

11281



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Facultad de Medicina

INTERLEUQUINA 4 Y RANTES EN EOSINOFILOS HUMANOS:  
SINTESIS CONSTITUTIVA VERSUS INDUCIBLE

T E S I S

Que para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS BIOMEDICAS,

AREA INMUNOLOGIA

P R E S E N T A

JUAN RAYMUNDO VELAZQUEZ RODRIGUEZ

DIRECTOR DE TESIS:

DRA. MARTHA LOPEZ OSUNA



México, D.F.

2000

276706



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.



**Interleuquina 4 y RANTES en eosinófilos humanos:  
síntesis constitutiva versus inducible**

**Este trabajo se realizó en la Unidad de Investigación Médica en Inmunología de la Coordinación de Investigación Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social y en Pulmonary Research Group de la Universidad de Alberta en Canadá, bajo la dirección y tutoría de la Dra. Martha López Osuna y el Dr. Redwan Moqbel respectivamente.**

**Durante el desarrollo de la Tesis el sustentante fue becado de la Coordinación de Investigación Médica del IMSS y del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.**

## Interleukin 4 and RANTES in human eosinophils: synthesis constitutive versus regulated

### Abstract

Eosinophil leukocytes are non-dividing, marrow-derived, granule-containing cells, approximately 8  $\mu\text{m}$  in diameter with a bilobed nucleus. Although peripheral blood eosinophils are terminally differentiated cells and their ability to synthesize proteins may be limited, recent evidence suggest that eosinophils retain the ability to synthesize cytokines (at least 19), RANTES and IL-4 included. There is some evidence of a constitutive expression of RANTES and IL-4 using eosinophils from healthy donors or from individuals with various disease conditions, namely eosinophils infiltrated into inflammatory tissues or eosinophils from patients with eosinophilia.

We hypothesized that *de novo* synthesis of such cytokines in eosinophils, is initiated in nascent cells during their development and differentiation, and that these newly synthesized proteins are stored in association with immature granules which are the precursor structures for crystalloid granules.

This hypothesis was tested by examining cytokine mRNA expression in differentiated eosinophil colonies, derived from purified cord blood CD34+ cells. Cytokine mRNA profiles were determined by RT-PCR analysis in cells from days 0, 7, 14 and 28 of culture. Immunoreactivity against MBP, ECP, IL-6 and RANTES was not detectable in freshly purified CD34+ cells. Maturing eosinophils (>95%) exhibited positive immunostaining for all these proteins between days 16-28 of culture. At early stages of culture, discrete immunostaining was observed around the periphery but not in the center of granular structures. By day 28, cultured eosinophil-like cells showed evidence for the acquisition of crystalloid granule-like structure, analogous to those observed in mature peripheral blood eosinophils.

Additionally, we studied the mobilization of intracellularly stored RANTES in response to Interferon gamma ( $\text{IFN}\gamma$ ) using peripheral blood eosinophils from atopic/asthmatic subjects. We used subcellular fractionation, immunogold analysis, two-color confocal laser scanning microscopy, and enzyme-linked immunosorbente assay, to trace the movement of eosinophil-derived RANTES

from intracellular reservoirs to its release. RANTES was rapidly mobilized (10 minutes) and released after 120 minutes of stimulation ( $80 \pm 15$  pg/ml per  $2 \times 10^6$  cells). RANTES appeared to be stored in at least two intracellular compartments: the matrix of crystalloid granule, detected by MBP and eosinophil peroxidase activities, and a specialized small secretory vesicle present in light membrane fractions. The extragranular RANTES was mobilized more rapidly than that of crystalloid granules during IFN $\gamma$  stimulation. This effect was not observed in eosinophils treated with IFN $\alpha$ , IL-3, IL-5, GM-CSF or genistein followed by IFN $\gamma$ .

We concluded that eosinophils express and stored cytokines simultaneously with cationic granule proteins during the process of maturation. Thus, the storage of cytokines during the development of eosinophils may be integral to the immunobiology of these cells. The results of this study suggest a constitutive expression of RANTES and IL-4 with potential immunoregulatory functions for maturing eosinophils. RANTES may be mobilized and released by piecemeal degranulation upon stimulation, involving transport through a putative pool of small secretory vesicles.

Ciudad Universitaria march 7, 2000



M en C Juan R. Velázquez Rodríguez

Tutor



Dra. Martha López Osuna

## Interleuquina 4 y RANTES en eosinófilos humanos: síntesis constitutiva versus inducible

### Resumen

Los leucocitos eosinófilos son células terminales derivadas de la médula ósea con gránulos característicos, miden 8  $\mu\text{m}$  de diámetro y poseen un núcleo bilobulado. A pesar de que los eosinófilos de sangre periférica están completamente diferenciados y por ende su habilidad para producir citocinas está limitada, se ha sugerido que estas células retienen cierta capacidad para sintetizar citocinas (19, por lo menos) que incluyen a RANTES e IL-4. Hay evidencia de una expresión constitutiva de RANTES e IL-4 en eosinófilos de donadores sanos o de individuos con diversas enfermedades (i.e. eosinófilos de infiltrados en tejidos inflamatorios o eosinófilos de pacientes con eosinofilia).

Hipotetizamos que la síntesis *de novo* de tales citocinas en los eosinófilos se inicia durante su desarrollo y diferenciación y que estas proteínas recién sintetizadas son almacenadas en los gránulos inmaduros, los que preceden a los gránulos cristaloides.

Probamos nuestra hipótesis examinando la expresión de RNAm de diferentes citocinas en colonias de eosinófilos en diferenciación, derivadas de células CD34+ de sangre de cordón umbilical. Los perfiles de citocinas se determinaron por análisis de RT-PCR en células de 0, 7, 14 y 28 días de cultivo. No se detectó inmunoreactividad contra MBP, ECP, IL-6 o RANTES en células CD34+ recién aisladas. Los eosinófilos en maduración (>95%) mostraron inmunotinción positiva para todas estas proteínas entre los días 16-28. En estadios tempranos de cultivo, se observó una discreta inmunotinción en la periferia pero no en el centro de los gránulos. Al día 28, las células eosinofiloideas adquirieron estructuras granulares cristaloides, similares a las observadas en eosinófilos maduros de sangre periférica.

Adicionalmente, utilizando eosinófilos de sangre periférica de individuos atópicos/asmáticos, estudiamos la movilización de RANTES almacenado intracelularmente en respuesta a Interferón gama (IFN $\gamma$ ). Empleamos fraccionamiento subcelular, análisis inmunoaureo, microscopía confocal de dos colores y ELISA para trazar el movimiento del RANTES eosinofílico de los reservorios intracelulares al exterior. El RANTES fue rápidamente movilizado (10 minutos) y liberado después de 120 minutos de estimulación

( $80 \pm 15$  pg/ml por  $2 \times 10^6$  células). El RANTES se observó almacenado en por lo menos dos compartimientos intracelulares: la matriz del gránulo cristalóide (evidenciada por la actividad de MBP y de EPO) y en pequeñas vesículas secretorias especializadas (presentes en las membranas ligeras durante la estimulación con IFN $\gamma$ ). Este efecto no se observó en eosinófilos tratados con IFN $\alpha$ , IL-3, IL-5, GM-CSF o genestina seguida por IFN $\gamma$ .

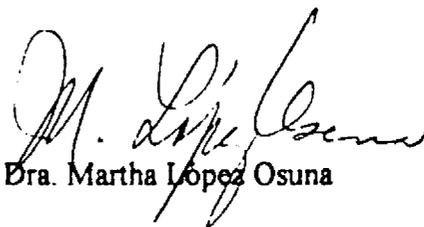
Concluimos que los eosinófilos expresan y almacenan citocinas simultáneamente con las proteínas catiónicas durante el proceso de maduración. Así, el almacenamiento de citocinas durante el desarrollo de los eosinófilos puede ser parte integral de la inmunobiología de estas células. Los resultados de estos estudios sugieren una expresión constitutiva de RANTES e IL-4 con funciones inmunoregulatorias para la maduración de los eosinófilos. Después de la estimulación el RANTES puede ser movilizado y liberado por desgranulación gradual a través de vesículas secretorias pequeñas.

Ciudad Universitaria 7 de marzo de 2000



M en C Juan R. Velázquez Rodríguez

Tutor



Dra. Martha López Osuna

**Hago patente mi agradecimiento a:**

Dra Martha López Osuna por su orientación y apoyo a lo largo de esta etapa de mi vida.

Dr. Roberto Kretschmer por su enseñanza, ejemplo e impulso hacia planos de desarrollo más elevados.

Dr. Redwan Moqbel por su generosidad, hospitalidad y paciencia en mi etapa de adaptación a un medio altamente competitivo.

BSc. Stacy Hagen: mi angel de la guardia en el extranjero un gran ser humano.

**Dedicado a:**

**Veronica y Carlos (QEPD)**  
*Mis padres*

**Karen e Ivan**  
*Mis hijos*

## Contenido

SIGNIFICADO DE ACRÓNIMOS EN INGLÉS .....	8
ÍNDICE DE TABLA Y FIGURAS.....	11
<b>CAPITULO I.....</b>	<b>13</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>13</b>
MORFOLOGÍA Y ULTRAESTRUCTURA DE LOS EOSINÓFILOS .....	13
<i>Gránulos específicos</i> .....	14
<i>Gránulos primarios</i> .....	14
<i>Cuerpos lípidos</i> .....	14
<i>Gránulos pequeños</i> .....	15
<i>Receptores en eosinófilos</i> .....	16
Receptores para inmunoglobulinas .....	16
Receptores para IgG (FcγR).....	16
Receptor para IgA (FcαR).....	17
RECEPTOR DE IGE (FcεR).....	17
Receptores del complemento.....	18
Receptores para citocinas.....	18
Receptores misceláneos.....	19
ACTIVACIÓN DE LOS EOSINÓFILOS .....	21
<i>Cambios morfológicos de los eosinófilos activados</i> .....	22
<i>Cambios funcionales de los eosinófilos activados</i> .....	23
MARCADORES DE SUPERFICIE.....	23
LOS EOSINÓFILOS COMO GENERADORES DE MEDIADORES QUÍMICOS.....	25
CITOCINAS.....	25
<i>Interleuquinas</i> .....	25
IL-1.....	25
IL-2.....	26
IL-3.....	26
IL-4.....	26
Actividades de la IL-4.....	28
IL-5.....	30
IL-6.....	30
IL-8.....	31
IL-10.....	31
IL-16.....	31
<i>Factores de crecimiento</i> .....	32
Factor de crecimiento transformante alfa (TGFα).....	32
Factor de crecimiento transformante β (TGFβ).....	32
Factor de crecimiento parecido al EGF que se une a la heparina (HB-EGF-LGF).....	32
Factor de crecimiento derivado de plaquetas cadena B (PDGF-B).....	33
GM-CSF.....	33
Interferon gamma (IFNγ).....	34
Factor de necrosis tumoral alfa (TNFα).....	35
QUIMOCINAS.....	36
<i>Las alfa quimocinas</i> .....	37
<i>Las betas quimocinas</i> .....	38
<i>Las gamma quimocinas o quimocinas C</i> .....	39

<i>Las CX3C quimocinas</i> .....	39
<i>Las quimiotactinas 6Ccinas (6Ckine)</i> .....	40
RECEPTORES DE LAS QUIMOCINAS .....	40
<i>Propiedades biológicas de las quimocinas</i> .....	42
RANTES.....	43
<i>Definición y características</i> .....	43
<i>Producción</i> .....	43
<i>Actividades biológicas de RANTES</i> .....	44
<i>Regulación de RANTES</i> .....	45
CULTIVOS DE EOSINÓFILOS .....	46
<i>Cultivos de médula ósea</i> .....	47
<i>Cultivos de sangre de cordón umbilical</i> .....	48
<i>Cultivos de sangre periférica</i> .....	49
<i>Cultivo de células CD 34+</i> .....	49
ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS EOSINÓFILOS .....	51
<i>Necrosis</i> .....	51
<i>Secreción granular</i> .....	51
<i>Desgranulación gradual</i> .....	52
FUNCIÓN DE LOS EOSINÓFILOS .....	53
<i>Eosinófilos y parasitosis</i> .....	53
<i>Eosinófilos y enfermedades</i> .....	54
<i>Eosinófilos y asma</i> .....	55
<b>CAPITULO II</b> .....	<b>58</b>
<b>EXPRESIÓN Y ALMACENAMIENTO DE CITOCINAS EN EOSINÓFILOS GESTANTES PROVENIENTES DE PROGENITORES DE SANGRE DE CORDÓN UMBILICAL CD34+</b> .....	<b>58</b>
RESUMEN .....	58
INTRODUCCIÓN .....	60
MATERIAL Y MÉTODOS .....	62
<i>Preparación de células CD34+ purificadas</i> .....	62
<i>Cultivo semi sólido para células CD34+</i> .....	63
<i>Cultivo líquido de células CD34+</i> .....	64
<i>Análisis por RT-PCR</i> .....	64
<i>Secuencias de iniciadores</i> .....	65
<i>Pares de iniciadores utilizados en el análisis de RT-PCR</i> .....	66
<i>RT-PCR in situ para el RNAm de RANTES</i> .....	67
<i>Tinción doble y microscopía confocal</i> .....	68
<i>Microscopía electrónica de transmisión</i> .....	69
<i>Análisis estadístico</i> .....	69
RESULTADOS .....	70
<i>Cultivos de células CD34+ en presencia de rIL-3h e rIL-5h</i> .....	70
<i>Análisis de los transcritos codificantes de citocinas empleando RT-PCR</i> .....	74
<i>Expresión proteica de citocinas en células de colonias provenientes de cultivos semi-sólidos</i> .....	78
DISCUSIÓN.....	82
REFERENCIAS.....	88
<b>CAPITULO III</b> .....	<b>91</b>
<b>L- EFECTO DEL INTERFERÓN GAMA EN LA MOVILIZACIÓN Y LIBERACIÓN DE RANTES DERIVADO DE EOSINÓFILOS</b> .....	<b>91</b>
RESUMEN .....	91
INTRODUCCIÓN.....	92

MATERIAL Y MÉTODOS.....	94
<i>Preparación de eosinófilos</i> .....	94
<i>Análisis in vitro de la liberación de RANTES derivado de eosinófilos</i> .....	94
<i>Fraccionamiento subcelular</i> .....	94
RESULTADOS.....	96
DISCUSIÓN.....	99
REFERENCIAS.....	100
<b>II. RÁPIDA MOVILIZACIÓN EN EOSINÓFILOS HUMANOS DEL RANTES ALMACENADO INTRACELULARMENTE EN RESPUESTA A INTERFERÓN <math>\gamma</math></b> .....	<b>101</b>
RESUMEN.....	101
INTRODUCCIÓN.....	103
MATERIAL Y MÉTODOS.....	106
<i>Preparación de los eosinófilos</i> .....	106
<i>Ensayo in vitro de la liberación de proteínas eosinofílicas</i> .....	107
<i>Marca inmunoaurea y microscopía electrónica</i> .....	108
<i>Doble marcado y microscopía de barrido láser confocal</i> .....	109
<i>Fraccionamiento subcelular</i> .....	110
<i>Ensayos enzimáticos de marcadores</i> .....	111
<i>Análisis Dot-Blot</i> .....	112
<i>Presentación de datos</i> .....	113
RESULTADOS.....	114
<i>Inmunocitoquímica usando APAAP</i> .....	114
<i>Etiquetado inmunoaureo de RANTES</i> .....	119
<i>Microscopía de Barrido Láser Confocal</i> .....	121
REFERENCIAS.....	135
<b>CAPITULO IV</b> .....	<b>140</b>
<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>140</b>
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>148</b>
<b>REFERENCIAS</b> .....	<b>149</b>

### Significado de acrónimos en Inglés

ADCC	Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos
APAAP	Fosfatasa alcalina – anti-fosfatasa alcalina
BCA-1	Atractante de linfocitos B 1
BCIP	Bromo-cloro-indol-fosfato
BLC	Quimiotractante de linfocitos B
CD	Agregado de diferenciación
CK	Quimocina
CLC	Proteína cristalina de Charcot-Leyden
CR	Receptor del complemento
CTAP-III	Peptido activador de tejido conectivo III
CHAK	Destructoras activadas por quimocinas CC
DEPC	Dietilpirocarbonato
DNA	Ácido desoxirribunucleico
DNac	Ácido desoxirribunucleico complementario
dNTP	Desoxinucleotidos trifosfato
dUTP	Desoxiuridin trifosfato
ECP	Proteína catiónica eosinofílica
EDN	Neurotoxina derivada del eosinófilo
ELC	Quimocina ligada a EB11
ELISA	Ensayo enzimático ligado a inmunoabsorbente
ENA-78	Atractante de neutrófilos derivado de células epiteliales 78
EPO	Peroxidasa eosinofílica
FACS	Selección celular activada por fluorescencia
Fc R	Receptor para el Fc de inmunoglobulina
FCS	Suero fetal bovino
FIC	Citocina inducida por fibroblastos
fMLP	Formil-metionil-leucil-fenilalanina
GCP-2	Proteína quimiotáctica de granulocitos 2
G-CSF	Factor estimulante de colonias granulocíticas
GM-CSF	Factor estimulante de colonias granulocíticas y monocíticas
GRO	Gen ligado al crecimiento
GTP <sub>γ</sub> S	5'-0-(3-Guanosin trifosfato)
HB-EGF-LGF	Factor de crecimiento parecido al EGF que se une a la heparina

HCC-1	Quimocina CC humana
HEPES	Ácido hidroxietil-piperazina-etanosulfónico
HLA	Antígeno humano leucocitario
HMECs	Células del endotelio microvascular de la mucosa
HNECs	Células del endotelio epitelial nasal
HUVEC	Células epiteliales venosas umbilicales humanas
ICAM-1	Molécula de adhesión intercelular 1
ICC	Inmunocitoquímica
IFN	Interferón
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleuquina
IP-10	Proteína inducible por IFN $\gamma$
ISH	Hibridación <i>in situ</i>
LARC	Quimocina reguladora-activadora en hígado
LBA	Lavado broncoalveolar
LDH	Deshidrogenasa láctica
LPS	Lipopolisacárido
LT	Leucotrieno
MBLC	Microscopía de barrido láser confocal
MBP	Proteína básica principal
MCP	Proteína quimioatrayente de monocitos
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad
MIG	Monocina inducible por IFN $\gamma$
MIP	Proteína inflamatoria de macrófagos
MSGA	Con actividad estimulante del crecimiento de melanocitos
NADH	Dinucleótido de nicotinamida adenina
NAP-2	Proteína activadora de neutrófilos 2
NBT	Azul de tetrazolio
PAF	Factor activador de plaquetas
PBP	Proteína básica de plaquetas
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PF-4	Factor de plaquetas 4
PG	Prostaglandina

PMN	Polimorfonucleares
PMSF	Fluorofenil metilsulfonil
RANTES	Expresada y secretada en linfocitos T normales, regulada después de la activación
RNA	Ácido ribonucleico
RNA <sub>m</sub>	Ácido ribonucleico mensajero
RT	Transcriptasa reversa
SDF-1	Factor derivado de células estromales 1
SH	Síndrome hipereosinofílico
TAME	Na-p-tosil-L-arginina metil éster
TARC	Quimocina reguladora-activadora en timo
TBS	Solución amortiguadora de Tris
TGF	Factor de crecimiento transformante
TG	Tromboglobina
TMB	Substrato de tetrametilbenzidina
TNF	Factor de necrosis tumoral
TRITC	Isotiocianato de fluoresceina
VCAM-1	Molécula de adhesión celular vascular
HIV	Virus de la inmunodeficiencia humana
VLA-4	Antígeno muy tardío 4
VSR	Virus sinsicial respiratorio

## Índice de tablas y figuras

	Página
<b>Tabla 1</b>	
Pares de iniciadores utilizados en el análisis por RT-PCR	66
<b>Tabla 1</b>	
Seguimiento de la liberación de RANTES inducida por IFN $\gamma$ en eosinófilos de sangre periférica	98
<b>Figura 1</b>	
Características morfológicas de las células eosinofílicas generadas en cultivo semi sólido	72
<b>Figura 2</b>	
Porcentajes de las células eosinofíloides obtenidas en cultivos semi sólidos	73
<b>Figura 3</b>	
Determinaciones semi cuantitativas de los transcritos de citoquinas en eosinófilos en desarrollo	76
<b>Figura 4</b>	
Resultado representativo de RT-PCR mostrando los productos de PCR obtenidos de las citocinas expresadas en eosinófilos en maduración	77
<b>Figura 5</b>	
Análisis por RT-PCR in situ de la expresión de RNAm de RANTES en eosinófilos en maduración al día 21 de cultivo en medio semi sólido	80
<b>Figura 6</b>	
Microscopía electrónica de transmisión de una célula eosinofílica obtenida después de 23 días de cultivo en medio semi sólido	81

<b>Figura 7</b>	
Fraccionamiento subcelular de eosinófilos en reposo y estimulados con IFN $\gamma$	97
<b>Figura 8</b>	
Eosinófilos humano de un citocentrifugado de concentrado leucocitario	115
<b>Figura 9</b>	
Seguimiento de la liberación de RANTES, EPO y $\beta$ -hexosaminidasa inducida por 500 U/ml de rIFN $\gamma$ h en eosinófilos de sangre periférica	118
<b>Figura 10</b>	
Microscopía electrónica de transmisión de marcaje inmunoaureo de RANTES en eosinófilos no estimulados	120
<b>Figura 11</b>	
Micorscopía confocal de eosinófilos estimulados y no estimulados con IFN $\gamma$ doblemente marcados	123
<b>Figura 12</b>	
Fraccionamiento subcelular de eosinófilos de sangre periférica ( $5 \times 10^7$ ) de donadores asmáticos	127
<b>Figura 13</b>	
Fraccionamiento subcelular de eosinófilos en reposo y estimulados con IFN $\gamma$ ( $5 \times 10^7$ células por fraccionamiento)	128

# CAPITULO I

## Introducción

### Morfología y ultraestructura de los eosinófilos

El término eosinófilo fue acuñado en 1879 por Paul Erlich, quien observó que ciertas células contenían numerosos gránulos intracitoplásmicos con gran afinidad por colorantes ácidos como la eosina <sup>1</sup>. Después de más de cien años las propiedades tintoriales de los eosinófilos continúan siendo la piedra angular para su clasificación celular.

Los eosinófilos son leucocitos del tipo granulocítico que son producidos principalmente en la médula ósea, pasan en circulación sanguínea un tiempo indeterminado y finalmente migran hacia los tejidos <sup>1,2</sup>. Se ha calculado que hay 100 eosinófilos tisulares por cada eosinófilo en circulación <sup>1,3</sup>. El tamaño de los eosinófilos es muy parecido al de los neutrófilos (8 $\mu$  de diámetro) pero a diferencia de estos últimos, los eosinófilos poseen un núcleo bilobulado y gránulos citoplásmicos distintivos. En individuos sanos el porcentaje de eosinófilos en la circulación sanguínea es de 0.5 - 1.5% de los leucocitos circulantes (25 - 150/mm<sup>3</sup> en número absoluto), mientras que en médula ósea representan el 3.0 - 3.5% de la población celular <sup>4,5</sup>.

En el citoplasma eosinofílico coexisten diferentes gránulos que podemos clasificar como:

### **Gránulos específicos**

Son estructuras membranosas esféricas u ovoides que contienen un núcleo cristalino rodeado por una matriz menos electrodensa. Estos gránulos (aproximadamente 20 por célula) son los responsables de las propiedades tintoriales de los eosinófilos <sup>6</sup>. Los gránulos específicos contienen hidrolasas, así como la mayoría de las proteínas catiónicas distintivas de los eosinófilos, en el núcleo cristalinoide está contenida la proteína básica principal (MBP), en la matriz se encuentran la proteína catiónica eosinofílica (ECP), la neurotoxina derivada del eosinófilo (EDN) y la peroxidasa eosinofílica (EPO).

### **Gránulos primarios**

Estas estructuras rodeadas por una membrana constituyen aproximadamente el 5% de los gránulos eosinofílicos. Su tamaño es variable, aunque por regla general son más grandes que los gránulos específicos, pero al contrario de estos carecen de un cuerpo nuclear granular. En eosinófilos recién aislados de sangre periférica los gránulos primarios son el reservorio de la proteína cristalina de Charcot-Leyden (CLC) <sup>7</sup>.

### **Cuerpos lípidos**

Son inclusiones de 0.5 - 2  $\mu\text{m}$  de diámetro. Dentro de ellas se encuentran contenidas las enzimas ciclooxigenasa (prostaglandin endoperoxidasa sintetasa o PGH sintetasa) <sup>8</sup> y 5 lipoxigenasa <sup>9</sup>.

### **Gránulos pequeños**

Se encuentran en eosinófilos tisulares. Son conglomerados diminutos que contienen fosfatasa ácida y aril sulfatasa <sup>10,11</sup>.

### **Receptores en eosinófilos**

Los eosinófilos poseen un variado grupo de receptores capaces de reconocer inmunoglobulinas, citocinas, proteínas del complemento y mediadores lípidos.

### **Receptores para inmunoglobulinas**

Los eosinófilos son capaces de expresar receptores para las inmunoglobulinas IgG, IgA, IgD e IgE. Las estructuras moleculares precisas de algunos de estos receptores no han sido completamente determinadas, y con respecto al receptor de la IgE existe controversia de la naturaleza exacta de la interacción IgE-eosinófilo <sup>12</sup>.

### **Receptores para IgG (FcγR)**

Los eosinófilos expresan FcγRII (CD32) de manera limitada y aparentemente no son capaces de expresar FcγRI (CD64) <sup>13</sup>. Su relativa carencia de FcγRIII (CD16) ha sido explotada en los métodos de purificación de eosinófilos a partir de aislados granulocíticos dado que los neutrófilos expresan grandes cantidades de este receptor <sup>13</sup>. Los eosinófilos son capaces de unirse a las cuatro subclases de IgG <sup>14</sup>. Su estimulación a través de FcγRII induce la desgranulación y explosión respiratoria, aunque no tan violentamente como aquella inducida por la IgA <sup>15</sup>. Dado que los estadios larvarios de los parásitos helmintos se encuentran recubiertos con IgG es probable que los eosinófilos ejerzan algún mecanismo citotóxico en este tipo de infecciones <sup>16</sup>.

### **Receptor para IgA (Fc $\alpha$ R)**

Diferentes estudios han demostrado que los eosinófilos poseen receptores funcionales de superficie para IgA <sup>15,17,18</sup>. La IgA y en particular la IgA secretoria, es un potente estimulador de la desgranulación y liberación de EDN en estas células. Este fenómeno aumenta cuando los eosinófilos son preincubados en presencia del factor estimulante de colonias granulocíticas y monocíticas (GM-CSF) e Interleuquina 3 (IL-3). El Fc $\alpha$ R de los eosinófilos posee un mayor contenido de carbohidratos N-ligados a diferencia de los receptores Fc $\alpha$  que expresan los neutrófilos y macrófagos <sup>15</sup>.

### **Receptor de IgE (Fc $\epsilon$ R)**

Los eosinófilos normodensos expresan el receptor de baja afinidad para IgE (Fc $\epsilon$ RII; CD23) <sup>19-23</sup>; mientras que los eosinófilos aislados de pacientes con síndrome hipereosinofílico (SH) muestran receptores de alta afinidad para IgE (Fc $\epsilon$ RI) <sup>24</sup> debido muy probablemente a su estado de activación. Por otro lado, se sabe que *in vitro* la estimulación a través de receptores Fc $\epsilon$ RII no conduce a niveles detectables de desgranulación <sup>17</sup>. Sin embargo, hay evidencia que sugiere que la IgE puede actuar como cofactor en otras respuestas eosinofílicas <sup>25,26</sup>.

### **Receptores del complemento**

Los eosinófilos expresan cantidades apreciables de CR3 (CD11b/CD18/Mac-1) un miembro de la familia de la  $\beta$  2 integrinas. Estas moléculas de adhesión tienen al menos dos sitios de unión que reconocen a ligandos como C3bi, ICAM-1, fibrinógeno y polisacáridos. Los eosinófilos de sangre periférica expresan significativamente menor cantidad de moléculas CR3 que los neutrófilos<sup>13</sup>. Este receptor es importante en diferentes funciones eosinofílicas, tales como la adhesión a células endoteliales<sup>27</sup> y la eliminación de esquistosómulas, ambas mediadas por anticuerpos IgE e IgG<sup>20</sup>. La unión a partículas recubiertas con complemento a través de este receptor, es un potente estímulo para que los eosinófilos lleven a cabo el estallido respiratorio<sup>28</sup> y la desgranulación<sup>29</sup>.

Por otro lado, los eosinófilos expresan bajos niveles del receptor CR1 (CD35), una glicoproteína que se une al fragmento C3b del complemento<sup>30</sup>.

### **Receptores para citocinas**

Los eosinófilos poseen receptores de alta afinidad para las citocinas IL-3, IL-5 y GM-CSF<sup>31-36</sup>. Estos tres receptores están formados por heterodímeros (una cadena alfa más una cadena beta) que comparten entre sí cadenas beta similares pero que poseen cada uno de ellos diferentes cadenas alfa<sup>35,37</sup>. Así, tenemos que los sitios de baja afinidad se forman por la unión de una cadena alfa (60 - 80 kDa) con su citocina respectiva, mientras que los sitios de alta afinidad se originan por la combinación de cadenas beta (120 - 140 kDa) con cadenas alfa específicas<sup>37,38</sup>. Se ha observado una cierta competencia entre los receptores

de IL-3, IL-5 y GM-CSF que puede deberse al número limitado de cadenas beta, lo que a su vez regularían la magnitud de la activación eosinofílica <sup>34,35</sup>.

Los eosinófilos purificados de pacientes con SH han mostrado receptores de alta afinidad para IL-2 (CD25), lo que bien pudiera estar asociado al grado de activación de estas células <sup>39</sup>. Se ha sugerido que este receptor después de unirse a su ligando (IL-2), podría estimular la quimiotaxis de los eosinófilos, la cual ha mostrado ser cuatro veces más potente que la inducida por factor activador de plaquetas (PAF) <sup>39</sup>.

Estudios recientes describen la expresión en eosinófilos de un receptor para la quimocina eotaxina <sup>40,41</sup>, identificada como un potente y específico factor quimiotáctico para estas células <sup>42</sup>.

### **Receptores misceláneos**

Los eosinófilos expresan receptores específicos para LTB<sub>4</sub>, PAF (con dos tipos de afinidades), C5a y C3a <sup>43,44</sup>.

La presencia de receptores para formil metionil leucil fenilalanina (fMLP) en eosinófilos no está suficientemente demostrada, pero existe evidencia que hace suponer la existencia de un sitio de baja afinidad para este péptido, el cual explicaría la respuesta eosinofílica observada cuando se utilizan altas concentraciones de fMLP<sup>45</sup>.

Los receptores para LTB<sub>4</sub>, PAF, C5a y fMLP pertenecen a la familia de receptores con siete dominios transmembranales asociadas a las llamadas proteínas G <sup>46</sup>. Los receptores eosinofílicos para C5a pueden activar la fosfolipasa D, estimular la quimiotaxis y la liberación de mediadores <sup>47</sup>. De manera similar los receptores para C3a al parecer inducen

quimiotaxis, liberación de mediadores, liberación de especies reactivas de oxígeno e aumento en el transporte intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  <sup>48</sup>.

Los eosinófilos también son capaces de expresar CD4 el cual se encontró elevado en pacientes con SH <sup>49,50</sup>. Una probable asociación entre la expresión de CD4 en la superficie de los eosinófilos y la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) está basada en la observación de que cuando son cultivados precursores eosinofílicos de médula ósea humana en presencia de IL-5, éstas células son susceptibles de ser infectadas con el virus <sup>51</sup>.

La presencia de HLA-DR ha sido reportada en eosinófilos cultivados con fibroblastos 3T3 en presencia de GM-CSF <sup>52</sup>. Colateralmente con esto, los eosinófilos han mostrado actuar como células presentadoras de antígeno relativamente débiles <sup>5</sup>.

El CD69 ha sido detectado *in vivo* en eosinófilos pulmonares de pacientes con neumonía eosinofílica <sup>53</sup>. Se ha podido inducir la expresión de CD69 utilizando GM-CSF en eosinófilos de sangre periférica en períodos cortos de incubación (1 hr)<sup>54</sup>. Se ha sugerido que CD69 pudiera utilizarse como un marcador de activación en los eosinófilos de manera similar a como ocurre en los linfocitos T <sup>55</sup>.

Los eosinófilos de sangre periférica y de poliposis nasal son capaces de expresar moléculas CD40. La unión de este receptor con su ligando induce la liberación de GM-CSF, sugiriendo que los eosinófilos pudieran participar en la unión con células que expresan este ligando <sup>56</sup>.

La molécula Fas (CD95) ha sido identificada en eosinófilos humanos de sangre periférica. El tratamiento con anticuerpos anti-Fas disminuye la sobrevida inducida por IL-5 y activa la apoptosis en estas células <sup>57</sup>.

Otros receptores en eosinófilos con funciones no bien definidas son CD31 <sup>58</sup> y CD9 <sup>59</sup>.

### **Activación de los eosinófilos**

Existen diferencias morfológicas y funcionales entre los eosinófilos de sangre periférica provenientes de individuos sanos y aquellos estimulados con citocinas <sup>64</sup>, o los provenientes de sujetos con eosinofilia <sup>60</sup>, asma <sup>61</sup> o SH <sup>62,63</sup>.

En condiciones normales los eosinófilos circulan en un estado de reposo con capacidad limitada de respuesta a mediadores inflamatorios. La exposición *in vitro* o *in vivo* a dichos mediadores da como resultado la preactivación de estas células junto con un aumento en sus funciones efectoras. Por ejemplo, una prolongada estimulación con mediadores inflamatorios o una perturbación en ciertos receptores eosinofílicos de membrana, da como resultado la desgranulación de proteínas almacenadas, lo que le confiere a los eosinófilos funciones citotóxicas. Así, el término activación se refiere primordialmente a la transición de los eosinófilos de un estado de reposo a un estado presto a secretar <sup>65</sup>.

### **Cambios morfológicos de los eosinófilos activados**

La densidad de los eosinófilos es la base de los métodos de purificación que emplean gradientes de Percoll o Metrizamida. Estos procedimientos permiten separar eosinófilos en las bandas más bajas que corresponden a células más densas <sup>66</sup>.

Una de las características mejor estudiada de los eosinófilos activados es su cambio de densidad. En individuos con eosinofilia se ha observado que sus eosinófilos son de menor densidad si los comparamos con aquellos provenientes de sujetos sin esta afección <sup>60</sup>. Los eosinófilos hipodensos se muestran como células vacuoladas, con gránulos disminuidos en tamaño pero no en número (comparados con eosinófilos normales) <sup>64</sup>. La presencia de eosinófilos hipodensos parece ser un fenómeno inespecífico que ocurre en cualquier condición eosinofílica incluyendo enfermedades alérgicas <sup>61</sup>.

Otros marcadores de activación incluyen el aumento en el número y tamaño de los cuerpos lípidos y en el número de gránulos primarios, gránulos pequeños y estructuras vesiculotubulares <sup>12</sup>, la presencia de retículo endoplásmico liso y estructuras CLC citoplásmicas <sup>7</sup>.

En los eosinófilos tisulares, hay una marcada reducción en el número de gránulos específicos, los cuales se observan translúcidos como si hubiesen vaciado sus contenidos <sup>12</sup>.

Por otra parte los eosinófilos hipodensos poseen mayor volumen celular que los eosinófilos normodensos <sup>64</sup>.

### **Cambios funcionales de los eosinófilos activados**

Cuando los eosinófilos excitados son extravasados hacia los tejidos, en el proceso se activan en términos de desgranulación y expresión de marcadores de superficie <sup>12</sup>.

Se cree que los eosinófilos hipodensos son más activos ya que requieren de un mayor consumo de oxígeno <sup>67</sup>, poseen mayor citotoxicidad hacia los helmintos <sup>68</sup> y liberan más LTC<sub>4</sub> después de su estimulación fisiológica <sup>69</sup>.

La presencia de la forma secretoria de ECP en eosinófilos, ha sido utilizada en estudios inmunohistoquímicos de desgranulación. Así, el uso de EG2 un anticuerpo monoclonal que solo reconoce la forma secretoria de ECP, intenta diferenciar entre eosinófilos activados y no activados <sup>70</sup>.

### **Marcadores de superficie**

La expresión o sobre expresión de ciertas proteínas de membrana externa se ha reportado en eosinófilos provenientes de individuos con diferentes condiciones patológicas. Así tenemos por ejemplo, que en eosinófilos aislados de lavado broncoalveolar de pacientes con eosinofilia pulmonar tropical, muestran un fenotipo activado y aumento en la expresión de HLA-DR y/o CD11b/CD18 <sup>71,72</sup>. Otro estudio ha reportado un aumento de CD54 (ICAM-1), CD58 (LFA-3), HLA-DR y CD11b/CD11c/CD18, en eosinófilos de lavado broncoalveolar de pacientes sometidos a reto alérgico segmental <sup>73</sup>. No deja de ser

interesante la observación de que durante el proceso de aislamiento y purificación de eosinófilos de sangre periférica, estas células pueden ser activadas como lo indica el aumento en la expresión de los marcadores de superficie membranal CD35, CD66 y CD81<sup>74</sup>.

Los eosinófilos de individuos parasitados presumiblemente liberan de su superficie una forma secretoria del marcador CD23 (sCD23) como respuesta a la activación inducida por parásitos<sup>75</sup>, además de mostrar un aumento de CD69, CD66 y CD81<sup>74</sup>.

Los eosinófilos también pueden ser activados *in vitro* con citocinas, por ejemplo, cuando se utilizan IL-3 y GM-CSF se observa un aumento en CD4 y CD25 (IL-2R)<sup>76</sup>, el empleo de IL-3, IL-5 o GM-CSF induce la expresión de los marcadores CD69, CD81 y CD23<sup>74</sup>, mientras que la IL-13 aumenta la expresión de CD69<sup>77</sup>. En un estudio reciente donde se utilizaron 473 diferentes anticuerpos monoclonales se pudo observar que CD69 aparecía *de novo* después que los eosinófilos eran activados *in vivo* o *in vitro*, mientras que CD44 aumentaba significativamente su expresión basal en dichas células. Por otro lado, únicamente CD44 estuvo presente en eosinófilos hipodensos provenientes de individuos alérgicos<sup>78</sup>.

## **Los eosinófilos como generadores de mediadores químicos**

### **Citocinas**

Las citocinas son proteínas que juegan un papel importante en la respuesta inmune, dada su capacidad para comunicar entre sí células efectoras por medio de señales químicas. Estas sustancias han sido ampliamente estudiadas en linfocitos y células mononucleares<sup>79-81</sup>.

Se ha dado por hecho que los eosinófilos tienen una baja capacidad para producir proteínas *de novo*, dado su carácter de células terminales. Sin embargo, un creciente número de laboratorios en todo el mundo han puesto de manifiesto una capacidad insospechada en estas células para sintetizar, almacenar y liberar: interleuquinas, factores de crecimiento y quimocinas<sup>82</sup>.

### **Interleuquinas**

#### **IL-1**

Es una citocina con propiedades inflamatorias que está involucrada en la presentación del antígeno a linfocitos T. Es producida principalmente en monocitos y macrófagos<sup>83</sup>. Hay evidencia de que los eosinófilos murinos estimulados con LPS han sido capaces de sintetizar y liberar IL-1 $\alpha$ <sup>84</sup>. En humanos, los eosinófilos de un paciente con hipereosinofilia pudieron transcribir, traducir y liberar al medio esta interleuquina, antes y después de la estimulación con ésteres de forbol<sup>5</sup>.

## **IL-2**

La IL-2 es un factor esencial para el crecimiento de linfocitos T y actúa indirectamente como un factor quimiotáctico en eosinófilos humanos <sup>85</sup>. En estas últimas células se ha descrito una subpoblación capaz de expresar el receptor para IL-2 (CD25) <sup>39</sup>. Los eosinófilos de sangre periférica son capaces de transcribir RNAm específico de IL-2 <sup>86</sup>, mientras que la forma proteica de la misma se encontró asociada a los gránulos eosinófilicos en el 10% de dichas células <sup>87</sup>. La liberación de pequeñas cantidades de IL-2 se produce después de que eosinófilos de individuos atópicos asmáticos son estimulados con suero homólogo <sup>87</sup>.

## **IL-3**

Este factor pluripotencial de crecimiento celular fue detectado en eosinófilos tratados con ionomicina <sup>88</sup>, FK-506 o rapamicina, aunque en el caso de estos dos últimos la inducción de IL-3 va acompañada de GM-CSF <sup>89</sup>.

## **IL-4**

La IL-4 fue descrita en 1982 como un factor que favorecía la proliferación de linfocitos B activados con anti-IgM <sup>90</sup> y que selectivamente aumentaba la producción de IgG1 en linfocitos B activados con mitógeno <sup>91</sup>. En 1986 la IL-4 murina fue aislada utilizando expansión clonal <sup>92</sup> lo que permitió la identificación y caracterización de la IL-4 humana

<sup>93</sup>.

#### **Actividades de la IL-4**

Desde que fue descrita por primera vez se ha identificado a la IL-4 como un coestimulador y regulador en el desarrollo de los linfocitos B <sup>90,91</sup>. La IL-4 ejerce diversos efectos en linfocitos B en reposo como son el aumento en la viabilidad y tamaño celular, junto con un incremento en la expresión celular de antígenos del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) clase II, receptores Fcε, receptores para IL-4, antígeno CD40 y la cadena p75 del receptor de IL-2 <sup>104,105</sup>. En términos del desarrollo de anticuerpos, la IL-4 está involucrada en la secreción de inmunoglobulinas por parte de los linfocitos B <sup>106</sup> teniendo un papel crítico en el cambio de clase de inmunoglobulinas <sup>107</sup>. Específicamente, la IL-4 causa que los linfocitos B activados secreten grandes cantidades de IgG1 murina, IgG4 human e IgE murina y humana. El mecanismo implicado en el cambio de isotipo implica la acción de la IL-4 sobre una población de linfocitos B, en lugar de una expansión selectiva de una población de linfocitos B previamente sensibilizados hacia un isotipo determinado <sup>107,108</sup>. Además de sus efectos sobre linfocitos B, la IL-4 regula muchas fases del desarrollo de los linfocitos T. La IL-4 es un coestimulador del crecimiento para linfocitos T cooperadores y citolíticos de corto tiempo <sup>109,110</sup>; aumenta la proliferación de timocitos doble negativos fetales y murinos que han sido activados con forbol miristato acetato (PMA) <sup>111</sup>. La IL-4 induce la diferenciación de una subpoblación de linfocitos T cooperadores (designados como Th2) la cual juega un papel preponderante en la regulación de muchos componentes de la inmunidad humoral <sup>112</sup>. Concomitantemente, la IL-4 antagoniza la diferenciación y funciones efectoras de la subpoblación de linfocitos T cooperadores (designados como Th1) los cuales regulan la inmunidad celular <sup>112</sup>. En cuanto

a las células CD8+, la IL-4 es un potenciador de la diferenciación citolítica de los linfocitos T, siendo más específica que la IL-2 en inducir reactividad de linfocitos T citolíticos antígeno-específicos en algunos sistemas *in vitro* <sup>113</sup>. Además de su acción sobre linfocitos, la IL-4 ejerce efectos complejos y conflictivos en diferentes funciones de monocitos/macrófagos <sup>114</sup>. La IL-4 aumenta la habilidad de presentar antígeno por parte de los macrófagos provenientes de la médula ósea, así como la expresión de antígenos MHC de clase II y la actividad tumoricida de macrófagos peritoneales. La IL-4 también estimula la fusión de los macrófagos de médula ósea y alveolares para formar células gigantes multinucleadas. En contraste, la IL-4 inhibe la formación de colonias de macrófagos humanos, producción de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en monocitos y la liberación de los mediadores de la inflamación factor de necrosis tumoral (TNF), IL-1, IL-8 y prostaglandinas E2 (PGE2) por parte de los monocitos activados.

La IL-4 posee un conjunto de actividades sobre otras células como la de promover el crecimiento de las células cebadas y actuar sinérgicamente con los factores estimulantes de colonias que promueven el crecimiento de varios tipos celulares hematopoyéticos <sup>115</sup>. En particular la IL-4 aumenta el crecimiento de progenitores mieloides y eritroides cuando se combina con el factor estimulante de colonias granulocíticas (G-CSF), IL-6 o eritropoyetina.

## **IL-5**

Esta citocina es la responsable de regular la diferenciación de progenitores celulares CD34+ hacia eosinófilos maduros<sup>116</sup>. Se ha podido demostrar la presencia de RNAm específico de IL-5 en eosinófilos de mucosas de pacientes con enfermedad celíaca activa<sup>117</sup>, en eosinófilos de sangre periférica de pacientes con SH<sup>118</sup>, y en eosinófilos de lavados broncoalveolares obtenidos de sujetos asmáticos<sup>119</sup>. La expresión de RNAm específico junto con la forma proteica de IL-5 ha sido reportada en eosinófilos de pacientes con SH<sup>118</sup> y en eosinófilos de pacientes con enfermedad cardíaca eosinofílica<sup>120</sup>.

## **IL-6**

La IL-6 juega un papel importante regulando la respuesta inmune debido a su efecto en las funciones de linfocitos T y B además de ser un importante mediador inflamatorio<sup>121</sup>. El RNAm de esta interleuquina se ha encontrado en eosinófilos normodensos de donadores sanos así como en eosinófilos de pacientes hipereosinofílicos<sup>122,123</sup>. El porcentaje de células positivas para esta citocina se eleva después de la estimulación con IFN $\gamma$  pero su liberación al medio es independiente de la presencia del estímulo. Al igual que otras citocinas la IL-6 es almacenada en los gránulos cristaloides<sup>123</sup>.

### **IL-8**

La IL-8 es un poderoso factor quimiotáctico para neutrófilos, producida principalmente por macrófagos<sup>124</sup>. La inducción de la transcripción, traducción y liberación de IL-8 se ha conseguido en eosinófilos de sujetos atópicos/asmáticos después de que estas células fueron estimuladas con diferentes citocinas<sup>125</sup>. El patrón de tinción para IL-8 es granular sugiriendo que esta citocina es almacenada intracelularmente<sup>126</sup>. La estimulación de los eosinófilos con los quimioattractantes C5a y fMLP, pero no con PAF o quimocinas CC induce la liberación de IL-8 al medio<sup>126</sup>.

### **IL-10**

Esta quimocina es expresada constitutivamente en eosinófilos recién aislados de donadores sanos<sup>127</sup>. Se ha observado que la IL-5 aumenta la capacidad de los eosinófilos para almacenar IL-10. Sin embargo, no existe evidencia de que los eosinófilos estimulados liberen IL-10 al medio<sup>127</sup>.

### **IL-16**

Esta quimocina que se une al CD4 y que fue conocida anteriormente como factor quimioattractante para linfocitos se encontró en eosinófilos de sangre periférica después que estas células fueron estimuladas *in vitro* con GM-CSF. Su inmunoreactividad se ha comprobado en ensayos biológicos<sup>128</sup>.

## **Factores de crecimiento**

### **Factor de crecimiento transformante alfa (TGF $\alpha$ )**

El TGF $\alpha$  ha sido detectado en eosinófilos de sangre periférica <sup>129</sup>, en eosinófilos de polipos nasales <sup>130</sup>, y en eosinófilos tisulares del carcinoma esquisomatoso oral <sup>131</sup>. La forma proteica de este factor se encontró almacenada dentro de los gránulos cristaloides eosinofílicos <sup>132</sup>.

### **Factor de crecimiento transformante $\beta$ (TGF $\beta$ )**

Se ha observado que los eosinófilos de polipos nasales tienen capacidad para transcribir y sintetizar TGF $\beta$  <sup>133</sup>. El TGF $\beta$ 1 ha sido localizado en eosinófilos de pacientes con enfermedad de Hodgkin <sup>134</sup>.

### **Factor de crecimiento parecido al EGF que se une a la heparina (HB-EGF-LGF)**

Este factor es un potente mitógeno de las células musculares lisas que contribuye a la hipertensión pulmonar en diferentes condiciones clínicas. En un modelo animal de hipertensión en ratas se ha detectado producción de RNAm de HB-EGF-LGF en los cúmulos de eosinófilos localizados en las paredes alveolares. Por otro lado, los eosinófilos de sangre periférica no han mostrado RNAm específico, quedando abierta la posibilidad de una posible activación transcripcional para este factor en los sitios de reclutamiento de eosinófilos <sup>135</sup>.

### **Factor de crecimiento derivado de plaquetas cadena B (PDGF-B)**

El PDGF-B estimula la proliferación de numerosos tipos celulares, incluyendo fibroblastos, células endoteliales y células del músculo liso. Utilizando hibridación *in situ* se ha podido detectar la expresión de RNAm específico de PDGF-B en eosinófilos tisulares de polipos nasales provenientes de individuos asmáticos <sup>136</sup>. También se ha detectado RNAm que codifica PDGF-B en eosinófilos de biopsias bronquiales de pacientes asmáticos severos. Sin embargo, la presencia de la proteína PDGF-B en eosinófilos tisulares no ha podido ser confirmada por inmunocitoquímica. Por otro lado los eosinófilos de sangre periférica han mostrado ser capaces de hibridar con la sonda específica de PDGF-B y poseer inmunoreactividad para PDGF-B después de que son estimulados con el ionóforo de calcio A23187 <sup>136</sup>.

### **GM-CSF**

La hibridación *in situ* de eosinófilos de sujetos sanos ha mostrado que estas células son capaces de transcribir y traducir GM-CSF después de haber sido estimuladas con IFN $\gamma$  o con ionóforo de calcio A23187 <sup>137</sup>. Otro estudio mostró que el GM-CSF era liberado después de que los eosinófilos eran estimulados con Ionomicina y evidenció un efecto autocrino del GM-CSF derivado de los eosinófilos el cual prolongó la supervivencia de estas células <sup>88</sup>.

El RNAm de GM-CSF ha sido detectado *in vivo* en eosinófilos asociados a poliposis nasal <sup>138</sup>. El empleo de la técnica del ensayo enzimático ligado a inmunoabsorbente (ELISA) permitió detectar la forma proteica de GM-CSF en los sobrenadantes de cultivos de tejido

de polipo nasal de 24 horas. La presencia de RNAm de GM-CSF ha sido también confirmada en eosinófilos humanos de lavado broncoalveolar obtenidos de sujetos asmáticos después de reto alérgico endobronquial <sup>119</sup>.

### **Interferon gamma (IFN $\gamma$ )**

El IFN $\gamma$  es una importante citocina regulatoria la cual se cree está involucrada en la reacción inmune contra los tumores, virus y parásitos protozoarios. Es una citocina Th1 con un amplio espectro de actividades biológicas sobre muchos tipos de células inmunes e inflamatorias incluyendo a los eosinófilos. El IFN $\gamma$  ha mostrado inducir un aumento en la expresión de RNAm para las citocinas eosinofílicas GM-CSF <sup>137</sup> e IL-6 <sup>123</sup>.

Nakajima et al <sup>127</sup> fallaron en su intento por mostrar RNAm de IFN $\gamma$  en eosinófilos obtenidos de donadores sanos en presencia o ausencia de estímulo. Sin embargo, el empleo de la técnica de transcriptasa reversa - reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) *in situ*, sugiere una subpoblación de eosinófilos inmunes capaces de expresar RNAm específico de IFN $\gamma$  <sup>139</sup>. Esta observación ha conducido a la interesante proposición de que los eosinófilos pudieran dividirse en dos grandes grupos dependiendo del perfil de citocinas que producen, de forma similar a la reconocida dicotomía Th1-Th2 existente en linfocitos T

<sup>139</sup>

### **Factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ )**

Esta importante quimocina antitumoral producida por células mononucleares también tiene propiedades quimiotácticas en los eosinófilos <sup>140</sup>.

La presencia de RNAm específico de TNF $\alpha$  ha sido reportada en eosinófilos de sangre periférica de sujetos normales y de pacientes con hipereosinofilia así como en eosinófilos infiltrantes en la enterocolitis necrosante <sup>141-143</sup> siendo notorio el almacenamiento de la forma proteica en los dos primeros casos.

## Quimocinas

El término “quimocinas” se empleó por primera vez en 1992 <sup>141,142,144</sup>, para agrupar a las citocinas quimiotácticas de 8 a 10 kDa con cuatro cisteínas conservadas en su secuencia de aminoácidos. Las quimocinas poseen polipéptidos básicos que le confieren gran afinidad por la heparina. Su actividad biológica se da a concentraciones de 1 a 100 ng/ml y son producidas por una amplia variedad de células inmunes y no inmunes en respuesta a diferentes agresiones como heridas, alérgenos, antígenos o microorganismos invasores <sup>79,141,142,145,146</sup>.

La clasificación inicial de estas moléculas se basa en la disposición de sus cuatro cisteínas conservadas en la cadena polipeptídica, así como en la localización cromosómica de sus genes. Sus cisteínas forman entre sí uniones disulfuro características (cys1-cys3 y cys2-cys4) <sup>79,147-149</sup>.

Las secuencias de quimocinas, en su mayoría, han sido obtenidas a partir de cDNA que codifica proteínas de 92 a 125 aminoácidos de longitud las cuales son secretadas después del rompimiento de una secuencia líder de 20 a 25 aminoácidos. En su cadena polipeptídica presentan una región amino terminal corta (que precede a la primera cisteína) y una secuencia carboxilo terminal larga <sup>148</sup>.

## **Las alfa quimocinas**

Son aquellas quimocinas cuyas dos primeras cisteínas de la región amino terminal están separadas por un aminoácido (CXC). En el humano sus genes están codificadas en el cromosoma 4(q12-21), la mayoría de ellas tiene acción quimiotáctica sobre neutrófilos pero nulo efecto sobre monocitos <sup>79,147</sup>.

Esta subfamilia incluye quimocinas CXC que poseen el motivo ERL en la porción amino terminal (ERLCXC: ácido glutámico-leucina-arginina-cisteína-X-cisteína) <sup>79,148,150</sup>

Sus miembros son:

GCP-2

SDF-1

PBP que es precursor de:

TGβ

CTAP-III

NAP-2

ENA-78

MSGA/GRO

GRO α

GRO β

GRO γ

IL-8

Y las quimocinas CXC que no poseen el motivo ERL<sup>148,150</sup>. A saber:

IP-10

MIG

PF-4

CK $\alpha$ 1

CK $\alpha$ 2

### **Las betas quimocinas**

Se refiere a las quimocinas que tienen en su región amino terminal dos cisteínas adyacentes (CC). En los humanos sus genes se encuentran agrupados en el cromosoma 17(q11-32). Tienen acción quimiotáctica sobre monocitos, linfocitos T, células NK y algunos granulocitos pero no neutrófilos<sup>79,147,150,151</sup>. Ejemplos:

MCP-1,2,3,4

MIP-1  $\alpha/\beta$

RANTES

I-309

C-10

Eotaxina

FIC

CK $\beta$  6,7,8,9,11,12,13,14

HCC-1

TARC

La investigación en quimocinas es un campo muy activo y fértil donde constantemente nuevos miembros son clasificados y adicionados a las listas arriba enumeradas. Tomando como criterio la disposición de las cisteínas conservadas podríamos enumerar a las siguientes familias de quimocinas.

### **Las gamma quimocinas o quimocinas C**

Se refiere a aquellas quimocinas que carecen de dos de las cisteínas características (cys-1 y cys-2). Hasta ahora, la linfotactina que es quimiotáctica para linfocitos pero no para macrófagos y cuyo gene se encuentra localizado en el cromosoma 1 en humanos y ratones, es el único representante de esta subfamilia <sup>152,153</sup>

### **Las CX3C quimocinas**

Estas quimocinas se encuentran unidas a la membrana celular y se caracterizan por poseer tres aminoácidos entre las dos primeras cisteínas (motivo CX3C) <sup>154</sup>. La Fraktalkine/Neurotactin es un ejemplo de este tipo.

### **Las quimiotactinas 6Ccinas (6Ckine)**

La tecnología moderna ha permitido identificar en bases de datos genómicos una secuencia que no corresponde a ninguna quimocina descrita. El producto clonado corresponde a la llamada 6Ckine la cual posee un patrón único de 6 cisteínas conservadas; las cuatro cisteínas características de las CC quimocinas más un par adicional en la región carboxilo terminal (la cual presenta una longitud más larga que el promedio). La expresión de 6Ckine se ha observado en humanos y ratones, donde presenta propiedades quimiotácticas para timocitos y linfocitos T activados <sup>155</sup>.

### **Receptores de las quimocinas**

Las quimocinas son reconocidas por receptores con siete dominios transmembranales (7TM) <sup>79,151</sup>acoplados a proteínas G <sup>81</sup>. La concentración de quimocina necesaria para el reconocimiento con su receptor y posterior activación celular es del orden de nanomoles. La especificidad de las quimocinas en ciertos grupos celulares se puede explicar por la presencia o ausencia de receptores específicos en determinadas células <sup>150</sup>. Sin embargo, la mayoría de los receptores reconocen a más de una quimocina y varias quimocinas se unen a más de un receptor, lo que le confiere una gran versatilidad al sistema de quimocinas <sup>150</sup>. Se ha propuesto una clasificación de los receptores conocidos agrupándolos en cuatro clases diferentes:

**Compartidos.** Son aquellos que se unen a más de una quimocina dentro de las familias CC o CXC.

**Específicos.** Son los que se unen a una quimocina en particular.

**Promiscuos.** Se unen a quimocinas de los grupos CXC o CC y se encuentran en la superficie de los eritrocitos.

**Viralmente codificados.** Estos receptores son codificados dentro de genomas virales

La siguiente tabla muestra, de acuerdo a la nueva nomenclatura, una de las clasificaciones más recientes de receptores de quimocinas.

<b>Receptor</b>	<b>Quimocina</b>
CXCR1	IL-8, GCP-2
CXCR2	IL-8, GRO $\alpha/\beta$ , NAP-2, ENA-78, GCP-2
CXCR3	IP10, Mig
CXCR4	SDR-1
CXCR5	BCA-1/BLC
CCR1	RANTES, MIP-1 $\alpha$ , MMCP-2, MCP-3
CCR2	MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-4
CCR3	Eotaxina, eotaxina-2, RANTES, MCP-2, MCP-3, MCP-4
CCR4	TARC, RANTES, MIP-1 $\alpha$ , MCP-1
CCR5	RANTES, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$
CCR6	LARC/MIP-3 $\alpha$ /exodus
CCR7	ELC/MIP-3 $\beta$
CCR8	I-309
CX3CR1	Fraktalkine/Neurotactin

### **Propiedades biológicas de las quimocinas**

Las citocinas quimiotácticas como ya se ha mencionado deben su nombre a la que es sin duda su característica mejor conocida: la atracción *in vitro* de diferentes estirpes celulares y a la inducción de infiltrados inflamatorios en sitios próximos a la inoculación cuando son inyectadas intramuscularmente en animales <sup>146</sup>. Sin embargo, es necesario mencionar otras actividades biológicas de las quimocinas tales como: la activación de la desgranulación y el estallido respiratorio en leucocitos, la modulación de la adhesividad de dichas células al endotelio, la vasoconstricción, el aumento de la permeabilidad vascular, la modulación de la proliferación celular y la angiogenesis <sup>156,157</sup>.

Las quimocinas ejercen su acción en un espacio muy reducido, por lo que las llamadas quimocinas fuertes tienen acción a mayor distancia que las quimocinas débiles, aún así su efecto está delimitado, pues se ha comprobado que su administración sistémica o sobre-expresión generalizada en ratones transgénicos no siempre conduce a los efectos fenotípicos esperados. Las quimocinas juegan un papel fundamental en la migración de los leucocitos de la circulación periférica a los espacios intersticiales, la cual representa la piedra fundamental del proceso inflamatorio y en donde la interacción entre las moléculas expresadas en las superficies membranales de los leucocitos y aquellas de las células endoteliales o de la matriz extracelular, determinan la eficiencia del proceso <sup>146,156,157</sup>.

## **RANTES**

### **Definición y características**

RANTES es una citocina quimiotáctica cuyo gene es expresado en diferentes tipos celulares inmediatamente después de la estimulación pero es regulada tardíamente (3 a 5 días) en linfocitos T normales después de ser activados <sup>158</sup>. RANTES fue descrito por primera vez en una biblioteca de cDNA enriquecida en secuencias específicas de linfocitos T. El producto del gene de RANTES es de 10 kDa incluido el péptido señal y de 8 kDa después de la pérdida de éste. Posee cuatro cisteínas a lo largo de sus 68 aminoácidos y no posee sitios para N-glicosilación <sup>159</sup>.

### **Producción**

La producción de RANTES se ha detectado en diferentes tejidos y en un gran número de células inmunes y no inmunes, entre las que podemos citar linfocitos T <sup>159</sup>, células epiteliales <sup>160,161</sup>, plaquetas <sup>162</sup>, fibroblastos <sup>163</sup>, macrófagos y células endoteliales <sup>164,165</sup>, una línea de células cebadas <sup>166</sup>, células del epitelio nasal <sup>167</sup>, células mesoteliales <sup>168</sup>, células corneales <sup>169</sup>, monocitos <sup>170</sup>, biopsias bronquiales <sup>171</sup>, células del endotelio umbilical, células del epitelio nasal, células endoteliales de la mucosa microvascular <sup>172</sup>, astrocitomas y astrocitos primarios <sup>173</sup>, células mesosteliales peritoneales <sup>174</sup>, mucosa sinusal <sup>175</sup>, fibroblastos sinoviales <sup>176</sup>, eosinófilos <sup>124,177</sup> y queratinocitos <sup>178</sup>.

RANTES es un potente factor quimiotáctico para eosinófilos, basófilos, monocitos/macrófagos, linfocitos T de memoria CD4+/CD45RO+ y células cebadas.

### **Actividades biológicas de RANTES**

La mayoría de los tejidos adultos contienen células positivas para RANTES. Sin embargo, la expresión de esta quimocina aumenta dramáticamente en los sitios inflamatorios <sup>179</sup>. Debido a que RANTES es un factor quimiotáctico para eosinófilos se le ha asociado con el reclutamiento de estas células en las vías aéreas de individuos asmáticos sometidos a reto alérgico <sup>180</sup>, en el asma alérgico, en la inflamación cutánea <sup>181</sup>, en el rechazo en trasplantes de pulmón <sup>182</sup> y en enfermedades de la piel y mucosa oral <sup>183</sup>.

Además de la función quimiotáctica, RANTES muestra otras actividades biológicas como:

RANTES y MIP-1 $\alpha$  aumentan la producción de IgE e IgG4 debido a la estimulación de sIgE+ y sIgG4 en linfocitos B <sup>184</sup>, abre canales de Ca<sup>2+</sup> y activa canales de K<sup>+</sup> en la línea de eosinófilos Eo-1 a través de la activación de proteínas G <sup>185</sup> e intensifica la adhesión de los eosinófilos a epitelios sin aumentar la expresión de  $\beta$ 2 integrina <sup>186</sup>. No se descarta su participación en la supresión de la replicación del HIV <sup>187-189</sup>.

RANTES junto con MCP-1 y MIP-1 $\alpha$  liberan histamina de basófilos humanos, así como de células cebadas de ratas y ratones. Las citocinas MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES y MCP-1 son capaces de coestimular la proliferación de linfocitos T purificados y clones de estos. *In vitro* inducen la producción de IL-2 en presencia de anticuerpo monoclonal anti-CD3 <sup>190</sup>.

Por otro lado son capaces de generar células citolíticas CHAK (CC chemokine activated killer).

RANTES al igual que otras citocinas CC e IL-2 pueden inducir la proliferación y activación de células NK <sup>191,192</sup>. Ya en alguna parte señalabamos que IL-5, IL-3, GM-CSF, TNF $\alpha$  y RANTES inducen desgranulación en eosinófilos <sup>193</sup>.

### **Regulación de RANTES**

Como ya se ha mencionado, son diversas las células capaces de producir RANTES, sin embargo la expresión de esta citocina se ve incrementada en aquellos sitios donde se desarrolla activamente un proceso inflamatorio <sup>179</sup>.

Poco se sabe acerca de los mecanismos celulares reguladores de la producción de RANTES, sin embargo se sabe de la existencia de un par de factores que influyen en su síntesis: factor viral y factor sinérgico de las citocinas IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  e IL-1 <sup>179</sup>.

## **CULTIVOS DE EOSINOFILOS**

En los inicios de los estudios de diferenciación celular se estableció que la sangre periférica humana posee células precursoras capaces de generar *in vitro*, granulocitos y colonias de monocitos cuando estas son incubadas en medios semi sólidos <sup>194,195</sup>. Más aún el método de cultivo que utiliza linfocitos purificados con subsecuente eliminación de monocitos sugiere que la célula formadora de colonia es no adherente, no fagocítica y morfológicamente indistinguible de un linfocito <sup>196,197</sup>.

Cuando las células humanas de progenitores hematopoyéticos son cultivadas en agar, son capaces de formar diferentes tipos de colonias <sup>194,195,198-202</sup>.

Existen factores en los medios líquido o semi sólido que favorecen el desarrollo de colonias de eosinófilos y de monocitos <sup>198</sup>. Así, el empleo de un medio condicionado con sustancias liberadas por células pancreáticas en cultivo más suero fetal bovino (FCS) favoreció la expresión de colonias eosinofílicas y de monocitos <sup>203</sup>.

Considerando la fuente de precursores eosinofílicos podríamos dividir los métodos de cultivo de eosinófilos de la siguiente manera:

## **Cultivos de médula ósea**

La capacidad de la médula ósea para generar continuamente células pluripotenciales, la coloca como fuente confiable de precursores eosinofílicos siendo la fracción de células mononucleares la que alberga la mayor cantidad de células indiferenciadas <sup>204-208</sup>.

En los intentos por cultivar eosinófilos a partir de células mononucleares de médula ósea se ha observado que la sola presencia de IL-5 en medios líquidos y semisólidos induce la generación de células eosinofílicas inmaduras a las dos semanas, concomitante a monocitos y neutrófilos indiferenciados <sup>209</sup>.

En medios líquidos la sola presencia de IL-5 induce una diferenciación y proliferación selectiva de eosinófilos del 72% del total de células a las tres semanas <sup>210</sup> o del 71% a las cuatro semanas de cultivo <sup>211</sup>. Debido a que las células restantes están constituidas por monocitos, basófilos y neutrófilos se puede argumentar que si bien la IL-5 induce diferenciación y proliferación selectiva de eosinófilos, esta no es exclusiva de esa estirpe celular <sup>210,211</sup>. Por otro lado la capacidad eosinopoyética de la IL-5 es menor que la de IL-3 o GM-CSF como fue demostrado cuando al agregar diferentes combinaciones de IL-3 con IL-5 y/o GM-CSF en medio semisólido no se incrementó el número de colonias eosinofílicas más allá de lo observado bajo la acción de IL-3 y/o GM-CSF <sup>212</sup>.

No obstante que la IL-3 y el GM-CSF inducen diferenciación de eosinófilos, la IL-5 muestra una mayor selectividad eosinopoyética <sup>211,213</sup>. Mas aún, en cultivos secuenciales una preincubación en presencia de IL-3 parece potenciar la capacidad de respuesta de los progenitores eosinopoyéticos hacia IL-5 <sup>213</sup>, o dicho con otras palabras, la IL-3 parece

actuar sobre progenitores eosinofílicos más tempranos que aquellos en los que actúa la IL-5  
212,213.

### **Cultivos de sangre de cordón umbilical**

Aunque no tan rica en células precursoras, la sangre de cordón umbilical posee suficientes progenitores en la fracción de células mononucleares que bajo la acción de IL-5 se diferencian a eosinófilos, basófilos, neutrófilos y macrófagos <sup>211</sup>. La IL-3 también influye en la diferenciación hacia eosinófilos pero en menor medida que la IL-5 y es más notorio su efecto sobre la diferenciación de basófilos <sup>214,215</sup>.

Las células mononucleares obtenidas de sangre de cordón umbilical cultivadas en medio líquido fueron capaces de diferenciarse a eosinófilos (mielocitos, metamielocitos y formas maduras) bajo la sola presencia de IL-5, este rendimiento fue suficiente para realizar un estudio de MBP y proMBP <sup>216</sup>. Las células mononucleares de cordón umbilical mostraron una diferencia selectiva hacia eosinófilos bajo la acción de la IL-5 obteniéndose un máximo a las 3 semanas (81 - 91% de eosinófilos inmaduros). Por otro lado, la IL-3 dio origen a mielocitos eosinofílicos (50 - 80%), neutrófilos, macrófagos y basófilos. Los mielocitos eosinofílicos desarrollados en presencia de IL-3 fueron indistinguibles de aquellos desarrollados en la presencia de IL-5. Los eosinófilos maduros fueron muy raros <sup>217</sup>.

Las células mononucleares de cordón umbilical cultivadas en medio líquido en presencia de IL-3 e IL-5 generaron eosinófilos con una pureza de 90% (no mencionándose su grado de madurez) que presentaron marcadores de membrana (FcγII y CR1) y propiedades

funcionales (quimiotaxis a PAF, citotoxicidad, contenido de EPO y adherencia basal) similares a los eosinófilos de sangre periférica <sup>218</sup>.

### **Cultivos de sangre periférica**

Las células mononucleares de sangre periférica de individuos sanos o asmáticos, al ser cultivadas en medio líquido o semi sólido bajo la acción de IL-3, IL-5 y GM-CSF, son capaces de diferenciarse hacia eosinófilos <sup>219-229</sup>.

### **Cultivo de células CD 34+**

CD34 es una glicoproteína monomérica O-sililada de 105 a 120 kD, la que en el sistema hematopoyético esta restringida a células progenitoras primitivas de todos los linajes <sup>116,230-232</sup>.

El porcentaje de células CD34+ varía enormemente, así tenemos que en médula ósea su porcentaje varía de 1 - 3% <sup>233</sup>, en sangre de cordón umbilical es de entre 0.3 - 2% <sup>227,234</sup>, mientras que en sangre periférica de individuos normales solo del 0.01 - 0.1% de leucocitos circulantes lo poseen <sup>235</sup>. Las células CD34+ han sido utilizadas en trasplantes autólogos <sup>236,237</sup>, como agentes potenciales en la terapia génica <sup>238-240</sup> y como células generadoras de eosinófilos en cultivos celulares <sup>116</sup>.

Las células CD34+ han mostrado capacidad multipotencial al ser cultivadas en metilcelulosa bajo la presencia de IL-3, GM-CSF o eritropoyetina <sup>241</sup>. En un estudio más elaborado no se observaron diferencias fenotípicas en la heterogeneidad del marcador

CD34+ de células provenientes de médula ósea o sangre periférica <sup>242</sup>. Las células CD34+ individuales no fueron capaces de generar eosinófilos bajo la sola presencia de IL-5 <sup>243</sup>. Sin embargo cuando células CD34+, CD33+ provenientes de médula ósea son incubadas en medio líquido en presencia de G-CSF o IL-3 y posteriormente transferidas a medio semi-sólido con IL-5, se observa la formación de colonias de eosinófilos. Lo mismo sucede con células CD34+, CD33- preincubadas con IL-3 y posteriormente transferidas a medio semi sólido conteniendo IL-5. Estas colonias alcanzan un óptimo desarrollo a los 15 a 20 días y consisten exclusivamente de eosinófilos maduros <sup>242,244</sup>.

Otro estudio señala que células CD34+ obtenidas por leucoforesis cuando son incubadas en presencia de IL-3, IL-5 o GM-CSF, son capaces de diferenciarse individualmente hacia eosinófilos. No obstante cuando se adiciona IL-5 a cultivos que poseen IL-3 y GM-CSF, se observa un efecto aditivo en la formación de eosinófilos aunque no significativo. Sobresale el hecho de que la IL-5 aumenta el porcentaje de colonias de eosinófilos puros <sup>116</sup>. Un procedimiento similar utilizando medio líquido se ha empleado para estudiar la expresión génica de proteínas características de eosinófilos <sup>229</sup>.

## **Actividad biológica de los eosinófilos**

Los eosinófilos pueden vertir el contenido de sus gránulos hacia el exterior utilizando cualquiera de los siguientes fenómenos o mecanismos:

### **Necrosis**

Este término que se refiere a la muerte celular aparece con frecuencia en los focos inflamatorios donde los eosinófilos muestran centralización de sus gránulos, pérdida de la integridad de la membrana granular y plasmática y lisis nuclear <sup>245</sup>.

La sola liberación de los gránulos eosinofílicos intactos o de su contenido a los intersticios puede provocar efectos tóxicos. Estos eventos han sido bien documentados en piel de pacientes con SH y penfigoide bulboso <sup>246</sup> y son consistentes con la observación frecuente de desgranulación masiva con pocos eosinófilos intactos que se observa en biopsias de inflamación eosinofílica vigorosa asociada a diferentes enfermedades <sup>12</sup>. Este proceso es contrario a la apoptosis en donde no hay pérdida de la integridad membranar <sup>227,247</sup>.

### **Secreción granular**

Esta es la mejor caracterizada de las formas de secreción. El proceso involucra la fusión de los gránulos con la membrana plasmática celular liberando al exterior su contenido (matriz y núcleo granular). Alternativamente, los gránulos pueden fusionarse intracitoplásticamente

en grandes cámaras de desgranulación, las cuales se abren al exterior de la célula a través de poros. Esta forma clásica de desgranulación está bien documentada en la desgranulación anafiláctica de células cebadas y basófilos <sup>248</sup>. Este mecanismo está presente en eosinófilos de pacientes con enfermedad intestinal inflamatoria o con infecciones tisulares invasivas <sup>249</sup>. Por otro lado este tipo de desgranulación no es muy común en los focos inflamatorios eosinófilicos.

### **Desgranulación gradual**

Se le llama así al proceso mediante el cual las vesículas con proteínas granulares geman de un gránulo secundario resultando en su vaciamiento gradual. Se ha podido observar una amplia gama de morfologías que van desde la pérdida del núcleo granular, pérdida parcial o total del compartimento de la matriz granular hasta un total vaciado del contenido de los gránulos <sup>250</sup>.

De acuerdo con estudios hechos en biopsias de tejido duodenal de pacientes con gastroenteritis eosinófilica, los eosinófilos secretan MBP siguiendo este mecanismo. Utilizando técnicas de marcado inmunoáureo, ha sido posible localizar MBP en extensas formaciones citoplásmicas membranosas y vesiculares, revelando núcleos granulares vacíos. Adicionalmente no se ha podido identificar EPO o ECP en estas estructuras, concluyéndose que los eosinófilos secretan selectivamente MBP a través de un proceso de desgranulación regulada sin liberación de proteínas contenidas en la matriz granular <sup>251</sup>.

## **Función de los eosinófilos**

Los eosinófilos, debido a su peculiar proceder, por un tiempo no contaron con la atención de los investigadores, al contrario de sus parientes cercanos: el polimorfonuclear (PMN) neutrófilo y basófilo. A principios de este siglo se pensaba que los eosinófilos tenían un papel protector removiendo detritus y destoxificando tejidos en enfermedades alérgicas y granulomatosas <sup>252</sup>. A mediados de siglo XX se les atribuyó alguna participación en el efecto de la histamina y en la presentación de antígeno para la síntesis de anticuerpos <sup>253</sup>. Otros posibles papeles incluyeron la reparación de tejidos como el útero <sup>254</sup>, como acelerador de los mecanismos de restauración después del trauma <sup>255</sup> y en la degradación de mediadores de anafilaxia derivados de células cebadas; lo que sugirió que estas células pudieran atemperar el proceso alérgico <sup>256</sup>.

## **Eosinófilos y parasitosis**

En la última parte de la década de 1970 la observación de que los eosinófilos o las proteínas contenidas en sus gránulos eran tóxicos para larvas de parásitos helmintos <sup>257</sup>, condujo a la muy difundida creencia de que el papel teleológico de los eosinófilos era la defensa del hospedero contra los gusanos.

El aumento en el número de eosinófilos tisulares y en circulación junto con una elevación en los niveles de IgE total y específica de parásitos, así como la presencia de mastocitosis son consideradas marcas distintivas de infección por gusanos parásitos, especialmente durante sus fases de migración larvaria <sup>258,259</sup>.

Está por aclararse si lo anterior obedece a una mera patología de la infección o a una respuesta protectora.

### **Eosinófilos y enfermedades**

Las cuentas de eosinófilos en sangre periférica representan el balance entre el grado de eosinófilos que migran de la médula ósea y los que ingresan a los tejidos. Recordemos que los eosinófilos son células primordialmente tisulares. El número de eosinófilos considerado como normal es menor a  $0.4 \times 10^9/L$  siendo más elevado en neonatos <sup>260</sup>. Las cuentas de eosinófilos varían con la edad, hora del día, ejercicio y medio ambiente. Los eosinófilos presentan variaciones circadianas siendo su número menor durante el día y mayor por la noche. Esto probablemente esté relacionado con las variaciones diurnas de cortisol, el cual se eleva por las mañanas <sup>261</sup>.

Las causas más comunes de eosinofilia en el tercer mundo son las infecciones por parásitos helmintos, mientras que en países desarrollados son las enfermedades atópicas alérgicas y el asma <sup>262</sup>.

Es evidente que los eosinófilos son la fuente de muchas citocinas las cuales están consideradas como factores homeostáticos más que proinflamatorios. Sin embargo, no hay duda que los eosinófilos pueden causar daños tisulares severos en ciertas circunstancias.

## Eosinófilos y asma

Durante muchos años se ha reconocido que existe una estrecha relación entre los eosinófilos y las enfermedades alérgicas. En el asma atópico y no atópico hay un aumento en el número de eosinófilos circulantes, aunque esta elevación no es tan pronunciada como la observada en otras enfermedades eosinofílicas<sup>12</sup>. Algunos estudios han encontrado una correlación entre el asma o rinitis y el número de eosinófilos hipodensos en la sangre periférica<sup>61</sup>.

La habilidad de los eosinófilos para generar un conjunto de mediadores proinflamatorios, en particular las proteínas granulares citotóxicas como la MBP, ha llevado a la hipótesis de que el asma es una enfermedad inflamatoria activa de la mucosa, cuyo principal componente es el daño tisular causado por mediadores derivados de los eosinófilos<sup>263-265</sup>.

De hecho, los eosinófilos contribuyen en mucho a la inflamación asociada con el asma, pues se ha observado que la exposición *in vitro* con ECP o MBP a concentraciones similares a las encontradas en el esputo de individuos asmáticos causa disfunción ciliar y desprendimiento de células epiteliales<sup>266</sup>. Se cree que el daño y/o pérdida de las células epiteliales se cree que es responsable del desarrollo de la hiperrespuesta de vías aéreas. Más aún, las proteínas granulares están presentes en grandes cantidades en vías aéreas de pacientes que han muerto por asma<sup>267</sup>.

En suma, los eosinófilos son células efectoras en la producción de daño tisular en asma y enfermedades alérgicas relacionadas<sup>65,268</sup>. En años recientes ha habido un sustancial aumento en la investigación sobre eosinófilos, estimulada en gran medida por la posibilidad

de que la modulación de la función eosinofílica pudiera ser un arma terapéutica efectiva para el asma y otras enfermedades alérgicas.

Como hemos visto, la participación de los eosinófilos en el proceso inflamatorio alérgico bien puede deberse a su capacidad de liberar citocinas o quimiocinas activas como la IL-4 y RANTES (ambas de gran importancia en la amplificación de la respuesta inflamatoria primaria). Así, la elucidación de la naturaleza constitutiva e/o inducible de la IL-4 y RANTES en eosinófilos es de gran importancia en la comprensión de la progresión del fenómeno inflamatorio.

Recientemente han aparecido diversas publicaciones que señalan la naturaleza constitutiva de la IL-4 y RANTES en eosinófilos de sangre periférica provenientes de individuos atópicos y normales <sup>127,128,269</sup>.

En la presente tesis nos propusimos investigar la expresión de citocinas durante la ontogenia de los eosinófilos y valorar su naturaleza constitutiva. Así, en el capítulo II presentamos nuestros estudios del patrón de citocinas producidas en progenitores eosinofílicos en diferentes estadios de diferenciación. Trabajo enviado a publicar como:

***Juan R. Velázquez, Paige Lacy, Salahaddin Mahmudi-Azer, Ben Bablitz, Craig D. Mine, Juda A. Denberg, and Redwan Moqbel. Cytokine expression and storage in maturing eosinophils derived from human cord blood CD34+ progenitors. Exp Hematol.***

Considerando nuestro hallazgo de la pronta aparición (en eosinófilos gestantes) y capacidad secretoria de RANTES (en eosinófilos de sangre periférica), nuestra atención en el capítulo III se centra en el efecto del IFN $\gamma$  en la movilización del RANTES eosinofílico almacenado intracelularmente. Dicho capítulo esta dividido en dos partes; en la primera se describen nuestros estudios preliminares tal como fueron publicados en: ***Velazquez, J.R.; Lacy, P.; Mahmudi-Azer, S.; Moqbel, R. Effects of interferon-gamma on mobilization and release of eosinophil-derived RANTES. Int Arch Allergy Immunol 118:447-449, 1999.***

En la segunda parte se estudia más detalladamente dicho fenómeno, acorde al trabajo publicado: ***Paige Lacy, Salahaddin Mahmudi-Azer, Ben Bablitz, Stacey C. Hagen, Juan R. Velazquez, S.F. Paul Man, and Redwan Moqbel. Rapid mobilization of intracellularly stored RANTES in response to interferon- $\gamma$  in human eosinophils. Blood 94:23-32, 1999.***

## Capítulo II

*Juan R. Velázquez, Paige Lacy, Salahaddin Mahmudi-Azer, Ben Bablitz, Craig D. Mine, Juda A. Denberg, and Redwan Moqbel. Cytokine expression and storage in maturing eosinophils derived from human cord blood CD34+ progenitors. Exp Hematol.*

**Expresión y almacenamiento de citocinas en eosinófilos gestantes provenientes de progenitores de sangre de cordón umbilical CD34+.**

### Resumen

Los eosinófilos sintetizan y liberan diferentes mediadores proinflamatorios, entre los que se encuentran diversas citocinas y quimocinas. En este trabajo hipotetizamos que durante la maduración *in vitro* de los eosinófilos ocurre una expresión diferencial de citocinas. Para probar dicha hipótesis examinamos la expresión de RNAm para las citocinas IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, GM-CSF, IFN $\gamma$ , RANTES y eotaxina en células eosinofílicas derivadas de progenitores CD34+ de sangre de cordón umbilical en presencia de IL-3 e IL-5 en dos medios de cultivo diferentes (líquido y semi sólido). Los perfiles de citocinas fueron determinados por RT-PCR en ambos sistemas a los 0, 7, 14, 21, y 28 días de cultivo. La expresión de los productos traducidos junto con la presencia de MBP fue confirmada en las colonias eosinofílicas en medio semi sólido a los 23 días de cultivo utilizando microscopía confocal (MC). Únicamente en células CD34+ no diferenciadas se detectó RNAm de IL-4 y RANTES. Durante el periodo de observación (0 - 28 días) los RNAm para IL-4 y RANTES permanecieron constitutivamente expresados en las colonias, mientras que los RNAm para IL-3, IL-6, GM-CSF, IFN $\gamma$  y eotaxina no fueron detectados. El empleo de RT-PCR *in situ* permitió la localización de transcritos para RANTES en células eosinofílicas a los 21 días

de cultivo en medio semi sólido. Mientras que el empleo de doble tinción y MC en colonias eosinofílicas gestantes de 23 días de cultivo en medio semi sólido puso de manifiesto la inmunoreactividad de IL-4 y RANTES las cuales colocalizaron con la de MBP. Estos resultados demuestran que las células eosinofílicas en gestación son capaces de transcribir y traducir citocinas que participan en el desarrollo de las reacciones alérgicas inflamatorias.

## **Introducción**

Los eosinófilos son prominentes células de la inflamación alérgica y se piensa que juegan algún papel efector en el asma crónico. En biopsias de pulmón y lavados broncoalveolares obtenidos de sujetos asmáticos atópicos crónicos, es típico observar grandes cantidades de eosinófilos tisulares activados y en reposo después del reto con alérgenos apropiados <sup>1</sup>.

La activación de los eosinófilos involucra la liberación de aniones superóxido, mediadores lipídicos y proteínas granulares citotóxicas, incluyendo las cinco bien caracterizadas proteínas cationicas que se almacenan en los gránulos cristaloides únicos: MBP, EPO, EDN, ECP y CLC <sup>1,2</sup>. Recientemente, se ha demostrado que los eosinófilos poseen la capacidad para sintetizar, almacenar y liberar hasta 19 diferentes citocinas y quimocinas. Estos productos en el caso del asma participan en la regulación de las respuestas inflamatorias locales de vías aéreas. Las citocinas eosinofílicas han sido revisadas recientemente <sup>3</sup> e incluyen a IL-2 <sup>4,5</sup>, IL-3 <sup>6</sup>, IL-4 <sup>7</sup>, IL-6 <sup>8,9</sup>, factor estimulante de colonias de macrófagos/granulocitos (GM-CSF) <sup>10,11</sup> y RANTES <sup>12,13</sup>. Aproximadamente la mitad de todas las citocinas eosinofílicas se encuentran almacenadas como mediadores preformados y en asociación con el gránulo cristaloides típico del eosinófilo. Un estudio ha mostrado que los eosinófilos coloniales derivados de células mononucleares purificadas de sangre periférica de individuos atópicos y no atópicos, poseen la capacidad para expresar RNAm y proteína para IL-5 y GM-CSF <sup>14</sup>. No están bien definidos los patrones de expresión de los genes transcritos, ni los productos traducidos de citocinas y quimocinas así como su almacenamiento en los gránulos inmaduros durante el desarrollo hematopoyético de los

eosinófilos nacientes. Algunos estudios han sugerido que los gránulos inmaduros contienen pro-MBP durante el desarrollo eosinofílico y que finalmente ésta se condensa cuando se forman los gránulos cristaloides maduros<sup>15</sup>. Hemos hipotetizado que los eosinófilos que se diferencian *in vitro* expresan genes que codifican citocinas y quimocinas proinflamatorias y que los productos traducidos son posteriormente almacenados en gránulos inmaduros.

Para probar esta hipótesis, utilizamos células CD34+ purificadas de sangre de cordón umbilical humano y las cultivamos en presencia de IL-3 recombinante humano (rIL-3h) e rIL-5h a fin de inducir su diferenciación al fenotipo eosinofílico. Analizamos la expresión de los perfiles de transcritos de quimocinas y citocinas utilizando RT-PCR durante 28 días de incubación en medio semi sólido (metilcelulosa).

Cuando son aisladas las células CD34+ usando separación inmunomagnética (por selección positiva), estas representan una subpoblación bien definida de progenitores capaces de diferenciarse a eosinófilos funcionalmente activos cuando son cultivados en medios semi-sólidos con las citocinas apropiadas<sup>16-20</sup>. A la par de estos estudios, efectuamos cultivos de progenitores en medio líquido, dado que este es un protocolo bien establecido de generación de eosinófilos gestantes *in vitro*<sup>19-21</sup>. Las citocinas en los eosinófilos gestantes fueron determinadas a nivel de transcritos empleando RT-PCR *in situ* mientras que la forma proteica fue detectada y colocalizada con la proteína gránular eosinofílica MBP utilizando marcado doble con anticuerpos (inmunofluorescencia y microscopia confocal (MC)). Nuestros hallazgos contribuyen a elucidar los mecanismos asociados con la regulación de citocinas en la maduración eosinofílica y su contribución en las reacciones inflamatorias tisulares locales.

## **Material y Métodos**

### **Preparación de células CD34+ purificadas**

Se recolectaron muestras de sangre de cordón umbilical inmediatamente después del alumbramiento, se obturó y seccionó el cordón umbilical recolectándose la sangre del extremo materno del mismo yvirtiéndola en tubos heparinizados. Después de diluir la sangre 1:4 con solución amortiguadora de fosfatos (PBS) estéril, se aislaron las células mononucleares por sedimentación en Ficoll-Paque (1.077 mg/ml Pharmacia, Uppsala, Suiza) centrifugando a 400g por 25 minutos. Posteriormente estas células fueron marcadas con microperlas magnéticas acopladas a un anticuerpo monoclonal anti-CD34 (QBEND-10) (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Alemania), seguida de una selección positiva a través de una columna de separación MiniMACS (Miltenyi Biotec). Las células enriquecidas en CD34+ se recuperaron por elución después de remover la columna del campo magnético. El número y la viabilidad se determinaron por tinción con azul tripano. La pureza de las células CD34+ después del procedimiento de purificación fue de aproximadamente 60 - 70% determinada por tinción con anti-CD34 y análisis por selección celular activada por fluorescencia (FACS). Las células CD34+ purificadas fueron procesadas para su cultivo en medios líquidos o semi sólidos. Rutinariamente, después de cada purificación fueron obtenidas entre  $7 \times 10^5$  y  $1.4 \times 10^6$  células CD34+. Utilizamos un protocolo ligeramente modificado de aquellos previamente descritos<sup>14,19,22</sup> para la maduración *in vitro* de células eosinofílicas en medios de cultivo líquidos y semi sólidos. Estos se describen a continuación.

### **Cultivo semi sólido para células CD34+**

Después de la purificación en columna MiniMACS de células CD34+, estas se incubaron ( $6 \times 10^4$ ) en cajas de Petri de 35 mm (Falcon Plastics, Oxnard, CA) con una mezcla de medio Iscove modificado (Gibco BRL Life Technologies, Grand Island, NY),  $\beta$  mercaptoetanol  $4\mu\text{M}$ , penicilina-estreptomicina al 0.8%,  $\text{NaHCO}_3$  15mM, FCS inactivado por calor (Gibco BRL) y metilcelulosa al 0.84% (Stem Cell Technologies, Inc. Vancouver, BC, Canadá). Se indujo la diferenciación de progenitores a células eosinofílicas adicionando 5 ng/ml de rIL-3h y 2 ng/ml de rIL-5h (Genzyme, Cambridge, MA). En nuestras manos, estas concentraciones de citocinas fueron suficientes para la formación de colonias en medio semi sólido. Las células fueron incubadas a  $37^\circ\text{C}$  con 5 - 10% de  $\text{CO}_2$  en condiciones de humedad por no menos de 28 días. La diferenciación de las colonias eosinofílicas en los medios semi sólidos fue verificada diariamente por observación microscópica usando tinción Leukostat® (Fisher Diagnostics, Huntersville, NC). Esta tinción produce gránulos rojo-rosados en las células eosinofílicas, los cuales son distintos de los gránulos azul-púrpura que aparecen en las células metacromáticas. A los 0, 14, 21, 23, y 28 días, las células fueron recoletadas del medio semi sólido y transferidas a medio McCoy 5A (Gibco BRL), lavadas en PBS, contadas y usadas para análisis experimental. El porcentaje de células eosinofílicas fue determinado contando 300 células teñidas con colorante de Kimura<sup>23</sup>, el cual es además capaz de distinguir entre células eosinofílicas y células metacromáticas. Con la tinción de Kimura, los gránulos de las células eosinofíloides

aparecen de color verdoso mientras que aquellos de las células metacromáticas son de color rojo cereza.

#### **Cultivo líquido de células CD34+**

Se cultivaron  $1 \times 10^6$  células CD34+ recién purificadas en 5ml de RPMI-1640 (Bio Whittaker, Walkersville, MD) suplementado con FCS al 10% (Gibco BRL),  $\beta$  mercaptoetanol  $10\mu\text{M}$  y penicilina-estreptomina al 1%. Para inducir la diferenciación de los progenitores hacia células eosinofílicas adicionamos al medio de cultivo 25ng/ml de rIL-3h y 10ng/ml de rIL-5h (Genzyme)<sup>19</sup>. Las células fueron incubadas a 37°C con 5 - 10% de CO<sub>2</sub> en condiciones de humedad. Cada siete días la mitad del volumen de cultivo fue reemplazado con medio fresco con citocinas, este procedimiento se continuó hasta completar 28 días. Cada vez que se renovaba el medio de cultivo se efectuaban cuentas celulares.

#### **Análisis por RT-PCR**

Se extrajo el RNA total de las células cultivadas en medios líquidos y semi sólidos utilizando los equipos Qiagen QIASHredder y RNeasy (Qiagen Inc, Mississauga, ON, Canadá) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se utilizaron  $2 \times 10^6$  células por extracción (obteniendo aproximadamente 1 $\mu\text{g}$  de RNA total). Brevemente, cada muestra de RNA celular total (aprox. 1 $\mu\text{g}$ ) fue incubado con 200 U de Superscript®, solución amortiguadora First Strand 1X y mezcla de dNTPs al 0.5mM (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (Gibco BRL). La mezcla se incubó a 37°C por 2 hrs y se inactivó calentando a 80°C por 10

minutos. Las alicuotas de cDNA fueron usadas en 20µl de solución de PCR que contenía 2.5U de Taq DNA polimerasa, solución amortiguadora de PCR 1X, mezcla de dNTPs 25µM (Gibco BRL) y los iniciadores apropiados sentido (5') y antisentido (3') al 0.3 µM.

Se efectuó un arranque en caliente a 95°C por 3 minutos antes que las muestras fueran sujetas a 35 ciclos de calentamiento de 45 seg. a 95°C, 1 minutos. a la temperatura de alineamiento (T<sub>M</sub>) (dependiendo del par de iniciadores de acuerdo a la tabla 1) y finalmente 30 seg a 72°C en un termociclador (M-J Research, Inc. Watertown, MA, USA y Perkin-Elmer, Mississauga, ON, Canadá). La extensión final se efectuó calentando 7 minutos. a 72°C. Los productos amplificados fueron visualizados por separación electroforética de alíquotas de 10µl en geles de agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio. El gen constitutivo β2 microglobulina fue empleado como control interno.

### **Secuencias de iniciadores**

Estos pares de iniciadores fueron diseñados para cubrir por lo menos un intrón. Las secuencias de nucleótidos de los pares de iniciadores usados en este estudio junto con sus respectivas temperaturas de anillamiento y tamaños de productos esperados se encuentran listados en la tabla 1.

**Tabla 1**

**Pares de iniciadores utilizados en el análisis de RT-PCR**

<b>Citocina</b>	<b>Secuencia del iniciador</b>	<b>T<sub>m</sub></b>	<b>Producto esperado (pb)</b>
IL-2	sentido (5') 5' -GCGAGGCTCAAAGTCGTCTGTTG-3' - anti-sentido (3') 5' -ATGAGCCGCCTGCCCGTCTCG-3'	56°C	449
IL-4	sentido 5'-ACGTACTCTGGTTGGCTTGGTTCACAGGACAG-3' anti-sentido 5'-CGGCAACTTTGACCACGGAACACAAGTGCGATA-3'	65°C	344
IL-5	sentido 5'-TGGCCGTC AATGTATTTCTTTATTAAG-3' anti-sentido 5'-GCTTCTGCATTTGAGTTTGCTAGCTT-3'	56°C	294
IL-6	sentido 5'-TGGACTGCAGGAACCTCCTT-3' anti-sentido 5'-AACTCCTTCTCCACAAGCG-3'	52°C	260
GM-CSF	sentido 5'-CTGGCTCCCAGCAGTCAAAGGG-3' anti-sentido 5'-ATGTGGCTGCAGAGCCTGCTGC-3'	60°C	424
IFN $\gamma$	sentido 5'-CTCCTTTTTCGCTTCCCTGTTTTAGCTGCTGG-3' anti-sentido 5'-GCATCGTTTTGGGTTCTCTTGGCTGTTACTGC-3'	65°C	427
Eotaxina	sentido 5'-CTCACGCCAAAGCTCACACCTTCA-3' anti-sentido 5'-GGCAACTCAGGCTCTGGTTTGG-3'	59°C	370
RANTES	sentido 5'-TCCCCATA TTCCTCGGAC-3' anti-sentido 5'-GATGTACTCCCGAACCCA-3'	51°C	186

## **RT-PCR in situ para el RNAm de RANTES**

Las células de medios semi-sólidos después de 21 días de cultivo, se lavaron dos veces con solución salina tratada con dietil-pirocarbonato (DEPC) y se centrifugaron antes de ajustarse a una concentración de  $1 \times 10^6$  células/ml. Para permitir la comparación entre muestra, control positivo y control negativo, tres gotas de esta suspensión celular (40,000 células/por muestra) fueron aplicadas sobre porta objetos recubiertos con aminoalquisilano GENEamp 1000 (Perkin-Elmer). Las laminillas se fijaron en paraformaldehído al 4% durante 20 minutos. y se lavaron exhaustivamente en agua tratada con DEPC antes de ser secadas con aire y almacenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Las laminillas fueron posteriormente permeabilizadas con  $2 \mu\text{g/ml}$  de proteinasa K (Sigma Oakville, ON, Canadá) por 10 minutos. El control negativo y la muestra fueron incubados a  $37^{\circ}\text{C}$  con DNasa (Boehringer Mannheim Canadá, Laval, PQ, Canadá) en solución amortiguadora conteniendo acetato de sodio 0.1 M y  $\text{Mg}_2\text{SO}_4$  5 mM. La formación de la hebra complementaria de DNA se efectuó en la muestra adicionando 50  $\mu\text{l}$  de un reactivo que contenía solución amortiguadora First Strand 1X, mezcla de dNTPs al 1 mM, 25 U de inhibidor de RNasa, 500U de Superscript  $\text{\textcircled{R}}$  (Gibco BRL) e iniciador específico 3' al 1  $\mu\text{M}$ . El control positivo no fue tratado con DNasa o transcriptasa reversa para permitir la detección de DNA genómico, en tanto el control negativo no fue tratado con transcriptasa reversa. Se incluyeron dos controles adicionales para eliminar la posibilidad de un alto fondo que pudiese ser interpretado como señal positiva en la muestra, uno incluyó una laminilla tratada con solución de RNasa (Amersham Life Sciences, Cleveland, OH) y el otro el

empleo de un iniciador de secuencia irrelevante. Las laminillas fueron selladas e incubadas a 37°C por 3 hrs en un GENEamp 1000 (Perkin-Elmer). La reacción de PCR se efectuó en todas las muestras adicionando 18U de Taq Polimerasa (Gibco BRL) en 50 µl de volumen total de reacción que contenía además solución amortiguadora de PCR IX, MgCl<sub>2</sub> 4 mM, 200 µM de mezcla de dNTPs (con digoxigenina-11 deoxiuridin trifosfato substituido de dUTP) y 0.8 µM de cada iniciador específico 3' y 5' para el RNAm de RANTES. El PCR se efectuó con una desnaturalización inicial de 3 minutos a 95°C seguida de 35 ciclos de calentamiento de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 51°C, 1 minuto 30 seg a 72°C. Se llevó a cabo una extensión final de 10 minutos a 72°C antes de almacenar a 4°C. Los segmentos de DNA marcados con digoxigenina fueron detectados usando conjugado azul de tetrazolio / Bromo-cloro-indol-fosfato (NBT/BCIP) y anticuerpos anti-digoxigenina de acuerdo a las recomendaciones del fabricante (Boehringer Mannheim). Las células totales y teñidas fueron enumeradas contando 500 células por laminilla con un microscopio de luz convencional. Se incluyó la secuencia del iniciador 3' para la β2microglobulina como un control interno.

### **Tinción doble y microscopía confocal**

Los citocentrifugados obtenidos del día 23 de los cultivos semi sólidos (100 µl de 0.5 x 10<sup>6</sup> células/ml en RPMI suplementado con FCS al 20%) fueron preparados como ya ha sido descrito <sup>13</sup>. A fin de marcar las citocinas intracelulares, las laminillas fueron incubadas 1hr con solución amortiguadora de Tris (TBS) conteniendo 5 µg/ml de anticuerpo monoclonal anti-RANTES o anti-IL-4 humana (R&D Systems). La unión del anticuerpo primario fue

detectada con 20  $\mu\text{g/ml}$  de Bodipyl FL anti-ratón (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) antes del bloqueo y adición de anticuerpo anti-MBP humana, de acuerdo a la optimización hecha en nuestro laboratorio <sup>13,24</sup>. La IgG1 de ratón (5  $\mu\text{g/ml}$ ) fue usada como un control isotípico (R&D Systems). Las laminillas se examinaron usando el objetivo 100X de un microscopio confocal Leica (CLSM; Heidelberg, Alemania) como ha sido descrito previamente <sup>8,13,24</sup>.

### **Microscopía electrónica de transmisión**

Este procedimiento fue una modificación de una técnica previamente descrita <sup>7,11</sup>. Brevemente, las colonias empaquetadas de células provenientes del día 21 de cultivo semi-sólido fueron fijadas 2 hrs en formaldehído recién preparado (2% en solución amortiguadora de fosfatos, 0.1M, pH 7.2) y embebidas en resina Lowicryl K4M. Después de la polimerización de la resina, se cortaron secciones de plata como se ha descrito <sup>11</sup> y se recogieron en gradillas de barra delgada de níquel.

### **Análisis estadístico**

Las estadísticas resumidas están expresadas como media y error estándar.

Las comparaciones estadísticas se efectuaron utilizando análisis de varianza de una cola Kruskal-Wallis. Los resultados fueron considerados significativos cuando  $p < 0.005$

## **Resultados**

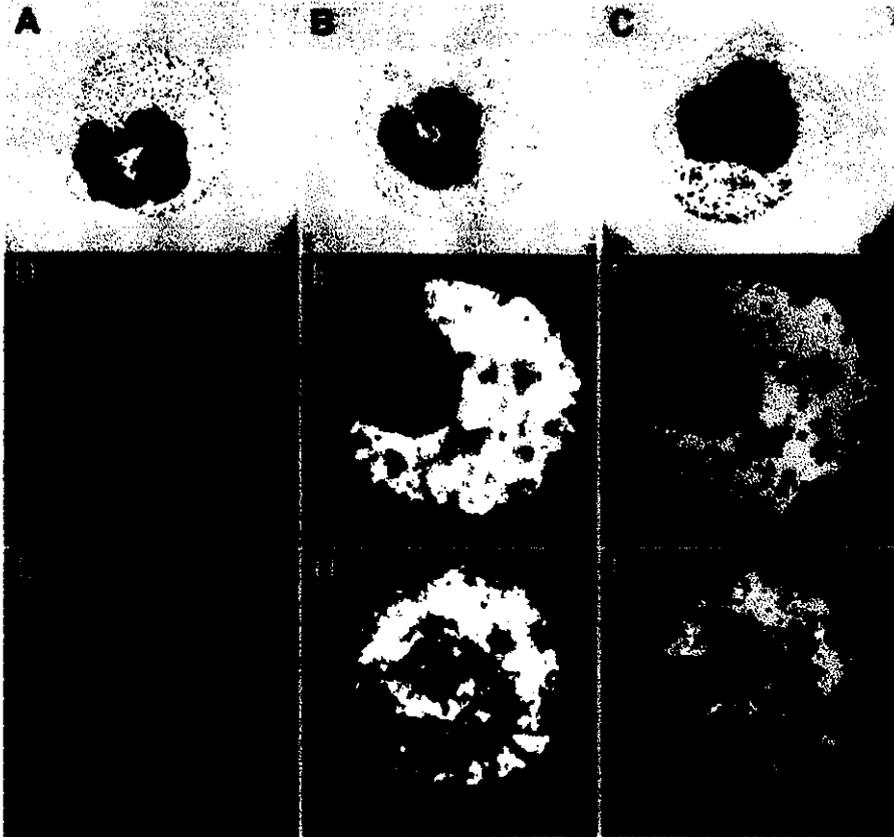
### **Cultivos de células CD34+ en presencia de rIL-3h e rIL-5h**

Después de la purificación de células CD34+ el crecimiento colonial en medio semi sólido se propició adicionado 5 ng/ml de rIL-3h y 2 ng/ml de rIL-5h (inductores de diferenciación eosinofílica). Las colonias de eosinófilos se seleccionaron basándose en su morfología y se separaron estas de las colonias difusas de macrófagos contaminantes. El crecimiento celular fue monitoreado semanalmente. La aparición de células eosinofiloideas en las colonias se caracterizó por la aparición de gránulos rojo-rosados y núcleos unilobulados al teñir con Leukostat (designados como células eosinofílicas “inmaduras”). Estas se distinguieron de las células que exhibían el mismo patrón granular de tinción con núcleos biobulados estructuralmente distintos (designados como células eosinofílicas “maduras”) (Fig.1). La viabilidad celular (determinada por azul tripano) fue siempre >95% durante el periodo de incubación, sugiriendo que la aparición de núcleos bilobulados no fue debido a senescencia (dato no mostrado). La identificación de cada tipo celular fue confirmada por tinción de Kimura. Como se observa en la figura 2, basados en la tinción histoquímica las células purificadas CD34+ no mostraron características eosinofílicas al día 0. Fuimos forzados a omitir en este estudio las células en medio semi sólido del día 7 debido al número insuficiente de colonias en ese periodo. Basándose en el criterio descrito anteriormente, después de 14 días de cultivo  $57 \pm 5\%$  de las células coloniales fueron clasificadas como eosinofílicas (suma de eosinófilos maduros e inmanudros) (Fig. 2). El número de células eosinofiloideas en las colonias aumento a un máximo de  $91 \pm 8\%$  al día 28 de cultivo, del

cual  $67 \pm 4\%$  poseían muchas de las características morfológicas de los eosinófilos maduros de sangre periférica (núcleos bilobulados y numerosos gránulos cristaloides rojorosados). Las células contaminantes fueron basofílicas en apariencia, sin colonias de neutrófilos después de 28 días de cultivo. Los cultivos semi sólidos produjeron un aumento de 17 veces el número celular al día 28 (potencialmente produciendo  $6.4 \times 10^6$  células), de las cuales  $91 \pm 8\%$  fueron eosinófilos.

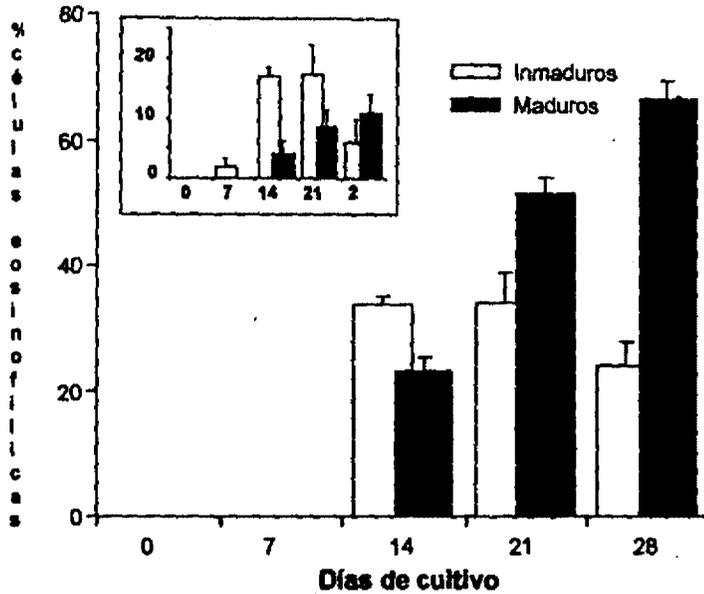
Las células purificadas CD34+ también fueron inducidas a diferenciarse hacia eosinófilos empleando cultivos líquidos adicionados con 25 ng/ml de rIL-3h y 10 ng/ml de rIL-5h<sup>19</sup> por periodos no mayores a 28 días. Se registraron los números de células cada semana, usando el mismo procedimiento de tinción para cultivos semi sólidos que se ha descrito líneas arriba. Las primeras células eosinofíloides aparecieron en cultivos líquidos al día 7, aunque su número no fue significativo hasta el día 14 de cultivo (Fig. 2 inserto). Al día 21 el número total de células eosinofíloides en cultivos líquidos alcanzó un pico de  $26 \pm 8\%$ . Al día 28, el mayor porcentaje de células eosinofílicas en medio líquido fue de  $17 \pm 7\%$ . Los tipos celulares remanentes poseían características morfológicas de monocitos o neutrófilos. Los medios de cultivo líquidos generaron un aumento de  $321 \pm 48$  veces el número de células al día 28 (potencialmente produciendo  $2.9 \times 10^8$  células). Estas cifras representan porcentajes de tres experimentos.

Figura 1



Características morfológicas de las células eosinofílicas generadas en cultivo semi sólido. (A-C) Ejemplos de células representativas de medio semi sólido teñidas con Leukostat a los (A) 14, (B) 21 y (C) 28 días. (D-I) Microscopía confocal de células eosinofílicas inmunofluorescentes a los 23 días de cultivo en medio semi sólido. (D) Las células eosinofíloides marcadas con BODIPYL FL (verde) indican inmunoreactividad de RANTES, (E) TRITC (rojo) corresponden a la MBP, (F) imágenes combinadas de la misma célula. El color amarillo en las imágenes combinadas indican colocalización de fluorescencia roja y verde. (G) Otra célula al día 23 de cultivo es mostrada con marca de BODIPYL FL indicando inmunoreactividad para IL-4. (H) TRITC para inmunofluorescencia de MBP e (I) imagen combinada resultante. Amplificación original 100X

Figura 2



Porcentajes de las células eosinofílicas obtenidas en cultivos semi sólidos. Las células eosinofílicas maduras e inmaduras fueron contadas y caracterizadas por sus propiedades de tinción y morfología empleando Leukostat a los 28 días de cultivo. El inserto muestra los datos obtenidos en medios de cultivo líquidos. Los datos mostrados representan el promedio de tres experimentos por cada medio de cultivo, las barras indican el Error Estandar (EE).

### **Análisis de los transcritos codificantes de citocinas empleando RT-PCR**

La aparición de transcritos para citocinas (IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IFN $\gamma$ , y GM-CSF) y quimocinas (eotaxina y RANTES) en células eosinofílicas en desarrollo fue monitoreada por análisis de RT-PCR cada 7 días a partir del inicio del cultivo y hasta el día 28. El producto de PCR de cada citocina proveniente de los cultivos líquidos y semi sólidos fue analizado midiendo las densidades ópticas en geles y normalizándolas con la del gen constitutivo  $\beta$ 2 microglobulina (Figura 3).

En el día de cultivo 0, únicamente los productos de PCR del RNAm que codifica para IL-4 y RANTES aparecieron constitutivamente expresados en células CD34+ recién aisladas.

Los transcritos para IL-4 y RANTES continuaron siendo expresados en células en maduración hasta el final del cultivo (día 28). Las células provenientes de cultivos semi sólidos expresaron progresivamente menos transcrito para RANTES relativo a aquel del día 0, alcanzando la mayor significancia al día 28 de cultivo ( $p < 0.01$  usando análisis de varianza Kruskal-Wallis de una cola).

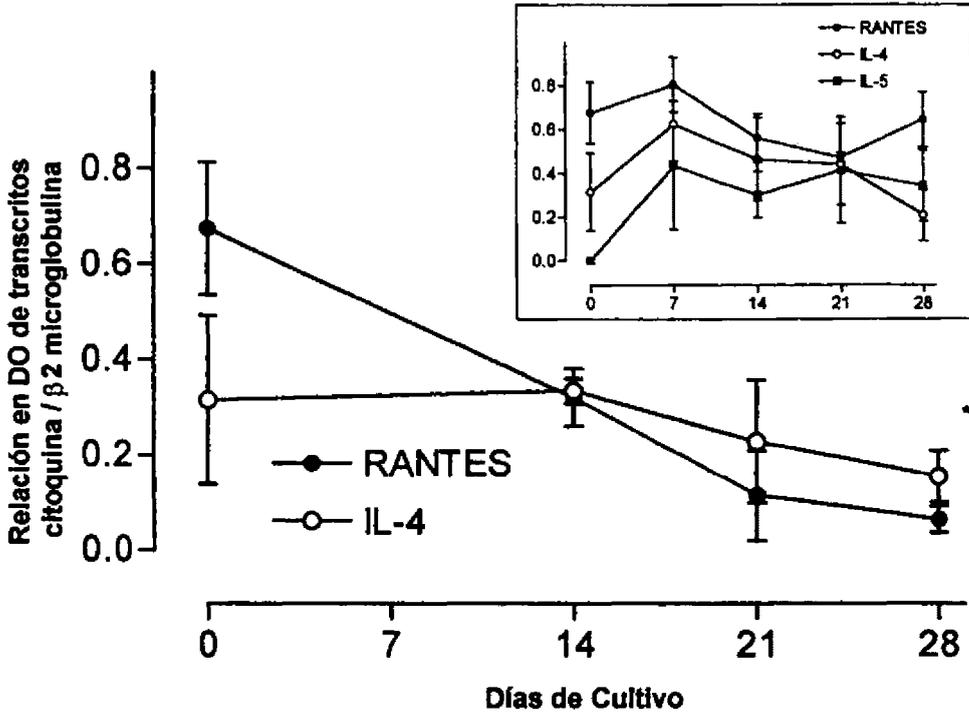
De igual manera, la expresión de RNAm de IL-4 permaneció consistente durante todo el periodo de incubación. Los resultados representativos del análisis de RT-PCR de células en cultivos semi sólidos son mostrados en la Fig. 4. Contrariamente a la IL-4 y RANTES, las células eosinofílicas no expresaron cantidades detectables de RNAm para IL-3, IL-5, IL-6, IFN $\gamma$ , GM-CSF o eotaxina en cualquier estadio de su desarrollo *in vitro*.

La expresión de RNAm para IL-5 fue inducida en células en desarrollo obtenidas de cultivos líquidos al día 7 y continuó siendo detectada hasta el día 28 de cultivo (Fig. 3 y 4).

En contraste, las células de colonias de cultivo semi sólido no expresaron RNAm para IL-5

en cualquier período de incubación probado en estos experimentos. De igual forma a nuestros hallazgos en colonias de cultivo semi sólido, los transcritos para IL-3, IL-6, IFN $\gamma$ , GM-CSF y eotaxina no se pudieron detectar en células de cultivos líquidos en un periodo de 28 días.

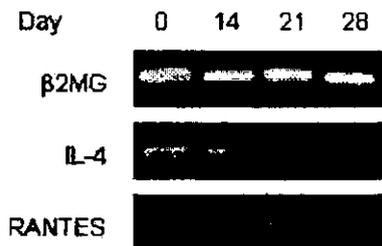
Figura 3



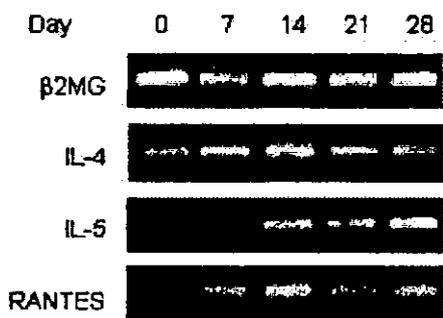
Determinaciones semicuantitativas de los transcritos de citoquinas en eosinófilos en desarrollo. Los valores de densidades ópticas de los productos de PCR para las diferentes citoquinas y la  $\beta 2$  microglobulina fueron trazados en función del tiempo en los cultivos semi sólidos. El inserto muestra los resultados obtenidos con células en medio líquido. Estos datos representan la media de tres experimentos bajo cada condición de cultivo. \*representa  $p < 0.05$

Figura 4

**A Semi-solid cultures**



**B Liquid cultures**



Resultado representativo de RT-PCR mostrando los productos de PCR obtenidos de las citoquinas expresadas en eosinófilos en maduración. Los productos de PCR indican la expresión de RNAm para las citoquinas en (A) medio semi sólido y (B) medio líquido.

La expresión de los transcritos de RANTES fue casi exclusivamente localizada en células eosinofílicas generadas en cultivos semi sólidos, de acuerdo a los resultados obtenidos con RT-PCR *in situ* en células de 21 días de cultivo (Fig. 5).

Todas las células con RNAm positivo para RANTES fueron identificadas como eosinófilos basófilos en sus características morfológicas y de tinción, siendo más del 95% de ellas positivas para RNAm de RANTES.

### **Expresión proteica de citocinas en células de colonias provenientes de cultivos semi-sólidos**

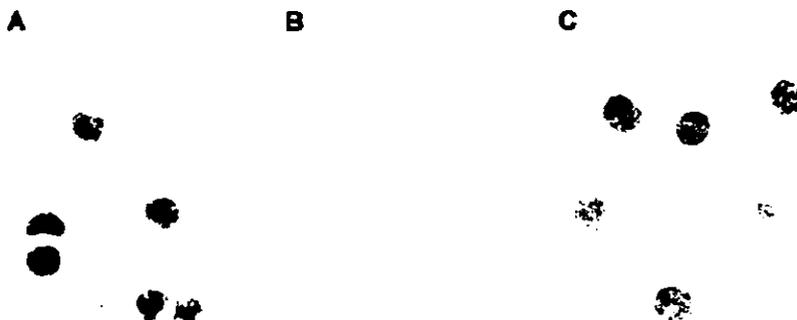
Para confirmar que las células eosinofílicas generadas *in vitro* eran capaces de expresar proteínas citoquímicas, se prepararon citocentrifugados de células producidas en el día 23 de cultivo en medio semi sólido y empleando inmunofluorescencia se procedió a detectar las citocinas almacenadas intracelularmente. Como se puede observar en la Fig. 1D-I, las células eosinofílicas en medio semi sólido al día 23 coexpresan MBP y RANTES así como IL-4. Más del 95% de todas las células MBP+ fueron también positivas para RANTES e IL-4. Mas aún, no se detectaron células con inmunoreactividad para RANTES e IL-4 en ausencia de inmunofluorescencia específica para MBP. La inmunofluorescencia para las citocinas fue granular en apariencia, sugiriendo almacenamiento en los gránulos cristaloides inmaduros. Mucha de la inmunoreactividad para IL-4 y RANTES colocaliza con la de MBP indicada en color amarillo en la Fig. 1F e I (como resultado de la coincidencia de fluorescencia roja y verde).

En otras células obtenidas al día 23 en cultivo semi sólido, la inmunoreactividad para IL-4 se localizó en gránulos de forma diferente a la MBP. Como se observa en la fig. 11, algo de la inmunoreactividad de MBP se detectó en los centros de estructuras granulares mientras que la IL-4 se asoció con la periferia de estas estructuras.

Después de examinar la ultraestructura de las células al día 23 de cultivo en medio semi sólido por microscopía electrónica (Fig. 6), fue posible observar estructuras granulares. Estas estructuras citoplásmicas probablemente sean gránulos cristaloides inmaduros con centros electrolucidos en contraste con los gránulos cristaloides maduros que presentan centros electrodensos.

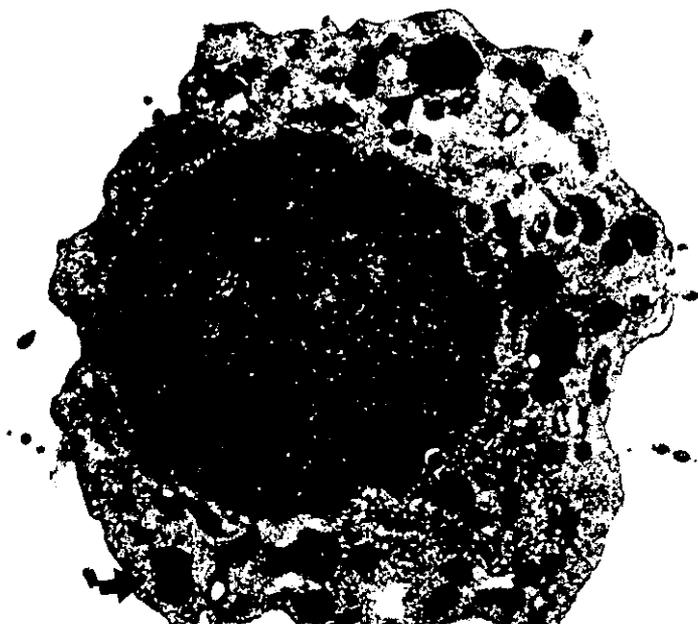
**ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

Figura 5



Análisis por RT-PCR *in situ* de la expresión de RNAm de RANTES en eosinófilos en maduración al día 21 de cultivo en medio semi-sólido. (A) Control positivo mostrando expresión de DNA genómico, detectado en el núcleo celular usando iniciador específico de RANTES en ausencia de transcriptasa reversa. (B) Control negativo en el cual la producción del producto de PCR fue inhibida mediante pre incubación con DNasa y omisión de transcriptasa reversa. (C) Muestra problema en la cual se incubó DNasa antes de ejecutar la transcriptasa reversa para permitir la detección de RNAm de RANTES en las regiones perinucleares y citoplásmicas de las células.

Figura 6



Microscopía electrónica de transmisión de una célula eosinofílica obtenida después de 23 días de cultivo en medio semi sólido. Las flechas indican gránulos cristaloides electrolúcidos. Amplificación original 9100 X

## Discusión

Demostramos que los eosinófilos, al menos *in vitro*, son capaces de transcribir y traducir citocinas en periodos tempranos de su maduración y desarrollo. Hemos empleado diferentes sistemas de cultivo *in vitro* para investigar los perfiles de expresión de citocinas en los eosinófilos en desarrollo. Elegimos usar células CD34+ de cordón umbilical como fuente de progenitores celulares tempranos en nuestros estudios debido a que están bien caracterizadas y son relativamente fáciles de obtener en gran número si las comparamos con las células germinales derivadas de médula ósea. Aunque las células indiferenciadas CD34+ provenientes de sangre de cordón umbilical son fenotípicamente distintas de aquellas de médula ósea <sup>25</sup>, las células CD34+ de sangre de cordón umbilical exhiben la capacidad para diferenciarse a eosinófilos después de una estimulación apropiada (IL-3 e IL-5) <sup>13,17-20</sup>. Así, estas células CD34+ proveen un sistema ideal para investigar la expresión de citocinas en eosinófilos en maduración.

Se sabe que las citocinas IL-3, IL-5 y GM-CSF son críticas en la inducción de células CD34+ no diferenciados hacia células de linaje eosinofílico <sup>18,19</sup>. La salida de estas células de la médula ósea es crítica y depende de la presencia de eotaxina, como lo han mostrado algunos estudios en cobayos <sup>26</sup>. Dado que los eosinófilos poseen la capacidad de expresar estas citocinas inmunoreguladoras, fue nuestro deseo determinar si éstas eran expresadas en células eosinofílicas en diferentes estadios de diferenciación *in vitro*. Estábamos además interesados en estudiar los patrones de almacenamiento de los productos traducidos de las citocinas en eosinófilos en desarrollo.

Nuestras observaciones mostraron que las células progenitoras CD34+ constitutivamente expresan RNAm para RANTES e IL-4. Los transcritos de estas dos proteínas se expresaron durante los 28 días de cultivo en medios líquidos o semi sólidos en presencia de rIL-3h e rIL-5h como inductores de diferenciación eosinofílica. La expresión de RNAm específico y de la forma proteica de RANTES fue exclusivamente localizada en células eosinofílicas a los 21 - 23 días de cultivo en medio semi sólido, como lo mostró la técnica de RT-PCR *in situ* e inmunofluorescencia respectivamente. Basándose en propiedades morfológicas y de tinción, las células RNAm+ para RANTES mostraron características eosinofílicas. Las células de colonias con expresión proteica de RANTES mostraron también inmunoreactividad para MBP en los cultivos de 23 días. Al día 28 en cultivo semi sólido, la detección de RNAm para RANTES declinó a niveles mínimos, como se ha definido por su bajo nivel de expresión en eosinófilos de sangre periférica humana (Velázquez, observaciones no publicadas). Esta tendencia descendente en la expresión de RANTES sugiere que las células coloniales pueden diferenciarse progresivamente a un fenotipo similar al del eosinófilo maduro de sangre periférica. El papel de la expresión de RANTES en estos cultivos podría estar asociado con los mecanismos de señalización autocrina que controlan el aumento de la maduración y flujo de eosinófilos. Sin embargo, esta posibilidad es especulativa ya que hay pocas evidencias publicadas sobre la expresión de RANTES por progenitores y por eosinófilos en diferenciación.

El RNAm de IL-4 se expresa constitutivamente por progenitores CD34+. La inmunoreactividad de la proteína IL-4 se detectó predominantemente en células MBP+ a los 23 días de cultivo, sugiriendo que los eosinófilos pueden ser uno de los principales tipos

celulares que expresan IL-4 en las poblaciones de células hematopoyéticas. Aunque el papel de la IL-4 en la proliferación y diferenciación de progenitores no ha sido plenamente caracterizado, es tentador sugerir que la expresión autocrina de IL-4 puede participar en el aumento de la respuesta proliferativa hacia IL-3 e IL-5, dado que, *in vitro*, la IL-4 ha mostrado favorecer la diferenciación de células precursoras hacia eosinófilos y basófilos <sup>27</sup>.

Hay evidencia contrastante que sugiere que la IL-4 pudiera suprimir la diferenciación eosinofílica (en células mononucleares de sangre de cordón umbilical) inducida por IL-3 e IL-5 <sup>28</sup>. El efecto de la IL-4 en la regulación de la diferenciación eosinofílica requiere de más estudios antes de que pueda hacerse alguna conclusión sobre estos hallazgos.

Únicamente en medios líquidos al día 7 de cultivo fue posible observar la inducción de la expresión de RNAm para IL-5 en células en desarrollo. Sin embargo, la proporción de células eosinofíloides en estos cultivos fue mucho menor que aquella obtenida en medio semi sólido, sugiriendo que los tipos celulares que expresan RNAm de IL-5 pueden ser distintos al de los eosinófilos. Esto fue particularmente evidente en cultivos con medios líquidos al día 7, en el cual un número insignificante de células fueron clasificadas como eosinófilos en base a la tinción con Leukostat y análisis morfológico. Ninguna de las células eosinofílicas obtenidas del medio semi sólido exhibió expresión detectable de RNAm para IL-5. Esto contrasta con un reporte reciente que muestra células eosinofílicas en desarrollo, generadas en cultivo a partir de células mononucleares de sangre periférica obtenida de donadores atópicos, las cuales expresan proteína y RNAm específico par IL-5 (y GM-CSF) después del reto alérgico <sup>14</sup>.

Por otro lado, en las células eosinofílicas en cultivo no se detectó la expresión de las citoquinas IL-3, IL-6, IFN $\gamma$ , GM-CSF y eotaxina no obstante estar presentes en eosinófilos maduros. Las razones de esta aparente carencia de citocinas en células CD34+ derivadas de sangre de cordón umbilical son probablemente complejas. En nuestro estudio la explicación más probable de la carencia de RNAm para IL-5 y GM-CSF es que los eosinófilos cultivados fueron derivados de células germinales CD34+ de sangre de cordón umbilical, las cuales son generalmente menos diferenciadas que aquellas encontradas en la sangre periférica. El estudio que mostró la expresión de RNAm para IL-5 y GM-CSF en células eosinofílicas se basó en el uso de poblaciones de células mononucleares más diferenciadas y heterogéneas de sangre periférica <sup>14</sup>. Más aún, la diferenciación eosinofílica fue adicionalmente estimulada por la presencia de GM-CSF <sup>14</sup>. Una desventaja de los sistemas de cultivo *in vitro* es que involucran una estimulación continua con concentraciones relativamente grandes de citocinas que son activadoras de los eosinófilos a las dosis empleadas y que probablemente difieran substancialmente de aquellas concentraciones presentes durante la maduración eosinofílica *in vivo* (médula ósea). Finalmente estos sistemas están limitados en su capacidad para generar eosinófilos completamente diferenciados. De hecho, fue difícil mantener células en cultivo completamente diferenciadas (aquellas obtenidas a los 28 días). El último estadio fue frágil y parcialmente desgranulado, presumiblemente debido a una constante exposición y activación con IL-3 e rIL-5h.

Un corolario interesante a nuestro hallazgo de la carencia de RNAm para algunas citocinas (IL-3, IL-5, GM-CSF y eotaxina) es que estas citocinas pueden ser generadas por otras

células hematopoyéticas tisulares. En nuestras manos, encontramos que las condiciones de los cultivos semi sólidos usando metilcelulosa favorecen la generación de células comprometidas al linaje eosinofílico, aunque el rendimiento de células fue mucho menor si lo comparamos con los cultivos líquidos.

La presencia de grandes gránulos conteniendo centros electrolúcidos, observados en los cortes de microscopía electrónica de eosinófilos en cultivo semi sólido al día 23, correlaciona con hallazgos anteriores de este tipo de estructuras dentro de los eosinófilos madurando en cultivo<sup>29</sup>. Estas estructuras pueden ser similares a los “gránulos cristaloides inmaduros” los cuales no han condensado MBP dentro de los núcleos de los gránulos cristaloides característicos de los eosinófilos maduros de sangre periférica<sup>19,30</sup>. Nuestras observaciones sugieren que la MBP colocaliza con la IL-4 y RANTES en los gránulos inmaduros. La localización intragranular de la IL-4 y MBP fue morfológicamente distinta en células más inmaduras recuperadas al día 23 de cultivo, sugiriendo que la condensación de MBP había comenzado en los núcleos de los gránulos inmaduros, los eosinófilos en desarrollo han mostrado ser capaces de almacenar predominantemente la forma inmadura de la MBP (pro MBP) dentro de sus gránulos<sup>15</sup>. Una ulterior implicación de nuestros hallazgos es que el anticuerpo anti MBP (BMK-13) es capaz de reconocer la pro-MBP, dado que se detecta muy poca MBP “madura” en los eosinófilos en desarrollo hasta que el núcleo cristalino del gránulo es formado<sup>15</sup>. En un estudio previo la pro-MBP se muestra en forma de anillo en la periferia de los gránulos en condensación<sup>15</sup>, de manera similar a lo observado en nuestras imágenes de microscopía confocal. Así parece ser que mientras la pro-MBP es condensada progresivamente hacia el centro de los gránulos en maduración

para formar una miga rica en MBP, el RANTES y la IL-4 parecen permanecer en la periferia de los gránulos para asociarse finalmente en la matriz de los gránulos cristaloides maduros.

Nuestros hallazgos son una novedosa evidencia de la expresión de genes que codifican citocinas y quimocinas inmunoregulatorias en el desarrollo de los eosinófilos, así como su patrón de almacenamiento durante la maduración y diferenciación de estas células. Este estudio además amplía nuestra visión de la historia natural del eosinófilo, particularmente en lo que concierne a la expresión de quimocinas y citocinas. Tales indicios podrían contribuir a aumentar nuestro entendimiento en la serie de eventos asociados con la acumulación y eventual activación de los eosinófilos en los sitios inflamatorios.

## Referenias

1. Wardlaw, A. J., R. Moqbel, and A. B. Kay. 1995. Eosinophils: biology and role in disease. *Adv.Immunol.* 60:151-266.
2. Gleich, G. J., C. R. Adolphson, and K. M. Leiferman. 1993. The biology of the eosinophilic leukocyte. *Annu.Rev.Med.* 44:85-101.
3. Lacy, P. and R. Moqbel. 1997. Eokines: synthesis, storage and release from human eosinophils. *Mem.Inst.Oswaldo Cruz* 92 Suppl 2:125-133.
4. Levi-Schaffer, F., J. Barkans, T. M. Newman, S. Ying, M. Wakelin, R. Hohenstein, V. Barak, P. Lacy, A. B. Kay, and R. Moqbel. 1996. Identification of interleukin-2 in human peripheral blood eosinophils. *Immunology* 87:155-161.
5. Bosse, M., M. Audette, C. Ferland, G. Pelletier, H. W. Chu, A. Dakhama, S. Lavigne, L. P. Boulet, and M. Laviolette. 1996. Gene expression of interleukin-2 in purified human peripheral blood eosinophils. *Immunology* 87:149-154.
6. Kita, H., T. Ohnishi, Y. Okubo, D. Weiler, J. S. Abrams, and G. J. Gleich. 1991. Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and interleukin 3 release from human peripheral blood eosinophils and neutrophils. *J.Exp.Med.* 174:745-748.
7. Moqbel, R., S. Ying, J. Barkans, T. M. Newman, P. Kimmitt, M. Wakelin, L. Taborda-Barata, Q. Meng, C. J. Corrigan, and S. R. Durham. 1995. Identification of messenger RNA for IL-4 in human eosinophils with granule localization and release of the translated product. *J.Immunol.* 155:4939-4947.
8. Lacy, P., F. Levi-Schaffer, S. Mahmudi-Azer, B. Bablitz, S. C. Hagen, J. Velazquez, A. B. Kay, and R. Moqbel. 1998. Intracellular localization of interleukin-6 in eosinophils from atopic asthmatics and effects of interferon gamma. *Blood* 91:2508-2516.
9. Hamid, Q., J. Barkans, Q. Meng, S. Ying, J. S. Abrams, A. B. Kay, and R. Moqbel. 1992. Human eosinophils synthesize and secrete interleukin-6, in vitro. *Blood* 80:1496-1501.
10. Moqbel, R., Q. Hamid, S. Ying, J. Barkans, A. Hartnell, A. Tscopoulos, A. J. Wardlaw, and A. B. Kay. 1991. Expression of mRNA and immunoreactivity for the granulocyte/macrophage colony-stimulating factor in activated human eosinophils. *J.Exp.Med.* 174:749-752.
11. Levi-Schaffer, F., P. Lacy, N. J. Severs, T. M. Newman, J. North, B. Gomperts, A. B. Kay, and R. Moqbel. 1995. Association of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor with the crystalloid granules of human eosinophils. *Blood* 85:2579-2586.
12. Ying, S., Q. Meng, L. Taborda-Barata, C. J. Corrigan, J. Barkans, B. Assoufi, R. Moqbel, S. R. Durham, and A. B. Kay. 1996. Human eosinophils express messenger RNA encoding

- RANTES and store and release biologically active RANTES protein. *Eur.J.Immunol.* 26:70-76.
13. Lacy, P., S. Mahmudi-Azer, B. Bablitz, S. C. Hagen, J. R. Velazquez, P. Man, and R. Moqbel. 1999. Rapid mobilization of intracellularly stored RANTES in response to Interferon gamma in human eosinophils. *Blood* 94:23-32.
  14. Gauvreau, G. M., P. M. O'Byrne, R. Moqbel, J. Velazquez, R. M. Watson, K. J. Howie, and J. A. Denburg. 1998. Enhanced expression of GM-CSF in differentiating eosinophils of atopic and atopic asthmatic subjects. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 19:55-62.
  15. Popken-Harris, P., J. Checkel, D. Loegering, B. Madden, M. Springett, G. Kephart, and G. J. Gleich. 1998. Regulation and processing of a precursor form of eosinophil granule major basic protein (ProMBP) in differentiating eosinophils. *Blood* 92:623-631.
  16. Saeland, S., C. Caux, J. Favre, P. Aubry, M. Mannoni, O. Pebusque, T. Gentilhomme, T. Otsuka, T. Yokota, and N. Arai. 1988. Effects of recombinant human interleukin-3 on CD34+-enriched normal hematopoietic progenitors and on myeloblastic leukemia cells. *Blood* 72:1580.
  17. Saito, H., K. Hatake, A. M. Dvorak, K. M. Leiferman, A. D. Donnenberg, N. Arai, K. Ishizaka, and T. Ishizaka. 1988. Selective differentiation and proliferation of hematopoietic cells induced by recombinant human interleukins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85:2288-2292.
  18. Walsh, G. M., A. Hartnell, R. Moqbel, O. Cromwell, L. Nagy, B. Bradley, T. Furitsu, T. Ishizaka, and A. B. Kay. 1990. Receptor expression and functional status of cultured human eosinophils derived from umbilical cord blood mononuclear cells. *Blood* 76:105-111.
  19. Shalit, M., S. Sekhsaria, and H. L. Malech. 1995. Modulation of growth and differentiation of eosinophils from human peripheral blood CD34+ cells by IL5 and other growth factors. *Cell Immunol.* 160:50-57.
  20. Zardini, D. M., P. Heuschling, A. Gallois, J. L. Bueb, and E. J. Tschirhart. 1997. Human umbilical cord blood-derived eosinophils cultured in the presence of IL-3 and IL-5 respond to fMLP with [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> variation and O<sub>2</sub>- production. *J.Immunol.Methods* 205:1-9.
  21. Shalit, M., S. Sekhsaria, S. Mauhorter, S. Mahanti, and H. L. Malech. 1996. Early commitment to the eosinophil lineage by cultured human peripheral blood CD34+ cells: messenger RNA analysis. *J.Allergy Clin.Immunol.* 98:344-354.
  22. Sehmi, R., P. O'Byrne, D. Sutherland, W. Schroagge, O'Byr, and J. Denburg. 1996. Increased levels of CD34+ hemopoietic progenitor cells in atopic subjects. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 15:645.
  23. Kimura, I., Y. Moritani, and Y. Tanizaki. 1973. Basophils in bronchial asthma with reference to reagin-type allergy. *Clin.Allergy* 3:195-202.

24. Mahmudi-Azer, S., P. Lacy, B. Bablitz, and R. Moqbel. 1998. Inhibition of nonspecific binding of fluorescent-labelled antibodies to human eosinophils. *J.Immunol.Methods* 217:113-119.
25. Saeland, S., V. Duvert, C. Caux, D. Pandrau, C. Favre, A. Valle, I. Durand, P. Charbord, J. de Vries, and J. Banchereau. 1992. Distribution of surface-membrane molecules on bone marrow and cord blood CD34+ hematopoietic cells. *Exp.Hematol.* 20.
26. Palframan, R. T., P. D. Collins, T. J. Williams, and S. M. Rankin. 1998. Eotaxin induces a rapid release of eosinophils and their progenitors from the bone marrow. *Blood* 91:2240-2248.
27. Favre, C., S. Saeland, C. Caux, V. Duvert, and J. E. De Vries. 1990. Interleukin-4 has basophilic and eosinophilic cell growth-promoting activity on cord blood cells. *Blood* 75:67-73.
28. Ochiai, K., I. Iwamoto, H. Takahashi, S. Yoshida, H. Tomioka, and S. Yoshida. 1995. Effect of IL-4 and interferon-gamma (IFN-gamma) on IL-3- and IL-5- induced eosinophil differentiation from human cord blood mononuclear cells. *Clin.Exp.Immunol.* 99:124-128.
29. Dvorak, A. 1994. Ultrastructural studies on mechanisms of human eosinophil activation and secretion. In *Eosinophils in Allergy and Inflammation*. G. Gleich and A. Kay, eds. Marcel Dekker, New York, NY, p. 159.
30. Pamley, R. T., M. Takagi, S. S. Spiccer, A. Thrasher, and F. R. Denys. 1982. Ultrastructural visualization of complex carbohydrates in eosinophilic leukocytes. *Am.J.Anat.* 165:53-67.

### CAPITULO III

**Velazquez,J.R.; Lacy,P.; Mahmudi-Azer,S.; Moqbel,R. Effects of interferon-gamma on mobilization and release of eosinophil- derived RANTES. Int Arch Allergy Immunol 118:447-449, 1999I.**

#### **I.- Efecto del Interferón gama en la movilización y liberación de RANTES derivado de eosinófilos**

##### **Resumen**

Los eosinófilos sintetizan y liberan diferentes citocinas y quimocinas, incluyendo RANTES, un potente quimioattractante para eosinófilos y linfocitos T de memoria. La incubación con IFN $\gamma$  por periodos prolongados (>12 h) fue capaz de activar eosinófilos e inducir la expresión de receptores de membrana. Nuestra hipótesis es que el IFN $\gamma$  es capaz de movilizar RANTES intracelular en los eosinófilos como preámbulo a la liberación de mediadores. Para probar lo anterior eosinófilos de sangre periférica de gran pureza provenientes de individuos asmáticos, fueron estimulados con 500 U/ml de IFN $\gamma$  por periodos menores a dos horas. Empleando un equipo de ELISA específico para esta quimocina, se detectaron  $80 \pm 15$ pg de RANTES por cada  $2 \times 10^6$  eosinófilos después de 120 minutos de estimulación. El fraccionamiento subcelular de eosinófilos en reposo ( $5 \times 10^7$  células) empleando gradientes de densidad, permitió detectar RANTES inmunoreactivo en dos compartimentos intracelulares. Después de 10 minutos de estimulación con IFN $\gamma$ , la inmunoreactividad de RANTES estuvo confinada en los gránulos cristaloides mientras que a los 60 minutos el RANTES se dispersó hacia fracciones membranales ligeras. Nuestros

datos sugieren que en eosinófilos estimulados ocurre una rápida movilización y liberación de RANTES. Estos hallazgos señalan al IFN $\gamma$  como un posible activador de eosinófilos humanos, particularmente en el asma crónico severo o exacerbación viral de la inflamación asmática, donde esta citocina pudiera estar implicada.

### **Introducción**

La activación de eosinófilos en la inflamación alérgica potencialmente involucra la liberación de hasta 19 diferentes citocinas y factores de crecimiento (revisado en <sup>1</sup>), que incluyen RANTES <sup>2</sup>. El RANTES es una quimocina CC que *in vitro* actúa como un potente quimioattractante para linfocitos T de memoria y eosinófilos <sup>3,4</sup>. La liberación de RANTES en fluidos biológicos durante la inflamación alérgica correlaciona fuertemente con la intensidad del infiltrado celular inflamatorio así como, con la aparición de síntomas en la alergia y el asma <sup>5</sup>. Anteriores estudios han mostrado que los eosinófilos de sangre periférica expresan RNAm para RANTES y al parecer son capaces también de almacenar intracelularmente esta proteína <sup>2</sup>. *In vitro* el IFN $\gamma$  induce un aumento en la transcripción y traducción de RANTES eosinofílico <sup>2</sup>.

Nuestra hipótesis es que el RANTES intracelular en eosinófilos humanos es rápidamente movilizado y secretado después de que estas células han sido expuestas a IFN $\gamma$ , siendo este evento dependiente de la duración del estímulo.

La inmunoreactividad específica de RANTES liberado por eosinófilos aislados de sujetos atópicos así como el proveniente de fracciones subcelulares, fue determinado mediante el

empleo de un equipo de ELISA. Los sitios de almacenamiento de RANTES fueron comparados con los de la proteína granular EPO.

## **Material y métodos**

### **Preparación de eosinófilos**

Sangre periférica (100 ml) fue obtenida de individuos atópicos asmáticos moderados, los cuales mostraron una eosinofilia >5% sin estar recibiendo corticosteroides orales en el momento del estudio. Los eosinófilos fueron purificados por selección inmunomagnética, como ha sido descrito previamente <sup>6-8</sup>.

### **Análisis *in vitro* de la liberación de RANTES derivado de eosinófilos**

Eosinófilos ( $2 \times 10^6$  células/muestra) fueron tratados con 500 U/ml de IFN $\gamma$  e incubados en RPMI-1640 incoloro (Bio-Whittaker, Walkersville, Md.USA). Después de cada periodo de incubación (0 - 240 minutos), las células fueron centrifugadas y utilizando un equipo de ELISA específico para esta citocina (Quantikine R&D Systems, Minneapolis, Minn., USA) con un límite de detección de 31.2 pg/ml, se determinó la inmunoreactividad de RANTES en los sobrenadantes.

### **Fraccionamiento subcelular**

Los eosinófilos purificados de sangre periférica ( $5 \times 10^7$  células) fueron pasados a través de un homogenizador celular con balín, obteniendo organelos celulares que fueron separados en un gradiente de densidad linear de Nycodenz, como ya ha sido descrito <sup>6-8</sup>. La actividad de EPO (empleado como un marcador enzimático de gránulos cristaloides) fue determinada

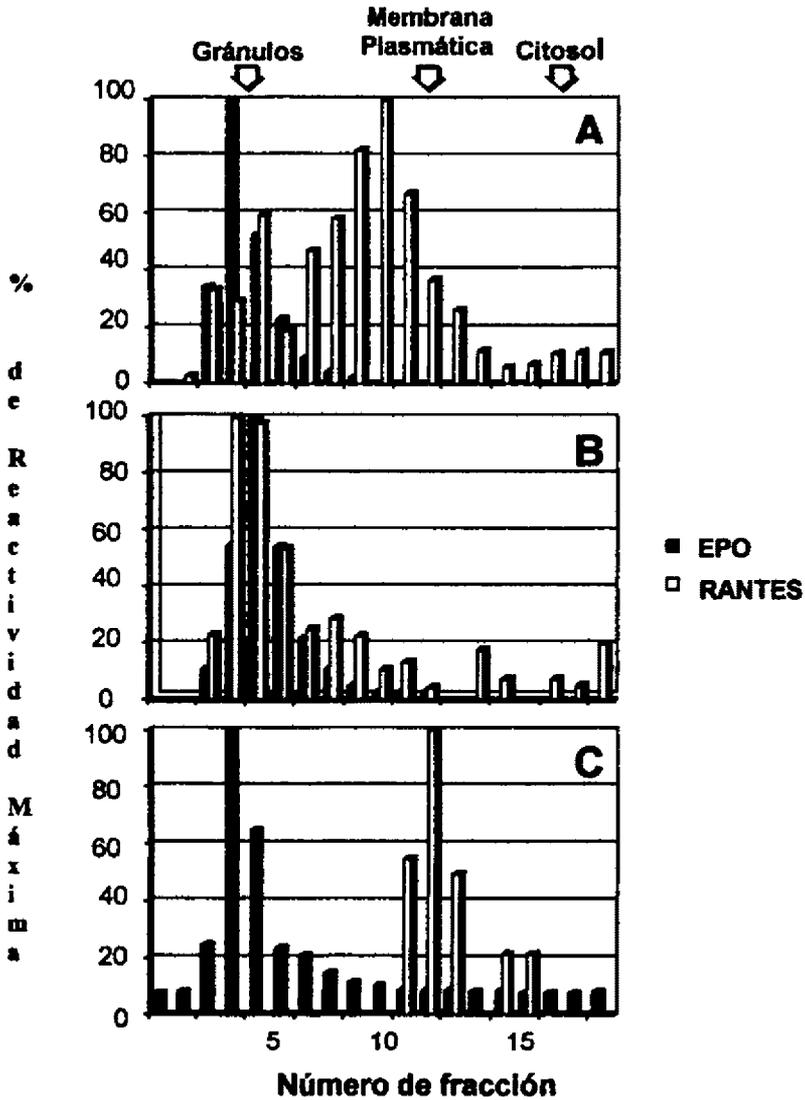
en cada fracción usando, 1, 1'-trimetilen-bis (Bromuro de 4-formilpiridinio) Dioxima como ya ha sido descrito <sup>6</sup>. Cada fracción fue también analizada con un equipo de ELISA específica de RANTES.

## **Resultados**

El RANTES liberado de los eosinófilos estimulados con IFN $\gamma$  (500U/ml) fue evaluado en intervalos cortos de incubación (0, 10, 30, 60, 120 y 240 minutos) usando  $2 \times 10^6$  células/intervalo. Se encontró que el IFN $\gamma$  indujo en los eosinófilos humanos una rápida liberación de RANTES, alcanzando un máximo entre los 60 - 120 minutos. (Tabla 2). Los eosinófilos no estimulados no mostraron liberación espontánea de RANTES en el mismo espacio temporal.

El análisis para EPO detectó gránulos secretorios cristaloides en fracciones provenientes de gradientes de Nycodenz. En eosinófilos no estimulados, el análisis para RANTES resolvió dos picos de actividad, uno de los cuales se sobrepuso al de EPO (Fig. 7a). Y otro que se sobrepuso a una región rica en membranas ligeras (detectada por CD9 y análisis Dot Blot; dato no mostrado). Los eosinófilos no estimulados almacenaron aproximadamente 72 pg de RANTES/ $10^6$  células. Después de 10 minutos de estimulación con IFN $\gamma$  (500U/ml), se observó un cambio dramático en la distribución de la inmunoreactividad de RANTES, el pico más grande de RANTES fue completamente eliminado de la zona de membranas ligeras (Fig. 7b), mientras alguna actividad permaneció en las fracciones asociadas a los gránulos. La cantidad de RANTES almacenada fue reducida un 68% comparada con las células no estimuladas (23 pg/ $10^6$  células). En eosinófilos estimulados durante 60 minutos con IFN $\gamma$  (Fig. 7C), este nivel permaneció disminuido (35pg RANTES/ $10^6$  células, 49% comparado con las células no estimuladas). Interesantemente, en células estimuladas durante 60 minutos, el grueso de la inmunoreactividad de RANTES fue transferido a las fracciones asociadas a la membrana plasmática.

Figura 7



Fraccionamiento subcelular de eosinófilos en reposo y estimulados con IFN $\gamma$ . El RANTES se determinó en fracciones individuales por la técnica de ELISA. (A) eosinófilos no estimulados (B) estimulados con 500 U/ml de IFN $\gamma$  durante 10 minutos y (C) 60 minutos.

Tabla 2

Tiempo (min)	Liberación espontánea de RANTES (pg/ml)	Liberación de RANTES Inducida por IFN $\gamma$ (pg/ml)
0	31 $\pm$ 9 (2)	31 $\pm$ 0 (4)
10	31 (1)	33 $\pm$ 2 (4)
30	40 (1)	59 $\pm$ 12 (4)
60	46 $\pm$ 2 (2)	67 $\pm$ 9* (4)
120	44 (1)	80 $\pm$ 15* (4)
240	46 (1)	45 $\pm$ 5 (4)

Seguimiento de la liberación de RANTES inducida por IFN $\gamma$  en eosinófilos de sangre periférica provenientes de donadores atópicos asmáticos.

El valor entre paréntesis es el número de determinaciones hechas en la misma muestra. Los errores están dados como  $\pm$  Error estándar.

\*p<0.05 comparado con la liberación al tiempo 0.

## Discusión

Hemos mostrado que el RANTES puede ser almacenado dentro de dos poblaciones de vesículas secretorias. La primera esta asociada a los gránulos cristaloides, como lo demuestra su colocalización con la proteína granular eosinofílica EPO, mientras la segunda esta constituida por vesículas secretorias de baja densidad no caracterizadas. Proponemos que el componente rápidamente movilizable de RANTES esta contenido dentro de una vesícula pequeña que es físicamente distinta del gránulo cristaloides. Esto es complementario a un reporte anterior en donde el IFN $\gamma$  (1000 U/ml), después de estimular eosinófilos por 16 hrs, indujo RNAm específico y expresión proteica de RANTES <sup>2</sup>. El RANTES intracelularmente movilizado por el IFN $\gamma$  es liberado de las células estimuladas a los sobrenadantes, como lo muestran nuestras mediciones *in vitro* de liberación de RANTES a diferentes intervalos. Estas observaciones sugieren que los eosinófilos poseen un mecanismo selectivo para la liberación regulada de mediadores provenientes de gránulos cristaloides, probablemente a través de vesículas pequeñas de baja densidad. La liberación selectiva de proteínas granulares de eosinófilos ha sido descrita en reportes anteriores <sup>9</sup>. Es probable que el RANTES derivado de eosinófilos juegue un papel en la señalización local, una vez que es liberado <sup>2</sup>. La habilidad de los eosinófilos para almacenar citocinas dentro de sus gránulos secretorios en forma de mediadores preformados, les confiere el potencial de regular respuestas inflamatorias locales. Estos interesantes hallazgos contribuirán a una mejor comprensión de la red de citocinas y quimocinas que regulan los procesos de reclutamiento de eosinófilos y su activación, así como sus efectos dañinos en la inflamación alérgica.

## Referencias

1. Lacy, P. and R. Moqbel. 1997. Eokines: synthesis, storage and release from human eosinophils. *Mem.Inst.Oswaldo Cruz* 92 Suppl 2:125-133.
2. Ying, S., Q. Meng, L. Taborda-Barata, C. J. Corrigan, J. Barkans, B. Assoufi, R. Moqbel, S. R. Durham, and A. B. Kay. 1996. Human eosinophils express messenger RNA encoding RANTES and store and release biologically active RANTES protein. *Eur.J.Immunol.* 26:70-76.
3. Baggiolini, M. and C. A. Dahinden. 1994. CC chemokines in allergic inflammation. [Review] [61 refs]. *Immunology Today* 15:127-133.
4. Schall, T. J., K. Bacon, K. J. Toy, and D. V. Goeddel. 1990. Selective attraction of monocytes and T lymphocytes of the memory phenotype by cytokine RANTES. *Nature* 347:669-671.
5. Holgate, S. T., K. S. Bodey, A. Janezic, A. J. Frew, A. P. Kaplan, and L. M. Teran. 1997. Release of RANTES, MIP-1 alpha, and MCP-1 into asthmatic airways following endobronchial allergen challenge. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 156:1377-1383.
6. Lacy, P., F. Levi-Schaffer, S. Mahmudi-Azer, B. Bablitz, S. C. Hagen, J. Velazquez, A. B. Kay, and R. Moqbel. 1998. Intracellular localization of interleukin-6 in eosinophils from atopic asthmatics and effects of interferon gamma. *Blood* 91:2508-2516.
7. Levi-Schaffer, F., P. Lacy, N. J. Severs, T. M. Newman, J. North, B. Gomperts, A. B. Kay, and R. Moqbel. 1995. Association of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor with the crystalloid granules of human eosinophils. *Blood* 85:2579-2586.
8. Levi-Schaffer, F., J. Barkans, T. M. Newman, S. Ying, M. Wakelin, R. Hohenstein, V. Barak, P. Lacy, A. B. Kay, and R. Moqbel. 1996. Identification of interleukin-2 in human peripheral blood eosinophils. *Immunology* 87:155-161.
9. Capron, M., M. Tomassini, G. Torpier, J. P. Kusnierz, S. MacDonald, and A. Capron. 1989. Selectivity of mediators released by eosinophils. *Int.Arch.Allergy Appl.Immunol.* 88:54-58.

*Paige Lacy, Salahaddin Mahmudi-Azer, Ben Bablitz, Stacey C. Hagen, Juan R. Velazquez, S.F. Paul Man, and Redwan Moqbel. Rapid mobilization of intracellularly stored RANTES in response to interferon- $\gamma$  in human eosinophils. Blood 94:23-32, 1999*

## **II. Rápida movilización en eosinófilos humanos del RANTES almacenado intracelularmente en respuesta a Interferón $\gamma$**

### **Resumen**

En eosinófilos humanos de sangre periférica, la quimocina RANTES es transcrita, sintetizada y almacenada en respuesta a IFN $\gamma$ . En este estudio, proponemos que el RANTES es rápidamente movilizado de los gránulos cristaloides eosinofílicos durante la desgranulación inducida por agonista. Para analizar la cinética de movilización y liberación de RANTES (0 - 240 minutos) eosinófilos purificados (>99%) provenientes de individuos atópicos asmáticos fueron estimulados con 500U/ml de IFN $\gamma$ . Con el fin de trazar el movimiento de RANTES eosinofílico desde su sitio de almacenamiento hasta su liberación, empleamos fraccionamiento subcelular, análisis inmunoáureo, microscopía de barrido láser confocal y ELISA. El RANTES fue rápidamente movilizado (10min) y liberado a los 120 minutos de estimulación ( $80 \pm 15$ pg/ml por cada  $2 \times 10^6$  células). El RANTES aparentó estar almacenado en al menos dos compartimentos intracelulares: la matriz de los gránulos cristaloides (detectada por proteína básica principal y por actividad de peroxidasa eosinofílica) y en pequeñas vesículas secretorias especializadas presentes en fracciones de membranas ligeras. Durante la estimulación con IFN $\gamma$  el RANTES extragranular fue movilizado más rápidamente que aquel de los gránulos cristaloides. Este efecto no fue

observado en eosinófilos tratados con IFN $\alpha$ , IL-3, IL-5, GM-CSF o genestina seguidos por IFN $\gamma$ . Nuestros hallazgos sugieren que después de la estimulación, el RANTES puede ser movilizado y liberado por desgranulación gradual, siendo probable que su transporte se realice a través de un conjunto putativo de vesículas secretorias pequeñas.

## Introducción

La acumulación de eosinófilos es una característica de la inflamación alérgica, particularmente en la mucosa de vías aéreas de sujetos asmáticos. Se cree que los eosinófilos son activados en respuesta a estímulos inflamatorios locales, liberando diversos mediadores. Estos están constituidos por productos de la explosión respiratoria, mediadores lípidos y proteínas granulares citotóxicas tales como MBP, y EPO <sup>1,2</sup>. En suma, los eosinófilos potencialmente sintetizan o producen hasta 18 diferentes citocinas y factores de crecimiento, incluyendo IL-2 <sup>3,4</sup>, IL-4 <sup>5</sup>, IL-6 <sup>6,7</sup>, GM-CSF <sup>8-10</sup> y RANTES <sup>11-13</sup>. Esta última proteína junto con otras ha mostrado ejercer efectos autocrinos en eosinófilos <sup>8,11,14</sup>

El RANTES es una quimocina CC que ha mostrado ser un potente quimioattractante para linfocitos T CD4+/CD45RO+, eosinófilos, basófilos, monocitos/macrófagos y células cebadas <sup>15-18</sup>. Además de los eosinófilos, RANTES es sintetizado y/o liberado por otros tipos celulares, como linfocitos T, plaquetas, macrófagos, células endoteliales, fibroblastos, células epiteliales y una línea celular de mastocitos <sup>16,19-23</sup>. En humanos se encontró que la inyección intracutánea de RANTES indujo un marcado reclutamiento de eosinófilos, el cual fue más rápido en individuos alérgicos comparados con el de sujetos normales <sup>24</sup>. En estudios anteriores, RANTES ha sido implicado en reacciones de hipersensibilidad de tipo tardío <sup>19</sup>, en artritis reumatoide y en procesos inflamatorios activos <sup>20</sup>. En asma el RANTES podría contribuir a la infiltración de células inflamatorias en el tejido mucoso de vías aéreas durante el reto alérgico.

Aunque la expresión y liberación de RANTES en tejidos y en fluido de lavado bronco alveolar (LBA) de sujetos asmáticos en reposo e individuos normales no difiere significativamente <sup>25,26</sup>, los niveles de RANTES encontrados estuvieron elevados en LBA de individuos asmáticos 4 horas después del reto alérgico <sup>27</sup> y en fluidos nasales de sujetos con rinitis alérgica después del reto con un extracto de polen <sup>28</sup>.

En asma y rinitis el aumento en la secreción de RANTES correlaciona fuertemente con un número elevado de eosinófilos en tejidos. Además, RANTES ha mostrado incrementar la expresión de CD11/CD18 en monocitos <sup>29</sup> e inducir la liberación de histamina en basófilos humanos <sup>30</sup>, sugiriendo que pudiera tener un papel en las respuestas alérgicas de tipo inmediato.

Utilizando inmunohistoquímica (ICC), hibridación in situ (ISH) y ELISA se ha mostrado que los eosinófilos de sangre periférica expresan RNAm específico de RANTES y que las perlas cubiertas con suero estimulan la liberación de RANTES bioactivo <sup>13</sup>. En los eosinófilos se observó un patrón granular de tinción inmunohistoquímica, sugiriendo que éstas células almacenan RANTES preformado en comportamientos intracelulares. El interferón  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) después de 16hrs de estimulación indujo la producción de RNAm específico de RANTES así como su expresión proteica en eosinófilos <sup>13</sup>. En numerosos estudios el IFN $\gamma$  ha mostrado ser un estímulo variable para los eosinófilos <sup>3-7,31-33</sup>.

Originalmente hipotetizamos que el RANTES intracelular era secretado proporcionalmente al tiempo de estimulación con IFN $\gamma$ . Sin embargo, datos preliminares indicaron que el IFN $\gamma$  tuvo un efecto más rápido en la movilización de RANTES que el anticipado previamente. Así, proponemos que el RANTES es rápidamente movilizado desde almacenes

intracelulares siguiendo un patrón gradual de desgranulación. Los eosinófilos purificados de sangre periférica fueron obtenidos de individuos atópicos asmáticos para ser posteriormente estimulados con IFN $\gamma$  humano recombinante. La liberación de RANTES fue analizada en las células usando una combinación de ensayos *in vitro*, ELISA específica para RANTES, análisis inmunoáureo, microscopía de barrido láser confocal (MBLC) y fraccionamiento subcelular. La localización de RANTES fue comparada con la de MBP y EPO conocidas proteínas de gránulos cristaloides. Nuestros hallazgos sugieren que RANTES como un producto almacenado en eosinófilos, es pronto y selectivamente liberado después de la estimulación siguiendo un patrón semejante a la desgranulación gradual.

## **Material y métodos**

Los equipos de detección para fosfatasa alcalina anti-fosfatasa alcalina que utilizan anticuerpos monoclonales murinos fueron obtenidos de Dako (Glostrup, Dinamarca). La adenosina trifosfato, aprotinina, Na-p-tosil-L-arginina metil éster (TAME), fluoro fenil metilsulfonil (PMSF), Rojo rápido TR, leupeptil, 4-metilumbeliferil N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminida,  $\beta$ -nicotinamida adenina dinucleótido (forma reducida), piruvato de sodio y substrato tetrametilbenzidina (TMB) fueron comprados a Sigma (Oakville, ON, Canada). La genestina fue obtenida de Calbiochem Corporation (San Diego, CA, USA). El IFN $\gamma$  humano recombinante fue donado generosamente por el Dr. Aziz Ghahary del Departamento de cirugía de la Universidad de Alberta. El nycodenz fue comprado a Gibco BRL Life Technologies, Ltd (gran Island, NY, USA). Todos los reactivos usados en este estudio incluyendo los medios fueron negativos para la actividad de LPS, determinada por el ensayo E-Toxate (Sigma).

## **Preparación de los eosinófilos**

Se obtuvieron 100ml de sangre periférica de individuos atópicos asmáticos moderados con eosinofilia >5% y sin tratamiento oral de corticosteroides. Después de sedimentar los eritrocitos en dextrán al 5%, las células remanentes fueron sujetas a centrifugación por densidad en Ficoll. Los eosinófilos de la capa de granulocitos fueron purificados por selección inmunomagnética usando el sistema MACS (Mitenyi Biotec GmGH, BergischGladbach, Germany). Los eosinófilos CD16- altamente purificados (>99%) fueron

obtenidos por selección negativa después de remover los neutrófilos con perlas inmunomagnéticas recubiertas con anti-CD16 como, ha sido descrito previamente<sup>7 9 34</sup>. La contaminación por células mononucleares y linfocitos fue evitada coincubando con perlas recubiertas de anticuerpos anti CD14 y CD3 (Miltenyi Biotec).

### **Ensayo *in vitro* de la liberación de proteínas eosinofílicas**

Los eosinófilos humanos purificados fueron depositados en alicuotas de  $2 \times 10^6$  células en tubos conteniendo RPMI-1640 (Bio Whitaker, Walkersville, MD, USA) y tratados con 500U/ml de IFN $\gamma$  o 1000U/ml de IFN $\alpha$  e incubados a 37°C a diferentes intervalos.

La reacción fue terminada al colocar los tubos en hielo y centrifugar las células a 400g por 5 minutos a 4°C. El ensayo para detectar la inmunoreactividad de RANTES en sobrenadantes se efectuó con un equipo de ELISA Quantikine (R & D Systems, Minneapolis, MN, USA) con una sensibilidad de 31.2 pg/ml.

Para la detección de otras dos proteínas de granulos cristaloides, EPO y  $\beta$ -hexosaminidasa, se emplearon modificaciones de determinaciones realizadas previamente. Brevemente, la actividad de EPO fue determinada mezclando 50  $\mu$ l de muestra con 150  $\mu$ l de substrato TMB en microplacas de 96 pozos incubadas a temperatura ambiente por 15 minutos. La reacción fue terminada adicionando 50 ml de ácido sulfúrico 4M y leyendo en un espectrofotometro de microplaca (Vmax Kinetic Microplate Reader, Molecular Device, Sunnyvale, CA) a 450nm.

Para la actividad de la  $\beta$ -hexosaminidasa, presente en granulos secretorios y lisosomales, se adicionaron 50  $\mu$ l de muestra en microplacas de 96 pozos y se mezcló con 50  $\mu$ l de solución

substrato (4-metilumbeliferil N-acetil- $\beta$ -D-glucosaminida 1 mmol en solución amortiguadora de citratos 0.2mol, pH 4.5 y solución triton X-100 0.1%) antes de incubar a 37°C por 1 o 2 hrs. La reacción se terminó adicionando 150 ml de Tris 0.2 M enfriado en hielo, midiéndose la fluorescencia (excitación a 360 nm, emisión a 460 nm) en un lector de placa Millipore CytoFluor 2350 (Millipore, Neapan, Ontario, Canada).

### **Marca inmunoaurea y microscopía electrónica**

Este procedimiento fue una modificación de una técnica descrita previamente<sup>5</sup>. Brevemente, las pastillas de eosinófilos aislados fueron fijadas 2 hrs en formaldehído (al 2% en PBS 0.1M, pH 7.4) recién preparado, para ser embebidos posteriormente en resina Lowicryl K4M y sujetos a un procedimiento de infiltración que involucró una disminución progresiva de la temperatura. Se cortaron secciones de plata y se recogieron en gradillas Formvar recubiertas de cobre. Antes del marcado, los cortes fueron bloqueados durante 10 minutos con glicina al 0.14 % en PBS. Un bloqueo adicional de 10 minutos fue hecho con suero de caballo al 3%. Las gradillas fueron sumergidas por 2 hrs en una solución conteniendo 20  $\mu$ g/ml de anticuerpo murino monoclonal anti RANTES humano (R & D Systems). Un bloqueo posterior fue ejecutado usando glicina al 0.14% en PBS. A fin de visualizar la marca inmunoreactiva incubamos las muestras durante 2 hrs con 0.5  $\mu$ g/ml de anticuerpo de cabra anti-murino en PBS conjugado a partículas de oro (20 nm de diámetro; E-Y Laboratories, Inc. , San Mateo, CA, USA). Los cortes fueron lavados tres veces con glicina al 0.14% en PBS antes de ser enjuagadas por 3 minutos en agua destilada. En el caso de los controles negativos, sustituimos el anticuerpo anti-RANTES con IgG1 murina

como control isotípico (20 µg/ml; R & D Systems). La tinción con tetra óxido de osmio fue omitida en los cortes eosinofílicos para asegurar la visualización de las partículas de oro en los gránulos cristaloides electrodenso.

### **Doble marcado y microscopía de barrido láser confocal**

Los citocentrifugados de eosinófilos (100µl de  $0.5 \times 10^6$  células/ml en RPMI suplementado con 20% de FCS) fueron procesados centrifugando laminillas en una centrifuga Cytospin 2 (Shandon Ltd, AStmoor, Runcorn, UK) (800 rpm por 2 minutos) seguida por 6 minutos de fijación en paraformaldehído al 2% en PBS. Las laminillas fueron sujetas a proceso de lavado (cinco lavados TBS, pH 7.4), seguido por una hora de incubación en solución bloqueadora (BSA al 2%) en una cámara humidificada. Las laminillas fueron posteriormente incubadas durante 1 h con TBS conteniendo 5 µg/ml de anticuerpo murino monoclonal anti-RANTES humano (R & D Systems). La inmunoreactividad de RANTES fue detectada usando 20 µg/ml de anticuerpo de cabra anti murino conjugado con BODYP FL (Molecular Probes; Eugene, OR, USA) de acuerdo a previa optimización hecha en nuestro laboratorio<sup>39</sup>. Las laminillas fueron nuevamente bloqueadas durante 2 hrs usando 50 µg/ml de anticuerpo IgG de cabra anti-ratón (Molecular Probes), marcadas doblemente incubando durante 1hr con anticuerpo monoclonal murino anti-MBP humano (BMK-13) al 1% en TBS. La unión del BMK-13 fue detectada incubando 1h en 5 µg/ml de anticuerpo de cabra anti-ratón marcado con Texas Red (Caltag Laboratories, San Francisco, CA, USA). Un anticuerpo IgG1 murino (5 µg/ml) fue usado como un control de isotipo (R & D

Systems). Después de un proceso de lavado final, 10  $\mu$ l de agente anti-blanqueador (0.4% n-propil galato [Sigma] en glicerol: TBS 3:1) fueron aplicados a cada laminilla antes de colocar un cubreobjetos. Las laminillas fueron examinadas usando un objetivo 100X en un microscopio de barrido láser Leica (CLSM; Heidelberg, Germany). Las imágenes fueron recolectadas y procesadas como se ha descrito previamente <sup>7</sup>.

### **Fraccionamiento subcelular**

Los eosinófilos purificados de sangre periférica fueron homogeneizados por pasaje repetitivo a través de un homogenizador celular con balín, resultando en la separación de organelos en un gradiente de densidad lineal como ha sido descrito en reportes anteriores <sup>4,10 7,9</sup>. Brevemente, por lo menos  $5 \times 10^7$  eosinófilos purificados de individuos asmáticos fueron suspendidos en solución amortiguadora de HEPES (conteniendo HEPES 10 mM, EGTA 1 mM, pH 7.4) al 0.25M en sucrosa enfriada en hielo y centrifugados a 4°C. Las células a una concentración de  $10 - 15 \times 10^6$ /ml fueron resuspendidas en solución amortiguadora de homogeneización (solución amortiguadora HEPES sucrosa descrita arriba, complementada con 100 $\mu$ g/ml de PMSE, y 5 $\mu$ g/ml de leupeptina, aprotinina y TAME, MgCl<sub>2</sub> 2mM y ATP 1mM) y sujetos a 10 - 20 pases a través de un homogenizador con balín con una malla de 12  $\mu$ m (EMBL, Heidelberg, Germany). El homogeneizado fue centrifugado a 400 g por 10 minutos y el sobrenadante post nuclear resultante fue colocado en tubos de centrifuga Beckman 14 x 89 mm UltraClear TM (Beckman, Palo Alto, CA, USA) con 8 ml de gradiente lineal de Nycodenz (0 - 45 % Nycodenz disuelto en solución

amortiguadora HEPES sucrosa con un cóctel de inhibidores de proteasas). El gradiente fue sujeto a centrifugación por equilibrio de densidad a 100,000g durante 1 hr a 4°C, fracciones (24 x 0.4ml) fueron recolectadas y almacenadas a -80°C hasta su uso.

### **Ensayos enzimáticos de marcadores**

Tres ensayos enzimáticos de marcadores fueron usados para obtener los perfiles de organelos subcelulares en las fracciones recolectadas de la centrifugación por gradiente de densidad. Las actividades para EPO y  $\beta$ -hexosaminidasa fueron determinadas en sobrenadantes y pastillas usando la misma técnica descrita anteriormente en esta sección. La actividad citosólica fue determinada usando una modificación de un ensayo de punto final en microplaca <sup>36</sup> para deshidrogenasa láctica (LDH), en cada pozo fueron mezclados 10  $\mu$ l de muestra con 80 $\mu$ l de una combinación de NADH a una concentración de 1mg/ml y piruvato 0.75 mM en solución amortiguadora de fosfatos pH 7.5 seguida de 30 minutos de incubación a 37°C, posteriormente se adicionaron 80  $\mu$ l de 2-4 dinitrofenilhidracina a una concentración de 0.2 mg/ml en HCl 1M y se incubó a temperatura ambiente por 20 minutos. La reacción fue terminada adicionando 40  $\mu$ l de NaOH 2.5 M y leída la absorbancia a 450 nm. La actividad de la membrana plasmática fue determinada por análisis dot-blot (*vide infra*) utilizando un anticuerpo anti CD9 como ya ha sido descrito <sup>4,10</sup> 7,9 .

### **Análisis Dot-Blot**

El análisis dot-blot fue realizado para determinar la distribución de CD9 en fracciones subcelulares de eosinófilos activados y en reposo. Anticuerpos monoclonales anti CD9 (IgG2a purificados) fueron donados gentilmente por el Dr A.R.E. Shaw (Cros Cancer Institute, University of Alberta). Un anticuerpo murino monoclonal isotipo IgG2a fue utilizado como control negativo para el anti-CD9 (Pharmigen Canada, Mississauga, ON, Canada). Muestras de cada fracción (2  $\mu$ l) fueron pipeteadas en tiras de metil celulosa, dejadas secar y bloqueadas con polvo de leche al 5%. Las tiras de membranas bloqueadas fueron incubadas con anticuerpo anti-CD9 1:1000 y después de lavados extensivos en TBS, pH 7.6 más Tween 20 al 0.2%, fueron reveladas usando la técnicas de tinción basada en la reacción fosfatasa alcalina - anti-fosfatasa alcalina (APAAP) como ha sido descrito <sup>9</sup>.

Las inmunoreactividades anti-CD9 de las fracciones fueron determinadas por densidad de tinción usando un escaner de gel, asignando unidades arbitrarias y convirtiendo todas las fracciones a porcentaje de actividad total.

### **Presentación de datos**

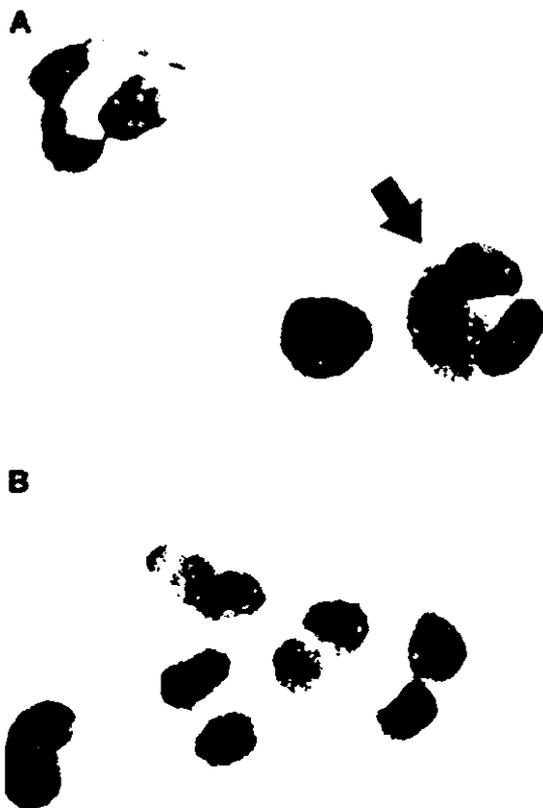
La bioactividad de gránulos eosinofílicos, constituyentes citosólicos y membranales posteriores al fraccionamiento celular son expresados como distribuciones de frecuencia como ya ha sido descrito <sup>9</sup>. El RANTES se mostró cuantitativamente como pg/fracción y pg/ml en fracciones y sobrenadantes, respectivamente. Las comparaciones estadísticas fueron realizadas utilizando la prueba de Mann-Whitney (de una cola) y análisis de varianza Kruskal-Wallis de una vía. Los resultados fueron considerados significativos cuando  $p < 0.05$

## **Resultados**

### **Inmunocitoquímica usando APAAP**

Utilizando la técnica de APAAP detectamos inmunoreactividad de RANTES en los citocentrifugados de leucocitos de individuos asmáticos marcados con anticuerpos específicos. Unicamente los eosinófilos identificados morfológicamente (no así los neutrófilos o los linfocitos), mostraron una mezcla de tinción granular y extragranular correspondiente a la inmunoreactividad de RANTES (Fig.8A). Esto parece indicar que si bien RANTES se almacena asociándose a los gránulos cristaloides característicos de los eosinófilos, también puede ser encontrado en otros compartimentos intracelulares. El anticuerpo para control isotípico (IgG1 murino) fue negativo (Fig. 8B).

Figura 8



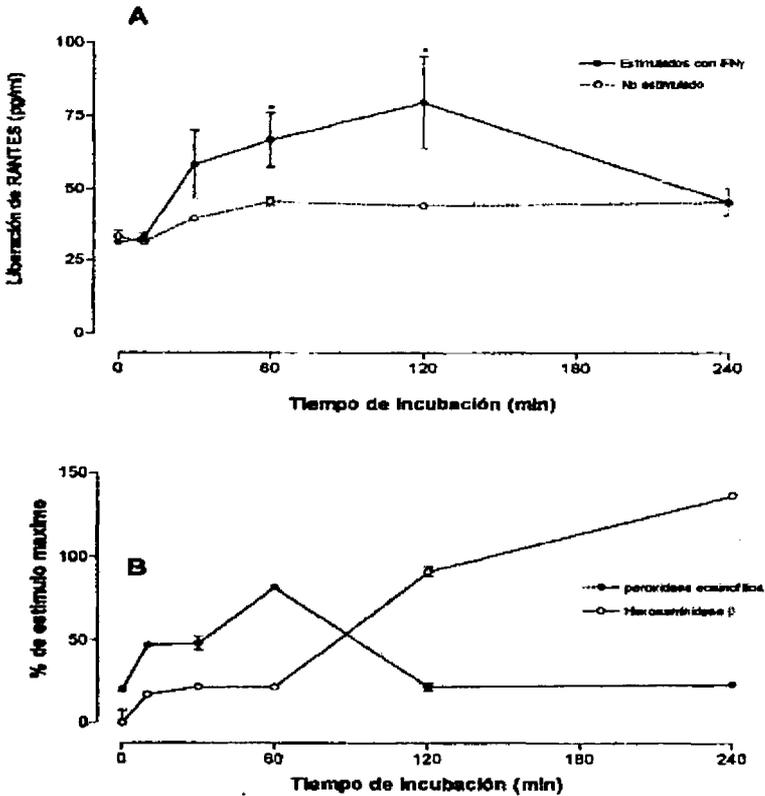
Eosinófilo humano de un citocentrifugado de concentrado leucocitario. (A) El eosinófilo indicado por la flecha fue teñido con anticuerpo murino monoclonal anti-RANTES humano (20  $\mu\text{g/ml}$ ) utilizando la técnica APAAP. En este campo se pueden observar dos células sin teñir; un neutrófilo con núcleo multilobulado (arriba a la izquierda) y un linfocito (a la izquierda del eosinófilo teñido). (B) Control de isotipo empleando anticuerpo IgG1 murino (20  $\mu\text{g/ml}$ ). Amplificación original 100X

### **Liberación de RANTES seguida de la estimulación *in vitro* con IFN $\gamma$**

Cuando se incubaron eosinófilos por periodos prolongados (hasta 24 hrs) en medios conteniendo IFN $\gamma$  humano recombinante se observó un aumento en la expresión de diversas citocinas eosinofílicas, incluyendo RANTES <sup>13</sup>. A fin de evaluar el comportamiento temporal de la liberación de RANTES en periodos cortos de estimulación con IFN $\gamma$  (500 U/ml), se midió la cantidad de RANTES liberado en células estimuladas a los 0, 10, 30, 60, 120 y 240 minutos ( $2 \times 10^6$  células en cada caso). El IFN $\gamma$  indujo una rápida liberación de RANTES en eosinófilos humanos, alcanzando niveles máximos entre los 60 - 120 minutos (4 experimentos). En un experimento representativo, los eosinófilos liberaron un promedio de  $80 \pm 15$  pg/ml de RANTES después de 120 minutos de estimulación con IFN $\gamma$  ( $p < 0.005$ ; Fig.9). La cantidad de liberación máxima vario entre 4 donadores (rango = 74.5 - 302 pg/ml). Después de 2 hrs de estimulación, la cantidad de RANTES detectada en los sobrenadantes disminuyó. Los eosinófilos no estimulados no mostraron una liberación espontánea de RANTES significativa (Fig.9A). Así, se encontró que *in vitro* el IFN $\gamma$  indujo una rápida liberación de RANTES en eosinófilos humanos de sangre periférica. En comparación la liberación de EPO fue probada en los mismos sobrenadantes y graficada como porcentaje de la liberación inducida a los 60 minutos de incubación a 37°C con un agonista de maxima estimulación como lo es las esferulas de Sephadex (Pharmacia) recubiertas con suero, en una muestra separada. La liberación de EPO fue potentemente inducida por el IFN $\gamma$  en los primeros 60 minutos de incubación y disminuyó después de 120 y 240 minutos de incubación. Sin embargo, debido a que la actividad de EPO no es siempre estable después de su liberación <sup>37,38</sup> también medimos la actividad de la  $\beta$ -hexaminidasa en

los sobrenadantes. La actividad de la  $\beta$ -hexaminidasa continuo incrementandose en los sobrenadantes durante la incubación continua, alcanzando valores que excedieron los niveles inducidos por las esferulas de Sephadex cubiertas con suero, después de 240 minutos de estimulación con IFN $\gamma$  (Fig 9B).

Figura 9

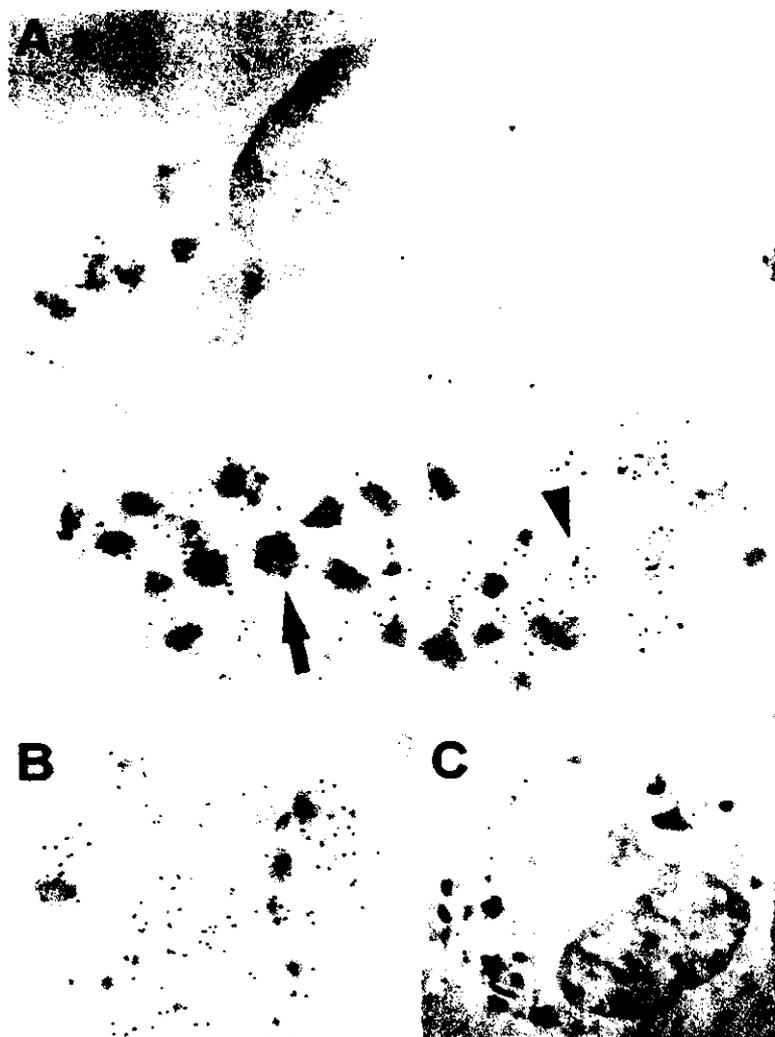


Seguimiento de la liberación de RANTES, EPO y  $\beta$ -hexosaminidasa en eosinófilos de sangre periférica inducida por 500 U/ml de IFN $\gamma$  humano recombinante. (A) Inmunoreactividad de RANTES en sobrenadantes de eosinófilos estimulados ( $2 \times 10^6$  células/determinación) utilizando un equipo de ELISA. Los valores representan el promedio de tres determinaciones en un donador representativo, después de 0, 10, 30, 60, 120 y 240 min de incubación. Una tendencia de liberación similar fue observada en cuatro donadores por separado. La línea punteada representa una sola determinación de la liberación espontánea de RANTES en eosinófilos (valores duplicados en 0 y 60 min) comparado con el valor de RANTES en sobrenadantes al inicio del experimento, \* $p < 0.05$  empleando análisis de varianza Kruskal-Wallis de una cola. La sensibilidad del equipo de ELISA utilizado fue de 31.2 pg/ml. (B) El IFN $\gamma$  también indujo la liberación de EPO y otros productos almacenados en los gránulos eosinofílicos, la  $\beta$ -hexosaminidasa detectada en los mismos sobrenadantes de células estimuladas con IFN $\gamma$  es mostrada en (B) la cantidad de proteína granular liberada esta expresada como porcentaje de la liberación inducida por un agonista estimulador máximo (perlas de Sephadex recubiertas con suero) en otro ejemplo. Los puntos y barras de error representan la media y Error Estándar (EE) de por lo menos tres determinaciones.

### **Etiquetado inmunoáureo de RANTES**

Los eosinófilos no estimulados exhibieron un patrón de tinción granular para la inmunoreactividad de RANTES, como lo indicó la proximidad de las partículas de oro a los centros granulares electrodensos (Fig. 10A y B). Este patrón de marcado inmune sugiere que el RANTES puede ser almacenado en asociación con los gránulos cristaloides. Adicionalmente, la tinción específica de RANTES se distribuyó a través de la célula en el miliu extracelular (mostrada por la punta de flecha en la Fig. 10A). El control de isotipo mostró un fondo exiguo (Fig. 10C).

Figura 10



Microscopía electrónica de transmisión de marcaje inmunoauero de RANTES en eosinófilos no estimulados. (A) La flecha indica las partículas de oro asociadas con los gránulos cristaloides electrodensos, mientras la punta de flecha muestra el marcado inmunoauero de áreas extragranulares. (B) Mayor aumento de otra célula. (C) Control de isotipo empleando anticuerpo IgG1 murino. Aumento original (A), 9100 X; (B), 34000 X y (C), 6900 X

## **Microscopía de Barrido Láser Confocal**

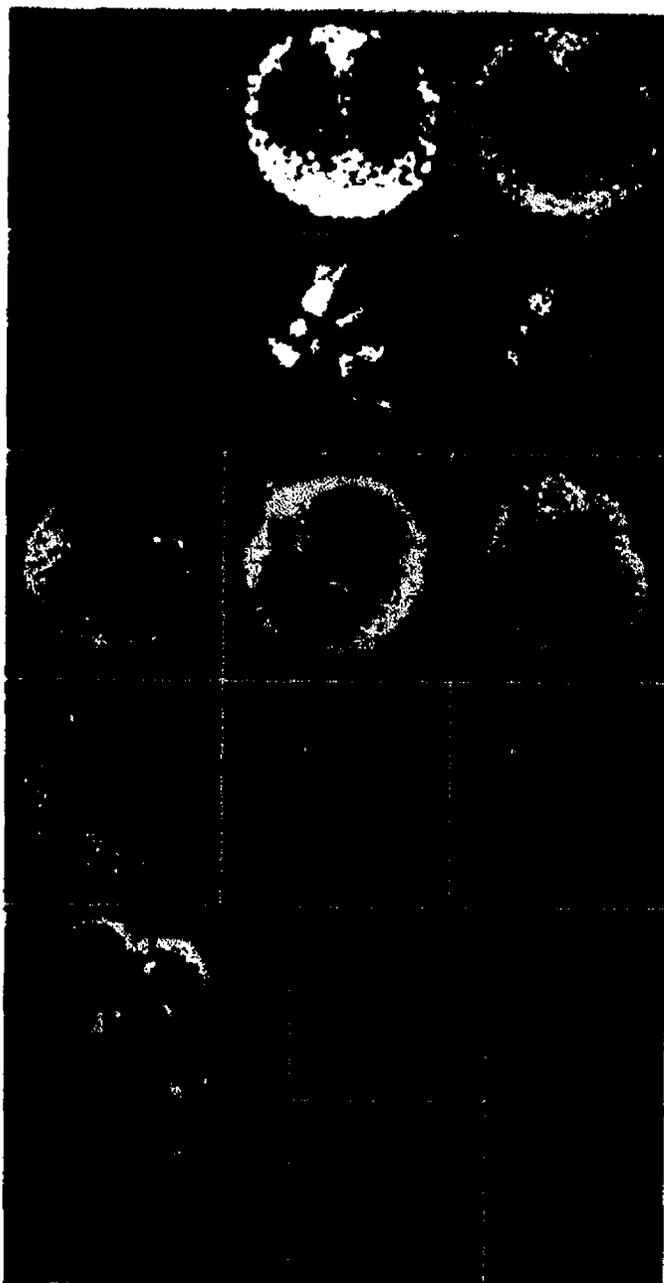
Para examinar la movilización de RANTES almacenado empleamos MBP como un marcador para gránulos cristaloides eosinofílicos. Usamos eosinófilos en reposo y estimulados con IFN $\gamma$  sometidos a marcado inmunofluorescente con anticuerpos apropiados. Las células inmuno teñidas mostraron discretas marcas rojas y verdes que corresponden a la inmunoreactividad del conjugado RANTES BODYPI FL (Fig. 11A) y a la del conjugado MBP Texas Red (Fig. 11B) respectivamente. La inmunofluorescencia aparece en amarillo donde los colores se sobreponen en las imágenes combinadas (Fig. 11C), sugiriendo que las dos proteínas marcadas colocalizan en el mismo compartimento intracelular. El control de isotipo exhibió una exigua inmunoreactividad después de sustraer la autofluorescencia como ha sido reportado previamente (dato no mostrado;<sup>39</sup>. A mayores amplificaciones, los gránulos cristaloides aparecen en forma de dona con centros rojos (MBP del centro cristalino) rodeado por inmunofluorescencia verde correspondiente al RANTES de la matriz de los gránulos cristaloides (Fig. 11D, E & F). En los gránulos las inmunoreactividades de MBP y RANTES sólo fueron sobrepuestas parcialmente.

En experimentos de seguimiento temporal, los eosinófilos estimulados con 500 U/ml de IFN $\gamma$  por 0, 5, 10, 30, 60 minutos y 16 hrs fueron fijados y teñidos para RANTES y MBP. Interesantemente, después de 10 minutos de incubación con IFN $\gamma$  la inmunofluorescencia de RANTES fue redistribuida en la periferia de las células (Fig. 11I, M & O), mientras que el MBP permaneció dentro del núcleo de los gránulos secretorios. La inmunofluorescencia específica de RANTES disminuyó visiblemente en las células después de 1h de incubación

con IFN $\gamma$ , aunque la actividad de MBP fue aun detectable (Fig. 11K). Después de 16hrs de incubación, regreso la inmunoreactividad de RANTES, indicando que algún grado de **reemplazamiento** había ocurrido (Fig. 11L). Estos hallazgos fueron reproducidos en eosinófilos de tres donadores asmáticos y las imágenes representan el patrón de marcado de la mayoría de las células en los citocentrifugados.

Para probar la especificidad de la respuesta por IFN $\gamma$ , los eosinófilos fueron incubados durante 10min con genestina ( $10^{-6}$  M) antes de adicionar 500 U/ml de IFN $\gamma$  y continuar la incubación otros 10 minutos. La genestina es un inhibidor de la tirosino cinasa de amplio espectro utilizada para inhibir los pasos tempranos en la ruta de señalización del receptor para IFN $\gamma$  una vez que éste se ha unido a su ligando <sup>40</sup>. Los efectos de IFN $\gamma$  en la inmunoreactividad de RANTES fueron completamente inhibidos en células con una sola marca (Fig. 11P; una célula estimulada con marca única es mostrada para comparación en Fig. 110). Adicionalmente, incubamos eosinófilos con IFN $\alpha$  (1000 U/ml) por 10 minutos y encontramos que no tuvo efecto observable en la distribución de la inmunoreactividad del RANTES eosinofílico (Fig. 11Q). Para examinar los efectos de IFN $\alpha$  y genestina en los eosinófilos tomamos ventaja del numero pequeño de células requeridas por MBLC para su estudio. En un ensayo por separado ninguna de las IL-3 humana recombinante (25 ng/ml), IL-5 (10 ng/ml) o GM-CSF (10 ng/ml) indujeron liberación significativa de RANTES en eosinófilos después de 1 h de estimulación (dato no mostrado).

Figura 11



(A-C) MC de eosinófilos teñidos para inmunofluorescencia. (A) Eosinófilos no estimulados marcados con BODIPYL FL indicando inmunoreactividad de RANTES. (B) Texas Red correspondiente a MBP, (C) imágenes combinadas. (D-F) muestran (D) Mayor acercamiento de los gránulos cristaloides mostrando inmunoreactividad de RANTES asociada a la matriz granular. (E) Centros granulares rojos con inmunoreactividad de MBP, (F) imágenes combinadas de la misma estructura. (G-L) imágenes combinadas de RANTES y MBP en un seguimiento temporal, estimulando con 500U/ml de IFN $\gamma$ . (G) células no estimuladas, (H) 5 min, (I) 10 min, (J) 30 min, (K) 60 min y (L) 16 horas. (M) Menor aumento de las imágenes combinadas de eosinófilos estimulados durante 10 min con IFN $\gamma$ . (N) Eosinófilo estimulado con una sola marca comparado con (O) 10 min de estimulación (500U/ml de IFN $\gamma$ ). (P) Efecto inhibitorio de la genestina 10<sup>-6</sup> mol/L adicionada 10 min antes de la estimulación con IFN $\gamma$ . (Q) Célula incubada con 1000U/ml de IFN $\alpha$  durante 10 min. Amplificación originales 100 X para todas las imágenes excepto para (M), 63 X.

## **Fraccionamiento subcelular**

Eosinófilos ( $5 \times 10^7$ ) fueron homogeneizados y depositados en gradientes de Nycodenz (0 - 45%) para su ultracentrifugación, las fracciones conteniendo organelos intactos se recogieron para su análisis de actividad enzimática y ELISA. Los compartimentos intracelulares fueron identificados en gradientes midiendo las actividades de marcadores enzimáticos dentro de fracciones individuales (Fig. 12). Los gránulos cristaloides secretorios fueron medidos usando ensayos para EPO y  $\beta$ -hexosaminidasa, mientras que la actividad de membrana plasmática fue determinada en las fracciones por análisis dot-blot usando anticuerpos anti-CD9. Las fracciones citosólicas fueron detectadas usando un ensayo de punto final para LDH. Las fracciones con actividad de membrana plasmática se sabe que contienen otras membranas ligeras, incluyendo compartimentos de Golgi, determinadas éstas por actividad de galactosil transferasa medida en subfracciones de eosinófilos de cobayo <sup>41</sup>. Hemos mostrado previamente que la pastilla producida por el conjunto de fracciones con pico de actividad proteica granular y que sedimenta a densidades altas típicamente observado en los gránulos cristaloides, esta enriquecido en gránulos secretorios <sup>9</sup>.

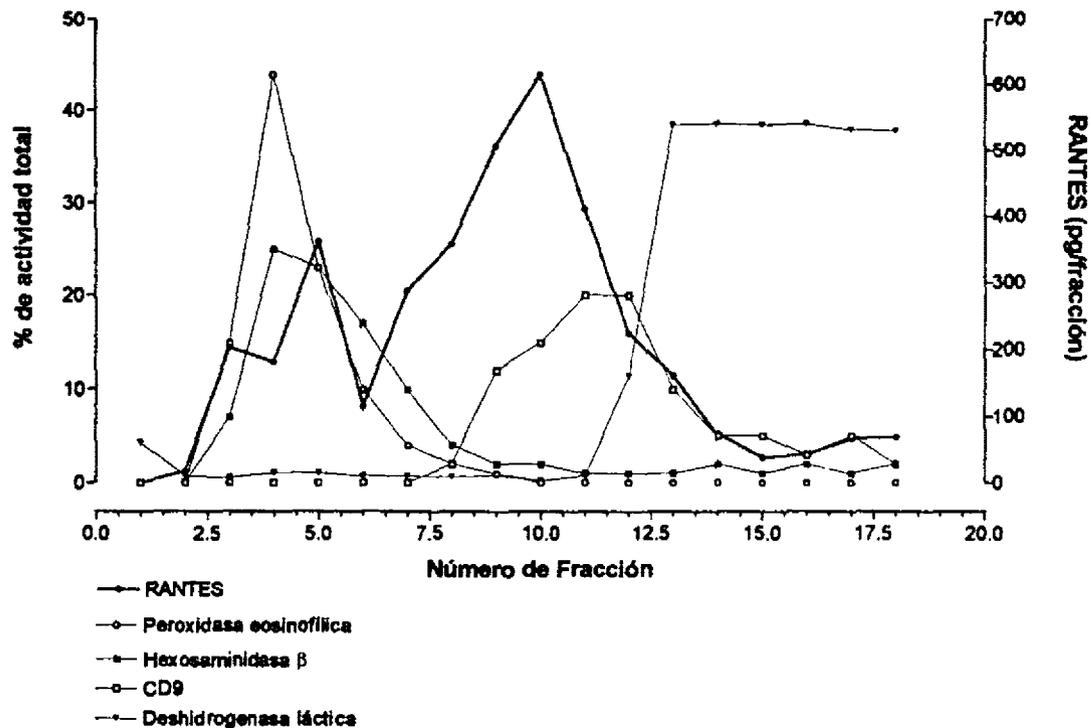
En eosinófilos no estimulados, la inmunoreactividad de RANTES fue detectada en al menos dos compartimentos intracelulares separados (Fig. 12 y 13A). El primer pico de actividad específica de RANTES fue detectado por actividad de EPO y  $\beta$ -hexosaminidasa en fracciones secretorias ricas en gránulos, mientras un pico mayor se encontró asociado a las fracciones membranales ligeras las cuales se sobreponen con la inmunoreactividad de CD9. Algo de la inmunoreactividad de CD9 fue visible en las fracciones granulares, como

ha sido descrito anteriormente <sup>4,9,42</sup> aunque su densidad óptica fue demasiado baja para ser detectada, sugiriendo que una pequeña cantidad de CD9 esta intracelularmente distribuida en el eosinófilo. Esta observación confirmó nuestros resultados de marcado inmunoáureo y MBLC, los cuales sugirieron que la inmunoreactividad de RANTES solamente colocaliza parcialmente en los gránulos secretorios de células no estimuladas. En este ejemplo se encontró que los eosinófilos no estimulados almacenaban aproximadamente 72 pg de RANTES/10<sup>6</sup> células.

En eosinófilos subfraccionados la estimulación con IFN $\gamma$  (500 U/ml) indujo un drástico cambio en la distribución de la inmunoreactividad de RANTES. Esta disminuyó rápidamente en las fracciones asociadas a membranas ligeras después de 10 minutos de estimulación con IFN $\gamma$  (Fig. 13B), mientras alguna inmunoreactividad permaneció dentro de las fracciones asociadas a los gránulos. Los eosinófilos almacenaron aproximadamente 23 pg de actividad específica de RANTES por cada 10<sup>6</sup> células después de ser estimulados con IFN $\gamma$  durante 10 minutos lo que significa una reducción del 68% si lo comparamos con el de las células no estimuladas. Sin embargo, los eosinófilos estimulados con IFN $\gamma$  por 60 minutos mostraron una marcada pérdida de inmunoreactividad de RANTES en las fracciones correspondientes al pico de actividad secretoria granular (Fig. 13C), esta inmunoreactividad fue translocada a las fracciones asociadas a la membrana plasmática representando un 49% de la cantidad medida en células no estimuladas (35 pg RANTES/10<sup>6</sup> células). Estos resultados coinciden con aquellos de MBLC, en los cuales los eosinófilos mostraron actividad reducida de RANTES después de la estimulación con IFN $\gamma$  (Fig. 11J, K). Cada perfil de subfracciones fue preparado en diferentes ocasiones del mismo

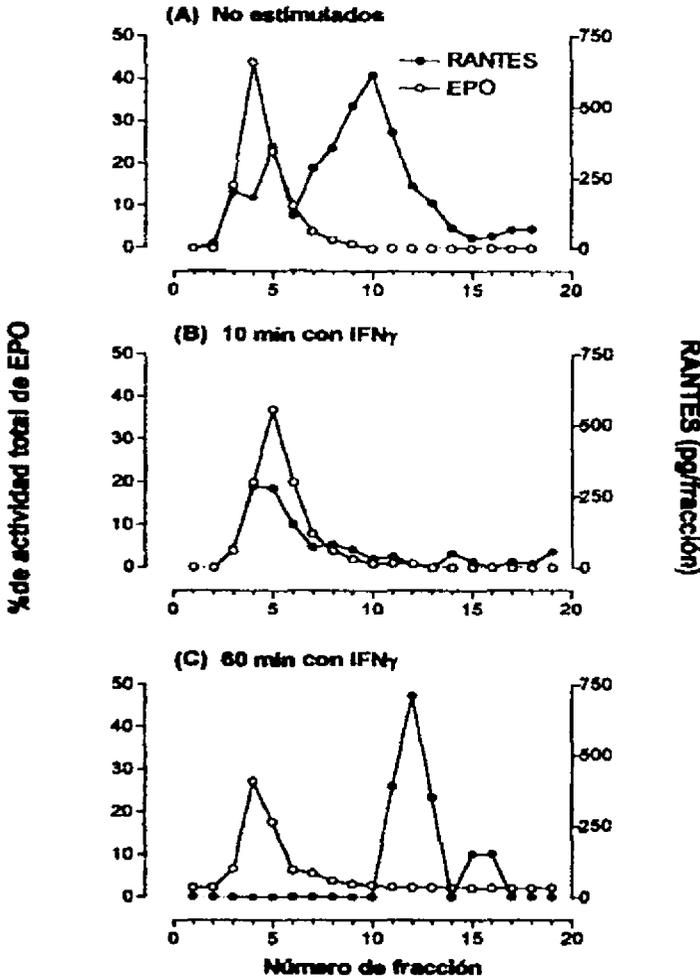
donador para permitir la comparación del testigo y células estimuladas. Los eosinófilos estimulados con IFN $\gamma$  mostraron perfiles de actividad de EPO similares a los de células no estimuladas (Fig. 13), no obstante que el pico de actividad de EPO apareció disminuido parcialmente después de 60 minutos de estimulación con IFN $\gamma$ .

Figura 12



Fraccionamiento subcelular de eosinófilos de sangre periférica ( $5 \times 10^7$ ) de donadores asmáticos. Las fracciones fueron recolectadas de gradientes lineales de Nycodenz (0 - 45%) y analizados para actividad de marcadores enzimáticos a fin de obtener los perfiles de los compartimentos subcelulares. Los marcadores utilizados fueron la EPO (gránulos secretorios), la b-hexosaminidasa (gránulos secretorios y lisosomales), CD9 (membrana plasmática) y deshidrogenasa láctica (citósol). La cuantificación de RANTES fue hecha con un equipo de ELISA en cada una de las fracciones y expresada como pg/fracción.

Figura 13



Fraccionamiento subcelular de eosinófilos en reposo y estimulados con IFN $\gamma$  ( $5 \times 10^7$  por fraccionamiento). Estos experimentos fueron conducidos a diferentes tiempos usando eosinófilos circulantes del mismo donador. La inmunoreactividad de RANTES fue determinada en fracciones individuales con un equipo de ELISA siendo expresada como pg/fracción. Los perfiles de actividad de EPO son mostrados aquí para comparación. (A) Eosinófilos no estimulados, (B) eosinófilos estimulados con IFN $\gamma$  (500U/ml) durante 10 min, (C) 60 min.

## Discusión

Hemos mostrado por primera vez que la inmunoreactividad de RANTES en los eosinófilos humanos esta asociada con la matriz de los gránulos cristaloides. Esto se basa en su cercana deposición al marcador proteico del centro del granulo cristalino MBP. Interesantemente, RANTES fue además detectado en compartimentos extragranulares distintos de los consabidos gránulos eosinofílicos que contienen MBP y EPO, dichos compartimentos granulares fueron prontamente liberados en respuesta a IFN $\gamma$ . Proponemos que la rápida movilización de RANTES esta confinada dentro de un conglomerado putativo de vesículas secretorias pequeñas que es físicamente distinto del granulo cristaloides.

El perfil de la inmunoreactividad de RANTES en las fracciones de eosinófilos no estimulados sugiere que el pico mayor esta probablemente asociado con vesículas pequeñas de baja densidad las cuales a su vez poseen mayor densidad que la membrana plasmática. Es importante notar que estas fracciones se diferencian completamente de las membranas endosomales, el Golgi y la membrana plasmática<sup>41 43</sup>. Las fracciones ligeras de membranas probablemente contienen estructuras vesiculotubulares previamente descritas en los eosinófilos<sup>44</sup>.

Se observó que el IFN $\gamma$  activó la liberación de RANTES de los eosinófilos junto con otras dos proteínas asociadas a los gránulos, EPO y  $\beta$ -hexosaminidasa. Invariablemente, los niveles de RANTES en los sobrenadantes disminuyeron a niveles basales después de 240 minutos de incubación. De manera similar los niveles de EPO se encontraron que disminuían después de 120 minutos de incubación (Fig 9). Estas observaciones sugieren que ambos RANTES y EPO pueden ser secuestrados por superficies membranales durante

la prueba después de su liberación. Una vez liberado el EPO es probable que se suelte de las superficies debido a su naturaleza altamente cationica (punto isoeléctrico [pI] de 10.8) 37,38

En suma, RANTES es rápidamente secuestrado por los glucosaminoglicanos de las superficies celulares después que es secretada, lo cual alienta la adhesión y activación de las células que responden a esta citocina <sup>45</sup>. En nuestros estudios de subfraccionamiento se observó que la inmunoreactividad de RANTES se desplazó a un pico de muy baja densidad después de 60 minutos de estimulación con  $IFN\gamma$ , ubicado a la derecha del pico de baja densidad de RANTES en células no estimuladas (Fig 13A y C). Este desplazamiento en la inmunoreactividad de RANTES sugiere que el RANTES liberado puede adherirse a los glicosaminoglicanos que cubren la superficie de los eosinófilos. Apoyan la posibilidad de que los productos específicos de los eosinófilos pueden adherirse a las superficies membranales durante las determinaciones el aumento en los sobrenadantes de la enzima no cationica granular  $\beta$ -hexosaminidasa (pI predicho de 5.4 a 5.9) encontrado durante la incubación con  $IFN\gamma$  (Fig 9B).

Con nuestros estudios sobre los efectos del  $IFN\gamma$  en la movilización de RANTES aportamos evidencia de la existencia de vesículas putativas pequeñas en los eosinófilos. De acuerdo a los datos recabados por MBLC, la inmunoreactividad de RANTES es transferida a la periferia de las células durante la estimulación con  $IFN\gamma$ , presumiblemente a un compartimento vesicular diferente de los gránulos cristaloides. Mas aún, el perfil de fraccionamiento subcelular de RANTES en células estimuladas con  $IFN\gamma$  (después de 10 minutos) mostró que abatido mucho del RANTES asociado con fracciones de densidad

ligera, mientras que el RANTES asociado a los gránulos se mantuvo a un nivel equivalente al de las células no estimuladas. La observación de que el IFN $\gamma$  ejerce un efecto tan rápido en la movilización y liberación de RANTES derivado de eosinófilos fue novedosa y atractiva. Esto es complementario a un reporte anterior, en el cual el IFN $\gamma$  (1000 U/ml) aumenta tanto la expresión del RNAm específico así como la producción proteica de RANTES en los eosinófilos después de 16hrs de estimulación <sup>13</sup>, y apoya nuestros hallazgos de un rápido aumento en la inmunoreactividad de IL-6 en eosinófilos humanos de sangre periférica <sup>7</sup>. Después de 60 minutos de estimulación con IFN $\gamma$ , casi toda la inmunoreactividad de RANTES colocalizó en las membranas de baja densidad (resultados obtenidos por fraccionamiento subcelular), indicando que el RANTES asociado al gránulo cristaloides ha sido selectivamente removido y transportado vía vesículas secretorias pequeñas.

Estas observaciones sugieren que los eosinófilos poseen un mecanismo único para la liberación regulada y selectiva de mediadores almacenados en los gránulos cristaloides. Este mecanismo se efectúa, probablemente, a través de la exocitosis de una población de vesículas pequeñas de densidad ligera. Tales vesículas secretorias ligeras, pueden ser responsables del acarreo de proteínas granulares descrito en reportes previos <sup>46</sup>. Un patrón similar de desgranulación gradual ha sido propuesto *in vivo*, basándose en observaciones de microscopía electrónica de eosinófilos desgranulando <sup>44</sup>. Estudios previos han mostrado que los eosinófilos llevan a cabo la desgranulación en respuesta a agonistas como la gama GTP $\gamma$ S aplicados intracelularmente <sup>35,47</sup>, aunque los mecanismos de liberación exocítica no han sido completamente elucidados. Actualmente estamos investigando la identidad de las

pequeñas vesículas secretorias putativas para determinar su colocalización con proteínas eosinofílicas intracelulares conocidas.

El IFN $\gamma$  es capaz de estimular a los eosinófilos *in vitro*, de aumentar la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) <sup>31</sup> e incrementar la expresión de Fc $\gamma$ RIII (CD16) <sup>32</sup> y CD69 <sup>33</sup>. El IFN $\gamma$  además estimula la liberación y/o aumento de varias citocinas eosinofílicas, incluyendo IL-3 <sup>48</sup>, IL-6 <sup>6,7</sup>, GM-CSF <sup>8,10</sup> y RANTES <sup>13</sup>. La expresión de receptores funcionales para IFN $\gamma$  en eosinófilos humanos de sangre periférica ha sido descrita recientemente <sup>49</sup>. Estos experimentos y otros por venir aportaran más información a la intrigante observación de que el IFN $\gamma$  puede inducir cambios rápidos en la expresión de citocinas, aumento de receptores y liberación de mediadores en eosinófilos.

La activación de la liberación de RANTES en eosinófilos estimulados con IFN $\gamma$  fue específica, como lo muestra la inhibición con genestina, un inhibidor de tirosina cinasa de amplio espectro. Esto sugiere que el IFN $\gamma$  actúa en esas células por medio de su receptor específico el cual a su vez activa la ruta Jak-STAT <sup>40</sup>. Mas aun, otras citocinas como IFN $\alpha$ , IL-3, IL-5 y GM-CSF tuvieron poco o nulo efecto en la inmunoreactividad de RANTES o su liberación en los sobrenadantes (Fig. 11Q; dato no mostrado). Es poco probable que los efectos de IFN $\gamma$  fueran mediados por LPS ya que los medios de cultivo con o sin IFN $\gamma$  empleados en este estudio, fueron negativos para LPS, determinado por pruebas rutinarias de E-Toxate (dato no mostrado).

Todos los eosinófilos probados en estos experimentos provinieron de sujetos atópicos. Es posible que los efectos del IFN $\gamma$  en la movilización de RANTES fueran debidos a un aumento en la susceptibilidad de estas células a esta citocina por un estado de sensibilización

previa <sup>50</sup>. Sin embargo, también hemos detectado una inducción por IFN $\gamma$  en la liberación de RANTES intracelular, en eosinófilos obtenidos de individuos atópicos no asmáticos. Así, concluimos que es poco probable que la capacidad de los eosinófilos de generar una respuesta diferencial a IFN $\gamma$  sea dependiente del estatus asmático del donador.

Estudios con seres humanos y roedores proponen que las citocinas liberadas durante las reacciones inmunes e inflamatorias sigue una dicotomía del tipo Th1 y Th2 en sus respuestas dependiendo de la naturaleza del estímulo entregada al sistema inmune. En infecciones bacterianas y virales concomitantes con supresión de atopia, la liberación de IFN $\gamma$  se ha asociado a una respuesta de citocinas del tipo Th1 <sup>51,52</sup>. Por otro lado, los eosinófilos son relegados como células efectoras del tipo Th2 con el potencial de responder a citocinas del tipo Th2 no obstante estar asociadas con el fenotipo alérgico <sup>2,53,54</sup>. Sin embargo, la distinción entre perfiles de citocinas Th1 y Th2 en la mayoría de los casos de infección e inflamación en humanos es poco clara. Así, mientras el IFN $\gamma$  inhibe potencialmente la maduración granulocítica y su proliferación en la médula ósea <sup>55</sup>, los niveles de IFN $\gamma$  se incrementan en el suero de pacientes con asma severa aguda, la cual presenta entre otras cosas eosinofilia en pulmones y tejidos <sup>56,57</sup>. El significado de estos hallazgos puede ser que el IFN $\gamma$  tenga un papel en la regulación de la homeostasis de eosinófilos, estimulando la completa maduración de estas células localmente mientras previene la eosinofilia excesiva, como ha sugerido Velerius et al. <sup>31</sup>. Es tentador especular que el IFN $\gamma$  liberado por células inmunes e inflamatorias infectadas con virus, dentro de la mucosa aérea de individuos asmáticos, pueda contribuir a la activación de eosinófilos residentes de vías aéreas durante la exacerbación viral de los ataques asmáticos <sup>58</sup>.

Es probable que el RANTES eosinofílico una vez liberado, por su bioactividad, juegue un papel en la señalización paracrina, autocrina o juxtacrina sobre otros eosinófilos. *In vitro* al menos, esto ya ha sido demostrado <sup>13</sup>. Además de RANTES, los eosinófilos contienen otras citocinas en sus gránulos secretorios, como IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, TNF $\alpha$  y GM-CSF <sup>4,7,9,10,59,60</sup>. El almacenamiento de citocinas como mediadores preformados dentro de los gránulos secretorios y su rápida liberación posterior a la estimulación podría conferir a los eosinófilos el potencial para regular las respuestas inflamatorias localmente. Muchas de las citocinas derivadas de eosinófilos hasta ahora descritas, son producidas en pequeñas proporciones cuando se comparan con aquellas provenientes de otras células inmunes, como los linfocitos T. Sin embargo, al contrario de los eosinófilos, los linfocitos T no se sabe que posean capacidad para almacenar citocinas. En asma por ejemplo, las citocinas producidas por un afluente ingreso de eosinófilos activamente desgranulando dentro de las vías aéreas, probablemente prolonguen la sobrevivencia de estas células y perpetúen la respuesta inflamatoria. Estas interesantes observaciones ampliarían nuestro conocimiento de las citocinas y/o red de citocinas que regulan los procesos de activación de los eosinófilos, de la actividad de estas células como mediadoras de eventos conducentes a la secreción de más citocinas, quimocinas y particularmente proteínas granulares con su reconocida secuela dañina en la inflamación alérgica.

## Referencias

1. Gleich, G. J., C. R. Adolphson, and K. M. Leiferman. 1993. The biology of the eosinophilic leukocyte. *Annu. Rev. Med.* 44:85-101.
2. Wardlaw, A. J., R. Moqbel, and A. B. Kay. 1995. Eosinophils: biology and role in disease. *Adv. Immunol.* 60:151-266.
3. Bosse, M., M. Audette, C. Ferland, G. Pelletier, H. W. Chu, A. Dakhama, S. Lavigne, L. P. Boulet, and M. Laviolette. 1996. Gene expression of interleukin-2 in purified human peripheral blood eosinophils. *Immunology* 87:149-154.
4. Levi-Schaffer, F., J. Barkans, T. M. Newman, S. Ying, M. Wakelin, R. Hohenstein, V. Barak, P. Lacy, A. B. Kay, and R. Moqbel. 1996. Identification of interleukin-2 in human peripheral blood eosinophils. *Immunology* 87:155-161.
5. Moqbel, R., S. Ying, J. Barkans, T. M. Newman, P. Kimmitt, M. Wakelin, L. Taborda-Barata, Q. Meng, C. J. Corrigan, and S. R. Durham. 1995. Identification of messenger RNA for IL-4 in human eosinophils with granule localization and release of the translated product. *J. Immunol.* 155:4939-4947.
6. Hamid, Q., J. Barkans, Q. Meng, S. Ying, J. S. Abrams, A. B. Kay, and R. Moqbel. 1992. Human eosinophils synthesize and secrete interleukin-6, in vitro. *Blood* 80:1496-1501.
7. Lacy, P., F. Levi-Schaffer, S. Mahmudi-Azer, B. Bablitz, S. C. Hagen, J. Velazquez, A. B. Kay, and R. Moqbel. 1998. Intracellular localization of interleukin-6 in eosinophils from atopic asthmatics and effects of interferon gamma. *Blood* 91:2508-2516.
8. Kita, H., T. Ohnishi, Y. Okubo, D. Weiler, J. S. Abrams, and G. J. Gleich. 1991. Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and interleukin 3 release from human peripheral blood eosinophils and neutrophils. *J. Exp. Med.* 174:745-748.
9. Levi-Schaffer, F., P. Lacy, N. J. Severs, T. M. Newman, J. North, B. Gomperts, A. B. Kay, and R. Moqbel. 1995. Association of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor with the crystalloid granules of human eosinophils. *Blood* 85:2579-2586.
10. Moqbel, R., Q. Hamid, S. Ying, J. Barkans, A. Hartnell, A. Tsicopoulos, A. J. Wardlaw, and A. B. Kay. 1991. Expression of mRNA and immunoreactivity for the granulocyte/macrophage colony-stimulating factor in activated human eosinophils. *J. Exp. Med.* 174:749-752.
11. Chihara, J., H. Oyamada, H. Yamada, A. Tsuda, Y. Kamada, and O. Urayama. 1997. Expression of mRNA for RANTES in human eosinophils. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 114 Suppl 1:33-35.

12. Lim, K. G., H. C. Wan, P. T. Bozza, M. B. Resnick, D. T. Wong, W. W. Cruikshank, H. Kornfeld, D. M. Center, and P. F. Weller. 1996. Human eosinophils elaborate the lymphocyte chemoattractants. IL-16 (lymphocyte chemoattractant factor) and RANTES. *J.Immunol.* 156:2566-2570.
13. Ying, S., Q. Meng, L. Taborda-Barata, C. J. Corrigan, J. Barkans, B. Assoufi, R. Moqbel, S. R. Durham, and A. B. Kay. 1996. Human eosinophils express messenger RNA encoding RANTES and store and release biologically active RANTES protein. *Eur.J.Immunol.* 26:70-76.
14. Anwar, A. R., R. Moqbel, G. M. Walsh, A. B. Kay, and A. J. Wardlaw. 1993. Adhesion to fibronectin prolongs eosinophil survival. *J.Exp.Med.* 177:839-843.
15. Baggiolini, M. and C. A. Dahinden. 1994. CC chemokines in allergic inflammation. *Immunol.Today* 15:127-133.
16. Kameyoshi, Y., A. Dorschner, A. I. Mallet, E. Christophers, and J. M. Schroder. 1992. Cytokine RANTES released by thrombin-stimulated platelets is a potent attractant for human eosinophils. *J.Exp.Med.* 176:587-592.
17. Schall, T. J., K. Bacon, K. J. Toy, and D. V. Goeddel. 1990. Selective attraction of monocytes and T lymphocytes of the memory phenotype by cytokine RANTES. *Nature* 347:669-671.
18. Taub, D., J. Dastych, N. Inamura, J. Upton, D. Kelvin, D. Metcalfe, and J. Oppenheim. 1995. Bone marrow-derived murine mast cells migrate, but do not degranulate, in response to chemokines. *J.Immunol.* 154:2393-2402.
19. Devergne, O., A. Marfaing-Koka, T. J. Schall, M. B. Leger-Ravet, M. Sadick, M. Peuchmaur, M. C. Crevon, K. J. Kim, T. T. Schall, and T. Kim. 1994. Production of the RANTES chemokine in delayed-type hypersensitivity reactions: involvement of macrophages and endothelial cells [published erratum appears in *J Exp Med* 1994 Aug 1;180(2):775]. *J.Exp.Med.* 179:1689-1694.
20. Kwon, O. J., P. J. Jose, R. A. Robbins, T. J. Schall, T. J. Williams, and P. J. Barnes. 1995. Glucocorticoid inhibition of RANTES expression in human lung epithelial cells. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 12:488-496.
21. Marfaing-Koka, A., O. Devergne, G. Gorgone, A. Portier, T. J. Schall, P. Galanaud, and D. Emilie. 1995. Regulation of the production of the RANTES chemokine by endothelial cells. Synergistic induction by IFN-gamma plus TNF-alpha and inhibition by IL-4 and IL-13. *J.Immunol.* 154:1870-1878.
22. Rathanaswami, P., M. Hachicha, M. Sadick, T. J. Schall, and S. R. McColl. 1993. Expression of the cytokine RANTES in human rheumatoid synovial fibroblasts. Differential regulation of RANTES and interleukin-8 genes by inflammatory cytokines. *J.Biol.Chem.* 268:5834-5839.
23. Selvan, R. S., J. H. Butterfield, and M. S. Krangel. 1994. Expression of multiple chemokine genes by a human mast cell leukemia. *J.Biol.Chem.* 269:13893-13898.

24. Beck, L. A., S. Dalke, K. M. Leiferman, C. A. Bickel, R. Hamilton, H. Rosen, B. S. Bochner, and R. P. Schleimer. 1997. Cutaneous injection of RANTES causes eosinophil recruitment: comparison of nonallergic and allergic human subjects. *J.Immunol.* 159:2962-2972.
25. Berkman, N., V. L. Krishnan, T. Gilbey, R. Newton, B. O'Connor, P. J. Barnes, and K. F. Chung. 1996. Expression of RANTES mRNA and protein in airways of patients with mild asthma. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 154:1804-1811.
26. Fahy, J. V., D. J. Figueroa, H. H. Wong, J. T. Liu, and J. S. Abrams. 1997. Similar RANTES levels in healthy and asthmatic airways by immunoassay and in situ hybridization. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 155:1095-1100.
27. Holgate, S. T., K. S. Bodey, A. Janezic, A. J. Frew, A. P. Kaplan, and L. M. Teran. 1997. Release of RANTES, MIP-1 alpha, and MCP-1 into asthmatic airways following endobronchial allergen challenge. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 156:1377-1383.
28. Rajakulasingam, K., Q. Hamid, F. O'Brien, E. Shotman, P. J. Jose, T. J. Williams, M. Jacobson, J. Barkans, and S. R. Durham. 1997. RANTES in human allergen-induced rhinitis: cellular source and relation to tissue eosinophilia. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 155:696-703.
29. Chuluyan, H. E., T. J. Schall, T. Yoshimura, and A. C. Issekutz. 1995. IL-1 activation of endothelium supports VLA-4 (CD49d/CD29)-mediated monocyte transendothelial migration to C5a, MIP-1 alpha, RANTES, and PAF but inhibits migration to MCP-1: a regulatory role for endothelium-derived MCP-1. *J.Leukoc.Biol.* 58:71-79.
30. Kuna, P., S. R. Reddigari, T. J. Schall, D. Rucinski, M. Y. Veksman, and A. P. Kaplan. 1992. RANTES, a monocyte and T lymphocyte chemotactic cytokine releases histamine from human basophils. *J.Immunol.* 149:636-642.
31. Valerius, T., R. Repp, J. R. Kalden, and E. Platzer. 1990. Effects of IFN on human eosinophils in comparison with other cytokines. A novel class of eosinophil activators with delayed onset of action. *J.Immunol.* 145:2950-2958.
32. Hartnell, A., A. B. Kay, and A. J. Wardlaw. 1992. IFN-gamma induces expression of Fc gamma RIII (CD16) on human eosinophils. *J.Immunol.* 148:1471-1478.
33. Hartnell, A., D. S. Robinson, A. B. Kay, and A. J. Wardlaw. 1993. CD69 is expressed by human eosinophils activated in vivo in asthma and in vitro by cytokines. *Immunology* 80:281-286.
34. Hansel, T. T., I. J. De Vries, T. Iff, S. Rihs, M. Wandzilak, S. Betz, K. Blaser, and C. Walker. 1991. An improved immunomagnetic procedure for the isolation of highly purified human blood eosinophils. *J.Immunol.Methods* 145:105-110.
35. Cromwell, O., J. P. Bennett, I. Hide, A. B. Kay, and B. D. Gomperts. 1991. Mechanisms of granule enzyme secretion from permeabilized guinea pig eosinophils. Dependence on Ca<sup>2+</sup> and guanine nucleotides. *J.Immunol.* 147:1905-1911.

36. Bach, M. K., J. R. Brashler, E. N. Petzold, and M. E. Sanders. 1992. Superoxide production by human eosinophils can be inhibited in an agonist-selective manner. *Agents Actions* 35:1-11.
37. Bach, M. K., J. R. Brashler, M. E. Sanders, and M. J. Bienkowski. 1991. Pitfalls in the quantitative estimation of the secretion of granule proteins by eosinophils. *J.Immunol.Methods* 142:243-250.
38. Menegazzi, R., G. Zabucchi, A. Knowles, R. Cramer, and P. Patriarca. 1992. A new, one-step assay on whole cell suspensions for peroxidase secretion by human neutrophils and eosinophils. *J.Leukoc.Biol.* 52:619-624.
39. Mahmudi-Azer, S., P. Lacy, B. Bablitz, and R. Moqbel. 1998. Inhibition of nonspecific binding of fluorescent-labelled antibodies to human eosinophils. *J.Immunol.Methods* 217:113-119.
40. Boehm, U., T. Klamp, Groot M, and J. C. Howard. 1997. Cellular responses to interferon gamma. *Annu Rev Immunol* 15:749.
41. Lacy, P., N. Thompson, M. Tian, R. Solari, I. Hide, T. M. Newman, and B. D. Gomperts. 1995. A survey of GTP-binding proteins and other potential key regulators of exocytotic secretion in eosinophils. Apparent absence of rab3 and vesicle fusion protein homologues. *J.Cell Sci.* 108 ( Pt 11):3547-3556.
42. Fernvik, E., G. Hallden, J. Hed, and J. Lundahl. 1995. Intracellular and surface distribution of CD9 in human eosinophils. *APMIS* 103:699-706.
43. Evans WH. *Biological Membranes: A practical approach*. IRL, Oxford UK.
44. Dvorak, A. 1994. Ultrastructural studies on mechanisms of human eosinophil activation and secretion. In *Eosinophils in Allergy and Inflammation*. G. Gleich and A. Kay, eds. Marcel Dekker, New York, NY, p. 159.
45. Gilat, D., R. Hershkoviz, Y. A. Mekori, I. Vlodavsky, and O. Lider. 1994. Regulation of adhesion of CD4+ T lymphocytes to intact or heparinase- treated subendothelial extracellular matrix by diffusible or anchored RANTES and MIP-1 beta. *J.Immunol.* 153:4899-4906.
46. Capron, M., M. Tomassini, G. Torpier, J. P. Kusnierz, S. MacDonald, and A. Capron. 1989. Selectivity of mediators released by eosinophils. *Int.Arch.Allergy Appl.Immunol.* 88:54-58.
47. Nusse, O., M. Lindau, O. Cromwell, A. B. Kay, and B. D. Gomperts. 1990. Intracellular application of guanosine-5'-O-(3-thiotriphosphate) induces exocytotic granule fusion in guinea pig eosinophils. *J.Exp.Med.* 171:775-786.
48. Fujisawa, T., S. Fukuda, J. Atsuta, R. Ichimi, H. Kamiya, and M. Sakurai. 1994. Interferon-gamma induces interleukin-3 release from peripheral blood eosinophils. *Int.Arch.Allergy Immunol.* 104 Suppl 1:41-43.

49. Ishihara, C., K. Ochiai, M. Kagami, H. Takashahi, G. Matsuyama, S. Yoshida, H. Tomioka, and N. Koya. 1997. Human peripheral eosinophils express functional interferon-gamma receptors (IFN-gammaR). *Clin.Exp.Immunol.* 110:524-529.
50. Schmi, R., O. Cromwell, A. Wardlaw, R. Moqbel, and A. Kay. 1993. Interleukin-8 is a chemo-attractant for eosinophils purified from subjects with a blood eosinophilia but not from normal healthy subjects. *Clin Exp Allergy* 23:1027.
51. Mosmann, T. and S. Sad. 1996. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today* 17:138.
52. Romagnani, S. 1991. Th1 and Th2 subsets: Doubt no more. *Immunol Today* 12:256.
53. Lee, N. A., M. P. McGarry, K. A. Larson, M. A. Horton, A. B. Kristensen, and J. J. Lee. 1997. Expression of IL-5 in thymocytes/T cells leads to the development of a massive eosinophilia, extramedullary eosinophilopoiesis, and unique histopathologies. *J.Immunol.* 158:1332-1344.
54. Foster, P., S. Hogan, A. Ramsay, K. Matthaei, and I. Young. 1996. Interleukin 5 deficiency abolishes eosinophilia, airways hyperreactivity, and lung damage in a mouse asthma model. *J Exp Med* 183:195.
55. Pelus, L., O. Ottmann, and K. Nocka. 1988. Synergistic inhibition of human marrow granulocyte-macrophage progenitor cells by prostaglandin E and recombinant interferon alpha, beta and gamma and an effect mediated by tumor necrosis factor. *J Immunol* 140:479.
56. Corrigan, C. and A. Kay. 1999. CD4 T-lymphocyte activation in acute severe asthma. Relationship to disease severity and atopic status. *Am Rev Respir Dis* 141:970.
57. Saito, H., T. Hayakawa, H. Mita, Y. Yui, and T. Shida. 1988. Aumentation of leukotriene C4 production by gamma interferon in leukocytes challenged with an allergen. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 87:286.
58. Fraenkel, D., P. Bardin, G. Sanderson, F. Lumpe, S. Johnston, and S. Holgate. 1995. Lower airways inflammation during rhinovirus colds in normal and in asthmatic subjects. *Am J Respir Crit Care Med* 151:879.
59. Beil, W. J., P. F. Weller, D. M. Tzizik, S. J. Galli, and A. M. Dvorak. 1993. Ultrastructural immunogold localization of tumor necrosis factor-alpha to the matrix compartment of eosinophil secondary granules in patients with idiopathic hypereosinophilic syndrome. *J.Histochem.Cytochem.* 41:1611-1615.
60. Dubucquoi, S., P. Desreumaux, A. Janin, O. Klein, M. Goldman, J. Tavernier, A. Capron, and M. Capron. 1994. Interleukin 5 synthesis by eosinophils: association with granules and immunoglobulin-dependent secretion. *J.Exp.Med.* 179:703-708.

## CAPITULO IV

### Discusión

Los mecanismos responsables para el reclutamiento selectivo de eosinófilos y linfocitos T en los sitios de inflamación son diversos. Sin duda la producción localizada de RANTES en sitios específicos es uno de los eventos cruciales en dicho proceso. Los eosinófilos son potentes células efectoras en la inflamación de tipo alérgico, dada su capacidad para sintetizar, almacenar y liberar hasta 19 diferentes citocinas y factores de crecimiento <sup>270</sup>.

El RANTES fue descrito inicialmente en linfocitos T activados, lo cual continuaba la tradición de colocar a estas células como orquestadores inmunológicos. Sin embargo, el descubrimiento de la capacidad de los eosinófilos para generar RANTES, abrió la posibilidad de que estas células estuvieran involucradas en procesos de regulación paracrina de linfocitos T y autocrina de eosinófilos.

Los primeros intentos por establecer la naturaleza constitutiva o inducible de RANTES se hicieron utilizando eosinófilos de sangre periférica de sujetos atópicos. Estos estudios mostraron una producción basal del RNAm de RANTES que aumentaba cuando los eosinófilos eran incubados con IFN $\gamma$  <sup>271,272</sup>. La forma proteica de RANTES pudo ser detectada en una pequeña proporción de eosinófilos que aumentaba en número cuando estas células eran incubadas con IFN $\gamma$ . Los datos anteriores apuntaban - al menos en donadores atópicos - hacia una generación *de novo* de RANTES.

Ying y col. emplearon RT-PCR e hibridización *in situ* para una determinación más precisa del porcentaje de eosinófilos productores de RANTES en donadores atópicos. Este grupo

encontró que únicamente el 6.8 - 10% de los eosinófilos expresaban RNAm de RANTES, no obstante este porcentaje aumentaba al 25% después de que las células eran incubadas con IFN $\gamma$ <sup>273</sup>.

Hasta este punto, era patente el efecto regulador del IFN $\gamma$  sobre RANTES, pero el empleo de eosinófilos que provenían de individuos enfermos no libraba de cierto escepticismo los resultados obtenidos. El advenimiento de mejores técnicas de purificación de eosinófilos, así como de métodos de detección de citocinas más sensibles, permitió el análisis de la expresión genética de RANTES y otras citocinas en eosinófilos de individuos normales. Los eosinófilos de donadores sanos no estimulados y estimulados con sIgA, IgA, IgG y TNF $\alpha$  en presencia o ausencia de IL-5, expresaron RNAm específico de RANTES en 25% de los casos probados, independientemente de la presencia o naturaleza del estímulo<sup>127</sup>. Otro estudio señala que hubo expresión de RNAm de RANTES en donadores normales (10 de 11 casos) pudiendo ser detectada la forma proteica de RANTES dentro y fuera de eosinófilos en reposo<sup>274</sup>.

Los eosinófilos también pueden producir IL-4; citocina involucrada en la generación de linfocitos Th1 y supresión de los Th2, así como en la promoción del cambio de isotipo IgE<sup>248</sup>. La IL-4 es un débil quimioattractante para eosinófilos y quizás su papel más relevante en estas células sea la inducción de la expresión de la molécula de adhesión vascular 1 (VCAM-1) en células epiteliales venosas umbilicales humanas (HUVEC)<sup>275</sup>. Dado que el reconocimiento antígeno muy tardío 4 (VLA-4) - ICAM-1 es necesario para la adhesión y trans migración de eosinófilos a través de epitelios, que este mecanismo podría explicar la migración selectiva de eosinófilos en algunos sitios inflamatorios.

El empleo de técnicas de microscopía electrónica con marcado inmunoáureo y fraccionamiento celular mostró que los eosinófilos son capaces de traducir y transcribir IL-4<sup>276</sup>. Más aún, esta citocina se almacena intracelularmente asociándose con los gránulos cristaloides eosinofílicos. *In vitro* la liberación de IL-4 hacia el medio externo se estimula con partículas recubiertas con suero<sup>276</sup>. Los eosinófilos de donadores sanos recién aislados o incubados en medio solo son capaces de transcribir y traducir IL-4<sup>127</sup>. Debido a que la IL-4 no es liberada espontáneamente al medio y el tratamiento con actinomicina D reduce su contenido intracelular, se concluyó que es sintetizada *de novo* y constitutivamente<sup>127</sup>.

La evidencia aportada en los trabajos arriba descritos apoya la expresión constitutiva de RANTES e IL-4 en un buen porcentaje de eosinófilos de sangre periférica independientemente del estatus del donador. En el desarrollo de esta tesis tratamos de estudiar más a fondo la naturaleza constitutiva o inducible de la expresión de RANTES e IL-4 enfocando nuestra atención en la aparición de dichas citocinas durante la diferenciación celular de los eosinófilos. Nuestro esfuerzo por establecer un buen sistema de estudio para la proliferación y diferenciación eosinofílica nos condujo a la innovación de un método de cultivo semi sólido que emplea células CD34+<sup>277-279</sup>. Nuestro método de cultivo mostró las siguientes ventajas sobre los cultivos líquidos tradicionalmente empleados en estas células:

Ausencia de contaminación con otros tipos celulares en suspensión y un alto grado de pureza, diferenciación y maduración eosinofílica (>90%); debido a que cada colonia teóricamente derivó de un solo progenitor eosinofílico.

Valiéndonos de esta metodología, que sin duda será de gran utilidad en posteriores estudios de diferenciación celular eosinofílica, establecimos el patrón de producción de citocinas y el periodo específico de aparición para cada una de ellas en eosinófilos gestantes. No deja de ser interesante y sugestivo el hallazgo de que RANTES e IL-4 además de ser citocinas constitutivas sean de temprana aparición en el desarrollo y diferenciación eosinofílica. Considerando el carácter quimiotáctico de RANTES para linfocitos T y eosinófilos, parecería que de alguna forma los progenitores al sintetizar esta quimocina garantizarían una retroalimentación positiva y la cooperación o participación de otras células que ayudarían a amplificar o llevar a término el proceso de eosinopoyesis. En el caso de la IL-4 ya contábamos con evidencia que sugería su participación en la diferenciación eosinofílica y basófilica <sup>280</sup>. En nuestro sistema semi sólido observamos que la diferenciación celular es casi exclusivamente de eosinófilos, dejando abierta la posibilidad de que RANTES, IL-3 e IL-5 pudieran influir de una forma más decisiva hacia la diferenciación eosinofílica ya sea por acción directa sobre los progenitores o por inhibición de otras citocinas participantes. Es bien conocida la influencia de las citocinas IL-3 e IL-5 <sup>281-283</sup> y ocasionalmente de la IL-4 <sup>280</sup> en la diferenciación eosinofílica, sin embargo nuestros resultados sugieren que la combinación de citocinas IL-4 y RANTES podrían tener un peso específico hasta ahora insospechado en este proceso. Una vez observada la naturaleza constitutiva de RANTES e IL-4 a lo largo de la ontogenia eosinofílica nos propusimos investigar la localización intracelular y mecanismos de secreción de RANTES habida cuenta del efecto inducido por el IFN $\gamma$  en la producción de esta quimocina en eosinófilos.

Poco se sabe acerca de los mecanismos celulares reguladores de la producción de RANTES, sin embargo, el análisis de experimentos que utilizan cultivos celulares ha permitido el discernimiento de los siguientes factores:

Factor viral. Células de tracto respiratorio bajo cultivadas con virus sincicial respiratorio (VSR) e IFN $\gamma$  incrementan su producción de RANTES <sup>284</sup>. Por otro lado en células epiteliales adenoides y nasales, la sola presencia *in vitro* del VSR fue capaz de inducir una respuesta de RANTES dependiente de la dosis empleada <sup>285</sup>. El virus de la influenza también estimula la producción de RANTES, IL-6 e IL-8 en células del epitelio bronquial <sup>286</sup>. El citomegalovirus es capaz de inducir la producción de RANTES en fibroblastos nasales siempre y cuando el virus este acompañado de TNF $\alpha$ , IL-1 o IFN $\gamma$  en cultivo <sup>287</sup>.

Factor sinérgico de las citocinas IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  e IL-1. La relación entre ellas ha sido estudiada en células del epitelio lobular proximal y en queratinocitos, encontrándose que la combinación de IFN $\gamma$ , IL-1 y TNF $\alpha$  inducen un aumento en la síntesis *de novo* de RANTES <sup>288</sup>. En células del músculo respiratorio liso el TNF $\alpha$  incrementa significativamente la producción de RANTES mientras el IFN $\gamma$  solo induce un ligero aumento de dicha quimocina. Sin embargo, cuando se combinan TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$  se potencializa considerablemente la transcripción y traducción de RANTES en forma dosis dependiente <sup>289</sup>. Un efecto sinérgico similar entre TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$  se ha observado en células humanas derivadas de la conjuntiva (Wk-hc) <sup>290</sup>. En células epiteliales de la traquea la acción de IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  o IFN $\gamma$  individualmente incrementa la producción de RANTES. Sin embargo, cuando se adicionan conjuntamente dichas citocinas la expresión de RANTES es veinte veces mayor. Este efecto no se ha podido bloquear utilizando IL-4, IL-

10 e IL-3 <sup>291</sup>. Las células epiteliales bronquiales expresan constitutivamente RANTES y esta citocina aumenta bajo la acción del TNF $\alpha$  <sup>292</sup>. En células del endotelio microvascular de la mucosa (HMECs) y células del endotelio epitelial nasal (HNECs) la acción conjunta de TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$  dispara la producción de RANTES en mayor grado a como lo hace la IL-1 sola <sup>293</sup>. En monocitos cultivados con IFN $\gamma$  y TNF $\alpha$  se induce un aumento importante de RANTES jugando un papel determinante los intermediarios del oxígeno. No deja de ser interesante la reversión de este efecto potenciador por IL-10 <sup>294</sup>.

En eosinófilos humanos ignoramos si los factores arriba enunciados juegan un papel similar, no obstante, sabemos que estas células presentan receptores funcionales para IFN $\gamma$  <sup>295</sup>, cuando los eosinófilos son cultivados en presencia de IFN $\gamma$  por periodos prolongados aumentan la transcripción y traducción de RANTES <sup>273</sup> y finalmente los eosinófilos estimulados con IFN $\gamma$  adquieren un cierto grado de activación y propensión a la secreción <sup>296</sup>.

En este estudio elegimos eosinófilos de donadores atópicos asmáticos debido a su mayor disponibilidad y el IFN $\gamma$  como agente estimulador de la liberación (y síntesis) de RANTES.

Nuestra hipótesis de trabajo se basó en el supuesto de que el RANTES bajo el efecto del IFN $\gamma$  además de verse afectado en su capacidad de síntesis bien podía ser movilizado dentro de los eosinófilos y forzado eventualmente a ser secretado al exterior. Primeramente mostramos, mediante el empleo de microscopía electrónica, que el RANTES efectivamente se encuentra almacenado dentro de los gránulos específicos de los eosinófilos. Nuestros trabajos con fraccionamiento subcelular indicaron una correlación entre el RANTES y la EPO, no obstante que otra fracción no asociada a EPO con actividad de CD9 de peso

pequeño fue evidente. Debido a esto conjeturamos que el RANTES se encuentra almacenado en dos sitios distintos dentro de los eosinófilos; uno en asociación con los gránulos cristaloides y otro dentro de vesículas pequeñas. El empleo del IFN $\gamma$  como agente estimulante tuvo el efecto de movilizar rápidamente el RANTES granular hacia vesículas putativas pequeñas antes de ser liberado al exterior, como lo mostraron nuestros estudios de fraccionamiento subcelular de eosinófilos estimulados y los estudios de microscopía confocal con dos colores (RANTES / MBP). Basándonos en lo anterior, inferimos que la secreción de RANTES sigue un comportamiento de liberación gradual, muy probablemente selectiva, lo que de alguna manera recuerda la liberación de MBP por estas células<sup>297</sup>. No deja de ser interesante que sea precisamente el IFN $\gamma$  (una citocina del tipo Th1) quien propicie una rápida liberación de RANTES eosinofílico *in vitro*. Aunque cabe señalar que en un estudio que utiliza antígenos inductores de respuestas Th1 o Th2 en linfocitos humanos se encontró que la producción de RANTES estaba relacionada con el patrón de respuesta Th1. Esto se corroboró utilizando clonas de linfocitos Th1, Th2 y Th0, encontrando que sólo las Th1 eran capaces de producir RANTES<sup>298</sup>. *In vivo*, sabemos que los individuos asmáticos exhiben un aumento de IFN $\gamma$  circulante<sup>299</sup>, no obstante que diferentes trabajos señalan que el IFN $\gamma$  posee un efecto anti migratorio sobre los eosinófilos<sup>300-303</sup>. En nuestros estudios *in vitro* observamos ciertos efectos del IFN $\gamma$  sobre eosinófilos humanos, sin embargo cualquier posible relación con su símil *in vivo* esta por aclararse.

Los eosinófilos se caracterizan por poseer una función dualista, ya sea como células protectoras en la respuesta inmune celular contra los parásitos, bacterias o células

tumorales, ya como células efectoras en la patología concomitante al daño tisular producido en la inflamación crónica.

Dada la capacidad de los eosinófilos para producir citocinas, se podría pensar en un tercer papel de estas células en los eventos inmunológicos, que van desde la presentación de antígeno a la regulación de la respuesta inmune. Este tercer papel de los eosinófilos estaría basado en la capacidad de producir citocinas inmunoregulatorias del tipo Th1 y/o Th2. Existen intentos para clasificar a los eosinófilos basándose en la producción de citocinas; Lamkhioued y col., por ejemplo, reportaron la presencia de dos tipos de eosinófilos; unos productores de las citocinas IL-4, IL-5 e IL-10 y otros productores de IFN $\gamma$ <sup>139</sup>, sin embargo estas observaciones no han sido corroboradas por otros laboratorios y existe la duda en el ánimo de muchos investigadores de una clasificación parecida al de los linfocitos T<sup>304</sup>. Es indudable que si bien los eosinófilos no son fácilmente caracterizables basándose en un patrón característico de citocinas producido, estas células juegan indudablemente un papel regulatorio en los procesos inflamatorios en general y en los eventos alérgicos en particular en donde el delicado balance de citocinas producido *in situ* (Th1/Th2) desencadena diferentes respuestas estereotipadas.

## **Conclusiones**

En esta tesis se cumplió nuestro objetivo de establecer el patrón de aparición de citocinas en eosinófilos gestantes, proveyendo con esto evidencia adicional y contundente sobre la naturaleza constitutiva de las citocinas RANTES e IL-4.

Se corroboró el almacenamiento intracelular de RANTES asociado a dos tipos de estructuras eosinofílicas: los gránulos característicos y un conjunto putativo de vesículas pequeñas.

Se puso de manifiesto el efecto del IFN $\gamma$  en la rápida movilización y liberación del RANTES eosinofílico intracelular, estando este fenómeno asociado muy probablemente a un tipo de segregación específica y gradual.

## Referencias

1. Spry, C. J. 1993. The natural history of eosinophils. In *Immunopharmacology of eosinophils*. H. Smith and R. Cook, eds. Academic Press, San Diego CA, pp. 1-7.
2. Weller, P. F. 1991. The immunobiology of eosinophils. *N.Engl.J.Med.* 324:1110-1118.
3. Wardlaw, A. 1996. The eosinophil: new insights into its function in human health and disease [editorial]. *J.Pathol.* 179 :355-357.
4. Gleich, G. J. 1988. Current understanding of eosinophil function. *Hosp.Pract.(Off Ed)* 23:137-4, 159.
5. Weller, P. F., T. H. Rand, T. Barrett, A. Elovic, D. T. Wong, and R. W. Finberg. 1993. Accessory cell function of human eosinophils. HLA-DR-dependent, MHC- restricted antigen-presentation and IL-1 alpha expression. *J.Immunol.* 150:2554-2562.
6. Sokol, R. J., N. T. James, J. Wales, and G. Hudson. 1987. Morphometry of eosinophils in human blood. *Acta Anat.(Basel)* 129:211-213.
7. Dvorak, A. M., L. Letourneau, G. R. Login, P. F. Weller, and S. J. Ackerman. 1988. Ultrastructural localization of the Charcot-Leyden crystal protein (lysophospholipase) to a distinct crystalloid-free granule population in mature human eosinophils. *Blood* 72:150-158.
8. Dvorak, A. 1994. Ultrastructural studies on mechanisms of human eosinophil activation and secretion. In *Eosinophils in Allergy and Inflammation* . G. Gleich and A. Kay, eds. Marcel Dekker, New York, NY, p. 159.
9. Weller, P. F. and A. M. Dvorak. 1994. Lipid bodies: intracellular sites for eicosanoid formation. *J.Allergy Clin.Immunol.* 94:1151-1156.
10. Dvorak, A., S. J. Ackerman, and T. N. Wells. 1991. Subcellular morphology and biochemistry of eosinophils. In *Blood Cell Biochemistry Vol. 2 Megakaryocytes, Platelets, Macrophages and Eosinophils*. J. R. Harris, ed. Plenum Press, London, pp. 237-344.
11. Parmley, R. T. and S. S. Spicer. 1974. Cytochemical and ultrastructural identification of a small type granule in human late eosinophils. *Lab Invest* 30:557-567.
12. Wardlaw, A. J., R. Moqbel, and A. B. Kay. 1995. Eosinophils: biology and role in disease. *Adv.Immunol.* 60:151-266.
13. Hartnell, A., R. Moqbel, G. M. Walsh, B. Bradley, and A. B. Kay. 1990. Fc gamma and CD11/CD18 receptor expression on normal density and low density human eosinophils. *Immunology* 69:264-270.

14. Walsh, G. M. and A. B. Kay. 1986. Binding of immunoglobulin classes and subclasses to human neutrophils and eosinophils. *Clin.Exp.Immunol.* 63:466-472.
15. Abu-Ghazaleh, R. I., T. Fujisawa, J. Mestecky, R. A. Kyle, and G. J. Gleich. 1989. IgA-induced eosinophil degranulation. *J.Immunol.* 142:2393-2400.
16. Butterworth, A. E., R. F. Sturrock, V. Houba, A. A. Mahmoud, A. Sher, and P. H. Rees. 1975. Eosinophils as mediators of antibody-dependent damage to schistosomula. *Nature* 256:727-729.
17. Capron, M., M. Tomassini, d. Van, V, J. P. Kusnierz, J. P. Papin, and A. Capron. 1988. [Existence and function of a receptor for immunoglobulin A on human eosinophils]. *C.R.Acad.Sci.III* 307:397-402.
18. Kita, H., R. Abu-Ghazaleh, C. J. Sanderson, and G. J. Gleich. 1991. Effect of steroids on immunoglobulin-induced eosinophil degranulation. *J.Allergy Clin.Immunol.* 87:70-77.
19. Capron, M., T. Jouault, L. Prin, M. Joseph, J. C. Ameisen, A. E. Butterworth, J. P. Papin, J. P. Kusnierz, and A. Capron. 1986. Functional study of a monoclonal antibody to IgE Fc receptor (Fc epsilon R2) of eosinophils, platelets, and macrophages. *J.Exp.Med.* 164:72-89.
20. Capron, M., M. D. Kazatchkine, E. Fischer, M. Joseph, A. E. Butterworth, J. P. Kusnierz, L. Prin, J. P. Papin, and A. Capron. 1987. Functional role of the alpha-chain of complement receptor type 3 in human eosinophil-dependent antibody-mediated cytotoxicity against schistosomes. *J.Immunol.* 139:2059-2065.
21. Capron, M., M. J. Truong, D. Aldebert, V. Gruart, M. Suemura, G. Delespesse, B. Tourvaille, and A. Capron. 1991. Heterogeneous expression of CD23 epitopes by eosinophils from patients. Relationships with IgE-mediated functions. *Eur.J.Immunol.* 21:2423-2429.
22. Jouault, T., M. Capron, J. M. Balloul, J. C. Ameisen, and A. Capron. 1988. Quantitative and qualitative analysis of the Fc receptor for IgE (Fc epsilon RII) on human eosinophils. *Eur.J.Immunol.* 18:237-241.
23. Capron, M. and A. Capron. 1987. The IgE receptor of human eosinophils. In *Allergy and Inflammation*. A. B. Kay, ed. Academic Press, London, pp. 151-159.
24. Gounni, A. S., B. Lamkhioed, K. Ochiai, Y. Tanaka, E. Delaporte, A. Capron, J. P. Kinet, and M. Capron. 1994. High-affinity IgE receptor on eosinophils is involved in defence against parasites. *Nature* 367:183-186.
25. Moqbel, R., G. M. Walsh, T. Nagakura, A. J. MacDonald, A. J. Wardlaw, Y. Iikura, and A. B. Kay. 1990. The effect of platelet-activating factor on IgE binding to, and IgE-dependent biological properties of, human eosinophils. *Immunology* 70:251-257.
26. Truong, M. J., V. Gruart, F. T. Liu, L. Prin, A. Capron, and M. Capron. 1993. IgE-binding molecules (Mac-2/epsilon BP) expressed by human eosinophils. Implication in IgE-dependent eosinophil cytotoxicity. *Eur.J.Immunol.* 23:3230-3235.

27. Walsh, G. M., A. Hartnell, A. J. Wardlaw, K. Kurihara, C. J. Sanderson, and A. B. Kay. 1990. IL-5 enhances the in vitro adhesion of human eosinophils, but not neutrophils, in a leucocyte integrin (CD11/18)-dependent manner. *Immunology* 71:258-265.
28. Koenderman, L., A. T. Tool, D. Roos, and A. J. Verhoeven. 1990. Priming of the respiratory burst in human eosinophils is accompanied by changes in signal transduction. *J.Immunol.* 145:3883-3888.
29. Zeiger, R. S. and H. R. Colten. 1977. Histaminase release from human eosinophils. *J.Immunol.* 118:540-543.
30. Hartnell, A., A. B. Kay, and A. J. Wardlaw. 1992. Interleukin-3-induced up-regulation of CR3 expression on human eosinophils is inhibited by dexamethasone. *Immunology* 77:488-493.
31. Chihara, J., J. Plumas, V. Gruart, J. Tavernier, L. Prin, A. Capron, and M. Capron. 1990. Characterization of a receptor for interleukin 5 on human eosinophils: variable expression and induction by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J.Exp.Med.* 172:1347-1351.
32. DiPersio, J., P. Billing, S. Kaufman, P. Eghtesady, R. E. Williams, and J. C. Gasson. 1988. Characterization of the human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor. *J Biol.Chem.* 263:1834-1841.
33. Ingley, E. and I. G. Young. 1991. Characterization of a receptor for interleukin-5 on human eosinophils and the myeloid leukemia line HL-60. *Blood* 78:339-344.
34. Lopez, A. F., J. M. Eglinton, D. Gillis, L. S. Park, S. Clark, and M. A. Vadas. 1989. Reciprocal inhibition of binding between interleukin 3 and granulocyte- macrophage colony-stimulating factor to human eosinophils. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 86:7022-7026.
35. Lopez, A. F., M. A. Vadas, J. M. Woodcock, S. E. Milton, A. Lewis, M. J. Elliott, D. Gillis, R. Ireland , E. Olwell, and L. S. Park. 1991. Interleukin-5, interleukin-3, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor cross-compete for binding to cell surface receptors on human eosinophils. *J.Biol.Chem.* 266:24741-24747.
36. Migita, M., N. Yamaguchi, S. Mita, S. Higuchi, Y. Hitoshi, Y. Yoshida, M. Tomonaga, I. Matsuda, A. Tominaga, and K. Takatsu. 1991. Characterization of the human IL-5 receptors on eosinophils. *Cell Immunol.* 133:484-497.
37. Tavernier, J., R. Devos, S. Cornelis, T. Tuypens, H. J. Van der, W. Fiers, and G. Plactinck. 1991. A human high affinity interleukin-5 receptor (IL-5) is composed of an IL5-specific alpha chain and beta shared with the receptor for GM-CSF. *Cell* 66:1175-1184.
38. Miyajima, A., T. Kitamura, N. Harada, T. Yokota, and K. Arai. 1992. Cytokine receptors and signal transduction. *Annu.Rev.Immunol.* 10:295-331.
39. Rand, T. H., D. S. Silberstein, H. Kornfeld, and P. F. Weller. 1991. Human eosinophils express functional interleukin 2 receptors. *J.Clin.Invest* 88:825-832.

40. Daugherty, B. L., S. J. Siciliano, J. A. DeMartino, L. Malkowitz, A. Sirotna, and M. S. Springer. 1996. Cloning, expression, and characterization of the human eosinophil eotaxin receptor. *J.Exp.Med.* 183:2349-2354.
41. Ponath, P. D., S. Qin, D. J. Ringler, I. Clark-Lewis, J. Wang, N. Kassam, H. Smith, X. Shi, J. A. Gonzalo, W. Newman, J. C. Gutierrez-Ramos, and C. R. Mackay. 1996. Cloning of the human eosinophil chemoattractant, eotaxin. Expression, receptor binding, and functional properties suggest a mechanism for the selective recruitment of eosinophils. *J.Clin.Invest* 97:604-612.
42. Jose, P. J., D. A. Griffiths-Johnson, P. D. Collins, D. T. Walsh, R. Moqbel, N. F. Totty, O. Truong, J. J. Hsuan, and T. J. Williams. 1994. Eotaxin: a potent eosinophil chemoattractant cytokine detected in a guinea pig model of allergic airways inflammation. *J.Exp.Med.* 179:881-887.
43. Kroegel, C., M. A. Giembycz, and P. J. Barnes. 1990. Characterization of eosinophil cell activation by peptides. Differential effects of substance P, melittin, and FMET-Leu-Phe. *J.Immunol.* 145:2581-2587.
44. Kurihara, K., A. J. Wardlaw, R. Moqbel, and A. B. Kay. 1989. Inhibition of platelet-activating factor (PAF)-induced chemotaxis and PAF binding to human eosinophils and neutrophils by the specific ginkgolide-derived PAF antagonist, BN 52021. *J.Allergy Clin.Immunol.* 83:83-90.
45. Yazdanbakhsh, M., C. M. Eckmann, L. Koenderman, A. J. Verhoeven, and D. Roos. 1987. Eosinophils do respond to fMLP. *Blood* 70:379-383.
46. Gerard, N. P. and C. Gerard. 1991. The chemotactic receptor for human C5a anaphylatoxin. *Nature* 349:614-617.
47. Minnicozzi, M., J. C. Anthes, M. I. Siegel, M. M. Billah, and R. W. Egan. 1990. Activation of phospholipase D in normodense human eosinophils. *Biochem.Biophys.Res.Communic.* 170:540-547.
48. Elsner, J., M. Oppermann, W. Czech, G. Dobos, E. Schopf, J. Norgauer, and A. Kapp. 1994. C3a activates reactive oxygen radical species production and intracellular calcium transients in human eosinophils. *Eur.J.Immunol.* 24:518-522.
49. Lucey, D. R., D. I. Dorsky, A. Nicholson-Weller, and P. F. Weller. 1989. Human eosinophils express CD4 protein and bind human immunodeficiency virus 1 gp120. *J.Exp.Med.* 169:327-332.
50. Rand, T. H., W. W. Cruikshank, D. M. Center, and P. F. Weller. 1991. CD4-mediated stimulation of human eosinophils: lymphocyte chemoattractant factor and other CD4-binding ligands elicit eosinophil migration. *J.Exp.Med.* 173:1521-1528.
51. Freedman, A. R., F. M. Gibson, S. C. Fleming, C. J. Spry, and G. E. Griffin. 1991. Human immunodeficiency virus infection of eosinophils in human bone marrow cultures. *J.Exp.Med.* 174 :1661-1664.

52. Lucey, D. R., A. Nicholson-Weller, and P. F. Weller. 1989. Mature human eosinophils have the capacity to express HLA-DR. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 86:1348-1351.
53. Nishikawa, K., T. Morii, H. Ako, K. Hamada, S. Saito, and N. Narita. 1992. In vivo expression of CD69 on lung eosinophils in eosinophilic pneumonia: CD69 as a possible activation marker for eosinophils. *J.Allergy Clin.Immunol.* 90:169-174.
54. Hartnell, A., D. S. Robinson, A. B. Kay, and A. J. Wardlaw. 1993. CD69 is expressed by human eosinophils activated in vivo in asthma and in vitro by cytokines. *Immunology* 80:281-286.
55. Corte, G., L. Moretta, G. Damiani, M. C. Mingari, and A. Bargellesi. 1981. Surface antigens specifically expressed by activated T cells in humans. *Eur.J Immunol.* 11:162-164.
56. Ohkawara, Y., K. G. Lim, Z. Xing, M. Glibetic, K. Nakano, J. Dolovich, K. Croitoru, P. F. Weller, and M. Jordana. 1996. CD40 expression by human peripheral blood eosinophils. *J.Clin.Invest* 97:1761-1766.
57. Matsumoto, K., R. P. Schleimer, H. Saito, Y. Iikura, and B. S. Bochner. 1995. Induction of apoptosis in human eosinophils by anti-Fas antibody treatment in vitro. *Blood* 86:1437-1443.
58. Maeda, K., K. Yamamoto, Y. Tanaka, S. Anan, and H. Yoshida. 1992. The relationship between eosinophils, OKT6-positive cells and house dust mite (HDM) antigens in naturally occurring lesions of atopic dermatitis. *J.Dermatol.Sci.* 3:151-156.
59. Masellis-Smith, A., G. S. Jensen, J. G. Seehafer, J. R. Slupsky, and A. R. Shaw. 1990. Anti-CD9 monoclonal antibodies induce homotypic adhesion of pre-B cell lines by a novel mechanism. *J Immunol.* 144:1607-1613.
60. Bass, D. A., W. H. Grover, J. C. Lewis, P. Szejda, L. R. DeChatelet, and C. E. McCall. 1980. Comparison of human eosinophils from normals and patients with eosinophilia. *J.Clin.Invest* 66:1265-1273.
61. Fukuda, T., S. L. Dunnette, C. E. Reed, S. J. Ackerman, M. S. Peters, and G. J. Gleich. 1985. Increased numbers of hypodense eosinophils in the blood of patients with bronchial asthma. *American Review of Respiratory Disease* 132:981-985.
62. Henderson, W. R., J. B. Harley, A. S. Fauci, and E. Y. Chi. 1988. Hypereosinophilic syndrome human eosinophil degranulation induced by soluble and particulate stimuli. *Br.J.Haematol.* 69:13-21.
63. Peters, M. S., G. J. Gleich, S. L. Dunnette, and T. Fukuda. 1988. Ultrastructural study of eosinophils from patients with the hypereosinophilic syndrome: a morphological basis of hypodense eosinophils. *Blood* 71:780-785.
64. Caulfield, J. P., A. Hein, M. E. Rothenberg, W. F. Owen, R. J. Soberman, R. L. Stevens, and K. F. Austen. 1990. A morphometric study of normodense and hypodense human eosinophils that are derived in vivo and in vitro. *Am.J.Pathol.* 137:27-41.

65. Wardlaw, A. J. and A. B. Kay. 1987. The role of the eosinophil in the pathogenesis of asthma. *Allergy* 42:321-335.
66. Vadas, M. A., J. R. David, A. Butterworth, N. T. Pisani, and T. A. Siongok. 1979. A new method for the purification of human eosinophils and neutrophils, and a comparison of the ability of these cells to damage schistosomula of *Schistosoma mansoni*. *J.Immunol.* 122:1228-1236.
67. Winqvist, I., T. Olofsson, I. Olsson, A. M. Persson, and T. Hallberg. 1982. Altered density, metabolism and surface receptors of eosinophils in eosinophilia. *Immunology* 47:531-539.
68. Prin, L., M. Capron, A. B. Tonnel, O. Bletry, and A. Capron. 1983. Heterogeneity of human peripheral blood eosinophils: variability in cell density and cytotoxic ability in relation to the level and the origin of hypereosinophilia. *Int.Arch.Allergy Appl.Immunol.* 72:336-346.
69. Shaw, R. J., G. M. Walsh, O. Cromwell, R. Moqbel, C. J. Spry, and A. B. Kay. 1985. Activated human eosinophils generate SRS-A leukotrienes following IgG- dependent stimulation. *Nature* 316:150-152.
70. Tai, P. C., C. J. Spry, C. Peterson, P. Venge, and I. Olsson. 1984. Monoclonal antibodies distinguish between storage and secreted forms of eosinophil cationic protein. *Nature* 309:182-184.
71. Pinkston, P., V. K. Vijayan, T. B. Nutman, W. N. Rom, K. M. O'Donnell, M. J. Cornelius, V. Kumaraswami, V. J. Ferrans, T. Takemura, and G. Yenokida. 1987. Acute tropical pulmonary eosinophilia. Characterization of the lower respiratory tract inflammation and its response to therapy. *J.Clin.Invest* 80:216-225.
72. Sedgwick, J. B., W. J. Calhoun, R. F. Vrtis, M. E. Bates, P. K. McAllister, and W. W. Busse. 1992. Comparison of airway and blood eosinophil function after in vivo antigen challenge. *J.Immunol.* 149:3710-3718.
73. Mengelers, H. J., T. Maikoe, L. Brinkman, B. Hooibrink, J. W. Lammers, and L. Koenderman. 1994. Immunophenotyping of eosinophils recovered from blood and BAL of allergic asthmatics. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 149:345-351.
74. Mawhorter, S. D., D. A. Stephany, E. A. Ottesen, and T. B. Nutman. 1996. Identification of surface molecules associated with physiologic activation of eosinophils. Application of whole-blood flow cytometry to eosinophils. *J.Immunol.* 156:4851-4858.
75. Aldebert, D., L. Prin, J. P. Dessaint, D. De Groote, A. Capron, and M. Capron. 1994. Elevation of soluble CD23 in serum from patients with blood eosinophilia. *Int.Arch.Allergy Immunol.* 103:245-251.
76. Riedel, D., A. Lindemann, M. Brach, R. Mertelsmann, and F. Herrmann. 1990. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-3 induce surface expression of interleukin-2 receptor p55-chain and CD4 by human eosinophils. *Immunology* 70:258-261.

77. Luttmann, W., B. Knoechel, M. Foerster, H. Matthys, J. C. Virchow, Jr., and C. Kroegel. 1996. Activation of human eosinophils by IL-13. Induction of CD69 surface antigen, its relationship to messenger RNA expression, and promotion of cellular viability. *J.Immunol.* 157:1678-1683.
78. Matsumoto, K., J. Appiah-Pippim, R. P. Schleimer, C. A. Bickel, L. A. Beck, and B. S. Bochner. 1998. CD44 and CD69 represent different types of cell-surface activation markers for human eosinophils. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 18:860-866.
79. Baggiolini, M. and C. A. Dahinden. 1994. CC chemokines in allergic inflammation. [Review] [61 refs]. *Immunology Today* 15:127-133.
80. Ben Baruch, A., D. F. Michiel, and J. J. Oppenheim. 1995. Signals and receptors involved in recruitment of inflammatory cells. *J.Biol.Chem.* 270:11703-11706.
81. Murphy, P. M. 1994. The molecular biology of leukocyte chemoattractant receptors. *Annu.Rev.Immunol.* 12:593-633.
82. Moqbel, R., F. Levi-Schaffer, and A. B. Kay. 1994. Cytokine generation by eosinophils. *J.Allergy Clin.Immunol.* 94:1183-1188.
83. Rosenwasser, L. J. 1998. Biologic activities of IL-1 and its role in human disease. *J Allergy Clin Immunol* 102:344-350.
84. Del, P., V. B. De Andres, E. Martin, N. Maruri, J. M. Zubeldia, P. Palomino, and C. Lahoz. 1990. Murine eosinophils and IL-1: alpha IL-1 mRNA detection by in situ hybridization. Production and release of IL-1 from peritoneal eosinophils. *J.Immunol.* 144:3117-3122.
85. Milne, A. A., M. M. Teixeira, P. G. Hellewell, and P. J. Piper. 1995. Induction of leucocyte recruitment and bronchial hyperresponsiveness in the guinea pig by aerosol administration of interleukin-2. *Int.Arch.Allergy Immunol.* 108:60-67.
86. Bosse, M., M. Audette, C. Ferland, G. Pelletier, H. W. Chu, A. Dakhama, S. Lavigne, L. P. Boulet, and M. Laviolette. 1996. Gene expression of interleukin-2 in purified human peripheral blood eosinophils. *Immunology* 87:149-154.
87. Levi-Schaffer, F., J. Barkans, T. M. Newman, S. Ying, M. Wakelin, R. Hohenstein, V. Barak, P. Lacy, A. B. Kay, and R. Moqbel. 1996. Identification of interleukin-2 in human peripheral blood eosinophils. *Immunology* 87:155-161.
88. Kita, H., T. Ohnishi, Y. Okubo, D. Weiler, J. S. Abrams, and G. J. Gleich. 1991. Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and interleukin 3 release from human peripheral blood eosinophils and neutrophils. *J.Exp.Med.* 174:745-748.
89. Hom, J. T. and T. Estridge. 1993. FK506 and rapamycin modulate the functional activities of human peripheral blood eosinophils. *Clin.Immunol.Immunopathol.* 68:293-300.

90. Howard, M., J. Farrar, M. Hilfiker, B. Johnson, K. Takatsu, T. Hamaoka, and W. W. Paul. 1982. Identification of a T cell-derived B cell growth factor distinct from interleukin 2. *J Exp Med* 155:914-923.
91. Isakson, P. C., E. Pure, E. S. Vitetta, and P. H. Krammer. 1982. T cell-derived B cell differentiation factor(s). Effect on the isotype switch of murine B cells. *J Exp Med* 155:734-748.
92. Lee, F., T. Yokota, T. Otsuka, P. Meyerson, D. Villaret, R. Coffman, T. Mosmann, D. Rennick, N. Roehm, and C. Smith. 1986. Isolation and characterization of a mouse interleukin cDNA clone that express B cell stimulatory factor 1 activities and T. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 83:2061-2065.
93. Yokota, T., T. Otsuka, T. Mosmann, J. Banchereau, T. De France, D. Blanchard, J. E. De Vries, F. Lee, and K. Arai. 1986. Isolation and characterization of a human interleukin cDNA clone, homologous to mouse B-cell stimulatory factor 1, that express B-cell and T-cell stimulating activities. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 83:5894-5898.
94. Arai, K. I., F. Lee, A. Miyajima, S. Miyatake, N. Arai, and T. Yokota. 1990. Cytokines: coordinators of immune and inflammatory responses. *Annu.Rev.Immunol.* 59:783-836.
95. Mosmann, T. R. and R. L. Coffman. 1989. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu.Rev.Immunol.* 7:145-173.
96. Zlotnik, A., D. I. Godfrey, M. Fischer, and T. Suda. 1992. Cytokine production by mature and immature CD4- CD8- T cells. Alpha beta- T cell receptor+ CD4-CD8- T cells produce IL-4. *J Immunol* 149:1211-1215.
97. Bendelac, A. and R. H. Schwartz. 1991. CD4+ and CD8+ T cells acquire specific lymphokine secretion potentials during thymic maturation. *Nature* 353:68-71.
98. Fischer, M., I. MacNeil, T. Suda, J. E. Cupp, K. Shortman, and A. Zlotnik. 1991. Cytokine production by mature and immature thymocytes. *J Immunol* 146:3452-3456.
99. Plaut, M., J. H. Pierce, C. J. Watson, J. Hanley-Hyde, R. P. Nordan, and W. E. Paul. 1989. Mast cell lines produce lymphokines in response to cross-linkage of Fc epsilon RI or to calcium ionophores. *Nature* 339:64-67.
100. Seder, R. A., J. L. Boulay, F. Finkelman, S. Barbier, S. Z. Ben Sasson, G. Le Gros, and W. E. Paul. 1992. CD8+ T cells can be primed in vitro to produce IL-4. *J Immunol* 148:1652-1656.
101. Yamamura, M., K. Uyemura, R. J. Deans, K. Weinberg, T. H. Rea, B. R. Bloom, and R. L. Modlin. 1991. Defining protective responses to pathogens cytokine profiles in leprosy lesions [published erratum appears in *Science* 1992 Jan 3,255 (5040): 12]. *Science* 254:277-279.
102. Moqbel, R., S. Ying, J. Barkans, T. M. Newman, P. Kimmitt, M. Wakelin, L. Taborda-Barata, Q. Meng, C. J. Corrigan, and S. R. Durham. 1995. Identification of messenger RNA

- for IL-4 in human eosinophils with granule localization and release of the translated product. *J.Immunol.* 155:4939-4947.
103. Ying, S., S. R. Durham, C. J. Corrigan, Q. Hamid, and A. B. Kay. 1995. Phenotype of cells expressing mRNA for TH2-type (interleukin 4 and interleukin 5) and TH1-type (interleukin 2 and interferon gamma) cytokines in bronchoalveolar lavage and bronchial biopsies from atopic asthmatic and normal control subjects. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 12:477-487.
  104. Paul, W. E. 1991. Interleukin-4 production by Fc epsilon R+ cells. *Skin Pharmacol* 4:8-14.
  105. Paul, W. E. 1992. The role of IL-4 in the regulation of B cell development, growth and differentiation. In *IL-4 Structure and Function*. H. Spits, ed. CRC Press, Boca Raton FL, p. 57.
  106. Coffman, R. L., B. W. Seymour, D. A. Leberman, D. D. Hiraki, J. A. Christiansen, B. Shrader, H. M. Cherwinski, H. F. Savelkoul, F. D. Finkelman, and M. W. Bond. 1988. The role of helper T cell products in mouse B cell differentiation and isotype regulation. *Immunol Rev* 102:5-28.
  107. Schultz, C. and R. L. Coffman. 1992. Mechanisms of murine isotype regulation of IL-4. In *IL-4: Structure and Function*. H. Spits, ed. CRC Press, Boca Raton FL, p. 75.
  108. Gauchat, J., G. Aversa, H. Gascon, R. de Waal Malefyt, and J. de Vries. 1992. Regulation of IgE synthesis. In *IL-4: Structure and Function*. H. Spits, ed. CRC Press, Boca Raton FL, p. 89.
  109. Grabstein, K. H., L. S. Park, P. J. Morrissey, H. Sassenfeld, Price, V, D. L. Urdal, and M. B. Widmer. 1987. Regulation of murine T cell proliferation by B cell stimulatory factor-1. *J Immunol* 139:1148-1153.
  110. Mosmann, T. R., M. W. Bond, R. L. Coffman, J. Ohara, and W. E. Paul. 1986. T-cell and mast cell lines responde to B-cell stimulatory factor 1. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 83:5654-5658.
  111. Zlotnik, A., J. Ransom, G. Frank, M. Fischer, and M. Howard. 1987. Interleukin 4 is a growth factor for activated thymocytes possible role in T-cell ontogeny. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 84:3856-3860.
  112. Le Gros, G., S. Z. Ben Sasson, R. Seder, F. D. Finkelman, and W. E. Paul. 1990. Generation of interleukin 4 (IL-4)- producing cells in vivo and in vitro: IL-2 and IL-4 are required for in vitro generation of IL-4- producing cells. *J Exp Med* 172:921-929.
  113. Widmer, M. B., R. B. Acres, H. M. Sassenfeld, and K. H. Grabstein. 1987. Regulation of cytolytic cell populations from human peripheral blood by B cell stimulatory factor 1 (interleukin 4). *J Exp Med* 166:1447-1455.
  114. Figdor, C. and A. te Velde. 1992. Regulation of human monocyte phenotype and function by IL-4. In *IL-4: Structure and Function*. H. Spits, ed. CRC Press, Boca Raton FL, p. 187.

115. Rennick, D., J. Moore, and L. Thompson-Snipes. 1992. IL-4 and hematopoiesis. In *IL-4: Structure and Function*. H. Spits, ed. CRC Press, Boca Raton FL, p. 151.
116. Shalit, M., S. Sekhsaria, and H. L. Malech. 1995. Modulation of growth and differentiation of eosinophils from human peripheral blood CD34+ cells by IL5 and other growth factors. *Cellular Immunology* 160:50-57.
117. Desreumaux, P., A. Janin, J. F. Colombel, L. Prin, J. Plumas, D. Emilie, G. Torpier, A. Capron, and M. Capron. 1992. Interleukin 5 messenger RNA expression by eosinophils in the intestinal mucosa of patients with coeliac disease. *J.Exp.Med.* 175:293-296.
118. Dubucquoi, S., P. Desreumaux, A. Janin, O. Klein, M. Goldman, J. Tavernier, A. Capron, and M. Capron. 1994. Interleukin 5 synthesis by eosinophils: association with granules and immunoglobulin-dependent secretion. *J.Exp.Med.* 179:703-708.
119. Broide, D. H., M. M. Paine, and G. S. Firestein. 1992. Eosinophils express interleukin 5 and granulocyte macrophage-colony-stimulating factor mRNA at sites of allergic inflammation in asthmatics. *J.Clin.Invest* 90:1414-1424.
120. Desreumaux, P., A. Janin, S. Dubucquoi, M. C. Copin, G. Torpier, A. Capron, M. Capron, and L. Prin. 1993. Synthesis of interleukin-5 by activated eosinophils in patients with eosinophilic heart diseases. *Blood* 82:1553-1560.
121. Taga, T. and T. Kishimoto. 1997. Gp 130 and the interleukin-6 family of cytokines. *Annu.Rev.Immunol.* 15:797-819.
122. Melani, C., G. F. Mattia, A. Silvani, A. Carc, L. Rivoltini, G. Parmiani, and M. P. Colombo. 1993. Interleukin-6 expression in human neutrophil and eosinophil peripheral blood granulocytes. *Blood* 81:2744-2749.
123. Hamid, Q., J. Barkans, Q. Meng, S. Ying, J. S. Abrams, A. B. Kay, and R. Moqbel. 1992. Human eosinophils synthesize and secrete interleukin-6, in vitro. *Blood* 80:1496-1501.
124. Zachariae, C. O. 1993. Chemotactic cytokines and inflammation. Biological properties of the lymphocyte and monocyte chemotactic factors ELCF, MCAF and IL-8. *Acta Derm.Venereol.Suppl (Stockh)* 181 :1-37.
125. Simon, H. U., S. Yousefi, M. Weber, D. Simon, C. Holzer, K. Hartung, and K. Blaser. 1995. Human peripheral blood eosinophils express and release interleukin-8. *Int.Arch.Allergy Immunol.* 107:124-126.
126. Braun, R. K., M. Franchini, F. Erard, S. Rihs, I. J. De Vries, K. Blaser, T. T. Hansel, and C. Walker. 1993. Human peripheral blood eosinophils produce and release interleukin-8 on stimulation with calcium ionophore. *Eur.J.Immunol.* 23:956-960.
127. Nakajima, H., G. J. Gleich, and H. Kita. 1996. Constitutive production of IL-4 and IL-10 and stimulated production of IL-8 by normal peripheral blood eosinophils. *J.Immunol.* 156:4859-4866.

128. Lim, K. G., H. C. Wan, P. T. Bozza, M. B. Resnick, D. T. Wong, W. W. Cruikshank, H. Kornfeld, D. M. Center, and P. F. Weller. 1996. Human eosinophils elaborate the lymphocyte chemoattractants. IL- 16 (lymphocyte chemoattractant factor) and RANTES *J Immunol* 156:2566-2570.
129. Walz, T. M., B. K. Nishikawa, C. Malm, and A. Wasteson. 1993. Production of transforming growth factor alpha by normal human blood eosinophils. *Leukemia* 7:1531-1537.
130. Elovic, A., D. T. Wong, P. F. Weller, K. Matossian, and S. J. Galli. 1994. Expression of transforming growth factors-alpha and beta 1 messenger RNA and product by eosinophils in nasal polyps. *J.Allergy Clin.Immunol.* 93:864-869.
131. Wong, D. T., P. F. Weller, S. J. Galli, A. Elovic, T. H. Rand, G. T. Gallagher, T. Chiang, M. Y. Chou, K. Matossian, and J. McBride. 1990. Human eosinophils express transforming growth factor alpha. *J.Exp.Med.* 172:673-681.
132. Egesten, A., J. Calafat, E. F. Knol, H. Janssen, and T. M. Walz. 1996. Subcellular localization of transforming growth factor-alpha in human eosinophil granulocytes. *Blood* 87:3910-3918.
133. Ohno, I., R. G. Lea, K. C. Flanders, D. A. Clark, D. Banwatt, J. Dolovich, J. Denburg, C. B. Harley, J. Gauldie, and M. Jordana. 1992. Eosinophils in chronically inflamed human upper airway tissues express transforming growth factor beta 1 gene (TGF beta 1). *J.Clin.Invest* 89:1662-1668.
134. Kadin, M., J. Butmarc, A. Elovic, and D. Wong. 1993. Eosinophils are the major source of transforming growth factor-beta 1 in nodular sclerosing Hodgkin's disease. *Am.J.Pathol.* 142:11-16.
135. Powell, P. P., M. Klagsbrun, J. A. Abraham, and R. C. Jones. 1993. Eosinophils expressing heparin-binding EGF-like growth factor mRNA localize around lung microvessels in pulmonary hypertension. *Am.J.Pathol.* 143:784-793.
136. Ohno, I., Y. Nitta, K. Yamauchi, H. Hoshi, M. Honma, K. Woolley, P. O'Byrne, J. Dolovich, M. Jordana, and G. Tamura. 1995. Eosinophils as a potential source of platelet-derived growth factor B- chain (PDGF-B) in nasal polyposis and bronchial asthma. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 13:639-647.
137. Moqbel, R., Q. Hamid, S. Ying, J. Barkans, A. Hartnell, A. Tsicopoulos, A. J. Wardlaw, and A. B. Kay. 1991. Expression of mRNA and immunoreactivity for the granulocyte/macrophage colony-stimulating factor in activated human eosinophils. *J.Exp.Med.* 174:749-752.
138. Ohno, I., R. Lea, S. Finotto, J. Marshall, J. Denburg, J. Dolovich, J. Gauldie, and M. Jordana. 1991. Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) gene expression by eosinophils in nasal polyposis. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 5:505-510.

139. Lamkhioued, B., A. S. Gounni, D. Aldebert, E. Delaporte, L. Prin, A. Capron, and M. Capron. 1996. Synthesis of type 1 (IFN gamma) and type 2 (IL-4, IL-5, and IL-10) cytokines by human eosinophils. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 796:203-208.
140. Nagata, M., T. Fukuda, T. Numao, S. Makino, and Y. Dohi. 1993. Tumor necrosis factor alpha induces migration of human eosinophils. *Aterugi* 42:549-555.
141. Costa, J. J., K. Matossian, M. B. Resnick, W. J. Beil, D. T. Wong, J. R. Gordon, A. M. Dvorak, P. F. Weller, and S. J. Galli. 1993. Human eosinophils can express the cytokines tumor necrosis factor-alpha and macrophage inflammatory protein-1 alpha. *J.Clin.Invest* 91:2673-2684.
142. Finotto, S., I. Ohno, J. S. Marshall, J. Gauldie, J. A. Denburg, J. Dolovich, D. A. Clark, and M. Jordana. 1994. TNF-alpha production by eosinophils in upper airways inflammation (nasal polyposis). *J.Immunol.* 153:2278-2289.
143. Tan, X., W. Hsueh, and F. Gonzalez-Crussi. 1993. Cellular localization of tumor necrosis factor (TNF)-alpha transcripts in normal bowel and in necrotizing enterocolitis. TNF gene expression by Paneth cells, intestinal eosinophils, and macrophages. *Am.J.Pathol.* 142:1858-1865.
144. Lindley, I., J. Westwick, and S. L. Kunkel. 1993. Nomenclature announcement the chemokines. *Immunology Today* 14:24-24.
145. Miller, M. D. and M. S. Krangel. 1992. Biology and biochemistry of the chemokines: a family of chemotactic and inflammatory cytokines. [Review] [183 refs]. *Critical Reviews in Immunology* 12:17-46.
146. Oppenheim, J. J., C. O. Zachariae, N. Mukaida, and K. Matsushima. 1991. Properties of the novel proinflammatory supergene "intercrine" cytokine family. [Review] [150 refs]. *Annual Review of Immunology* 9:617-648.
147. Baggiolini M . 1993. Chemotactic and inflammatory cytokines--CXC and CC proteins. [Review] [88 refs]. *Advances in Experimental Medicine & Biology* 351:1-11.
148. Baggiolini, M., B. Dewald, and B. Moser. 1997. Human chemokines: an update. [Review] [181 refs]. *Annual Review of Immunology* 15:675-705.
149. Baggiolini, M. 1998. Chemokines and leukocyte traffic. [Review] [69 refs]. *Nature* 392:565-568.
150. Schlondorff, D., P. J. Nelson, B. Luckow, and B. Banas. 1997. Chemokines and renal disease. [Review] [122 refs]. *Kidney International* 51:610-621.
151. Baggiolini, M., B. Dewald, and B. Moser. 1994. Interleukin-8 and related chemotactic cytokines--CXC and CC chemokines. *Adv.Immunol.* 55:97-179.

152. Kelner, G. S., J. Kennedy, K. B. Bacon, S. Kleynsteuber, D. A. Largaespada, Jenkins, NA, N. G. Copeland, J. F. Bazan, K. W. Moore, T. J. Schall, and et al. 1994. Lymphotactin: a cytokine that represents a new class of chemokine. *Science* 266:1395-1399.
153. Kennedy, J., G. S. Kelner, S. Kleynsteuber, T. J. Schall, M. C. Weiss, H. Yssel, P. V. Schneider, B. G. Cocks, K. B. Bacon, and A. Zlotnik. 1995. Molecular cloning and functional characterization of human lymphotactin. *Journal of Immunology* 155:203-209.
154. Bazan, J. F., K. B. Bacon, G. Hardiman, W. Wang, K. Soo, D. Rossi, D. R. Greavcs, A. Zlotnik, and T. J. Schall. 1997. A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. *Nature* 385:640-644.
155. Hedrick, J. A. and A. Zlotnik. 1997. Identification and characterization of a novel beta chemokine containing six conserved cysteines. *J.Immunol.* 159:1589-1593.
156. Koch, A. E., P. J. Polverini, S. L. Kunkel, L. A. Harlow, L. A. DiPietro, V. M. Elner, S. G. Elner, and R. M. Strieter. 1992. Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis [see comments]. *Science* 258:1798-1801.
157. Schall, T. J. and K. B. Bacon. 1994. Chemokines, leukocyte trafficking, and inflammation. *Curr.Opin.Immunol.* 6:865-873.
158. Ortiz, B. D., A. M. Krensky, and P. J. Nelson. 1996. Kinetics of transcription factors regulating the RANTES chemokine gene reveal a developmental switch in nuclear events during T-lymphocyte maturation. *Molecular & Cellular Biology* 16:202-210.
159. Schall, T. J., J. Jongstra, B. J. Dyer, J. Jorgensen, C. Clayberger, M. M. Davis, and A. M. Krensky. 1988. A human T cell-specific molecule is a member of a new gene family. *Journal of Immunology* 141:1018-1025.
160. Heeger, P., G. Wolf, C. Meyers, M. J. Sun, S. C. O'Farrell, A. M. Krensky, Neilson, and EG. 1992. Isolation and characterization of cDNA from renal tubular epithelium encoding murine Rantes. *Kidney International* 41:220-225.
161. Kwon, O. J., P. J. Jose, R. A. Robbins, T. J. Schall, T. J. Williams, and P. J. Barnes. 1995. Glucocorticoid inhibition of RANTES expression in human lung epithelial cells. *American Journal of Respiratory Cell & Molecular Biology* 12:488-496.
162. Kameyoshi, Y., A. Dorschner, A. I. Mallet, E. Christophers, and J. M. Schroder. 1992. Cytokine RANTES released by thrombin-stimulated platelets is a potent attractant for human eosinophils. *Journal of Experimental Medicine* 176:587-592.
163. Fuller, K., J. M. Owens, and T. J. Chambers. 1995. Macrophage inflammatory protein-1 alpha and IL-8 stimulate the motility but suppress the resorption of isolated rat osteoclasts. *Journal of Immunology* 154:6065-6072.
164. Devergne, O., A. Marfaing-Koka, T. J. Schall, M. B. Leger-Ravet, M. Sadick, M. Peuchmaur, M. C. Crevon, K. J. Kim, T. T. c. t. S. T. Schall, T. Kim, K. J. [corrected to Kim, and et al. 1994. Production of the RANTES chemokine in delayed-type

- hypersensitivity reactions: involvement of macrophages and endothelial cells [published erratum appears in *J Exp Med* 1994 Aug 1;180(2):775]. *Journal of Experimental Medicine* 179:1689-1694.
165. Marfaing-Koka, A., O. Devergne, G. Gorgone, A. Portier, T. J. Schall, Galanaud, P, and D. Emilie. 1995. Regulation of the production of the RANTES chemokine by endothelial cells. Synergistic induction by IFN-gamma plus TNF- alpha and inhibition by IL-4 and IL-13. *Journal of Immunology* 154:1870-1878.
  166. Selvan, R. S., J. H. Butterfield, and M. S. Krangel. 1994. Expression of multiple chemokine genes by a human mast cell leukemia. *Journal of Biological Chemistry* 269:13893-13898.
  167. Calderon, M. A., J. L. Devalia, A. J. Prior, R. J. Sapsford, and R. J. Davies. 1997. A comparison of cytokine release from epithelial cells cultured from nasal biopsy specimens of atopic patients with and without rhinitis and nonatopic subjects without rhinitis. *Journal of Allergy & Clinical Immunology* 99:65-76.
  168. Topley, N., R. K. Mackenzie, and J. D. Williams. 1996. Macrophages and mesothelial cells in bacterial peritonitis. *Immunobiology* 195:563-573.
  169. Pearlman, E., J. H. Lass, D. S. Bardenstein, E. Diaconu, F. E. Hazlett, Jr., Albright, J, A. W. Higgins , and J. W. Kazura. 1997. IL-12 exacerbates helminth-mediated corneal pathology by augmenting inflammatory cell recruitment and chemokine expression. *Journal of Immunology* 158:827-833.
  170. Marfaing-Koka, A., M. Maravic, M. Humbert, P. Galanaud, and D. Emilie. 1996. Contrasting effects of IL-4, IL-10 and corticosteroids on RANTES production by human monocytes. *International Immunology* 8:1587-1594.
  171. Humbert, M., S. Ying, C. Corrigan, G. Menz, J. Barkans, R. Pfister, Q. Meng, J. Van Damme, G. Oudenakker, S. R. Durham, and A. B. Kay. 1997. Bronchial mucosal expression of the genes encoding chemokines RANTES and MCP-3 in symptomatic atopic and nonatopic asthmatics: relationship to the eosinophil-active cytokines interleukin (IL)- 5, granulocyte macrophage-colony-stimulating factor, and IL-3. *American Journal of Respiratory Cell & Molecular Biology* 16:1-8.
  172. Terada, N., K. Maesako, N. Hamano, T. Ikeda, M. Sai, T. Yamashita, S. Fukuda, and A. Konno. 1996. RANTES production in nasal epithelial cells and endothelial cells. *Journal of Allergy & Clinical Immunology* 98:S230-7.
  173. Barnes, D. A., M. Huston, R. Holmes, E. N. Benveniste, V. W. Yong, P. Scholz, Perez, and HD. 1996. Induction of RANTES expression by astrocytes and astrocytoma cell lines. *Journal of Neuroimmunology* 71:207-214.
  174. Kinnaert, P., J. P. De Wilde, B. Bournonville, C. Husson, and I. Salmon. 1996. Direct activation of human peritoneal mesothelial cells by heat- killed microorganisms. *Annals of Surgery* 224:749-54; discussion 754-5.

175. Davidsson, A., A. Danielsen, G. Viale, J. Olofsson, P. Dell'Orto, Pellegrini, C, M. G. Karlsson, and H. B. Hellquist. 1996. Positive identification in situ of mRNA expression of IL-6, and IL-12, and the chemotactic cytokine RANTES in patients with chronic sinusitis and polypoid disease. Clinical relevance and relation to allergy. *Acta Oto-Laryngologica* 116:604-610.
176. Jordan, N. J., M. L. Watson, T. Yoshimura, and J. Westwick. 1996. Differential effects of protein kinase C inhibitors on chemokine production in human synovial fibroblasts. *British Journal of Pharmacology* 117:1245-1253.
177. Ying, S., Q. Meng, L. Taborda-Barata, C. J. Corrigan, J. Barkans, B. Assoufi, R. Moqbel, S. R. Durham, and A. B. Kay. 1996. Human eosinophils express messenger RNA encoding RANTES and store and release biologically active RANTES protein. *Eur.J.Immunol.* 26:70-76.
178. Tran, M. T., M. Tellaetxe-Isusi, V. Elner, R. M. Strieter, R. N. Lausch, and J. E. Oakes. 1996. Proinflammatory cytokines induce RANTES and MCP-1 synthesis in human corneal keratocytes but not in corneal epithelial cells. Beta-chemokine synthesis in corneal cells. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.* 37:987-996.
179. McLean, A. 1994. Regulation with RANTES [comment] [see comments]. *Lancet* 343:189-190.
180. Teran, L. M., N. Noso, M. Carroll, D. E. Davies, S. Holgate, and J. M. Schroder. 1996. Eosinophil recruitment following allergen challenge is associated with the release of the chemokine RANTES into asthmatic airways. *Journal of Immunology* 157:1806-1812.
181. Schroder, J. M., N. Noso, M. Sticherling, and E. Christophers. 1996. Role of eosinophil-chemotactic C-C chemokines in cutaneous inflammation. [Review] [24 refs]. *Journal of Leukocyte Biology* 59:1-5.
182. Monti, G., A. Magnan, M. Fattal, B. Rain, M. Humbert, J. L. Mege, M. Noirclerc, P. Dartevelle, J. Cerrina, G. Simonneau, P. Galanaud, and D. Emilie. 1996. Intrapulmonary production of RANTES during rejection and CMV pneumonitis after lung transplantation. *Transplantation* 61:1757-1762.
183. Li, J., G. W. Ireland, P. M. Farthing, and M. H. Thornhill. 1996. Epidermal and oral keratinocytes are induced to produce RANTES and IL-8 by cytokine stimulation. *Journal of Investigative Dermatology* 106:661-666.
184. Kimura, I., Y. Moritani, and Y. Tanizaki. 1973. Basophils in bronchial asthma with reference to reagin-type allergy. *Clin.Allergy* 3:195-202.
185. Saito, M., R. Sato, I. Hisatome, and T. Narahashi. 1996. RANTES and platelet-activating factor open Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in eosinophils. *FASEB Journal* 10:792-798.
186. Weber, C., J. Katayama, and T. A. Springer. 1996. Differential regulation of beta 1 and beta 2 integrin avidity by chemoattractants in eosinophils. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 93:10939-10944.

187. Cocchi, F., A. L. DeVico, A. Garzino-Demo, S. K. Arya, R. C. Gallo, and P. Lusso. 1995. Identification of RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells [see comments]. *Science* 270:1811-1815.
188. Kissler, S., C. Susal, and G. Opelz. 1997. Anti-MIP-1alpha and anti-RANTES antibodies: new allies of HIV-1? *Clinical Immunology & Immunopathology* 84:338-341.
189. Mackewicz, C. E., E. Barker, and J. A. Levy. 1996. Role of beta-chemokines in suppressing HIV replication [letter; comment]. *Science* 274:1393-1395.
190. Taub, D. D., S. M. Turcovski-Corrales, M. L. Key, D. L. Longo, and W. J. Murphy. 1996. Chemokines and T lymphocyte activation: I. Beta chemokines costimulate human T lymphocyte activation in vitro. *Journal of Immunology* 156:2095-2103.
191. Loetscher, P., M. Seitz, I. Clark-Lewis, M. Baggiolini, and B. Moser. 1996. Activation of NK cells by CC chemokines. Chemotaxis, Ca<sup>2+</sup> mobilization, and enzyme release. *Journal of Immunology* 156:322-327.
192. Maghazachi, A. A., A. al-Aoukaty, and T. J. Schall. 1996. CC chemokines induce the generation of killer cells from CD56+ cells. *European Journal of Immunology* 26:315-319.
193. Horie, S., G. J. Gleich, and H. Kita. 1996. Cytokines directly induce degranulation and superoxide production from human eosinophils. *Journal of Allergy & Clinical Immunology* 98:371-381.
194. Chervenick, P. A. and D. R. Booggs. 1971. In vitro growth of granulocyte and mononuclear cell colonies from blood of normal individuals. *Blood* 37:131-135.
195. Chervenick, P. A. and A. F. LoBuglio. 1972. Human blood monocytes stimulators of granulocyte and mononuclear colony formation in vitro. *Science* 178:164-166.
196. Zucker-Franklin, D., G. Grusky, and P. L'Esperance. 1974. Granulocyte colonies derived from lymphocyte fractions of normal human peripheral blood. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 71:2711-2714.
197. Howard, M., J. Farrar, M. Hilfiker, B. Johnson, K. Takatsu, T. Hamaoka, and W. W. Paul. 1982. Identification of a T cell-derived B cell growth factor distinct from interleukin 2. *J Exp Med* 155:914-923.
198. Iscove, N. N., J. S. Senn, J. E. Till, and E. A. McCulloch. 1971. Colony formation by normal and leukemic human marrow cells in culture: effect of conditioned medium from human leukocytes. *Blood* 37:1-5.
199. Moore, M. A., N. Williams, and D. Metcalfe. 1973. In vitro colony formation by normal and leukemic human hematopoietic cells: characterization of the colony-forming cells. *J Natl Cancer Inst* 50:603-623.

200. Zlotnik, A., D. I. Godfrey, M. Fischer, and T. Suda. 1992. Cytokine production by mature and immature CD4- CD8- T cells. Alpha beta- T cell receptor+ CD4-CD8- T cells produce IL-4. *J Immunol* 149:1211-1215.
201. Pike, B. L. and W. A. Robinson. 1970. Human bone marrow colony growth in agar-gel. *J Cell Physiol* 76:77-84.
202. Pluznik, D. H. and L. Sachs. 1966. The induction of clones of normal mast cells by a substance from conditioned medium. *Exp Cell Res* 43:553-563.
203. Shoham, D., E. B. David, and L. A. Rozenszajn. 1974. Cytochemical and morphologic identification of macrophages and eosinophils in tissue cultures of normal human bone marrow. *Blood* 44:221-233.
204. Sehmi, R., L. J. Wood, R. Watson, R. Foley, Q. Hamid, P. M. O'Byrne, and J. A. Denburg. 1997. Allergen-induced increases in IL-5 receptor alpha-subunit expression on bone marrow-derived CD34+ cells from asthmatic subjects. A novel marker of progenitor cell commitment towards eosinophilic differentiation. *J Clin Invest* 100:2466-2475.
205. Denburg, J. A., M. D. Inman, L. Wood, R. Ellis, R. Sehmi, M. Dahlback, and P. O'Byrne. 1997. Bone marrow progenitors in allergic airways diseases: studies in canine and human models. *Int.Arch.Allergy Immunol* 113 :181-183.
206. Denburg, J. A. 1998. Hemopoietic progenitors and cytokines in allergic inflammation. *Allergy* 53:22-26.
207. Kirshenbaum, A. S., S. W. Kessler, J. P. Goff, and D. D. Metcalfe. 1991. Demonstration of the origin of human mast cells from CD34+ bone marrow progenitor cells. *J Immunol* 146:1410-1415.
208. Pike, B. L. and W. A. Robinson. 1970. Human bone marrow colony growth in agar-gel. *J Cell Physiol* 76:77-84.
209. Campbell, H. D., W. Q. Tucker, Y. Hort, M. E. Martinson, G. Mayo, E. J. Clutterbuck, C. J. Sanderson, and I. G. Young. 1987. Molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of the gene encoding human eosinophil differentiation factor (interleukin 5). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84:6629-6633.
210. Clutterbuck, E. J. and C. J. Sanderson. 1988. Human eosinophil hematopoiesis studied in vitro by means of murine eosinophil differentiation factor (IL5): production of functionally active eosinophils from normal human bone marrow. *Blood* 71:646-651.
211. Saito, H., K. Hatake, A. M. Dvorak, K. M. Leiferman, A. D. Donnenberg, N. Arai, K. Ishizaka, and T. Ishizaka. 1988. Selective differentiation and proliferation of hematopoietic cells induced by recombinant human interleukins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85:2288-2292.

212. Sonoda, Y., N. Arai, and M. Ogawa. 1989. Humoral regulation of eosinophilopoiesis in vitro: analysis of the targets of interleukin-3, granulocyte/macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), and interleukin-5. *Leukemia* 3:14-18.
213. Clutterbuck, E. J., E. M. Hirst, and C. J. Sanderson. 1989. Human interleukin-5 (IL-5) regulates the production of eosinophils in human bone marrow cultures: comparison and interaction with IL-1, IL-3, IL-6, and GMCSF. *Blood* 73:1504-1512.
214. Favre, C., S. Saeland, C. Caux, V. Duvert, and J. E. De Vries. 1990. Interleukin-4 has basophilic and eosinophilic cell growth-promoting activity on cord blood cells. *Blood* 75:67-73.
215. Gruart, V., M. J. Truong, J. Plumas, M. Zandecki, J. P. Kusniercz, L. Prin, D. Vinatier, A. Capron, and M. Capron. 1992. Decreased expression of eosinophil peroxidase and major basic protein messenger RNAs during eosinophil maturation. *Blood* 79:2592-2597.
216. Popken-Harris, P., J. Checkel, D. Loegering, B. Madden, M. Springett, G. Kephart, and G. J. Gleich. 1998. Regulation and processing of a precursor form of eosinophil granule major basic protein (ProMBP) in differentiating eosinophils. *Blood* 92:623-631.
217. Saito, H., K. Hatake, A. M. Dvorak, K. M. Leiferman, A. D. Donnenberg, N. Arai, K. Ishizaka, and T. Ishizaka. 1988. Selective differentiation and proliferation of hematopoietic cells induced by recombinant human interleukins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85:2288-2292.
218. Walsh, G. M., A. Hartnell, R. Moqbel, O. Cromwell, L. Nagy, B. Bradley, T. Furitsu, T. Ishizaka, and A. B. Kay. 1990. Receptor expression and functional status of cultured human eosinophils derived from umbilical cord blood mononuclear cells. *Blood* 76:105-111.
219. Denburg, J. A., S. Telizyn, H. Messner, B. Lim, N. Jamal, S. J. Ackerman, G. J. Gleich, and J. Bienenstock. 1985. Heterogeneity of human peripheral blood eosinophil-type colonies: evidence for a common basophil-eosinophil progenitor. *Blood* 66:312-318.
220. Denburg, J. A., J. E. Silver, and J. S. Abrams. 1991. Interleukin-5 is a human basophilopoietin: induction of histamine content and basophilic differentiation of HL-60 cells and of peripheral blood basophil-eosinophil progenitors. *Blood* 77:1462-1468.
221. Denburg, J. A., L. Wood, G. Gauvreau, R. Sehmi, M. D. Inman, and P. M. O'Byrne. 1997. Bone marrow contribution to eosinophilic inflammation. *Mem.Inst Oswaldo Cruz* 92 Suppl 2:33-35.
222. Gauvreau, G. M., P. M. O'Byrne, R. Moqbel, J. Velazquez, R. M. Watson, K. J. Howie, and J. A. Denburg. 1998. Enhanced expression of GM-CSF in differentiating eosinophils of atopic and atopic asthmatic subjects. *Am.J Respir. Cell Mol. Biol.* 19:55-62.
223. Sehmi, R., K. Howie, D. R. Sutherland, W. Schragge, P. M. O'Byrne, and J. A. Denburg. 1996. Increased levels of CD34+ hemopoietic progenitor cells in atopic subjects. *Am.J Respir. Cell Mol. Biol.* 15:645-655.

224. Gabbianelli, M., M. Sargiacomo, E. Pelosi, U. Testa, Isacchi, G, and C. Peschle. 1990. "Pure" human hematopoietic progenitors: permissive action of basic fibroblast growth factor. *Science* 249:1561-1564.
225. McCredie, K. B., E. M. Hersh, and E. J. Freireich. 1971. Cells capable of colony formation in the peripheral blood of man. *Science* 171:293-294.
226. Rosenberg, H. F., K. D. Dyer, and F. Li. 1996. Characterization of eosinophils generated in vitro from CD34+ peripheral blood progenitor cells. *Experimental Hematology* 24:888-893.
227. Feldmann, G. 1999. [Apoptosis]. [Review] [125 refs] [French]. *Annales Pharmaceutiques Francaises* 57:291-308.
228. Shalit, M., S. Sekhsaria, and H. L. Malech. 1995. Modulation of growth and differentiation of eosinophils from human peripheral blood CD34+ cells by IL5 and other growth factors. *Cellular Immunology* 160:50-57.
229. Shalit, M., S. Sekhsaria, S. Mauhorter, S. Mahanti, and H. L. Malech. 1996. Early commitment to the eosinophil lineage by cultured human peripheral blood CD34+ cells: messenger RNA analysis. *J.Allergy Clin.Immunol.* 98:344-354.
230. Brugger, W., S. Scheduling, W. Vogel, T. Bock, H. J. Buhning, B. Ziegler , and L. Kanz. 1996. Ex vivo manipulations of CD34+ peripheral blood progenitor cells. [Review] [25 refs]. *Bone Marrow Transplantation* 18 Suppl 1:S5-7.
231. Kirshenbaum, A. S., S. W. Kessler, J. P. Goff, and D. D. Metcalfe. 1991. Demonstration of the origin of human mast cells from CD34+ bone marrow progenitor cells. *J Immunol* 146:1410-1415.
232. Link, H. and L. Arseniev. 1997. CD34 positive blood cells for allogeneic progenitor and stem cell transplantation. [Review] [92 refs]. *Leukemia & Lymphoma* 26:451-465.
233. Bender, J. G., K. L. Unverzagt, D. E. Walker, W. Lee, D. E. Van Epps, D. H. Smith, C. C. Stewart, and L. B. To. 1991. Identification and comparison of CD34-positive cells and their subpopulations from normal peripheral blood and bone marrow using multicolor flow cytometry. *Blood* 77:2591-2596.
234. Sutherland, D. R., A. Keating, R. Nayar, S. Anania, and A. K. Stewart. 1994. Sensitive detection and enumeration of CD34+ cells in peripheral and cord blood by flow cytometry. *Experimental Hematology* 22:1003-1010.
235. Serke, S., S. Sauberlich, and D. Huhn. 1991. Multiparameter flow-cytometrical quantitation of circulating CD34(+)-cells: correlation to the quantitation of circulating haemopoietic progenitor cells by in vitro colony-assay. *British Journal of Haematology* 77:453-459.
236. Goldman, J. 1995. Peripheral blood stem cells for allografting [editorial] [see comments]. *Blood* 85:1413-1415.

237. Henon, P. R. 1993. Peripheral blood stem cell transplantations: past, present and future. [Review] [119 refs]. *Stem Cells* 11:154-172.
238. Li, F., G. F. Linton, S. Sekhsaria, N. Whiting-Theobald, J. P. Katkin, J. I. Gallin, and H. L. Malech. 1994. CD34+ peripheral blood progenitors as a target for genetic correction of the two flavocytochrome b558 defective forms of chronic granulomatous disease. *Blood* 84:53-58.
239. Bregni, M., M. Magni, S. Siena, M. Di Nicola, G. Bonadonna, and A. M. Gianni. 1992. Human peripheral blood hematopoietic progenitors are optimal targets of retroviral-mediated gene transfer. *Blood* 80:1418-1422.
240. Cassel, A., M. Cottler-Fox, S. Doren, Dunbar, and CE. 1993. Retroviral-mediated gene transfer into CD34-enriched human peripheral blood stem cells. *Experimental Hematology* 21:585-591.
241. Gabbianelli, M., M. Sargiacomo, E. Pelosi, U. Testa, Isacchi, G, and C. Peschle. 1990. "Pure" human hematopoietic progenitors: permissive action of basic fibroblast growth factor. *Science* 249:1561-1564.
242. Ema, H., T. Suda, Y. Miura, and H. Nakauchi. 1990. Colony formation of clone-sorted human hematopoietic progenitors. *Blood* 75:1941-1946.
243. Ema, H., K. Kitano, T. Suda, Y. Sato, K. Muroi, M. Ohta, M. Yoshida, S. Sakamoto, M. Eguchi, and Y. Miura. 1990. In vitro differentiation of leukemic cells to eosinophils in the presence of interleukin-5 in two cases of acute myeloid leukemia with the translocation (8;21)(q22;q22). *Blood* 75:350-356.
244. Ema, H., T. Suda, K. Nagayoshi, Y. Miura, C. I. Civin, and H. Nakauchi. 1990. Target cells for granulocyte colony-stimulating factor, interleukin-3, and interleukin-5 in differentiation pathways of neutrophils and eosinophils. *Blood* 76:1956-1961.
245. Lemasters, J. J. 1999. V. Necrapoptosis and the mitochondrial permeability transition: shared pathways to necrosis and apoptosis. *Am.J Physiol* 276:G1-G6.
246. Dvorak, A. M., M. C. Mihm, Jr., J. E. Osage, T. H. Kwan, K. F. Austen, and B. U. Wintroub. 1982. Bullous pemphigoid, an ultrastructural study of the inflammatory response: eosinophil, basophil and mast cell granule changes in multiple biopsies from one patient. *J.Invest Dermatol.* 78:91-101.
247. Lundberg, A. S. and R. A. Weinberg. 1999. Control of the cell cycle and apoptosis. [Review] [85 refs]. *European Journal of Cancer* 35:531-539.
248. Paul, W. E. 1992. The role of IL-4 in the regulation of B cell development, growth and differentiation. In *IL-4 Structure and Functon*. H. Spits, ed. CRC Press, Boca Raton FL, p. 57.
249. Dvorak, A. M., A. B. Onderdonk, R. S. McLeod, R. A. Monahan-Earley, D. A. Antonioli, J. Cullen, J. E. Blair, R. Cisneros, L. Letourneau, E. Morgan, and et al. 1993. Ultrastructural

identification of exocytosis of granules from human gut eosinophils in vivo. *International Archives of Allergy & Immunology* 102:33-45.

250. Tai, P. C. and C. J. Spry. 1981. The mechanisms which produce vacuolated and degranulated eosinophils. *Br.J.Haematol.* 49:219-226.
251. Torpier, G., J. F. Colombel, C. Mathieu-Chandelier, M. Capron, J. P. Dessaint, A. Cortot, J. C. Paris, and A. Capron. 1988. Eosinophilic gastroenteritis: ultrastructural evidence for a selective release of eosinophil major basic protein. *Clin.Exp.Immunol.* 74:404-408.
252. Schwarz, E. 1914. Die Lehre von der allgemeinen und ortlichen Eosinophile. *Ergeb.Allge.Pathol.Pathol.Anat.* 17:137-789.
253. Speirs, R. S. 1958. Advances in the knowledge of the eosinophil in relation to antibody formation. *Annual New York Academic Science* 73:283-292.
254. Besset, E. G. 1962. Infiltration of eosinophils into the modified connective tissue of oestrous and pregnant animals. *Nature* 194:1259-1261.
255. Baker, J. R., P. A. Baker, E. G. Bassett, and D. B. Myers. 1976. Collagenolytic activity in peritoneal eosinophils from rats [proceedings]. *Journal of Physiology* 263:242P-243P.
256. Goetzl, E. J., S. I. Wasserman, and F. Austen. 1975. Eosinophil polymorphonuclear leukocyte function in immediate hypersensitivity. [Review] [60 refs]. *Archives of Pathology* 99:1-4.
257. Butterworth, A. E., R. F. Sturrock, V. Houba, and P. H. Rees. 1974. Antibody-dependent cell-mediated damage to schistosomula in vitro. *Nature* 252:503-505.
258. Finkelman, F. D., E. J. Pearce, J. F. Urban, Jr., and A. Sher. 1991. Regulation and biological function of helminth-induced cytokine responses. *Immunol.Today* 12:A62-A66.
259. Kay, A. B., R. Moqbel, S. R. Durham, A. J. MacDonald, G. M. Walsh, R. J. Shaw, O. Cromwell, and J. Mackay. 1985. Leucocyte activation initiated by IgE-dependent mechanisms in relation to helminthic parasitic disease and clinical models of asthma. *International Archives of Allergy & Applied Immunology* 77:69-72.
260. Krause, J. R. and D. R. Boggs. 1987. Search for eosinopenia in hospitalized patients with normal blood leukocyte concentration. *Am.J.Hematol.* 24:55-63.
261. Winkel, P., B. E. Statland, A. M. Saunders, H. Osborn, and H. Kupperman. 1981. Within-day physiologic variation of leukocyte types in healthy subjects as assayed by two automated leukocyte differential analyzers. *Am.J.Clin.Pathol.* 75:693-700.
262. Wardlaw, A. 1996. The eosinophil: new insights into its function in human health and disease [editorial]. *J.Pathol.* 179:355-357.
263. Wardlaw, A. J. and A. B. Kay. 1987. The role of the eosinophil in the pathogenesis of asthma. *Allergy* 42:321-335.

264. Bousquet, J., P. Chanez, A. M. Vignola, J. Y. Lacoste, and F. B. Michel. 1994. Eosinophil inflammation in asthma. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 150:S33-S38.
265. Gleich, G. J. 1990. The eosinophil and bronchial asthma: current understanding. [Review] [78 refs]. *Journal of Allergy & Clinical Immunology* 85:422-436.
266. Frigas, E., D. A. Loegering, G. O. Solley, G. M. Farrow, and G. J. Gleich. 1981. Elevated levels of the eosinophil granule major basic protein in the sputum of patients with bronchial asthma. *Mayo Clinic Proceedings* 56:345-353.
267. Gleich, G. J., C. R. Adolphson, and K. M. Leiferman. 1993. The biology of the eosinophilic leukocyte. *Annu.Rev.Med.* 44:85-101.
268. Gleich, G. J. and C. R. Adolphson. 1986. The eosinophilic leukocyte: structure and function. [Review] [450 refs]. *Advances in Immunology* 39:177-253.
269. Moqbel, R., S. Ying, J. Barkans, T. M. Newman, P. Kimmitt, M. Wakelin, L. Taborda-Barata, Q. Meng, C. J. Corrigan, and S. R. Durham. 1995. Identification of messenger RNA for IL-4 in human eosinophils with granule localization and release of the translated product. *J.Immunol.* 155:4939-4947.
270. Lacy, P. and R. Moqbel. 1997. Eokines: synthesis, storage and release from human eosinophils. *Mem.Inst.Oswaldo Cruz* 92 Suppl 2:125-133.
271. Hamid, Q., J. Barkans, Q. Meng, S. Ying, J. S. Abrams, A. B. Kay, and R. Moqbel. 1992. Human eosinophils synthesize and secrete interleukin-6, in vitro. *Blood* 80:1496-1501.
272. Moqbel, R., Q. Hamid, S. Ying, J. Barkans, A. Hartnell, A. Tscopoulos, A. J. Wardlaw, and A. B. Kay. 1991. Expression of mRNA and immunoreactivity for the granulocyte/macrophage colony-stimulating factor in activated human eosinophils. *J.Exp.Med.* 174:749-752.
273. Ying, S., Q. Meng, L. Taborda-Barata, C. J. Corrigan, J. Barkans, B. Assoufi, R. Moqbel, S. R. Durham, and A. B. Kay. 1996. Human eosinophils express messenger RNA encoding RANTES and store and release biologically active RANTES protein. *Eur.J.Immunol.* 26:70-76.
274. Lim, K. G., H. C. Wan, P. T. Bozza, M. B. Resnick, D. T. Wong, W. W. Cruikshank, H. Kornfeld, D. M. Center, and P. F. Weller. 1996. Human eosinophils elaborate the lymphocyte chemoattractants. IL- 16 (lymphocyte chemoattractant factor) and RANTES. *J Immunol* 156:2566-2570.
275. Thornhill, M. H., S. M. Wellicome, D. L. Mahiouz, J. S. Lanchbury, U. Kyan-Aung, and D. O. Haskard. 1991. Tumor necrosis factor combines with IL-4 or IFN-gamma to selectively enhance endothelial cell adhesiveness for T cells. The contribution of vascular cell adhesion molecule-1-dependent and -independent binding mechanisms. *J Immunol* 146:592-598.
276. Moqbel, R., S. Ying, J. Barkans, T. M. Newman, P. Kimmitt, M. Wakelin, L. Taborda-Barata, Q. Meng, C. J. Corrigan, and S. R. Durham. 1995. Identification of messenger RNA

- for IL-4 in human eosinophils with granule localization and release of the translated product. *J.Immunol.* 155:4939-4947.
277. Shalit, M., S. Sekhsaria, and H. L. Malech. 1995. Modulation of growth and differentiation of eosinophils from human peripheral blood CD34+ cells by IL5 and other growth factors. *Cell Immunol.* 160:50-57.
  278. Shalit, M., S. Sekhsaria, S. Mauhorter, S. Mahanti, and H. L. Malech. 1996. Early commitment to the eosinophil lineage by cultured human peripheral blood CD34+ cells: messenger RNA analysis. *J.Allergy Clin.Immunol.* 98:344-354.
  279. Gauvreau, G. M., P. M. O'Byrne, R. Moqbel, J. Velazquez, R. M. Watson, K. J. Howie, and J. A. Denburg. 1998. Enhanced expression of GM-CSF in differentiating eosinophils of atopic and atopic asthmatic subjects. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 19:55-62.
  280. Favre, C., S. Saeland, C. Caux, V. Duvert, and J. E. De Vries. 1990. Interleukin-4 has basophilic and eosinophilic cell growth-promoting activity on cord blood cells. *Blood* 75:67-73.
  281. Clutterbuck, E. J., E. M. Hirst, and C. J. Sanderson. 1989. Human interleukin-5 (IL-5) regulates the production of eosinophils in human bone marrow cultures: comparison and interaction with IL-1, IL-3, IL-6, and GMCSF. *Blood* 73:1504-1512.
  282. Clutterbuck, E. J. and C. J. Sanderson. 1990. Regulation of human eosinophil precursor production by cytokines: a comparison of recombinant human interleukin-1 (rhIL-1), rhIL-3, rhIL-5, rhIL-6, and rh granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood* 75:1774-1779.
  283. Ema, H., T. Suda, K. Nagayoshi, Y. Miura, C. I. Civin, Nakauchi, and H. 1990. Target cells for granulocyte colony-stimulating factor, interleukin-3, and interleukin-5 in differentiation pathways of neutrophils and eosinophils. *Blood* 76:1956-1961.
  284. Olszewska-Pazdrak, B., A. Casola, T. Saito, R. Alam, S. E. Crowe, F. Mei, Ogra, PL, and R. P. Garofalo. 1998. Cell-specific expression of RANTES, MCP-1, and MIP-1alpha by lower airway epithelial cells and eosinophils infected with respiratory syncytial virus. *Journal of Virology* 72:4756-4764.
  285. Saito, T., R. W. Deskin, A. Casola, H. Haerberle, B. Olszewska, P. B. Ernst, Alam, R, P. L. Ogra, and R. Garofalo. 1997. Respiratory syncytial virus induces selective production of the chemokine RANTES by upper airway epithelial cells. *Journal of Infectious Diseases* 175:497-504.
  286. Matsukura, S., F. Kokubu, H. Noda, H. Tokunaga, and M. Adachi. 1996. Expression of IL-6, IL-8, and RANTES on human bronchial epithelial cells, NCI-H292, induced by influenza virus A. *Journal of Allergy & Clinical Immunology* 98:1080-1087.
  287. Michelson, S., P. Dai Monte, D. Zipeto, B. Bodaghi, L. Laurent, E. Oberlin, F. Arenzana-Seisdedos, J. L. Virelizier, and M. P. Landini. 1997. Modulation of RANTES production by human cytomegalovirus infection of fibroblasts. *J.Virol.* 71:6495-6500.

288. Yamada, H., M. Matsukura, T. Yodate, J. Chihara, G. Stingl, and T. Tezuka. 1997. Enhanced production of RANTES, an eosinophil chemoattractant factor, by cytokine-stimulated epidermal keratinocytes. *Int.Arch.Allergy Immunol.* 114 Suppl 1:28-32.
289. John, M., S. J. Hirst, P. J. Jose, A. Robichaud, N. Berkman, C. Witt, C. H. Twort, P. J. Barnes, and K. F. Chung. 1997. Human airway smooth muscle cells express and release RANTES in response to T helper 1 cytokines: regulation by T helper 2 cytokines and corticosteroids. *Journal of Immunology* 158:1841-1847.
290. Fukagawa, K., H. Saito, K. Tsubota, S. Shimmura, H. Tachimoto, A. Akasawa, and Y. Oguchi. 1997. RANTES production in a conjunctival epithelial cell line. *Cornea* 16:564-570.
291. Berkman, N., A. Robichaud, V. L. Krishnan, G. Roesems, R. Robbins, P. J. Jose, P. J. Barnes, and K. F. Chung. 1996. Expression of RANTES in human airway epithelial cells: effect of corticosteroids and interleukin-4, -10 and -13. *Immunology* 87:599-603.
292. Wang, J. H., J. L. Devalia, C. Xia, R. J. Sapsford, and R. J. Davies. 1996. Expression of RANTES by human bronchial epithelial cells in vitro and in vivo and the effect of corticosteroids. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 14:27-35.
293. Terada, N., K. Maesako, N. Hamano, T. Ikeda, M. Sai, T. Yamashita, S. Fukuda, and A. Konno. 1996. RANTES production in nasal epithelial cells and endothelial cells. *Journal of Allergy & Clinical Immunology* 98:S230-7.
294. Yang, A. G., X. Bai, X. F. Huang, C. Yao, and S. Chen. 1997. Phenotypic knockout of HIV type 1 chemokine coreceptor CCR-5 by intrakines as potential therapeutic approach for HIV-1 infection. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 94:11567-11572.
295. Ishihara, C., K. Ochiai, M. Kagami, H. Takashahi, G. Matsuyama, S. Yoshida, H. Tomioka, and N. Koya. 1997. Human peripheral eosinophils express functional interferon-gamma receptors (IFN-gammaR). *Clin.Exp.Immunol.* 110:524-529.
296. Valerius, T., R. Repp, J. R. Kalden, and E. Platzer. 1990. Effects of IFN on human eosinophils in comparison with other cytokines. A novel class of eosinophil activators with delayed onset of action. *J.Immunol.* 145:2950-2958.
297. Torpier, G., J. F. Colombel, C. Mathieu-Chandelier, M. Capron, J. P. Dessaint, A. Cortot, J. C. Paris, and A. Capron. 1988. Eosinophilic gastroenteritis: ultrastructural evidence for a selective release of eosinophil major basic protein. *Clin.Exp.Immunol.* 74:404-408.
298. Schrum, S., P. Probst, B. Fleischer, and P. F. Zipfel. 1996. Synthesis of the CC-chemokines MIP-1alpha, MIP-1beta, and RANTES is associated with a type 1 immune response. *J.Immunol.* 157:3598-3604.
299. Corrigan, C. J. and A. B. Kay. 1991. CD4 T lymphocyte activation in acute severe asthma. *International Archives of Allergy & Applied Immunology* 94:270-271.

300. Shi, H., X. Zhong, and H. Xu. 1996. [Effect of interferon-gamma on antigen-induced eosinophil infiltration in mouse airway]. *Chung Hua Nei Ko Tsa Chih* 35:371-374.
301. Schneider, L. C., Z. Baz, C. Zarcone, and D. Zurakowski. 1998. Long-term therapy with recombinant interferon-gamma (rIFN-gamma) for atopic dermatitis. *Ann.Allergy Asthma Immunol.* 80:263-268.
302. Nakajima, H., I. Iwamoto, and S. Yoshida. 1993. Aerosolized recombinant interferon-gamma prevents antigen-induced eosinophil recruitment in mouse trachea. *Am.Rev.Respir.Dis.* 148:1102-1104.
303. Iwamoto, I., H. Nakajima, H. Endo, and S. Yoshida. 1993. Interferon gamma regulates antigen-induced eosinophil recruitment into the mouse airways by inhibiting the infiltration of CD4+ T cells. *J.Exp.Med.* 177:573-576.
304. Mosmann, T. R. and R. L. Coffman. 1989. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu.Rev.Immunol.* 7:145-173.

# **Interleukin-4 and RANTES expression in maturing eosinophils derived from human cord blood CD34<sup>+</sup> progenitors<sup>1</sup>**

**Juan R. Velazquez, MSc, Paige Lacy, PhD, Salahaddin Mahmudi-Azer, MSc,**

**Ben Bablitz, BSc, MLT, Craig D. Milne, BSc, Judah A. Denburg, MD, and**

**Redwan Moqbel, PhD, FRCPath**

Pulmonary Research Group, Department of Medicine, University of Alberta, Edmonton, Alberta; \*Asthma

Research Group, Department of Medicine, McMaster University, Hamilton, Ontario, Canada

**Running Title: Cytokine expression in maturing eosinophils**

Address correspondence to:

Dr. Redwan Moqbel, PhD, FRCPath  
Pulmonary Research Group  
574 Heritage Medical Research Center  
University of Alberta  
Edmonton, Alberta  
Canada T6G 2S2  
Tel: (780) 492 1909  
Fax: (780) 492 5329  
E-mail: [redwan.moqbel@ualberta.ca](mailto:redwan.moqbel@ualberta.ca)

---

<sup>1</sup> This work was supported by the Medical Research Council, Canada, the Alberta Heritage Foundation for Medical Research, Canada; the Glaxo Heritage Research Laboratory Award; and by CONACYT Grant no. 3256P-M9608 and Coordination of Biomedical Research, IMSS, Mexico City, Mexico. J.R.V. is a recipient of a fellowship from CONACYT and IMSS; P.L. is a Parker B. Francis Fellow in Pulmonary Research; R.M. is an Alberta Heritage Senior Medical Scholar.

## Effects of Interferon- $\gamma$ on Mobilization and Release of Eosinophil-Derived RANTES

J.R. Velazquez P. Lacy S. Mahmudi-Azer R. Moqbel

Pulmonary Research Group, Department of Medicine, University of Alberta, Edmonton, Canada

### Key Words

Asthma · Granulocytes · Crystalloid granules · Chemokines

### Abstract

Eosinophils synthesize and release a number of cytokines and chemokines, including RANTES, a potent chemoattractant particularly for memory T cells and eosinophils. Long-term (> 12 h) incubation with interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) has been shown to activate eosinophils and induce expression of membrane receptors. We hypothesized that IFN- $\gamma$  mobilizes intracellular RANTES in eosinophils in advance of mediator release. Highly purified peripheral blood eosinophils were obtained from asthmatics and stimulated with IFN- $\gamma$  at 500 U/ml for time course analysis up to 2 h. By specific ELISA, RANTES was detected in supernatants ( $80 \pm 15$  pg per  $2 \times 10^6$  cells) following 120 min of stimulation. Immunoreactive RANTES in resting cells ( $5 \times 10^7$  eosinophils) was detected in two intracellular compartments in studies of subcellular fractionation by density gradient centrifugation. After 10 min IFN- $\gamma$  stimulation, RANTES immunoreactivity was confined to crystalloid granules. RANTES was redistributed from secretory granules to light-membrane fractions after 60 min of IFN- $\gamma$  incubation. Our data suggest that rapid mobilization and release of RANTES occurs from stimulated eosinophils. These findings may have important implications for the role of IFN- $\gamma$  in activating human eosinophils, particular-

ly in severe chronic asthma or viral exacerbation of asthmatic inflammation, where this cytokine may play a role.

### Introduction

Eosinophil activation in allergic inflammation potentially involves the release of up to 19 different cytokines and growth factors [reviewed in 1], including RANTES [2]. RANTES is a CC chemokine and acts as a potent *in vitro* chemoattractant for memory T cells and eosinophils [3, 4]. Release of RANTES into biological fluids during allergic inflammation correlates strongly with the intensity of inflammatory cell infiltrate and symptoms of allergy and asthma [5]. An earlier study has shown that peripheral blood eosinophils express RANTES mRNA and apparently store RANTES intracellularly [2]. Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) stimulation, *in vitro*, induced upregulation of RANTES transcription and translation in eosinophils [2].

We hypothesized that intracellular RANTES is rapidly mobilized and secreted following stimulation by IFN- $\gamma$  in a time-dependent manner. RANTES release was analyzed in eosinophils purified from atopic subjects using RANTES-specific ELISA and subcellular fractionation, and its sites of storage were compared with the crystalloid granule protein eosinophil peroxidase (EPO).

KARGER

Fax +41 61 306 12 10  
E-Mail karger@karger.ch  
www.karger.com

© 1999 S. Karger AG, Basel  
1018-243X/99/1184-447\$17.00/0

Accessible online at  
<http://BioMedNet.karger.com>

Correspondence to: Dr. Redwan Moqbel  
Pulmonary Research Group, 574 Heritage Medical Research Center, University of Alberta,  
Edmonton, Alberta T6G 2S2 (Canada)  
Tel. +1 403 492 1909, Fax +1 403 492 5329  
E-Mail redwan.moqbel@ualberta.ca

## Rapid Mobilization of Intracellularly Stored RANTES in Response to Interferon- $\gamma$ in Human Eosinophils

By Paige Lacy, Salahaddin Mahmudi-Azer, Ben Babilitz, Stacey C. Hagen, Juan R. Velazquez, S.F. Paul Man, and Redwan Moqbel

The CC chemokine RANTES is synthesized, stored, and upregulated in response to interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) in human peripheral blood eosinophils. In this report, we propose that RANTES is rapidly mobilized from eosinophil crystalloid granules during agonist-induced degranulation. We stimulated purified eosinophils (>99% from atopic asthmatics with 500 U/mL IFN- $\gamma$  to analyze the kinetics of mobilization and release of RANTES (0 to 240 minutes). We used subcellular fractionation, immunogold analysis, two-color confocal laser scanning microscopy (CLSM), and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) to trace the movement of eosinophil-derived RANTES from intracellular stores to release. RANTES was rapidly mobilized (10 minutes) and released after 120 minutes of stimulation ( $80 \pm 15$  pg/mL per  $2 \times 10^6$  cells).

**E**OSINOPHIL ACCUMULATION is a hallmark of allergic inflammation, particularly within the airway mucosa of asthmatic subjects. Eosinophils are thought to be activated in response to local inflammatory stimuli by releasing an array of mediators. These consist of cytotoxic granule proteins such as major basic protein (MBP), eosinophil cationic protein (ECP), and eosinophil peroxidase (EPO), products of respiratory burst, and lipid mediators.<sup>1,2</sup> In addition, eosinophils potentially synthesize or produce up to 18 different cytokines and growth factors, including interleukin-2 (IL-2),<sup>3,4</sup> IL-4,<sup>5</sup> IL-6,<sup>6,7</sup> granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF),<sup>8-10</sup> and RANTES.<sup>11-13</sup> A number of these proteins have been shown to exert autocrine effects on eosinophils, including RANTES.<sup>8,11,14</sup>

RANTES is a CC chemokine, which has been shown to be a potent chemoattractant for CD4<sup>+</sup>/CD45RO<sup>+</sup> T cells, eosinophils, basophils, monocyte/macrophages, and mast cells.<sup>15-18</sup> In addition to eosinophils, RANTES is synthesized and/or released by a number of other cell types, such as T cells, platelets, macrophages, endothelial cells, fibroblasts, epithelial cells, and a mast cell line.<sup>16,19-23</sup> Cutaneous injection of RANTES was found to induce marked eosinophil recruitment in human subjects, which was more rapid in allergic compared with normal subjects.<sup>24</sup> In earlier studies, RANTES has been implicated in delayed-type hypersensitivity reactions<sup>19</sup> and in ongoing inflammatory processes in rheumatoid arthritis.<sup>20</sup> RANTES may have a role in contributing to the infiltration of inflammatory cells in allergen-challenged airway mucosal tissue in asthma. Although the expression and release of RANTES in tissue and bronchoalveolar lavage (BAL) fluids from resting asthmatic and normal subjects do not differ significantly,<sup>25,26</sup> the levels of RANTES were found to be elevated in BAL fluids obtained from asthmatics 4 hours after allergen challenge<sup>27</sup> and in nasal fluids obtained from subjects with allergic rhinitis after challenge with a grass pollen extract.<sup>28</sup> Increased RANTES secretion correlated strongly with elevated tissue eosinophil numbers in both asthma and rhinitis. Furthermore, RANTES has been shown to upregulate expression of CD11/CD18 on monocytes<sup>29</sup> and induce histamine release from human baso-

phils,<sup>30</sup> suggesting that it may also have a role in immediate-type allergic responses. It has previously been shown that peripheral blood eosinophils express mRNA for and release bioactive RANTES in response to serum-coated beads, using immunocytochemistry (ICC), in situ hybridization (ISH), and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).<sup>11</sup> A granular pattern of immunocytochemical staining of eosinophils was observed, suggesting that eosinophils store preformed RANTES in intracellular compartments. Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) was found to upregulate RANTES mRNA and protein expression in eosinophils after 16 hours of stimulation.<sup>11</sup> IFN- $\gamma$  has been shown to be a viable stimulus for eosinophils in a number of studies.<sup>6,7,9,31-33</sup>

© 1999 by The American Society of Hematology.

phils,<sup>30</sup> suggesting that it may also have a role in immediate-type allergic responses.

It has previously been shown that peripheral blood eosinophils express mRNA for and release bioactive RANTES in response to serum-coated beads, using immunocytochemistry (ICC), in situ hybridization (ISH), and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).<sup>11</sup> A granular pattern of immunocytochemical staining of eosinophils was observed, suggesting that eosinophils store preformed RANTES in intracellular compartments. Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) was found to upregulate RANTES mRNA and protein expression in eosinophils after 16 hours of stimulation.<sup>11</sup> IFN- $\gamma$  has been shown to be a viable stimulus for eosinophils in a number of studies.<sup>6,7,9,31-33</sup>

We originally hypothesized that intracellular RANTES was secreted after stimulation by IFN- $\gamma$  in a time-dependent manner. However, preliminary data indicated that IFN- $\gamma$  had a more rapid effect on mobilization of RANTES than previously anticipated. Thus, we propose that RANTES is rapidly mobilized from intracellular stores in a piecemeal pattern of degranulation. Eosinophils were purified from peripheral blood obtained from atopic asthmatics and stimulated with recombinant

From the Pulmonary Research Group, Department of Medicine, University of Alberta, Edmonton, Alberta, Canada.

Submitted October 19, 1998; accepted February 19, 1999.

Supported by the Medical Research Council, Canada, the University of Alberta Hospital Foundation, the Alberta Heritage Foundation for Medical Research, and the Glaxo Heritage Research Laboratory Award. P.L. is a Parker B. Francis Fellow in Pulmonary Medicine and R.M. is an Alberta Heritage Senior Medical Scholar.

Address reprint requests to Redwan Moqbel, PhD, FRCPath, Pulmonary Research Group, 574 Heritage Medical Research Center, University of Alberta, Edmonton, Alberta, Canada T6G 2S2; e-mail: redwan.moqbel@ualberta.ca.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. section 1734 solely to indicate this fact.

© 1999 by The American Society of Hematology.  
0006-4971/99/4011-0019\$3.00/0