

ARTÍCULO ORIGINAL

Activación de polimorfonucleares neutrófilos por UDP-Glucosa extracelular

Borda, N.; Carbia, C.; Rabossi, G.; Arcavi, M.; García Gonçalves, L.; Ameneiros, M.; Martínez, R.; Lazarowski, A.; Merelli, A. Instituto de Investigaciones en Fisiopatología y Bioquímica Clínica (INFIBIOC), Laboratorio de Hematología, Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA. CABA, Argentina.

Contacto: Merelli, A.; amerelli2002@yahoo.com.ar

RESUMEN

Los nucleótidos purinérgicos extracelulares juegan roles importantes en la señalización celular mediante la activación de sus receptores específicos, expresados en la mayoría de las células. El receptor P2Y₁₄ responde a la señalización por UDP-glucosa extracelular pero no por otros nucleótidos/nucleósidos purinérgicos libres. Si bien, los polimorfonucleares neutrófilos normales presentan altos niveles de transcritos del receptor P2Y₁₄, su función en dichas células ha sido poco investigada. El objetivo de este trabajo fue demostrar si UDP-Glucosa extracelular induce la quimiotaxis y adhesividad de los neutrófilos. Para ello, se midió la quimiotaxis en polimorfonucleares neutrófilos de: a) pacientes con leucocitosis y neutrofilia (n=10), b) individuos sanos (n=10), c) neutrófilos normales pre-incubados con suero de individuos sanos (n=20) y d) neutrófilos normales pre-incubados con suero de pacientes con artritis reumatoidea (n=17). El control basal se realizó con neutrófilos preincubados con RPMI. También se ensayó la adhesividad de neutrófilos normales al vidrio. En ambos procedimientos se utilizaron como agonistas, UDP-Glucosa y fMLP. Los resultados obtenidos indicaron que, en los grupos a y b los valores de quimiotaxis inducida por fMLP fueron similares, mientras que, la inducida por UDP-Glucosa fue superior en el grupo a. En el grupo c, fMLP mostró mayor estimulación que UDP-Glucosa, en tanto que, en neutrófilos normales preincubados con suero de pacientes con artritis reumatoidea (grupo d) la quimiotaxis inducida por ambos agonistas fue similar. Cabe destacar que UDP-Glucosa presentó mayor actividad quimiotáctica en neutrófilos normales preincubados con suero de pacientes con artritis reumatoidea, respecto a los preincubados con suero normal. La adhesividad al vidrio de neutrófilos normales, fue mayor con UDP-Glucosa que con fMLP. En conclusión, estos resultados sugieren que la UDP-Glucosa como agonista extracelular, tiene capacidad de generar respuestas fisiológicas en los neutrófilos, tales como la activación de la quimiotaxis y la adhesividad, donde la quimiotaxis se hace más evidente frente a condiciones inflamatorias previas.

Palabras clave: PMN, UDP-G, quimiotaxis, P2Y₁₄-R, adhesividad.

ABSTRACT

Extracellular purinergic nucleotides play important roles in cell signalling by activating their specific receptors expressed in most cells. The P2Y₁₄ receptor responds to extracellular signalling by UDP-glucose but not to other free purinergic nucleotides / nucleosides. Normal polymorphonuclear neutrophils have high levels of P2Y₁₄-R transcripts. However, the function of these receptors in these cells has been poorly investigated. The aim of this study was to demonstrate whether UDP-glucose induces chemotaxis and adhesion of neutrophils. For this purpose, we measured chemotaxis in: a) polymorphonuclear neutrophils of patients with leukocytosis and neutrophilia (n=10); b) polymorphonuclear neutrophils of healthy individuals (n=10); c) normal polymorphonuclear neutrophils pre-incubated with serum from normal individuals (n = 20); and d) normal polymorphonuclear neutrophils pre-incubated with serum from patients with rheumatoid arthritis (n=17). The baseline control was performed with polymorphonuclear neutrophils pre-incubated with RPMI. The adhesiveness to glass of polymorphonuclear neutrophils was also tested. UDP-glucose and fMLP were used as agonists in both procedures. In a and b, the values of chemotaxis induced with fMLP were similar, whereas those induced with UDP-glucose were higher in group a. In group c, fMLP showed greater stimulation than UDP-glucose, whereas in group d chemotaxis was similar with both agonists. UDP-glucose showed higher chemotactic activity in cells pre-incubated with serum from patients with rheumatoid arthritis than in cells pre-incubated with normal serum. Adhesiveness to glass of normal neutrophils was higher when induced with UDP-glucose than when induced with fMLP. In conclusion, these results suggest that UDP-glucose, as extracellular agonist, can induce physiological responses of neutrophils such as chemotaxis and adhesiveness, where chemotaxis becomes more evident under previous inflammatory conditions.

Key words: polymorphonuclear neutrophils, UDP-glucose, chemotaxis, P2Y₁₄-R, adhesiveness.

Introducción

Los polimorfonucleares neutrófilos (PMN) son células dinámicas móviles que forman parte de los mecanismos de defensa contra muchos agentes patógenos. Son los leucocitos más numerosos presentes en la sangre periférica de individuos adultos, siendo su rango normal estándar de $2,0-7,0 \times 10^9/l$.¹

Éstas células tienen la capacidad de fagocitar y destruir una amplia gama de gérmenes patógenos responsables de la generación de infecciones y también participan en el desarrollo del proceso inflamatorio, así como de diferentes patologías autoinmunes^{2,3}.

Los PMN se producen en la médula ósea (MO), a partir de las células madre hematopoyéticas pluripotenciales, las que inician un proceso de diferenciación o granulopoyesis en respuesta a la estimulación ejercida por distintos factores de crecimiento. Dicho proceso genera elementos de maduración intermedia que finalmente se diferenciarán en neutrófilos, eosinófilos y basófilos periféricos. Los PMN circulantes corresponden a las formas más maduras de la progenie granulocítica-neutrófila, con un diámetro promedio de 12-15 micras, según se puede observar en extendidos de sangre periférica (Figura 1: A-F).

Estas células tienen una vida media muy corta comparada a otras células hematopoyéticas y mueren mientras ejercen su función bactericida intratisularmente, para lo cual, deben diferenciarse y migrar al foco infeccioso o inflamatorio para actuar (migración suicida). Esta particular forma de actuar requiere de varias funciones tales como: adhesión, migración, degranulación [con liberación de mediadores de la inflamación y/o enzimas lisosomales], fagocitosis y apoptosis.

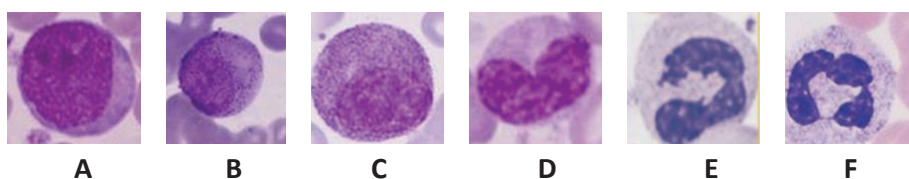
Gran parte de la maquinaria molecular necesaria para cada una de estas respuestas de los PMN, se almacenan en sus gránulos citoplasmáticos o bien en la membrana plasmática⁴⁻⁸. Los neutrófilos forman parte de la respuesta temprana a los estímulos inflamatorios, lo que implica su adhesión a la microvasculatura, su posterior migración y retención en el tejido afectado. Una nueva línea de conceptos, aún controversiales, acerca de cómo los neutrófilos pueden combatir a los microorganismos incluye la posible regulación de la función de las enzimas de sus gránulos, mediada por flujos iónicos y la formación de las llamadas "trampas extracelulares de neutrófilos (NETs)"^{9,10}.

Los mecanismos involucrados en el reclutamiento de neutrófilos hacia los sitios inflamatorios han sido amplia-

mente estudiados. Conocer los procesos de señalización que participan en la modulación de su función, puede resultar de gran importancia en la prevención de la lesión tisular inducida por neutrófilos infiltrantes y evitar el daño, fallo o disfunción de órganos¹¹. Tras su activación, los PMN circulantes se marginan en posición adyacente a la pared del endotelio vascular, mediante la expresión de moléculas de adhesión como la P-selectina e integrina, migrando posteriormente hacia los tejidos, donde sobreviven por 1-2 días¹². El PMN tiene la capacidad de detectar la presencia de bajas concentraciones de compuestos bacterianos que activan su migración desde el torrente sanguíneo hacia el sitio de la infección, así como, la concentración del agente quimiotáctico suele ser extremadamente baja en las proximidades de los PMN, por lo tanto, estas células requieren mecanismos especiales para sostener la señal y migrar en dirección del gradiente. Aunque el mecanismo de quimiotaxis se ha estudiado ampliamente, aún no está totalmente dilucidado. Las células polarizan la expresión de sus receptores quimiotácticos para que queden expuestos hacia la dirección de los estímulos, lo que permite orientar el movimiento migratorio^{4,5}. La mayoría de las moléculas de membrana de los PMN y sus mecanismos de interacción con diferentes tipos celulares, incluyendo células vasculares, macrófagos, células dendríticas, plaquetas, etc., han sido ampliamente descritos¹³.

Una nueva línea de investigaciones, surgida en la última década, ha mostrado la competencia de la señalización ejercida por distintos nucleótidos extracelulares sobre la diferenciación, proliferación y quimiotaxis de células hematopoyéticas, a través de sus respectivos receptores (P2X y P2Y)^{14,15}. A su vez, se demostró que dichos agonistas también activan la quimiotaxis de los PMN^{16,17}. Existe cierto grado de especificidad en la activación de dichos receptores purinérgicos, de modo tal que el receptor P2Y₂ se activa por ATP o UTP, pero no por UDP¹⁸. Cuando el neutrófilo detecta una señal quimiotáctica [por ejemplo, péptidos bacterianos tales como fMLP], distorsiona su superficie y emite un pseudópodo hacia la señal quimiotáctica. Esta deformación de su membrana plasmática promueve la liberación local de ATP, que autoactiva el receptor P2Y₂ presente en el pseudópodo emergente. La liberación de ATP se produce predominantemente en el polo frontal de la célula, donde la formación de pseudópodos ha tenido lugar generando un nuevo gradiente quimiotáctico [esta vez debido al propio ATP autoliberado], que permite amplificar la señal iniciada

Figura 1. Granulopoyesis (A: Mieloblasto; B: Promielocito; C: Mielocito; D: Metamielocito; E: Granulocito en banda; F: PMN).



por fMLP. Es importante tener en cuenta que un segundo mecanismo de amplificación de la respuesta quimiotáctica implica la conversión del ATP liberado a adenosina y la posterior activación de sus receptores (P2Y₂ y A₃) presentes en los neutrófilos¹⁹ [Figura 2].

Hasta ahora, sin embargo, son pocos los estudios funcionales en los cuales es posible inferir un papel fisiológico para otros receptores purinérgicos como P2Y₁₁, P2Y₁₃ y P2Y₁₄. Este último receptor (P2Y₁₄-R), identificado más recientemente y, tal vez el menos estudiado, es un receptor metabotrópico. Éste se reconoció inicialmente como un receptor que se activa nucleótidos glicosilados, tales como UDP-glucosa (UDP-G), UDP-galactosa, UDP-N-acetilglucosamina y ácido UDP-N-glucurónico, exhibiendo la más alta selectividad entre los receptores purinérgicos para dichos agonistas, y sin afinidad por la adenosina y/o nucleótidos de uridina^{20,21}. Si bien el P2Y₁₄-R ha sido considerado como un receptor de nucleótidos-glicosilados, se ha informado que UDP (sin residuos glúcidos) puede ser un antagonista competitivo, o agonista parcial de este receptor²².

La activación de proteínas G inhibitorias (Gi), promovida por el agonista (UDP-G) y la consecuente inhibición de la adenilato ciclasa, es considerada una de las principales cascadas de señalización intracelular disparadas por la excitación del P2Y₁₄-R, como fue demostrado en distintos tipos celulares (HEK-293, glioma C6, células CHO), y muestran una expresión estable de dicho receptor²³.

A diferencia de otros tipos celulares (células dendríticas, linfocitos T, células de la médula ósea y astrocitos), los PMN tienen una altísima carga de transcritos (mRNA) del P2Y₁₄-R, siendo 14.000 veces mayor que en los tipos celulares mencionados²⁴.

Las células progenitoras hematopoyéticas están presentes en circulación en pequeñas cantidades y pueden

ser liberadas de la MO por acción de los respectivos factores estimulantes de colonias; como así también por diferentes injurias. Recientemente se ha demostrado que UDP-G puede ser liberada al medio extracelular en condiciones de estrés. También se ha documentado que UDP-G logra estimular la movilización de células hematopoyéticas progenitoras de un animal sano, las que inoculadas a un animal aplasiado [letalmente irradiado], son capaces de repoblar su médula ósea restituyendo todos los linajes celulares sanguíneos²⁵. En función de lo mencionado, sería lógico pensar que la UDP-G extracelular (UDP-G-e) podría activar o inhibir algunas funciones de los neutrófilos, tales como la quimiotaxis, la migración, o la adhesividad. Es importante destacar que UDP-G puede ser liberada por distintos tipos celulares, jugando un rol protagónico en la señalización como agonista externo de sus receptores específicos²⁶. Sin embargo, hasta el presente, el potencial efecto de este agonista sobre los PMN ha sido escasamente investigado.

El objetivo de este trabajo es investigar si la incubación de PMN con UDP-G extracelular, posee efectos regulatorios sobre la quimiotaxis (QTX) y la adhesión de dichas células, y verificar si dichos efectos podrían estar condicionados por una situación inflamatoria pre-existente.

Materiales y Métodos

Diseño experimental

Se diseñaron dos tipos de experimentos:

- Ensayo de QTX en PMN provenientes de:
 - a) voluntarios sanos (n = 10)
 - b) individuos con leucocitosis (> 12.000 células/ml y neutrofilia > 75%) (n = 10)
- Ensayo de QTX en PMN provenientes de individuos normales preincubados con:
 - a) sueros normales (n = 20)
 - b) sueros de pacientes con AR (n = 17)
 - c) con buffer RPMI-1640 (n = 5)

En todos los grupos los PMN fueron estimulados con UDP-G-extracelular o con fMLP.

Muestras

En una primera fase la QTX fue ensayada con muestras de sangre periférica, extraída a individuos adultos voluntarios normales, y de individuos con leucocitosis (> 12.000 cel/ml y neutrofilia > 75%). En una segunda fase, la QTX fue examinada utilizando PMN de individuos sanos previamente incubados con: suero normal, suero de pacientes con artritis reumatoidea, o RPMI-1640.

Todos los individuos con AR y los controles normales fueron evaluados con los siguientes parámetros de laboratorio: hemograma, eritrosedimentación, PCR cuantitativa por métodos convencionales y TNF circulante por técnica de quimioluminiscencia (Roche Diagnostics). Los sueros fueron conservados a -20° C hasta la realización de las pruebas serológicas.

Figura 2. La mayoría de los tejidos son capaces de liberar nucleótidos purinérgicos incluyendo la UDP-G, que activan sus correspondientes receptores extracelulares. Se postula que la UDP-G, podría tener un efecto quimioattractante sobre los PMN.

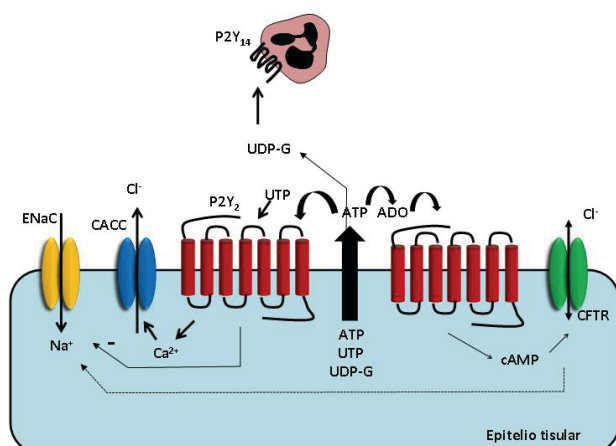
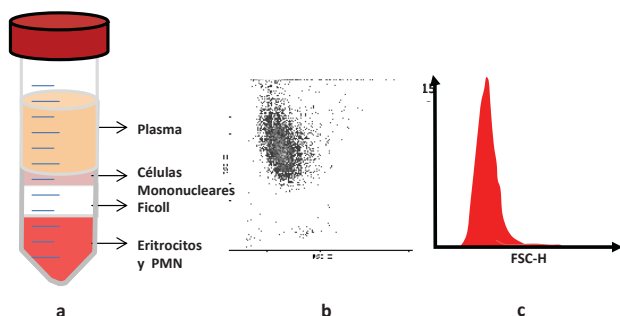


Figura 3. a- Esquema de separación celular con Ficoll-Hypaque (Izquierda).

b- Análisis por citometría de flujo: Patrón compatible con una población homogénea de PMNs viables. Obsérvese en la parte inferior la presencia de una mínima población celular posiblemente linfocitaria. Estos datos confirman lo obtenido con el equipo automatizado de hemograma.

c- Histograma. Frequency vs. Forward Scatter que muestra la población altamente homogénea.



Aislamiento y caracterización de los PMN

Los PMN fueron aislados mediante la técnica de separación por gradiente de densidad y centrifugación con *Ficoll-Hypaque* (Figura 3a) ²⁷.

La suspensión celular obtenida fue cuantificada utilizando un contador hematológico automatizado (*Sysmex XT-1800i-Sysmex Corporation, Kobe, Japan*). Se alcanzó una concentración de PMN del 99% mientras que las células mononucleares no superaron el 0,5%. La viabilidad se testeó con tinción vital *Trypan Blue*, y la suspensión fue ajustada a una concentración final de $2,5 \times 10^6$ cel./ml.

Este procedimiento fue controlado por técnicas de citometría de flujo para confirmar el linaje celular por parámetros FSC/SSC (Figura 3b, 3c).

Ensayo de quimiotaxis

Se colocaron 130 μ l de: a) fMLP [control positivo], b) RPMI-1640 [control negativo] y c) UDP-G, en los correspondientes pocillos del compartimiento inferior de la cámara de Boyden modificada.

Posteriormente se sembraron 100 μ l de la suspensión de

PMN antes obtenida en los pocillos del compartimiento superior de la cámara. Ambos compartimientos son separados por una membrana de policarbonato con poros de 3μ m (Figura 4).

La placa fue incubada a 37° C en estufa gaseada [5% CO_2] por 50 minutos y la suspensión celular de la fase superior fue removida, mientras que, cada filtro fue cuidadosamente lavado con salina estéril, teñido con May Grunwald-Giemsa y observado al microscopio (100 X), para la cuantificación de las células quimioatraídas (4 campos por filtro). Este resultado se expresa como n° de PMN /campo, y también, puede expresarse como el recuento total de PMN transmigrados por pocillo (PMN / well).

Curva dosis respuesta

Las pruebas de QTX se ensayaron inmediatamente después del aislamiento de los PMN neutrófilos y se realizaron las correspondientes curvas dosis-respuesta de UDP-G-e (concentraciones crecientes desde 10^{-7} M a 10^{-3} M), y de fMLP (concentraciones crecientes desde 10^{-10} M a 10^{-7} M).

Las concentraciones óptimas obtenidas fueron de 100 mM para la UDPG-e y 100 nM para el fMLP, las cuales fueron utilizadas en todos los ensayos.

Los estudios de QTX estimulada con UDP-G-e, fueron realizados en presencia y en ausencia de apirasa (*Apyrase* 0,5 U/ml - *Sigma Aldrich* Cat No. A6410). La apirasa es una enzima que cataliza la hidrólisis de ATP para dar AMP y fosfato inorgánico. También puede hidrolizar ADP y otros nucleótidos (tri o di-fosfatos), y no actúa sobre nucleótidos glicosilados como UDP-G. El agregado de apirasa en este ensayo permitió verificar que la activación de la QTX de los PMN fue debida exclusivamente a UDP-G-e agregado.

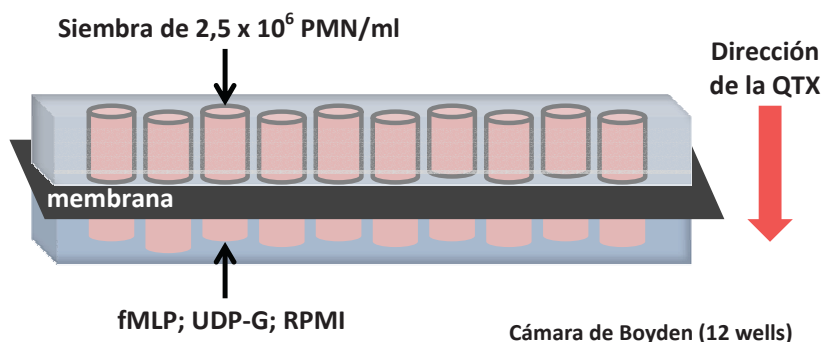
Ensayo de QTX en muestras de PMN neutrófilos de individuos sanos (sin leucocitosis ni neutrofilia)

La QTX de los PMN de 17 individuos sanos, se ensayó con UDP-G-e (100 mM), fMLP (100 nM) como control positivo y RPMI-1640 como control negativo.

Ensayo de quimiotaxis en sujetos con leucocitosis

La QTX de PMN provenientes de sujetos con leucocitosis (> 12.000 cel / ml y neutrofilia $> 75\%$) se ensayó en las mismas condiciones que en el grupo anterior.

Figura 4. Esquema de la Cámara de Boyden.



Ensayo de quimiotaxis de PMN normales pre-incubados con suero normal y con suero de pacientes con AR

Las pruebas de QTX se realizaron empleando los mismos métodos antes descritos, con PMN neutrófilos normales pre-incubados con sueros normales (n= 20) y con sueros provenientes de pacientes con artritis reumatoidea (n= 17).

Técnica de adhesión

Se incubaron PMN de individuos sanos, con fMLP, UDP-G-e y RPMI 1640. Una alícuota de cada suspensión se colocó sobre un portaobjeto, el cual se incubó 45 minutos en estufa (37° C) gaseada (5% CO₂) y fue posteriormente examinado al microscopio óptico. La suspensión de PMN utilizada fue la misma que en los ensayos de QTX. Se procesaron 4 muestras por duplicado.

Estadística

Los resultados fueron analizados con INFOSTAT, con pruebas test de t (Figura 6) y de Kruskal Wallis (Figuras 7 y 8).

Resultados:

Curvas dosis-respuesta

Las curvas dosis respuesta con fMLP y con UDP-G-e mostraron un incremento en la actividad quimiotáctica de los PMN provenientes de muestras con leucocitosis y neutrofilia. Las concentraciones de fMLP necesarias para esta estimulación resultaron significativamente menores a las de UDP-G-e. Las curvas de UDP-G-e con y sin apirasa, no mostraron diferencias significativas (Figura 5 y 6).

QTX de PMN con o sin leucocitosis / neutrofilia

La activación de la quimiotaxis utilizando PMN provenientes de individuos normales (sin leucocitosis) y de individuos con

leucocitosis y neutrofilia, mostraron diferentes perfiles de inducción, ya sea con fMLP o con UDP-G-e, y ambos casos mostraron diferencias significativas con respecto a los controles con RPMI. La estimulación con fMLP fue indistintamente elevada frente a los dos tipos de poblaciones leucocitarias, en tanto que la UDP-G-e mostró una fuerte acción inductora, sólo frente a los PMN provenientes de muestras con leucocitosis ($p < 0,0001$) (Figura 7).

Resultados de las determinaciones realizadas en los pacientes con artritis reumatoide

Ninguno de los pacientes tenía leucopenia ni plaquetopenia, y sólo tres de ellos presentaban anemia leve. Los valores de ERS fueron medianamente elevados (VN: hasta 10-15 mm/1h) en la mayoría de ellos, hecho que no se correlacionó con los valores de la PCR cuantitativa (VN: hasta 6 mg/L). El recuento leucocitario y el % de PMN resultaron normales en todos los individuos. En la tabla I, se detallan los resultados de 3 parámetros del hemograma, considerados relevantes para el estudio (Hto, Rto. Blancos y % PMN), acompañados de las determinaciones complementarias tales como: ERS y PCR cuantitativa [Tabla I].

Los resultados de TNF fueron en su mayoría bajos, excepto en tres casos que tenían valores elevados y en los que se constató una mayor actividad de QTX inducida por UDP-G-e respecto a la QTX inducida por fMLP. Sin embargo, solamente en el caso con valores de TNF de 220 pg/ml, la activación de la QTX con UDP-G-e duplicó el valor observado frente a fMLP [Tabla II].

QTX de PMN normales, preincubados con suero normal o suero de pacientes con AR

La QTX de PMN normales previamente enfrentados con sueros normales, fue mayor cuando se indujo con fMLP que con UDP-G-e y RPMI. En cambio, la QTX de los PMN normales

Figura 5. Curva dosis respuesta de la QTX inducida con fMLP de PMN provenientes de individuos con leucocitosis y neutrofilia. Las microfotografías corresponden a las dosis mínimas y máximas de fMLP aplicadas respectivamente. Los ensayos con PMNs de individuos normales mostraron resultados similares.

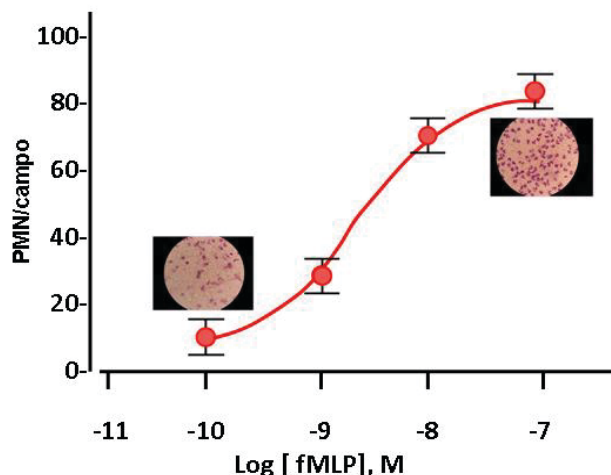


Figura 6. Curva dosis respuesta de la QTX inducida con UDP-G de PMN provenientes de individuos con leucocitosis en presencia (◆) o en ausencia (●) de apirasa. Las microfotografías corresponden a dosis mínimas y máximas de UDPG (sin apirasa). Las dosis resultaron en un rango de 3 logaritmos de concentración superiores a las utilizadas con fMLP.

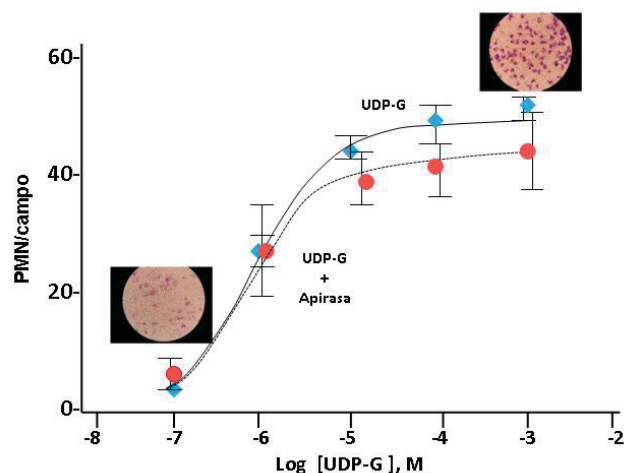
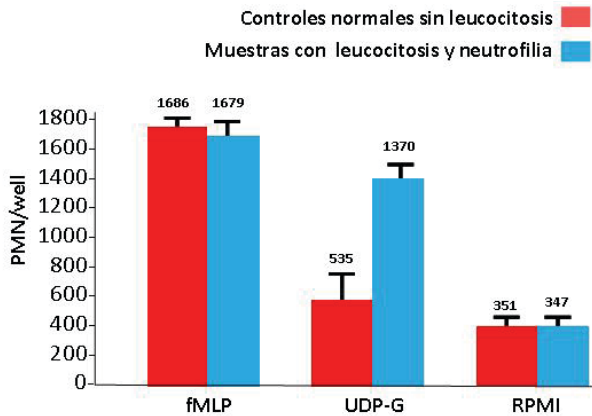


Figura 7. Quimiotaxis: valores promedio de recuento de PMN migrados según cada tratamiento. Análisis estadístico kruskal wallis.



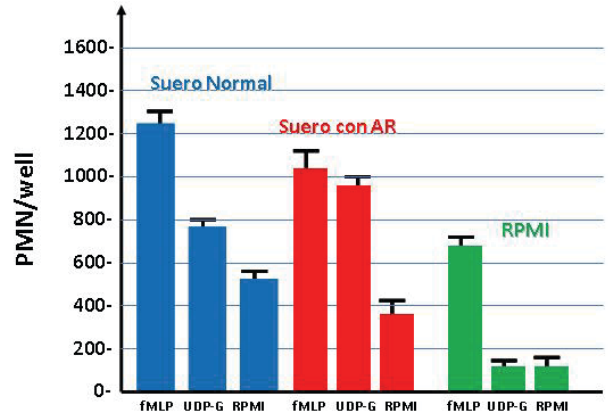
pre-incubados con sueros de pacientes con artritis, mostró que la inducción con fMLP se redujo respecto al grupo anterior. A su vez, la inducción con UDP-G-e en presencia de suero de pacientes con artritis, fue significativamente superior a la del grupo anterior, igualando los valores obtenidos con fMLP en las mismas condiciones. Si bien la QTX inducida por UDP-G-e fue ligeramente positiva frente al suero normal, dicha actividad no se diferenció de los controles con RPMI. Sin embargo, cuando los PMN normales fueron enfrentados al pool de sueros con AR, la QTX inducida por UDPG-e se incrementó significativamente respecto al mismo control con RPMI ($p < 0,001$). Cabe destacar que en ausencia de suero, sólo fMLP activó la QTX (Figura 8).

Tabla I. Valores de los parámetros de laboratorio de los pacientes con artritis reumatoidea.

Paciente	Hto [%]	Rto. Blancos	%PMN	Eritro	PCR mg/l
1	45	4.900	53	2	<0,10
2	39	8.800	74	31	4,22
3	40	7.700	49	42	0,67
4	41	6.500	53	19	0,18
5	34	6.200	59	53	0,52
6	35	9.300	64	48	0,93
7	36	4.500	68	20	0,15
8	38	6.000	64	23	0,24
9	41	6.900	48	18	<0,10
10	40	7.200	73	42	1,33
11	43	5.200	55	10	0,22
12	43	6.700	60	30	<0,10
13	36	8.200	66	31	0,84
14	44	10.000	66	32	0,23
15	38	5.100	60	30	0,15
16	33	5.400	59	21	0,13
17	38	7.800	66	56	3,72

Hto: Heatocrito; PMN: Polimorfonucleares; PCR: Proteína C Reactiva

Figura 8. QTX de PMN de controles normales, incubados con suero normal, suero con AR y RPMI. Análisis estadístico kruskal wallis.



Adhesividad de PMN normales (PMNn) activada por fMLP y UDP-G-e

La técnica de adhesividad mostró que tanto fMLP como UDP-G-e favorecen la adhesividad de los PMN normales al vidrio respecto al control con RPMI, siendo mayor con UDP-G-e que con fMLP (Figura 9).

Discusión

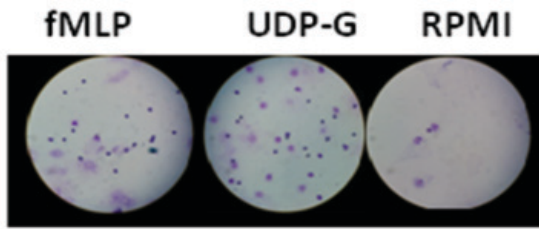
Los resultados obtenidos sugieren que la activación de la quimiotaxis de PMN mediada por la acción de UDP-G extracelular sería un proceso condicionado por una situación

Tabla II. Valores de TNF α (pg/ml), y cantidad total de PMN migrados con cada agonista.

Paciente	TNF (pg/ml)	QTX-fMLP	QTX-UDP-G	QTX-RPMI
1	12.4	1025	788	420
2	11.5	1277	890	289
3	27.9	1302	798	330
4	44.4	980	1070	380
5	5.2	876	760	410
6	220	1034	2056	298
7	13.2	987	863	321
8	12.8	1276	970	368
9	104	1305	1586	452
10	26.1	799	687	466
11	9.6	965	746	389
12	10.3	1206	852	375
13	6.9	1177	796	299
14	3.8	698	669	350
15	5.7	886	784	620
16	4.3	1054	812	278
17	8.2	1138	915	420
Promedio	162	1057	943	380

TNF: Factor de Necrosis Tumoral; QTX: Quimiotaxis; fMLP: formil-Metil-Leucin-Fenilalanina; RPMI: Buffer

Figura 9. Ensayo de adhesividad (vista microscópica 10X).



inflamatoria pre-existente (Figuras 7 y 8).

El dato más significativo fue que la QTX de neutrófilos normales inducida por UDP-G-e, no sólo fue positiva frente a suero normal, sino que se incrementó cuando dichos PMN normales fueron previamente enfrentados con sueros de pacientes con AR, sugiriendo que la presencia de un factor inflamatorio, puede ser una condición “necesaria” para la adecuada acción de la UDP-G-e sobre los receptores P2Y₁₄ presentes en los PMN. A su vez, estos datos confirman los resultados de los primeros experimentos realizados con PMN provenientes de individuos con leucocitosis y neutrofilia.

Efectivamente, la QTX inducida en PMN normales preincubados con sueros de pacientes con AR, fue mayor con fMLP que con UDP-G-e, pero ambos, fueron superiores a los valores basales obtenidos con RPMI.

Sin embargo, llamativamente, en los tres casos que presentaban niveles altos de TNF en suero, la activación de la QTX por UDP-G-e superó a la inducida por fMLP.

Es interesante mostrar que la QTX inducida por fMLP es mayor en PMN preincubados con suero normal respecto a los preincubados con suero con AR, y a la inversa, la QTX inducida por UDP-G-e, parece ser menor frente a suero normal que frente a suero con AR. Cabe destacar, además, que a diferencia de lo que ocurre con fMLP en ausencia de ambos sueros (normal o con AR), y ante la sola presencia de buffer, la UDP-G-e no activó en forma significativa la QTX de los PMN. Estos resultados nos sugieren que un eventual factor, particularmente inflamatorio presente en el suero, podría actuar como un facilitador de dicha inducción. Recientemente se ha descrito que las condiciones inflamatorias incrementan la liberación de ATP por el epitelio bronquial²⁸. Por lo tanto, se especuló con la posibilidad de que este mecanismo podría extenderse a la liberación de UDP-G^{29,30}, y a su vez incrementar la susceptibilidad quimiotáctica de los PMN en dicho tejido^{31,32}.

Similarmente a lo descrito con el ATP, el incremento en la liberación de UDP-G ha sido asociado con la secreción de mucina desde las “Goblet Cells” del pulmón³³. Es de notar que, altas concentraciones de UDP-G capaces de activar el receptor P2Y₁₄, son detectadas en las secreciones bronquiales de pacientes con enfermedad fibroquística, una patología crónica caracterizada por la progresiva metaplasia de las “Goblet Cells”, acumulación de mucus e infiltración de PMN a nivel pulmonar³⁴.

Por su parte, en las pruebas de adhesividad realizadas solamente con PMN normales, se observó que UDP-G-e, administrada a idénticas concentraciones que en los ensayos de QTX, dio resultados positivos y fue más efectiva que el fMLP (Figura 9).

La UDP-G como agonista extracelular, tiene capacidad de generar respuestas fisiológicas en los PMN, tales como la activación de la QTX y la adhesividad, donde la QTX se hace más evidente frente a condiciones inflamatorias previas.

Agradecimientos

Al Dr Eduardo Lazarowski (Cystic Fibrosis/Pulmonary Research & Treatment Center-University of North Carolina-Chapel Hill) por su apoyo científico y bibliográfico. Los presentes resultados fueron financiados con subsidios UBACyT B415- y UBACyT-CB02.

Referencias bibliográficas

1. John V Dacie and SM Lewis. Chapter 2. References ranges and normal values. En: Practical Hematology (Eight Edition). Pp 9-19; Eight Edition. Ed. Churchill Livingstone ISBN 0443-049319, 1995.
2. Nathan C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. Nat. Rev. Immunol. 2006; 6: 173–182.
3. Németh T, Mócsai A. The role of neutrophils in autoimmune diseases. Immunol. Lett. 2012; 143: 9–19.
4. Ley K, Laudanna C., Cybulsky MI, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. Nat. Rev. Immunol. 2007; 7: 678–689.
5. Nourshargh S, Hordijk PL, Sixt M. Breaching multiple barriers: leukocyte motility through venular walls and the interstitium. Nat. Rev. Mol. Cell Biol 2010; 11: 366–378.
6. Borregaard N. Neutrophils, from marrow to microbes. Immunity 2010; 33: 657–670.
7. Borregaard N, Sørensen OE, Theilgaard-Mönch K. Neutrophil granules: a library of innate immunity proteins. Trends Immunol. 2007; 28: 340-345.
8. Witko-Sarsat V, Rieu P, Descamps-Latscha B, Lesavre P, Halbwachs-Mecarelli L. Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. Lab Invest 2000; 80(5):617–653.
9. Reeves EP, Lu H, Jacobs HL. Killing activity of neutrophils is mediated through activation of proteases by K⁺ flux. Nature 2002; 416: 291–297.
10. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. Science 2004. 303:1532–1535.
11. Al-Omari M, Korenbaum E, Ballmaier M, Lehmann U, Jonigk D, Manstein DJ, Welte T, Mahadeva R, Janciauskiene S. The acute phase protein, α 1-antitrypsin, inhibits neutrophil calpain I and induces random migration. Mol Med. 2011;17: 865-874.
12. Pillay J, den Braber I, Vriskoop N, Kwast LM, de Boer RJ,

- Borghans JA, Tesselaar K, Koenderman L. In vivo labeling with ²H₂O reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days *Blood*. 2010; 116(4):625-627.
13. Mócsai A. Diverse novel functions of neutrophils in immunity, inflammation, and beyond. *J. Exp. Med.* 2013;210,7:1283-1299.
 14. Di Virgilio, F., Chiozzi, P., Ferrari, D., Falzoni S, Sanz, JM., Morelli A., Torboli, M., Bolognesi, G., Baricordi OR. Nucleotide receptors: an emerging family of regulatory molecules in blood cells. *Blood*. 2001; 97(3):587–600.
 15. Sak K, Boeynaems JM, Everaus H. Involvement of P2Y receptors in the differentiation of haematopoietic cells. *J Leukoc Biol.* 2003; 73(4):442–447.
 16. Linden J. Cell biology. Purinergic chemotaxis. *Science*. 2006;314[5806]:1689–1690.
 17. Rossi L, Manfredini R, Bertolini F, Ferrari D, Fogli M, Zini R, Salati S, Salvestrini V, Gulinelli S, Adinolfi E, Ferrari S, Di Virgilio F, Baccarani M, Lemoli RM. The extracellular nucleotide UTP is a potent inducer of hematopoietic stem cell migration. *Blood*. 2007; 109(2):533–542.
 18. Wang S, Voisin MB, Larbi KY, Dangerfield J, Scheiermann C, Tran M, Maxwell PH, Sorokin L, Nourshargh S. Venular basement membranes contain specific matrix protein low expression regions that act as exit points for emigrating neutrophils. *J.Exp.Med* 2006; 203:1519–1532.
 19. Chen Y, Corriden R, Inoue Y, Yip L, Hashiguchi N, Zinkernagel A, Nizet V, Insel PA, Junger WG. ATP release guides neutrophil chemotaxis via P₂Y₂ and A₃ receptors. *Science* 2006; 314:1792-1795.
 20. Chambers JK1, Macdonald LE, Sarau HM, Ames RS, Freeman K, Foley JJ, Zhu Y, McLaughlin MM, Murdock P, McMillan L, Trill J, Swift A, Aiyar N, Taylor P, Vawter L, Naheed S, Szekeres P, Hervieu G, Scott C, Watson JM, Murphy AJ, Duzic E, Klein C, Bergsma DJ, Wilson S, Livi GP. A G protein-coupled receptor for UDP-glucose. *J Biol Chem* 2000; 275:10767-10771.
 21. Freeman K, Tsui P, Moore D, Emson PC, Vawter L, Naheed S, Lane P, Bawagan H, Herrity N, Murphy K, Sarau HM, Ames RS, Wilson S, Livi GP, Chambers JK. Cloning, pharmacology, and tissue distribution of G-protein-coupled receptor GPR105 (KIAA0001) rodent orthologs. *Genomics*. 2001; 78(3):124-128.
 22. Carter RL, Fricks IP, Barrett MO, Burianek LE, Zhou Y, Ko H, Das A, Jacobson KA, Lazarowski ER, Harden TK. Quantification of Gi-Mediated Inhibition of Adenylyl Cyclase Activity Reveals That UDP Is a Potent Agonist of the Human P2Y14 Receptor. *Mol Pharmacol* 2009;76:1341–1348.
 23. Fricks I, Carter R, Lazarowski E, Harden K. Gi-Dependent Cell Signaling Responses of the Human P2Y14 Receptor in Model Cell Systems. *JPET* 2009,330: 162–168.
 24. Moore DJ, Murdock PR, Watson JM, Faull RL, Waldvogel HJ, Szekeres PG, Wilson S, Freeman KB, Emson PC. GPR105, a novel Gi/o-coupled UDP-glucose receptor expressed on brain glia and peripheral immune cells, is regulated by immunologic challenge: possible role in neuroimmune function. *Molecular Brain Research* 2003; 118:10-23.
 25. Kook S, Cho J, Lee SB, Lee B-Ch. The nucleotide sugar UDP-glucose mobilizes long-term repopulating primitive hematopoietic cells. *J Clin Invest.* 2013; 123(8):3420–3435.
 26. Lazarowski E, Shea DA, Boucher RC, Harden TK. Release of cellular UDP-glucose as a potential extracellular signaling molecule. *Mol Pharmacol* 2003; 63,1190–1197.
 27. Clark RA and Nauseef WM. Isolation and functional analysis of neutrophils. In *Current Protocols in Immunology*. Coligan JE. Krusibeek AM. Margulies DH. Shevach EM and Strober W. Editors: John Wiley & Sons, New York. 7. 23.1-7.23.3. 1991.
 28. Okada SF, Ribeiro CM, Sesma JI, Seminario-Vidal L, Abdullah LH, van Heusden C, Lazarowski ER, Boucher RC. Inflammation promotes airway epithelial ATP release via calcium-dependent vesicular pathways. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2013; 49(5):814-820.
 29. Kreda SM, Okada SF, van Heusden CA, O'Neal W, Gabriel S, Abdullah L, Davis CW, Boucher RC, Lazarowski ER. Coordinated release of nucleotides and mucin from human airway epithelial Calu-3 cells. *J Physiol* 2007;584:245–259.
 30. Lazarowski ER, Shea DA, Boucher RC, Harden TK. Release of cellular UDP-glucose as a potential extracellular signaling molecule. *Mol Pharmacol* 2003;63:1190–1197.
 31. Sesma JI, Kreda SM, Steinckwich-Besancon N, Dang H, García-Mata R, Harden TK, Lazarowski ER. The UDP-sugar-sensing P2Y14 receptor promotes Rho-mediated signaling and chemotaxis in human neutrophils. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2012; 303 (5):C490-498.
 32. Barrett MO, Sesma JI, Ball CB, Jayasekara PS, Jacobson KA, Lazarowski ER, Harden TK. A selective high-affinity antagonist of the P2Y14 receptor inhibits UDP-glucose-stimulated chemotaxis of human neutrophils. *Mol Pharmacol* 2013;84(1):41-49.
 33. Okada SF, Zhang L, Kreda SM, Abdullah LH, Davis CW, Pickles RJ, Lazarowski ER, Boucher RC. Coupled nucleotide and mucin hypersecretion from goblet cell metaplastic human airway epithelium. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2011;45:253–260.
 34. Sesma JI, Esther CR Jr, Kreda SM, Jones L, O'Neal W, Nishihara S, Nicholas RA, Lazarowski ER. ER/golgi nucleotide sugar transporters contribute to the cellular release of UDP sugar signaling molecules. *J Biol Chem* 2009;284:12572–12583.