1, CD11b/CD18) y CR4 (p150/95, CD11c/CD18). El receptor C5aR (CD88) es una glicoproteína de membrana con un peso molecular de alrededor de 42 kDa y alta afinidad para C5a, pertenece a la familia de receptores acoplados a proteínas G de siete dominios transmembranales; el receptor C3a (C3aR) es una proteína con un peso molecular entre 86-107 kDa, que muestra un 37% de homología con CD88 y se une con baja afinidad a su ligando (C5a) (Huber-Lang et al., 2003). El receptor tipo 1 del complemento (CR1, CD35) es una glicoproteína de membrana de 210-290 kDa con especificidad para los productos del complemento C3b, C4b y con baja afinidad para iC3b, el dominio extracelular de CR1 está formado por 30 o más SCRs (repeticiones consenso pequeñas). El receptor tipo 2 de complemento (CR2, CD21) es una glicoproteína de 145 kDa, reconoce con gran afinidad iC3b, C3dg y con baja afinidad a C3b y C3i, tiene gran importancia en la función de la célula B, aunque se encuentra expresado también en los neutrófilos polimorfonucleares.

El receptor tipo 3 (CR3, Mac-1, CD11b/CD18) y 4 (CR4, p150/95, CD11c/CD18) del complemento, son glicoproteínas heterodiméricas formados por una cadena β común y una cadena α distinta para cada receptor. Ambos pertenecen a la superfamilia de integrinas las cuales son proteínas de adhesión. La cadena α de CR3 es una glicoproteína de 155 kDa y la del CR4 es de 150 kDa. CR3 se une a iC3b y zimosan, CR4 se une al fibrinógeno, ICAM-I (CD54), LPS y al factor inhibidor de neutrófilos (NIF) (Graham et al., 2002).

Mediadores solubles estimuladores de los PMN

La función de estas células fagocíticas esta regulada por diversos factores extracelulares que aumentan o disminuyen sus funciones efectoras, tal es el caso de las citocinas producidas por células del sistema inmune como los linfocitos, así, su generación puede regular la respuesta inmune. La IL-8 es una citocina perteneciente a la familia de quimiocinas CXC, posee actividad biológica para neutrófilos durante los eventos inflamatorios agudos por su unión con los receptores CXCR1 y CXCR2, entre sus efectos está generar quimiotaxis, y regula positivamente la expresión de moléculas de adhesión (Harshika et al., 2004; Feniger-Barish et al., 2003). La interleucina 15 es una citocina proinflamatoria activadora de neutrófilos por interacción con el receptor IL-15R, ocasiona un aumento en la actividad fagocítica, fungicida, quimiotáctica y retraso en la apoptosis (Girard et al., 1996; Rathhé et al., 2004). La interleucina 18, induce la liberación de citocinas y quimiocinas (IL-8, IL-1 α y TNF- α), regula positivamente la expresión de CD11b, induce su desgranulación y aumenta el estallido respiratorio por exposición con fMLP (N-formyl-L-methionyl-L-leucil-L-phenylalanine), pero no tiene un efecto protector contra la apoptosis (Leung et al., 2001). Se ha reportado que el interferón gama (IFN- γ) aumenta el estallido respiratorio, (incremento dependiente de la concentración de esta citocina) e induce la expresión de algunos genes y de moléculas presentadoras de antígeno (Ellis et al., 2004). El IFN γ recombinante aumenta el consumo de oxígeno y la producción del anión superóxido bajo la inducción del estallido respiratorio por fMLP, Concanavalina A (Con A) y Acetato Forbol Miristato (PMA) (Berton et al., 1987).

La proteína C reactiva (CRP), perteneciente a las proteínas de fase aguda, tiene un efecto negativo en el estallido respiratorio al interactuar con su receptor (CRP-R) en la membrana de leucocitos. Esta proteína a dosis de 50 µg/mL inhibe el ensamble del complejo NADPH oxidasa dependiente de la protein cinasa C (PKC-β₂) al impedir su fosforilación y traslocación a la membrana, también inhibe la fosforilación de la serina p47phox y su traslocación al complejo en formación, así como la localización en la membrana de Rac (Rac 1/2) activado (Mortensen et al., 2000).

La α1-antiquimotripsina es un supresor en la generación del anión superóxido, interfiere en el ensamblaje de algún componente de la NADPH oxidasa, sin afectar la activación o traslocación de la protein cinasa C, ni la movilización del calcio intracelular (Kilpatrick et al., 1992).

Algunas citocinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral (TNF), el factor estimulador de crecimiento de granulocitos-monocitos (GM-CSF), el factor estimulador de crecimiento de granulocitos (G-CSF) y la interleucina ocho (IL-8) modulan positivamente la actividad de la NADPH oxidasa (Gougerot-Pocidaló et al., 2002). El TNF-α, a través del receptor p55 induce la fosforilación selectiva de las serinas de p47phox al activar una protein tirosin cinasa (Dewas et al., 2003). Por otra parte, TNF y el GM-CSF en concentraciones óptimas tienen un efecto sinérgico en la producción del anión superóxido (Saeki et al., 1998) sobre neutrófilos polimorfonucleares estimulados por FMLP, IL-8, ionomicina y Concanavalina A (Con A).

La angiotensina II estimula positivamente la producción del anión superóxido al promover la traslocación de los componentes citosólicos de p47phox y p67phox y activa la fosforilación de p38MAPK y ERK 1/2 (El Bekay et al., 2003).

Durante el ejercicio físico, se presenta un efecto bifásico, si es de intensidad moderada, hay un incremento en el estallido respiratorio dependiente de la concentración tanto de la hormona de crecimiento como de IL-6, por otro lado, el ejercicio intenso y prolongado abate la desgranulación y la producción de oxidantes reactivos, efecto mediado por la elevación de adrenalina y cortisol (Peake et al., 2002).

Importancia de los neutrófilos en la clínica

La importancia de la función y participación de los neutrófilos polimorfonucleares dentro del contexto de los mecanismos de defensa se pone de manifiesto cuando ocurre deficiencia de alguno de sus componentes. La enfermedad granulomatosa crónica (CGD) es una inmunodeficiencia primaria causada por un defecto en la explosión oxidativa, donde la actividad de la NADPH oxidasa esta ausente o profundamente disminuida por la carencia funcional de al menos uno de sus componentes (gp91, p22phox, p47phox y/o p67 phox) ocasionadas por mutaciones en los genes que las codifican. Esta patología se presenta clínicamente como un síndrome caracterizado por infecciones de origen bacteriano y/o fúngico severas y recurrentes. Los neutrófilos polimorfonucleares de estos pacientes son incapaces de destruir los microorganismos ingeridos con la posterior formación de granulomas y abscesos. Los patógenos predominantes son

bacterias catalasa positivas como *Staphylococcus aureus* y algunos hongos como *Aspergillus sp* (Nemet et al., 1997; Dinauer et al., 1993).

El empleo de fármacos inmunosupresores como el *sirolimus* (utilizado en pacientes transplantados), inhiben la activación del estallido respiratorio (Gee et al., 2003), ocasionando un proceso similar a la enfermedad granulomatosa crónica que desaparece al término del tratamiento. Estudios clínicos efectuados en pacientes con VIH han comprobado que el metabolismo oxidativo se encuentra disminuido, situación que correlaciona con la carga viral, el conteo de linfocitos CD4+ y de neutrófilos. Este efecto en los neutrófilos contribuye al establecimiento en estos pacientes de infecciones oportunistas (Diaz et al., 1999). De igual manera, los neutrófilos de trabajadores expuestos a vapores de formaldehído presentan una disminución en la actividad del estallido respiratorio (Lyapina et al., 2004).

III. ANTECEDENTES.

Glicosilación

Las glicoproteínas son una clase abundante de moléculas expresadas en la membrana plasmática, plasma y secreciones extracelulares. Los oligosacáridos que las conforman son responsables de muchas propiedades fisicoquímicas de las proteínas y juegan un papel importante en el reconocimiento célula-célula, fertilización y desarrollo (Butters et al., 2001). Se han identificado glicosilaciones O y N, dependiendo si la adición de oligosacáridos se lleva a cabo en la asparagina (N-glicosilación) en una secuencia consenso Asn-X-Ser/Thr (en la que X puede ser cualquier aminoácido), o en una Ser o Thr (O-glicosilación). Los azúcares juegan un papel importante en el plegamiento, ensamblaje, control de calidad y transporte retrógrado de proteínas desplegadas. Por su tamaño, los glicanos pueden cubrir grandes regiones de la superficie de proteínas, proporcionando protección de la acción de proteasas séricas. Se han identificado diferentes moléculas de reconocimiento glicosilados presentes en la superficie de células del sistema inmune, tales el caso de las moléculas CD2, TCR, CD3, CD8 en linfocitos T y CD48, MHC en células presentadoras de antígeno (CPA) (Rudd et al., 2001). Algunas lectinas animales como la galectina 3 con especificidad para lactosa, es secretada por mastocitos, basófilos y macrófagos activados, su función en neutrófilos polimorfonucleares es estimulando su desgranulación y la activación de la NADPH oxidasa (Kimata, 2002; Karlsson et al., 1998). La lectina de *Vatairea macrocarpa* (VML) induce la migración celular de neutrófilos polimorfonucleares en ratas, efecto inhibido por la adición del azúcar específico para esta lectina (Alencar et al., 2003).

Lectinas.

Las lectinas son proteínas o glicoproteínas de origen animal y vegetal, que tienen la capacidad de reconocer residuos específicos de carbohidratos de glicoconjugados. Estas proteínas que interactúan con carbohidratos están involucradas en una amplia variedad de funciones, en las que se incluyen el crecimiento, adhesión y reconocimiento celular, procesos metastáticos, infecciones (virales y bacteriana) e inflamación (Sharon and Lis, 2001). Las lectinas de plantas se han utilizado como herramienta para conocer el perfil celular de glicosilación. Se han identificado dos lectinas pertenecientes a la superfamilia de proteínas que unen quitina con efectos sobre los neutrófilos polimorfonucleares, la heveína y la aglutinina de germen de trigo (WGA), siendo la primera prototipo de esta familia (Rüdiger and Gabius, 2001).

La heveína (*Hevea brasiliensis*) es una lectina específica para N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc) capaz de reconocer la membrana plasmática de neutrófilos polimorfonucleares (Reyes-López and Rodríguez, 2002). Se ha comprobado que la WGA (aglutinina de germen de trigo) es capaz de reconocer estas células fagocíticas, ocasionando la movilización de gránulos intracelulares e inducir la producción de especies reactivas de oxígeno por activación de la NADPH oxidasa en neutrófilos de individuos sanos (Karlsson and Dahlgren, 2002). La WGA proveniente de la planta *Triticum vulgare* es una lectina de 36 kDa, es una glicoproteína dímérica en la que cada subunidad está compuesta de un ensamble de cuatro dominios de heveína (Wright, 1987). La estructura cristalográfica demuestra que existen tres tipos de isolectinas con un punto isoeléctrico diferente, el azúcar específico para la WGA es GlcNAc pero en forma preferencial se une a

dímeros y trímeros de este azúcar. La WGA puede unir también oligosacáridos que contienen GlcNAc y quitobiosa en enlaces de tipo N-glicosídico, estructuras muy comunes en glicoproteínas de membrana, el reconocimiento también se presenta hacia peptidoglicanos de la pared celular de bacterias, quitina, glucosaminoglicanos y glicolípidos pueden unirse a WGA, también se ha reportado que la unión de la WGA con algunas glicoproteínas se establece a través de residuos de ácido siálico, en donde de manera importante participa su grupo carboxilo (Muraki et al., 2002).

Participación de los neutrófilos polimorfonucleares en fenómenos alérgicos

La hipersensibilidad tipo I es el resultado de la participación de diferentes mediadores químicos producidos por distintas células del sistema inmune. Los neutrófilos polimorfonucleares participan en el proceso inflamatorio de tipo alérgico por distintos mecanismos, entre ellos el mediado por la interacción de receptores (FcεRI y FcεRII) para IgE (Gouni et al., 2001). En pacientes atópicos con asma severa se presenta un reclutamiento y activación de neutrófilos polimorfonucleares posterior al reto alérgico en vías aéreas, ocasionando en linfocitos T CD45+ la liberación de IL-17, la cual estimula la liberación de IL-8 e IL-6 de las células epiteliales bronquiales (*in vitro*), con la consecuente actividad quimiotáctica para los neutrófilos polimorfonucleares (Linden, 2001). En pacientes con dermatitis atópica se observó infiltración de estas células fagocíticas en el tejido en el que se aplicó el alérgeno (Sjogren et al., 1995). Por otra parte se ha demostrado que la actividad de la enzima leucotrieno A4 hidrolasa se encuentra elevada en

neutrófilos polimorfonucleares de pacientes con dermatitis atópica comparada con la de individuos sanos (Okano-Mitani., et al 1996).

Se ha reportado en la literatura que la heveína es el principal alérgeno del látex. Estudios previos en nuestro grupo de trabajo identificaron que la heveína y la WGA inducen la explosión oxidativa en neutrófilos polimorfonucleares de individuos sanos a través de un mecanismo independiente de IgE, efecto que es inhibido por el azúcar específico (GlcNAc), lo que sugiere la existencia de un receptor específico en la superficie de estas células para ambas lectinas. Así mismo este mecanismo de activación en los neutrófilos polimorfonucleares podría contribuir al daño tisular en pacientes alérgicos hacia heveína (Rojas et al., 2002). Por otra parte se ha reportado que modificaciones en la glicosilación contribuyen a la patogenia en diversas enfermedades humanas (cáncer, inmunodeficiencias primarias, autoinmunidad), de ahí la importancia de conocer los patrones de glicosilación en individuos sanos (Jiménez et al. 2002).

IV. HIPÓTESIS.

Los receptores que contienen GlcNAc en neutrófilos polimorfonucleares juegan un papel importante en la regulación de la actividad biológica de neutrófilos, por lo que la WGA desencadena la actividad del estallido respiratorio en estas células a través de residuos de GlcNAc específicos del receptor.

V. OBJETIVOS.

Objetivo General.

- Identificar y caracterizar al receptor específico de WGA en neutrófilos polimorfonucleares de sangre periférica de humano.

Objetivos específicos.

- Identificación de neutrófilos polimorfonucleares reconocidos por la lectina de WGA por inmunocitoquímica.
- Purificación del receptor que reconoce la WGA en neutrófilos polimorfonucleares.
- Caracterización bioquímica del receptor para WGA en neutrófilos polimorfonucleares.
- Realizar pruebas funcionales mediante ensayos de estallido respiratorio del receptor de WGA (WGA_r).

VI. MATERIAL Y MÉTODOS.

Obtención de Neutrófilos Polimorfonucleares (PMN) de humanos de Sangre Periférica.

Los neutrófilos se obtuvieron de sangre venosa periférica mediante venopunción de individuos clínicamente sanos. La sangre se diluyó 1:2 en amortiguador de fosfato-salina (PBS, NaCl 0.15M, 0.05 M fosfato de sodio pH 7.2), los PMN fueron separados de la sangre total mediante centrifugación a 450 g durante 30 min a 18 °C, en una interfase con *polimorphprep* (Axis shield) densidad 1.113. De los neutrófilos polimorfonucleares recuperados se llevó a cabo la lisis de eritrocitos contaminantes con cloruro de amonio 0.17 M pH 7.4 a 37 °C por 3 min, se valoró la viabilidad celular por exclusión del colorante azul tripano y finalmente se cuantificaron en un hemocitómetro, se utilizaron solo aquellas muestras con una viabilidad >90%.

Microscopia de luz.

Se comprobó el tipo celular mediante tinciones con hematoxilina-eosina, Giemsa y tinción de PAS para detectar la presencia de carbohidratos. Para la tinción de Giemsa las células fueron fijadas en paraformaldehído al 4%, colocadas en portaobjetos e incubadas a 37°C durante 1 h, se introdujeron en solución de trabajo de Giemsa por 10 min, se retiró el exceso de colorante y se observó al microscopio óptico. Para la tinción de hematoxilina y eosina se utilizaron las células fijadas en paraformaldehído al 4% en portaobjetos y se incubaron a 37°C durante 1 h, posteriormente se utilizó la técnica descrita por Gelista et al (1997), y se valoraron las preparaciones en el microscopio óptico.

Para la detección de carbohidratos se utilizó la tinción de PAS-azul anciano. Se

utilizaron las células fijadas al 4%, se mantuvieron en una solución de azul alciano pH 2.5 durante 30 min, se lavó con agua de la llave, se oxidó la preparación con ácido periódico al 1% durante 10 min, se lavó nuevamente con agua, se incubó con solución del reactivo de Schiff durante 10 min y 6 minutos con una solución de metabisulfito de sodio al 0.5%, se realizó un tercer lavado con agua, ya por último se deshidrató la preparación con alcohol de 96% y absoluto; y se aclaró con xilol, se montó la preparación con resina sintética y se observó al microscopio óptico.

Acoplamiento de isotiocianato de fluoresceína (FITC) a la lectina de germen de trigo (WGA)

Para el acoplamiento se utilizó WGA comercial (Sigma). El acoplamiento de la fluoresceína a la proteína se llevó a cabo dializando la proteína contra amortiguador de carbonatos (carbonato de sodio 0.06 M y bicarbonato de sodio 0.03 M) pH 8.5 y agregándole FITC 0.5 mg por cada mg de WGA (10 mg) disuelto en el mismo amortiguador. Se incubó toda la noche a 4°C en agitación constante. El FITC no acoplado se separó del conjugado por filtración en Sephadex G-25 equilibrada previamente con PBS pH 7.2.

Acoplamiento de peroxidasa a la lectina de germen de trigo (WGA).

Se utilizó la técnica de Avrameas et al., 1971. Se disolvieron 10 mg de peroxidasa tipo VI en 0.2 ml de glutaraldehído 1.25% en amortiguador de fosfatos (fosfato de sodio 0.1 M, cloruro de sodio 0.15 M pH 6.8), se mezcló y mantuvo a temperatura ambiente durante 18 h, posteriormente se ajustó el volumen a 1 ml con solución salina 0.15 M y dializó contra la misma solución. Se mezcló la enzima activada con 5 mg de WGA. Enseguida se adicionaron 0.1 ml de bicarbonato de sodio 1 M a pH 9.5. Se mezcló y dejó reposar durante 24 h a 4 °C. Transcurrido el tiempo se

agregó 0.1 ml de L-lisina 0.2 M y se dejó reposar durante 2 h a temperatura ambiente. Se dializó durante 24 h contra PBS pH 7.2.

Inmunocitoquímica de neutrófilos con WGA.

Para este experimento se utilizó la técnica de inmunofluorescencia directa con células en suspensión, utilizamos la lectina de germen de trigo acoplada directamente con el fluorocromo (WGA-FITC). Para fijar las células se incubaron 1×10^5 neutrófilos polimorfonucleares con 200 μ l de paraformaldehído (PFH) al 4% en agitación constante a 4 °C, se lavaron por dos ocasiones las células con PBS por centrifugación, posteriormente se realizó una segunda incubación con 200 μ l de con albumina al 5% en PBS para bloquear sitios inespecíficos por 30 min a 37°C; se eliminó el sobrenadante y añadieron 20 μ l de WGA-FITC 1:32 incubando 30 min a 37°C, posteriormente se eliminó la WGA-FITC no unida y se colocaron las células en un portaobjetos. Las preparaciones se analizaron en un microscopio invertido de epifluorescencia (Olimpus IMT-2).

Lisado Celular.

Los neutrófilos 1×10^8 se incubaron en una solución de lisis (100 μ l/ml de inhibidores de proteasas, PMSF y tritón X-100 al 1%) 30 min a 4°C en agitación constante. La suspensión resultante se centrifugó a 12000 RPM 30 min para eliminar residuos celulares.

Inmunoelectrotransferencia.

Se empleó el método descrito por Towbin et al. (1979). Después de la electroforésis se incubó el gel en amortiguador de transferencia (Tris base 25 mM, glicina 192 mM y metanol 20%, pH 8.3) durante 1 h. La transferencia a

membranas de nitrocelulosa, se realizó en un aparato Trans-Blot SD semi Dry Tranfer Cell (Bio Rad) a temperatura ambiente con voltaje constante (25 V) durante 1 h, en amortiguador de transferencia. Transferido el gel a la membrana de nitrocelulosa, se bloquearon los sitios reactivos libres con leche descremada al 5% en PBS durante 1.5 h a 37 °C, posteriormente las membranas se lavaron con PBS con Tween 20 al 0.01% (PBS-T) 5 veces, 5 min cada lavado. Se agregó WGA-Peroxidasa diluido 1:100 en PBS e incubó a 37°C por 1.5 h, en seguida las membranas se lavaron con PBS-T (5 veces, 5 min cada lavado) y se procedió a revelar empleando el kit Opti-4CN(Bio Rad) mediante el siguiente procedimiento: Se incubó la membrana por 5 minutos con BAR (Bio-Rad amplified reagent), se lavó 2 veces con PBS-T/DMSO 20% 5 min cada lavado y dos lavados más con PBS-T por 5 min, posteriormente se procedió a la detección colorimétrica incubando la membrana por 30 min en una solución de Opti-4CN diluet y agua destilada en una relación 1:10 con 200 µl de Opti-4CN substrate (4-chloro-1-naphthol) por cada 10 ml de la solución.

Purificación del receptor para WGA

El receptor se purificó en una columna con Sepharose 4B-CL (Pharmacia Chemicals Uppsala, Sweden) acoplada a WGA. La Sepharose 4B-CL (5ml) se lavó con agua miliQ (millipore) para eliminar el conservador y se mezcló con 10 ml de carbonato de potasio (K_2CO_3) y 0.5 ml de bromuro de cianógeno disuelto en acetonitrilo (1g/ml) en agitación constante por 20 min a 4°C, posteriormente se lavó la Sepharose 4B-CL activada con 3 l de agua mili Q fría, con un lavado final con cloruro de sodio 0.5 M, bicarbonato de sodio 0.5 M pH 9, por último se añadió

la WGA (5 mg) en solución, y se mantuvo en agitación constante por 2 días a 4 °C. Una vez acoplada la WGA a la Sepharose 4B-CL se colocó en una columna y se equilibro con PBS hasta que se estabilizó el pH alrededor de 7. Enseguida se añadió a la columna el sobrenadante del lisado celular de neutrófilos polimorfonucleares, para eluir la fracción no retenida se lavo la columna con PBS hasta obtener en las muestras colectadas una absorbancia de cero a 280 nm. La fracción retenida se eluyó con 10 ml de GlcNAc 200 mM. Las fracciones con densidad óptica positiva a 280 nm se colectaron, dializaron contra agua desionizada y concentraron por centrífuga y liofilización.

Caracterización del Receptor para WGA

Concentración de proteína. Para la determinación de la concentración de proteínas se llevó acabo el método de Bradford (1976) modificado para microvolúmenes en placa para ELISA, se utilizó como estándar albúmina sérica bovina (BSA) y el reactivo de Bradford (ácido ortofosfórico 8.5%, azul de Coomassie G-250 1%, etanol absoluto 5 %), la lectura se realizó en un lector de ELISA (Dynatech MR5000) a 570 nm. Se utilizó el método de Lowry modificado por Peterson (1977) para microvolúmenes en placa para ELISA, se utilizó como estándar albúmina sérica bovina (BSA) y a las muestras se le añadió 100µl de desoxicolato de sodio al 0.15% y ácido tricloroacético al 72%, se centrifugó la muestra a 3000 g por 15 min se decanto el sobrenadante y se resuspendió con 200 µl de agua destilada, se añadió 200 µl del reactivo A (Tartrato de cobre-carbonato, SDS 10%, hidróxido de sodio 0.8 N mezclados en partes iguales) y 100

μl de reactivo B (reactivo de Folin-Ciocalteu 1:6), se mezclaron e incubaron 30 min y se leyó a 750 nm.

Electroforesis en geles de poliacrilamida. Esta determinación se realizó para evaluar el grado de pureza y determinar el peso molecular del receptor para WGA. Los geles se prepararon de acuerdo al método de Laemli (1970). Se utilizaron geles de poliacrilamida al 10 % y 12.5 %, amortiguador separador (Tris-base 1 M pH 8.8), SDS 0.24 %, TEMED ($C_6H_{16}N_2$, N,N,N,N – tetrametiletildiamina) 0.012 %, persulfato de amonio (NH_3SO_4) 0.0018 %. Las muestras se mezclaron en proporción 1:2 con amortiguador de muestra (Tris - HCl, 100 mM, pH 6.8, SDS 2%, Glicerol 20% y β-mercaptoetanol 5% conc. final) y se calentaron a ebullición por 15 min. El corrimiento electroforético se llevó a cabo durante 2 h a 150 V. Los geles se tiñeron con solución de Coomasie (metanol al 50 %; ácido acético al 10 %; azul de Coomasie R-250 al 0.1 %) y se utilizó tinción de plata en algunos casos, para este procedimiento los geles se fijaron con una solución de ácido acético en isopropanol al 10 %, durante 20 min, luego en una solución de isopropanol al 10 % 20 min y finalmente con una solución de glutaraldehído al 3.5 % durante 1 h. Transcurrido este tiempo los geles se lavaron exhaustivamente con agua desionizada. Para teñir se utilizó una solución de NaOH 0.097 %, $AgNO_3$ 0.5 %, NH_3OH 1.5 % en agua desionizada. Esta solución se adicionó y se mantuvo en agitación durante 30 min. El revelado se realizó con una solución de 500 μg /100 ml ácido cítrico/50 μl paraformaldehído al 37 % por cada 100 ml de solución de revelado. La reacción se detiene con una solución de ácido acético al 10% (Oakle et al., 1980).

Determinación de azúcares. Se llevó a cabo por el método de fenol (Dubois et al., 1956). Se preparó una solución al 5% de fenol cristalizado en agua (p/v) y se agregó 0.1 ml de esta solución a 1 ml de la solución del receptor con una concentración de 50 µg de proteína, posteriormente se añadió 1 ml de ácido sulfúrico. La solución se agitó y se incubó a 100 °C durante 5 min, posteriormente se leyó el color obtenido a 490nm en un lector de ELISA (Dynatech MR5000). Se utilizó una curva con glucosa como estandar.

Composición de carbohidratos del receptor WGA. Este ensayo se realizó mediante cromatografía de gases de acuerdo al método de Zanetta et al., (1999). Se utilizó la muestra purificada por cromatografía de afinidad, la cual se sometió a un proceso de hidrólisis con metanol/HCl 5N durante 24 h a 100°C. La muestra se dejó enfriar y se neutralizó con AgNO₃ pH 6.0. Posteriormente se reacetiló la muestra con anhídrido acético en oscuridad absoluta durante toda la noche y se procedió a extraer los ácidos grasos con heptano. La muestra se secó con una corriente de N₂, posteriormente se resuspendió en piridina y se realizó la derivación de los alditoles liberados con ácido trifluoroacético. El análisis de los derivados trifluoro-acetil alditoles se realizó en un cromatógrafo de gases Mod. Varian 2100 (Orsay, France) equipado con un detector de flama y un inyector de vidrio sólido; utilizando meso-inositol (Sigma Chemical) como estándar interno en una columna capilar (25 m x 0.32 mm; 0.5 µm de diámetro interno) al 5 % de Silicona OV 210 (Applied Science Laboratories, Buffalo NY). Como gas transportador se utilizó Helio a una presión de 0.6 bar y la temperatura del horno se programó de 150° a 250 °C con incremento de 3°C/ min. Como estándar

interno se utilizó lisina (Sigma Science., St. Lois, MO). Esta determinación se realizó en la Universidad de Ciencias y Tecnologías de Lille, Francia.

Composición de aminoácidos.- La fracción purificada por cromatografía de afinidad se sometió a hidrólisis en vacío con ácido clorhídrico (HCl) 5 N a 110°C durante 48 h en tubos sellados herméticamente. Las muestras fueron examinadas en un analizador automático de aminoácidos Mod. Durrum 500 de acuerdo al método de Bidlingmeyer y cols. (1984), utilizando norleucina como estándar interno.

Determinación de la secuencia primaria del receptor de WGA. La secuencia de aminoácidos del receptor de WGA se determinó por espectrometría de masas mediante ionización desorción asistida con laser (MALDI-TOF) en péptidos obtenidos por digestión con tripsina: Después de la electroforesis, las bandas que contenían las fracciones de proteína, fueron cortadas del gel y digeridas con 0.05 mg de tripsina en 500 µl de bicarbonato de amonio, pH 8.0 a 37°C durante 24 h. El efecto de la tripsina fue inhibido dejando la mezcla a 2°C por 4 horas. La fracción digerida se secó por evaporación usando un Gyrovap (Howe, Londres). Las muestras se prepararon mezclando directamente 1 µl de los productos de la reacción (conteniendo 50 pM) con 1 µl de ácido 2,5-dihidroxibenzoico (12 mg/ml en CHO, 70:30), dejando cristalizar la mezcla a temperatura ambiente. Los iones positivos de los péptidos se analizaron por MALDI-TOF, en un espectrofotómetro de masas Vision 2000 (Finnigan MAT Bremen, Germany) equipado con un lector UV a 337 nm. Los espectros de masa se midieron en modo reflectrón bajo voltaje de aceleración y detección positiva. Como control se utilizó Tripsina para

identificar los péptidos libres y Angiotensina como estandar (Mr 296.7) (Helman et al., 1995). Las masas de los iones de cada péptido fueron comparadas en una base de datos obtenida de NCBIInr (Profound 2004/01/26).

Obtención de anticuerpos policlonales anti-WGAR. Para la obtención de anticuerpos policlonales contra el receptor de WGA identificado (anti-WGAR) se inmunizaron ratones BALB/c hembras de cuatro semanas de edad y 20-25g de peso, con 50 µg del receptor de WGA en adyuvante completo de Freund (Gibco Laboratorios Inc., Grand Island, N.Y.; 1:1; relación v:v), se realizaron en un intervalo de 15 días cada uno por vía intraperitoneal. Tres días después de la última inmunización, los ratones se sangraron del plexo retroorbital.

Estallido Respiratorio. Se utilizaron 1×10^5 células por pozo en medio de cultivo RPMI (Sigma) en placas de cultivo de 96 pozos (Nunc), se incubó 1 h a 37°C con 100 µl de una suspensión de Zymosan 0.01% /azul de tetrazolio 0.02% (la suspensión previamente se incubó en baño María a 37 °C durante 2 h). Posteriormente se lavaron las células con 150 µl de PBS con tres lavados más de metanol al 70%, posteriormente se secó la placa a temperatura ambiente y se agregó a cada pozo 120 µl de hidróxido de potasio (KOH) 2M, se mantuvo la placa en agitación moderada constante a temperatura ambiente durante 60 min. En seguida se adicionó a cada pozo 140 µl de dimetilsulfoxido (DMSO-sigma) y se resuspendió vigorosamente hasta homogenizar el contenido de cada pozo, finalmente la placa se leyó a 490 nm en un lector de ELISA (Dynatech MR5000). Para evaluar el efecto de la WGA en el estallido respiratorio se realizaron diluciones seriadas, y para determinar la concentración óptima se probaron

concentraciones de 10 μg a 0.03 μg , se utilizó como control positivo PMA y BSA (albúmina sérica bovina) como control negativo. La especificidad del efecto de WGA en neutrófilos polimorfonucleares fue confirmada mediante ensayos de inhibición del estallido respiratorio inducido por WGA utilizando GlcNAc 200 mM, se evaluó el efecto de la Glicina en la estimulación por WGA en la producción de radicales libres en neutrófilos polimorfonucleares y por último, se examinó el efecto de los anticuerpos policlonales de ratón específicos para el receptor de membrana identificado (anti-WGAR).

VI. RESULTADOS.

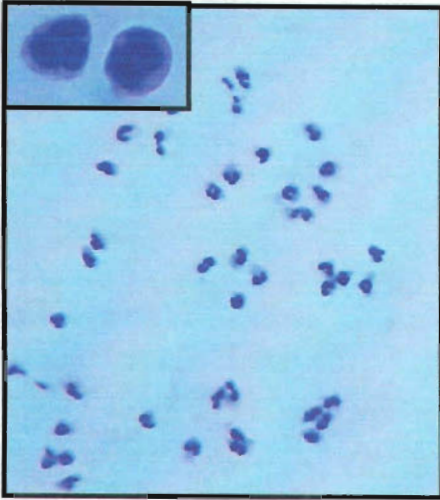
Microscopia de Luz

Se identificó tipo y pureza de las células aisladas de sangre periférica obtenidas por *polimorphrep*, se observaron al microscopio de luz las preparaciones teñidas con el colorante de Giemsa y Hematoxilina-eosina. Se observaron células con citoplasma de aspecto acidófilo y gránulos intracitoplasmáticos, con núcleos basófilos y multilobulados (con 3 a 4 lóbulos en promedio por núcleo), los cuales corresponden con la descripción citológica de los neutrófilos polimorfonucleares (Ross et al., 1997) (Figura 3). La tinción de PAS mostró una reacción positiva, indicando la presencia de carbohidratos en los neutrófilos polimorfonucleares. De igual forma encontramos que el 99% de las muestras corresponde a neutrófilos polimorfonucleares y el 1% restante a otros granulocitos (eosinófilos).

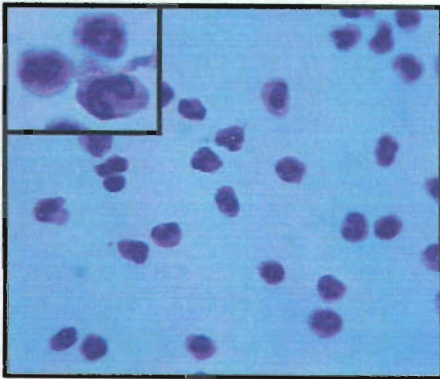
Inmunocitoquímica.

Los datos obtenidos por inmunocitoquímica para detectar el reconocimiento de la WGA (WGA-FITC) hacia los neutrófilos polimorfonucleares demostró que este reconocimiento es positivo. La lectina reconoce de forma homogénea la membrana plasmática de estas células en 100% de los neutrófilos polimorfonucleares analizados, este proceso se inhibió por la adición de GlcNAc 200mM (Figura 4).

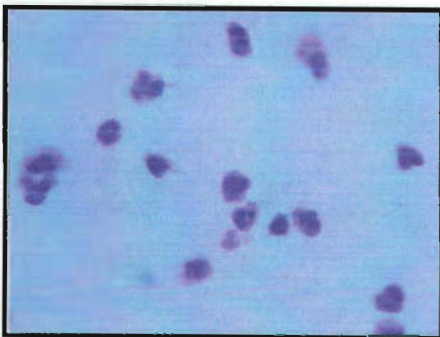
Figura 3. Microscopia de luz de neutrófilos polimorfonucleares.



A. Microfotografía a 40x que muestra los neutrófilos polimorfonucleares teñidos con Giemsa. En el recuadro superior izquierdo se observa un aumento a 100x en el que se muestra el núcleo basófilo multilobulado característico de estas células fagocíticas.

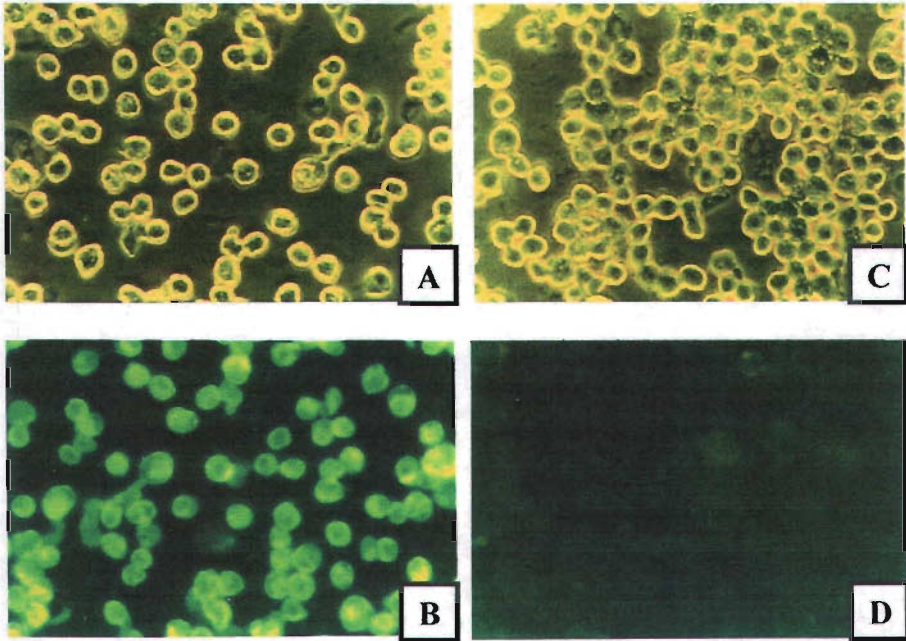


B. Microfotografía a 40x que muestra los neutrófilos polimorfonucleares teñidos con Hematoxilina-Eosina. En el recuadro superior izquierdo se observa un aumento a 100x en el que se muestran las mismas características citológicas que en la figura anterior.



C. Microfotografía a 40x que muestra los neutrófilos polimorfonucleares teñidos con PAS, se observa una reacción positiva lo que indica la presencia de carbohidratos en las células.

Figura 5. Inmunocitoquímica de neutrófilos polimorfonucleares con WGA-FITC e inhibición del reconocimiento con GlcNAc.



A. Microfotografía a 40x que muestra los neutrófilos polimorfonucleares incubados con WGA-FITC con luz normal.

B. Microfotografía a 40x que muestra el mismo campo de células de la figura anterior observadas con luz ultravioleta, en la que se hace evidente un reconocimiento positivo por parte de WGA-FITC.

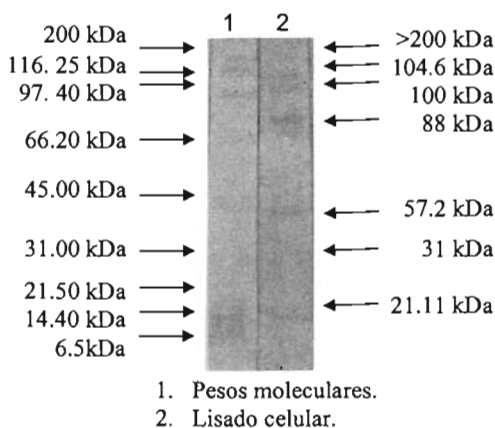
C. Microfotografía a 40x que muestra neutrófilos polimorfonucleares incubados con WGA-FITC y GlcNAc 200 mM con luz normal

D. Microfotografía a 40x que muestra el mismo campo de la figura anterior observadas con luz ultravioleta, en la que se observa una disminución en el reconocimiento por parte de la lectina hacia los neutrófilos

Inmunoelectrotransferencia.

Con la finalidad de identificar el posible receptor de WGA en el lisado de neutrófilos polimorfonucleares se realizó una inmunoelectrotransferencia del lisado celular y se reveló con WGA-peroxidasa en dilución 1:100. Se observaron 7 bandas reconocidas por la lectina con los siguientes pesos moleculares: >200, 104.6, 100, 88, 57.2, 31 y 21.11 como se muestra en la figura 6.

Figura 6. Inmunoelectrotransferencia del lisado total de neutrófilos polimorfonucleares revelado con WGA-Px 1:100



Purificación del receptor para WGA.

El receptor para la lectina de WGA presente en los neutrófilos polimorfonucleares se purificó por cromatografía de afinidad utilizando WGA-Sepharose 4B-CL a partir del lisado celular. Se eluyó la fracción no retenida con PBS y la fracción retenida con GlcNAc 200mM (figura 7), se lograron purificar 0.045 mg de receptor por cada 1.67 mg de lisado celular (Tabla 1).

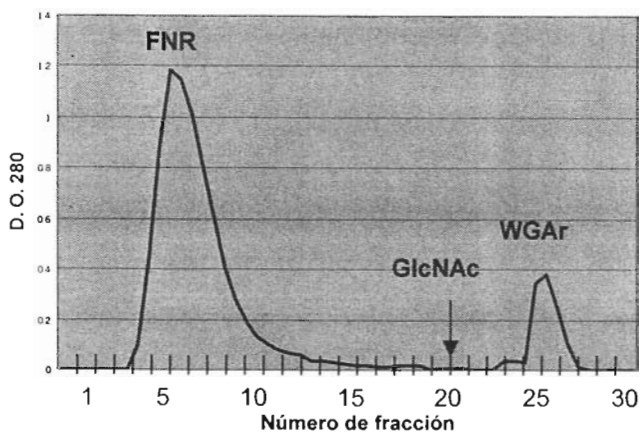


Figura 7. Perfil de elución del receptor de WGA por cromatografía de afinidad en una columna de Sepharose-WGA. Se aplicaron 2.4×10^7 equivalentes celulares a la columna de 5 ml previamente equilibrada con PBS pH 7.2. La columna se lavó con PBS para eliminar la fracción no retenida. La fracción retenida se eluyó con GlcNAc 200mM. A cada fracción de 1 ml se le determinó absorbancia a 280 nm.

Fracción	Concentración de Proteínas mg/ml	Porcentaje
Lisado Celular	1.67	100%
Fracción No Retenida	1.365	82%
Fracción Retenida	0.045	2.69%

Caracterización química.

El receptor de neutrófilo para WGA fue concentrado y analizado por electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% con SDS en condiciones reductoras. En el perfil electroforético se observaron dos bandas proteicas de 78 y 63 kDa (Figura 8)

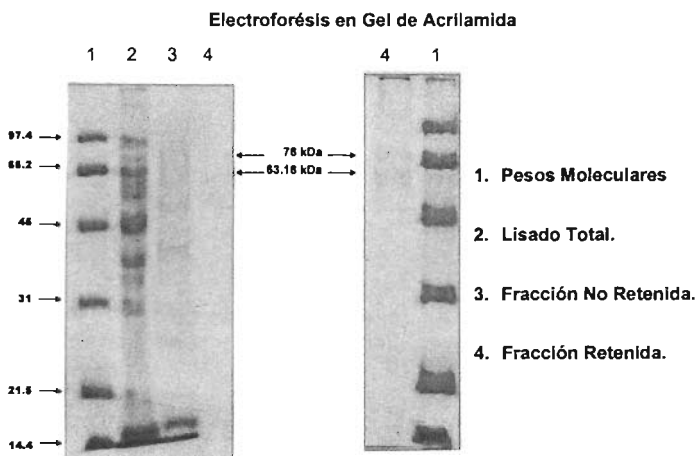


Figura 8. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% en condiciones reductoras (SDS-PAGE) de la fracción retenida del lisado celular de neutrófilos polimorfonucleares de sangre periférica teñido con azul de Coomasie. En el carril 4 se muestra dos bandas de 78 kDa y de 63 kDa en la fracción retenida.

Caracterización química.

Determinación de azúcares.

La concentración de azúcares se determinó por el método de Dubois et al (1956).

Se encontró que los carbohidratos presentes en el receptor constituyen el 10% del peso del receptor purificado.

La determinación de los carbohidratos del receptor para WGA se realizó por cromatografía de gases. En la porción sacarídica presenta principalmente Gal, Man, GlcNAc y en menor proporción NeuAc y GalNAc, no se identificó fucosa ni xilosa (Tabla 2).

Tabla 2. Composición de Carbohidratos

Carbohidrato	Porcentaje (%)
Manosa	30
Galactosa	25
GlcNAc	30
GalNAc	5
NeuAc	10

Composición de aminoácidos.

El análisis mostró que los aminoácidos más abundantes son serina y glicina, con una cantidad moderada de ácido aspártico, ácido glutámico, treonina, tirosina, valina e isoleucina, así como un contenido bajo de los aminoácidos histidina, arginina, tirosina, metionina, cisteína, y ausencia total de hidroxí-prolina (Tabla 3).

Tabla 3. Composición de aminoácidos del receptor de WGA en neutrófilos.

Aminoácido	Porcentaje (%)	Aminoácido	Porcentaje (%)	Aminoácido	Porcentaje (%)
Ácido aspártico	2.98	Treonina	3.42	Arginina	0.85
Ácido glutámico	4.87	Alanina	3.27	Cisteína	0.55
OH-Prolina	0.00	Prolina	3.79	Isoleucina	3.74
Serina	49.67	Tirosina	1.30	Leucina	3.24
Glicina	13.00	Valina	2.23	Fenilalanina	4.23
Histidina	0.08	Metionina	0.93	Lisina	2.26
				Total	100.00

Secuencia de aminoácidos

La secuencia de aminoácidos de las dos subunidades identificadas se obtuvo mediante el análisis de masas de los fragmentos péptidicos generados por digestión enzimática con tripsina y analizadas por MALDI-TOF. Estas masas se ingresaron en la base de datos Profound (2004/01/26) y el programa comparó con las masas peptídicas de proteínas reportadas. Ambas subunidades presentan homología con citoqueratinas de tipo II. Para la subunidad de 78 kDa se obtuvieron ochenta y cuatro fragmentos peptídicos en el rango de 774.2 a 3338.6 (m/z) de las cuales diez y seis presentan semejanza del 26% con la citoqueratina 1. Se obtuvieron sesenta fragmentos peptídicos para la subunidad de 63 kDa en el rango de 775.2 a 3323.6 (m/z) nueve de ellas presentaron una semejanza del 29% con citoqueratina 9. Ambas secuencias presentan un alto contenido de aminoácidos hidrofóbicos y no polares (41% para la subunidad de 78 kDa y 42.7% para la subunidad de 63 kDa) entre ellos, el aminoácido glicina que se encuentra de forma muy importante en algunos péptidos de ambas subunidades; por otra parte, buscando sitios de O y N glicosilación encontramos que aparentemente no contienen sitios potenciales de N-glicosilación de acuerdo a la secuencia consenso Asp-X-Ser/Thr en las secuencias peptídicas, pero probablemente puedan existir sitios de O-glicosilación en los aminoácidos serina o treonina del péptido (Tabla 4 y 5).

Tabla 4. Mapa peptídico de la subunidad de 78kDa del receptor de WGA de neutrófilos polimorfonucleares determinados por péptidos trípticos por MALDI-TOF.

m/z	No. residuos		Péptido
831.485	75	82	SISISVAR
1032.509	484	492	TLLEGEESR
1178.594	377	386	YEELQITAGR
1276.707	473	483	LALDLEIATYR
1301.709	344	355	SLDLDSIIAEVK
1301.709	393	403	NSKIEISELNR
1474.752	212	223	WELLQQVDTSTR
1474.752	200	211	FLEQQNQVLQTK
1637.843	186	199	SLNNQFASFIDKVR
1656.778	13	29	SGGGFSSGSAGIINYQR
1992.943	224	239	THNLEPYFESFINLR
2020.913	625	644	SSGGSSSVRFVSTTYSGVTR
2149.043	224	240	THNLEPYFESFINLR
2285.099	367	386	AEAESLYQSKYEELQITAGR
2382.901	519	549	GGGGGYGSGSSYSGGGSYSGGGGGGR

Tabla 5. Mapa peptídico de la subunidad de 63 kDa del receptor de WGA en neutrófilos polimorfonucleares determinados por péptidos trípticos por MALDI-TOF.

m/z	No. Residuos		Péptido
1059.564	225	233	TLLDIDNTR
1156.591	251	261	QGV DAD INGLR
1231.595	14	29	SGGGGGGLGSGGSIR
1234.568	47	59	FSSSSGYGGGSSR
1790.728	491	513	GGSGSYGGGSGGGYGGGSGSR
1836.970	375	390	HGVQELEIELQSQLSK
1850.934	322	336	TLNDRQYEQLIAK
2704.124	64	95	GGGGSFGYSYGGGSGGGFSASSLGGGFGGGSR
2901.430	200	224	NYSPPYNTIDDLKDQIVDLTVGNK

Estallido Respiratorio.

Para estudiar la participación de la WGA como inductor de la explosión oxidativa se realizaron ensayos con neutrófilos polimorfonucleares y lectina, la producción de radicales libres (O_2^-) se detectó por reducción del colorante NBT/zymosan. Se determinó la concentración óptima a la que se produce mayor cantidad de radicales libres (1.25 μ g) (Fig. 9).

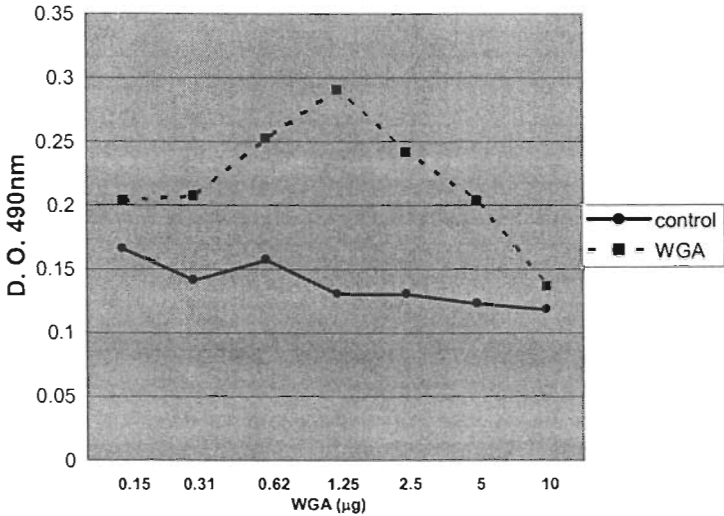


Figura 9. Determinación de la concentración óptima de WGA para la producción de radicales libres en neutrófilos polimorfonucleares. La máxima producción de radicales libres se encuentra entre 1-1.25 μ g.

Para determinar la interacción específica entre WGA y el neutrófilo polimorfonuclear utilizamos GlcNAc 200 mM y 1 μ g de lectina, encontramos una inhibición en la producción de radicales libres del 53.5% en comparación con células estimuladas con la lectina sin llegar a los niveles de estimulación del zymosan (Fig. 10).

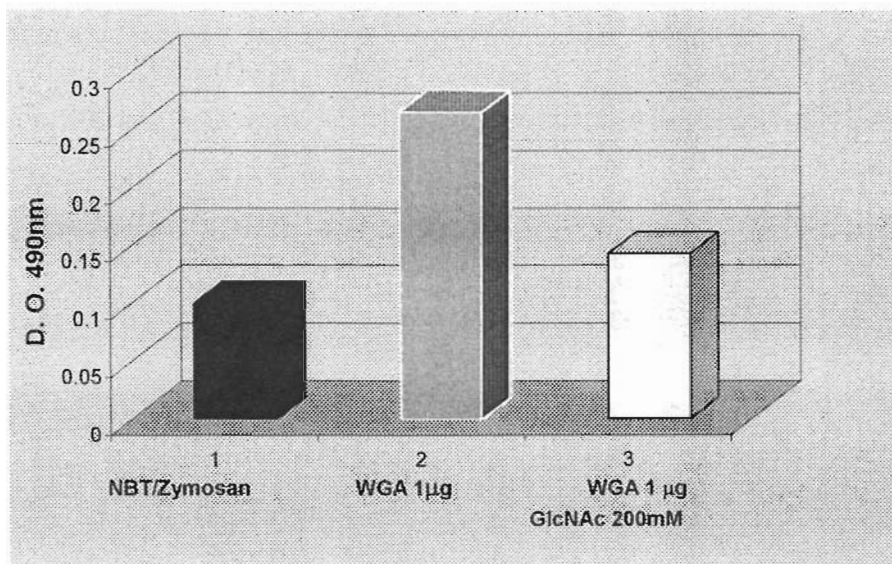


Figura 10. Efecto de GlcNAc en la explosión oxidativa de neutrófilos. (1) Producción de radicales libres inducidos por NBT/Zymosan, (2) Producción de radicales libres con 1 µg de WGA, (3) Disminución con GlcNAc.

Se estudió el efecto de diluciones seriadas de suero de ratón inmune (WGA_r) en la producción de radicales libres. Se comparó con 1µg de WGA como control positivo y suero de ratón no inmune como control negativo. El efecto fue directamente proporcional a la concentración de suero hasta 1:128 con mayor producción de radicales libres en comparación con la actividad inducida por NBT/zymosan y suero de ratón no inmune (Fig. 11).

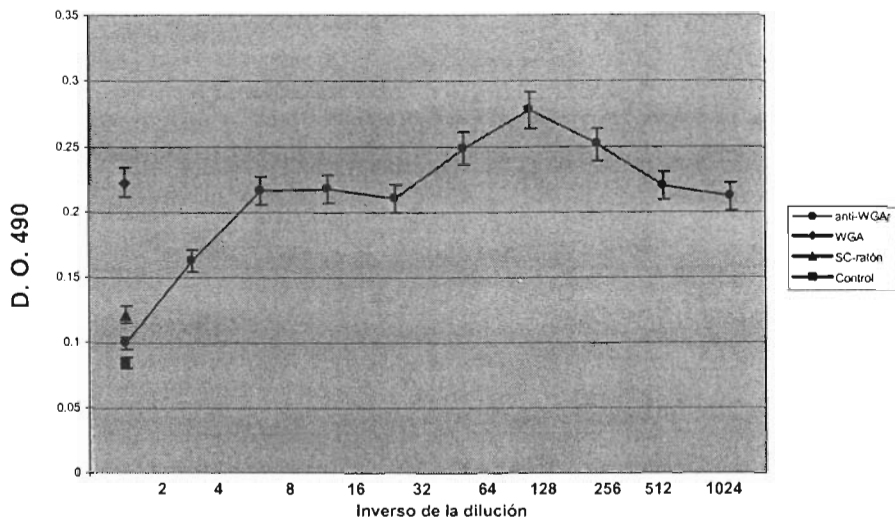


Figura 11. Estimulación en la producción de radicales libres en neutrófilos polimorfonucleares por anticuerpos policlonales específicos a WGA. Se muestran los promedios de los controles, WGA y suero de ratón no inmune. El efecto del suero de ratón inmune anti-WGAr se señala en diluciones seriadas con efecto máximo en la dilución 1:128.

Se utilizó glicina para identificar su efecto en la producción de radicales libres. Se llevaron a cabo diluciones seriadas del aminoácido. Nuestros resultados muestran que en todas las concentraciones utilizadas hay una disminución en la producción de radicales libres por debajo de la actividad con zymosan/NBT (Fig. 12).

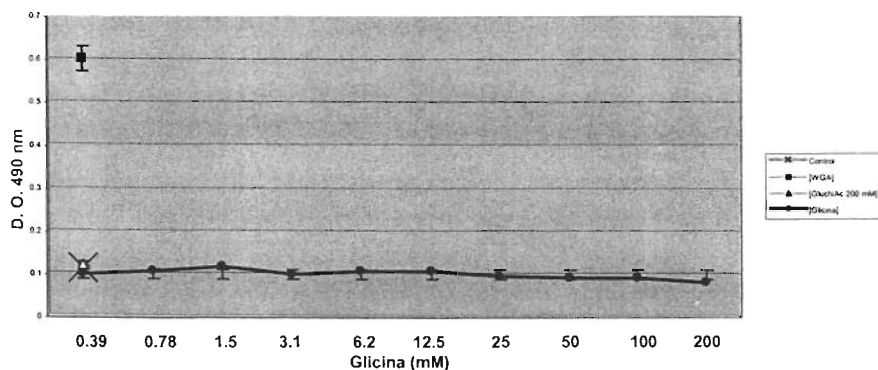


Figura 12. Efecto del aminoácido Glicina en el estallido respiratorio.

Se utilizó metamizol (*Dipirona*) para estudiar su participación en la activación del estallido respiratorio, en dosis de 10 μg , 0.625 μg y 0.078 μg en presencia de WGA (1 μg). La máxima inhibición en la producción de radicales libres se encontró con 10 μg de *dipirona* (80.3%) en comparación con NBT/zymosan y 85.7% comparado con células estimuladas. Para esta inhibición la dosis mínima de *dipirona* es de 0.078 μg con 18.5 % (Fig. 13).

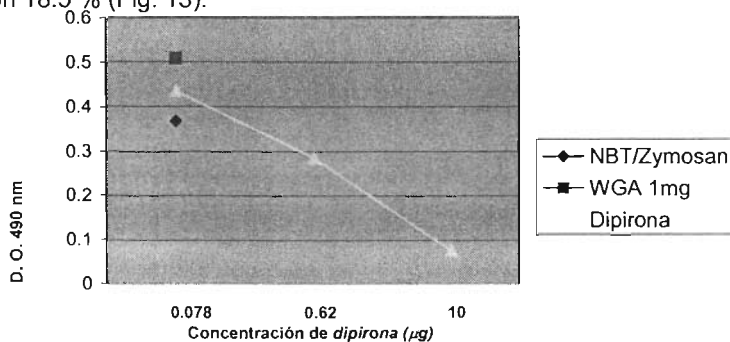


Figura 13. Inhibición de la explosión oxidativa en neutrófilos. Disminución en la producción de radicales libres dependiente de la concentración de *dipirona* comparado con el efecto inducido por WGA y NBT/Zymosan.

VII. DISCUSIÓN.

Los neutrófilos polimorfonucleares son células fagocíticas que forman parte de los mecanismos de defensa de la inmunidad innata, los cuales responden a un grupo diverso de estímulos, tales como lipopolisacáridos, glicolípidos y DNA metilado, entre otros capaces de desencadenar una amplia variedad de respuestas especializadas de tipo metabólico y funcional, entre ellos la quimiotaxis, la fagocitosis y la generación de intermediarios reactivos del oxígeno (Ginaldi et al., 1999). La fagocitosis es un mecanismo utilizado por células especializadas como los macrófagos, células dendríticas y neutrófilos polimorfonucleares, con el fin de internalizar, degradar y eventualmente presentar péptidos derivados de antígenos en el contexto del MHC-II (Lei et al., 2001; Radsak et al., 2000). El mecanismo de la fagocitosis es desencadenado por receptores de la superficie del fagocito posterior al reconocimiento con su ligando (interacción ligando-receptor), lo que ocasiona transducción de señales que inician modificaciones en el citoesqueleto, como la polimerización de actina y la formación de extensiones de la membrana plasmática alrededor de la partícula a internalizar (Cichetti et al., 2002).

Las proteínas de membrana y sus ligandos, especialmente los componentes de la superficie extracelular de la membrana plasmática representan hasta un 70% como blanco de nuevos agentes bioterapéuticos (Ghosh et al., 2004). Estas proteínas integrales de membrana se encuentran extensamente glicosiladas y se estima que representan el 20-30% de todos los marcos de lectura abierto contenidos en el genoma de eucariontes (Wallin and Von Heijne, 1998; Jang Hanash, 2003). Las lectinas se han utilizado como herramienta en el estudio de

glicoconjugados gracias a su capacidad de reconocer carbohidratos. Las lectinas también se han empleado en el aislamiento de proteínas; la WGA es específica para GlcNAc y ácido siálico y su uso ha permitido obtener una amplia gama de moléculas del lisado total de la línea celular K562 (células de eritroleucemia provenientes de un paciente con leucemia mieloide en crisis blástica) se obtuvieron 33 proteínas de membrana reconocidas por la lectina WGA, 38 moléculas pertenecientes a los compartimientos de organelos membranosos, cinco proteínas del citoesqueleto y nueve citoplasmáticas (Ghosh et al., 2004)

En este trabajo identificamos inicialmente la existencia de moléculas glicosiladas que contienen GlcNAc en la superficie celular en el 100% de los neutrófilos polimorfonucleares detectado por inmunocitoquímica utilizando WGA-FITC, esto sugiere que las moléculas reconocidas por la lectina de WGA se encuentran expresadas en la membrana plasmática en forma constitutiva en condiciones de reposo (sin estimulación).

En la inmunoelectrotransferencia obtuvimos un reconocimiento a siete proteínas con un peso de >200, 104.6, 100, 88, 57.2, 31 y 21.11 kDa. De todas las bandas reconocidas por la WGA, la proteína de 31 kDa se acerca al peso de una proteína reportada para la misma lectina presente en los neutrófilos polimorfonucleares (30 kDa) que se encuentra localizada en gránulos intracitoplasmáticos y en la membrana plasmática (Karlson, 1999), pudiese tratarse de la misma proteína con pequeñas diferencias en la glicosilación (Kleinberg et al., 1989)

Posteriormente se procedió a identificar y aislar las moléculas reconocidas por la

lectina por cromatografía de afinidad (WGA-Sepharose 4B-CL). Encontramos en geles de acrilamida SDS-PAGE dos bandas de 78 y 63 kDa, las cuales no se observan en la inmunoelectrotransferencia del lisado celular, posiblemente se deba a su baja concentración, por otra parte de las siete proteínas reconocidas por la lectina por inmunoelectrotransferencia no se observa ninguna de ellas en el análisis electroforético de la fracción retenida de la cromatografía de afinidad. Las proteínas de 88 y 57 kDa identificadas por inmunoelectrotransferencia podrían corresponder a alguna de las purificadas por la cromatografía de afinidad, y la diferencia en los pesos moleculares se podría atribuir a diferencias en los patrones de glicosilación de un individuo a otro (Kleinberg et al., 1989). Cabe destacar que las dos proteínas obtenidas por cromatografía de afinidad en diferentes ensayos de purificación siempre se localizan muy cercanas una de la otra. Por inmunoelectrotransferencia ninguna de las proteínas identificadas tiene una distancia similar de las proteínas de la fracción retenida, probablemente solo una de ellas sea reconocida por WGA-peroxidasa en la inmunoelectrotransferencia y la otra estar asociada a ella, esto nos permite suponer que la subunidad reconocida por WGA esta glicosilada y es específica y que la otra subunidad pudiera no estar glicosilada o presentar otro tipo de azúcares, lo que nos hace suponer que una de ellas se co-purifica con la otra, probablemente porque ambas estuviesen asociadas en condiciones nativas mediante puentes disulfuro que se disocian en condiciones reductoras, lo que sugiere que el receptor sea dimérico. Existen reportes en la literatura de una proteína de 118 kDa (proteína 1^a) aislados de granulocitos provenientes de individuos sanos y de pacientes con leucemia mielocítica crónica (Mehta et al., 1995), también una proteína de superficie de 140

kDa reconocida por WGA ligada al citoesqueleto durante la activación de neutrófilos (Suzanne et al., 1989). Sin embargo ninguna de estas proteínas corresponde las moléculas reportadas en este trabajo.

La afinidad de una lectina por su carbohidrato específico es usualmente baja con monosacáridos, presentan constantes de asociación del rango de 10^3 a 5×10^4 mol L⁻¹ mientras que para los oligosacáridos es 1000 veces mayor (Sharon and Lis, 2001); en el presente trabajo se eluyó el receptor de la cromatografía de afinidad con GlcNAc 200 mM, lo que nos lleva a considerar que probablemente se trate de un receptor de baja afinidad para esta lectina.

En el análisis de la secuencia de aminoácidos de WGA_r presenta un alto contenido de aminoácidos hidrofóbicos y no polares; sin embargo presenta un bajo contenido de cisteína, dato que sugiere la presencia de puentes disulfuro en su estructura. En la porción sacarídica el receptor presenta 10% de carbohidratos constituido principalmente por Gal, Man, GlcNAc y NeuAc en menor proporción, datos que nos permite concluir que se trata de una glicoproteína. Por otro parte, la cantidad de aminoácidos hidrofóbicos y no polares presentes en ambas subunidades (41% para la subunidad de 78 kDa y 42.7% para la subunidad de 63 kDa) confirma que se trata de una proteína de membrana, ya que este tipo de aminoácidos son requeridos para insertarse en la matriz hidrofoba de la bicapa lipica, requiriendo como mínimo un segmento hidrofóbico de 19 aminoácidos en su secuencia peptídica, situación que se confirma con el receptor (Jiménez and Merchat, 2003).

Las dos glicoproteínas de 78 y 63 kDa purificadas con WGA fueron analizadas para conocer su secuencia y homología. La secuencia de aminoácidos del receptor de WGA fue determinado por espectrometría de masas MALDI-TOF de los péptidos obtenidos por digestión con tripsina y analizados en un espectrómetro de masas Vision 2000 (Finnigan MAT Bremen, Germany), las masas de cada péptido fueron comparadas en una base de datos obtenida en NCBI (Profound 2004/01/26), se identificaron diez y seis masas peptídicas para la subunidad de 78 kDa y nueve para la subunidad de 63 kDa. La proteína de 78 kDa presenta una homología del 26% para la citoqueratina 1 de *Homo sapiens*, mientras que para la proteína de 63 kDa presenta una homología de 18% para la citoqueratina 1 tipo II humana y una segunda homología del 26% para la citoqueratina 9 de *Homo sapiens*. Las proteínas con las que presenta homología son miembros de una familia de filamentos intermedios del citoesqueleto en células epiteliales, que se dividen en seis tipos. Los tipos I y II incluyen las proteínas de filamento intermedio epitelial también llamados citoqueratinas o queratinas que comprenden más de veinte diferentes polipéptidos; presentan funciones de tipo estructural y se ha evidenciado su participación en la modulación y control de procesos celulares esenciales, en particular la transducción de señales, por ejemplo, en la apoptosis (Oshima, 2002). Entre los procesos celulares en que participan se encuentran la motilidad celular, interacciones ligando-receptor e internalización de receptores, interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular, permiten suponer que las citoqueratinas endoteliales funcionan como proteínas de unión extracelular (Paramio and Jorcano, 2002). Datos experimentales nos dan evidencia de que citoqueratina 1 funciona como una proteína de unión a cininógeno, por otra parte

también hay datos que sugieren que las citoqueratinas (CK1) de endotelio interaccionan con la proteína de unión a manosa (MBL) y consecuentemente activan el complemento (por la vía de las lectinas) en células expuestas a estrés oxidativo. La activación del sistema del complemento se inhibió por interacción con GlcNAc o por adición de anticuerpos anti-citoqueratina 1 lo que demuestra su función en el reconocimiento extracelular (Collard et al., 2001), por consiguiente, esta situación sugiere que el WGA_r presenta funciones de reconocimiento en la membrana plasmática del neutrófilo polimorfonuclear. Así mismo proponemos su asociación con proteínas del citoesqueleto, ya que la interacción de la WGA con los neutrófilo polimorfonucleares desencadena la producción de radicales libres por la activación y ensamblaje de la citocromo b₅₅₈ contenido en los gránulos intracitoplasmáticos con las demás subunidades de la NADPH oxidasa presentes en el citoplasma, hecho que involucra la participación del citoesqueleto en la movilización de estos gránulos (Kujipers et al., 1999). Sin embargo, es interesante el hecho de que ambas subunidades presenten péptidos de aminoácidos comunes, por lo que pensamos que fueran el producto de un mismo gen y que se expresaran por splacing alternativo.

Estudios previos reportan que WGA es capaz de reconocer la gp91phox del citocromo b₅₅₈ a través de interacciones de tipo carbohidrato sin reconocimiento hacia la p21phox (Foubert et al., 2002). Parkos et al (1987) utilizaron la WGA para purificar el citocromo b₅₅₈ partiendo de neutrófilos polimorfonucleares activados, en la subunidad gp91phox eliminaron las regiones glicosiladas lo que ocasionó la disminución del peso molecular de 91 kDa a 50 kDa. En el presente trabajo las

dos glicoproteínas identificadas difieren con las reportadas previamente, sin embargo, la posibilidad de que se trate de las mismas proteínas es mínima, ya que la base de datos NCBI y el alineamiento entre gp91phox con las masas peptídicas de las subunidades identificadas, no mostró ninguna homología entre ellas, por lo que consideramos que se trata de un nuevo receptor involucrado con la activación del estallido respiratorio.

El estallido respiratorio se caracteriza por un incremento en el consumo de oxígeno y generación de oxígeno reactivo que se consigue por la exposición de los neutrófilos polimorfonucleares a microorganismos y/o mediadores inflamatorios a través de la activación de la NADPH oxidasa (Mollinedo et al., 1999). Este proceso involucra la activación de enzimas, modificaciones en el citoesqueleto, movilización de gránulos intracitoplasmáticos mediante diferentes vías de señalización iniciados por receptores de membrana. Por otra parte las lectinas vegetales y animales inducen también este efecto biológico, tales como la heveína. La producción máxima de radicales libres con 1-1.5 μg de WGA se inhibió por la adición del azúcar específico GlcNAc 200 mM, lo que nos confirma que en la interacción receptor-WGA este carbohidrato participa en forma específica en la inducción de la producción de radicales libres. El anión superóxido, es producido por el complejo multienzimático NADPH oxidasa, que se activa por el ensamble de los componentes citoplasmáticos con las subunidades localizadas en la membrana celular, en este proceso participan diferentes enzimas como la fosfolipasa D (McPhail et al., 1999), así como la fosfolipasa C, la fosfatidilinositol 3 cinasa (ambas participan en la vía de señalización en células

estimulado por ácido araquidónico), y la protein cinasa C (Twomey et al., 1991). La actividad funcional de los neutrófilos polimorfonucleares tales como su agregación, quimiotaxis, producción de anión superóxido y liberación de enzimas lisosomales esta asociado con metabolitos del ácido araquidónico. El metamizol (*dipirona*) es un inhibidor de la ciclooxigenasa, que disminuye de forma significativa la producción de tromboxano A₂ y de prostaglandina E₂. En el presente trabajo se utilizó este anti-inflamatorio en presencia de WGA para estudiar la vía que estimula la explosión oxidativa desencadenada por la lectina, los resultados muestran una disminución en la producción de radicales libres dependiente de la dosis, con un efecto máximo de inhibición con 10µg del fármaco, lo que sugiere la participación de los productos de la ciclo-oxigenasa en la señalización llevada a cabo por el receptor de WGA, y que culmina con la producción de radicales libres. Por otra parte, se estudió el efecto de la glicina en la explosión oxidativa en presencia de WGA; en la literatura se ha propuesto que este aminoácido en su interaccion con células de Kupffer ocasiona hiperpolarización de la membrana plasmática al vincularse con un canal de cloro que favorece su flujo intracelular, y previene el aumento del calcio citosólico y consecuentemente la activación celular. Utilizamos diferentes concentraciones milimolares del aminoácido y encontramos que hay una disminución en forma importante en la producción de radicales libres provocados por la acción de WGA en forma similar a los niveles de radicales libres producidos por NBT. Este dato sugiere que en la activación del neutrófilo polimorfonuclear por la WGA involucra la movilización de calcio intracelular, catión que es muy importante en los eventos

de activación y señalización celular. El entrecruzamiento de los receptores para Fc en el proceso de fagocitosis induce una variedad de señales, que inducen tanto una reorganización del citoesqueleto, como el remodelamiento de la membrana celular, por ejemplo, en linfocitos B el entrecruzamiento del receptor del linfocito B (BCR) resulta en la activación de algunas cinasas de proteínas de tirosina (PTK) citoplasmáticas (Hozumi et al., 2004). En neutrófilos polimorfonucleares el entrecruzamiento de los receptores para IgG de tipo Fc γ RII induce la quimiotaxis y la producción de anión superóxido por parte de los neutrófilos polimorfonucleares (García-García, 2002). Un gran número de procesos biológicos involucran la interacción de uniones multivalentes, incluyendo la adhesión celular y eventos de transducción de señales. Algunos sistemas biológicos presentan un gran número de estas interacciones como la unión de carbohidratos multivalentes y glicoconjugados con lectinas. Por estudios moleculares y estructurales se ha demostrado que el entrecruzamiento entre ciertas lectinas multivalentes y glicoconjugados forma un ensamble supramolecular asociado con efectos de transducción de señales incluyendo la actividad mitogénica de las lectinas, la inducción de las reacciones de apareamiento de hongos y la inducción de apoptosis en linfocitos T activados de humano como el producido por galectina 1 (Scchettini et al., 2001). La WGA una lectina formada por dos subunidades podría ocasionar el entrecruzamiento y la dimerización del receptor identificado y ser este entrecruzamiento de receptores responsable de iniciar la activación del neutrófilo polimorfonuclear con la consiguiente activación para la producción de radicales libres. Un dato experimental que apoya que el entrecruzamiento de

receptores es responsable de desencadenar la explosión oxidativa se fundamenta en el hecho de que los anticuerpos policlonales dirigidos contra el receptor de WGA estimula este efecto biológico al interactuar con los WGA_r en la superficie celular.

IX. CONCLUSIONES.

- La lectina de WGA reconoce receptores específicos en los neutrófilos polimorfonucleares de sangre periférica.
- Se purificaron dos subunidades del receptor para WGA de 78kDa y 63 kDa.
- La subunidad de 78 kDa presenta una similitud del 26% con la citoqueratina 1 y la fracción de 63 kDa tiene una similitud del 29% con la citoqueratina 9.
- La producción de radicales libres por los neutrófilos polimorfonucleares estimulados con WGA es inhibido por *dipirona* y glicina.
- El WGA_r podría participar en la activación de la ciclo-oxigenasa en la inducción de la explosión oxidativa en neutrófilos polimorfonucleares y a través de la movilización de calcio.
- El receptor identificado podría participar en la activación no opsónica en el neutrófilo polimorfonuclear.

X. PERSPECTIVAS.

- Identificar isoformas del receptor de WGA
- Expresión del receptor en procesos de activación.
- Expresión del receptor en pacientes atópicos.
- Regulación genética de la glicosilación del receptor (transferasas).
- Obtención de anticuerpos monoclonales.

XI. REFERENCIAS.

- Alencar N. M., A. M. Assreuy, V. B. Alencar, S. C. Melo, M. V. Ramos, B. S. Cavada, F. Q. Cunha, R. A. Ribeiro (2003). The galactose-binding lectin from *Vatairea macrocarpa* seeds induces in vivo neutrophil migration by indirect mechanism. *Int J Biochem Cell Biol* 12:1674-81.
- Atzeni, F., M. Schena, A. M. Ongari, M. Carrabba, P. Bonara, F. Minonzio, F. Capsoni (2002). Induction of CD69 activation molecule on human neutrophils by GM-CSF, IFN-gamma, and IFN-alpha. *Cell Immunol* 220:20-9.
- Avrameas, S. And T. Ternyck (1971). Peroxidase labeled antibody and Fab conjugates with enhanced intracellular penetration. *Immunochemistry* 8:1175-79.
- Berton, G., L. Zeni, M. A. Cassatella, F. Rossi (1986). Gamma interferon is able to enhance the oxidative metabolism of human neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun* 138:1276-82.
- Bidlingmeyer, B. A., S. A. Cohen and T. L. Tarvin (1984). Rapid analysis of amino acids using pre-column derivatization. *J. Chromatogr.* 336:93-104.
- Binder, R., A. Kress, G. Kan, K. Herrmann, M. Kirschfink (1999). Neutrophil priming by cytokines and vitamin D binding protein (GC-globulin): impact on C5a-mediated chemotaxis, degranulation and respiratory burst. *Mol Immunol* 36:885-92.
- Bjerrum, O. W. (1993). Human neutrophil structure and function with special reference to cytochrome b559 and beta 2-microbulin. *Dan Med Bull* 40:163-89.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of

microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-54.

- Butters T. D. (2001). Glycoproteins. *Encyclopedia of life sciences.* www.els.net.
- Cicchotti, G., P. G. Allen, M. Glogauer (2002). Chemotactic signaling pathways in neutrophils : from receptor to actin assembly. *Crit Rev Oral Biol Med* 13:220-8.
- Collard, C. D., M. C. Montalto, W. R. Reenstra, J. A. Buras, and G. L. Stahl (2001). Endothelial oxidative stress activates the lectin complement pathway: Role of cytokeratin 1. *Am J Pathol* 159:1045-54.
- Cotran R., V. Kumar, T. Collin (2000). *Patología estructural y funcional.* Editorial Mc Graw-Hill Interamericana. 6° edición. Impreso en Colombia.
- Dagher, M. C., A. Fuchs, N. Bourmeyster, A. Jouan, P. V. Vignais (1995). Small G proteins and the neutrophil NADPH oxidase. *Biochimie* 77:651-60.
- Demaurex, N., J. Schrenzel, M. E. Jaconi, D. P. Lew, K. H. Krause (1993). Proton channels, plasma membrane potential, and respiratory burst in human. *Eur J Haematol* 51:309-12.
- Dewas, C., P. M. Dang, M. A. bGougerot-Pocidaló, J. El-Benna (2003). TNF- α induces phosphorylation of p47(phox) in human neutrophils: partial phosphorylation of p47phox is a common event of priming of human neutrophils by TNF- α and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J Immunol* 171:4392-8.
- Diaz, D. P., H. A. Ocampo, L. N. Rayo, V. I. Otero, M. I. Iglesias, C. Martínez (1999). The oxidative metabolic activity of the polymorphonuclear neutrophilic

leukocytes in patients infected with the human immunodeficiency virus. *Med Clin (Barc)* 113:652-4.

- Dinauer, M. C. (1993). The respiratory burst oxidase and the molecular genetics of chronic granulomatous disease. *Crit Rev Clin Lab Sci* 30:329-69.
- Dubois M., K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Robers, F. Smith (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem* 28: 350-6.
- El Bekay, R., M. Alvarez, J. Monteseirin, G. Alba, P. Chacon, A. Vega, J. Martin-Nieto, J. Jimenez, E. Pintado, F. J. Bedoya, F. Sobrino (2003). Oxidative stress is a critical mediator of the angiotensin II signal in human neutrophils: involvement of mitogen-activated protein kinase, calcineurin, and the transcription factor NF-kappaB. *Blood* 102:662-71.
- Ellis, T.N., B. L. Beaman. Interferon-gamma activation of polymorphonuclear neutrophil function (2004). *Immunology* 112:2-12.
- Feniger-Barish R., I. Yron, T. Meshel, E. Matityahu, A. Ben-Baruch (2003). IL-8 induced migratory responses through CXCR1 and CXCR2: association with phosphorylation and cellular redistribution of focal adhesion kinase. *Biochemistry* 42:2874-86.
- Foubert T. R., J. B. Burritt, R. M. Taylor, A. J. Jesaitis (2002). Structural changes are induced in human neutrophil cytochrome b by NADPH oxidase activators, LSD, SDS, and arachidonate: intermolecular resonance energy transfer between trisulfo-pyrenyl-wheat germ agglutinin and cytochrome b 558. *Biochim Biophys Acta* 1567:221-31.

- García-García E., C. Rosales (2002). Signal transduction during Fc receptor-mediated phagocytosis. *J Leukoc Biol* 72:1092-108.
- Gee, I., A. K. Trull, S. C. Charman, G. J. Alexander (2003). Sirolimus inhibits oxidative burst activity in transplant recipients. *Transplantation* 76:1766-8.
- Gelista H., J. L. Garcés, J. C. Báez (1997). Manual de técnicas de tinción. Hospital General de México
- Ghosh, D., O. M. Krokhin. W. E: Antanovici, K. G. Standing, R. C. Beavis, J. A. Wilkins. (2004). Lectin Affinity as an approach to the proteomic analysis of membrane glycoproteins. *J proteome Research* 3:841-50.
- Ginaldi, L., M. De Martinis, A. D'Ostilio, L. Marini, M. F. Loreto, D. Quaglino (1999). The immune system in the elderly : III. Innate immuninity. *Immunol Res* 20:117-26.
- Girard D., M. E. Paquet, R. Paquin, A. D. Beaulieu (1996). Differential effects of interleukin-15 (IL-15) and IL-2 on human neutrophils: modulation of phagocytosis, cytoskeleton rearrangement, gene expression, and apoptosis by IL-15. *Blood* 8:3176-84.
- Gougerot-Pocidallo, M. A., J. Benna, C. Elbim, S. Chollet-Martin, M. C. Dang (2002). *J Soc Biol* 196:37-42.
- Gougerot-Pocidallo, M. A., C. Elbim, S. Chollet-Martin (1996). Modulation of the oxidative burst of human neutrophils by pro- and anti-inflammatory cytokines. *Pathol Biol* 44:36-41.
- Gounni A. S., B. Lamkhioued, L. Koussih, C. Ra, P. M. Renzi, Q. Hamid (2001). Human neutrophil express the high-affinity receptor for immunoglobulin E

(FceRI): role in asthma. *FASEB J* 15:940-49.

- Graham R., L. Quinton (2001). Complement Receptors. *Encyclopedia of life sciences*. www.els.net.
- Hansberg W (2002). *Biología de las especies de oxígeno reactivas*. *Mensaje Bioquímico* 26:19-54.
- Harsika F., C. Chin, J. Rösger, K. Rajarathnam (2004). Dimer dissociation is essential for interleukin-8 (IL-8) binding to CXCR1 receptor. *J Biol Chem* 279:36175-8.
- Hellman, U., C. Wernstedt, J. Gonez, C. Heldin (1995). Improvement of an In Gel digestion procedure for the micropreparation of internal protein fragments for amino acid sequencing. *Anal Biochem* 224:451-5.
- Hozumi, N., T. Baba, N. Fusaki (2004). Actin and Miosine are in vivo Substrates of SHP-1 after mIgM cross-linking. 12th International Congress of Immunology and 4th Annual Conference of FOCIS. Montreal, Canada, July 18-23.
- Huber-Lang M., J. V. Sarma, S. R. McGuire, K. T. Lu, V. A. Padgaonkar, E. M. Younkin, R. F. Guo, C. H. Weber, E. R. Zuiderweg, F. S. Zetoune, P. A. Ward. Structure-function relationship of human C5a and C5aR. *J Immunol* 170:6115-24.
- Jang J., S. Hanash (2003). Profiling of the cell surface proteome. *Proteomics* 3:1947-54.
- Jiménez L. F. and H. Merchat (2003). *Biología celular y molecular*. Editorial Pearson educación. México, 1° edición. 912 páginas.
- Jiménez M. C., H. Trejo, A. Herrera, J. Romero, R. Chávez, R. Lascurain, E.

Zenteno (2002). Alteraciones de la glicosilación en enfermedades humanas. *Rev Inst Enf Resp Mex* 15:39-47.

- Jurkowska, M., E. Bernatowska, J. Bal (2004). Genetic and biochemical background of chronic granulomatous disease. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 52:113-20.
- Karlsson A., C. Dahlgren (2002). Assembly and activation of the neutrophil NAPH oxidase in granule membranes. *Antioxid Redox Signal*. 4:49-60.
- Karlsson A., P. Follin, H. Leffer, C. Dahlgren (1998). Galectin-3 activates the NADPH-oxidase in exudated but not peripheral blood neutrophils. *Blood* 91:3430-38.
- Karlsson, A. (1999). Wheat Germ Agglutinin Induces NADPH-Oxidase Activity in Human Neutrophils by Interaction with Mobilizable Receptors. *Infection and Immunity* 67:3461-68.
- Kilpatrick L., L. McCawley, V. Nachiappan, W. Greer, S. Majumdar, H. M. Korchak, S. D. Douglas (1992). Alpha-1-antichymotrypsin inhibits the NADPH oxidase-enzyme complex in phorbol ester-stimulated neutrophil membranes. *J Immunol* 149:3059-65.
- Kimata H (2002). Enhancement of IgE production in B cells by neutrophils via galectin-3 in IgE-associated atopic eczema/dermatitis syndrome. *Int Arch Allergy Immunol* 128:168-70.
- Klebanoff, S. J. (1999). Myeloperoxidase. *Proc Assoc Am Physicians* 111:383-9.
- Kleinberg M. E., D. Rotrosen, H. L. Malech (1989). Asparagine-linked

glycosylation of cytochrome b558 large subunit varies in different human phagocytic cells. *J Immunol* 12:4152-7.

- Kuijpers T. W., D. Ross (2001) Neutrophil. *Encyclopedia of life sciences*. www.els.net.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-5.
- Lambeth J. D. (2004). NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nature Reviews Immunology* 4:181-9.
- Lei L., J. Altstaedt, M Von der Ohe, T. Proft, U. Gross, L. Rink (2001). Induction of interleukin-8 in human neutrophils after MHC class II cross-linking with superantigens. *J Leukoc Biol* 70:80-6.
- Leung B. P., S. Culshaw, J. A. Gracie, D. Hunter, C. A. Canetti, C. Campbell, F. Cunha, F. Y. Liew, I. B. McInnes (2001). A role for IL-18 in neutrophil activation. *J Immunol* 167:2879-86.
- Li, P., H. L. Zhou, J. Q. Chen (1999). Phospholipase D and inflammation. *Sheng Li Ke Xue Jin Zhan*. 30: 118-22.
- Linden A (2001). Role of interleukin-17 and the neutrophil in asthma. *Int Arch Allergy Immunol* 126:179-84.
- Liu J, Z Liu, S. Chuai, X. Shen. (2003). Phospholipase C and phosphatidylinositol 3-kinase signaling are involved in the exogenous arachidonic acid-stimulated respiratory burst in human neutrophils. *J Leukoc Biol* 74:428-37.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, L. Farr, R. J. Randall (1951). Protein

measuring with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-75.

- Lyapina, M., G. Zhelezova, E. Petrova, M. Boev (2004). Flow cytometry determination of neutrophil respiratory burst activity in workers exposed to formaldehyde. *Int Arch Occup Environ Health* 77: 335-40.
- Maxfield, F. R. (1993). Regulation of leukocyte locomotion by Ca²⁺. *Trends Cell Biol* 3:386-91.
- McPhail, L.C., K.A. Waite, D.S. Regier, J.B. Nixon, D. Qualliotine-Mann, W. X. Zhang, R. Wallin, S. Sergeant (1999). A novel protein kinase target for the lipid second messenger phosphatidic acid. *Biochim Biophys Acta.* 30:277-90.
- Mehta P., S. Zindge, S. Advani., H. Desai, D. Gothoskar (1995). Protein 1: Major wheat germ agglutinin binding protein on the surface of human granulocytes associated with the cytoskeleton. *Cell Biochem Funct* 13:25-30.
- Mollinedo, F., N. Borregaard, L. A. Boxer (1999). Novel trends in neutrophil structure, function and development. *Immunol Today* 20:535-7.
- Mortensen, R. F., W. Zhong (2000). Regulation of phagocytic leukocyte activities by C-reactive protein. *J Leukoc Biol* 67:495-500.
- Muraki M., M. Ishimura, K. Harata (2002). Interactions of wheat germ agglutinin with GlcNAc β 1,6Gal sequence. *Biochim Biophys Acta* 1569:10-20.
- Nemet, K., G. Fekete, D.Schuler, E. Kiss, Z. Meszner, G. Krivan, G. Kardos, I. Galantai, G. Poder, A. Kalmar, M. De Boer, D. Roos (1997). Chronic granulomatous disease (CGD): dysfunction of the neutrophil granulocyte NADPH-oxidase enzyme system. *Orv Hetil* 138:397-401.
- Newburger, P. E., Y. V. Subrahmanyam, S. M. Weissman (2000). Global

analysis of neutrophil gene expression. *Curr Opin Hematol* 7:16-20.

- Okano-Mitani H., K. Ikai, S. Imamura (1996). Leukotriene A4 hydrolase in peripheral leukocytes of patients with atopic dermatitis. *Arch Dermatol Res* 288:168-72.
- Oshima R. G. (2002). Apoptosis and keratin intermediate filaments. *Cell Ceath Differ* 9:486-92.
- Pallister, C. J., J. T. Hancock (1995). Phagocytic NADPH oxidase and its role in Chronic granulomatous disease. *Br J Biomed Sci* 52:149-56.
- Paramio J., J. Jorcano (2002) Beyond structure: do intermediate filaments modulate cell signalling. *BioEssays* 24:836-44.
- Parkos C. A., R. A. Allen, C. G. Cochrane, A. J. Jesaitis (1989). Purified cytochrome b from human granulocyte plasma membrane is comprised of two polypeptides with relative molecular weights of 91,000 and 22, 000. *J Clin Invest* 80:732-42.
- Peake, J. M. (2002). Exercise-induced alterations in neutrophil degranulation and respiratory burst activity: possible mechanisms of action. *Exerx Immunol Rev* 8:49-100.
- Peterson G. L. (1977). A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal Biochem* 83:346-56.
- Pitrak, D. L. (1997). Effects of granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on the bactericidal functions of neutrophil. *Curr Opin Hematol* 4:183-90.
- Quinn, M.T., K.A. Gauss (2004). Structure and regulation of the neutrophil

respiratory burst oxidase : comparison with nonphagocyte oxidases. *J Leukoc Biol* 76:1-15

- Radaev S., P. Sun (2001). Recognition of immunoglobulins by Fcγ receptors. *Mol Immunol* 38:1073-83.
- Radsak M., C. Iking-Konert, S. Stegmaier, K. Andrassy, G. M. Hänsch (2000). Polymorphonuclear neutrophils as accessory cells for T-cell activation: major histocompatibility complex class II restricted antigen-dependent induction of T-cell proliferation. *Immunology* 101:521-30.
- Ratthé C., D. Girard (2004). Interleukin-15 enhances human neutrophil phagocytosis by a Syk-dependt mechanism: imortance of the IL-15Ra chain. *J Leukol Biol* 76:162-68.
- Reyes-López C. A., A. Rodríguez (2002). Características bioquímicas y moleculares de alergenos del látex de *Hevea brasiliensis*. *Alergia, Asma e Immunol Ped* 11:92-100.
- Ricevuti, G., A. Mazzone, G. Fossati, I. Mazzucchelli, P. M. Cavigliano, D. Pasotti, A. Notario (1993). Assay of phagocytic cell functions. *Allerg immunol* 25:55-66.
- Rojas E., P. Llinas, A. Rodríguez-Romero, C. Hernández, M. Linares, E. Zenteno, R. Lascurain (2001). Hevein, an allergenic lectin from rubber latex, activates human neutrophils' oxidative burst. *Glycoconjugate J* 18: 339-45.
- Ross M. H., L. J. Romrell, G. I. Kaye (1997). *Histología, texto y atlas*. Editorial Médica panamericana, 3° edición, Colombia.
- Rudd P. M., T. Elliott, P. Cresswell, I. A. Wilson, R. A. Dwek (2001).

Glycosylation and the Immune System. *Science* 291:2370-6.

- Rüdiger H., H. Gabius (2001). Plant lectins: Occurrence, biochemistry, functions and applications. *Glycoconjugate J* 18:589-613.
- Saeki, K., S. Kitagawa, E. Okuma, S. Hagiwara, M. Yagisawa, A. You (1998). Cooperative stimulatory effects of tumor necrosis factor and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor on the particular respiratory burst activity in human neutrophils: synergistic priming effect on concanavalin A-induced response, no interactive priming effect on the chemotactic peptide-induced response and additive triggering effect. *Int J Hematol* 68:269-78.
- Scchettini J. C., L. G. Baum, F. Brewer (2001). Multivalent protein-carbohydrate interactions. a new paradigm for supermolecular assembly and signal transduction. *Biochemistry* 40:3009-15.
- Sharon, N., H. Lis (2001). Lectins. *Encyclopedia of life sciences*. www.els.net.
- Sjogren F., C. Anderson, O. Groth (1995). The cellular infiltrate in experimental immediate type cutaneous hypersensitivity. *Acta Derm Venerol* 75:417-21.
- Suzanner J. A., S. Boxer, L. Boxer. (1989). Characterization and cytoskeletal association of a major cell surface glycoprotein, GP 140, in Human Neutrophil. *J Clin Invest* 84:484-92.
- Towbin, M., T. Staehelin, J. Gordon (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets. Procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 76:4350-4.
- Twomey BM, K. Clay, M. Dale (1991). The protein kinase C inhibitor, K252a, inhibits superoxide production in human neutrophils activated by both PIP2-

dependent and -independent mechanisms. *Biochem Pharmacol* 41:1449-54.

- Wallin E., G. Von Heijne (1998). Genome-wide analysis of integral membrane proteins from eubacterial, archaean, and eukaryotic organisms . *Proteomics* 7:1029-38.
- Weber, H., P. Heilmann, B. Meyer, K. L. Maier, (1990). Effect of canine surfactant protein (SP-A) on the respiratory burst of phagocytic cells. *FEBS Lett*, 270:90-4.
- Werner, E. (2004) GTPases and reactive oxygen species: switches for killing and signaling. *J Cell Sci.* 117:143-53.
- Wright C. S. (1987). Refinement of the crystal structure of wheat germ agglutinin isolectin 2 at 1.8 Å resolution. *J Mol Biol* 194:501-29.
- Yan, S.R., M.J. Novak (1999). Diverse effects of neutrophil integrin occupation on respiratory burst activation. *Cell Immunol* 195:119-26.
- Zanetta J. P., P. Timmeman and Y. Leroy (1999). Gas-liquid chromatography of the heptafluorobutyrate derivatives of the O-methyl-glycosides on capillary columns: a method for the quantitative determination of the monosaccharide composition of glycoproteins and glycolipids. *Glycobiology* 9:255-66.