

Tesi doctoral presentada per En/Na

Esther BERTRAN RODRÍGUEZ

amb el títol

**"El Factor 4 Plaquetar indueix
activitat proinflamadora en les cèl.lules
Natural Killer Humanes"**

per a l'obtenció del títol de Doctor/a en

BIOLOGIA

Barcelona, 21 de juny de 2004.

Facultat de Biologia
Departament de Bioquímica i Biologia Molecular



UNIVERSITAT DE BARCELONA



AGRAÏMENTS

Voldria agrair especialment

Al Dr. Fèlix Rueda, per ser aquella persona que em va donar una primera oportunitat permeten la meva incorporació en el seu grup. També pel suport com a director d'aquesta tesi, sobre tot en la segona part de la seva realització.

Al Dr. Francesc Martí perquè em va ensenyar el “bon fer” en un laboratori i el saber gaudir de la feina. Com a primer director d'aquesta tesi, li haig d'agrair que m'animés en fer-la quan jo no n'estava convençuda. També per les estones compartides i els cops de ma malgrat la distància.

Al Dr. Joan Garcia pel recolzament en aquest projecte malgrat no estava dins de les línies d'interès del seu departament.

Al Dr. Octavi Vinyes com a tutor d'aquesta tesi, pel seu interès i els ànims que m'ha donat quan els he necessitat.

A les meves amigues, l'Esther Villen, per haver-me aguantat durant tants anys, la seva solidaritat, les llargues estones en el LIO sobre tot a partir de segons quines hores, l'ajut en la informàtica, en l'estadística, les purificacions, els ELISAS, les citotoxicitats,, Esther, sense tu segur que no ho hauria pogut fer. A la Montse Llucià per tota la feina sobre tot en les PCRs i les bones estones que vam passar fent-la. A la Magda Uribes pel seu ajut incondicional amb el millor dels humors.

Al Dr. Joan Bertran i la Dra. Ana Limón per l'assistència en la biologia molecular, i les seves crítiques en el treball, sempre benvingudes.

Al Dr. Estanis Navarro, per fer-me de mestre de la biologia molecular, per les correccions dels articles, per haver-me “presentat” l'Endnote, i sobre tot pels ànims i consells en el dia a dia del laboratori.

A la Mati Peiró per la paciència en ensenyar-me a treballar en un laboratori, i a la Marta Hernandez per tots els cops de mà, sobre tot logístics, tant necessaris. A totes dues els haig d'agrair l'ajut tant personal com professional. A la Begoña Amill, al Dr. Jordi Petriz i al Dr. Jose Antonio Cancelas per la col·laboració en la citometria de flux. Al Carlos Torrico, Jose Antonio Sanchez i Clara Dalmases per l'auxili en la criobiologia. A la Carme Azqueta pels consells en el cultius cel·lulars. A La Montse Picón pels consells i intercanvi de material per la purificació cel·lular. A la Dra. Eva González, Dr. Sergi Querol i al Dr. Gregorio Martin-Henaó pel consells en hematologia.

A La Dra Julia Inglés per compartir amb mi tots els meus problemes amb els westerns. A La Dra Anna Bigas pels consells sobre el treball i l'ajut en les revisions dels manuscrits.

A La inestimable guia del Dr. Agustín Valenzuela i al Departament de Bioquímica de la Facultat de Químiques, Universitat de Barcelona per, ensenyar-me i permetre'm realitzar les mesures de Ca^{2+} intracitoplasmàtic.

Al Banc de Sang de la Ciutat Sanitària de Bellvitge, sobre tot a les seves auxiliars que gràcies a la seva paciència i professionalitat van proveir el laboratori durant anys de la principal matèria primera, les cèl·lules, i sempre de bon grat.

Al Rafel Cardoner, per l'escanejat de les imatges, per proporcionar-me totes i cada una de les necessitats informàtiques, per la paciència i per allò que sempre ens falta, el temps.

A la Magda Cardoner per l'enorme paciència en les correccions del manuscrit.

Als meus pares, perquè si la he acabat és per ells.

A tots, moltes gràcies.

CONTINGUTS

INTRODUCCIÓ:

1. El sistema Immunològic	1
1.1. Ontogènia	
1.2. La resposta immune específica / inespecífica	
2. La Inflamació	4
2.1. Mecanisme i tipus cel·lulars implicats	
2.2. Altres tipus cel·lulars implicats en el procés inflamatori	
• Les plaquetes	
• Les cèl·lules endotelials	
• Les cèl·lules Natural Killer	
2.3. Factors solubles implicats en la inflamació	
• Immunoglobulines	
• Proteïnes del complement	
• Eicosanoids	
• Factor activador de plaquetes (PAF)	
• Histamina	
• Citocines	
3. El sistema Hemostàtic	11
4. La reparació de teixits	13
5. Els processos tumorogènics	14
6. Les quimiocines	15
6.1. Característiques Bioquímiques i Classificació.	
6.1.1. Bioquímica de les quimiocines CXC.	
6.1.2. Bioquímica de les quimiocines CC.	
6.2. Els gens de les quimiocines.	
6.3. Tipus cel·lulars que produeixen quimiocines.	
6.4. Funcions de les quimiocines.	
6.5. Els receptors i la transducció del senyal.	
6.5.1. Receptors de les quimiocines CXC.	
6.5.2. Receptors de les quimiocines CC.	
6.5.3. Transducció de la senyal.	
6.6. Paper de les quimiocines en la inflamació.	
7. Les cèl·lules amb activitat Natural Killer	32
7.1. Morfologia.	
7.1.1. Marcadors de superfície.	

- 7.2. Ontogènia.
- 7.3. Proliferació / diferenciació.
- 7.4. Activitat citotòxica.
 - 7.4.1. El mecanisme citotòxic.
 - Citotoxicitat per exocitosi de grànuls.
 - Citotoxicitat no secretora.
 - 7.4.2. Factors solubles reguladors de l'activitat citotòxica.
- 7.5. Reguladors de l'hemopoesi.
- 7.6. Eliminació de cèl·lules neoplàssiques.
- 7.7. Cèl·lules presentadores d'antigen.
- 7.8. Efectes en el trasplantament al·logènic del moll de l'os.
 - GVL (efecte de l'empelt contra la leucèmia)
 - GVHD (malaltia de l'empelt contra l'hoste)
- 7.9. Moduladors de la resposta immune que interaccionen ó lliuren les NK.

8. Transducció del senyal 51

- 8.1 Transducció del senyal associat al reconeixement de la cèl·lula diana.
 - 8.1.1. Mecanismes responsables de l'activitat citotòxica natural.
 - Receptors implicats
 - Vies de transducció del senyal
 - Principals enzims i missatgers secundaris
 - a) La fosfolipasa C (PLC) i la protein quinasa C (PKC)
 - b) Protein tirosin quinases (PTK)
 - c) Les proteïnes G
 - d) Ca^{2+}
 - 8.1.2. Mecanismes desencadenats en l'ADCC
 - Receptor implicat, FcγRIIIA
 - Transducció de la senyal, principals enzims implicats.
- 8.2. Transducció del senyal mediada per l'IL-2.
 - Receptor implicat
 - Transducció del senyal i principals enzims implicats.

OBJECTIUS 65

MATERIAL I MÈTODES 69

1. Obtenció de la població de Limfòcits Granulars Grans (LGL) 69

- 1.1. Obtenció de cèl·lules mononucleades (CMN).
- 1.2. Purificació de la subpoblació de LGL.
- 1.3. Determinació fenotípica de la població obtinguda.

2. Condicions de cultiu de les cèl·lules NK	76
2.1. Condicions generals de cultiu.	
2.2. Activació de les LGL.	
2.2.1. Activació a través del receptor Fc γ RIIIA	
2.2.2. Determinació de l'especificitat funcional del F4P.	
2.3. Unió del F4P a l'heparina.	
3. Mesura de l'Activitat citotòxica	80
3.1. Condicions de cultiu de les cèl·lules diana.	
3.2. Marcatge amb ^{51}Cr de les cèl·lules diana K562 i Raji.	
3.3. Marcatge amb ^{51}Cr de les cèl·lules diana p815.	
3.4. Sembrat de les cèl·lules efectores.	
3.5. Assaig d'alliberament de ^{51}Cr per les activitats NK i LAK.	
3.6. Assaig d'alliberament de ^{51}Cr per l'activitat ADCC.	
3.7. Càlcul de l'activitat citotòxica.	
3.8. Immunització d'un conill per l'obtenció d'Ac policlonal anti-p815.	
4. Mesura de l'activitat proliferativa	87
5. Determinació de la producció de citocines	88
6. Valoració semiquantitativa del mRNA per RT-PCR	90
6.1. Extracció de RNA.	
6.2. Transcripció reversa.	
6.3. Reacció en cadena de la polimerasa.	
7. Determinació de la mobilització de calci intracitoplasmàtic	96
8. Immunoprecipitació i Western blot	99
8.1. Preparació i activació de les cèl·lules.	
8.2. Llisat de les cèl·lules.	
8.3. Immunoprecipitació.	
8.3.1. Unir l'Ac a la proteïna A-sepharosa.	
8.3.2. Obtenció de la proteïna desitjada.	
8.4. Western blot	
8.4.1. Separació de proteïnes per electroforesis.	
8.4.2. Transferència de les proteïnes del gel a la membrana.	
8.4.3. Immunodetecció.	
8.5. Rentat (ó "stripping") i reutilització de les membranes.	
9. Inducció del quimiotactisme en Neutròfils	107
9.1. Purificació de Neutròfils.	
9.2. Extracció de les citocines del sobrenadant.	
9.3. Quimiotactisme.	

RESULTATS	113
1. Obtenció de la subpoblació de cèl·lules NK	113
1.1. Caracterització de les CMNs.	
1.2. Caracterització de les poblacions limfocitàries.	
2. El F4P indueix a les cèl·lules NK a lliurar citocines	118
2.1. Valoració de la producció d'IL-8.	
2.2. El F4P estimula el lliurament d'IL-1 β , IL-6, INF γ , GM-CSF i TNF α .	
2.3. El F4P sinergitza amb el CD16 en l'activació de les cèl·lules NK.	
2.4. Cinètica del lliurament de l'IL-8. Efecte de la CHX i l'Act C.	
2.5. Efecte del conjugat F4P – Heparina-Sepharosa.	
3. El F4P incrementa el mRNA de citocines en les NK	125
3.1. Increment en els nivells de mRNA d'IL-8. Un efecte transcripcional.	
3.2. Augment del mRNA d'IL-1 β , IL-6, INF γ , GM-CSF i TNF α .	
4. Efecte del F4P sobre l'activitat citotòxica	129
4.1. Variabilitat de l'activitat citotòxica basal	
4.2. El F4P no té efecte sobre les activitats NK i LAK, però sí sobre l'ADCC.	
4.3. Comparació dels efectes del F4P i l'IL-2 sobre l'activitat citotòxica.	
5. El F4P no té efecte sobre la proliferació de les NK	132
6. Capacitat funcional de l'IL-8 produïda per les NK	134
6.1. Obtenció de Neutròfils.	
6.2. Quimiotactisme.	
7. El F4P provoca canvis fenotípics en les cèl·lules NK	38
7.1. El F4P indueix l'expressió de CD69	
7.2. El F4P no indueix l'expressió de CD25	
8. Transducció del senyal induïda pel F4P en les NK	141
8.1. El F4P no indueix un increment de Ca ²⁺ intracitoplasmàtic.	
8.2. Implicació de les proteïnes G.	
8.2.1. Efecte de la toxina pertússica.	
8.2.2. Efecte de la toxina colèrica.	
8.3. Implicació de la protein quinasa C.	
8.3.1. Efecte del PMA, un estimulador de PKC.	
8.3.2. Efecte dels inhibidors de PKC.	
8.4. Implicació dels enzims PTK.	
8.5. Fosforilació en residus tirosina de l'enzim PI3-K.	
9. Vies de transducció del senyal en les cèl·lules NK	151

9.1. Proteïnes G.	
9.2. Implicació dels isoenzims PKC.	
9.3. Implicació de l'enzim PI3-K.	
DISCUSSIÓ	155
1. Antecedents	155
1.1. Resultats previs.	
2. Obtenció de les cèl·lules NK purificades	157
3. El F4P estimula les cèl·lules NK a lliurar citocines	157
3.1. La dosi de F4P utilitzada és una dosi fisiològica.	
3.2. Efecte del F4P unit a heparan sulfat. El receptor del F4P.	
3.3. Implicacions fisiològiques del lliurament d'aquestes citocines.	
3.4. El F4P sinergitza amb l'estímul induït a través del FcγRIIIA.	
3.5. Possible mecanisme regulador del F4P.	
3.6. El F4P incrementa el mRNA d'aquestes citocines.	
3.7. El F4P estimula a les cèl·lules NK a lliurar IL-8 biològicament activa.	
4. Efecte del F4P sobre l'activitat citotòxica	167
4.1. El F4P i l'IL-2 tenen efectes complementaris	
5. El F4P no té efecte sobre la proliferació	169
6. El F4P i la IL-2 semblen tenir efectes complementaris.	169
7. El F4P indueix canvis fenotípics	169
8. Aproximació al mecanisme de transducció del senyal induït pel F4P	170
8.1. El F4P no indueix un augment transitori de Ca ²⁺ intracitoplasmàtic	
8.2. Implicació de les proteïnes G	
8.3. L'efecte del F4P implica l'activació d'enzims PTK	
8.4. Les activitats NK i LAK estan associades a l'activació d'enzims PKC	
8.5. L'activitat citotòxica depenent d'anticòs	
9. Paper fisiològic de les cèl·lules NK	177
10. Propietats del F4P	178
CONCLUSIONS	181
BIBLIOGRAFIA	183

TAULES I FIGURES

INTRODUCCIÓ:

TAULA 1 Classificació de les quimiocines	18
TAULA 2 Marcadors que expressen les cèl·lules NK	36
TAULA 3 Citocines alliberades per les cèl·lules NK	51
TAULA 4 Les proteïnes G	56
Figura 1 Aproximació als possibles mecanismes d'acció de les proteïnes G	57
Figura 2 Mecanismes de transducció del senyal desencadenats a través del Fc γ RIIIA... ..	60
Figura 3 Mecanismes de transducció del senyal desencadenats a través de l'IL-2	63

RESULTATS:

Histogrames de les subpoblacions cel·lular:

Abans i després de la purificació de les LGL	114
Abans i després de la purificació dels Neutròfils	134
Figura 1 Quantitat antigènica d'IL-8 mesurada per ELISA	118
Figura 2 Corba dosi-resposta de l'efecte del F4P i la β TG en la producció d'IL-8	119
Figura 3 Citocines lliurades per les cèl·lules NK per efecte del F4P	120
Figura 4 Dosi-resposta de l'efecte sinèrgic del F4P i el CD16 en el lliurament d'IL-8 ..	121
Figura 5 Dosi-resposta de l'efecte sinèrgic del F4P i l'IL-2 en el lliurament d'IL-8	122
Figura 6 Cinètica del lliurament d'IL-8, per efecte del F4P, l'ActD i la Chx	123
Figura 7 Efecte del F4P unit a Heparina-Sepharosa en el lliurament d'IL-8	124
Figura 8 Variació de la quantitat de mRNA d'IL-8 per efecte del F4P	126
Figura 9 Variació de la quantitat de mRNA d'IL-1 β per efecte del F4P	127
Figura 10 Variació de la quantitat de mRNA d'IL-6 per efecte del F4P	127
Figura 11 Variació de la quantitat de mRNA de GM-CSF per efecte del F4P	128
Figura 12 Variació de la quantitat de mRNA d'INF γ per efecte del F4P	128
Figura 13 Variació de la quantitat de mRNA de TNF α per efecte del F4P	129

Figura 14	Mesura de l'activitat citotòxica basal NK i LAK	130
Figura 15	Efecte del F4P sobre les activitats NK, LAK i ADCC	131
Figura 16	Efecte del F4P i l'IL-2 sobre les activitats NK, LAK i ADCC	132
Figura 17	Efecte del F4P sobre la proliferació de les cèl·lules NK	133
Figura 18	Efecte del F4P sobre la proliferació de les NK estimulades amb IL-2	133
Figura 19	Efecte de l'IL-8r sobre la capacitat quimiotàctica dels PMN	136
Figura 20	Quimiotactisme induït a PMN pels sobrenadants de cèl·lules NK F4P	137
Figura 21	Cinètica d'expressió del CD69 en les NK per efecte del F4P	138
Figura 22	Histogrames de l'expressió del CD69 en les NK estimulades amb F4P	139
Figura 23	Histogrames del CD69 i CD25 en les NK estimulades amb F4P	140
Figura 24	Cinètica del D69 i CD25 en cèl·lules NK estimulades amb F4P	141
Figura 25	Efecte del F4P i el FcγRIIIA sobre la mobilització de Ca ²⁺	143
Figura 26	Efecte del F4P, MCP-1 i FcγRIIIA sobre la mobilització de Ca ²⁺	144
Figura 27	Mobilització de Ca ²⁺ en cèl·lules NK pre-estimulades	145
Figura 28	Efecte de la toxina pertússica sobre l'activitat del F4P en NK	146
Figura 29	Efecte de la toxina colèrica sobre l'activitat del F4P en NK	147
Figura 30	Efecte del PMA sobre l'activitat del F4P en NK	148
Figura 31	Efecte del PKCi sobre l'activitat del F4P en NK	149
Figura 32	Efecte de la Staurosporina sobre l'activitat del F4P en NK	149
Figura 33	Efecte de la Genisteïna sobre l'activitat del F4P en NK	150
Figura 34	Efecte del wortmannin sobre l'activitat del F4P en NK	150
Figura 35	Fosforilació en residus tirosina de la PI3-K per efecte del F4P	151
Figura 36	Efecte de les toxines colèrica i pertússica en el lliurament d'IL8	152
Figura 37	Efecte de les toxines colèrica i pertússica en les activitats NK i LAK.....	152
Figura 38	Efecte del PMA i la PKCi en el lliurament d'IL8	153
Figura 39	Efecte de la PKCi en les activitats NK i LAK	153
Figura 40	Efecte del Wortmannin en el lliurament d'IL-8	154
Figura 41	Efecte del Wortmannin en les activitats NK i LAK	154

ABREVIACIONS

AcMn	Anticòs monoclonal
ActD	Actinomicina D
ADCC	Activitat citotòxica mediada per anticòs
Ag	Antigen
AMPc	Adenosin monofosfat cíclic
ARQ	Àcid Araquidònic
BFU-E	Unitat formadora de colònies eritroides immadures
c.p.m.	Contes per minut
CFU-GEMM	Unitat formadora de colònies granulocítiques/macrofàgiques/eritroides/megacariocítiques
CFU-GM	Unitat formadora de colònies granulocítiques/macrofàgiques
CPA	Cèl·lula presentadora d'antígen
CTAP-III	Connective tissue-activating peptide III
Ctx	Toxina colèrica
CHX	Cicloheximida
EGF	Factor de Creixement Epidèrmic
F(ab')	Fracció variable de l'Ac
Fc	Fracció constant de l'Ac
F4P	Factor 4 Plaquetar
Fc γ PIIIA	Receptor de baixa afinitat per la regió Fc de les IgG ₁ i IgG ₂ del tipus IIIA.
FS	“Forward scatter” dispersió de la llum en funció de la grandària
GAG	Glicosaminglicans
Gen	Genisteina
GM-CSF	Factor estimulador de colònies granulo-macrofàgiques
GVHD	Malaltia de l'empelt contra l'hoste
GVL	Efecte de l'empelt contra la leucèmia

H	Heparina
HS	Heparan sulfat
HSPG	Heparan sulfat proteoglican
IL	Interleuquina
INF	Interferó
IP-10	Proteïna induïble d'interferó-10
IP ₃	Inositol trifosfat
LAK	Activitat citotòxica induïda per limfoquines
LB	Limfòcit B
LGL	Limfòcits Granulars Grans
LTc	Limfòcit T citotòxic
LTh	Limfòcit T coadjuvant
MCP	Proteïna quimioatracent de monòcits
MHC	Molècules del sistema major d'histocompatibilitat
MIP	Proteïna Inflamadora de Macròfags
Mo	Monòcit
N ϕ	Neutròfil
NK	Natural Killer
PAF	Factor estimulator de plaquetes
PDGF	Factor de Creixement Derivat de Plaquetes
PG	Prostaglandina
PI3-K	Fosfoinositol 3-quinasa
PKC	Protein quinasa C
PKCi	Inhibidor de protein quinasa C
PLC	Fosfolipasa C
PLQ	Plaquetes
PMA	Phorbol myristate acetate
PMN	Cèl·lules Polimorfonucleades
PtdIns (3,4,5)	Fosfatidil Inositol (3,4,5) trifosfat
PTK	Fosfotirosin quinasa

Ptx	Toxina pertússica
RANTES normals	Factor d'expressió i secreció regulador de cèl·lules T
RT	Transcripció reversa
SAM	Fracció variable d'un Ac anti-ratolí
SF	Suero Fisiològic
SS granulositat	“Side scatter” dispersió de la llum en funció de la
Stau	Staurosporina
TCR	Receptor del Limfòcit T
βTG	β Tromboglobulina
TGF	Factor de creixement transformant
TNF	Factor de Necrosi tumoral
W	Wormannin

1. EL SISTEMA IMMUNOLÒGIC

1.1. Ontogènia

Totes les cèl·lules hematopoètiques deriven d'una població de cèl·lules primordials pluripotencials del moll de l'os a través de dues línies de diferenciació: la línia mieloide i la línia limfoide.

La línia mieloide es diferencia en quatre tipus cel·lulars bàsics:

- Monòcits / Macròfags (Mo).
- Polimorfonuclears (PMN), diferenciats en Neutròfils (N ϕ), Eosinòfils o Basòfils segons la tinció citològica dels seus grànuls, juntament amb els Mastòcits, que tenen moltes similituds estructurals i funcionals amb els Basòfils.
- Eritròcits.
- Megacariòcits que per fragmentació citoplasmàtica donaran lloc a les Plaquetes.

La línia limfoide es diferencien tres classes de limfòcits, amb diferents funcions:

- Limfòcits B (LB)
- Limfòcits T (LT)
- Limfòcits Granulars Grans (LGL)

Els LB, després de les primeres etapes al moll de l'os, s'acumulen als òrgans limfoides secundaris perifèrics, principalment melsa i ganglis limfàtics. En canvi els LT es diferencien inicialment en el moll de l'os i posteriorment en el timus, on hi té lloc la seva capacitat, procés pel qual són seleccionats únicament els LT capaços de reconèixer un antigen (Ag) estrany en combinació amb molècules del Sistema Principal d'Histocompatibilitat (MHC) [1]. Les LGL són considerades les principals cèl·lules efectores de l'anomenada activitat "Natural Killer", també anomenades cèl·lules NK. Actualment se sap que LT i LGL deriven d'un precursor comú, el timòcit. Si la maduració

d'aquesta cèl·lula es produeix en el timus es diferencia cap a LT, si la maduració té lloc en un ambient extratímic donarà lloc a un limfòcit granular gran o LGL [2, 3].

1.2. La resposta immune específica / inespecífica

El sistema immunitari consisteix en una sèrie d'òrgans i tipus cel·lulars capaços d'identificar i eliminar el que és estrany al propi organisme. Funcionalment la resposta immunològica es pot dividir en immunitat innata inespecífica i immunitat adaptativa específica. **La immunitat inespecífica** actua com a primera línia de defensa contra agents infecciosos i controla la majoria de patògens abans que provoquin un procés infecció greu. Està mediada bàsicament per cèl·lules fagocítiques (PMN i Mo).

Si aquesta primera línia de defensa és superada, entra en acció **la resposta immune específica** que, a diferència de la inespecífica, la seva resposta millora quan es repeteix la infecció. Aquest mecanisme es deu a la capacitat de memòria que tenen les seves cèl·lules efectores, LT i LB. Els LB activats es converteixen en cèl·lules plasmàtiques secretores d'anticossos i responsables de la immunitat específica humoral. Els LT es poden diferenciar funcional i fenotípicament en diferents subpoblacions, els LT citotòxics (LT_C) i els anomenats LT coadjuvants o "helpers" (LT_H). Els LT_C són cèl·lules efectores de la resposta citotòxica que tenen com a dianes cèl·lules pròpies portadores d'antígens estranys; cèl·lules tumorals o cèl·lules infectades per virus. Són responsables, per tant, de la immunitat específica cel·lular i es caracteritzen per presentar l'Ag de membrana CD8. Aquestes cèl·lules funcionalment no serien efectives sense la cooperació dels LT_H, cèl·lules que fenotípicament es caracteritzen per l'expressió de l'Ag CD4 [4]. La funció dels LT_H és la d'estimular la resposta específica contra un Ag estrany mitjançant la síntesi de diferents factors de creixement i diferenciació com són les limfoquines [5].

Les cèl·lules NK es van considerar inicialment com a cèl·lules efectores inespecífiques, i per tant, mediadores de la immunitat innata. Evidències posteriors sobre les seves funcions i especificitat fan pensar, en una funció com a cèl·lules pont entre la immunitat inespecífica i l'específica [6, 7].

Els **moduladors de la resposta immune** són els factors solubles, les anomenades citocines. Les citocines són glicoproteïnes que es produeixen tant durant la resposta immune

inespecífica com l'específica i serveixen per mediar i regular tant la resposta immune com la inflamatòria [8]. La seva síntesi i secreció sol ser curta i altament regulada. Poden ser produïts per diferents tipus cel·lulars i poden induir efecte, també, sobre diferents tipus cel·lulars, són, per tant, altament pleiotròpiques. Fins i tot, una mateixa citocina pot induir efectes diferents en el mateix tipus cel·lular segons la presència d'altres estímuls, l'estat de maduració de la cèl·lula, etc.. Poden tenir efectes redundants, es a dir, dues citocines diferents poden induir el mateix efecte, o poden influenciar en l'efecte d'un altre citocina tant antagonitzant la seva funció com produint un efecte additiu o fins i tot sinèrgic. Totes aquestes característiques fan que, actualment, sigui força complexa la classificació d'aquests factors.

Els factors moduladors es classifiquen de la següent manera:

- **Interleucines (ILs):** Citocines que interrelacionen les cèl·lules leucocitàries entre sí.
- **Limfocines:** Històricament descrites com a citocines produïdes per limfòcits.
- **Interferons (IFNs):** Proporcionen protecció no específica contra virus. També són potents immunomoduladors.
- **Factors de Necrosis Tumoral (TNFs):** Importants en la resposta inflamatòria, poden destruir directament cèl·lules tumorals. Actualment se sap que poden ser també quimiotàctics.
- **Factors Estimuladors de colònies (CSFs):** Estimuladors de cèl·lules mare del moll de l'os. Són també potents factors de creixement d'altres tipus cel·lulars, activitat quimiotàctica, etc..
- **Transforming Growth Factors (TGFs):** Inhibidors generals del sistema immune, però també són agents quimiotàctics i poden actuar com a factors de creixement.

- **Quimiocines:** Caracteritzades inicialment com citocines amb activitat quimiotàctica, principalment implicades en el procés inflamatori.

2. LA INFLAMACIÓ

2.1. Mecanisme i tipus cel·lulars implicats

La Inflamació és una resposta protectora, localitzada o sistèmica, que s'inicia pel malmenament de cèl·lules o teixits de l'organisme, que té com a finalitat el destruir o aïllar tant l'agent lesiu com el teixit malmès. Amb la reacció inflamatòria, es dona la síntesi i alliberament de gran nombre de mediadors que solen tenir la vida mitja curta, i que promouen l'inici d'una cascada d'aconteixements a nivell tant local com sistèmic [9, 10].

El procés s'inicia amb el reconeixement de l'agent estrany de forma no específica podent ser mediat directament per la via del complement o per leucòcits amb funció fagocítica. La unió dels components del reconeixement del sistema immune a un Ag provoca, generalment, l'activació i amplificació del sistema iniciant-se la producció de substàncies pro-inflamatòries com són [9]:

- Immunoglobulines [11]
- Proteïnes del complement [12]
- Eicosanoids [9]
- Factor activador de plaquetes (PAF) [13]
- Histamina i serotonina [9]
- Citocines [8]
- Quimiocines [14, 15]

Algunes de les funcions d'aquests mediadors són [9]:

- Alterar el flux sanguini
- Incrementar la permeabilitat vascular
- Augmentar l'adherència dels leucòcits circulants a l'endoteli vascular

- Promoure la migració dels leucòcits als teixits (cadascun d'ells amb una cinètica específica)
- Estimular als leucòcits (fagòcits) per destruir els agents irritants.

Les cèl·lules responsables del procés de reconeixement i destrucció d'un antigen de forma no específica, així com de l'amplificació del sistema són:

- **Granulòcits (PMNs): Neutròfils**
Eosinòfils
Basòfils i Mastòcits
- **Monòcits/Macròfags**

Són cèl·lules amb funció fagocítica o fagòcits professionals (neutròfils, eosinòfils, monòcits/macròfags) que tenen com a funció principal la fagocitosi i per tant la destrucció de microorganismes [16].

Quan l'agent estrany interacciona amb la membrana del fagòcit s'inicia la fase d'ingestió a través de l'activació del citoesquelet. Aquesta activació té com a conseqüència la formació de pseudòpodes al voltant de la partícula fins que l'envolta completament formant el fagosoma. Seguidament els grànuls citoplasmàtics es fusionen amb el fagosoma descarregant el seu contingut microbicida (lisozima, lactoferrina, proteïnes catióniques com clatepsina i enzims proteolítics i hidrolítics).

Els basòfils i els mastòcits presenten forces similituds funcionals. Aquestes no es consideren cèl·lules fagocítiques ja que desenvolupen aquesta funció en casos concrets i amb molta menys capacitat que els anomenats fagòcits professionals, careixen de quantitats suficients d'enzims lisosomals o bactericides. Contenen múltiples grànuls prominents on magatzemen histamina i proteases que es lliuren quan la cèl·lula s'activa [17, 18].

Passades 24 hores si les cèl·lules fagocítiques són incapaces de diluir o ingerir completament l'estímul inflamatori degranulen lliurant part del seu contingut lisosomal, lliurant metabòlits tòxics (que potencialment poden atacar el teixit normal adjacent, cèl·lules

malignes i organismes invasors) i citocines proinflamatòries que promouran la migració de més PMNs així com de limfòcits responsables d'un reconeixement antigènic específic.

La resposta immune específica s'inicia amb el processament i la presentació de l'Ag per part de les cèl·lules presentadores d'Ag (APC) com són les cèl·lules dendrítiques ó ocasionalment els monòcits. El reconeixement de l'Ag processat junt amb el MHC propi, que es presenten en la membrana de l'APC, tindrà com a funció l'activació del LT [19]. S'indueix la proliferació clonal del LT específic capaç de reconèixer aquell Ag presentat [20] i finalment s'indueix la síntesi de citocines com l'IL-2, l'INF γ , i diferents factors quimiotàctics provocant l'amplificació de la senyal [21].

El mateix tipus d'activació i selecció clonal té lloc en els LB. Aquestes cèl·lules productores d'una Ig capaç de reconèixer un determinat Ag s'activen proliferant clonalment, posteriorment aquestes maduren a cèl·lules plasmàtiques, productores d'Ig, o bé maduren a cèl·lules de memòria [9].

Els tipus cel·lular responsables de la immunitat específica són:

- Les APC: **Cèl·lules Dendrítiques**
Monòcits
- Cèl·lules responedores amb especificitat clonal: **Limfòcits T (LT)**
Limfòcits B (LB)

2.2. Altres tipus cel·lulars implicats en el procés inflamatori:

- **Les Plaquetes**

Les plaquetes (PLQ) s'originen per fragmentació citoplasmàtica dels megacariòcits, procés que té lloc principalment en el moll de l'os. La cèl·lula anucleada resultant circula per la sang perifèrica durant un període de temps entre 9 i 11 dies. Morfològicament la PLQ té una grandària variable (2-4 μ m de diàmetre) i una forma discoidal en estat inactiu.

Envoltant la PLQ, per sota de la seva membrana cel·lular, hi ha un sistema de microtúbuls que manté la morfologia plaquetar i que es troben estructural i funcionalment lligats al seu sistema contràctil. A més a més dels microtúbuls, el sistema contràctil es localitza en la membrana superficial i jugaria un paper fonamental en l'acció espasmòdica que té lloc durant l'activació plaquetar, tant en el procés d'alliberament com de retracció del coàgul. Aquest sistema microtubular el formen proteïnes com l'actina, la miosina i la trombostatina. L'actina és la proteïna més abundant de les PLQ (un 25 % del total) i a diferència de la del múscle esquelètic no està associada a miosina [22].

Altres estructures intracel·lulars de les PLQs són el sistema tubular dens, el sistema canalicular obert, les mitocondries i els lisosomes. Aquests últims contenen hidrolases àcides del tipus acetil glucosaminidasa, galactosidasa, arilsulfatasa, catepsines i pro-elastasa.

Per la seva especificitat cal destacar els grànuls densos, i els grànuls- α , distingibles al microscopi pel diferent grau d'opacitat. Els primers contenen bàsicament Adenosin 5'-difosfat (ADP) no metabòlic, Adenosin trifosfat (ATP), serotonina i Ca^{2+} , mentre que els grànuls- α contenen ions K^+ , fibrinogen, fibronectina, factor von Willebrand, albúmina, factor 4 plaquetar (F4P), CTAP-III/NAP-2 (β -tromboglobulina (β -TG)), RANTES i diferents tipus de factors de creixement, com el Factor de Creixement Transformant β (TGF β), el factor de creixement derivat de plaquetes (PDGF) i el factor de creixement epidèrmic (EGF) [23].

Les PLQ exerceixen la seva funció a través, principalment, dels factors emmagatzemats en els seus grànuls, la major part dels quals es sintetitzen en el megacariòcit precursor [24, 25]. Altres factors són produïts per un metabolisme propi activable a través de l'efecte de diferents agonistes. Tots ells són factors que actuen com a intermediaris de processos fisiològics com l'hemostàsia, la inflamació o la reparació del teixit malmès.

L'activació de les plaquetes té lloc tant en processos de lesió vascular aguda com en lesions vasculars cròniques, provocant la secreció dels factors abans esmentats que modulen les funcions vasculars i les cèl·lules amb funcions pro-inflamatòries.

Les funcions pro-inflamatòries de les plaquetes són [9]:

- Expressió de proteïnes d'adhesió
- Activació i regulació del complement
- Unió de microorganismes
- Alteració de la permeabilitat vascular
- Producció de factors quimiotàctics
- Lliurament d'eicosanoids
- Lliurament de factors de creixement
- Acceleració de la coagulació i fibrinolisi
- Modulació de les funcions leucocitàries

- **L'endoteli**

L'endoteli vascular és un teixit dinàmic responsable de controlar el tràfic tant de cèl·lules com de molècules entre la sang i els llocs on es produeix la reacció immune [26]. Entre les seves funcions es troben la secreció de factors quimiotàctics i l'expressió de molècules d'adhesió com ICAM-1, ELAM o V-CAM. Cada subsoca de leucòcits reconeix preferentment (encara que no exclusivament) unes determinades molècules d'adhesió que s'expressaran de forma diferencial en l'endoteli depenent del moment en que es trobi el procés inflamatori. Aquest mecanisme és fonamental per a aconseguir la migració separada i ordenada de cada subtipus de leucòcit [27].

- **Les cèl·lules Natural Killer**

Són cèl·lules amb morfologia de limfòcit granular gran (LGL), amb activitat citotòxica en absència d'estimulació prèvia. Llisen gran varietat de cèl·lules diana on s'inclouen cèl·lules tumorals, cèl·lules infectades per virus, i en alguns casos cèl·lules normals. Per això les cèl·lules amb activitat NK es consideren la primera línia de defensa a infeccions víriques, creixement tumoral, i altres alteracions patològiques de l'homeostasi dels teixits.

L'activació d'aquestes cèl·lules amb diferents estímuls, com l'IL-2 ó a través del receptor Fc γ RIIIA (CD16), pot estimular diferents funcions associades a aquestes cèl·lules com poden ser l'increment de l'activitat citotòxica, la proliferació, l'expressió de diferents receptors en la membrana plasmàtica, l'activitat quimiotàctica, ó la producció de citocines. Així, se sap que les cèl·lules NK són capaces de produir INF γ , GM-CSF, IL-1 β , IL-6 ó IL-8, citocines totes elles implicades en el procés inflamatori [28].

Altres evidències suggereixen la implicació d'aquest tipus cel·lular en la inflamació. Tant les NK activades com quiescents expressen estructures involucrades en processos d'adhesió que interaccionen amb lligams que s'expressen en cèl·lules endotelials [29]. Lliuren citocines proinflamatòries, com l'IL-8, amb capacitat per regular l'expressió d'aquestes molècules d'adhesió en els LT, regulant en últim terme la migració d'aquestes cèl·lules cap el lloc de la lesió. [30].

2.3. Els factors solubles implicats en la inflamació:

- **Les immunoglobulines (Ig)**

Les Ig són proteïnes que es fixen a l'Ag a través de les zones específiques de reconeixement de naturalesa variable. Les regions constants d'aquestes Ig són les responsables, en canvi, d'activar la via del complement ó directament determinats tipus cel·lulars com els fagòcits, mastòcits i NK. Aquests cèl·lules tenen receptors específics per a la fracció cristalitzable de les immunoglobulines (Fc) [9, 11].

- **Les proteïnes del complement**

El sistema del complement el formen una sèrie de 20 proteïnes que es localitzen en el plasma i que es caracteritzen per la capacitat de produir una resposta ràpida i molt amplificada a un determinat estímul. Tenen diferents funcions com facilitar el reconeixement dels microorganismes per part de les cèl·lules del sistema immune; de manera que les cèl·lules fagocítiques tenen receptors per alguna d'aquestes proteïnes (C3b). D'altres proteïnes com C3a i C5a poden actuar directament sobre els fagòcits estimulants el seu metabolisme, són quimiotàctics per neutròfils i també poden actuar sobre les cèl·lules

endotelials dels capil·lars produint vasodilatació o augment de la permeabilitat. Finalment aquestes proteïnes formen l'anomenat complexa d'atac que té com a funció l'obertura de porus en la membrana que conduiran a la llisi cel·lular [12].

- **Els eicosanoids**

Són àcids grassos de 20 carbonis poli-insaturats derivats del metabolisme de l'Àcid Araquidònic. Poden provenir de l'àcid araquidònic a través de la via de la Cicloxigenasa formant Prostanoids o a través de la via de la lipoxigenasa deriven a Leucotriens.

Els prostanoids es divideixen en dos subfamílies: les Prostaglandines (PGE_2 , PGI_2 , $PGF_{2\alpha}$) i el Tromboxà [9]

Els principals productors d'eicosanoids durant la inflamació són: les cèl·lules endotelials (produeixen grans quantitats de PGE_2 i PGI_2), els fagòcits mononuclears (produeixen un gran espectre de PG, tromboxans i leucotriens), els mastòcits (produeixen notables quantitats de PGD_2) i, finalment, els PMNs (els majors productors de leucotriens i pobres productors de prostanoids).

- **El factor estimulador de plaquetes (PAF)**

És un fosfolípid biològicament actiu a concentracions nanomolars que indueix una resposta en cèl·lules diana unint-se a un receptor específic. Fou descrit inicialment com un mediador lliurat per basòfils activats que induïa l'activació de les plaquetes, d'on prové el seu nom. La seva via de síntesi està fortament regulada i interacciona amb el metabolisme de l'àcid araquidònic [31]. A més a més d'activar plaquetes també activa PMNs així com d'altres leucòcits [32], altera la permeabilitat vascular, la pressió sanguínea i la resposta cardíaca. Totes aquestes funcions li confereixen un paper fonamental en el mecanisme inflamatori [9].

- **Histamina**

La histamina és un mediador inflamatori que s'emmagatzema en els grànuls dels basòfils i mastòcits i es lliura com a resposta a un estímul. Produeix vasodilatació, augment de la permeabilitat vascular i és capaç d'augmentar la infiltració dels leucòcits en els llocs de

la inflamació. La interacció de la Histamina amb el receptor H₁ provoca l'estimulació de les funcions proinflamadores del leucòcit, mentre que la interacció amb el receptor H₂ estimula la supressió de la inflamació [33].

- **Les citocines**

Els Leucòcits poden activar-se en resposta a Citocines pro-inflamatòries com l'INF γ [34], IL-1 β [35] i TNF α [36]. Aquests compostos solubles poden ser lliurats pels diferents tipus cel·lulars que intervenen en la inflamació com neutròfils, limfòcits, macròfags, cèl·lules endotelials, etc... Aquests estímuls poden activar aquestes cèl·lules a produir i secretar més mediadors inflamatoris establint-se un cicle de retroalimentació positiva [8].

3. EL SISTEMA HEMOSTÀTIC

Quan es produeix una ferida, immediatament després del trencament dels vasos sanguinis, el sistema hemostàtic entra en acció per prevenir la pèrdua de sang: a més a més de l'espasme vascular miogènic que té lloc immediatament, les PLQ que es troben en el lloc afectat sofreixen importants canvis estructurals i funcionals, passant de ser corpuscles circulants a formar una massa immòbil i impermeable, evitant així la pèrdua de flux sanguini (**hemostàsia**). Aquest mecanisme, quan es duu a terme en altres situacions, pot ser perjudicial ja que pot impedir el subministrament de sang als teixits (**trombosi**).

El procés d'activació plaquetar involucra diferents canvis físics i químics que poden diferenciar-se en etapes successives [37]:

1. *Adhesió plaquetar* : Les PLQ es contrauen canviant la seva morfologia i passen a ser esferes irregulars amb llargues evaginacions. Adquireixen la capacitat d'adherir-se entre elles, a la paret vascular alterada especialment a la membrana basal i a les fibres de col·lagen.

2. *Agregació plaquetar primària* : Les PLQ es van adherint entre sí, formant agregats encara reversibles. Al mateix moment que té lloc el canvi en l'estructura, la membrana de les plaquetes adquireix noves propietats fisicoquímiques que afavoriran la coagulació.

3. *Reacció d'alliberament* : Els productes localitzats en els grànuls plaquetars són alliberats en el microambient.

4. *Agregació plaquetar secundària* : En el pas anterior s'alliberen quantitats importants d'ADP, el que provoca una massiva i irreversible agregació plaquetar, que es va estabilitzant per ponts de fibrinogen.

5. *Retracció* : Les PLQ del coàgul es retrauen convertint-se aquest en impermeable.

6. *Formació de fibrina* : S'activa la cascada de la coagulació i es comença a formar fibrina que s'adhereix a la superfície de les plaquetes i entre sí formant una malla.

Hi ha diferents estímuls, fisiològics o patològics, que poden desencadenar aquest procés. Entre els fisiològics hi ha el col·lagen, enzims proteolítics (trombina o tripsina) i compostos de baix pes molecular com l'ADP, serotonina, epinefrina o vasopresina (afecten al to vascular, potencien l'agregació i promouen les interaccions entre leucòcits i la paret vascular). Cadascun d'aquests agents té receptors específics en la superfície de la membrana plaquetar. Altres estímuls poden actuar en condicions patològiques: complexos Ag-Ac, agregats d'Ig, o el PAF. En tots els casos el fibrinogen i el Ca^{2+} ó el Mg^{2+} són necessaris.

Si l'estímul és prou potent (trombina o PAF) o continuat, les PLQ finalitzen la seqüència d'activació, però si l'estímul no és suficient les PLQ es paren en una fase encara reversible, sense arribar a la reacció d'alliberament. Els inductors dèbils (ADP, epinefrina o baixa concentració de trombina) només són capaços d'induir l'alliberament del contingut dels grànuls densos.

La secreció dels grànuls- α i dels lisosomes necessita un estímul més potent, com un augment en la concentració de trombina que provoqui una ocupació continuada del seu receptor. La trombina indueix la fusió de grànuls- α uns amb els altres i amb el sistema canalicular, el qual està en contacte amb la superfície plaquetar . La secreció comença 1 ó 2 segons després d'iniciar-se l'estímul i es completa en pocs minuts.

Simultàniament la fosfolipasa- A_2 de la membrana plaquetar s'activa i mobilitzant àcids grassos dels fosfolípids de la membrana, s'allibera àcid araquidònic (ARQ) que inicia una via metabòlica essencial en el metabolisme plaquetar [10].

L'ARQ és substracte de dos enzims diferents: la Ciclooxygenasa i la 12-Lipooxygenasa. La via de la ciclooxygenasa té com a productes últims les Prostaglandines i els Tromboxans. Aquests metabòlits tenen diferents efectes segons el tipus cel·lular sobre el qual actuen o fins i tot segons la dosi a la que es troben. Poden actuar com a inhibidors i com a estimuladors de l'agregació plaquetar, així com a vasoconstrictors principalment el tromboxà. També s'els hi ha descrit característiques immunomoduladores, principalment a les prostaglandines. Altres factors implicats en el sistema hemostàtic també se'ls ha descrit característiques immunomoduladores com és el PAF [38, 39] ó la trombina [40].

4. LA REPARACIÓ DELS TEIXITS

La reparació del teixit malmès té lloc en una seqüència definida d'aconteixements. Després de la fase inicial, en que es forma el trombus plaquetar i els leucòcits són atrets al focus afectat, es desenvolupa el procés inflamatori. Posteriorment té lloc la formació del teixit de la granulosa, s'incrementa la producció de col·lagen i la matriu extracel·lular per cèl·lules mesenquimàtiques, s'estimula la migració i proliferació dels fibroblastes i de cèl·lules vasculars (endotelials, pericitals, i musculars llises) [41] activant-se, doncs, l'angiogènesis [42].

En tots aquests processos tenen un paper fonamental diferents factors de creixement provinents de la degranulació plaquetar com el PDGF ó el TGF β , així com d'altres tipus cel·lulars presents tant en el procés de la inflamació com en la reparació dels teixits [43-45] .

El procés de reparació del teixit malmès requereix, per tant, la inducció localitzada i controlada d'un increment en la taxa proliferativa de determinades cèl·lules. L'acumul simultani de cèl·lules del sistema immunològic en la zona afectada, com les cèl·lules amb activitat NK [6], fa imprescindible l'existència de mecanismes de control que evitin la llisi cel·lular d'aquest teixit en reparació. Així s'ha descrit capacitat immunomoduladora de pràcticament tots aquests factors.

El TGF β s'ha considerat com un dels inhibidors generals del sistema immune, té diferents efectes sobre les cèl·lules NK [46, 47], LT [48] i d'altres leucòcits [49]. Al PDGF se li ha descrit capacitat moduladora de les cèl·lules NK [50].

Aquestes funcions posen de manifest la modulació de la resposta del sistema immunològic per part del sistema hemostàtic. El grau de interacció entre aquests dos sistemes és molt evident en processos fisiològics com la inflamació o la reparació de ferides, així com en patologies relacionades amb la desregulació d'aquests processos, com el shock sèptic, la isquèmia, l'asma, les inflamacions cròniques o els processos tumorigènics, entre d'altres.

5. PROCESSOS TUMORIGÈNICS

Amb freqüència es compara el desenvolupament tumoral amb un procés de reparació de teixit que escapa als mecanismes naturals de control, el que podria fer pensar que ambdós compartissin mecanismes moleculars i cel·lulars.

Un exemple seria el TGF β , que com ja s'ha explicat, actua com a intermediari en els processos d'inflamació i reparació de teixits. Aquest factor es va descriure per primera vegada com a efector capaç d'induir un fenotip transformant en cèl·lules no neoplàssiques [51]. S'ha anat descrivint, a més a més, diferents tipus cel·lulars neoplàssics que secreten TGF β [52].

Hi ha evidències que recolzen aquesta interacció entre l'hemostàsia i el desenvolupament tumoral:

- Propensió dels pacients d'algun tipus de càncer a desenvolupar malaltia tromboembòlica i/o coagulació intravascular disseminada. Cèl·lules tumorals envoltades de trombos de fibrina i agregats plaquetars, induïts per les mateixes cèl·lules tumorals a través de diferents factors, com la trombina [53] i l'ADP [54].

- A nivell citològic, diferents funcions de les PLQ podrien afavorir el desenvolupament tumoral. Les PLQ podrien facilitar l'adhesió de la cèl·lula tumoral a la paret del vas sanguini [55], alliberant factors que afavoririen la vasoconstricció i la immobilització del tumor [56] i serien font de factors de creixement per a la cèl·lula tumoral [9].

6. LES QUIMIOCINES

Quimiocines és el nom genèric que reben les citocines amb activitat quimiotàctica. Són petits pèptids de baix pes molecular que regulen el tràfic i l'activació de diferents tipus cel·lulars del sistema immune [57]. Algunes d'elles són també capaces de regular el potencial proliferatiu de les cèl·lules progenitores hematopoètiques [58, 59], de les cèl·lules endotelials [60] i de certs tipus de cèl·lules transformades [61]. Per tant, les quimiocines podrien jugar un paper important en la defensa de l'hoste contra infeccions i patologies com el desenvolupament tumoral o la Inflamació crònica.

La primera quimiocina que es va caracteritzar va ser durant la realització d'estudis de trombolisi, es va observar certa **neutralització de les funcions de l'heparina** quan s'indueix l'agregació plaquetar. A partir del contingut granular de les plaquetes es va aïllar una nova proteïna responsable d'aquest fenomen i que va rebre el nom de Factor 4 Plaquetar (F4P) [62]. Aquest factor està localitzat en els grànuls α i es lliura amb l'estímul d'agonistes com la trombina, l'ADP, o el col·lagen, que provoquen l'agregació plaquetar. En lliurar-se, el F4P s'uneix a l'heparina amb una forta afinitat, prevenint la formació del complexa ternari heparina-antitrombina III-trombina, exercint així la seva activitat procoagulant, afavorint la formació de trombos locals [63].

El F4P pot unir-se a diferents Glicosamino Glicans (GAGs) amb afinitats variables: heparina (H) > heparan sulfat (HS) > desmatan sulfat (DS) > condroitin sulfat (CS). Aquests polisacàrids s'uneixen a proteïnes, els proteoglicans, amb capacitat per anclar-se a la membrana cel·lular. Són proteïnes d'un pes molecular aproximat de 59.000 daltons que actuen com a proteïnes "carrier" del F4P. La major part de proteoglicans que s'associen a les

cèl·lules endotelials són HS proteoglicans [64]. La ràpida unió del F4P a aquests receptors podria explicar la desaparició d'aquesta proteïna de la circulació sanguínia immediatament després del seu lliurament [65, 66].

Posteriorment es va demostrar que el F4P era capaç de suprimir el creixement tumoral “in vivo” sense un efecte directe sobre les cèl·lules transformades “in vitro”. Aquest fenomen va fer pensar que aquest agent podria actuar modulant la resposta d'implant del tumor en l'hoste.

Se sap que la progressió del creixement tumoral depèn d'un establiment vascular que subministra les necessitats metabòliques derivades de la hiperproliferació de les cèl·lules transformades. Es va demostrar que el F4P era un **potent inhibidor de l'angiogènesi** i que, específicament, inhibeix la proliferació de l'endoteli vascular, procés essencial per a la neovascularització del tumor [67]. Encara ara, però, es coneix molt poc sobre el mecanisme d'acció del F4P sobre les cèl·lules de l'endoteli. Estudis sobre cultius confluents sincronitzats en fase G₀ / G₁ demostren que el F4P impedeix l'entrada de les cèl·lules endotelials en fase S. També redueix la síntesi del DNA de les cèl·lules que ja han entrat en fase S, acumulant així més del 70% de les cèl·lules en fase de síntesi [60].

Paral·lelament es van anar identificant d'altres proteïnes, que si bé tenien una seqüència altament homòloga amb el F4P, no s'identificaren des d'un principi com a membres de la mateixa família, com és el cas de l'interleuquina-8 (IL-8).

Les funcions biològiques descrites fins llavors pel F4P es van identificar com a propietats mútuament exclouents, suggerint que probablement estaven modulades pel mateix domini proteic. Per a poder determinar-ho es realitzaren diferents estudis amb anàlegs de Factor 4 Plaquetar recombinant (F4Pr), amb els que es va demostrar que l'extrem carboxi-terminal conté determinants estructurals solapats, però independents per a la unió a l'heparina i per a l'activitat angiostàtica [67]. Actualment, l'activitat angiostàtica també ha estat demostrada en altres quimiocines com la proteïna induïble d'INF-10 (IP-10) que presenta un 31% d'homologia amb el F4P. L'IP-10 també és capaç d'unir-se a l'heparina i se li ha identificat un receptor específic de naturalesa heparan sulfat proteoglican (HSPG) [68].

Diferents factors de creixement com el factor de creixement de fibroblastes (FGF), el TGF β o el EGF necessiten dels HSPG com a part del seu complexa receptor, per tant, tant l'IP-10 com el F4P podrien provocar un fenomen de competència pel HSPG que impediria als factors de creixement interaccionar amb el seu receptor i induir la proliferació a l'endoteli [68, 69]. Aquest fenomen de competència pel receptor, junt amb la capacitat de modular el cicle cel·lular abans esmentat, podrien ser els mecanismes biològics responsables d'aquesta activitat angiostàtica.

Per altre banda, les quimiocines tenen també la **capacitat de modular el creixement de precursors hematopoètics**. La proteïna inflamadora de macròfags -1 α , -2 α “ (MIP-1 α , MIP-2 α), el F4P [70], l'IL-8 [71], i d'altres com l'IP-10. Aquest últim és capaç d'inhibir el creixement de subsoques immadures de progenitors sanguinis: les unitats formadores de colònies granulocítiques / macrofàgiques (CFU-GM) i els progenitors multipotencials com són les unitats formadores de colònies granulocítiques / eritroides / macrofàgiques / megacariocítiques (CFU-GEMM) i les unitats formadores de colònies eritroides immadures (BFU-E) [72].

S'ha observat també que el F4P, la IL-8 i el NAP-2 (β -TG) són capaços de mantenir la supervivència de precursors hematopoètics normals, incrementant la viabilitat i protegint-los de l'apoptosi induïda per drogues citotòxiques com el TGF β ó per diferents agents quimioterapèutics. Per altre banda, cap de les tres quimiocines anteriors no afecten ni la viabilitat ni la quimiosensitivitat de diferents línies leucèmiques o tumorals. Aquests resultats suggereixen el potencial clínic d'aquestes molècules pel tractament del càncer degut a la seva activitat sobre cèl·lules normals i no sobre cèl·lules transformades [70].

El F4P és capaç, a més a més, d'inhibir el creixement de cèl·lules eritroleucèmiques, impedit la formació de colònies leucèmiques i la síntesi del DNA. Aquesta activitat biològica també queda neutralitzada en afegir al medi heparina o heparan sulfat [61].

En l'actualitat s'ha descrit un gran nombre de quimiocines, nombre que es va incrementant continuament. A més a més la complexitat d'aquesta superfamília es veu incrementada pel fet que aquestes molècules com d'altres citocines, tenen les funcions solapades i estan produïdes per una gran varietat de tipus cel·lulars.

6.1. Característiques bioquímiques i classificació.

Les quimiocines tenen 4 residus cisteïna conservats que els facilita la formació de 2 ponts disulfur, el que els hi confereix una estructura terciària característica.

Segons la disposició de les dues primeres cisteïnes, les quimiocines es separen en quatre subfamílies: La subfamília α o CXC, en la que un aminoàcid separa ambdues cisteïnes, la subfamília β o CC on les dues cisteïnes es localitzen de forma adjacent, i dos noves subfamílies amb un representant cada una: la subfamília γ o C amb una estructura similar però que ha perdut una de les quatre cisteïnes conservades i la subfamília CXXXC amb 3 aminoàcids que separen les dos primeres cisteïnes. En la **taula 1** es presenten algunes de les quimiocines més representatives així com algunes de les seves funcions. (Per revisió [15, 59, 73-75].

TAULA 1. Classificació de les Quimiocines

Subfamílies	Homologia Respecte al F4P (%)	Produïdes per	QUIMIOTACTISME SOBRE:				Activitat en Cèl·lula "STEM"	Cites [59]
			Neutròfils	Monòcits	Limfòcits	Basòfils/ Eosinòfils		
① CXC								[14]
F4P	100 %	Plaquetes Megacariòcits		✓			✓	[68] [76]
IL-8	31%	Monòcits Neutròfils Endoteli LT	✓	✓	✓	✓	✓	[77]
IP-10	41%	Monòcits Neutròfils		✓	✓		✓	[68] [78]
GRO α /GRO β		Monòcits Neutròfils Macròfags	✓					[79]
β -TG	51%	Plaquetes Megacariòcits	✓	✓				[80]
ENA-78		Cèl. Epiteliais	✓					[81]

Subfamílies	Homologia Respecte al F4P (%)	Produïdes per	QUIMIOTACTISME SOBRE:				Activitat en Cèl·lula "STEM"	Cites [59]
MGSA			✓					
GCP-2			✓			✓	✓	[82]
MIP-2 α / MIP-2 β		Monòcits Macròfags LT				✓	✓	
② CC			Neutròfils	Monòcits	Limfòcits	Basòfils/ Eosinòfils		[14]
RANTES		LT Fibroblasts Epiteli PLQ		✓	✓ (CD4 ⁺)	✓	✓	✓ [83]
MIP-1 α / MIP-1 β		Monòcits Limfòcits Cèl.Endotelials			✓ (CD8 ⁺)	✓	✓	✓ [84] [14]
MCP-1,2,3		Monòcits Macròfags Endoteli		✓	✓			[85, 86]
I-309		Limfòcits T		✓	✓		✓	[73]
HC-14		Monòcits Endoteli		✓	✓			[81]
③ C			Neutròfils	Monòcits	Limfòcits	Basòfils/ Eosinòfils		
Limfotactina		NK LT mastòcits			✓			[87]
④ CXXXC			Neutròfils	Monòcits	Limfòcits	Basòfils/ Eosinòfils		
Fractalquina		NK C. endotelials activades		✓	✓			[88]

6.1.1. Bioquímica de les quimiocines cxc.

- **El Factor 4 plaquetar (F4P)**

Va ser la primera quimiocina CXC caracteritzada. La seva seqüència va ser publicada l'any 1977, 10 anys abans del descobriment de l'IL-8. El F4P s'emmagatzema en els grànuls α de les plaquetes, els quals contenen també les proteïnes PBP (proteïna bàsica de plaquetes) i CTAP-III (connective tissue-activating peptide III) de la subfamília CXC. També contenen una quimiocina de la subfamília β , el factor d'expressió i secreció regulador de cèl·lules T normals (RANTES).

El F4P es compon d'una única cadena polipeptídica de 70 aminoàcids on s'inclouen els 4 residus cisteïna i un únic residu tirosina. El pes molecular calculat a partir de la seva estructura primària és de 7.767 daltons.

Se li ha caracteritzat una regió NH_2 altament àcida on 5 dels 7 primers residus de la seqüència són àcid glutàmic o àcid aspàrtic. També té una seqüència característica en l'extrem COOH -terminal que consisteix en un clúster de residus catiònics amb parelles de lisines intercalades amb parells de residus alifàtics [89].

60

70

Tyr-Lys-Lys-Ile-Ile-Lys-Lys-Leu-Leu-Glu-Ser-COOH

Aquest clúster repetitiu de càrregues positives i dominis hidrofòbics és, probablement, un centre actiu de la proteïna. Per altra banda, s'ha demostrat que els residus Lys estan involucrats en la unió a l'heparina [90].

- **Les β -Tromboglobulines (β -TG)**

Es coneixen com β -tromboglobulines un grup de proteïnes derivades dels grànuls α de les plaquetes amb seqüències homòlogues i immunològicament crosreactives. Difereixen tant sols en el seu extrem aminoterminal. En les plaquetes humanes s'han identificat principalment 2 variants, la PBP (94 aminoàcids) que es sintetitza en els megacariòcits i el CTAP-III (85 aminoàcids), el qual representa, probablement, un producte truncat format per proteolisis durant la maduració de la plaqueta. Quant les plaquetes s'activen i lliuren el seu contingut la quantitat de CTAP-III és sempre superior a la de PBP, amb una proporció del

90 %. Un altre membre d'aquesta subfamília és la β -Tromboglobulina (β -TG, amb 81 aminoàcids) aquesta forma està absent en les plaquetes no activades, prové de la proteolisis del CTAP-III. Totes elles tenen el motiu ELR que s'ha associat amb la capacitat d'estimular neutròfils, però a cap d'elles se li ha pogut demostrar la capacitat per estimular aquestes cèl·lules [91]. Finalment es va observar que els neutròfils tenien la capacitat de convertir la β -TG secretada per les plaquetes amb una nova forma amb l'extrem aminoterminal truncat, el pèptid 2 activador de neutròfils (NAP-2, amb 70 aminoàcids), forma que si és capaç d'estimular neutròfils [92].

- **L'Interleuquina-8 (IL-8)**

Es va purificar inicialment d'un cultiu de monòcits activats i es va identificar com una proteïna de 72 aminoàcids d'un pes molecular de 8.383 daltons. Aquesta proteïna, abans de ser lliurada al medi, és processada per proteases que generen variants en l'extrem aminoterminal, depenent del tipus cel·lular i de les condicions de cultiu. Es poden produir 2 subtipus principals: un de 72 aminoàcids, predominant en cultius de monòcits i macròfags, i un de 77 aminoàcids que predomina en els cultius de cèl·lules endotelials i fibroblasts.

Generalment l'IL-8 està present en cadenes de 69,70 o 72 aminoàcids mentre que la forma que presenta 79 residus està pràcticament absent. S'ha especulat que el processament continu de l'extrem N-terminal podria provocar la inaccessibilitat de la proteïna a les proteases, per tant, aquest processament progressiu potenciaria l'activitat de la quimiocina [93].

Els rangs d'homologia entre les diferents proteïnes CXC van del 24% al 46%. Aquest grau d'identitat en la seqüència no es correlaciona necessàriament amb l'activitat biològica de les proteïnes. Sí que es correlaciona, però, amb una petita seqüència en l'extrem N-terminal Glu-Leu-Arg (ELR) que precedeix a la primera cisteïna i determina l'activitat sobre Neutròfils [93].

6.1.2. Bioquímica de les quimiocines CC

La primera quimiocina CC identificada, l'anomenada LD78, es va aïllar d'un cultiu de Limfòcits humans. Posteriorment s'identificaren dues proteïnes similars, el MIP-1 α i el MIP-1 β , en un cultiu de macròfags estimulats amb lipopolisacàrid (LPS). La quimiocina CC millor caracteritzada actualment és la proteïna-1 quimioattractant de monòcits (MCP-1), purificada d'un cultiu de cèl·lules mononucleades. D'altres quimiocines CC: com l'I-309, el RANTES, i l'HC14 es purificaren com a producte de Limfòcits T activats.

Les quimiocines CC, que com ja s'ha esmentat, actuen sobre monòcits, tenen una seqüència N-terminal comú i anàloga a l'ELR de les quimiocines CXC.

Totes les quimiocines, tant les CXC com les CC, tenen un tamany i una estructura similars, caracteritzades per dos ponts disulfur, un extrem N-terminal curt i un C-terminal llarg. El cDNA codifica per proteïnes de 92 a 99 aminoàcids amb una seqüència característica de 20-25 aminoàcids que correspon al pèptid senyal [93].

Limfotactina i fractalquina són las úniques proteïnes descrites de les subfamílies C i CX3C respectivament. Les funcions d'aquestes quimiocines estan menys estudiades. Ambdues actuen sobre cèl·lules limfoides (LT i NK). A la Fractalquina se li ha descrit, també, activitat sobre monòcits .

La formació d'oligòmers no covalents és una característica de totes les quimiocines analitzades fins el moment. Aquest tret consisteix en la unió dels monòmers a partir de certa concentració de la quimiocina present en el medi. Mentre que en concentracions elevades l'IL-8, NAP-2, GRO- α i MIP-1 β formen dímers en solució, el F4P forma tetràmers i l'IP-10 s'associa en oligòmers de major ordre [94]. Posteriorment, anàlisis amb anàlegs sintètics d'IL-8 que prevenen la formació d'oligòmers, van demostrar que és la forma monomèrica la que interacciona amb el receptor, i per tant, la forma capaç de desencadenar activitat biològica [95]. En canvi, aquest fenomen sembla ser totalment diferent en el cas del F4P, ja que la formació d'oligòmers podria ser essencial per la unió amb el seu receptor. En aquest sentit, Petersen et al [94] demostren que la unió específica del F4P amb el receptor de naturalesa Condrítin Sulfat Proteoglicans en els neutròfils precisa de la unió d'aquest en

tetràmers. És interessant assenyalar que d'altres autors ja havien apuntat que el segrest de quimiocines com l'IL-8 per GAG té com a punt crucial l'estat oligomèric de la quimiocina [96].

6.2. Els gens de les quimiocines

Els gens que codifiquen per aquestes proteïnes són relativament petits, d'aproximadament 2.000 pb. Aquests gens s'organitzen en clústers localitzats en el cromosoma 4, q12-21, la subfamília CXC, en el cromosoma 17, q11-21 la subfamília CC i la subfamília C és localitzada en el cromosoma 1 [97].

És important assenyalar que el grau d'homologia de la seqüència d'aminoàcids entre les diferents quimiocines es troba directament relacionat amb la proximitat en que es troben els seus gens entre sí. Aquest fet va fer pensar que probablement totes les quimiocines provenen d'un mateix gen ancestral. L'origen de la subfamília CC fou probablement una translocació cromosòmica, mentre que, l'origen dels gens per l'IL-8, el "Growth Related Peptide" (GRO), el F4P, el PBP i l'IP10, probablement, va ser la duplicació gènica. L'estructura dels SIGs és, per tant, força similar: els gens de la subfamília CXC (excepte el F4P) tenen 3 exons i 2 introns, mentre que els de la subfamília CC i el F4P tenen 3 exons i 1 intró [93].

- **Regulació de l'expressió gènica:**

La major part de les quimiocines tenen una seqüència "TATA box" en la regió 5', així com d'altres dominis d'unió per a factors nuclears i seqüències riques en AT en la regió 3'. Totes aquestes característiques fan que aquests gens puguin ser ràpidament induïts a expressar RNAm. Per aquest motiu s'els va donar el nom de petits gens induïbles (SIGs).

L'increment d'expressió del RNAm d'IL-8 post-estimulació amb IL-1 o TNF és ràpid (màxima expressió a les 6 hores). Aquest increment és degut, per una banda, a l'activació de la transcripció, i per l'altre, a l'estabilització del RNAm preexistent, gràcies a la presència d'una seqüència estabilitzadora AUUUA que es troba en la regió 3' [93, 97, 98].

6.3. Tipus cel·lulars que produeixen quimiocines

Monòcits / Macròfags: Són els principals productors de quimiocines, tant CXC com CC, com a resposta a múltiples agents. En general són agents pro-inflamatoris. Així, per exemple, expressen i secreten IL-8 en resposta a l'IL-1 α , l'IL-1 β , el TNF α , el GM-CSF i LPS, entre d'altres. En resposta a estímuls semblants també produeixen: GRO α , GRO β , GRO γ , MCP-1. Sintetitzen IP-10 per efecte de l'INF γ [73].

Neutròfils: Són principalment productors de quimiocines CXC.

Limfòcits: Són potents productors de la subfamília de quimiocines CC [93].

LGLs: estimulades amb IL-2 ó CD16 produeixen IL-8 [30].

Cèl·lules Endotelials: Les cèl·lules de l'endoteli activades poden produir, depenent de l'estímul, tant quimiocines del tipus CC com CXC. Aquesta capacitat facilita la transmissió selectiva dels diferents Leucòcits a través de l'endoteli.

També són productors de quimiocines: Els **fibroblasts** de diferents orígens, les **cèl·lules epitelials**, les **cèl·lules tumorals** (melanoma, carcinoma renal, osteosarcoma, glioma,...), els **queratinòcits** i els **condròcits** [93].

6.4. Funcions de les quimiocines

La major part de quimiocines CXC són activadores de **neutròfils**, capacitat que es basa en dos efectes biològics observats "*in vitro*": la quimiotaxi i el lliurament de grànuls amb un contingut enzimàtic.

S'observen diferents canvis en la cèl·lula correlacionats amb aquests efectes: S'indueix l'activació del citoesquelet contràctil com a reflex d'un canvi en la càrrega de la cèl·lula. S'observa un augment transitori de Ca²⁺ intracitoplasmàtic que desencadena l'activació d'un mecanisme de transducció de senyal. Hi ha una activació de la cadena respiratòria que provoca la reducció d'oxigen extracel·lular a radicals superòxid. Un augment en l'expressió de molècules d'adhesió promovent l'adherència dels neutròfils a

l'endoteli i un increment de la síntesi de lípids bioactius derivats del metabolisme de l'Àcid Araquidònic (com el LTB₄ o el 5-HETE) i la síntesi de nou del PAF, implicats tots ells en la inflamació [73].

S'ha descrit en alguns treballs que el F4P és capaç d'induir quimiotaxi i exocitosi en neutròfils, a concentracions elevades. Els últims treballs apunten, però, que aquest efecte podria ser degut a la β -TG que es troba com a contaminant en preparacions de F4P no gaire ben purificades.

El MIP-1 α és l'única quimiocina CC que s'ha descrit amb algun efecte sobre els neutròfils, doncs és capaç d'induir un augment transitori i moderat de Ca²⁺ intracel·lular, però no s'observa cap resposta funcional com la quimiotaxi o l'exocitosi [93].

Les dosis de quimiocines CXC capaces d'induir als **basòfils** a lliurar histamina i leucotriens són equivalents a les necessàries per activar als neutròfils. Aquesta activació és dependent de l'estimulació prèvia de les cèl·lules amb IL-3, IL-5 o GM-CSF [76].

Les proteïnes CC són estimuladores més potents sobre els basòfils que les CXC, essent el MCP-1 l'inductor més potent pel lliurament de leucotriens i histamina i el RANTES el més efectiu quimioattractiu per Basòfils.

Com en el cas dels basòfils, els **eosinòfils** responen millor a la subfamília CC que a la CXC. Provoquen un increment de Ca²⁺ intracel·lular i un canvi de càrregues induint quimiotactisme i el lliurament de peroxidases [14].

La major part de quimiocines CXC no indueixen quimiotactisme en **monòcits**, però sí s'ha observat que algunes d'elles s'uneixen a la membrana d'aquestes cèl·lules de forma saturable provocant un baix però significatiu increment del Ca²⁺ intracel·lular. Els monòcits són molt sensibles a l'efecte de la subfamília CC. Provoquen l'activació de l'activitat quimiotàctica i de la cadena respiratòria, estimulen l'expressió de β_2 -integrines (CD11b-CD18) i el seu efecte s'associa a canvis transitoris en la concentració de Ca²⁺ intracel·lular.

L'IL-8 estimula el quimiotactisme en **limfòcits T** *in vitro*. Aquest fenomen no es correlaciona amb un increment de Ca²⁺ transitori, mentre que sí s'observa un increment

transitori d'inositols fosfat [99]. El RANTES és capaç d'estimular el moviment de LT tant en estat actiu com quiescent [93, 100].

El paper de les quimiocines sobre les **cèl·lules NK** ha estat poc estudiat. Se sap que expressen en la seva superfície alguns dels receptors per aquestes proteïnes. Les funcions de les quimiocines que s'han descrit sobre aquest tipus cel·lular són el reclutament de les cèl·lules amb activitat NK i un efecte modulador de la resposta NK citotòxica, possiblement potenciant la seva degranulació i mobilització de Ca^{2+} intracel·lular [101]. Els resultats obtinguts en aquest tipus cel·lular són però força controvertits [102] [103-105]. Finalment cal assenyalar l'important funció en l'activitat d'aquestes cèl·lules pel que fa a les quimiocines descrites més recentment com són el LTN i FKN [106-108].

En **altres tipus cel·lulars** s'ha descrit que les quimiocines també tenen funcions de regulació del creixement i reparació del teixit, ambdós mecanismes implicats en la Inflamació. S'ha demostrat que el GRO α i l'IL-8, a diferència de la subfamília CC, inhibeixen l'expressió de col·lagen en fibroblasts sinovials de pacients amb Artritis Reumatoide, suggerint que les quimiocines CXC, junt amb factors de creixement participarien en la reparació dels teixits. S'ha demostrat l'activitat angiogènica de l'IL-8 en observar-se la capacitat per estimular la quimiotaxi de cèl·lules epidermals i endotelials [41]. En canvi, és interessant recordar que el F4P, essent una quimiocina de la mateixa subfamília, inhibeix l'angiogènesi disminuint la proliferació de l'endoteli [93].

Del que es coneix fins el moment de la família de les quimiocines fa pensar en un sistema redundat tant en l'acció com en la producció dels seus components. Aquesta característica el fan un sistema sòlid ó "robust", força insensible a determinats canvis [109].

6.5. Els receptors de les quimiocines i la transducció de la senyal.

El diferent patró d'expressió dels receptors de les quimiocines i d'altres proteïnes de membrana com les selectines i les integrines és el responsable directe de la migració leucocitària. Així, l'expressió d'aquests receptors està estrictament regulada, ja que determina, en últim terme, el posicionament dels leucòcits en els diferents teixits.

En la major part de receptors de les quimiocines es donen reaccions creuades, és a dir, les quimiocines poden interaccionar, en alguns casos, amb receptors d'altres quimiocines de la mateixa subfamília amb diferents afinitats.

Un altre de les característiques d'aquests receptors és el fenomen de l'atenuació de la resposta, que consisteix en que un cop el receptor ha transduït una senyal aquest es manté inactiu durant uns minuts a la resposta d'un estímul posterior del mateix lligam o de qualsevol altre [110]. S'ha descrit, en canvi, el cas contrari on la interacció del lligam provoca el bloqueig selectiu a la resposta d'un determinat agonista mantenint-se la capacitat per respondre a un altre lligam. Aquest fenomen s'ha demostrat que podria estar facilitat pel bloqueig d'una via de transducció de senyal a través d'un mecanisme de fosforilació dels enzims implicats [111]. Les diferents característiques d'aquests receptors proporcionen la "flexibilitat" adequada per ser els principals responsables de la migració leucocitària selectiva.

La major part de quimiocines actuen a través de receptors de 7 segments de transmembrana (7-TM) els quals transdueixen la seva senyal a través de proteïnes heterotrimèriques d'unió a GTP. Utilitzen com a missatger secundari un increment transitori de Calci intracitoplasmàtic. En base a la identitat de la seqüència d'aquests receptors es pot també establir l'existència de 2 subgrups: 1) els que reconeixen quimiocines CXC i 2) els que reconeixen la subfamília CC. Els percentatges de identitat van del 36% al 89%

6.5.1. Receptors de les quimiocines cxc

Els receptors més ben caracteritzats són potser els de l'IL-8, CXCR1 i CXCR2, de 7-TM. Ambdós receptors s'expressen principalment en els neutròfils, encara que els podem trobar també en monòcits, basòfils o eosinòfils i de forma minoritària en els limfòcits . El receptor CXCR1 és selectiu per a l'IL-8 mentre que el receptor CXCR2 interactua a més a més amb les altres α -quimiocines que tenen efecte sobre neutròfils, com són les proteïnes GRO ó NAP-2.

El domini ELR (Glu-Leu-Arg) és el que determina la capacitat d'una determinada quimiocina per interaccionar amb el receptor de l'IL-8 i és comú a totes les quimiocines

CXC que activen i/o atreuen neutròfils. És absent en el F4P i en l'IP10, pel que no poden interaccionar amb aquest receptor. La introducció d'aquests 3 aminoàcids en la seqüència del F4P li proporciona la capacitat per interaccionar amb aquest receptor [112].

El F4P no és capaç, doncs, d'estimular el quimiotactisme d'aquestes cèl·lules, malgrat alguns treballs inicials havien apuntat el contrari [113]. Actualment se sap que el F4P indueix efecte sobre els neutròfils pre o coestimulant amb $\text{TNF}\alpha$, activitat biològica que és independent de la mobilització de Ca^{2+} intracel·lular, i per tant, probablement independent de la interacció amb un receptor de 7-TM [76].

També ha estat clonat un receptor específic per Mig i IP-10, l'anomenat CXCR3 que s'expressa a LT pre-estimulats amb IL-2 [114]. Posteriorment s'han caracteritzat dos receptors més el CXCR4 i CXCR5 que tenen com a lligams el SDF-1 i el BCA-1 respectivament. El primer es localitza en monòcits i limfòcits mentre que el segon s'expressa majoritàriament en LB [15, 115].

Tots ells són receptors de set segments de transmembrana acoblats a les proteïnes G i responsables de la mobilització de Ca^{2+} intracel·lular.

S'han caracteritzat altres tipus de receptors. L'IP-10 [68] s'uneix a la superfície cel·lular a través d'un receptor HSPG amb una Kd de 25 nM i de forma específica. Aquesta interacció no provocava l'increment de Ca^{2+} intracel·lular i tant sols el F4P i certs Glicosaminglicans competeixen per la unió de l'IP-10 a la cèl·lula. Tots aquests resultats, junt amb el fet que l'IP-10 i el F4P tenen algunes funcions equivalents, podrien ser indicatius d'un receptor comú o de receptors de característiques semblants. Més recentment Stringer et al. [63] han demostrat que el tetramer de F4P s'uneix de forma específica i amb una Kd de 16 nM a Heparan Sulfat (HS), el que permetria la unió amb HS proteoglicans que s'expressen en les cèl·lules endotelials. Finalment Petersen et al. [94] demostren que l'efecte biològic que és capaç d'induir el F4P en els neutròfils depèn de la unió específica amb un receptor de naturalesa condroitin sulfat proteoglicà.

6.5.2. Receptors de les quimiocines cc

En els receptors d'aquesta subfamília (clonats del CCR1 al CCR7) és on més clarament es dona el fenomen de reacció creuada. Per exemple, CCR1 originalment designat com a receptor de MIP-1 α /RANTES també interacciona amb MCP-2,-3 i el CCR2 que té com a lligam principal el MCP-1 també pot interaccionar amb el MCP-2,-3,-4. S'expressen principalment en monòcits i en alguns casos en eosinòfils i basòfils. El CCR3 que té com a lligams el MCP-2,-3,-4, RANTES i eotaxin. En canvi, els lligams de CCR5 són el MIP-1 α , -1 β i el RANTES.

Com en el cas de les α -quimiocines també trobem en aquesta subfamília algun exemple d'interacció quimiocina-cèl·lula que no està associada a un increment de Ca²⁺ intracel·lular. Així, per exemple, el RANTES és capaç d'activar LT quiescents a través d'una via de transducció del senyal independent de Ca²⁺ però associada a l'activació de la PI3-K. Això fa pensar que el receptor amb el que interactua el RANTES, en aquest cas, no té una estructura de 7-TM com la major part dels receptors de les quimiocines caracteritzats fins el moment. Finalment cap dels receptors de 7-TM als quals s'ha descrit la seva interacció amb el RANTES, s'expressa en LT quiescents [116].

6.5.3. Transducció de la senyal

Els receptors de les quimiocines de 7-TM s'acoblen a una proteïna d'unió a GTP. Aquest fenomen es va observar per primera vegada amb l'efecte que produïa el pretractament amb toxina pertússica (que inactiva les proteïnes G del tipus G_i per una ADP-Ribosilació) impeding l'efecte de la proteïna sobre la cèl·lula diana. Són receptors d'una única cadena polipeptídica, de 350 a 360 aminoàcids, que formen 7 segments o dominis transmembrana de 20-25 aminoàcids, amb una estructura α -hèlix, típica dels receptors acoblats a proteïna G. Les regions N-terminal i el segon loop extracel·lular contenen llocs per a la glicosilació. L'extrem COOH-terminal conté de 7 a 15 llocs potencials de fosforilació.

La senyal primerenca induïda per les quimiocines sobre la cèl·lula diana és el ràpid i transitori increment de Ca^{2+} lliure en el citosol. Aquest augment de la concentració de Ca^{2+} intracel·lular és un senyal comú d'activació desencadenada per varis agonistes, estimuladors de la locomoció, degranulació i activadors del metabolisme oxidatiu. L'augment transitori de Ca^{2+} pot ser degut a dos mecanismes diferenciats: el lliurament del catió dels reservoris intracel·lulars i el flux a través de la Membrana Plasmàtica de l'exterior de la cèl·lula. El lliurament dels acúmul intracel·lulars es produeix per efecte del IP_3 (Inositol fosfat) produït per la hidròlisi de PIP_2 per la PLC (Fosfolipasa C). El flux de Ca^{2+} de fora de la cèl·lula és degut a uns nivells de $(\text{Ca}^{2+})_i$ sostingudament elevats, aquest mecanisme és essencial per reomplir els magatzems de Ca^{2+} intracel·lulars [15].

Algunes quimiocines, com el MCP-1, s'ha descrit que no utilitzen aquesta via clàssica d'estímul del quimiotactisme (utilitzat per FMLP, C5b, PAF i LTB_4). El MCP-1 no produeix el lliurament de Ca^{2+} dels magatzems intracel·lulars, no veient-se incrementat per PIP_2 , sinó per un efecte directe sobre els canals de Ca^{2+} de la Membrana Plasmàtica. També s'ha pogut demostrar que una PKC (proteïna quinasa C) és l'encarregada de regular els canals de Ca^{2+} activats per MCP-1 [117].

Com ja s'ha dit, algunes quimiocines (IP-10 i RANTES) en determinades situacions transdueixen una senyal d'activació independent d'un increment de Ca^{2+} intracel·lular. En el cas del RANTES, estaria regulada per la fosfoinositol 3-quinasa (PI3-K) i els seus productes metabòlics, lípids fosforilats en la posició 3. Els fosfatidil inositol (3,4,5) trisfosfat (PtdIns (3,4,5)) produïts per la PI3-K, s'ha postulat que actuen com a segons missatgers en la regulació del creixement i de la proliferació cel·lular. Semblen estar implicats en la regulació del tràfic eficient de proteïnes en les cèl·lules eucariotes. Aquesta funció és particularment rellevant en la regulació i reorganització del citoesquelet mecanisme clau per la polarització i posterior migració cel·lular [116].

6.6. Paper de les quimiocines en la inflamació

La migració leucocitària està controlada per dos fenòmens crítics: primer el segrest i l'adhesió ferma a la superfície de l'endoteli dels vasos i en segon terme la migració a través de l'endoteli a l'interstici i d'allà als diferents microambients.

La unió leucocitària a l'endoteli involucra el "lliscament" de les cèl·lules mediat per selectines i finalment l'adhesió ferma mediada per integrines. Les quimiocines interaccionen amb les cèl·lules endotelials i els diferents leucòcits induint l'expressió tant de selectines com de integrines, tenen també la capacitat de regular l'expressió dels seus propis receptors. La diferent expressió d'aquests receptors proporciona als leucòcits una diferent combinació o "adreça" pel posicionament de la cèl·lula en un determinat teixit. Una extensió important d'aquest paradigma central és el fet que els leucòcits poden respondre seqüencialment a les quimiocines en els diferents moments del seu desplaçament. Poden migrar a través de l'endoteli utilitzant un receptor de quimiocina, atravesar l'interstici utilitzant un altre receptor i localitzar-se en un determinat microambient amb un altre receptor. Cada quimiocina és important per cada un dels passos durant la migració.

Per tant, la gran varietat de quimiocines i de receptors amb fenòmens d'interacció creuada proporciona la flexibilitat necessària per determinar un patró de migració precís pels diferents leucòcits. Encara que selectines i integrines s'els hi reconeix àmpliament la seva expressió diferencial en cèl·lules T navegants i cèl·lules T efectores/de memòria, recentment s'ha observat que el nombre de receptors de quimiocines s'expressen també de forma diferencial depenent de la seva funció, estat d'activació, o maduració. Per tant, es suggereix que les quimiocines i els seus receptors serien importants reguladors del posicionament i de la funció dels diferents leucòcits [118].

Efectes mediat per les quimiocines que són fonamentals pel desenvolupament de la Inflamació [73]:

- Activadors de la maquinària quimiotàctica.
- Modulen selectivament les molècules d'adhesió.

- Incrementen tant l'expressió com l'avidès de les integrines leucocitàries facilitant la seva interacció amb l'endoteli i, per tant, la transmigració.
- Incrementen l'expressió i lliurament de més factors que intervenen en el procés inflamatori.

7. LES CÈL·LULES AMB ACTIVITAT NATURAL KILLER

Les cèl·lules amb activitat Natural Killer (NK) foren descobertes fa aproximadament 20 anys mentre es feien estudis sobre la citotoxicitat cel·lular. Els investigadors esperaven trobar activitat citotòxica específica contra cèl·lules tumorals autòlogues en individus que tenien tumors, però observaren una apreciable activitat citotòxica en limfòcits d'individus sans. Les NK es definiren posteriorment en el "Workshop on NK cells" [119] com a cèl·lules efectores amb citotoxicitat espontània contra vàries cèl·lules diana on s'inclouen cèl·lules tumorals, cèl·lules infectades per virus, o per bacteries intracel·lulars, i, en alguns casos cèl·lules normals. Es va observar que per a dur a terme el seu efecte no requerien d'una sensibilització prèvia i no estaven restringides pel MHC. Posteriorment es va veure que aquest últim punt no era del tot correcte (**Introducció, apartat 7.4**).

En aquest sentit es va demostrar que l'expressió a la cèl·lula diana d'antigen MHC-I propis li conferia una protecció selectiva contra l'activitat NK. Aquesta propietat es distribueix de forma clonal en les cèl·lules efectores, i les capacita, per tant, per matar selectivament determinades cèl·lules al·logèniques [120]. Fisiològicament, aquest model suposa la complementarietat de les capacitats lítiques de NK i dels LT_c : mentre que per NK el reconeixement de la cèl·lula diana d'un complex proteic en el que intervenen molècules MHC-I pròpies resultaria inhibitori, en el LT_c aquest reconeixement és necessari per iniciar el procés citolític. En ambdós casos, però, la resposta estaria restringida pel MHC [121].

Al contrari dels Limfòcits T i B, les cèl·lules NK no expressen reordenament molecular dels receptors i, en particular, no expressen reordenament en cap dels 4 gens que codifiquen pel receptor de la cèl·lula T (TCR). L'habilitat de les cèl·lules amb activitat NK per reconèixer i destruir les cèl·lules diana possiblement estigui mediada per múltiples

receptors relacionats amb molècules d'adhesió que reconeixen un patró alterat d'expressió de les molècules de superfície de les cèl·lules diana patològiques [122, 123]

7.1. Morfologia

Posteriorment al "Workshop on NK cells" es va aconseguir aïllar poblacions altament enriquides de cèl·lules amb activitat NK, demostrant que aquesta activitat estava associada a subpoblacions de Limfòcits més grans que els LT ó LB, que tenen en el seu citoplasma grànuls azuròfils. Degut a aquesta morfologia es van anomenar Limfòcits Granulars Grans (LGLs). Representen entre un 10 i un 20% de la població limfocitària i entre un 7 i un 14% del total de cèl·lules mononucleades [9, 124].

7.1.1. Marcadors de superfície

Els antígens més freqüentment utilitzats com a marcadors extensius de les LGL són el CD56 i el CD16. També es caracteritzen per la manca d'expressió de l'antigen CD3, característic dels LT.

L'antigen CD56 s'expressa pràcticament en totes les cèl·lules de sang perifèrica capaces d'induir citotoxicitat no restringida per MHC i és idèntica a la molècula d'adhesió neural NCAM. Aquest antigen no està involucrat directament en la mort de la cèl·lula diana, encara que estudis recents suggereixin que el CD56 podria mediar l'adhesió homotípica de les NK a les línies cel·lulars CD56⁺. Se sap que menys del 5% dels limfòcits de sang perifèrica són CD56⁺ CD3⁺.

Aproximadament el 90% dels limfòcits de sang perifèrica que expressen CD56 són també CD16⁺. El CD16 és el receptor de baixa afinitat per la fracció Fc de les IgG i és, probablement, el marcador més ben caracteritzat de les LGL. L'altre 10% de limfòcits CD56⁺ són CD16⁻, la major part d'aquestes tenen una major expressió de l'antigen CD56 i constitueixen una subpoblació CD56^{+bright}. Aquestes cèl·lules CD16⁻ CD56^{+bright} constitueixen una subsoca de cèl·lules més immadures que podrien ser les precursors de

l'altre subsoca més freqüent $CD56^{+dim} CD16^+$, considerades cèl·lules més madures (veure revisió en [28]).

Marcadors limfoides:

- **CD2:** També anomenat LFA-2. La seva funció és l'activació cel·lular. És el lligam del LFA-3. També s'expressa en LT.
- **CD8:** L'expressen entre un 30 i un 40% de les LGL, la majoria en forma homodimèrica $CD8_\alpha/CD8_\alpha$ a diferència dels LT supressors/citotòxics que expressen l'heterodímer $CD8_\alpha/CD8_\beta$. Antigen de membrana associat a tirosin quinases i per tant capaç de transduïr una senyal a la cèl·lula. L'expressen una subpoblació de LGL amb una baixa expressió són, per tant, $CD8^{+dim}$.
- **CD45R:** També anomenat LCA. Receptor que en activar-se indueix transducció de senyal. S'expressa en la subsoca de cèl·lules amb activitat LAK i en LB.
- **CD25:** És la cadena α del receptor de la IL-2, també s'anomena p55. Transdueix una senyal de proliferació i diferenciació cel·lular. S'expressa en els LT, LB i LGL en estat d'activació.
- No expressen marcadors deLB com el CD19, CD20 o CD22. Tampoc expressen el receptor dels LT TCR/CD3 [28].

Marcadors Mieloides:

- **CD11a:** També conegut com a cadena α del LFA-1. S'uneix a ICAM-1,2,3. També l'expressen els LT i LB.
- **CD11b:** Cadena α del CR3. Reconeix ICAM-1.
- **CD11c:** Cadena α del CR4 s'uneix a C3bi
- **CD16 ó Fc γ RIIIA.** És, potser, el marcador més ben caracteritzat de les NK. Constitueix el receptor de baixa afinitat per la regió Fc de les IgG₁ i IgG₃ de tipus IIIA (Fc γ RIIIA ó CD16). A través d'ell la cèl·lula és capaç de reconèixer una IgG unida a la cèl·lula diana

iniciant-se l'activitat citotòxica mediada per Ac (ADCC). Així, les cèl·lules que expressen aquest receptor tenen capacitat per induir l'ADCC, aquest és el cas de LGLs, monòcits, macròfags, granulòcits i neutròfils.

Aquest receptor està format per homo o heterodimers de les cadenes ζ del CD3/TCR i γ del Fc ϵ RI i media una transducció de senyal amb mecanismes similars als que s'observen per la via del complex TCR/CD3 [28].

En els neutròfils, aquest receptor, està anclat en la membrana a través d'un fosfatidilinositol-glicà. En canvi, en les NK és un receptor integrat en la membrana a través de la cadena ζ . La interacció amb una Ig provoca la ràpida fosforilació d'aquesta cadena en els residus tirosina, provocant un ràpid increment de Ca^{2+} intracitosòlic i la producció de IP_3 (1,4,5), ambdós són missatgers secundaris importants per l'activació limfocitària [125].

En les NK, la interacció de l'agonista amb aquest receptor provoca, a més a més de l'activació del procés citolític, l'expressió d'antígens d'activació i la secreció de citocines [126].

- **CD18:** També s'anomena β_2 integrina. És la cadena β dels receptors CD11a,b,c. Es troba tant en cèl·lules d'origen Limfoide (LT; LB) com Mieloide.
- No expressen marcadors mielomonocítics com el CD14 o el CD15
- **CD69:** L'antigen CD69 (EA1, AIM) és una proteïna homodimèrica fosforilable que pot expressar-se en la major part de cèl·lules hematopoètiques [127].

Aquesta molècula és capaç de mediar senyals coestimuladores als limfòcits que l'expressen, induint proliferació, producció d'IL-2, o la regulació de factors de transcripció com l'AP-1.

S'ha demostrat que la inducció de l'expressió del CD69 en les NK pot estar mediada per diferents estímuls. Alguns d'aquests són l'IL-2, l'INF γ , l'estímul a través del FC γ RIIIA, la interacció amb una cèl·lula diana com la K562 (mecanisme desencadenant de l'activitat natural killer), ó amb l'activació amb èsters de forbol (PMA). Cadascun d'aquests estímuls, però, pot involucrar un sistema de transducció de senyal diferent. Així tant el PMA com la interacció amb K562 provoquen l'activació de la protein

quinasa C (PKC). En canvi, la inhibició de fosfotirosin quinases (PTK) mitjançant la genisteina inhibeix l'expressió de CD69 induïda a través de la IL-2, INF α , Fc γ RIIIA i K562 el que suggereix que diferents estats d'activació de les NK, induïts per vies de transducció de senyal diferents involucren l'expressió del CD69 [128].

TAULA 2. Marcadors que expressen les cèl·lules NK.

CD	Antigen	% de LGL que expressen l'antigen	Altres tipus cel·lulars que expressen l'Ag
CD2	LFA-2	70-90	LT, timòcits
CD7	p40	80-90	LT, timòcits
CD8	MHC-1	30-40	LTcitotox./supres.
CD11a	LFA-1	95-100	Tots els Leucòcits
CD11b	receptor CR3	80-90	Monòcits i PMN
CD11c	p150	30-60	Macròfags i PMN
CD16	Fc γ RIII	80-90	Macròfags i PMN
CD18	cadena β de CD11a-b	95-100	Tots els Leucòcits
CD25	receptor IL-2	LGL activada	LT, LB activats
CD38	p45	60-80	LTactivats i cèl. plasmàtiques
CD54	ICAM-1	30-50	Cèl. activades
CD56	NCAM	95-100	NEC
CD57	HNK-1	50-60	NEC, LT
CD58	LFA-3	85-95	molts tipus cel·lulars
CD69	AIM, EA1	LGL activada	LB, plaquetes

CD	Antigen	% de LGL que expressen l'antigen	Altres tipus cel·lulars que expressen l'Ag
CD122	p75 receptor IL-2	70	LT, LB
HLA-DR	HLA-II	LGL activada	LB, Monocits LT activats

Aquesta barreja d'antígens de dos llinatges diferents en les LGL va fer pensar, en un principi, que podrien constituir un llinatge a part entre el Limfoide i el Mieloide [129].

7.2. Ontogènia

S'ha descrit que els timòcits contenen precursors tant de LT com de NK i el seu desenvolupament cap a un tipus cel·lular o un altre depèn del microambient en el que es duu a terme la seva maduració. Els timòcits humans purificats $CD7^+CD3^-CD4^-CD8^-$ maduren segons l'estímul de les cèl·lules productores de factors de creixement veïnes. En experiments in vivo sobre ratolins s'observa que timòcits purificats a dia 14.5 (caracteritzats fenotípicament com a $CD7^+CD3^-CD4^-CD8^-FcyR2/3^+$) i injectats en el timus es desenvolupen cap a LT madurs ($CD3^+TCR^+(\alpha/\beta)$ o (γ/ζ) , $FcyR2/3^-$), en canvi, si la injecció és intravenosa, el desenvolupament és extratímic i maduren cap a cèl·lules NK ($CD3^-CD16^+CD56^+$). Aquestes dades suggereixen que els precursors de LT i NK podrien derivar d'una subsoca fenotípicament homogènia de timòcits [124].

Hi ha forces evidències que relacionen les cèl·lules NK i els LT madurs. Ambdues tenen una activitat citotòxica mediada, al menys en part, pel lliurament de grànuls amb perforina. Els LT madurs a més a més de tenir activitat NK, poden expressar alguns marcadors típics de NK com NK1.1. Per altre banda les cèl·lules NK expressen $CD3\zeta$ i se'ls hi pot trobar una o més de les cadenes del $CD3$ intracel·lularment. Ara, també sembla clar que les NK poden reconèixer variacions polimòrfiques de les molècules MHC o dels pèptids que contenen. Com ja s'ha apuntat anteriorment la hipòtesi de treball és que les cèl·lules NK

i els LT tenen mecanismes afins però complementaris per l'eliminació de malalties o de cèl·lules infectades. Els LT reconeixen pèptids foranis associats a MHC propis i les NK reconeixen l'absència de molècules MHC no pròpies ó el desplaçament de pèptids propis per foranis. La proximitat d'aquests dos tipus cel·lulars en la ontogènia seria, probablement, un punt a favor per aquesta hipòtesi.

En base a totes aquestes consideracions s'ha proposat que els LT evolucionen de cèl·lules "NK-like" i durant l'ontogènia en animals superiors les cèl·lules NK i LT deriven d'un precursor comú, que depenent del microambient en el qual es desenvolupen aniran cap a un tipus cel·lular o un altre [130, 131].

7.3. Proliferació i diferenciació

La regulació de la proliferació de les cèl·lules NK humanes ha estat menys estudiada que en els LT ó LB. En la immunitat adaptativa es requereix l'expansió clonal dels LT o LB Ag-específic. Aquesta propietat coordina la proliferació limfocitària i és crucial per generar una resposta immune efectiva. Després de l'activació a través del seu receptor Ag-específic expressaran en la seva superfície receptors d'alta afinitat per l'IL-2, secretaran IL-2, i proliferaran de manera IL-2-depenent.

Les cèl·lules NK expressen constitutivament el receptor per a la IL-2 i poden proliferar en resposta a ella sense un estímul addicional. Aquestes cèl·lules, però, poden tenir diferent capacitat de resposta a l'IL-2. El 10% de les NK circulants expressen CD56^{+bright}, de les quals una petita quantitat són CD16⁺, aquesta subpoblació expressa el receptor d'alta afinitat per l'IL-2 i proliferen molt a dosis de pmols d'IL-2. El 90 % restant de les NK circulants expressen: l'Ag CD56 amb baixa intensitat, expressen constitutivament el receptor de l'IL-2 d'afinitat intermitja, per tant per induir l'activitat proliferativa aquestes cèl·lules necessiten concentracions més elevades d'IL-2. Amb dosis nanomolars d'aquest efector s'estimula l'activitat citolítica de les LGL CD56^{+dim} induint-els-hi però una baixa capacitat proliferativa [132].

Encara que l'IL-2 aparegui com un estímul mitogènic primari de les LGL, altres citocines regulen la seva proliferació cel·lular. Aquest és el cas de l'IL-4, IL-7 ó l'IL-12

cada un d'aquests mitògens, com la IL-2, estimulen molt més la proliferació de la subpoblació CD56^{+bright} que la CD56^{+dim} [133, 134].

7.4. Activitat citotòxica

Durant anys aquestes cèl·lules s'havien definit només per la seva funcionalitat com a limfòcits capaços de mediar la mort espontània de les cèl·lules diana. D'aquí el seu nom d'assassines naturals (cèl·lules "Natural Killer").

L'activitat citotòxica natural o "activitat natural killer" (NK) té lloc poques hores després de l'exposició a la cèl·lula diana, per tant, no precisa d'una immunització prèvia deliberada, no requereix que la cèl·lula diana expressi Ag MHC propis i no involucra una especificitat clonal. Característiques totes elles que la fan diferent a l'activitat citotòxica mediada pels Limfòcits T.

Com ja s'ha dit, però, la capacitat de matar d'aquestes cèl·lules efectores sembla ser inversament proporcional a l'expressió dels Ag MHC propis en la diana. Aquest fenomen suggereix que les glicoproteïnes MHC interactuen amb estructures de superfície de les cèl·lules NK que transduïrien una senyal negativa per la citolisis. Actualment s'han descrit varis receptors amb aquesta funció, i se'ls ha anomenat NKR o KIRs. Són, per tant, receptors inhibidors específics per determinats alels MHC, amb la capacitat de prevenir la citolisis de cèl·lules normals que expressen els antígens MHC-I propis [123].

Un dels principals estímuls de l'activitat citotòxica és l'IL-2. Aquesta citocina a més a més d'augmentar la capacitat de llisi d'aquestes cèl·lules (potenciant l'activitat NK), és capaç d'augmentar l'espectre de cèl·lules diana que aquestes són capaces de matar. A aquesta activitat citotòxica estimulada per limfoquines es coneix com activitat LAK.

7.4.1. El mecanisme citotòxic

Fins el moment s'han descrit dos mecanismes independents en la citotoxicitat mediada per cèl·lules. El primer és conseqüència de la secreció de grànuls citoplasmàtics. Aquests grànuls contenen proteïnes citolítiques i serina proteïnases que indueixen la mort cel·lular, principalment, per necrosi [135, 136].

El segon mecanisme es caracteritza per una via no secretora basada en la interacció del CD95L (l'ligand de Fas), que s'expressa en les cèl·lules NK, amb la molècula CD95 (Fas) expressada en les cèl·lules diana, la interacció dels dos receptors indueix en la cèl·lula diana la mort per apoptosi [137, 138].

- **Citotoxicitat per exocitosis de grànuls**

Es caracteritza pels següents esdeveniments:

Reconeixement de la cèl·lula diana i formació d'un conjugat:

En cèl·lules amb activitat NK aquest contacte pot ser directe entre receptors de superfície de la cèl·lula diana i l'efectora. Els principals receptors que es veuen implicats són el LFA-1 (CD11a / CD18) i el CD2 en la cèl·lula efectora i els seus lligands en la diana ICAM-1 (CD54) i LFA-3 (CD58) respectivament. També pot estar mediada per Ac que reconeixen un Ag estrany. La fracció cristallitzable de l'Ac es reconeguda pel receptor FcγRIIIA ó CD16 de la cèl·lula NK induint l'activitat citotòxica mediada per Ac ó ADCC.

Un cop s'ha format el conjugat es pot desencadenar el procés lític, això implica l'activació de la cèl·lula efectora. En el cas de l'ADCC, la cadena ζ del FcγRIIIA transduïx una senyal d'activació dins de la cèl·lula. En les activitats citotòxiques NK i LAK el CD2 podria estar implicat en l'activació del procés lític com està implicat en la fosforilació de la cadena ζ del TCR en els LT [28].

Lliurament de grànuls citotòxics:

Un cop format el conjugat, l'activació del procés lític facilita l'orientació dels grànuls citotòxics cap al lloc de contacte entre les cèl·lules. Es lliura el contingut dels grànuls per exocitosis a l'espai extracitoplasmàtic, on la concentració de Ca^{2+} augmenta gràcies a la mateixa cèl·lula efectora [139].

El contingut granular consta de: Perforina (proteïna citolítica capaç de formar porus en la membrana de la cèl·lula diana, quan els seus monòmers polimeritzen en presència de Ca^{2+}), molècules de Proteoglicà (tipus Condroitin Sulfat A, que podrien estar involucrades

en la protecció de la cèl·lula efectora de la seva pròpia llisi), i Granzimes (família de serina proteases amb capacitat per fragmentar el DNA [135].

Desencadenament de la mort cel·lular

L'obertura de porcs en la membrana de la cèl·lula diana provoca la pèrdua de l'homeostasis cel·lular així com l'entrada dels granzimes que provocaran la fragmentació del DNA. La cèl·lula acaba lliurant el seu contingut a l'espai extracel·lular, cas en el que parlariem de mort cel·lular per necrosi. També s'ha observat mort cel·lular per apoptosi en la citotoxicitat depenent del lliurament de grànuls, observant-se canvis nuclears com són la condensació de la cromatina i finalment la fragmentació del DNA per efecte dels granzimes [140].

- **Citotoxicitat “no secretora”**

Aquest tipus de citotoxicitat es va observar en estudiar determinades línies cel·lulars citotòxiques deficientes en perforina. Aquestes eren capaces d'induir la mort cel·lular sense l'exocitosis de grànuls i provocar la mort per apoptosi (mecanisme de mort cel·lular programada que s'inicia amb la fragmentació del DNA i que finalitza en la transformació de la cèl·lula en petits cossos apoptòtics, no lliurant-se al medi el contingut cel·lular) [138]. Hi ha diferents vies que desencadenen aquest mecanisme com per exemple la via del lligam de Fas.

Via del lligam de Fas:

Aquesta via es va identificar en observar que el bloqueig d'un receptor de membrana localitzat en la cèl·lula diana impedeix el desencadenament de l'activitat citotòxica. S'ha identificat el receptor com el CD95 (APO-I / Fas). Posteriorment es va detectar l'expressió del lligam de Fas (FasL/CD95L) en cèl·lules amb activitat NK purificades. La interacció d'aquests dos receptors activa una transducció de senyal que finalitza en una mort cel·lular programada o apoptosi [141]. Els mecanismes que regulen l'activitat citotòxica mediada a través d'aquesta via són poc coneguts. Se sap, però, que l'activació de l'ADCC en els llocs de la inflamació indueix l'expressió de FasL en cèl·lules NK. Les NK quiescents humanes

no expressen FasL, indueixen la mort de la cèl·lula diana a través de l'exocitosi de grànuls, quan s'estimulen a través del receptor FcγRIIIA les NK expressen en la seva membrana FasL, poden provocar la mort cel·lular per apoptosi [142].

7.4.2. Factors solubles reguladors de l'activitat citotòxica

Estudis en model animal "in vivo" han determinat l'increment de l'activitat NK per l'efecte de varis agents bacterians [143]. Els principals activadors són, però, les citocines secretaades per diferents tipus cel·lulars del Sistema Immune [28, 144]. Aquest és el cas de l'IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-12, IL-15, IL-18, GM-CSF, INFγ (Introducció, apartat 7.9.), i algunes citocines de la família de les quimiocines (Introducció, apartat 6.4.).

Altres factors actuen com inhibidors de l'activitat citotòxica. Aquest és el cas del TGFβ ó del PDGF (Introducció pàgina 12). Ambdós lliurats per les PLQ.

7.5. Reguladores de l'Hemopoesi

L'estudi de l'efecte de les NK sobre l'hemopoesi humana *in vitro* ha donat dades, fins ara, força controvertides. S'han descrit efectes tant estimuladors com inhibidors de CFU per aquestes cèl·lules. Particularment NK purificades promouen el creixement de BFU-E de sang perifèrica autòloga. A més a més sobrenadants de cèl·lules NK purificades i posades en cultiu només amb medi tenen activitat estimuladora de colònies per progenitors mieloides primerencs de sang perifèrica o de moll de l'os al·logènic. L'activació de les NK amb IL-2 o amb INFγ no incrementa aquesta activitat estimuladora de colònies però, en canvi, es veu disminuïda però no abolida neutralitzant GM-CSF amb Ac monoclonals específics.

Per altra banda estudis sobre l'efecte de diferents poblacions clonals de NK posaren en evidència que alguns clons eren capaços d'inhibir la generació de CFU-Mix , CFU-GM, BFU-E, CFU-E de moll de l'os al·logènic. Sobrenadants de clons de NK estimulades amb cèl·lules de moll de l'os normals ó amb cèl·lules diana sensibles a NK poden inhibir la formació de CFU. El factor soluble responsable d'aquesta activitat podria ser el INFγ. En canvi altres autors demostren la manca d'efecte inhibidor en la formació de colònies de NK

policlonals CD16⁺ autòlogues. La causa d'aquestes discrepàncies podrien ser els diferents estats d'activació dels efectors NK, ja que els clons NK requereixen d'una estimulació continua per la seva propagació [28].

El que sí sembla clar és que les cèl·lules NK poden afectar el creixement de progenitors hematopoètics humans *in vitro*. Sota diferents condicions experimentals les cèl·lules NK poden secretar factors solubles amb activitat estimuladora o inhibidora [145].

7.6. Eliminació de cèl·lules neoplàssiques

S'ha demostrat que les cèl·lules amb activitat NK poden inhibir el creixement de tumors malignes "*in vivo*" sota condicions experimentals. Però és molt més difícil demostrar que les NK estan involucrades en la vigilància immune contra tumors autòlegs espontanis. Les evidències indirectes sobre pacients deficients en les funcions de les cèl·lules NK, però amb funcions relativament normals dels LT i LB, demostren una particular susceptibilitat a desordres limfoproliferatius malignes. A més a més varis estudis retrospectius documenten una anormal funció NK en pacients amb diferents tumors malignes [28].

7.7. Cèl·lules presentadores d'antigen

També s'ha demostrat que les cèl·lules NK tenen la capacitat per actuar com a APC estimulants la resposta de LT Ag-específics restringits per MHC. Tenen la capacitat d'internalitzar, processar i presentar Ag a LT CD4⁺. La subpoblació de cèl·lules NK amb aquesta funció es caracteritza per l'expressió de HLA-DR (HLA de classe II). Així, factors capaços de potenciar l'expressió de HLA-DR en aquestes cèl·lules, com l'IL-2, potencien la seva capacitat per actuar com a APC [146].

7.8. Efectes en el trasplantament al·logènic del moll de l'os.

El trasplantament de moll de l'os proporciona un tractament curatiu per alguns pacients amb malalties malignes hematològiques. Aquest tractament permet la utilització de quimioteràpia i radioteràpia en dosis elevades fins arribar a l'aplassia del pacient.

Posteriorment es realitza el trasplantament de precursors hematopoètics d'un donant compatible, el que permet la regeneració d'una hemopoesi no maligna.

En els pacients que reben un trasplantament al·logènic de moll de l'os, s'ha observat que les cèl·lules del donant tenen un important paper en el control de cèl·lules malignes de l'hoste. A més a més els pacients que reben un moll d'os menys histocompatible recidiven amb menys freqüència que pacients amb un TMO més homòleg. Aquest efecte beneficiós de l'empelt contra la leucèmia és l'anomenat GVL.

En canvi l'efecte de la malaltia de l'empelt contra l'hoste (GVHD), que es refereix a la malaltia que es deriva de la reacció de rebuig que tenen les cèl·lules del donant contra les de l'hoste, és molt més severa. Malauradament hi ha una relació directe entre els dos efectes, es a dir, quant major és l'efecte GVL més sever és el GVHD.

La deplecció de cèl·lules T del molls de l'os al·logènic pot prevenir el GVHD això, però, està associat a una major probabilitat de recaiguda [28].

Estudis de laboratori indiquen que les NK podrien tenir, també, un efecte GVL [147]. Similar als efectes trobats en progenitors primerencs mieloides normals, cèl·lules NK no estimulades poden inhibir el creixement de cèl·lules tumorals clonogèniques de pacients amb leucèmies mieloides. A més a més, s'ha demostrat que les NK es recuperen ràpidament després del TMO, representant la major part de limfòcits de sang perifèrica les primeres setmanes després del trasplantament [28, 148].

Aquests estudis suggereixen que cèl·lules NK del donant podrien tenir un efecte beneficiós en el TMO al·logènic, però altres evidències demostren que podrien ser potencials efectors capaços de mediar el GVHD. Mentre que als LT, com ja s'ha dit, se'ls involucra com a causa primària del GVHD, les NK podrien ser les encarregades de reclutar aquests limfòcits en el lloc de la lesió a través de la producció de citocines proinflamadores com l'IL-1 β ó el TNF α .

S'especula que l'efecte beneficiós o perjudicial de les NK en el TMO al·logènic dependria del seu grau de diferenciació així com del seu estat d'activació [149]. Recolzant aquesta idea es va observar que cèl·lules amb activitat LAK tenen capacitat per suprimir

l'al·loreactivitat, suprimint així la generació de GVHD. Aquestes són les anomenades cèl·lules amb activitat VETO [150].

7.9. Moduladors de la resposta immune que regulen ó lliuren les NK.

Moltes de les funcions promogudes per les NK venen mediades per l'alliberament de factors moduladors, principalment de citocines.

- **Interleuquina 1 (IL-1):**

S'han descrit dues formes d'IL-1: la α i la β . Tenen una activitat biològica similar encara que no són gaire homòlogues. Són molt nombrosos els tipus cel·lulars que secreten una o les dues formes, així com són nombrosos els tipus cel·lulars sobre els quals actuen, induint diferents efectes [151]. Joga un paper destacat en la resposta immunològica i inflamatòria: incrementa la permeabilitat vascular, és quimiotàctic per leucòcits [152], incrementa l'adherència i activació de PMN, Mo i limfòcits, promou la producció de prostaglandines [153]. És sinèrgic amb l'IL-2 i l'INF γ en l'activació citotòxica limfocitària [154].

- **Interleuquina 2 (IL-2):**

L'IL-2 provoca en les cèl·lules NK un increment en la capacitat lítica tant a nivell quantitatiu com qualitatiu. Potencia la capacitat lítica d'aquestes cèl·lules incrementant l'activitat NK, i amplia l'espectre de cèl·lules diana sensibles a la llisi, induint, l'activitat LAK. Si bé la majoria de cèl·lules amb activitat LAK són les que posseïen prèviament activitat NK, n'hi ha que per efecte de l'IL-2 expressen activitat lítica de novo [155, 156].

Aquestes cèl·lules en tenir un ampli espectre de cèl·lules diana i una activitat citotòxica important, han estat utilitzades en tractaments immunoteràpics contra tumors. L'administració d'IL-2 a pacients pediàtrics de Neuroblastoma estadi IV provoca l'increment de l'activitat citotòxica NK i indueix activitat LAK. Aquest tractament incrementa la supervivència lliure de malaltia en aquest tipus de pacients [157].

Els resultats publicats sobre l'efecte de l'IL-2 en l'activitat ADCC són força controvertits [101, 158]. S'han detectat diferències en l'efecte d'aquesta citocina sobre

l'activitat ADCC segons l'estat de maduració ó l'activació de les cèl·lules. Així, cèl·lules NK obtingudes de sang de cordó umbilical veuen potenciada la seva activitat ADCC per efecte de l'IL-2, mentre que NK de sang perifèrica d'adult aquesta citocina no és capaç d'incrementar l'ADCC [159].

- **Interleuquina 4 (IL-4):**

L'IL-4 és un potent inhibidor de l'activitat LAK [160]. IL-4 i IL-12 tenen un efecte sinèrgic tant en la regulació de la producció de citocines [161], com en la regulació de la capacitat proliferativa [162].

- **Interleuquina 6 (IL-6):**

Diferents tipus cel·lulars tenen capacitat per sintetitzar aquesta citocina com LT, LB, Mo, fibroblastes, cèl·lules endotelials i varis tipus de tumors. Les seves funcions també són molt variables: activen la proliferació i la síntesi de citocines en timòcits [9]. Incrementa l'activitat citotòxica NK, per una via diferent a l'IL-2 sense estimular la proliferació d'aquestes [163].

- **Interleuquina 7 (IL-7):**

A aquesta citocina se li defineix la seva activitat principalment dins del sistema hematopoètic. A les cèl·lules CD56⁺ els indueix una activitat comparable a l'IL-2 amb qui pot actuar sinèrgicament [164].

- **Interleuquina 8 (IL-8):**

Proteïna de 8 Kdaltons que pertany a la família de les quimiocines. La sintetitzen Mo, NK, PMN i LT. La seva producció pot ser induïda per diferents estímuls, especialment per l'acció de l'IL-1 i el TNF α (Introducció, apartat 6.1.1).

- **Interleuquina 10 (IL-10):**

Es va identificar inicialment com a producte de secreció de LTh2 amb capacitat per inhibir la síntesi de citocines com el INF γ , en LTh1 i en NK. Posteriorment s'ha demostrat,

però, que a baixes dosis l'IL-10 potencia l'activitat proliferativa i citotòxica induïda per l'IL-2 sobre les NK [165].

- **Interleuquina 12 (IL-12):**

És una citocina heterodimèrica produïda per la major part de cèl·lules fagocítiques en resposta a diferents estímuls proinflamatoris. Actua com a factor de creixement de cèl·lules NK activades, els incrementa la capacitat citotòxica i indueix el lliurament de $\text{INF}\gamma$ en aquestes cèl·lules. Indueix l'expressió de marcadors d'activació com el CD69 i CD25, incrementa l'expressió de molècules d'adhesió com CD2, CD54, CD56, i d'altres facilitant així l'adhesió, la migració i la citotoxicitat. L'IL-12 comparteix, doncs, algunes de les propietats de l'IL-2 en l'activació de les NK [166]. Actua també com a factor de creixement de limfòcits T, facilitant la proliferació d'aquestes en resposta a un antígen específic. Els hi indueix, també, la capacitat de síntesi de citocines. Totes aquestes funcions fan que l'IL-12 hagi estat considerada com un pont funcional entre la resposta innata no específica i la immunitat adaptativa Ag-específica [6].

- **Interleuquina 15 (IL-15):**

Citocina amb característiques similars a l'IL-2 en especificitat amb el receptor i activitat biològica. La produeixen per macròfags activats amb diferents estímuls proinflamatoris. Com l'IL-12, l'IL-15 és un potent inductor de la producció de citocines proinflamatòries en les NK, com l' $\text{INF}\gamma$, $\text{TNF}\alpha$ i GM-CSF, així com β -quimiocines com el MIP-1 α i MIP-1 β [167].

- **Interleuquina 18 (IL-18):**

Citocina produïda, com en el cas de l'IL-12 i l'IL-15, per macròfags activats. Té variis efectes sobre les NK: els hi indueix l'expressió d' $\text{INF}\gamma$ i estimula l'activitat citotòxica a través de diferents mecanismes. Activa l'expressió del lligam de Fas (Fas-L), i estimula l'activitat citotòxica no dependent del lligam de Fas. També estimula diferents funcions sobre LT i LB però a diferència de les NK, no expressen el receptor per aquesta citocina de forma constitutiva [168].

- **Interferons (INF):**

Família de proteïnes amb una reconeguda funció antivírica. Hi ha tres classes principals d'INF: els que indueixen un efecte sobre leucòcits ó $INF\alpha$, els que tenen efecte sobre les fibroblastes ó $INF\beta$ i els implicats en les funcions dels limfòcits ó $INF\gamma$.

Les cèl·lules productores d'INF són els LT i les NK. Les NK produeixen $INF\gamma$, principalment quan s'estimulen amb IL-2, IL-12 [169], ó a través de l'activació de receptors com el CD16 ó el CD94. Els seus efectes són variats: indueixen l'expressió de MHC-I, -II. Regulen la producció de citocines com l'IL-1, IL-2 ó $TNF\alpha$. La seva funció està mediada pel reconeixement d'un dels dos receptors específics amb els que pot interactuar, i que no comparteix amb els $INF\alpha$ ó β . A nivell fisiològic, les infeccions virals i parasítiques estan fortament associades a la producció d' $INF\alpha$ i β , així com de la producció d' $INF\gamma$ per part de les NK .

En les cèl·lules NK hi ha evidències experimentals de que molts dels efectes promoguts per l'IL-2, en determinats casos, podrien estar mediat per l' $INF\gamma$, entre els quals es troba la generació de l'activitat LAK. Els altres dos INFs si bé poden també augmentar l'activitat LAK ho farien a través d'una via diferent de l'IL-2 i l' $INF\gamma$ [144, 170, 171].

- **Factor estimulator de la formació de colònies grànulo-macrofàgiques (GM-CSF):**

És una proteïna glicosilada amb un pes molecular de 14-35 Kdaltons. Els tipus cel·lulars descrits com productors d'aquesta citocina inclou les NK, els LT, cèl·lules endotelials i Mo. Les NK produeixen aquesta citocina per efecte de l'IL-2 ó l'IL-12. A més a més de la seva capacitat d'estimular la proliferació i maduració de colònies grànulo-macrofàgiques de precursors hematopoètics, desencadena molts efectes biològics tots ells centrats en PMN i Mo: els hi indueix activitat quimiotàctica, els hi incrementa la seva capacitat fagocítica, i la producció d'IL-1 i TNF per part dels Mo [46,145].

En treballs realitzats en el nostre laboratori (dades no publicades), pacients tractats amb GM-CSF després d'un trasplantament de moll d'os, els hi incrementa l'activitat LAK però no l'activitat NK.

- **Factor de necrosi tumoral (TNF):**

Hi ha descrites, també, dues formes diferents: l' α i la β . El TNF α està produït per Mo, LT, LB, i NK. El TNF β està produït per LT activats i cèl·lules NK. Hi ha diferents estímuls que poden activar les cèl·lules NK a produir TNF α com són l'IL-2, IL-12 o estímuls a través del receptor CD16 o del CD94 [161].

S'han descrit nombrosos efectes biològics mediat pel TNF: activa els fibroblastes tant a créixer com a alliberar IL-6 i PGE₂. A les cèl·lules endotelials els hi indueix l'expressió de l'Ag MHC i de molècules d'adhesió, així com l'alliberament d'IL-1, modula les seves propietats hemostàtiques i els hi modifica la seva morfologia i capacitat proliferativa. Activa també neutròfils i eosinòfils. Comparteix moltes propietats amb l'IL-1, essent ambdós importants mediadors de les respostes immunològiques i inflamatòries. Incrementa la resposta immunològica dels LT i les capacitats citotòxiques dels Mo i cèl·lules NK. El mateix factor és directament citostàtic ó citolític sobre cèl·lules canceroses [9, 28] .

- **Factor de creixement transformant (TGF- β):**

El TGF- β 1 inhibeix la proliferació i lliurament de citocines en els cultius de cèl·lules NK, així com provoca la disminució de l'activitat citotòxica, d'acord amb el seu paper de citocina supressora de les fases inicials de la resposta immune. Per altra banda, cal assenyalar que, a més a més de les plaquetes, les cèl·lules NK no estimulades produeixen quantitats bassals de TGF- β i TGF- β 1. En canvi, cèl·lules NK estimulades amb IL-2 ó IL-12 disminueixen lleugerament el RNAm del TGF- β 1 [46].

- **Les quimiocines:**

Les quimiocines tenen un paper central en la migració i localització dels LT i LB "in vivo" [172, 173], el que va fer pensar que aquests factors podessin tenir un efecte similar en la biologia de les cèl·lules NK.

El primer fenomen que va corroborar aquesta idea és la diferent expressió dels receptors de les quimiocines en les diferents subsoques de cèl·lules NK, CD56^{+brigh} i

CD56^{dim} [174], també es va observar diferències en l'expressió de les molècules d'adhesió en aquestes cèl·lules [174, 175].

Aquests resultats van suggerir que aquestes dues subsoques de cèl·lules NK podrien tenir una diferent localització in vivo. Així, per exemple, els elevats nivells d'expressió de CCR7 i L-selectina en les cèl·lules NK CD56^{brigh} podria dirigir aquestes cèl·lules als òrgans limfàtics secundaris [174-176]. Com que aquestes cèl·lules produeixen grans quantitats de INF γ i altres citocines després de la seva activació [132, 177] podrien regular l'activació de LT i LB en aquests òrgans. En canvi CD56^{dim} no expressen ni CCR7 ni L-selectina però expressen LFA-1 i d'altres molècules d'adhesió [174, 175], probablement aquestes cèl·lules es localitzen en teixits perifèrics no limfàtics. Quan aquestes cèl·lules s'activen expressen CCR7 el que podria promoure la seva migració als òrgans limfàtics després d'un estímul inflamatori en els teixits perifèrics.

Les quimiocines també poden regular l'activitat citolítica de les cèl·lules NK regulant la seva resposta a tumors ó a patògens infecciosos. Així, s'ha demostrat que quimiocines com el MCP-1, MIP-1 α , IP-10 ó fractalquina tenen la capacitat per promoure el lliurament de grànuls citotòxics [101, 108, 178]. Per altra banda, algunes quimiocines de la família CC augmenten la citotoxicitat induint la redistribució de les molècules d'adhesió en la superfície de les cèl·lules [179]. Pel que fa la proliferació cap de les quimiocines que han estat testades tenen capacitat per estimular la proliferació de cèl·lules NK purificades i quiescents [133].

TAULA 3. Citocines alliberades per les cèl·lules NK.

Citocina	Estímul	Referència
IL-1	IL-2	[180]
IL-3	IL-2	[145]
IL-5	IL-4, IL-5	[161]
IL-6	LPS	[143]

IL-8	IL-2, CD16	[181]
IL-10	IL-2, IL-12, IL-15, IL-18	[167, 182]
IL-13	IL-2	[183, 184]
INFγ	IL-2, CD16, IL-12, IL-15, IL-18	[102] [185] [167]
GM-CSF	IL-2, CD16 IL-12, IL-15, IL-18	[145] [167]
TNFα	IL-2, CD16 Interacció diana IL-12, IL-15, IL-18	[102] [186] [167]
TGFβ	Lliurament basal	[46]
MIP-1β, RANTES	Lliurament basal	[133, 179]
MIP-1α, -1β, RANTES, IL-8,	IL-12, IL-15, IL-18 Interacció diana	[167] [133, 179]

8. TRANSDUCCIÓ DEL SENYAL

Fins ara s'han descrit les principals funcions que duen a terme les cèl·lules NK així com els mecanismes fisiològics on es veuen implicades. També s'han anomenat alguns dels principals factors responsables de la regulació d'aquestes funcions. En general se sap poc, però, sobre quins són els mecanismes activats per aquests factors dins de la cèl·lula o les vies de transducció de la senyal, que, en últim terme, seran les responsables de que es desenvolupi una determinada funció cel·lular.

Ens centrarem en les vies de transducció de la senyal que es desencadenen en les NK com a resultat del reconeixement de la cèl·lula diana i de la interacció de l'IL-2 amb el seu receptor.

8.1. Transducció del senyal associat al reconeixement de la cèl·lula diana

Dels mecanismes citotòxics, on més s'ha estudiat la regulació és en aquells que desencadenen, en últim terme, l'exocitosis de grànuls. Les activitats ADCC i NK varien en el mecanisme de reconeixement de la cèl·lula diana, però ambdós mecanismes poden desencadenar la mateixa funció biològica, el lliurament de grànuls citotòxics.

8.1.1. Mecanismes responsables de l'activitat citotòxica natural

- **Receptors implicats**

No està clar encara quins són els receptors directament responsables de desencadenar aquest mecanisme, algunes de les molècules que s'ha proposat que podrien estar implicades són molècules d'adhesió com la β_1 i β_2 integrines i proteïnes de membrana com el CD2, CD69, KAR, NK-TR, NKR-P1 [28, 187].

Donat el número de receptors en les NK que són candidats per ser els desencadenants de l'activitat NK i, per altre banda, el gran rang de cèl·lules diana sensibles amb diferents lligams, s'ha suggerit que les interaccions receptor-lligam involucrades podrien ser relativament específiques per cada combinació efector-diana. Per tant, són determinants per a la inducció d'activitat citotòxica la presència o absència d'un determinat receptor en la cèl·lula NK, o de l'expressió o no d'un lligam en la cèl·lula diana, o fins hi tot la distribució adequada d'aquestes proteïnes en la membrana cel·lular. Així, per exemple, s'ha descrit que β_2 -integrina (LFA-1) es capaç de desencadenar l'activitat citotòxica pel reconeixement en la cèl·lula diana d'una redistribució del lligam ICAM [188, 189].

- **Vies de transducció de la senyal**

La primera via que es va descriure associada a l'activitat citotòxica natural, involucrava l'activació d'una fosfolipasa C (PLC), de la protein quinasa C (PKC) i un increment transitori de Ca^{2+} intracitoplasmàtic [190]. Posteriorment es va demostrar que estimuladors de les proteïnes G com el $\text{GTP}\gamma\text{S}$ també eren capaços de potenciar l'activitat

NK. Finalment, la utilització conjunta d'activadors d'aquests enzims va provocar un efecte sinèrgic en el lliurament de grànuls [191].

Però no totes les senyals mediades per aquesta via podien explicar tots els fenòmens moleculars que s'anaven descrivint com a reguladors de les reaccions citotòxiques en les NK. L'evidència de que molts dels mecanismes relacionats com l'activació del receptor FcεRI, l'activació dels LT a través del CD3/TCR, l'activació a través de la IL-2, etc.. tenien com a mecanisme primerenc la fosforilació de diferents proteïnes en residus tirosina (Tyr) [192], va fer pensar en la possible implicació de fosfotirosin quinases (PTK) en la regulació de la inducció de l'activitat citotòxica. Posteriorment es va demostrar la implicació d'aquestes proteïnes, ja que inhibidors de PTK com la Herbemicin A ó la Genisteina eren capaços de inhibir l'activitat citotòxica natural [193, 194].

- **Principals enzims i missatgers secundaris:**

- a) La fosfolipasa C (PLC) i la Protein Kinasa C (PKC)**

Les PKCs constitueixen una gran família d'enzims que poden ser activats per la major part de missatgers secundaris. Es poden subdividir en 3 grans grups: la família de PKCs que per ser activades requereixen Ca^{2+} i diacilglicerol (DAG), les que només precisen DAG, i les que no s'activen amb cap d'aquests missatgers secundaris. També són variats els mecanismes que indueixen aquests missatgers secundaris: l'activació de la PLC provoca la hidròlisi de fosfatidil inositol bisfosfat (PIP₂) en DAG i inositol trisfosfat (IP₃). Aquest mecanisme és capaç d'activar el primer grup de PKCs. La hidròlisi de fosfatidilcolina per part de PLC ó fosfolipasa D (PLD) produeix únicament DAG capaç d'estimular el segon grup de PKCs. Finalment, l'activació del tercer grup pot ser dut a terme per fosfatidil inositols (3,4,5) trisfosfat (PI (3,4,5) P₃).

És però força complexa el conèixer en cada sistema estudiat quins són exactament els isoenzims de PKC implicats degut a l'elevada promiscuïtat d'aquests enzims, tant pel que fa als activadors com als seus substractes [195].

Se sap que les PKCs tenen 2 dominis, un domini regulador que interacciona amb el Ca^{2+} , la fosfatidilserina, i el DAG, i un domini catalític que uneix ATP.

L'estimulador més utilitzat dels enzims PKCs és el "phorbol myristate acetate" (**PMA**). Els esters de phorbol són inductors més potents que el DAG en l'activació de la PKC. Ambdós interaccionen amb l'enzim en el mateix lloc, però se sap que el DAG, a diferència dels esters de phorbol, és ràpidament metabolitzat [196]. Ha estat descrit que cèl·lules NK estimulades amb PMA incrementen la capacitat d'exocitosi de grànuls, i per tant l'activitat citotòxica [191].

Com a inhibidors s'ha utilitzat la **staurosporine (Stau)** i el **GF 109203X (PKCi)**. La staurosporine és un alcaloïd microbià amb capacitat per bloquejar el domini catalític d'aquestes quinases, és un inhibidor molt potent però poc selectiu, inhibeix també proteïnes dependents d'AMPc i algunes PTKs. L'inhibidor GF 109203X és un compost estructuralment relacionat amb la staurosporine, té un potencial inhibidor semblant però és molt més selectiu. Inhibeix les PKCs també a través del domini catalític. El fet de que aquests compostos inhibeixin aquests enzims a través de la subunitat catalítica i no de la reguladora fa que probablement tinguin una eficiència semblant per cada un dels isoenzims [197].

b) Protein Tirosin quinases (PTK)

Constitueixen una família d'enzims amb una elevada diversitat estructural. Tenen un domini catalític conservat que els determina com a membres d'aquesta família. Les PTKs són transmissors biològics amb capacitat per rebre, processar i amplificar un senyal. Es poden classificar en diferents subfamílies. N'hi ha que són receptors de factors de creixement, com és el cas del receptor del FGF, del EGF, del PDGF, ó de la insulina. Altres PTKs són proteïnes citoplasmàtiques com la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3-K), aquestes també s'han classificat en 4 subclasses, famílies: FES, SRC, ABL i JAK [198].

Per una primera aproximació sobre la implicació d'aquests enzims en els processos estudiats es van utilitzar, també, inhibidors més o menys específics de seu efecte. Com és el

cas de la **genisteïna**, potent però poc selectiu [199]. També s'ha valorat l'efecte del **Wortmannin**, metabòlit fúngic que específica i irreversiblement inhibeix l'activitat de la PI3-K a concentracions nanomolars. La PI3-K es compon d'una subunitat reguladora de 85 kD i una catalítica de 110 kD, sobre la qual actua el wortmannin [200].

c) Les Proteïnes G

Diferents receptors, com els de moltes hormones, catecolamines o la major part de quimiocines, en interaccionar amb el seu lligam activen un grup de proteïnes anomenades proteïnes G per la seva capacitat d'unió a GTP. Aquestes proteïnes regulen diferents enzims i canals iònics. Les proteïnes G constitueixen, per tant, un pas primerenc en les vies de transducció del senyal. Aquestes proteïnes estan formades per 3 polipèptids, una subunitat α que s'uneix i hidrolitza GTP, una subunitat β i una γ que formen un dímer que només es dissocia quan les proteïnes estan desnaturalitzades [201].

S'ha estudiat la funció d'aquestes proteïnes, principalment, sobre canals iònics com els transportadors de Ca^{2+} , K^{+} i Na^{+} , i sobre enzims com l'adenilat ciclasa o la fosfodiesterasa. L'adenilat ciclasa és un enzim unit a la membrana plasmàtica que sintetitza AMPc del substracte ATP. Es coneixen 8 isoformes d'aquest enzim en mamífers, la major part de les quals estan regulades per proteïnes G i Ca^{2+} . Tots els receptors que actuen via AMPc estan acoblats a proteïnes G estimuladores (Gs) les quals activen l'adenilat ciclasa incrementen els nivells d'AMPc. L'AMPc és un important mediador secundari que pot variar en pocs segons, després d'un estímul, fins a 20 vegades la seva concentració dins de la cèl·lula.

Hi ha diferents tipus de subunitats α agrupades en classes segons la seva funció. També s'ha descrit diferents tipus de subunitats $\beta\gamma$. Així, per exemple, les proteïnes G de tipus s (Gs) contenen una proteïna α de la classe s (α_s) com són α_s o α_{olf} , entre d'altres, la toxina colèrica té la capacitat de modificar l'activitat específicament d'aquesta família de proteïnes G. En canvi, la toxina pertússica és un inhibidor de les proteïnes Gi [202].

La toxina colèrica és un enzim que catalitza la transferència d'ADP ribosilat a la subunitat α de les proteïnes G_s. Aquest ADP ribosilat altera la subunitat α implicant la hidròlisi del GTP unit això provoca el manteniment de l'estat actiu de la proteïna estimuladora

indefinidament l'adenilat ciclase, el resultat, és un augment en els nivells d'AMPc. La toxina pertússica catalitza la ribosilació de l'ADP de la subunitat α de les proteïnes G_i prevenint que la subunitat interactiu amb el seu receptor [103, 203].

Se sap que les proteïnes G poden activar, també, la PLC_β però no la PLC_γ [204, 205].

TAULA 4. Les proteïnes G

Proteïna G	Classe de α	Modifica la seva funció	Algunes funcions
Proteïnes G_s	α_s	Toxina col·lèrica	(+) Adenilat Ciclase, regula canals de Ca^{2+}
Proteïnes G_i	α_i	Toxina pertússica	(-) Adenilat Ciclase, regula canals de Ca^{2+} i K^+
Proteïnes G_q	α_q		(+) PLC_β

d) Ca^{2+}

És l'element de transducció del senyal més comú en les cèl·lules. Els nivells de Ca^{2+} intracel·lulars són d'aproximadament 100 nM, 20.000 cops per sota de la concentració de 2 mM que hi ha a l'exterior de la cèl·lula. Gràcies al gran nombre de proteïnes amb una gran afinitat pel Ca^{2+} aquest pot ser un missatger secundari extremadament localitzat. Difon més lentament que el que caldria esperar per la seva força iònica, i s'ha demostrat que el grau de difusió també depèn del grau de saturació de les proteïnes que duen Ca^{2+} .

La transducció del senyal mediada pel Ca^{2+} està associada a diferents mecanismes que introdueixen pulsos de Ca^{2+} en el citosol amb aquesta finalitat. Aquest pot provindre dels dos grans continguts l'espai extracel·lular o del reticle endoplasmàtic. Els responsables directes solen ser els Inositols-1,4,5-trifosfat (IP_3) [206].

En la **figura 1** s'ha representat una aproximació al mecanisme de transducció del senyal d'acció d'aquests missatgers secundaris. És força establerta la implicació en la mateixa via de missatgers com les Proteïnes G, la PLC_β , el Ca^{2+} i la PKC.

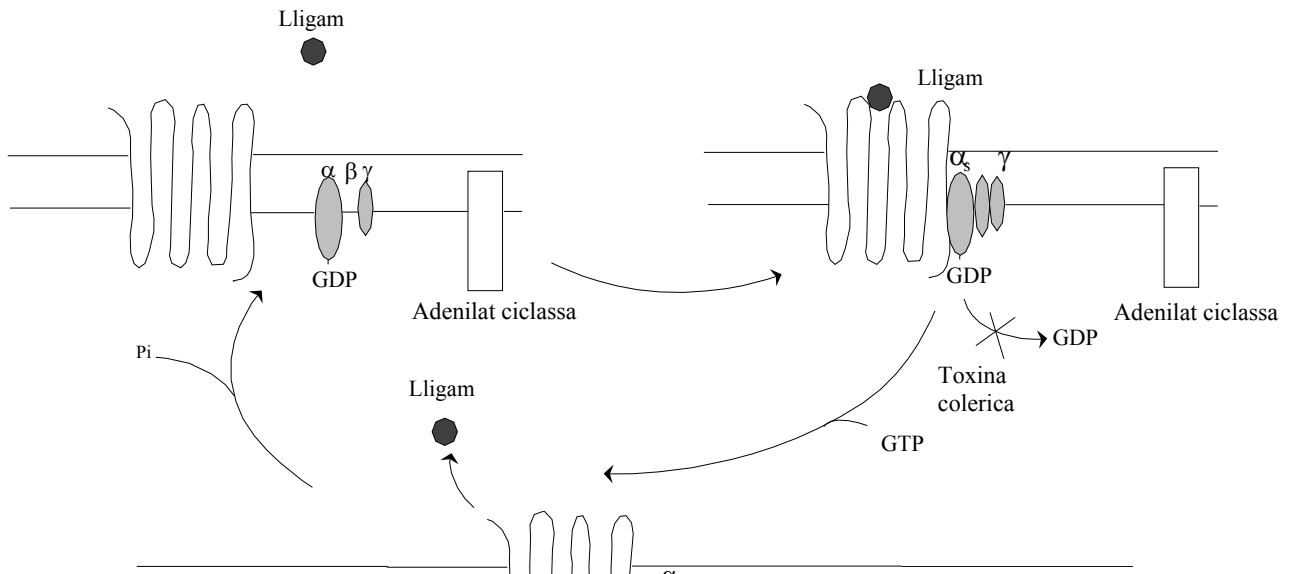


Figura 1. Aproximació a dos dels possibles mecanismes d'acció de les Proteïnes G. Aquestes proteïnes es van descriure inicialment associades a receptors de 7 segments de transmembrana, poden activar la PLC_{β} que provoca la hidròlisi de PIP_2 en DAG i IP_3 . El DAG estimula la PKC, mentre que els IP_3 són els responsables de l'obertura de canals de Ca^{2+} . L'altre mecanisme el desencadenen les proteïnes G_s que en activar-se unint GTP activen l'enzim adenilat ciclassa, capaç d'hidrolitzar ATP per produir AMPc.

8.1.2. Mecanismes desencadenats en l'activitat ADCC

- **Receptor implicat, FcγRIIIA**

A diferència de la pobre definició que es té sobre les interaccions lligam-receptor en l'activitat citotòxica natural, en l'ADCC la interacció del receptor (FcγRIIIA) amb el seu lligam (fracció cristalitzable de les immunoglobulines) és l'estímul responsable del desencadenament d'aquest mecanisme citotòxic .

El FcγRIIIA és un receptor multimèric que pot estar compostat per 3 proteïnes diferents:

III α : és una glicoproteïna de transmembrana que conté un domini d'unió extracel·lular.

III α γ / III α ζ : són les subunitats de transmembrana responsables de l'ensamblatge i la transducció de la senyal d'aquest receptor. Aquestes dues cadenes són membres d'una família de proteïnes homòlogues, que es localitzen en aquest receptor en forma d'homo o heterodímers, així, podem trobar receptors: γ - γ , ζ - ζ i γ - ζ . La cadena ζ va ser identificada inicialment com un component del complex TCR. En els LT aquesta subunitat es requereix per l'expressió i la integritat funcional del TCR, conté una cua intracitoplasmàtica de 113 aa que es fosforila en els residus Tyr en resposta al reconeixement antigènic del complex TCR. Per analogia això va fer pensar que la transducció de la senyal desencadenada a través del CD16 també podria estar mediada per aquesta cadena ζ [207, 208].

- **Transducció del senyal, principals enzims implicats.**

La fosforilació de diferents proteïnes en residus tyr ha demostrat ser un mecanisme central en la senyal iniciada a través d'aquest receptor Fc. Malgrat que es coneixen moltes proteïnes activades per efecte de la interacció amb aquest receptor hi ha forces incògnites encara sobre el mecanisme global que es desencadena [209].

En interaccionar la Fc d'una Ig les cues intracitoplasmàtiques de les cadenes ζ i γ d'aquest receptor es fosforilen en els residus Tyr. Se sap que aquest receptor no té activitat enzimàtica intrínseca i es va demostrar en 1993 que la cadena ζ i/o la γ interaccionen directament amb una PTK de la cèl·lula, la p56^{lck}, una quinasa de la família src. La p56^{lck} interacciona amb un altre PTK, la fosfatidil-inositol 3-quinasa (PI3-K) [210].

L'enzim PI3-K és un heterodímer compost per una subunitat catalítica p110 i una reguladora p85. L'activació d'aquest enzim indueix la fosforilació de fosfoinositols en la posició 3 donant lloc a molècules com: PI3-P, PI(3,4)-diP, PI(3,4,5)-triP [211]. Aquests fosfoinositols són diferents dels generats per la via de la PLC. S'ha demostrat la seva implicació com a missatgers secundaris en processos relacionats amb canvis en el citoesquelet i la regulació del transport vesicular [200].

En l'ADCC, com en el cas de l'activitat citotòxica NK, s'ha observat la implicació de les proteïnes G en la transducció del senyal, com es demostra per l'efecte inhibidor que provoca la toxina colèrica [203]. Per altre banda també s'ha detectat un increment transitori de Ca^{2+} intracitoplasmàtic [125].

Alguns dels possibles mecanismes i enzims implicats en el desencadenament de l'ADCC es representen en l'esquema de la **figura 2**. Aquest model és semblant al que s'ha proposat per explicar les vies de transducció del senyal implicades en l'activació del TCR dels LT.

Tant la citotoxicitat natural com l'ADCC tenen implicats mecanismes de transducció del senyal dependents de la fosforilació en Tyr, però, diferents observacions fan evidents que els dos mecanismes tenen vies de regulació diferents: La realització d'un patró de fosforilació d'aquestes cèl·lules, estimulades per un mecanisme o un altre, demostra que les proteïnes implicades en cada un d'aquests processos no són les mateixes [200, 212]. A més a més ratolins deficientes en Lck i Fyn, proteïnes de la família src, no tenen cap anormalitat en l'activitat citotòxica NK i sí en l'ADCC. El fet de que la carència d'aquests enzims no dificulti l'activitat NK en ratolins va fer pensar en un possible mecanisme alternatiu, o bé en que l'activació de la cadena tingués lloc a través d'un altre membre de la família src (com per exemple Lyn) [213].

Ambtot, el desencadenament de l'activitat citotòxica ADCC, NK i també en la desencadenada pels LTc, s'inicia amb la formació d'un conjugat efectora-diana i provoca, en últim terme, el lliurament direccional dels grànuls citolítics en el lloc de interacció del conjugat. Per tant, l'activació de la cèl·lula efectora, ha de desencadenar la reorganització del citoesquelet d'actina per facilitar el desplaçament d'aquests grànuls. Les proteïnes d'unió a GTP anomenades GTPases, entre elles les proteïnes Rho, tenen com a funció principal aquesta reorganització del citoesquelet, havent-se demostrat en ambdós tipus cel·lulars la seva implicació. Finalment sembla que la proteïna pont entre les proteinquinases, com la PI3-K, i les proteïnes Rho podria ser VAV. Aquest enzim forma part d'una família que té com a característica fonamental la presència de multidominis que els hi confereix la capacitat per interaccionar amb diferents proteïnes de transducció de

senyal. En aquest cas VAV s'activa en interaccionar amb PI3-P, sintetitzats per PI3-K, i adquireix la capacitat per catalitzar l'intercanvi GDP-GTP en les Rho. **Figura 2**

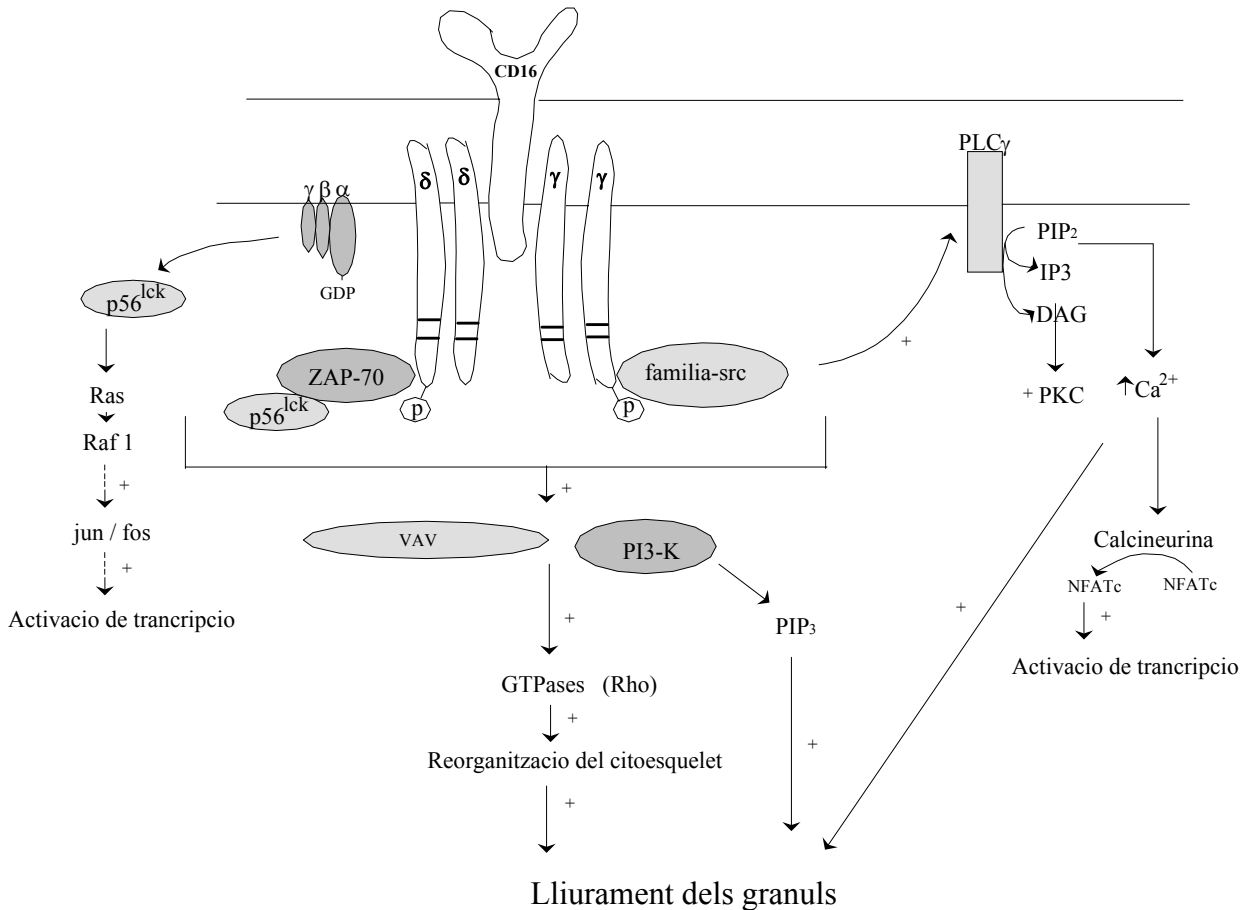


Figura 2. Representació esquemàtica dels possibles mecanismes de transducció del senyal que poden estar implicats en el desencadenament de l'efecte a través del FCγRIIIA (Leibson P., *Immunity* 6, 655-661, 1997)(Kurana D. et. al. *J. Leuk. Biol.* 73, 333-338, 2003).

El reconeixement d'una diana implica, tant en l'activitat NK com en l'ADCC, un l'increment de Ca²⁺ intracel·lular i el lliurament de inositols fosfat, mentre que en els mecanismes primerencs té lloc l'activació transitòria d'una PTK, Syk. La manca d'efecte o d'expressió d'aquest enzim inhibeix la citotoxicitat natural així com l'ADCC [213].

En últim terme, però, el que determinarà la funció d'una cèl·lula NK que ha interaccionat amb una cèl·lula diana estarà mediat per un balanç de senyals positives i negatives transmeses. Les senyals positives generades durant la citotoxicitat natural inclouen

l'activació de PTKs, increment en inositols fosfat i l'augment de Ca^{2+} intracel·lular. Les senyals negatives estan derivades, al menys en part, per protein-tyr-fosfatasa (PTPase) SHP-1 associats amb els receptors de reconeixement dels MHC en les cèl·lules NK, els KIR [123].

8.2. Transducció del senyal mediat per l'IL-2.

- **Receptor implicat**

L'IL-2 és una glicoproteïna de 15 KDa produïda pels LT “adjuvants” ó “helpers”, responsables de l'activació i el manteniment de les respostes proliferativa i citotòxica mediades pels LT i les cèl·lules NK. Aquestes cèl·lules s'activen mitjançant aquest factor soluble quan aquest interacciona amb receptors específics que es localitzen en la superfície cel·lular.

El receptor de l'IL-2 (IL-2r) es compon de 3 possibles cadenes:

Cadena α (p55, TAC)

Cadena β (p75)

Cadena γ (p64)

Diferents combinacions d'aquestes cadenes formen els diferents receptors per l'IL-2, amb diferent capacitat de interacció ó afinitat:

Receptor de: baixa afinitat: cadena α

afinitat intermitja: cadena β + cadena γ

alta afinitat: cadena α + cadena β + cadena γ

Els diferents limfòcits així com els diferents estats d'activació cel·lular van lligats amb l'expressió diferencial per cada un d'aquests receptors:

La majoria de LT (>98%) són cèl·lules no activades que no expressen receptors per la IL-2. Quan el LT interacciona amb una cèl·lula presentadora d'Ag a través del CD3/TCR s'indueix una senyal d'activació cel·lular que implica diferents respostes, una d'elles és la inducció de l'expressió del receptor d'alta afinitat de la IL-2 [214].

En canvi un 50% de les LGL expressen el receptor d'afinitat intermitja (constituït per les cadenes cadena β (p75) + γ (p64)), són cèl·lules quiescents que es caracteritzen a més a

més per l'expressió de CD56 amb baixa intensitat (CD56^{dim}) i per l'expressió del CD16. Aquestes cèl·lules són estimulades amb IL-2 incrementant-els-hi l'activitat citotòxica basal.

Entre un 2 % i un 5 % de les NK expressen el CD56 amb alta intensitat (CD56^{bright}). Aquestes cèl·lules a més a més expressen la cadena p55 (conegut com a CD25) associada a la cadena p75 formen el receptor d'alta afinitat i són cèl·lules que en general no expressen el receptor CD16. L'exposició d'aquestes cèl·lules a una dosi elevada d'IL-2 activa el seu mecanisme citolític, en canvi, una baixa dosi d'IL-2 activa la proliferació d'aquesta població. A aquest 2 – 5 % de cèl·lules NK se les considera cèl·lules immadures [28].

- **Transducció del senyal, principals enzims implicats.**

Les cadenes del rIL-2 que juguen un paper en la senyalització són la cadena β la cadena γ . La presència d'IL-2 provoca la dimerització d'aquestes dues cadenes, desencadenant senyals que involucren la fosforilació en tyr d'un gran rang de proteïnes cel·lulars. Cap d'aquestes cadenes té activitat catalítica intrínseca (com activitat tirosin quinasa). Se sap però que diferents enzims amb activitat PTK poden unir-se a elles (p56^{lck}, Syk, Jak).

Aquests enzims desencadenen una cascada de fenòmens que es poden classificar en 3 vies diferents, i que s'han representat en la **figura 3**:

a) Activació de Shc i inducció de la via del Ras:

L'activació d'aquesta via depèn del domini àcidic de la cadena IL-2R β . Aquest domini conté un residu Y338 per la interacció del domini SH₂ de la proteïna Shc, s'activa el complexa Grb2-SOS, s'activa el Ras, i es desencadena la cascada de les proteïnes quinases activadores de la mitogènesis (MAPK). L'activació d'aquesta via s'havia associat en altres models amb la inducció de la proliferació. Però mutacions en el residu Y338 que impedeix la associació de Shc no prevé la capacitat mitogènica de l'IL-2 [215].

b) Via de la PI3-K:

Com s'ha comentat anteriorment la PI3-K juga un paper fonamental en l'organització del citoesquelet. Això facilita la capacitat per regular mecanismes tant disperss com l'exocitosis de grànuls o la divisió cel·lular. La interacció d'aquest enzim amb la cadena IL-2R β necessita d'un adaptador en aquest cas la p56^{lck} [216].

c) Via JAK-STAT:

La senyal que indueixen moltes citocines com l'IL-2, IL-12 ó INF α involucra la fosforilació de proteïnes conegudes com a janus quinases (JAK) i factors activadors de la transcripció (STAT) que en la seva forma dimèrica s'uneixen a seqüències específiques en el DNA. Cadascuna d'aquestes citocines activen diferents però solapades proteïnes STAT, fenomen que justificaria les similituds i el sinergisme funcional en l'acció d'aquestes citocines sobre les NK [217, 218].

Però de totes aquestes possibles vies de transducció del senyal estimulades, en aquest cas, tant sols per un factor com l'IL-2, ¿quiénes són les responsables d'un efecte en un determinat tipus cel·lular?

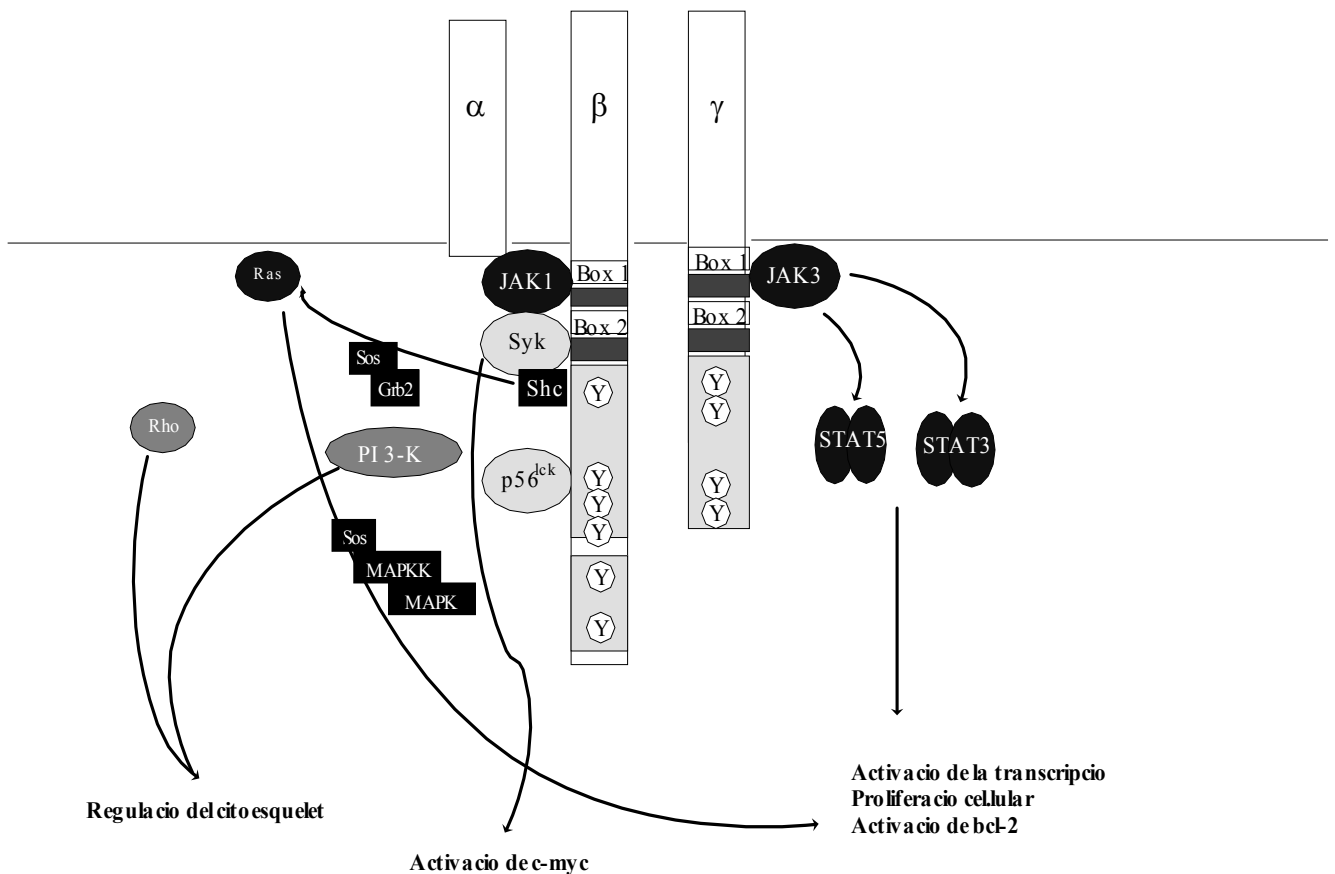


Figura 3. Representació esquemàtica dels mecanismes de transducció del senyal que s'ha demostrat que poden estar implicats en el desencadenament de l'efecte a través del receptor de l'IL-2.

Molts dels estudis realitzats sobre els mecanismes responsables de la transducció de senyal induïts per l'IL-2 s'han realitzat sobre LT, aquests són els limfòcits més abundants i hi ha múltiples línies cel·lulars establertes que faciliten la seva utilització com a model en aquest tipus d'estudis. Aquests assaigs resulten força més complexes en el cas de les cèl·lules NK. Són els limfòcits menys abundants (10% de la població limfocitaria) la qual cosa dificulta l'obtenció d'un número adequat de cèl·lules altament purificades. A més a més la població cel·lular obtinguda en ser heterogènia pot no comportar-se de la mateixa manera en resposta a un estímul, com està àmpliament descrit en el cas de l'IL-2. Existeixen poques línies cel·lulars d'aquesta població. Les línies establertes són majoritàriament de subpoblacions més immadures amb més activitat proliferativa que citotòxica.

OBJECTIUS

L'activitat proinflamadora de les **cèl·lules Natural Killer (NK)** ha estat una de les funcions biològiques menys estudiades en aquestes cèl·lules. Se sap, però, que les NK es localitzen en el focus de la inflamació en estadis inicials d'aquest procés, i que són capaces de lliurar, com a resposta a diferents estímuls, citocines implicades en la regulació de la inflamació.

D'altra banda, el **Factor 4 Plaquetar (F4P)** és una proteïna específica de les plaquetes que es troba emmagatzemada en els grànuls α , i que es lliura en el procés d'activació plaquetar. Malgrat que inicialment el F4P havia estat associat a processos com ara la trombosi, estudis posteriors han posat en evidència la seva implicació en la regulació del procés inflamatori.

En aquest context, **l'objectiu principal** d'aquest treball ha estat el de determinar l'efecte del F4P sobre diferents paràmetres o activitats biològiques de les cèl·lules NK, valorant-se la capacitat per induir un efecte per ell mateix o junt amb els activadors principals d'aquest tipus cel·lular, l'IL-2 i el lligam de Fc γ R11A.

Els objectius concrets van ser:

- Determinació de la capacitat del F4P per estimular l'activitat proinflamadora de les cèl·lules NK:

Se sap que les cèl·lules NK lliuren citocines com a resposta a diferents estímuls. El primer objectiu va ser analitzar la capacitat de les cèl·lules NK per lliurar citocines reguladores del procés inflamatori, com a resposta a l'estímul del F4P. Es va valorar tant el lliurament antigènic com el mRNA de les citocines IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF α , INF γ i GM-CSF. En segon lloc ens vàrem plantejar determinar un possible efecte sinèrgic o additiu d'aquest factor amb els activadors principals d'aquestes cèl·lules, l'IL-2 i el lligam del receptor Fc γ R11A.

- Determinació de l'efecte del F4P unit a heparina sobre les cèl·lules NK:

Quan les plaquetes s'activen i lliuren el contingut dels grànuls α al torrent sanguini, el F4P es ràpidament segrestat pels heparan sulfats localitzats en l'endoteli vascular, i d'altre banda, algunes de les funcions atribuïdes al F4P se sap que són bloquejades quan aquest s'uneix a aquests heparan sulfats. Per tant, per un millor coneixement del mecanisme fisiològic d'actuació del F4P, ens vam plantejar el valorar la capacitat del F4P, unit a una matriu d'heparina-sefarosa, per induir efecte sobre les cèl·lules NK.

- Anàlisi de l'efecte del F4P sobre l'activitat citotòxica de les cèl·lules NK:

Les cèl·lules NK han estat considerades com a primera línia de defensa dels organismes en multitud d'agressions com les infeccions víriques ó el creixement neoplàssic. La principal funció biològica de les cèl·lules NK, associada a aquesta funció de defensa, és l'activitat citotòxica. Les cèl·lules NK són capaces de desencadenar aquesta activitat sense necessitat d'un estímul previ, encara que s'han descrit diferents estímuls que potencien l'activitat citotòxica, com és el cas de l'IL-2. En aquest sentit el següent objectiu d'aquest treball va ser analitzar la capacitat del F4P per regular les activitats citotòxiques Natural Killer (NK), l'activitat citotòxica estimulada per limfoquines (LAK), i l'activitat citotòxica dependent d'anticòs (ADCC).

- Determinació de l'efecte del F4P sobre la proliferació de les cèl·lules NK:

L'objectiu plantejat va ser, per una banda, determinar la capacitat del F4P per estimular la proliferació d'aquestes cèl·lules, i per l'altre valorar la capacitat per modular la proliferació de cèl·lules activades prèviament amb IL-2.

- Determinació de l'efecte del F4P sobre marcadors d'activació de les cèl·lules NK:

La major part d'activadors provoquen en les cèl·lules diana, a més a més de canvis en les seves funcions, variacions en el seu fenotip. Així, determinats receptors

de membrana, com a resposta a un estímul extern, poden veure's sobreexpressats en alguns casos ó expressats de nou en altres. En aquest sentit, l'objectiu va ser valorar l'expressió de receptors de membrana propis d'un estat d'activació en aquestes cèl·lules, com són el CD25 (cadena del receptor de l'IL-2) i el CD69.

- Valoració de l'activitat biològica dels factors lliurats per les NK estimulades amb F4P:

Una de les funcions principals de la major part de citocines proinflamadores és estimular la maquinaria quimiotàctica dels leucòcits, provocant la seva migració cap al focus inflamatori. L'objectiu, en aquest cas, va ser determinar la capacitat dels factors lliurats per les cèl·lules NK, estimulades amb F4P, per estimular el quimiotactisme dels neutròfils.

- Estudi del mecanisme de transducció del senyal induït pel F4P en les cèl·lules NK:

El F4P pertany a la família de proteïnes anomenades quimiocines. La major part d'aquestes proteïnes interaccionen amb receptors de 7 segments de transmembrana acoblats a proteïnes G i amb el Ca^{2+} com a missatger secundari. Malgrat no s'ha pogut trobar un receptor d'aquestes característiques pel F4P, ens vam plantejar com a objectiu realitzar una primera aproximació del mecanisme de transducció del senyal desencadenat per aquest factor. Amb aquesta finalitat es va determinar la implicació de les proteïnes G i el paper del Ca^{2+} com a missatger secundari. Per altra banda es va valorar el paper dels enzims amb activitat PTK i la família d'isoenzims PKC. Finalment es va determinar si el mecanisme d'acció del F4P tenia lloc a nivell transcripcional ó traduccional.

1. OBTENCIÓ DE LA POBLACIÓ DE LGL

Obtenim aquesta població cel·lular de la sang perifèrica provenint de donants sans del Banc de Sang de la Ciutat Sanitària i Universitària de Bellvitge. De les donacions de sang (d'aproximadament 450 ml de sang), en el banc es procedeix a extreure els eritròcits i el plasma ric en plaquetes, queda com a subproducte el concentrat cel·lular o “buffy coat” d'on purifiquem la població de LGL.

1.1. Obtenció de cèl·lules mononucleades (CMNs)

El primer pas consisteix en separar les CMNs (limfòcits i monòcits) de la resta de cèl·lules que es troben en el concentrat sanguini (eritròcits restants, granulòcits, PMN). Per això, utilitzarem el mètode standard d'obtenció de CMNs. Aquest es basa en les diferències de densitat que presenten les cèl·lules sanguínies: 1,090 g/ml els eritròcits, 1,080 g/ml els granulòcits, i 1.070 g/ml les CMNs. Així, per la purificació d'aquestes últimes s'utilitza la centrifugació en un gradient de densitat de 1.077 g/ml (Ficoll-Paque) i es recull la banda de cèl·lules que queda immediatament per sobre del gradient, en contacte amb el plasma.

Com a resultat, obtenim CMNs i plaquetes (també amb una densitat per sota del gradient, de 1.040 g/ml.) que han quedat com a contaminants de la separació del plasma que es realitza en el banc de sang. Per aquesta raó, abans de realitzar la separació cel·lular per gradient de densitat fem un rentat d'aquest concentrat cel·lular per extreure les plaquetes. El nostre grup va demostrar que diferents paràmetres funcionals de les LGL podrien veure's interferits per l'efecte de les plaquetes contaminants en la purificació de les CMNs [219].

Procediment:

- Diluir el concentrat cel·lular amb suero fisiològic (SF) en una proporció aproximada de 1:4 (v:v).
- Centrifugar a 460 x g durant 10 min.
- En el sobrenadant ens quedarà el plasma amb les plaquetes que depreciarem.
- El concentrat cel·lular es redilueix amb SF en una proporció de 1:4 (v:v).

- En tubs de base cònica i estèrils (preferentment de 50 ml) s'afegeix el Ficoll-Paque tenint en compte que s'ha de mantenir una proporció de 1 part de ficoll per 2 parts de sang (concentrat cel·lular diluït) (per tubs de 50 ml: 15 ml de ficoll + 30 ml de sang).
- La sang es fa lliscar suaument per les parets del tub, on prèviament s'ha afegit el ficoll, de forma que no es barregin les dues fases.
- Centrifugar a 825 x g durant 20 min.
- Recollir la banda de cèl·lules que queda en la interfase.
- Fer 2 rentats successius d'aquestes cèl·lules amb SF a 460 x g durant 10 min per treure el ficoll que hagués pogut quedar en recollir la banda on es troben les cèl·lules (aquest pas és important, ja que el ficoll és tòxic).
- Finalment es fa un recompte de les cèl·lules obtingudes. Es sol obtenir entre 10^9 i $0,5 \times 10^9$ CMN / buffy coat, on trobem les següents subpoblacions:

Limfòcits T ($\approx 60\%$)

Limfòcits B ($\approx 20\%$)

Limfòcits Granulars Grans (LGL) ($\approx 10\%$)

Monòcits ($\approx 10\%$)

Percentatges variables depenent del donant.

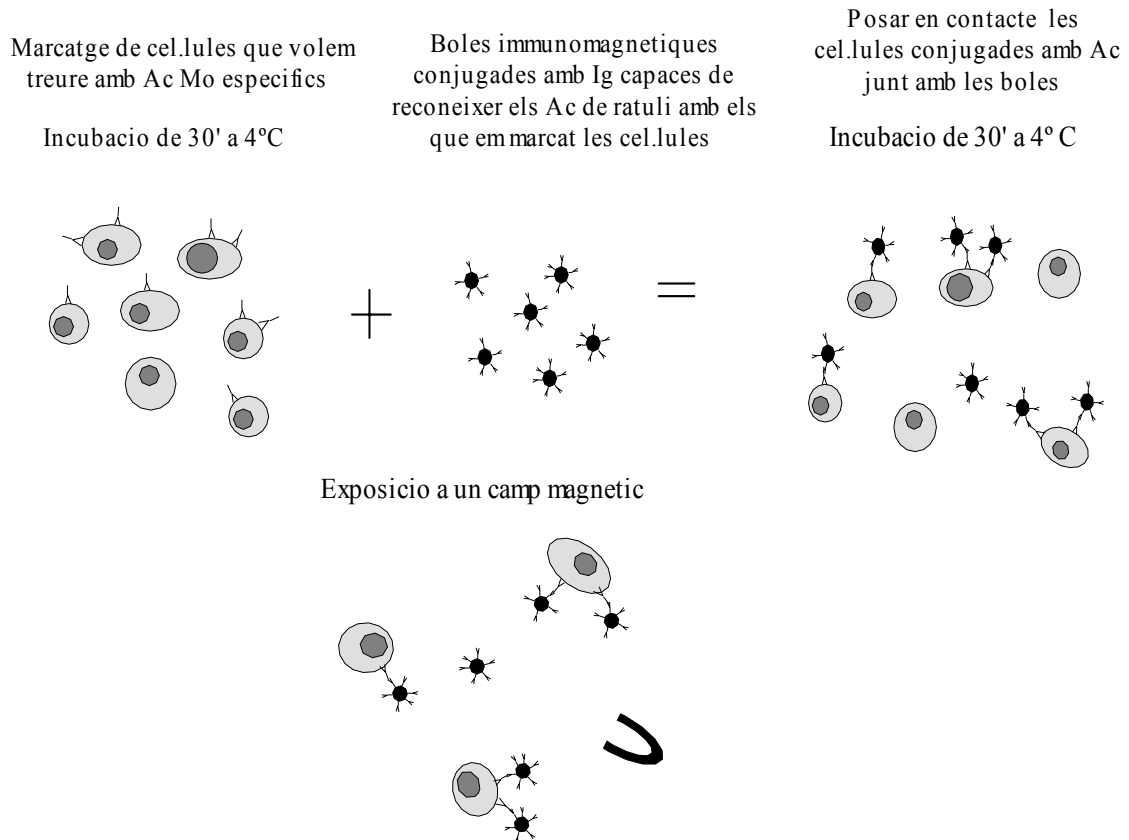
Materials i solucions

- Ficoll-Paque (Amersham Pharmacia Biotech)
- SF (Suero fisiològic) NaCl 0,9 % (Baxter)

1.2. Purificació de la subpoblació de LGL

Per separar aquesta subpoblació de les CMNs s'ha utilitzat un mètode de selecció negativa amb esferes immunomagnètiques. Aquest mètode consisteix en el reconeixement amb Ac monoclonals (Ig de ratolí) de les diferents subpoblacions de CMNs que volem depleccionar (selecció negativa). El total de les cèl·lules es posen en contacte amb petites

esferes magnètiques que estan conjugades amb Ig capaces de reconèixer les Ig de ratolí amb les que hem marcat inicialment les poblacions desitjades. Posteriorment s'exposen a un camp magnètic, les subpoblacions cel·lulars reconegudes pels diferents Ac seran arrossegades per aquest camp magnètic.



Procediment:

- Les CMNs obtingudes en el procediment anterior es resuspenen amb PBA a una concentració de $2,5 \times 10^7$ cèl. / ml.

- Incubar les cèl·lules amb 2,5 µg de cada un dels següents Ac:

Per depleccionar els LT s'utilitza: Anti-CD5, Anti-CD3, Anti-CD4.

Per depleccionar els LB: Anti-CD19.

Per depleccionar els Monòcits: Anti-CD14.

Incubar durant 30 minuts a 4°C i en agitació.

- Passat aquest temps, rentar les cèl·lules per tal de treure l'Ac sobrant. Per això, diluir 1:2 (v:v) amb PBA i centrifugar a 460 x g durant 10', les cèl·lules es resuspenen de nou amb PBA.
- Un cop hem marcat les cèl·lules amb els diferents Ac es posen en contacte amb les partícules immunomagnètiques.

Les partícules ó esferes immunomagnètiques que s'han utilitzat estan conjugades amb IgG d'ovella anti-ratolí (isotip IgG ST) i es troben resuspeses a una concentració de 4×10^8 unitats / ml de solució conservant (0,02 % d'azida). Donat el baix percentatge de cèl·lules que representa la fracció de LGL respecte del total de CMN, calculem la quantitat d'esferes a afegir respecte del total de CMN i no respecte del total de cèl·lules que s'han d'unir a aquestes. Això no varia gaire el número de partícules que necessitem i ens permet continuar la tècnica sense haver de caracteritzar abans fenotípicament les diferents subpoblacions. Utilitzem 10 esferes immunomagnètiques per cada CMN.

- Les esferes es renten 3 vegades per tal de treure la solució conservant: Diluir la quantitat necessària de partícules amb 1:3 (v:v) de PBA, i exposar a un camp magnètic. Les esferes queden atrapades en el camp magnètic i la solució en la que estan resuspeses es desprecia.
- Resuspendre les esferes junt amb les cèl·lules a una concentració final de $2,5 \times 10^7$ cèl·lules / ml de PBA, i mantenir durant 30 min. a 4°C i en agitació.
- Transcorregut aquest temps exposar aquesta solució a un camp magnètic, les cèl·lules reconegudes per algun dels Ac tindran, ara, esferes immunomagnètiques adherides a la seva superfície i seran arrossegades pel camp magnètic, en canvi la subpoblació de LGL quedarà en el sobrenadant que recollirem, realitzant 3 rentats successius amb PBA.
- Centrifugar la suspensió cel·lular a 460 x g durant 10 min. Les cèl·lules obtingudes es resuspenen en un medi de cultiu específic per limfòcits (mc3), a una concentració de 4×10^6 cèl·lules / ml.

Materials i solucions

- PBA: 10 ml d'albumina humana (Grifols)
1,5 ml de bicarbonat sòdic (Farmacia)
2,5 ml de penicilina-streptomina (Gibco BRL)
Portar fins a 500 ml amb SF (suero fisiològic) (Baxter).
- AcMo utilitzats per a la depleció (Reac. Cromatest, Lab. Knickerbocker):
 - Anti-CD3, clon Cris-7, isotip IgG2a (ratolí)
 - Anti-CD4, clon Edu-2, isotip IgG2a (ratolí)
 - Anti-CD5, clon Cris-1, isotip IgG2a (ratolí)
 - Anti-CD19, clon A3B1, isotip IgG1 (ratolí)
 - Anti-CD14, clon Cris-6, isotip IgG1 (ratolí)
- Esferes immunomagnètiques (Dynabeads[®] M-450, Dynal, Baxter)
- El medi de cultiu complet (mc3) per Limfòcits:
 - Biotarget (Biological industries)
 - L-Glutamina 4 mM (10ml/500ml) “
 - Piruvat Sòdic 1 mM (5ml/500ml) “
 - Penicil·lina 250 UI/ml, Estreptomina 250 µg/ml (2,5 ml/500ml) (Gibco BRL)
 - Tilosin (2,5 ml/500ml) (Sigma)

1.1. Determinació fenotípica de la població obtinguda

La població cel·lular obtinguda es caracteritza per citometria de flux. Aquesta tècnica ens permet analitzar una a una les cèl·lules que es mouen en un corrent de líquid travessat per una font de llum, en aquest cas un làser d'argó. La llum que incideix sobre cada partícula es dispersa en funció de la grandària de les cèl·lules (“forward scatter” (FS)), de la seva granulositat (“side scatter” (SS)), i de la fluorescència que els hi proporcionen un fluorocrom que s'els hagi incorporat.

Per distingir els diferents tipus cel·lulars utilitzem AcMn conjugats amb fluorocroms. Aquests fluorocroms en ser excitats pel làser d'argó, emeten llum a una determinada longitud d'ona. La utilització de diferents fluorocroms, que emetran fotons en diferents longituds d'ona, permet caracteritzar 2 ó 3 marcadors en la mateixa mostra, donant així idea de la compartició d'aquests marcadors en una població cel·lular.

Es van realitzar els següents marcatges:

CD45/CD14: el marcador CD14 reconeix als monòcits, mentre que el CD45 és un marcador comú a la població limfoide, així doncs esperarem que les cèl·lules obtingudes siguin: CD45⁺/CD14⁻.

CD2/CD19: el CD2 és un receptor que s'expressa en LT + LGL mentre que el CD19 s'expressa en les LB, per tant esperarem tenir majoritàriament cèl·lules CD2⁺/CD19⁻.

CD3/CD16/CD56: El CD3 és el marcador específic pels LT, per això esperem que la població sigui CD3⁻. Es consideren LGL els limfòcits amb algun dels següents fenotips: CD3⁻/CD16⁺/CD56⁺, CD3⁻/CD16⁻/CD56⁺ ó CD3⁻/CD16⁺/CD56⁻,

Les cèl·lules NK, com la major part de tipus cel·lulars, en activar-se expressen un fenotip diferent al de les cèl·lules quiescents. Els marcadors que ens indiquen un fenotip d'activació són els següents:

CD69: S'expressa en limfòcits activats, timòcits i plaquetes, és una proteïna homodimèrica fosforilable de la qual es desconeix la funció específica.

CD25: cadena α del receptor de l'IL-2. l'expressió d'aquesta cadena α junt amb la cadena β constitueix el receptor d'alta afinitat per a l'il-2.

CD75: Cadena β del receptor de l'IL-2. L'expressió d'aquesta cadena sense estar associada a la cadena α constitueix el receptor d'afinitat intermitja per la IL-2. Malgrat l'expressió d'aquesta cadena és constitutiva en les cèl·lules NK, l'activació d'aquestes cèl·lules pot induir un increment en l'expressió d'aquest marcador.

Procediment:

- En un tub eppendorf es posen entre $0,3$ i $0,5 \times 10^6$ cèl·lules per cada determinació.
- S'afegeix PBA azida amb una proporció de 1:1 (v:v) (l'azida atura el metabolisme cel·lular), centrifugar amb un pols (a $7000 \times g$) amb una microcentrífuga.
- Les cèl·lules es resuspenen en $25 \mu\text{l}$ de PBA azida. Afegir els AcMn. En general, les quantitats d'Ac utilitzades són les següents: $5 \mu\text{l}$ pels Ac subministrats per Coulter i per Immunotech, $2,5 \mu\text{l}$ pel CD3-TC subministrat per Caltag i $10 \mu\text{l}$ pels Ac subministrats per Becton Dickinson.
- Incubar durant 20 min. a temperatura ambient i en la foscor (per evitar la degradació dels fluorocroms).
- Passat el temps d'incubació rentar les cèl·lules per treure l'Ac sobrant: Afegir $200 \mu\text{l}$ de PBA azida i centrifugar amb un pols (a $7000 \times g$) amb una microcentrífuga. Resuspendre les cèl·lules de nou amb $200 \mu\text{l}$ de PBA azida.
- Analitzar les cèl·lules amb el citòmetre de flux.

Materials i solucions

- PBS ("phosphate-buffer saline"): $0,23 \text{ g NaH}_2\text{PO}_4$ (1,9 mM)
 $1,15 \text{ g Na}_2\text{HPO}_4$ (8,1 mM)
 $9,0 \text{ g NaCl}$ (154 mM)
Ajustar el pH (7,2 - 7,4) amb 1 M NaOH ó 1M HCl
Afegir aigua fins a 1 litre
- PBA azida: PBS
 $0,1\%$ p/v de Na_2azida (Sigma)
 1% p/v d'albumina de sèrum boví (Sigma)
- AcMn utilitzats per a la caracterització fenotípica de la població purificada:
CD14-RD1 (Clon: Mo2) / CD45-FITC (Fluorescein isothiocyanate) (Clon: KC56)),
suministrat per Coulter Immunology.
CD2-FITC / CD19-PE, (Clons: 39C1.5 / J4.119) suministrat per Immunotech.

CD3-TC (tri-color) de Caltag Laboratories / CD16-FITC (Clon: 3G8) de Becton Dickinson / CD56-PE (Clon: MY31) de Becton Dickinson / CD25-PE ó –FITC de Becton Dickinson / CD69-PE de Becton Dickinson / CD75-FITC de Becton Dickinson.

- El citòmetre de flux utilitzat és el EPICS[®] XL-MCL de Coulter.

2. CONDICIONS DE CULTIU DE LES CÈL·LULES NK

2.1. Condicions generals de cultiu.

Medi de cultiu: S'ha utilitzat el Biotarget com a medi de cultiu, per ser un medi de composició controlada que no precisa l'addició de sèrum. Això elimina possibles variacions en els resultats degut a una font de factors de creixement no controlada.

El medi de cultiu complet (mc3):

Biotarget	(Biological industries)
L-Glutamina 4 mM (10ml/500ml)	“
Piruvat Sòdic 1 mM (5ml/500ml)	“
Penicil·lina 250 UI/ml, Estreptomicina 250 µg/ml (2,5 ml/500ml)	(Gibco BRL)
Tilosin (2,5 ml/500ml)	(Sigma)

Incubacions: Tenen lloc a un incubador de cultiu a 37°C, en una atmòsfera amb humitat saturant i al 5% de pressió de CO₂ . Incubador Function Line (Heraeus).

2.2. Activació de les LGL.

Els moduladors de la resposta biològica utilitzats en aquest treball per a la determinació de l'efecte sobre algunes de les funcions de les cèl·lules NK ó LGL i les dosis utilitzades (concentracions finals) són els següents:

- Factor 4 Plaquetar humà (**F4P**) (Sigma) ó (Diagnostica Stago, Roche): Obtingut de plasma ric en plaquetes, amb una puresa del 95 % i purificat per electroforesis SDS-PAGE. La dosis utilitzada està entre 10 i 200 ng/ml.
- **IL-8** humana recombinant (R&D Systems). Dosis entre 0,2 i 100 ng/ml.
- **MCP-1** humà recombinant (R&D Systems). Dosis de 100 ng/ml.
- **IL-2** humana recombinant (cedida per: Chiron Iberica). Dosis entre 50 i 100 UI/ml.
- **PMA** “phorbol myristate acetate”, (Sigma). Dosis de 10 ng/ml.
- **Actinomicina D** (Sigma). Concentració final de 10 µg/ml.
- **Cicloheximida** (Sigma). Concentració final de 10 µg/ml.
- **Toxina Pertússica** (Sigma). Concentració final de 1 µg/ml.
- **Toxina Colèrica** (Sigma). Concentració final de 1 ng/ml.
- **PKCi** (Inhibidor de PKC) GF 109203X (Sigma). Concentració final de 1 ng/ml.
- **Staurosporina** (Sigma). Concentració final de 60 nM.
- **Genisteina** (Sigma). Concentració final de 50 µM.
- **Wortmannin** (Sigma). Concentració final de 50 nM.

2.2.1. Activació a través del receptor FcγRIIIA

Per activar les cèl·lules NK a través d'aquest receptor.

Procediment

- En plaques de 96 pous, sembrarem de 300 a 450 ng d'Ac / 50 µl de SF / pou. En cas d'utilitzar plaques de 6 pous, sembrarem de 3 a 5 µg d'Ac / 2-3 ml de SF/ pou.
- Incubar les plaques amb l'Ac 1 h i 30 min a 37 °C
- Passat aquest temps rentar els pous amb SF fred (4°C) un parell de vegades. Inmediatament després es sembren les cèl·lules (no es pot deixar l'Ac en el pou sec, ni massa estona amb el SF).

- La concentració de les cèl·lules en el cultiu posterior serà l'habitual de 4×10^6 cèl·lules / ml.

Quan el que volem és activar les cèl·lules en suspensió (en el nostre treball per la determinació de Ca^{2+} intracitoplasmàtic):

Procediment

- Afegir l'Anti-CD16 en forma soluble.
- Transcorreguts 15 segons afegir un segon Ac capaç d'interaccionar amb el primer, amb una Ig anti-mouse (10 μg /ml), ó amb la fracció variable F(ab') (16 μg /ml). Té lloc així l'anomenada reacció de "cross-linking"

Incubador, Function Line (Heraeus).

Materials i solucions

- Plaques de 96 pous amb el fons en U (TPP).
- L'AcMo utilitzat anti-CD16 és una IgG₁ de ratolí, corresponent al clon 3G8 (Immunotech).
- Ac per la reacció de "cross-linking": Fracció variable F(ab') anti-mouse (Sigma).

2.2.2. Determinació de l'especificitat funcional del F4P.

Procediment

- Rentar 20 μl de proteina-A-sepharosa 2 cops amb 1 ml de SF, i centrifugar a 3000 x g durant 1 min.
- Resuspendre amb 150 μl de SF i afegir 2 μg d'Ac policlonal anti-F4P.
- Incubar 1 h i 30 min a 4°C en agitació.
- Centrifugar a 3000 x g durant 1 min i deprecia el sobrenadant.

- Incubar 1 h i 30 min a 4°C en agitació les partícules de sepharosa conjugades amb l'Ac solució que conté F4P a una concentració de 200 ng/ml.
- Centrifugar a 3000 x g durant 1 min. En treure les partícules de sepharosa retirem específicament el F4P de la solució.
- Determinem la capacitat d'aquesta solució per induir un efecte biològic.

Materials i solucions

- Factor 4 Plaquetar humà (**F4P**) (Sigma) ó (Diagnostica Stago, Roche).
- Proteïna-A-Sepharosa (Amersham Pharmacia Biotech).
- Serum de conill policlonal anti-F4P humà (Diagnostica Stago, Roche).

2.3. Unió del F4P a l' Heparina.

Procediment

- Rentar 20 µl d'heparina-sepharosa 2 cops amb 1 ml de medi sense sèrum (RPMI) i centrifugar a 3000 x g durant 1 min.
- Incubar amb el F4P (200 ng/ml i 40 ng/ml) durant 1 h i 30 min a 4 °C.
- Rentar 3 cops les partícules d'heparina-sepharosa conjugades amb F4P amb medi sense sèrum abans d'incubar-les amb les cèl·lules.

Materials i solucions

- Factor 4 Plaquetar humà (**F4P**) (Sigma) ó (Diagnostica Stago, Roche).
- Heparina-Sepharosa (Amersham Pharmacia Biotech).
- RPMI 1640 (Biological Industries).

3. MESURA DE L'ACTIVITAT CITOTÒXICA.

L'activitat citotòxica s'ha mesurat amb un assaig estàndard de 4 h de lliurament de ^{51}Cr prèviament descrit per Henney [220-222]. Aquesta tècnica ens permet valorar la capacitat lítica d'una població de cèl·lules efectores i, per tant, ens permetrà determinar l'efecte que indueix un determinat factor sobre aquesta activitat biològica.

Per valorar l'activitat citotòxica mediada per cèl·lules, utilitzem línies cel·lulars susceptibles de ser llisades per cada una de les activitats citotòxiques que volem determinar: NK, LAK i ADCC. A aquestes cèl·lules se'ls incorpora $\text{Na}_2 \text{}^{51}\text{Cr} \text{O}_4$ (isòtop que emet radiació gamma), quan la cèl·lula es llisada lliure aquest isòtop al medi. La quantitat de ^{51}Cr del sobrenadant serà proporcional al nombre de cèl·lules llisades i es pot valorar fàcilment amb un comptador de radiació γ .

3.1. Condicions de cultiu de les cèl·lules diana.

S'han utilitzat com a cèl·lules diana:

- Línia K562: Línia cel·lular humana eritroleucèmica sensible a l'activitat citotòxica NK. Es cultiva amb RPMI 1640, medi complert (mc1).
- Línia Raji: Línia cel·lular humana de Limfoma de Burkitt sensible a l'activitat citotòxica LAK (Lymphokine Activated Killer). Es cultiva amb RPMI 1640, medi complert (mc1).
- Línia p815: Aquesta línia cel·lular de mastocitoma es va obtenir d'un tumor de ratolí DBA/2. Línia resistent a les activitats NK i LAK. En ser reconeguda per un Ac pot ser llisada per una cèl·lula NK a través de l'ADCC. Aquestes cèl·lules es cultiven amb "Dulbecco's mod Eagle medium" (DMEM), medi complert (mc2)

Procediment

- **Suport del cultiu:**

Es mantenen en cultiu líquid, preferentment en flascons de 75 cm^2 , en un volum de 30 ml de medi complert a una concentració aproximada de 10^5 cèl·lules viables/ml. Es

realitza un canvi de medi de cultiu regularment cada 2 ó 3 dies segons el creixement de la línea.

Per canviar el medi les cèl·lules en cultiu es centrifuguen a 460 x g durant 10 min. i es resuspenen en medi nou.

- **Condicions de incubació:**

Són les estandars de 37°C, 5% de CO₂ i en una atmòsfera amb humitat saturant.

Materials i solucions:

- Les 3 línees van ser suministrades per l'ATCC (American Type Culture Collection).

Linea K562 (ATCC CCL-243)

Linea Raji (ATCC CCL-86)

Linea p815 (ATCC TIB-64)

- Medis de cultiu:

Medi complert (mc1):

RPMI 1640	(Biological Industries)
Sèrum boví fetal 10% (50 ml/500ml)	(Gibco BRL)
L-Glutamina 4 mM (10ml/500ml)	(Biological Industries)
Piruvat Sòdic 1 mM (5ml/500ml)	(Biological Industries)
Penicil·lina 250 UI/ml, Estreptomicina 250 µg/ml (2,5 ml/500ml)	(Gibco BRL)
Tilosin (2,5 ml/500ml)	(Sigma)

Medi de cultiu (mc2):

DMEM (Dulbecco's mod Eagle medium)	(Life Technologies)
Sèrum boví fetal 10% (50 ml/500ml)	(Gibco BRL)
L-Glutamina 4 mM (10ml/500ml)	(Biological Industries)
Piruvat Sòdic 1 mM (5ml/500ml)	(Biological Industries)
Penicil·lina 250 UI/ml, Estreptomicina 250 µg/ml (2,5 ml/500ml)	(Gibco BRL)

Tilosín (2,5 ml/500ml) (Sigma)

Incubador, Function Line (Heraeus).

3.2. Marcatge amb ^{51}Cr de les cèl·lules diana K562 i Raji

L'assaig d'activitat citotòxica es realitza en el moment de creixement exponencial del cultiu de les línies.

Procediment:

- Centrifugar les cèl·lules a 460 x g durant 10 min. i resuspendre-les en SF.
- Realitzar un recompte de les cèl·lules mitjançant la càmera de Neubauer. Per poder visualitzar les cèl·lules es tenyeixen amb colorant "Trypan Blue". Aquesta tinció ens permet distingir les cèl·lules mortes (color blau) de les vives (cèl·lules transparents i refringents).
- Es marquen per l'activitat NK..... 4×10^6 cèl·lules K562
per l'activitat LAK..... 10^7 cèl·lules Raji.
- El total de cèl·lules necessàries per un marcatge es centrifuguen a 460 x g 10 min. i es resuspenen en 200 μl de mc 1.
- Marcatge : S'afegeix 200 μCi de ^{51}Cr (200 μl per una activitat de 1 μCi / μl).
- Incubar 1 h a 37°C, si pot ser, en agitació.
- Transcorregut aquest temps es fan 2 rentats de les cèl·lules per eliminar l'isòtop no incorporat: resuspendre-les amb 50 ml de SF i centrifugar a 460 x g durant 10 min .
- Les cèl·lules es resuspenen en 40 ml de SF i incubar les cèl·lules marcades durant 45 min. a 37°C . Aquest pas permet eliminar el ^{51}Cr que es lliura espontàneament sobre tot en els primers minuts després del marcatge disminuint així el "background" ó soroll de fons.

- Finalitzats els 45 min. i just abans de sembrar-les amb les cèl·lules efectores es centrifuguen a 460 x g durant 10 min. i es resuspenen amb mc 1 a una concentració de 4×10^5 cèl·lules / ml (en 20 ml les K562 i en 25 ml les Raji).

3.3. Marcatge de les p815

Les p815 són les cèl·lules diana que s'utilitzen per a la determinació de l'ADCC.

Per determinar aquesta activitat realitzem dos marcatges amb ^{51}Cr de 10^7 cèl·lules p815 cada un d'ells. Utilitzem pels 2 marcatges el mateix procediment que en l'apartat anterior 3.2. amb la salvetat següent:

1. En un dels marcatges quan s'incuben les p815 amb el ^{51}Cr s'afegeix 25 μl de suero de conill immunitzat amb p815 (aquest sèrum conté, per tant, Ac policlonal de conill capaç de reconèixer aquestes cèl·lules). El procediment per la immunització del conill s'especifica en l'apartat 3.8.
2. L'altre marcatge és exactament igual que el que es realitza en l'apartat 3.2. Aquest segon marcatge, sense Ac (ó amb un Ac inespecífic, obtenim el mateix resultat) ens serveix com a control per determinar l'activitat citotòxica no induïda específicament pel reconeixement de la diana a través de l'Ac. A partir d'aquest punt aquests dos marcatges es tracten com si fossin dues determinacions citotòxiques independents.

Materials i solucions:

- Camara de Neubauer (Marienfeld).
- "Trypan Blue" (Sigma).
- Isòtop $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ (Amerham Pharmacia Biotech)

3.4. Sembrat de les cèl·lules efectores

S'ha utilitzat com a cèl·lules efectores la població de CMNs total o la subpoblació purificada de LGL ambdues obtingudes segons el procés anteriorment explicat. Les cèl·lules es resuspenen a una concentració de 4×10^6 cèl·lules efectores / ml amb mc 1 ó mc 3.

- Sembrar les cèl·lules en plaques de 96 pous en fons en U, en dilucions $\frac{1}{2}$ seriades i en triplicats de cada una de les diferents dilucions i en un volum total de 100 μ l. En els 3 primers pous es sembren 4×10^5 efectores, 2×10^5 efectores en els altres 3 pous, i així successivament en un total de 6 dilucions.
- S'afegeix en cada pou 50 μ l del factor del qual es vol testar el seu efecte i s'incuba durant 16 hores en les condicions ja esmentades. Transcorregut aquest temps es realitza l'assaig d'alliberament de ^{51}Cr .

3.5. Assaig d'alliberament de ^{51}Cr per NK i LAK.

- Transcorregudes les 16 hores (Over/Night). En les plaques on s'havien sembrat les cèl·lules efectores es sembren 50 μ l de cèl·lules diana marcades (20.000 cèl·lules / pou). Tindrem, així, triplicats amb les següents proporcions d'*efectores:diana*: 20:1; 10:1; 5:1; 2,5:1; 1,25:1 i 0,6:1.
- Utilitzarem com a **control (+)** o mesura **d'alliberament total (A_T) de ^{51}Cr** el número de comptes que s'obté en llisar amb un detergent 20.000 cèl·lules diana: 20.000 cèl·lules diana (100 μ l) + 100 μ l de SDS al 0,1%.
- Com a **control (-)** o mesura **d'alliberament espontani (A_S) de ^{51}Cr** sembrarem en 3 pous 20.000 cèl·lules diana en 100 μ l + 100 μ l de mc 1.
- Les plaques s'incuben a 37°C i 5 % de CO₂ durant 4 hores.
- Transcorregut aquest temps es centrifuguen a 460 x g durant 5 min. En el pel·let ens quedaran les cèl·lules que hagin quedat intactes, mentre que en el sobrenadant es trobarà el ^{51}Cr lliurat de les cèl·lules diana que s'hagin llisat.
- Del total de 200 μ l del volum dels pous s'extreu 100 μ l tenint cura de no emportar-nos les cèl·lules que hauran quedat en el fons del pou. Els 100 μ l del sobrenadant es posen en tubs especials pel comptador γ .

3.6. Assaig d'alliberament de ^{51}Cr per ADCC

Com ja s'ha esmentat en els punts 1.- i 2.- de l'apartat **3.3.** per l'activitat ADCC es sembren les cèl·lules com si es tractés de dues activitats citotòxiques independents. Les cèl·lules diana marcades amb Ac ens mesuraran l'activitat citotòxica mediada per Ac. Les cèl·lules del marcatge 2.- ens serveixen de control (-), donen idea de l'activitat citotòxica no induïda directament per l'Ac, i donat que és una línia cel·lular resistent a les activitats NK i LAK hauria de donar un valor pròxim a zero.

Materials i solucions:

- Detergent SDS 0,1%
- Contador γ , 1261 Multigamma, LKB-Wallac.

3.7. Càlcul de l'activitat citotòxica

El valor de l'activitat citotòxica es sol expressar en unitats de percentatge d'alliberament específic ó en unitats lítiques.

Obtenim aquestes unitats com a resultat de les següents fórmules matemàtiques:

El percentatge d'alliberament específic (A_E) es calcula com a mitja dels triplicats segons la fórmula

$$A_E = \frac{\text{Alliberament test } (A_T) - \text{Alliberament espontani } (A_S)}{\text{Alliberament total } (A_T) - A_S}$$

En aquest treball el valor de les activitats citotòxiques s'expressa en unitats lítiques (UL)/ 10^9 cèl·lules efectores, a partir de la fórmula descrita per Davidson [221], que defineix una unitat lítica com l'entitat capaç de causar la llisi específica d'una cèl·lula diana durant 4 hores d'incubació. Les unitats lítiques es calculen a partir de la següent equació:

$$UL = -\ln(1 - A_E) \times \frac{\text{n}^\circ \text{ cel. diana}}{\text{n}^\circ \text{ de cel. efectores}}$$

3.8. Immunització d'un conill per l'obtenció d'Ac policlonal anti-P815.

Per la mesura de l'activitat citotòxica dependent d'Ac (ADCC) es va obtenir un Ac policlonal de conill anti-p815.

Procediment

- Rentar 2 cops 10×10^6 cèl·lules P815 amb SF centrifugant a $460 \times g$ durant 10 min.
- Les cèl·lules es resuspenen en 1 ml d'adjuvant complet de Freund. Preparar una emulsió fent passar la solució a través d'una agulla mitjançant una xeringa.
- Injectar la solució al conill quan aquesta pren un aspecte blanquinós homogeni.
- Injectar el volum total de 1 ml en la zona dorsal de l'animal repartit en 4 punxades subcutànies.
- Repetir aquest procés 3 cops amb una periodicitat quinzenal.
- Transcorreguts 5 dies de la tercera immunització extreure sang de la vena marginal de l'orella del conill per fer una primera titulació de l'Ac produït.
- Transcorreguts 15 dies fer una quarta injecció de record en les condicions esmentades.
- Al cap de 5 dies anestesiar i sacrificar l'animal per sangria.
- Recollir la sang en tubs sense cap tipus d'anticoagulant.
- Un cop format el coàgul centrifugar els tubs a $460 \times g$ durant 10 min. i extreure el sèrum ric en Ac.

Materials i solucions:

- Conill femella blanc New Zeland (El subministrament, manteniment i cura de l'animal es van realitzar en l'estabulari de La Ciutat Sanitària i Universitària de Bellvitge).
- Adjuvant complet de Freund (Sigma).

4. MESURA DE L'ACTIVITAT PROLIFERATIVA

La proliferació la determinem de forma indirecte com la incorporació de Metil-³H-Timidina durant la duplicació del DNA en les cèl·lules proliferants. El triti (³H) emet radiació β que podem detectar gràcies als fotons excitats per aquesta radiació en líquid de guspireig, que seran captats per un comptador β . Cada valoració la realitzem per triplicat.

Un dels principals inductors de la proliferació de les LGL és, com ja s'ha esmentat en la introducció, l'IL-2. En els diferents assaigs s'utilitzarà aquesta citocina com a control positiu de la proliferació.

Procediment:

- En plaques de 96 pous amb fons en U (microplaques), sembrar 4×10^5 cèl·lules en 100 μ l de mc3 / pou , (a $4 \cdot 10^6$ cèls / ml). Afegirem l'estímul a testar en un volum de 50 μ l.
- Incubar durant 48 hores a 37°C, i 5% de CO₂ .
- Transcorregut aquest temps afegim 50 μ l de timidina tritiada (³HTd) 1mCi/ml (1 μ Ci/pou).
- Incubar durant 16 hores a 37°C i 5% de CO₂ .
- Centrifugar la placa a 825 x g 5 min.
- Treure el sobrenadant (amb una xeringa amb agulla evitant endur-nos les cèl·lules del pel·let).
- Afegir al pel·let 100 μ l d' Acid Tricloracètic (TCA) al 5% (precipita proteïnes). Protegir de la llum.
- Mantenir a 4° C durant 5-10 min (DNA acomplexat amb proteïnes)
- Centrifugar la placa a 825 x g durant 5 min.

- Treure el sobrenadant.
- Afegir 100 µl de solució éter- etanol 1:2 (v:v) (per deshidratar)
- Incubar durant 5 min. (es pot deixar O/N).
- Treure el sobrenadant. Deixar eixugar fins que s'evapori tota la solució d'éter-etanol.
- Redisoldre amb 200 µl de solució NaOH 1 M.
- Deixar incubar 1 h a 37°C ó 2-4 hores a T^a ambient.
- Recollir la meitat del volum (100 µl) i passar-ho a tubs que continguin 5 ml de líquid de guspireig
- Vortejar els tubs fins a observar la formació d'escuma.
- Llegir les cpm en un comptador de radiació β.

Material i solucions:

- Plaques de 96 pous amb fons en U (microplaques).
- Medi de cultiu mc 3 (*Mat i Met apartat 2*).
- Incubador Function Line (Heraeus).
- Isòtop metil-³H-Timidina (Amersham Pharmacia Biotech).
- Acid Tricloracètic (TCA) (Merck).
- Éter-etanol 1:2 (v:v) (Merck).
- Líquid de guspireig (Optiphase "hifase"2) (Wallac).
- Comptador de radiació β, 1209 Rackbeta (Wallac).

5. DETERMINACIÓ DE LA PRODUCCIÓ DE CITOCINES

Les cèl·lules es sembren en les mateixes microplaques que per les determinacions anteriors, també amb 4×10^5 cèl·lules / pou amb medi complet mc3, amb la dosi adequada de l'estímul que volem provar. Transcorregut el temps indicat per cada test es centrifuga la placa a 460 x g 5 min i s'extreu el sobrenadant.

Es testa la quantitat de citocina present en el sobrenadant mitjançant un kit comercial d'E.L.I.S.A. ("enzyme-linked immunosorbent assay"). El procediment utilitzat en cada cas

és estrictament el recomanat per la casa comercial. A grans trets el protocol que s'ha seguit és el de "sandwich" ELISA i que de forma resumida es descriu a continuació:

Es deposita una quantitat coneguda d'Ac monoclonal contra la citocina que volem valorar en plaques de 96 pous, quedant aquest adherit al plàstic. Els pous s'exposen a solucions amb quantitats conegudes de citocina (per poder realitzar l'anomenada corba de standards) i als sobrenadants que volem valorar el seu contingut en la citocina en qüestió. La citocina que està present en aquestes solucions s'uneix de forma molt eficient a aquest Ac primari. Posteriorment els pous es renten amb una solució que conté detergent (tween 20) i proteïna bloquejant. S'exposa a un Ac secundari anti-citocina monoclonal o policlonal conjugat amb un enzim. Es torna a fer un rentat per treure les restes d'Ac secundari no unit i s'incuba amb un substracte cromogènic específic per l'enzim conjugat.

Els pouets que contenen citocina unida i per tant Ac conjugat amb enzim produeix una reacció cromogènica. La intensitat de la coloració, dins d'un rang, és proporcional a la quantitat de citocina que hi ha en el pou. Mesurem la intensitat de la coloració amb un lector espectrofotomètric de plaques amb un filtre adequat a la longitud d'ona emesa.

Materials i solucions:

- Medi de cultiu mc 3 (*Mat i Met apartat 2*).
- Es van utilitzar els següents kits comercials per les determinacions:
 - IL-1 β (amb un rang de detecció entre 10 - 400 pg / ml) (Amerham Phamacia Biotech).
 - GM-CSF (rang entre 10 – 500 pg / ml) (Genzime).
 - INF γ (rang entre 5 – 500 pg / ml) (Endogen).
 - IL-6 (rang entre 5 – 400 pg / ml) (Amersham Phamacia Biotech).
 - IL-8 (rang entre 31,2 – 2000 pg / ml) (R & D).
 - TNF α (rang entre 10 - 1025 pg / ml) (Genzime).
- Lector espectrofotomètric de plaques, Titertek-Niohit

6. VALORACIÓ SEMIQUANTITATIVA DE RNAm PER RT-PCR.

Per valorar si un determinat estímul és capaç d'induir un canvi en la quantitat de RNAm de diferents citocines hem utilitzat un mètode per anàlisis semiquantitatiu basat en la reacció en cadena de la polimerasa (PCR) amb una reacció prèvia de transcripció reversa (RT). Es va escollir aquesta tècnica degut, principalment, a la poca disponibilitat de cèl·lules (LGL altament purificades) per a la realització dels assaigs, basant-nos en el treball de Lago-Deenadayalan [223].

Procediment

- Posar en cultiu entre 5 i 10×10^6 de LGLs per test a una concentració de 4×10^6 cèl. /ml de medi de cultiu complet mc3.
- Afegir en el cultiu els diferents factors a testar en les diferents dosis i temps d'estímul que s'indiquen en l'apartat de resultats.
- Incubar a 37°C i 5% de CO_2 .
- Transcorregut el temps d'incubació rentar les cèl·lules 2 cops amb SF, Centrifugant a $460 \times g$ durant 10 min..
- Congelar el pel·let per immersió del tub en nitrògen líquid.
- Els pel·lets es guarden congelats a -80°C fins que es procedeix a l'extracció del RNA.

6.1. Extracció de RNA

Per realitzar l'extracció del RNA s'ha utilitzat el mètode descrit per Chomczynsky i Sacchi [224]. Degut a la resistència d'enzims capaços de degradar RNA (RNAses) s'ha d'esterilitzar tot el material utilitzat amb l'autoclau. Les RNAses endògenes s'inactiven mitjançant la desproteïnitació que provoca el tractament amb fenol i la inhibició amb tiocianat de guanidina. Per aquesta raó es descongelaran les cèl·lules en presència d'aquests productes. Es realitzarà, a més a més, tot el procés en gel (entre 0 i 4°C) per evitar l'acció de les RNAses.

Procediment:

- Afegir 1 ml de solució desnaturalitzant (D) per cada 10^7 cèl·lules i homogeneïtzar fins a obtenir una solució uniforme.
- Transferir l'homogeneïtzat a un tub de polipropilè i afegir:
 - 0,1 Vols d'acetat sòdic 2 M pH 4. Barrejar.
 - 1 Vol de fenol saturat amb aigua. Barrejar.
 - 0,2 Vol cloroform.
- Agitar suaument fins aconseguir una solució homogènea.
- Centrifugar a $10.000 \times g$, 20 min a 4°C .
- Transferir la fase superior a un nou tub (fase aquosa on es troba el RNA lliure de DNA i proteïnes) per fer una segona extracció:
- Afegir 0,5 vol de fenol i 0,5 vol vol de cloroform. Barrejar la solució resultant.
- Centrifugar a $10.000 \times g$, 20 min a 4°C .
- Recuperar novament la fase aquosa en un nou tub i s'afegeix 1 vol d'isopropanol al 100 % per precipitar el RNA, agitar la solució.
- Incubar durant 1 h a -20°C per que es formin els precipitats (obtenim, però, millors resultat en quant a quantitat de RNA deixant precipitar tota la nit (O/N) .
- Centrifugar a $12.000 \times g$ durant 30 min a 4°C . Decantar el sobrenadant.
- Fer una segona precipitació del RNA afegint 1/3 de vol de solució (D) i passar-ho a eppendorf. Incubar novament 1 h a -20°C (millor, també, O/N).
- Centrifugar $10.000 \times g$ durant 30 min a 4°C . Decantar el sobrenadant.
- Rentar el precipitat de RNA amb etanol al 70 %. Incubar de 10-15 min a temperatura ambient per dissoldre petites quantitats residuals de guanidina en el precipitat.

- Centrifugar a 10.000 x g 5 min a 4°C, i decantar el sobrenadant. Assecar el precipitat de RNA.
- Dissoldre el precipitat de RNA en 20 µl de H₂O DEPC.

Determinar la quantitat de RNA

El RNA resultant es quantifica a partir de l'absorvència a 260 nm (A_{260}), i es valora el grau de puresa a partir de l'índex A_{260} / A_{280} . Considerem acceptables les mostres amb un índex entre 1,8 i 2,0 ja que els contaminants proteics absorbeixen a una longitud d'ona de 280 nm. Una A_{260} de 1,0 correspon a una concentració de 40 µg/ml de RNA de cadena senzilla..

La quantitat de RNA (µg/ml) = 40 x A_{260} x factor dilució.

El RNA aïllat es guarda a -20°C ó a -80°C.

Materials i solucions

- H₂O DEPC 0,1 %

El dietil-pirocarbonat (DEPC) és un potent inhibidor de les RNAases.

1 ml de DEPC en un litre d'aigua.

Incubar durant 30 min a 37°C.

Autoclavar

- Solució desnaturalitzant (D)

250g de tiocianat de guanidina

293 ml d'H₂O

Agitar la solució fins a dissoldre-la. Abans de fer-la servir afegir-hi 144 µl de 2-β-mercaptoetanol per cada 20 ml de solució anterior.

- Acetat sòdic 2 M

Dissoldre 16,42 g d'acetat sòdic en 40 ml d'aigua i 35 ml d'àcid acètic Ajustar la solució a pH 4 amb àcid acètic. Afegir H₂O fins a obtenir un volum final de 100 ml.

- Espectrofotòmetre DU-64 (Beckman).

6.2. Transcripció reversa (RT)

Aquesta reacció ens permet obtenir cDNA a partir de RNAm mitjançant l'acció de l'enzim transcriptasa reversa. Utilitzem 0,5 µg de RNA total en la reacció de transcripció reversa, en un volum final de reacció de 20 µl.

Procediment

- Diluir 0,5 µg de RNA total fins a un volum total de 10 µl, amb H₂O.
- Afegir 4µl de tampó de la transcriptasa reversa (5x). Afegir, també, 0,33 µl d'oligo [d(N)₆] 60 µM (Pharmacia LKB Biotechnology). Hexanucleòtids degenerats que utilitzem com a encebadors de la reacció.
- Incubar a 65°C durant 3 min.
- Afegir 2µl de DTT (Dithiothreitol) (Sigma) 100 mM. Com agent reductor.
1 µl de dNTPs (barreja de deoxiribonucleòtids trifosfat 10 mM cadascun d'ells).
20 unitats de RNAsin. (Promega). Enzim inhibidor de les RNAases.
200 unitats de transcriptasa reversa de MoMLV (GIBCO-BRL).
H₂O fins a un volum total de 20 µl.
- Incubar a 37°C durant 60', i es guarda a -20°C fins a la seva utilització.

Materials i solucions

- Tampó de la transcriptasa reversa 1x: 50 mM Tris-HCl pH 8,3
0,75 mM KCl
3 mM Mg Cl₂

6.3. Reacció en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacció té lloc amb un volum final de 50 µl.

Procediment

- Utilitzar 1 µl de DNA de la transcripció reversa anterior.
- 5 µl de tampó de PCR 10x
- 1 µl de mescla dels 4 nucleòtids a 2 mM cadascun.
- 25 pmols de cada encebador, sentit i antisentit.
- 1,25 U de Taq polimerasa (Promega).
- S'utilitzaren diferents concentracions de MgCl₂ per cada citocina: 2,6 mM per la IL-8 i pel GM-CSF 3,5 mM per la IL-1β i per l'IFNγ ; 3 mM per la IL-6 i el TNFα.
- Realitzar 30 cicles de la PCR de les diferents citocines i 25 cicles per la β-actina sota condicions idèntiques de reacció i en tubs separats.
- Cada cicle de inclou:
 - 30 seg de desnaturalització a 94°C
 - 1 min per la unió de l'encebador a 60°C
 - 1 min per a l'extensió de la cadena o síntesis a 72°C
- Per visualitzar els productes de la PCR es van fer correr 20 µl del producte de PCR per electroforesi en un gel d'agarosa al 2 % en TBE 1x i amb bromur d'etidi.
- Les bandes es visualitzaren mitjançant un transiluminador amb llum ultraviolada i es fotografia utilitzant un film Polaroid en blanc/negre del tipus 667. La quantitat relativa del producte de la PCR es determina per quantificació de les bandes sobre el negatiu fotogràfic, mesura obtinguda mitjançant un densitòmetre.

Materials i solucions

- Tampó de la PCR 1x:
 - 50 mM de KCl
 - 10 mM de Tris-HCl pH 9
 - 0,1 % de Tritó x-100

- Encebadors utilitzats:

β-actin 5'- ATCTGGCACCACACCTTCTACAATGAGCTGCG-3'

5'-CGTCATACTCCTGCTTGCTGATCCACATCTGC-3'

(Clontech Laboratories Inc., Palo Alto, CA). Obtindrem un producte de PCR de 838 pb.

Les seqüències específiques dels encebadors per les diferents citocines es van obtenir del treball de S. Lagoo-Deenadayalan et al. (Sintetitzades per Amersham Pharmacia Biotech)

IL-8 5'-ATGACTTCCAAGCTGGCCGTGCT-3'

5'-TCTCAGCCCTCTTCAAAAATTCTC-3' (producte de PCR de 289 pb)

IL-1 β 5'-ATGGCAGAAGTACCTAAGCTCGC-3'

5'-ACACAAATTGCATGGTGAAGTCAGTT-3' (producte de 802 pb)

IL-6 5'-ATGAACTCCTTCTCCACAAGCGC-3'

5'-GAAGAGCCCTCAGGCTGGACTG-3' (producte de PCR de 638 pb);

TNF- α 5'-ATGAGCACTGAAAGCATGATCCGG-3'

5'-GCAATGATCCCAAAGTAGACCTGCCC-3' (producte de 695 pb);

IFN- γ 5'-ATGAAATATACAAGTTATATCTTGGCTTT-3'

5'-GATGCTCTTCGACCTCGAAACAGCAT-3' (producte de 494 pb);

GM-CSF 5'-ATGTGGCTGCAGAGCCTGCTGC-3'

5'-CTGGCTCCCAGCAGTCAAAGGG-3' (producte de PCR de 424 pb).

- Densitòmetre, Bio-profile 1D-2D image analyzer (Vilber Lourmat, MRNAe la Vallé, France).

7. DETERMINACIÓ DE L'AUGMENT DE CALCI

Per a determinar si els processos cel·lulars estudiats en aquest treball estan associats a un increment transitori de Ca²⁺ intracitoplasmàtic, s'ha utilitzat la tècnica descrita per Grynkiewicz [225] on s'utilitza com a sonda pel Ca²⁺ el cromofor Indo 1-AM.

Limfòcits granular grans (LGL) purificats es posen en cultiu a una concentració de 4x10⁶ cèl./ ml de mc3 sense cap estímul. Al dia següent es recullen les cèl·lules i es valora la

capacitat d'un estímul d'incrementar en pocs segons la quantitat de Ca^{2+} intracel·lular en la cèl·lula.

S'ha realitzat el mateix tipus de valoració en cèl·lules NK pre-estimulades durant 16 hores amb 100 UI / ml d'IL-2 ó amb Ac Anti-CD16 (de 3-5 μg d'Ac adherit al plàstic per pou de 3,5 cm de diàmetre (plaques de 6 pous).

Procediment:

- Transcorregudes les 16 hores es recullen les cèl·lules del cultiu i es renten 2 cops amb 5 ml de tampó Indo A. Centrifugar a 460 x g 5 min..
- Resuspendre les cèl·lules a 5×10^6 cèl./ml amb Indo A. El tampó Indo A té un pH de 7,0 que permet reduir la càrrega negativa del cromòfor, Indo 1-AM, i augmentar la seva permeabilitat, però pot arribar a ser tòxic per les cèl·lules.
- Afegir el fluorocrom, Indo 1-AM a una concentració final de 5 μM . (Si les cèl·lules són grans com blastes ó línees cel·lulars s'afegeix el doble de la concentració indicada).
- Incubar 30 min. a 37°C.
- Afegir tampó Indo B fins a duplicar el volum inicial. Aquest tampó corregeix el pH baix del tampó Indo A evitant els efectes tòxics per a les cèl·lules.
- Incubar 30 min. a 37°C.
- Rentar 2 cops amb 5 ml de Indo C.
- Resuspendre les cèl·lules a 5×10^6 cèl./ml de Indo C.
- Mantenir les cèl·lules a temperatura ambient en tubs tapats i protegits de la llum (es mantenen en bones condicions durant 3 hores, però els millors resultats s'obtenen durant els primers 90 min.).
- Just abans de la lectura, resuspendre les cèl·lules a 10^6 cèl / ml i atemperar a 37°C. (a 37°C les cèl·lules poden perdre més rapidament el Indo-1A i a 4°C cristalitza, per això s'ha de mantenir a temperatura ambient fins el moment de la lectura, en que la mostra s'ha d'atemperar a la temperatura fisiològica (37°C).

- En cada lectura es carrega la cubeta amb 2×10^6 cèl·lules en un volum de 2 ml.
- Es detecta la fluorescència emesa amb l'espectrofluorímetre RF-5000 Shimadzu de forma contínua amb una temperatura estable a la cubeta de 37°C i en agitació contínua. La suspensió cel·lular s'excita a 355 nm i es detecta la fluorescència emesa a 405 (Ca^{2+} - unit al fluorocrom) i 485 nm (Ca^{2+} - lliure de fluorocrom).

Materials i solucions:

- Cromofor, Indo 1-AM (Sigma).
- Tampons (es filtren i es mantenen a 4°C):

10 x BSS n° 1	<u>1 litre</u>
Dextrosa . H ₂ O 5mM	10,42 g
KH ₂ PO ₄ 0,3 mM	0,4 g
Na ₂ HPO ₄ . 12 H ₂ O 2 mM	6,55 g

10 x BSS n° 2	
CaCl ₂ . 2 H ₂ O 1,2 mM	1,86 g
KCl 5 mM	4 g
NaCl 140 mM	80 g
MgCl ₂ . 6 H ₂ O 1 mM	2,25 g
MgSO ₄ . H ₂ O 1 mM	2 g

Hepes 1M pH 7,4

- Solucions de treball (es preparen el dia de l'experiment)

1 x BSS Es barregen els tampons amb l'ordre següent per evitar precipitacions:

- 1) 10 ml de 10 x BSS n° 1
- 2) 80 ml de H₂O bidestilada
- 3) 10 ml de 10 x BSS n° 2

Treure 1 ml i afegir 1 ml de HEPES 1 M.

Indo A 25 ml de 1 x BSS, pH 7,0

Indo B 5 ml de 1 x BSS

0,25 ml de FCS inactivat, pH 7,4

Indo C 50 ml de 1 x BSS

2,5 ml de FCS inactivat, pH 7,2

Es calcula la concentració intracel·lular de Ca^{2+} de la ratio de les fluorescències emeses (405/485 nm) utilitzant l'equació descrita per Grynkiewicz et. al. [225].

$$[\text{Ca}^{2+}] = K_d \frac{(R - R_{\min})}{(R_{\max} - R)} \times \frac{S_f}{S_b}$$

K_d és el valor de la constant de dissociació del cromòfor, i és de 250 nM per l'Indo-1. R , R_{\min} i R_{\max} corresponen a les ràtios d'intensitat de fluorescència emesa quan la cèl·lula està en repòs (R), el valor màxim (R_{\max}) i el valor mínim (R_{\min}) d'emissió. El valor R_{\max} es va obtenir per lisis de les cèl·lules amb Tritó X-100 al 0,1 %, seguidament s'afegeix EGTA (quelant de Ca^{2+}) per determinar la R_{\min} .

S_f / S_b : és la ratio de intensitat de fluorescència a longituds d'ona llarga corresponent al Ca^{2+} lliure i Ca^{2+} unit respectivament.

8. IMMUNOPRECIPITACIÓ I WESTERN

L'anàlisi de proteïnes per *western blot* s'ha utilitzat per valorar de manera indirecte l'activació de la proteïna PI-3K implicada en mecanismes de transducció de senyal. Nosaltres valorarem l'increment de fosforilació en residus tirosina d'aquesta proteïna en diferents moments després d'afegir l'estímul.

8.1. Preparació i activació de les cèl·lules.

Procediment

- Purificar la subpoblació de LGL i posar-les en cultiu amb mc3 O/N a una concentració de 4×10^6 cèl·lules / ml a 37°C i 5% de CO₂.
- Al dia següent, per tal de parar l'activació basal, rentar les cèl·lules 3 cops amb PBS a 460 x g durant 10 min. Incubar a 37°C amb PBS durant 2-3 hores.
- Trascorregut aquest temps centrifugar les cèl·lules a 460 x g durant 10 min.
- Posar de $10-15 \times 10^6$ cèl·lules / condició en un tub eppendorf en 50 µl de RPMI (medi no complert), mantenir en gel per evitar l'activació cel·lular.
- Trascorreguts 10 min. (per facilitar l'atemperació), afegir la dosi d'activador que volem valorar.
- Incubar 20 min. en gel per facilitar el reconeixement del receptor, però evitant l'inici de l'activació cel·lular.
- Posteriorment, per facilitar la transducció de la senyal sumergir els tubs eppendorfs amb les cèl·lules en un bany a 37°C, tranccorreguts els diferents temps (1 min., 2 min., 5 min., 10 min. i 30 min.) afegir 400 µl de PBS fred per parar la transducció de la senyal. Seguidament tornar a posar en gel.

8.2. Llisat de les cèl·lules

Procediment

- Afegir 450 µl de tampó de llisi (2x) al volum de 450 µl on tenim resuspeses les cèl·lules. Barrejar bé la solució.
- Incubar de 30 a 60 min. en gel
- Centrifugar a 12000 x g durant 10 min. a 4°C.

- Recuperar el sobrenadant en un altre tub eppendorf on tindrem el conjunt de proteïnes de la cèl·lula. Si es vol parar en aquest punt el procés cal congelar aquests llistats cel·lulars per immersió en nitrogen líquid i guardar-los a -80°C .

Materials i solucions

- Tampó de llisi NP-40 1 %
 Tris (pH 7,4) 50 mM
 NaCl 50 mM
 Inhibidors de proteases: PMSF 500 mM
 Aprotinin 2 mg/ml
 Leupeptin 2 mg/ml
 Inhibidors de fosfatasas: Iodoacetamide 500 mM
 Na-Vanadate 20 mM
 Na-Fluoride 1M
 Na-pyrophosphate 500 mM

8.3. Immunoprecipitació

Aquest procés ens permet la purificació selectiva d'un tipus de proteïna concreta a través d'un Ac capaç de reconèixer-la específicament. Per poder aïllar específicament la proteïna desitjada, unirem primer l'Ac a partícules de proteïna A sepharosa (prot.A) que ens facilitarà l'aïllament i els rentats successius.

8.3.1. Unir l'Ac a la Proteïna A-sepharosa:

Procediment

- Rentar la proteïna A Sepharosa (prot.A) (30 μl de prot.A/condició) dos cops amb 1 ml de solució RIP. Centrifugar a 2000 x g durant 1 min.
- Després del segon rentat deixar incubant 20 min. en agitació amb solució RIP, a 4°C . Aquest pas facilita el bloqueig de la prot. A per l'albumina que conté aquest tampó (evitant posteriors unions proteiques inespecífiques).

- Rentar la prot. A amb PBS i centrifugar a 2000 x g durant 1 min.
- Afegir de 2 a 5 µg d'Ac / condició (per cada 30 µl de prot. A). Incubar durant 1 hora en rotació a 4°C en un volum de 500 a 800 µl de PBS.
- Rentar un cop amb solució RIP. Centrifugar a 2000 x g 1 min.
- Rentar un cop amb tampó de llisi. Centrifugar a 2000 x g 1 min.

8.3.2. Obtenció de la proteïna desitjada

Un cop unit l'Ac a la Prot. A el segon pas consisteix en posar-la en contacte amb el llisat d'on es vol purificar la proteïna en qüestió:

Procediment

- Incubar la prot. A junt amb el llisat cel·lular durant 1h i 30 min a 4°C en agitació. Nosaltres utilitzem 30 µl de prot. A marcada amb 4 µg Ac per cada llisat de 10 a 15.10⁶ cèl·lules.
- Realitzar 6 rentats de les boles de prot. A amb 1 ml de tampó de llisi. Centrifugar a 4°C a 2000 x g durant 1 min.
- Ressuspendre en un volum final de 20 µl de tampó de llisi i afegir 5 µl de tampó de mostra (4x).
- Bullir durant 5 min.
- Centrifugar durant 30 seg. a 12000 x g .
- Recuperar el sobrenadant ó immunoprecipitat.

Materials i solucions

- Proteïna A Sepharosa “protein A-conjugate Sepharose 4 fast flow beads” (Amersham Pharmacia Biothec)
- Ac utilitzat per a la immunoprecipitació: antiserum de conill anti-PI3-K (Upstate Biotechnology)

- Solució RIP
 - Tris (pH 8) 1M
 - EDTA 0,1 M
 - NP-40 125 µl
 - NaCl 5M
 - PMSF 0,5M

- Tampó de mostra (x4)
 - Glicerol 4 ml
 - 2-β-mercaptoetanol 2 ml
 - SDS 0,92 g
 - Tris (pH 6,8) 2,5 ml
 - Bromofenol blue 400 mg
 - H₂O ajustar a un volum final de 10 ml.

8.4. Western blot

8.4.1. Separació de proteïnes per electroforesi

Separació de les proteïnes que hem obtingut després de la immunoprecipitació per electroforesi. Per aquest assaig utilitzem un gel format per una matriu de poliacrilamida i en condicions denaturalitzants (en presència del 0,1% de SDS) per tal de separar les proteïnes segons la seva grandària.

Procediment

- Montar els vidres de suport del gel seguint les recomanacions del fabricant de la cubeta d'electroforesi.
- Preparar 10 ml de gel "separador" al 10% d'acrilamida-bis-acrilamida per 2 minigels (gels de 6 x 8 cm). El percentatge de poliacrilamida que s'utilitza en aquest gel depèn del pes molecular de la proteïna que volem separar, així gels SDS-denaturalitzants al 10 % ens permet separar proteïnes de d'entre 20 i 100 kDa.
- Un cop polimeritzat aquest primer gel, preparar 5 ml d'un segon gel, l'anomenat gel apilador ó "stack", que disposem per sobre del primer i que ens facilitarà l'alineament de les proteïnes abans d'entrar en el gel separador.

- Omplir la cubeta amb una solució de Tris/glicina, l'anomenat tampó de cubeta.
- Un cop carregades les mostres es fan corre a un amperatge fix de 20 mA.

Materials i solucions

- Cubeta d'electroforesi: Mini Protean II (Bio-Rad).
- Gel separador

H ₂ O	4 ml
30% acrilamida / 0,8% bisacrilamida	3,3 ml
1,5 M Tris (pH 8,8)	2,5 ml
10 % SDS	0,1 ml
10 % APS (persulfat amònic)	0,1 ml (inicia la reacció de polimerització)
TEMED	4 µl (accelera la reacció del persulfat)
- Gel apilador

H ₂ O	3,4 ml
30% acrilamida / 0,8% bisacrilamida	0,83 ml
0,5 M Tris (pH 6,8)	0,63 ml
10 % SDS	50 µl
10 % APS (persulfat amònic)	50 µl
TEMED	5 µl
- Tampó de cubeta (10x)

Tris	250 mM
Glicina	192 mM
SDS	34,7 mM

8.4.2. Transferència de les proteïnes del gel a una membrana

Per a la identificació d'un antígen específic amb Ac monoclonals o policlonals, després de la electroforesi, transferim les proteïnes a una membrana PVDF (difluorur de polivinilidé). Les proteïnes transferides s'uneixen a la superfície de la membrana proporcionant l'accessibilitat per que es duguin a terme les reaccions d'immunodetecció.

Procediment

- Un cop finalitzada l'electroforesi es desprecia el gel apilador i s'equilibra el gel separador durant 15 min amb tampó de transferència.
- Retallar la membrana de la mateixa grandaria que el gel. La membrana PVDF és hidrofòbica, per aquesta raó abans de submergir-la en aigua ó tampó de transferència cal mantenir-la 1 ó 2 seg en metanol 100%, posteriorment s'equilibra 15 ó 20 min en tampó de transferència.
- Retallar també 2 trossos de paper de filtre Whatman 3 MM que un cop equilibrats amb tampó de transferència es disposen fent un sandwich de la membrana i el gel.
- La transferència de les proteïnes del gel a la membrana de PVDF es realitza mitjançant l'aplicació d'un camp elèctric en un aparell d'electroblotting sumergint el sandwich completament en tampó de transferència.
- Transferir O/N a 4°C aplicant una corrent de 25V.

Materials i solucions

- Cubeta de transferència: Mini Trans-Blot Transfer (Bio-Rad)
- Membrana Hybond PVDF (Amersham Pharmacia Biotech)
- Tampó de transferència Tris 25 mM
 Glicina 192 mM
 Metanol 20%

8.4.3. Immunodetecció

Finalitzada la transferència es pot utilitzar la membrana per a la detecció de proteïnes amb la utilització d'Ac específics.

Procediment

- Bloquejar la membrana per evitar unions inespecífiques dels Ac. El tampó de bloqueig conté, així, una gran quantitat de proteïna que s'uneix inespecíficament a la membrana.

La font proteica utilitzada en aquest tampó varia segons l'Ac utilitzat. Per la detecció de residus Tyr-fosforilats bloquegem la membrana amb TTBS + 10% de FCS. Per la detecció de qualsevol altre Ag (com PI3-K) utilitzem TTBS + 10% de llet en pols.

- Incubar la membrana amb tampó de bloqueig durant 2 hores en agitació i a temperatura ambient.
- Diluir l'Ac en tampó de bloqueig. Les dilucions que es van utilitzar van ser de 1:1000 en el cas de l'Ac antifosfotirosina (4G10), i una dilució 1:2000 en el cas de l'anti-PI3-K.
- Incubar 60 min a temperatura ambient.
- Transcorregut aquest temps rentar la membrana de l'Ac sobrant. Els rentats es realitzen amb 200 ml de TTBS. Realitzar 6 rentats en agitació i temperatura ambient, el primer de 15 min els altres 5 rentats de 5 min cadascun.
- Després dels rentats diluir l'Ac secundari en tampó de bloqueig, dilució 1:2000. Per detectar l'Ac anti-fosfotirosina s'utilitza un Ac de conill anti-Ig de ratolí conjugat amb peroxidasa (HRP). Per detectar anti-PI3-K s'utilitza un Ac de cabra anti-Ig de conill conjugat, també, amb HRP.
- Incubar a temperatura ambient, en agitació, i en la foscor (per evitar el deteriorament de la peroxidasa).
- Repetir els rentats anteriors.
- Finalment, per a la detecció de la peroxidasa utilitzar un kit de detecció quimioluminiscent aquest conté luminol que en ser oxidat per la peroxidasa passa a un estat excitat, que en decaure a un estat estable emet llum. La reacció té lloc en 1 min. seguint les instruccions del proveïdor del kit.
- Transcorregut aquest temps la membrana es posa en contacte amb un film autoradiogràfic d'alta sensibilitat.
- Exposar el film a la membrana durant, aproximadament, 30 seg.
- Revelar la pel·lícula autoradiogràfica.

Materials i solucions

- Ac anti-Fosfotirosina: Monoclonal del clon 4G10, IgG_{2b} de ratolí (Upstate Biotechnology).
- Ac anti-PI3-K: antiserum de conill anti-PI 3-K (Upstate Biotechnology).
- Ac de conill anti Ig de ratolí conjugat amb HRP (DAKO).
- Ac de cabra anti Ig de conill conjugat amb HRP (DAKO)
- Kit de detecció quimioluminiscent ECL (Amersham Pharmacia Biotech AB).
- Film autorradiogràfic, Hyperfilm ECL (Amersham Pharmacia Biotech AB).
- TTBS (10x)

Na Cl	50 mM
KCl	12 mM
Tris	25 mM
Tween 20	(10 ml / l de tampó)
pH 7,4	

8.5. Rentat ("stripping") i reutilització de les membranes

Aquest procés consisteix en la extracció de l'Ac de la membrana per la posterior reutilització en la immunodetecció d'un altre antígen. Com ja s'ha esmentat aquestes tècniques s'han utilitzat per la detecció de proteïnes amb residus tirosina fosforilats. La possibilitat d'una segona immunodetecció sobre el mateix filtre ens permet primer corroborar, amb un Ac específic, la proteïna on hem valorat prèviament la fosforilació en Tirosina i per tant la qualitat de la immunoprecipitació, i en segon lloc ens permet valorar la quantitat de proteïna ó immunoprecipitat carregat en cada carril.

Procediment

- Submergir la membrana amb 25 ml de solució de stripping.
- Incubar entre 55 i 65°C durant 45 min en agitació.

- Rentar la membrana amb TTBS 6 cops, el primer durant 15 min i els restants durant 5 min., en agitació i a temperatura ambient.
- En aquest moment la membrana està a punt per realitzar una segona immunodetecció.

Materials i solucions

- | | | |
|------------------------|----------------------------|-------------|
| - Solució de stripping | 2- β -mercaptoetanol | 177 μ l |
| | 10 % SDS | 5 ml |
| | Tris 1 M pH 6,7 | 157 μ l |
| | H ₂ O destilada | 18,25 ml. |

9. INDUCCIÓ DEL QUIMIOTACTISME EN NEUTRÒFILS

Per determinar l'activitat biològica ó funcional de les citocines lliurades per les cèl·lules NK, es va valorar la capacitat d'aquestes per induir activitat quimiotàctica sobre els neutròfils. Les cèl·lules NK amb un determinat estímul es van mantenir en cultiu durant 48 h. a 37°C i 5 % de CO₂ (temps en que es va observar la producció de citocines en una quantitat apreciable). Transcorregut aquest temps d'incubació s'extreu el sobrenadant del cultiu i es testa la seva capacitat per induir el quimiotactisme de neutròfils. Com a control positiu es va utilitzar un banc de dilucions de citocina recombinant.

Vàries de les citocines lliurades per les NK són potencialment inductores del quimiotactisme de PMN, així que, per determinar si una citocina concreta és la responsable de l'activitat quimiotàctica detectada es va extreure del sobrenadant per immunoprecipitació segons el procediment especificat en el punt **9.2.**, posteriorment valorem l'activitat quimiotàctica remanent.

9.1. Purificació de neutròfils

Obtenim la població de neutròfils d'un concentrat cel·lular de sang perifèrica d'un donant cedit pel Banc de Sang de la Ciutat Sanitària i Universitària de Bellvitge.

El primer pas consisteix en separar els eritròcits, granulòcits i PMN de les CMNs (limfòcits i monòcits). Per això, utilitzarem el mètode standard de separació de CMNs (*material i mètodes, apartat 1.1.*), basat en un gradient de densitat. Un cop extretes les CMNs per purificar els neutròfils dels eritròcits, granulòcits i de la resta de PMN utilitzem un mecanisme també basat en un gradient de densitat. Les cèl·lules es fan precipitar en una solució de dextrans al 3 %.

Procediment:

- Diluir el concentrat cel·lular amb SF en una proporció aproximada de 1:4 (v:v).
- Centrifugar a 460 x g durant 10 min.
- Depreciar el sobrenadant on hi ha el plasma i les plaquetes.
- Rediluir el concentrat cel·lular amb SF en una proporció de 1:4 (v:v).
- En tubs de base cònica i estèrils (preferentment de 50 ml) s'afegeix el Ficoll-Paque tenint en compte que s'ha de mantenir una proporció de 1 part de ficoll per 2 parts de sang (concentrat cel·lular rediluit) (per tubs de 50ml: 15ml de ficoll + 30ml de sang).
- La sang es fa lliscar suaument per les parets del tub, on prèviament s'ha afegit el ficoll, de forma que no es barregin les dues fases.
- Centrifuguem a 825 x g durant 20 min.
- Recollir la banda de cèl·lules que queda en la interfase, on es troben les CMNs i deprecia-la
- Recollir la resta de cèl·lules que es troben en el pellet (grànuls, hematies i PMN) i resuspendre-les v/v amb PBS.
- Fer una barreja de 1 part de cèl·lules x una part de dextrans T500 al 3 % en PBS.

- Deixar precipitant a temperatura ambient durant 2 h.
- Recollir el sobrenadant.
- Centrifugar a 200 x g durant 10 min.
- Per llisar els hematies restants, resuspendre el pel·let obtingut en 20 ml de NaCl al 0,2 %. Transcorreguts 30 seg. afegir 20 ml de NaCl al 1,6 %. Per evitar la llisi d'altres tipus cel·lulars realitzar aquest procés a una temperatura d'entre 0 i 4°C (en gel).
- Centrifugar a 460 x g durant 10 min.
- Les cèl·lules obtingudes són entre un 80 i un 95 % neutròfils.
- Posar les cèl·lules a una concentració de 5×10^6 neutròfils / ml de SF i deixar-les en gel durant 2 h. per tenir-les en estat quiescent.
- Just abans d'utilitzar-les es centrifuguen a 200 x g durant 10 min.

Materials i solucions

- Ficoll-Paque (Amersham Pharmacia Biotech)
- Dextrà T500 (Amersham Pharmacia Biotech)

9.2. Extracció de citocines del sobrenadant.

Procediment

- Per 1 ml de sobrenadant agafar 20 µl de proteïna-A-sepharosa i rentar 2 cops amb 1 ml de SF. Centrifugar a 3000 x g durant 1 min.
- Resuspendre amb 150 µl de SF i s'afegir 2 µg d'Ac Mo (capaç de reconèixer específicament la citocina que volem extreure).
- Incubar 1 h i 30 min a 4°C en agitació.
- Centrifugar a 3000 x g durant 1 min i deprecier el sobrenadant.
- Un cop conjugades les partícules de sepharosa amb l'Ac es posa en contacte amb la solució d'on volem extreure la citocina en qüestió.

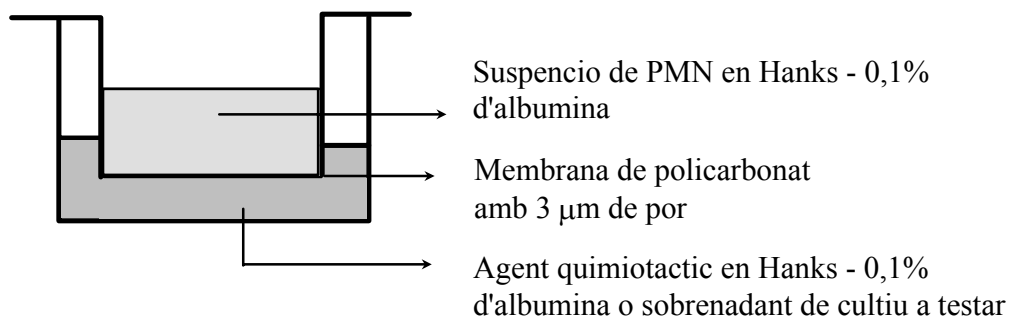
- Incubar 1 h i 30 min a 4°C en agitació.
- Centrifugar a 3000 x g durant 1 min. El sobrenadant restant té el mateix contingut inicial excepte la citocina que hem tret específicament.

Materials i solucions

- Proteïna-A-Sepharosa (Amersham Pharmacia Biotech)
- Ac anti-IL-8 (R&D)

9.3. Quimiotactisme

Per a realitzar aquest experiment fem servir cel·les Millicell-PC de 3 µm de porus. Les cel·les es col·loquen dins de pous de 16 mm de diàmetre (plaques de 24 pous).



Procediment

- Preparar l'agent quimiotàctic a una concentració adequada (IL-8 recombinant) en medi Hanks-0'1 % BSA. Afegir 500 µl per pou, de l'agent quimiotàctic ó de la solució problema.
- Introduir les cel·les millicell en els pous de la placa de manera que la membrana conctati totalment amb el líquid.
- Preparar una solució de PMN amb Hanks-0'1 % BSA a una concentració de 5×10^6 cèl·lules / ml. Introduir 300 µl d'aquesta suspensió dins de cada cel·la.

- Incubar la placa a 37° C i 5 % de CO₂ durant 2 hores.
- Transcorregut el període de incubació extreure les cel·les amb unes pinces i contar el número de PMN que han migrat en el pou, per fer-ho tenyir les cèl·lules amb Tripan Blue i contar amb una càmera de Neubauer.

Materials i solucions

- Millicell-PC de 3 µm de porus (Millipore).
- Plaques de 24 pous (TPP).
- HBSS Hanks (1x) sense vermell fenol (Life Technologies).
- BSA (albúmina bovina) (Sigma).
- IL-8 recombinant (R&D).

1. OBTENCIÓ DE LA SUBPOBLACIÓ DE CÈL·LULES NK.

Per l'obtenció d'aquesta subpoblació limfocitària es va procedir primer a l'obtenció de les cèl·lules mononucleades a través del mètode standard basat en les diferències de densitat que presenten els diferents tipus de cèl·lules sanguínies. Les cèl·lules es van sotmetre al pas per un gradient de densitat (Ficoll-Paque). Posteriorment es va separar la població de cèl·lules NK de la resta de cèl·lules mononucleades per selecció negativa amb esferes immunomagnètiques.

Les poblacions cel·lulars que es van obtenir després del gradient de densitat (CMN) i després de la selecció negativa (NK) es van caracteritzar per citometria de flux.

1.1. Caracterització de les CMN

La fracció de CMNs compren les poblacions de limfòcits i monòcits. Per a la caracterització d'aquestes poblacions es van utilitzar els següents AcMn:

Anti-CD45: Marcador que comparteixen totes les CMNs.

Anti-CD14: Marcador específic de la població de monòcits.

Així doncs les poblacions es caracteritzen per ser:

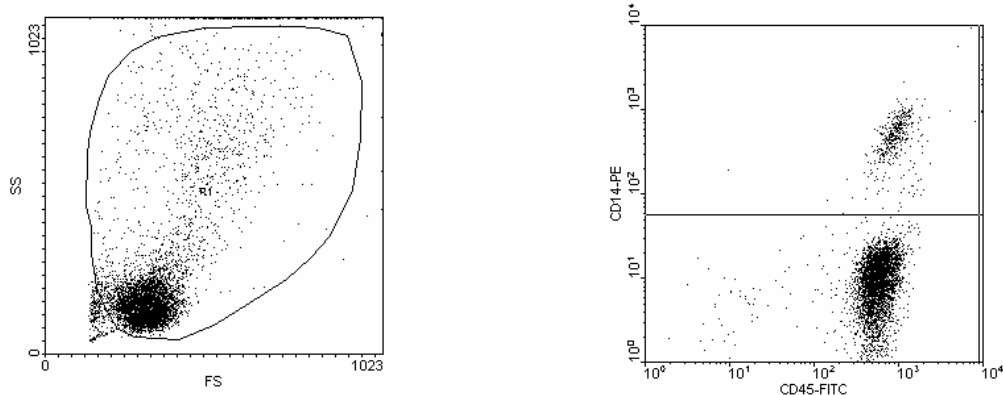
Limfòcits: $CD45^+ CD14^-$

Monòcits: $CD45^+ CD14^+$

Els següents histogrames es van obtenir amb el citòmetre de flux XL de Coulter. En aquests es presenta un exemple de les poblacions cel·lulars que es van obtenir, en finalitzar el pas pel gradient de densitat (Ficoll-Paque) per una banda, i en finalitzar la selecció negativa per l'altre.

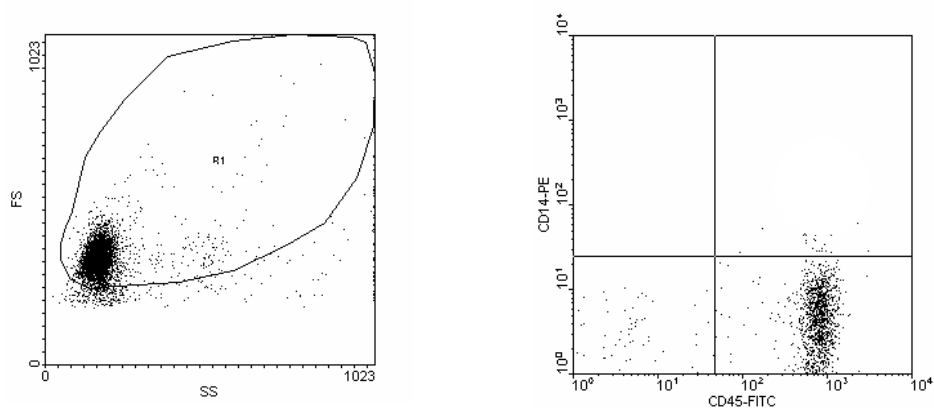
El primer histograma correspon, a l'anàlisi dels paràmetres de grandària (FS) i granulositat (SS). La població seleccionada amb R_1 (en aquest cas el total de la població), serà la seleccionada per analitzar els marcadors CD45 i CD14 per intensitat de fluorescència en el segon histograma.

- **Histogrames de la població cel·lular obtinguda després del Ficoll (CMNs):**



Després de la purificació amb el gradient de densitat obtenim una població de CMN formada per un 91,35 % de limfòcits i un 8,5 % de monòcits

- **Histogrames de la població cel·lular després de la selecció negativa (cèl·lules NK)**



Es va obtenir una població formada per un 93,6 % de limfòcits i un 2 % de monòcits. Amb els histogrames FS/SS també va quedar descartat la presència de cèl·lules PMNs que haguessin pogut quedar com a contaminants després del Ficoll. Aquestes són cèl·lules d'un major tamany i granulositat, pel que es distingeixen fàcilment dels Limfòcits.

1.2. Caracterització de les poblacions limfocitàries

Per a la caracterització dels diferents limfòcits es van utilitzar els següents AcMn:

CD2: l'expressen els LT i les NK.

CD19: l'expressen els LB.

Finalment, realitzem un triple marcatge que ens permet discriminar la població de LT de la població NK:

CD3: l'expressen els LT.

CD16: l'expressen cèl·lules NK i Granulòcits.

CD56: l'expressen cèl·lules NK.

Es consideraren LGLs ó cèl·lules NK aquelles que expressen el fenotip:

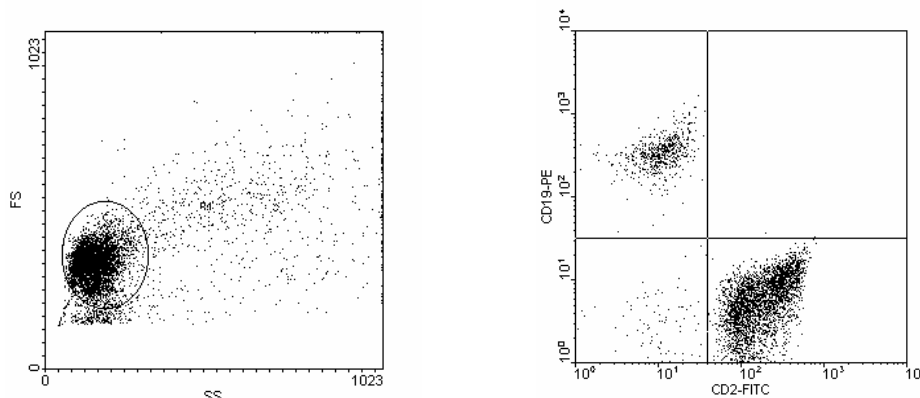
$CD3^- (CD16-CD56)^+$

Els següents histogrames obtinguts amb el citòmetre de flux XL de Coulter representen un exemple de les poblacions cel·lulars que es van obtenir, en finalitzar el pas pel gradient de densitat (Ficoll-Paque) per una banda, i en finalitzar la selecció negativa per l'altre.

1.2.1. LIMFÒCITS B

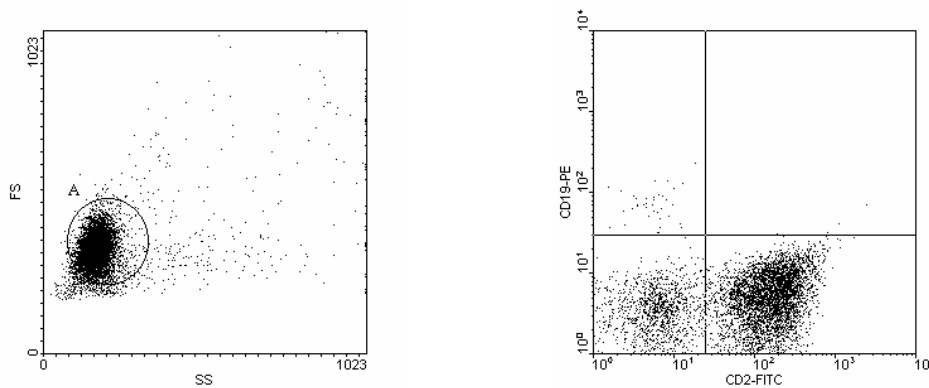
Com en el cas anterior, el primer histograma correspon a l'anàlisi dels paràmetres FS/SS. Les diferents subpoblacions limfocitàries es van analitzar respecte la població limfoide (R_1). Sobre aquesta subpoblació s'analitzà la intensitat de fluorescència pels marcadors CD2 i CD19 després del ficoll i després de la selecció negativa.

- Histogrames de la població cel·lular obtinguda després del Ficoll (CMNs):



Després del ficoll obtenim una població limfocitària amb un 13,5 % de LB i un 83,4 % de LT + NK.

- **Histogrames de la població cel·lular després de la selecció negativa (cèl·lules NK)**



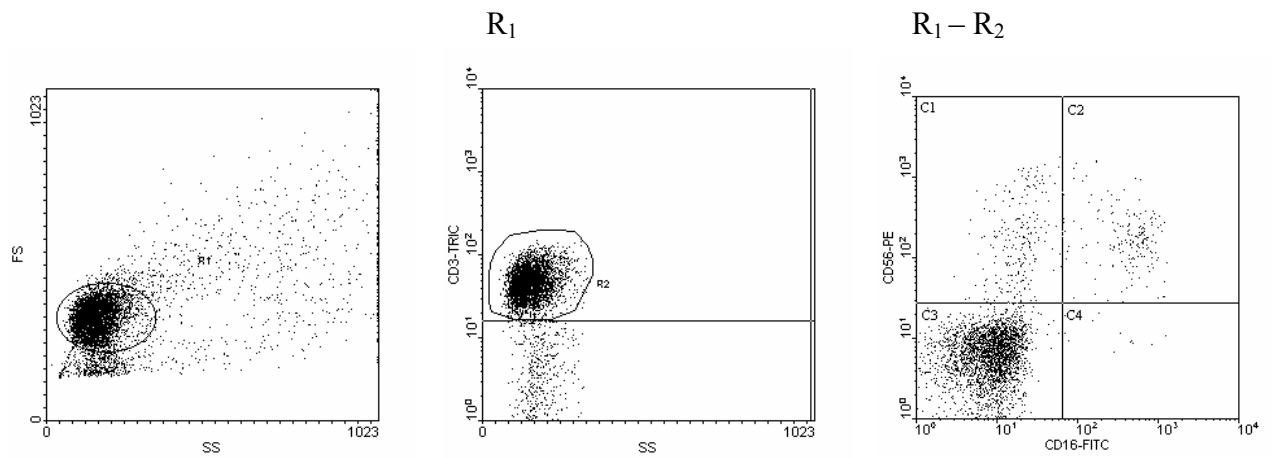
Després de la selecció negativa obtenim una població de limfòcits amb un 0,2 % de limfòcits B.

1.2.2. LIMFÒCITS T I CÈL·LULES NATURAL KILLER

En aquest cas es van analitzar els paràmetres de 3 intensitats de fluorescència pels marcadors CD3, CD16 i CD56 respecte de la població limfocitària (R_1). Com en els casos anteriors el primer histograma ens permet caracteritzar aquesta subpoblació. Els segon histograma ens permet valorar l'expressió del marcador CD3, característic de LT.

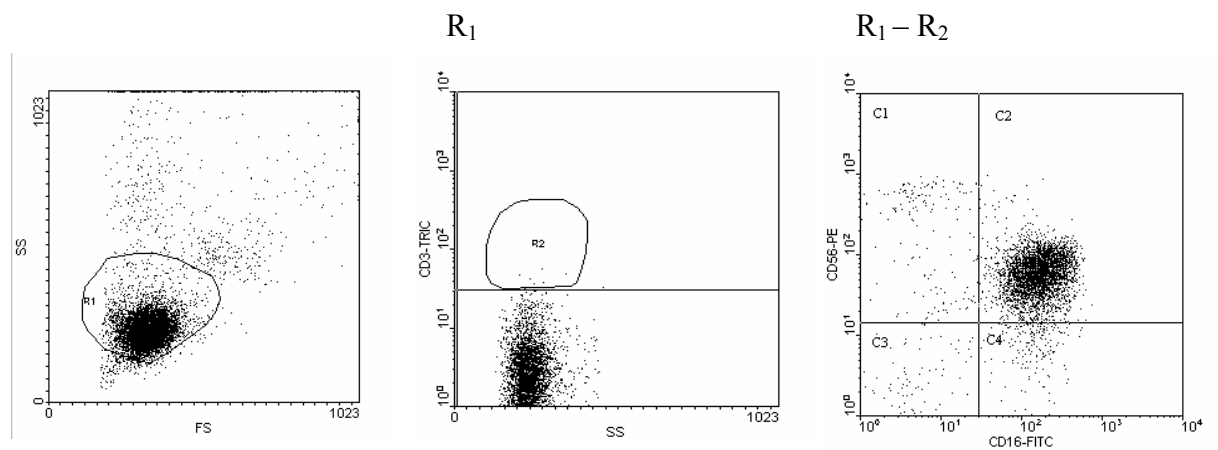
Se sap que determinades subpoblacions de LT (cèl·lules $CD3^+$) poden coexpressar marcadors típics de NK com CD16 ó CD56. El tercer histograma ens permet determinar l'expressió del marcadors CD16 i CD56 de la població limfocitària (R_1) que no expressen CD3 (R_2), és a dir $R_1 - R_2$ (treim, així, del total de la població de limfòcits aquells que expressen CD3 i que són, per tant, LT). Per tant, el percentatge total de cèl·lules NK vindrà donat per la suma dels quadrants C_1 , C_2 i C_4 del tercer histograma.

- **Histogrames de la població cel·lular obtinguda després del ficoll (CMNs):**



Després de la purificació amb el gradient de densitat obtenim una població limfocitària amb un 80,1 % de LT (regió R₂) i un 5 % de cèl·lules NK.

- **Histogrames de la població cel·lular després de la selecció negativa (cèl·lules NK)**



Després de la selecció negativa obtenim una població de LT del 0,8 % (R₂) i de cèl·lules NK del 95,6 % (C₁ + C₂ + C₄).

2. EL F4P INDUEIX A LES NK A LLIURAR CITOCINES

2.1. Valoració de la producció d'IL-8.

Es va determinar la capacitat del F4P per estimular el lliurament d'IL-8 a les cèl·lules NK. Aquestes es posaren en cultiu amb un estímul de 50 ng/ml de F4P, es recolliren els sobrenadants dels cultius en un temps transcorregut entre 0 i 120 hores i es va testar la quantitat d'IL-8 per la tècnica d'ELISA (*Material i mètodes apartat 5*). En la **figura 1** es presenta una cinètica representativa. Els resultats demostren, en primer lloc, que el F4P indueix a les cèl·lules NK a lliurar IL-8 sense el requeriment de cap estímul addicional. En segon lloc, es va observar en tots els casos que les cèl·lules NK lliuren quantitats detectables d'IL-8 al medi sense necessitat de cap estímul.

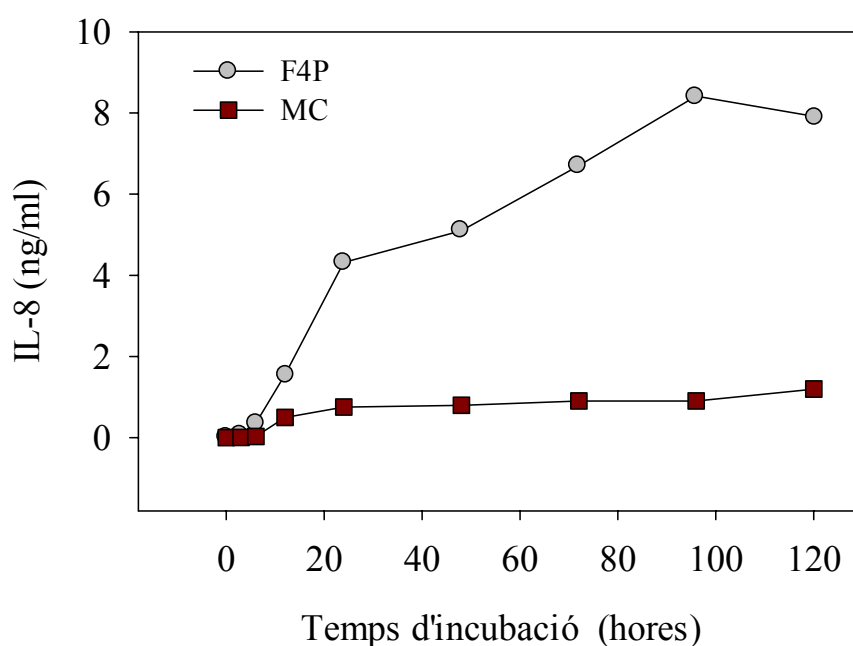


Figura 1. Quantitat antigènica d'IL-8 mesurada per ELISA. Es va posar en cultiu 4×10^6 cèl·lules NK/ml amb F4P (50 ng/ml, (●)), ó amb medi de cultiu (MC) sense factor (■). Els sobrenadants dels cultius es recullen en els diferents temps indicats i es mesura el seu contingut en IL-8. De cada punt es van realitzar triplicats i es representa la mitja de cada un d'ells, els valors corresponen a un experiment representatiu dels 4 que es van realitzar.

Es va provar també l'efecte de la β -TG - NAP-2. Aquesta quimiocina pertany a la mateixa subfamília que el F4P, i es també d'origen plaquetar. En aquest assaig es van incubar cèl·lules NK amb dosis de 0 a 200 ng/ml d'ambdós quimiocines. En cap cas es va obtenir un efecte significatiu de la β -TG, mentre que el F4P augmenta l'estímul fins a la dosi de 100 ng/ml, com es mostra en la **figura 2**. Cal assenyalar que malgrat que en tots els donants testats es va observar un augment en la quantitat d'IL-8 a mesura que s'augmenta la dosi de F4P, no vàrem obtenir la mateixa corba dosi-resposta en tots els casos.

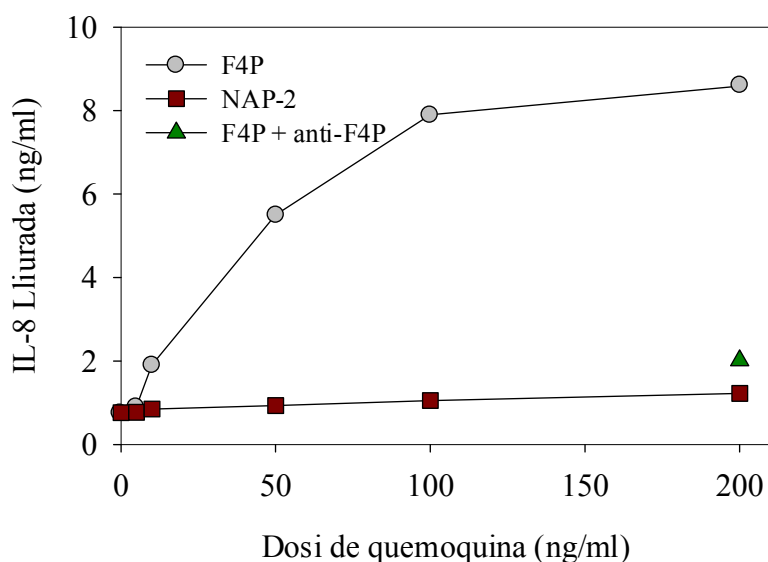


Figura 2. Corba dosi-resposta de l'efecte del F4P i la β -TG-NAP-2 en la producció d'IL-8. Cèl·lules NK altament purificades (4×10^6 /ml) es van posar en cultiu amb les dosis indicades de F4P (■) ó β -TG (•). El punt (▲) correspon a un control de l'experiment, en el qual, una dosi de 200 ng/ml de F4P es va incubar amb un Ac policlonal de conill anti-F4P, posteriorment es va treure amb prot-A-sepharosa. Transcorregudes 48 hores es van recollir els sobrenadants i es va mesurar la quantitat antigènica d'IL-8 per ELISA. Cada punt es realitza per triplicat i la gràfica correspon a un experiment representatiu de 6 realitzats.

2.2. El F4P estimula el lliurament d'IL-1 β , IL-6, INF γ , GM-CSF i TNF α .

Per a determinar la capacitat de les NK per lliurar altres citocines es posaren en cultiu amb les mateixes condicions que el cas anterior: cèl·lules NK purificades, quiescents i amb dosis creixents entre 0 i 100 ng/ml de F4P. Els sobrenadants dels cultius en les diferents condicions es van extreure a les 48 h i es va testar la quantitat de la citocina en qüestió per la

tècnica d'ELISA. Com es mostra en la **figura 3**, el F4P indueix a les cèl·lules NK a lliurar altres citocines amb activitat proinflamadora com són la IL-1 β , IL-6, INF γ , GM-CSF i TNF α .

Es demostra en aquesta figura, també, que l'efecte observat és específic de la quimiocina ja que en extreure-la de les mostres test amb un Ac-policlonal anti-F4P conjugat amb proteïna A Sepharosa (*Material i mètodes apartat 2.4.*) observem la desaparició de l'efecte.

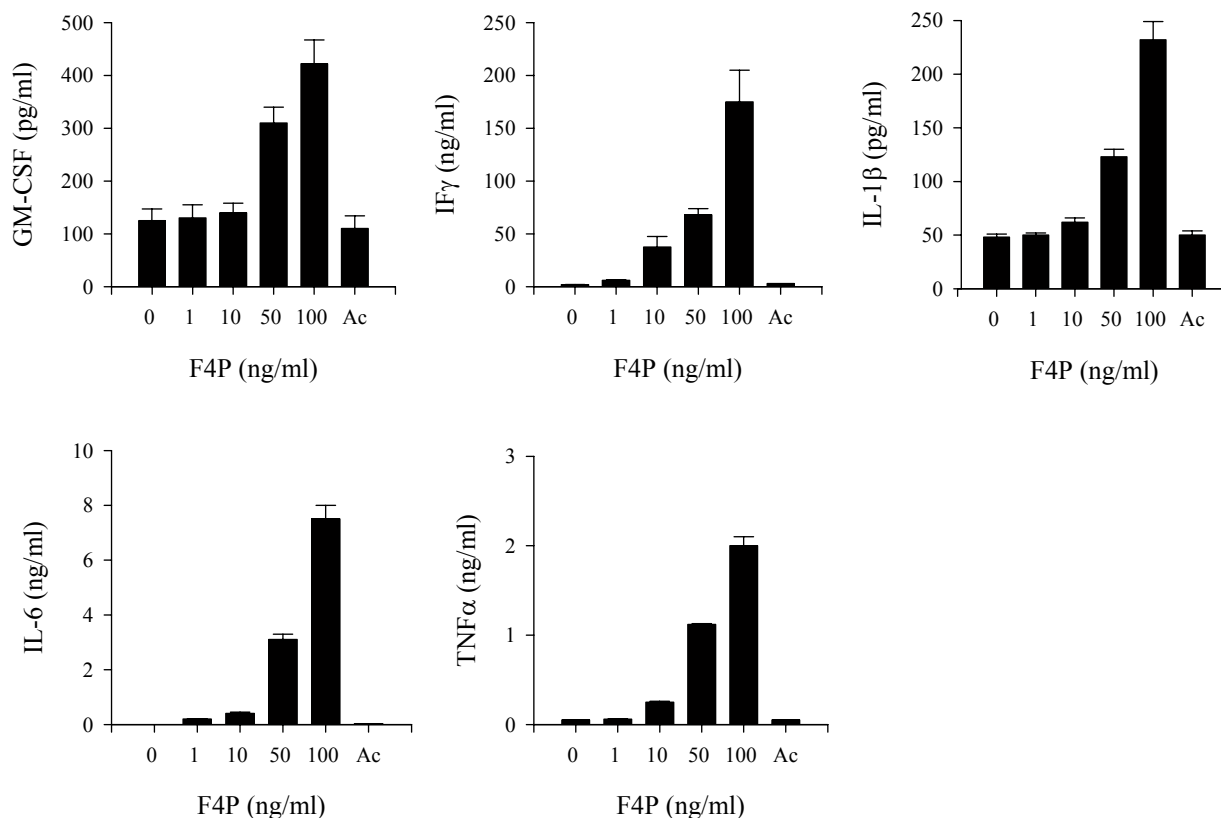


Figura 3. Quantitat antigènica de diferents citocines lliurades per efecte del F4P sobre les NK. Cèl·lules NK purificades es van posar en cultiu amb les dosis indicades de F4P (0-100 ng/ml). Per determinar l'especificitat de l'efecte, l'últim punt (Ac) correspon al cultiu amb una mostra amb 200 ng/ml de F4P a la que se li va extreure la quimiocina amb un Ac-policlonal anti-F4P combinat amb prot-A-sepharosa. A les 48 hores de cultiu es van recollir els sobrenadants i es va mesurar el contingut antigènic de les diferents citocines per ELISA. Cadascun dels punts representa la mitja i desviació standard de 3 experiments diferents amb triplicats de cada un dels punts.

2.3. El F4P sinergitza amb el CD16 en l'activació de les NK.

Com ja s'ha demostrat, el F4P sense necessitat de cap co-estímul és capaç d'induir a les cèl·lules NK a produir diferents citocines amb capacitat proinflamadora, on s'inclou l'IL-8. Prèviament ha estat descrit que es pot estimular la síntesis d'IL-8 en les cèl·lules NK mitjançant diferents factors com són el lligam de FcγRIIIA ó la IL-2 [181].

Per valorar possibles fenòmens de co-estimulació del F4P amb algun d'aquests activadors, es van posar en cultiu, en presència de F4P, cèl·lules NK amb Ac anti-CD16 pre-adherit al plàstic (específic per FcγRIIIA). Com es mostra en la figura 4 el lliurament d'IL-8 per efecte del F4P més l'anti-CD16 (*) fou entre 4 ó 5 vegades superior als nivells induïts per l'Ac anti-CD16 sol (**), i sobre 10 vegades per sobre dels nivells induïts per l'estímul del F4P sol (***).

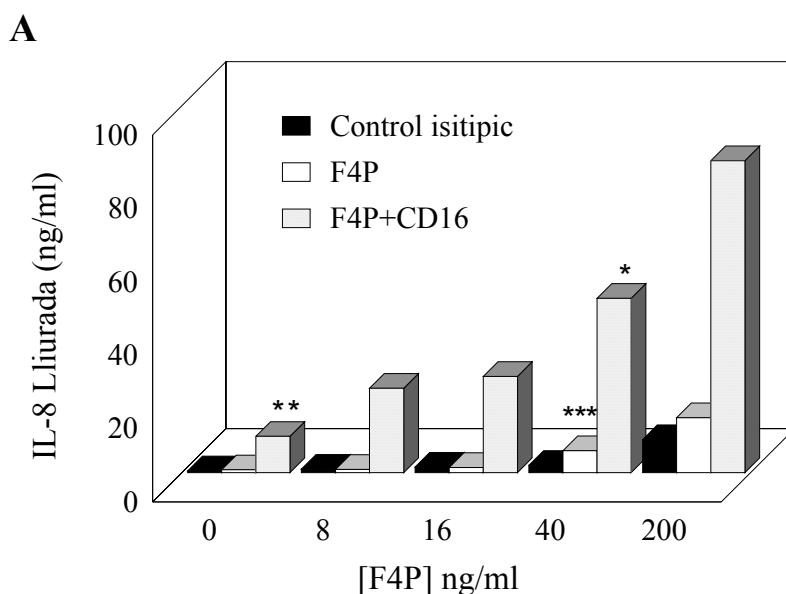


Figura 4 Corba dosi-resposta de l'efecte sinèrgic del F4P i el CD16 en el lliurament d'IL-8. Cèl·lules NK purificades (4×10^6 /ml) es van pre-incubar durant 30 min. amb F4P, posteriorment es van posar en cultiu durant 48 hores amb Ac anti-CD16 pre-adherit als pous (400 ng/pou, en plaques de 96 pous) (F4P+Ac CD16) ó amb un Ac isotípic a la mateixa dosi.

A diferència d'aquest efecte sinèrgic del F4P amb l'estímul del FcγRIIIA, no es veuen diferències en les quantitats d'IL-8 que s'observen amb el F4P en presència o absència de rIL-2, **figura 5**.

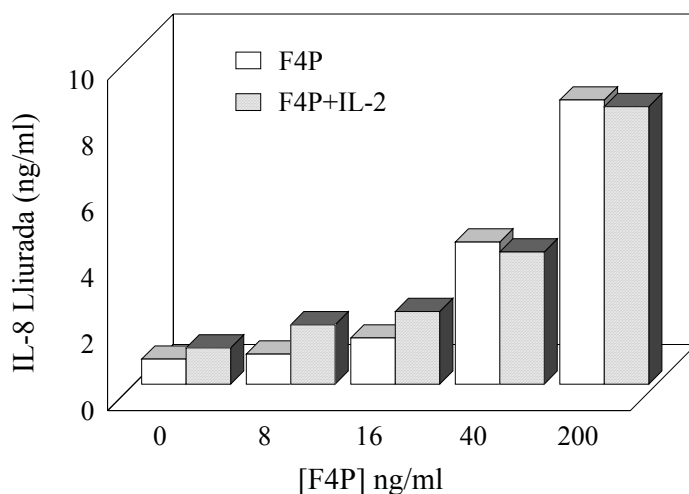


Figura 5. Corba dosi-resposta de l'efecte sinèrgic del F4P i l'IL-2 en el lliurament d'IL-8. Cèl·lules NK ($4 \times 10^6/ml$) es van pre-incubar durant 30 min. amb F4P, posteriorment es van posar en cultiu durant 48 hores amb 50 UI/ml d'IL-2 (F4P+IL-2), ó sense cap altre estímul adicional (F4P). Es van recollir els sobrenadants i es va quantificar per ELISA la presència d'IL-8. Les diferències que vàrem observar no foren significatives.

2.4. Cinètica de lliurament de la IL-8. Efecte de la cicloheximida i l'actinomicina C.

S'han realitzat experiments de valoració de la cinètica de secreció de l'IL-8, analitzant-se, també, els nivells d'IL-8 preformada en aquestes cèl·lules. Per a determinar-la es realitzaren llisats cel·lulars immediatament després de la purificació de les cèl·lules, obtenint-se en tots els casos certa quantitat d'IL-8 preformada intracitoplasmàtica.

Paral·lelament valorem l'efecte de l'Actinomicina D (Act D) (substància capaç d'inhibir la transcripció) i de la cicloheximida (CHX) (substància inhibidora de la traducció) sobre l'activitat del F4P. Aquest experiment té com a objecte la valoració indirecte del mecanisme de regulació del F4P, determinant si la regulació és pre ó post-transcripcional. Les dosis utilitzades per cada un d'aquests factors són les que s'indiquen en el peu de la figura 6. Es van extreure els sobrenadants dels cultius en les hores indicades (de 3 a 120 hores).

Observem que tant l'Act. D com la CHX provoquen una disminució en els nivells de producció de citocina.

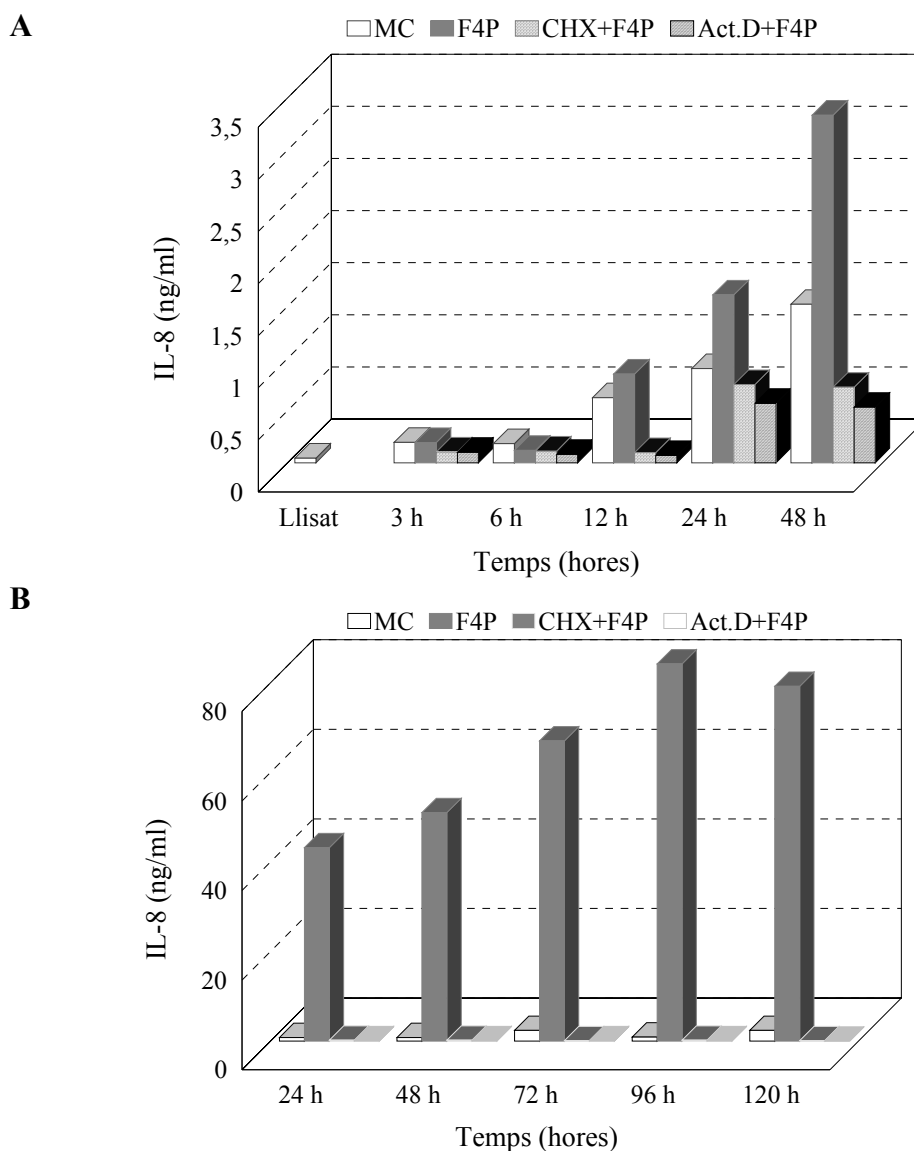


Figura 6. Cinètica de lliurament d'IL-8 de les cèl·lules NK ($4 \times 10^6/ml$) incubades amb els següents estímuls: (a) F4P (50 ng/ml), (b) pre-incubació durant 30 min. amb Act.D (10 $\mu g/ml$) i posteriorment estimulat amb F4P (50 ng/ml), (c) pre-incubació durant 30 min. amb CHX (10 $\mu g/ml$) i posteriorment estimulat amb F4P (50 ng/ml) i (d) sense cap estimulat (MC). Transcorreguts els temps indicats per cada punt es van recollir els sobrenadants i es va mesurar la quantitat d'IL-8 per ELISA. Les gràfiques A i B corresponen a 2 experiments amb donants diferents, on s'han solapat els punts de 24 i 48 hores, les diferències que observem entre donants per efecte d'aquests estímuls són quantitatives i no qualitatives.

2.5. Efecte del conjugat F4P-heparina sepharosa

Fisiològicament se sap que el F4P s'uneix amb una forta afinitat i àvides als glicosaminoglicans que es localitzen en la superfície cel·lular i matriu extracel·lular de

l'endoteli vascular. Aquesta capacitat fa que el F4P que es lliura al torrent sanguini degut a un estímul inflamatori, sigui ràpidament segrestat per aquestes molècules desapareixent de la circulació. L'objectiu d'aquest assaig fou el determinar si el F4P unit a heparina mantenia la capacitat d'estimular les cèl·lules NK. Com es mostra en la **figura 7** es van agafar dues dosis representatives de F4P i es van conjuguar amb heparina-sepharosa (*Material i mètodes apartat 2.5.*). A les 48 hores de cultiu es va valorar la capacitat d'aquests conjugats d'incrementar el lliurament d'IL-8 en les cèl·lules NK. Els resultats demostren que els conjugats de F4P-Heparina mantenen la capacitat del F4P per induir la producció d'IL-8 en les cèl·lules NK, sent les diferències en l'efecte entre el factor lliure i el conjugat no significatives.

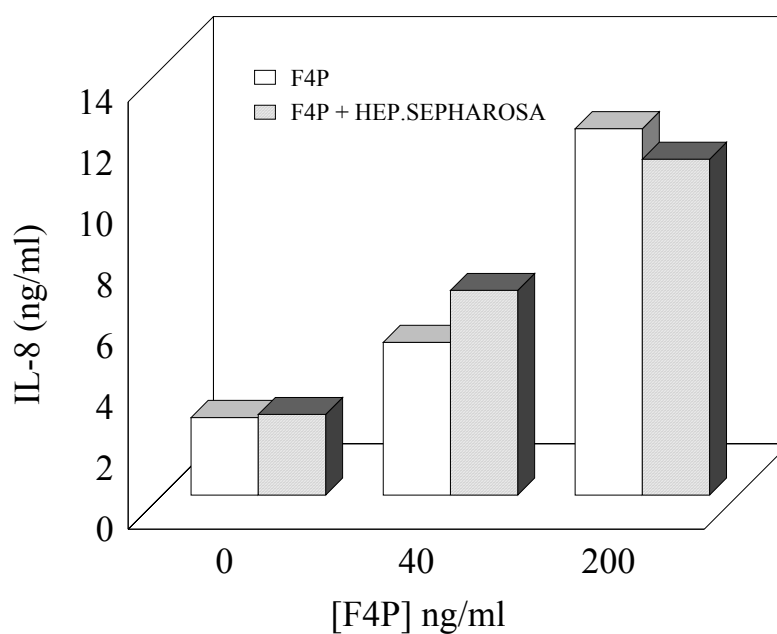


Figura 7 Capacitat del F4P unit a heparina-sepharosa d'estimular les cèl·lules NK a lliurar IL-8. Cèl·lules NK purificades es van posar en cultiu amb les dosis indicades de F4P lliure ó acomplexat a heparina-sepharosa, transcorregudes 48 hores es van recollir els sobrenadants i es va mesurar la quantitat d'IL-8 per ELISA.

3. EL F4P INCREMENTA EL mRNA DE CITOCINES EN LES NK.

Per determinar l'efecte del F4P en la producció de les diferents citocines per les cèl·lules NK es va determinar, també, l'expressió gènica de cada una d'elles en resposta al F4P de manera dosis i temps-depenent.

Es va extreure RNAm en cada una de les diferents condicions, es va obtenir cDNA a través de la reacció de transcripció reversa (RT). Posteriorment es va realitzar un anàlisi per PCR semiquantitativa de la variació en l'expressió del mRNA de cada una de les citocines testades respecte els nivells de mRNA de β -actina (*material i mètodes, apartat 6*).

3.1. Increment en els nivells de mRNA d'IL-8. Un efecte transcripcional.

Es van realitzar corbes dosi-resposta, **figura 8 B**, cinètiques d'expressió de mRNA **figura 8 C**, així com també es va valorar l'efecte de la CHX en els nivells de mRNA d'IL-8, **figura 8 A**.

El resultat mostra un increment del mRNA d'IL-8 per efecte del F4P, que s'inicia a les 3 hores de cultiu de les cèl·lules amb el factor. També observem que per efecte de la CHX l'increment de mRNA és superior al que es detecta en presència de F4P sol.

Aquest resultat junt amb l'efecte contrari de la CHX observat en la valoració de la quantitat proteica de la citocina ens va suggerir que l'augment de mRNA sigui degut a una acumulació del mateix mRNA que no es tradueix a proteïna, i que per tant, estaríem davant d'una regulació de tipus transcripcional.

Finalment cal assenyalar que obtenim un pic d'expressió de mRNA d'IL-8 a les 6 hores de cultiu, mentre que a les 12 hores comença a decaure, i que la corba dosi resposta coincideix amb la corba obtinguda amb la producció antigènica de la citocina.

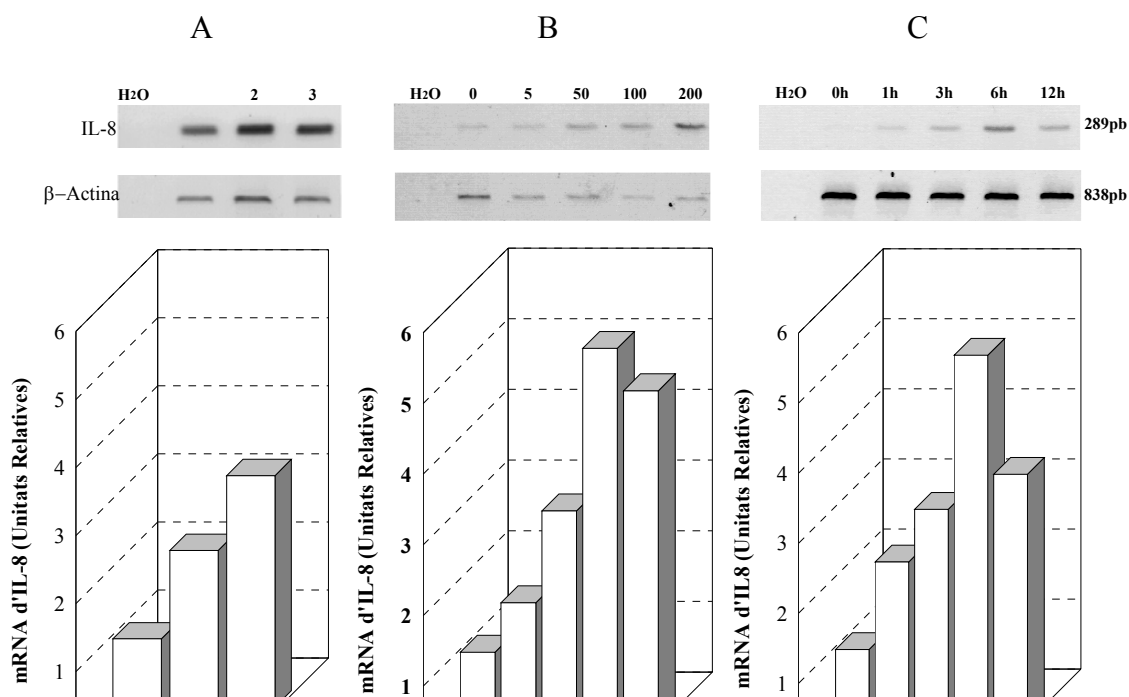


Figura 8. Efecte transcripcional del F4P en la síntesis d'IL-8 per les NK. Cada condició corresponen a 15×10^6 NK que es van posar en cultiu amb F4P. Es va extreure RNA i es va analitzar per RT-PCR. Les bandes es van quantificar densitomètricament. Com a estimació del mRNA d'IL-8 es va calcular l'índex IL-8 mRNA / β -Actina mRNA. Aquesta conversió normalitza les variacions artefactuals originades pel processament de la mostra. El nivell de mRNA en el punt 0 s'ha utilitzat com a referència (nivell=1) per estimar els valors de mRNA dels diferents punts experimentals.

A Efecte de la CHX. Cèl·lules NK es van incubar durant 6 hores amb medi sol (MC); F4P (50 ng/ml); CHX (10 μ g/ml, es va pre-incubar 30 min) més F4P (50 ng/ml, incubació durant 6 hores més).

B Dosi-Resposta: Cèl·lules NK cultivades 6 hores amb F4P a les dosis indicades.

C Cinètica: cèl·lules NK incubades amb F4P (50 ng/ml) i processades en els temps indicats.

3.2. Augment del mRNA d'IL-1 β , IL-6, INF γ , GM-CSF i TNF α .

Per determinar l'efecte del F4P en la producció de les diferents citocines per les cèl·lules NK es va determinar, també, l'expressió gènica de cada una d'elles en resposta al F4P de manera dosis i temps-depenent. Com es mostra en la **figures 9, 10, 11, 12 i 13** es va observar un augment dels nivells de mRNA de totes les citocines testades, amb un patró dosi-resposta similar. L'efecte del F4P va ser detectable a partir d'una dosis de 5 ng/ml, observant-se nivells de mRNA màxim amb una concentració de F4P entre 50 i 200 ng/ml.

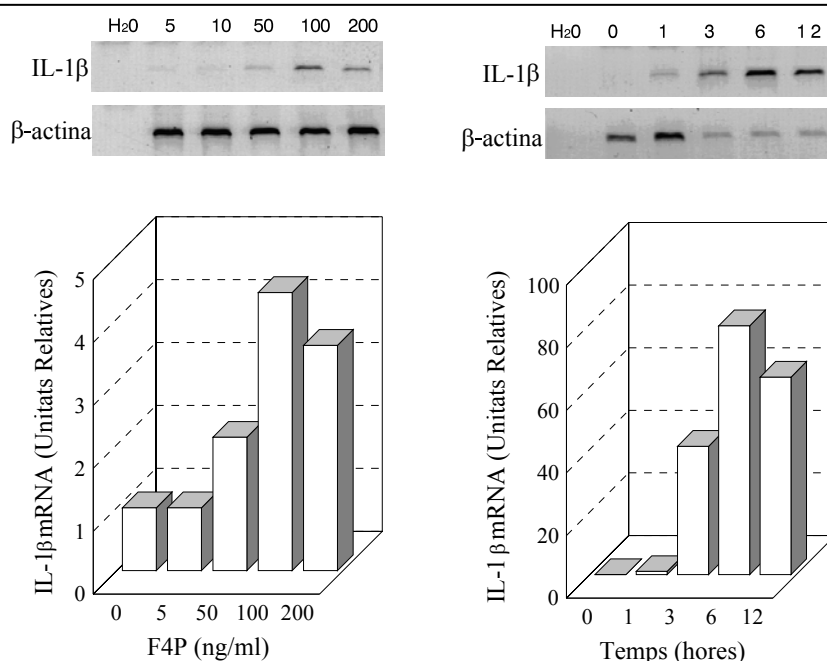


Figura 9 Corba dosi-resposta (esquerra) i cinètica (dreta) de l'efecte del F4P sobre la quantitat de mRNA d'IL-1β. El F4P provoca un augment de la quantitat de mRNA d'IL-1β. Es van posar en cultiu 15×10^6 cèl·lules NK per cada condició, el processament de les mostres va ser: Dosi-resposta: cèl·lules NK posades en cultiu durant 6 hores amb F4P a les dosis indicades. Cinètica: cèl·lules NK incubades amb F4P (50 ng/ml) i processades en les temps indicats.

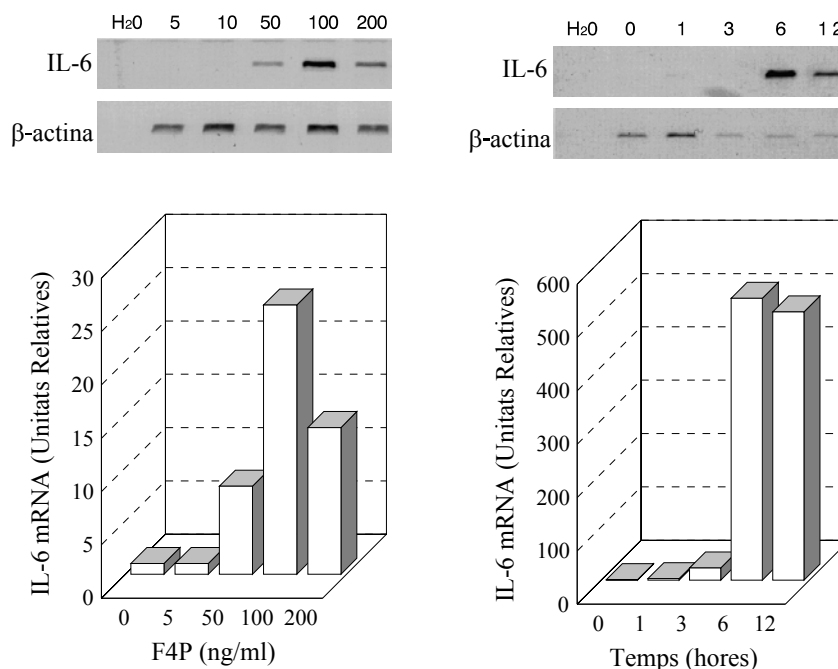


Figura 10 Corba dosi-resposta (esquerra) i cinètica (dreta) de l'efecte del F4P sobre la quantitat de mRNA d'IL-6. El F4P provoca un augment de la quantitat de mRNA d'IL-6. Es van posar en cultiu 15×10^6 cèl·lules NK per cada condició, el processament de les mostres va ser el mateix que en el cas anterior: Dosi-resposta: cèl·lules NK posades en cultiu durant 6 hores amb F4P a les dosis indicades. Cinètica: cèl·lules NK incubades amb F4P (50 ng/ml) i processades en les temps indicats.

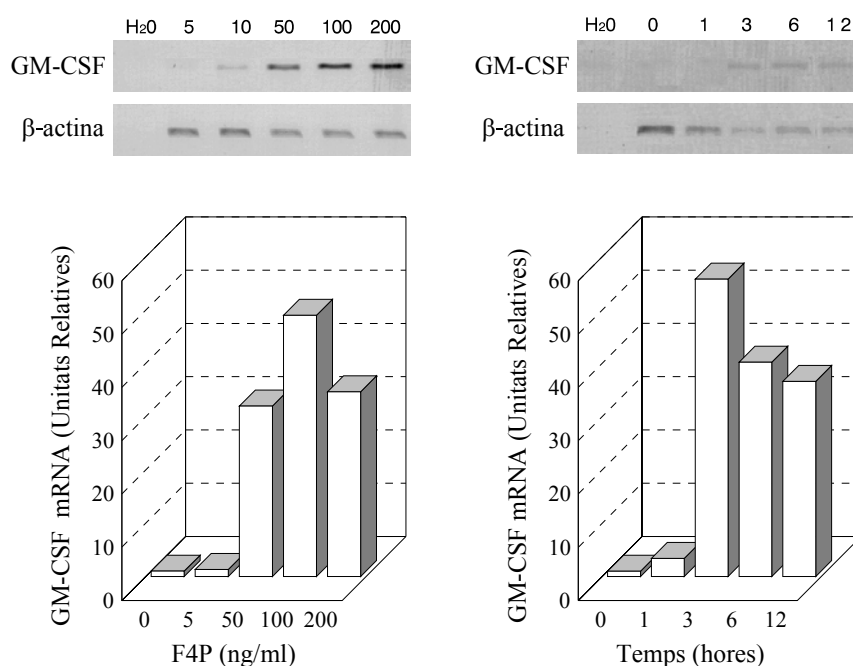


Figura 11 Corba dosi-resposta (esquerra) i cinètica (dreta) de l'efecte del F4P sobre la quantitat de mRNA de GM-CSF. El F4P provoca un augment de la quantitat de mRNA de GM-CSF. Es van posar en cultiu 15×10^6 cèl·lules NK per cada condició, el processament de les mostres va ser el mateix que en els casos anteriors: Dosi-resposta: cèl·lules NK posades en cultiu durant 6 hores amb F4P a les dosis indicades. Cinètica: cèl·lules NK incubades amb F4P (50 ng/ml) i processades en els temps indicats.

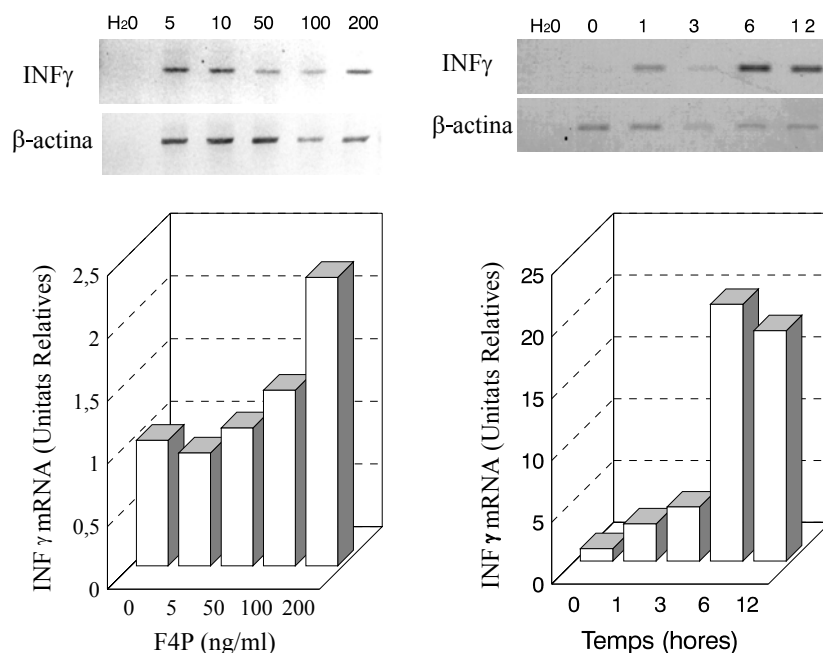


Figura 12 Corba dosi-resposta (esquerra) i cinètica (dreta) de l'efecte del F4P sobre la quantitat de mRNA d'INFγ. El F4P provoca un augment de la quantitat de mRNA d'INFγ. Es van posar en cultiu 15×10^6 cèl·lules NK per cada condició, el processament de les mostres va ser el mateix que en els casos anteriors: Dosi-resposta: cèl·lules NK posades en cultiu durant 6 hores amb F4P a les dosis indicades. Cinètica: cèl·lules NK incubades amb F4P (50 ng/ml) i processades en els temps indicats.

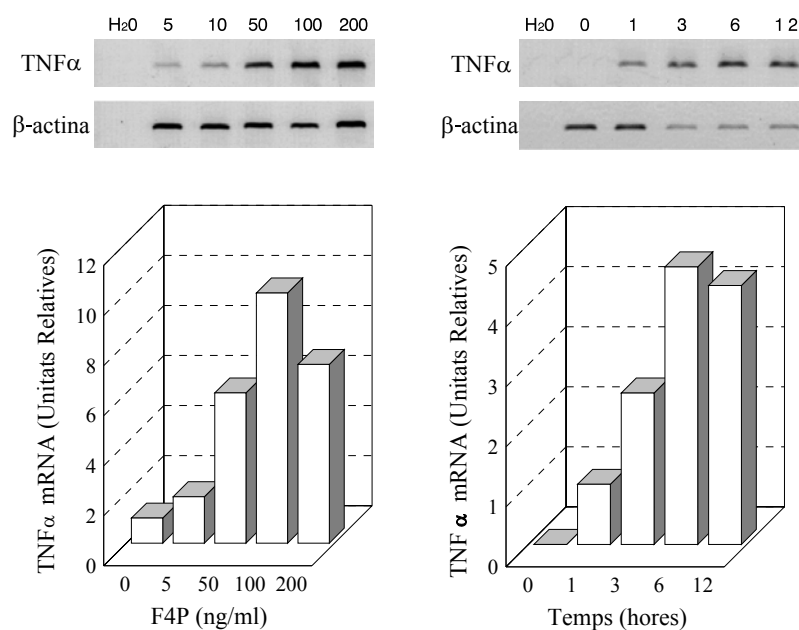


Figura 13 Corba dosi-resposta (esquerra) i cinètica (dreta) de l'efecte del F4P sobre la quantitat de mRNA de TNF α . El F4P provoca un augment de la quantitat de mRNA de TNF α . Es van posar en cultiu 15×10^6 cèl·lules NK per cada condició, el processament de les mostres va ser el mateix que en els casos anteriors: Dosi-resposta: cèl·lules NK posades en cultiu durant 6 hores amb F4P a les dosis indicades. Cinètica: cèl·lules NK incubades amb F4P (50 ng/ml) i processades en els temps indicats.

4. EFECTE DEL F4P SOBRE L'ACTIVITAT CITOTÒXICA.

Les cèl·lules NK han estat considerades com la primera línia de defensa de l'organisme, es caracteritzen per tenir activitat citotòxica basal, es a dir, tenen la capacitat de lliar determinades cèl·lules diana sense un estímul previ. S'han descrit, però, varis factors amb capacitat per regular aquesta capacitat citotòxica com és el cas de l'IL-2. L'IL-2 és una citocina amb capacitat tant per augmentar l'eficiència de lliar, incrementant l'activitat NK, com per augmentar el ventall de cèl·lules diana que pot reconèixer la cèl·lula, el que es coneix com activitat LAK.

4.1. Variabilitat de l'activitat citotòxica basal

Un estudi col·lateral en el nostre laboratori, ens va permetre observar la variabilitat de les activitats NK i LAK basals entre donants sans. Es van determinar aquestes activitats sobre CMNs. Els resultats obtinguts de 190 donants sans es van representar en diagrames de caixa ó “box plot” (**figura 14**) que ens donen una major idea de la dispersió dels resultats. El 50 % central de les activitat citotòxica NK es va trobar entre 12,3 i 34,3 UL/10⁹ CMN (mediana =22,8). L'activitat citotòxica LAK va variar entre 0 i 11,8 UL/10⁹ CMN (mediana = 3,96).

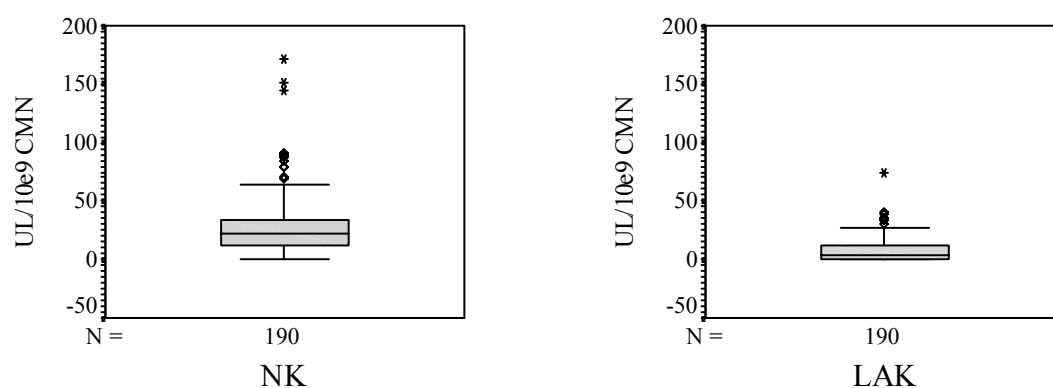


Figura 14. Mesures de les activitats citotòxiques basals NK i LAK, mesura sobre 190 donants sans. El box plot ó diagrama de caixa està format per un rectangle ó caixa que delimita el 50 % dels valors, aquells que es troben entre els percentils 25 i el 75. La línia de l'interior del rectangle representa la mediana. Les dues prolongacions que surten de la caixa, anomenades “patilles”, corresponen als valors màxim i mínim. Finalment, els cercles indiquen els valors anòmals.

4.2. El F4P no té efecte sobre les activitats NK i LAK, però sí sobre l'ADCC.

Es va voler determinar l'efecte del F4P sobre la capacitat citotòxica de les cèl·lules NK. Per realitzar aquest experiment es van posar en cultiu durant 18 hores cèl·lules NK purificades amb les dosis de F4P que s'indiquen en la **figura 15**. Transcorregut aquest temps es van valorar les activitats citotòxiques NK, LAK i ADCC. Les tres activitats es van valorar mitjançant un assaig standard de lliurament de ⁵¹Cr durant 4 hores, tal i com s'ha especificat en el *material i mètodes apartat 3*.

Els resultats van demostrar que el F4P no indueix cap efecte sobre les activitats citotòxiques NK ó LAK, però sí es capaç d'estimular l'ADCC de forma dosi dependent. Aquest resultat que es va obtenir en 4 dels 6 donants que es van testar.

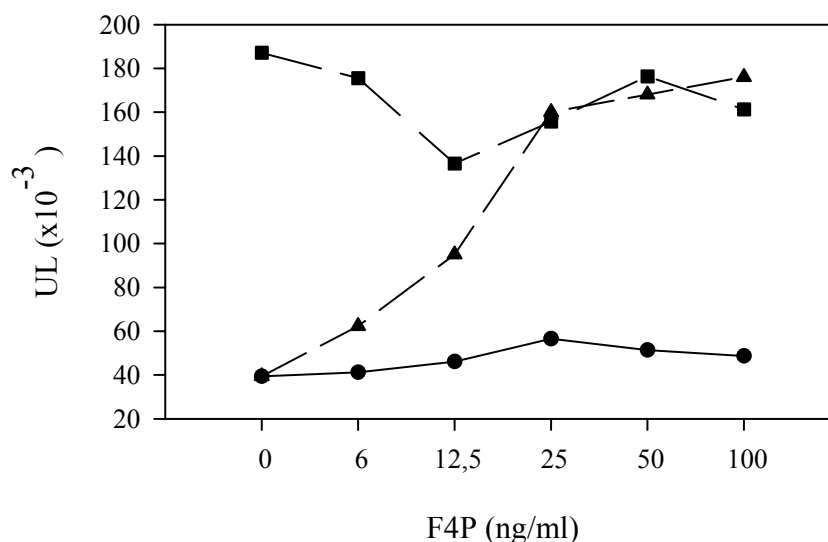


Figura 15 Corba dosi-resposta de l'efecte del F4P sobre les activitats citotòxiques NK, LAK i ADCC. La quimiocina F4P estimula l'activitat ADCC (▲) però no indueix cap efecte sobre les activitats NK (●) ó LAK (■). Cèl·lules NK purificades van ser pretractades amb F4P durant 18 hores en les diferents dosis indicades. Posteriorment es va realitzar un assaig standard de 4 hores de lliurament de ⁵¹Cr (material i mètodes apartat 3).

4.3. Comparació dels efectes del F4P i l'IL-2 sobre l'activitat citotòxica.

Els resultats obtinguts de l'efecte del F4P sobre les diferents activitats citotòxiques varen mostrar una important variabilitat, tant de tipus quantitatiu com qualitatiu. Per altra banda, hi ha poca uniformitat en els resultats observats en la bibliografia sobre l'efecte d'altres quimiocines en l'activitat citotòxica. Per aquesta raó es va valorar sobre la població total de cèl·lules mononucleades (CMN) de 20 donants sans l'efecte de l'IL-2, i del F4P sobre les activitats NK, LAK i ADCC.

Com s'observa en les representacions "caixa" ó "box plot" de la **figura 16** els resultats són coincidents amb els obtinguts amb cèl·lules NK purificades (**figura 15**). El F4P no té cap efecte estadísticament significatiu sobre les activitats NK i LAK, i confirmen els resultats de la bibliografia, la IL-2 estimula ambdues activitats. En canvi, el F4P incrementa de forma estadísticament significativa l'activitat ADCC, mentre que la IL-2 no té un efecte significatiu sobre l'ADCC.

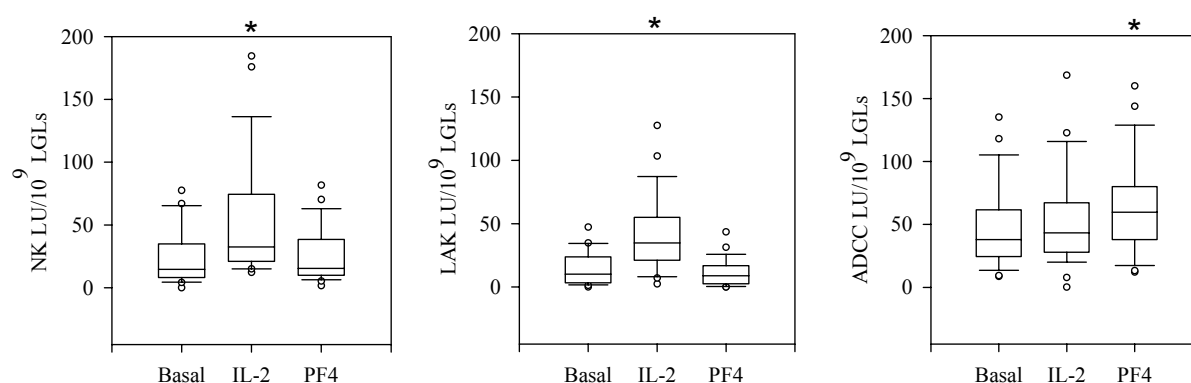


Figura 16. Efecte del F4P i l'IL-2 sobre les activitats NK, LAK i ADCC en mostres de CMNs de 20 donants sans. Les dades es presenten en forma de gràfiques de caixa. Els asteriscs (*) mostren els tractaments que presenten diferències significatives amb les cèl·lules no tractades, amb una $p \leq 0,001$, d'acord amb el test no paramètric per dades aparellades, test de Wilcoxon. El box plot ó diagrama de caixa està format per un rectangle ó caixa que delimita el 50 % dels valors, aquells que es troben entre els percentils 25 i el 75. La línia de l'interior del rectangle representa la mediana. Les dues prolongacions que surten de la caixa, anomenades "patilles", corresponen als valors màxim i mínim. Finalment, els cercles indiquen els valors anòmals.

5. EL F4P NO TÉ EFECTE SOBRE LA PROLIFERACIÓ DE LES NK.

Per la determinació de la proliferació cel·lular mesurem la incorporació de ^3H -Timidina en el DNA segons les especificacions que es detallen en el *material i mètodes apartat 4*. Es va determinar l'efecte de l'estímul testat després de 48 hores de cultiu. Transcorregut aquest temps es va afegir ^3H -Timidina en el cultiu, 16 hores després es va procedir a la determinació de la incorporació de l'isòtop en el DNA. Com es pot veure en la

figura 17 no es produeix cap increment significatiu de la proliferació cel·lular per efecte del F4P.

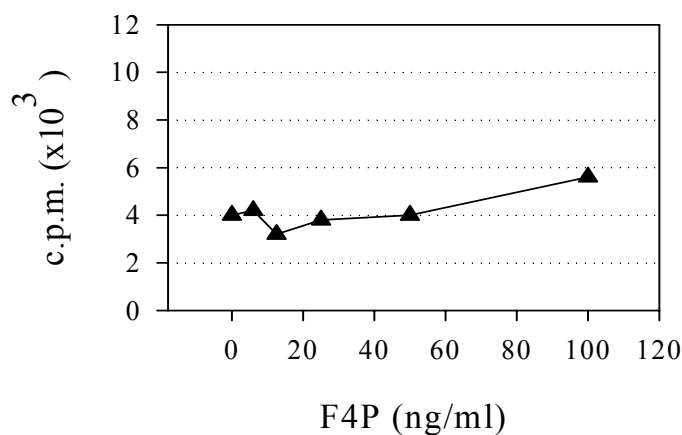


Figura 17 Corba dosi-resposta de l'efecte del F4P sobre la proliferació de les cèl·lules NK. Com es mostra, no es va observar un efecte significatiu del F4P sobre la proliferació d'aquestes cèl·lules. En aquesta gràfica es presenten els resultats que es van obtenir en posar en cultiu cèl·lules NK amb diferents dosis de F4P, en cap cas es va obtenir una diferència significativa respecte les cèl·lules no tractades.

L'IL-2 s'ha descrit com el principal estimulador de la proliferació de les cèl·lules NK. Per aquesta raó, es va valorar si el F4P tenia algun efecte co-estimulador amb aquesta citocina. Com es mostra en la **figura 18**, en cap de les dosis testades el F4P va ser capaç d'incrementar la proliferació cel·lular induïda per l'IL-2, després de 48 hores de cultiu.

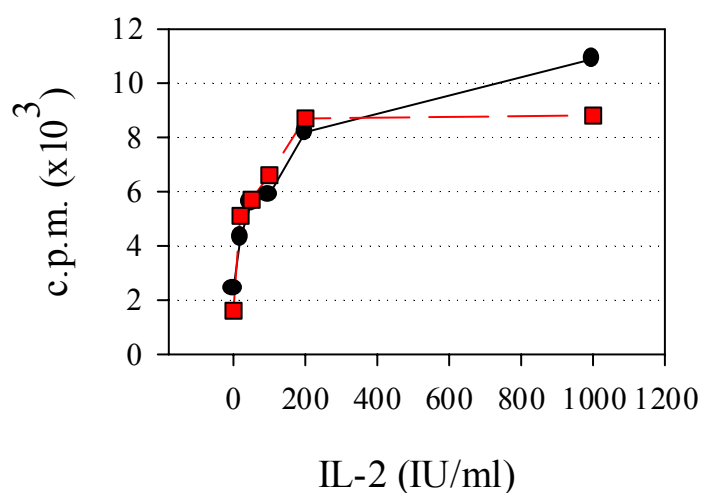


Figura 18 Corba dosi-resposta de l'efecte del F4P sobre la capacitat proliferativa de les cèl·lules NK estimulades amb IL-2. El F4P no va potenciar l'activitat proliferativa de les cèl·lules NK estimulades amb IL-2. La gràfica presenta els resultats de posar en cultiu aquestes cèl·lules amb diferents dosis d'IL-2 (●) o amb les dosis indicades d'IL-2 + 50 ng/ml de F4P (■). No es va obtenir cap diferència significativa, entre aquestes dues condicions.

6. CAPACITAT FUNCIONAL DE L'IL-8 PRODUÏDA PER LES NK.

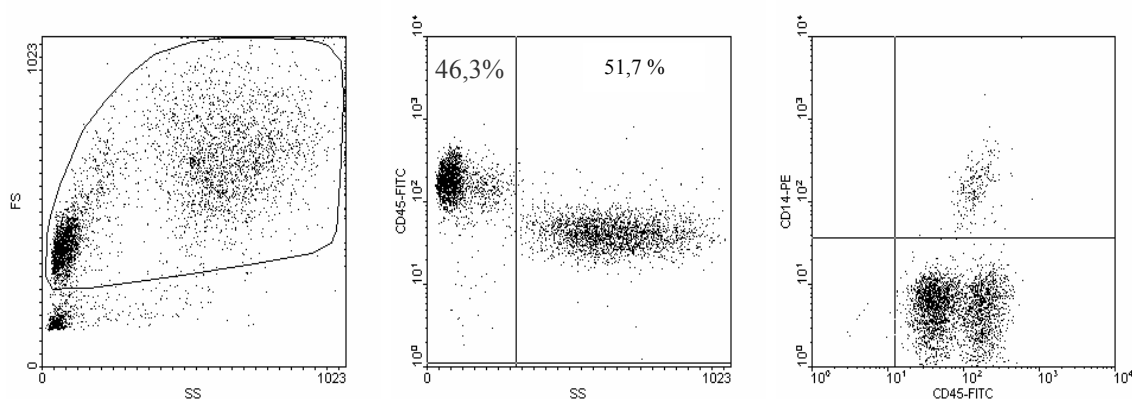
L'objectiu d'aquest apartat va ser determinar si els factors lliurats per les cèl·lules NK estimulades amb F4P tenen capacitat per induir una resposta quimiotàctica en cèl·lules polimorfonucleades. I sent així, es va valorar si aquesta capacitat era total o parcialment deguda a l'IL-8 lliurada per les NK.

6.1. Obtenció de neutròfils purificats.

Es va obtenir aquesta població d'un concentrat cel·lular donat pel banc de sang. El primer pas consisteix en extreure les CMNs sotmetent les cèl·lules a un gradient de densitat (Ficoll-Paque). Per separar els neutròfils ó PMNs dels eritròcits i granulòcits es va realitzar un nou pas per un gradient de densitat, en aquest cas dextrà al 3% (*material i mètodes, apartat 9.1.*).

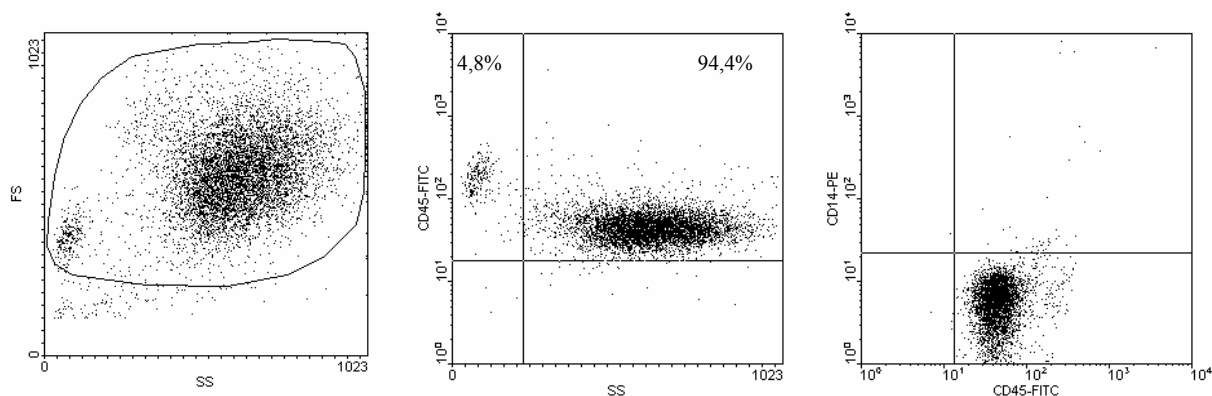
La població resultant es va analitzar per citometria de flux. Aquesta població és la que es pot veure en els histogrames següents:

- Anàlisi fenotípica de la població, previ a la purificació de neutròfils:



El primer histograma correspon a l'anàlisi dels paràmetres de grandària (FS) i granulositat (SS). La regió marcada en aquest histograma va ser la seleccionada per analitzar els marcadors CD45 i CD14 per intensitat de fluorescència en els histogrames del costat. En el histograma del mig observem que el total de la població seleccionada és CD45⁺. Per diferències en la granulositat es distingeixen dos poblacions una amb major granulositat que correspon als PMNs i que constitueix un 51,7 % de la població inicial i una amb menor granulositat que correspon a les CMNs amb un 46,5 %. En el histograma de la dreta s'observen 3 poblacions: CD45^{bright} CD14⁻ els limfòcits. CD45^{low} CD14⁻ (pel hibridoma Mo4, utilitzat) els PMNs i CD45⁺ CD14⁺ els monòcits (5,8 %)

- Anàlisi de les poblacions cel·lulars obtingudes després del procés de purificació de neutròfils:



Les cèl·lules s'han analitzat en les mateixes condicions que abans de realitzar el procés de purificació. El primer histograma correspon a l'anàlisi dels paràmetres de grandària (FS) i granulositat (SS). La regió marcada en aquest histograma va ser la seleccionada per analitzar els marcadors CD45 i CD14 per intensitat de fluorescència en els histogrames del costat. En el histograma del mig observem que el total de la població seleccionada és CD45⁺. Per diferències en la granulositat es distingeixen dos poblacions una amb major granulositat que correspon als PMNs i que ara constitueix un 94,4 % de la població inicial i una amb menor granulositat que correspon a les CMNs que ha quedat reduïda a un 4'8 %. En el histograma de la dreta s'observen 3 poblacions: CD45^{bright} CD14⁻ els limfòcits, CD45^{low} CD14⁻ els PMNs i CD45⁺ CD14⁺ els monòcits (0,3 %)

6.2. Quimiotactisme

La realització d'aquest experiment es va dur a terme segons les especificacions de l'apartat 9 del material i mètodes. Es va dipositar una suspensió de cèl·lules PMN purificades en cel·les Millicell-PC de 3 µm de porus. Les cel·les es van disposar dins de pous de 16 mm de diàmetre on prèviament s'havia afegit l'agent quimiotàctic. Transcorregudes 2 hores d'incubació es va fer un recompte del número de cèl·lules que havien migrat a dins del pou.

En primer lloc, per determinar l'eficiència i sensibilitat de la tècnica, es va realitzar una corba dosi-resposta amb IL-8 recombinant. Aquesta quimiocina ha estat àmpliament descrita com una citocina amb la capacitat d'induir quimiotactisme sobre PMNs [93]. En la

figura 19 es representa el percentatge de PMN que van traspasar les cel·les per efecte de diferents dosis d'IL-8 recombinant.

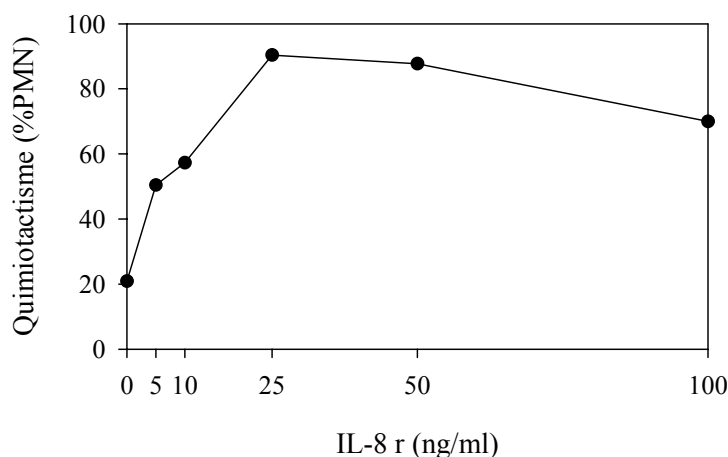


Figura 19 Corba dosi-resposta de l'efecte de l'IL-8r sobre la capacitat quimiotàctica de PMN. Es va dipositar una suspensió de cèl·lules PMN purificades en cel·les Millicell-PC de 3 μ m de por. Com a agent quimiotàctic es va posar una quantitat coneguda d'IL-8r. Com mostra la figura, l'IL-8r és capaç d'estimular el quimiotactisme de PMNs a les mateixes dosis que s'ha descrit en la bibliografia.

El següent assaig va consistir en valorar la capacitat quimiotàctica dels sobrenadants dels cultius de cèl·lules NK estimulades amb 50 ng/ml de F4P en els temps indicats en la **figura 20**.

La capacitat quimiotàctica d'aquests sobrenadants sense tractar es va comparar amb l'activitat del mateix sobrenadant al que se li ha extret específicament l'IL-8 amb un AcMn units a proteïna-A Sepharosa. La tècnica s'especifica en l'apartat 9.2. del material i mètodes.

Els resultats obtinguts es presenten en la **figura 20**, les cèl·lules NK estimulades amb F4P lliuren al medi citocines amb capacitat per atreure PMNs. Aquesta capacitat quimiotàctica es deguda, amb un percentatge elevat, a la presència d'IL-8 en el medi.

Per altra banda, cal assenyalar que la dosi de F4P utilitzada, i que es troba en els sobrenadants testats no va ser capaç d'estimular el quimiotactisme d'aquestes cèl·lules.

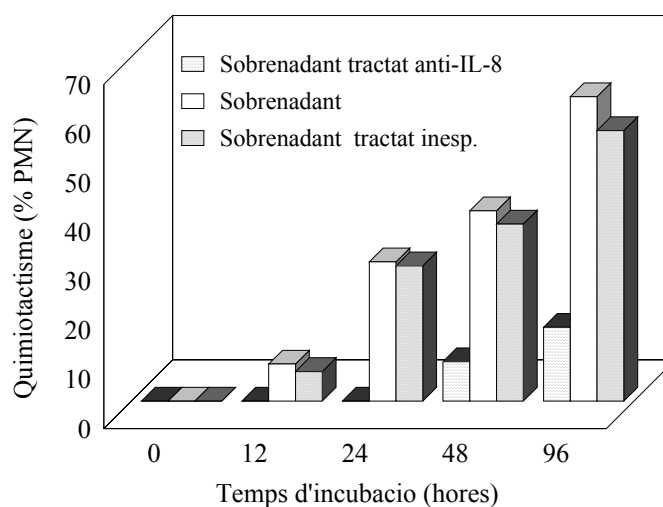


Figura 20 Quimiotactime induït pels sobrenadants de cèl·lules NK estimulades amb F4P. Es van posar en cultiu 4×10^6 cèl·lules NK purificades amb 50 ng/ml de F4P. Els sobrenadants del cultiu es recolliren en el temps d'incubació indicat en el gràfic. Una part d'aquest sobrenadant es va testar directament com agent quimiotàctic, un altre part, prèviament a l'assaig, se li va extreure específicament l'IL-8, finalment un altre part es va tractar amb un Ac inespecífic. L'assaig quimiotàctic es va realitzar sobre un total de 15×10^5 cèl·lules PMNs purificades.

En la taula següent es donen les quantitats d'IL-8 que contenen aquests sobrenadants. Aquests valors es van determinar per la tècnica d'ELISA. Pels resultats obtinguts es va concloure que l'increment en el % de PMN en la càmera inferior es correlaciona amb un increment de la quantitat d'IL-8 produïda per les cèl·lules NK del cultiu. Malgrat és interessant assenyalar que els valors d'IL-8 en el sobrenadant van ser de l'ordre de 10 vegades menor que els valors necessaris d'IL-8r que es precisa per induir la mateixa activitat quimiotàctica.

TAULA 1. Quantitat d'IL-8 que contenen els sobrenadants.

Temps d'incubació amb 50 ng/ml de F4P (hores)	Quantitat d'IL-8 (pg/ml)
0	60
12	850
24	1615
48	3310

7. EL F4P PROVOCA CANVIS FENOTÍPICS EN LES NK.

Degut a la capacitat del F4P per estimular algunes de les funcions de les cèl·lules NK es va voler determinar si aquesta anava associada a canvis en el seu fenotip, i més concretament a canvis en l'expressió de receptors de membrana, que se sap, es veuen incrementats per l'efecte d'altres estímuls.

Cèl·lules NK purificades es van posar en cultiu amb 50 ng/ml de F4P, transcorreguts els temps de cultiu que s'indiquen en les gràfiques les cèl·lules es van recollir i es va valorar l'expressió del diferents marcadors per citometria de flux.

7.1 El F4P indueix l'expressió de CD69.

El CD69 és una proteïna de membrana fosforilada, homodimèrica de 27-33 KDa, que s'expressa en diferents cèl·lules del llinatge hematopoètic. Aquesta molècula és una de les primeres que es sintetitzen durant l'activació de les cèl·lules limfoides. La seva expressió és detectable en les cèl·lules NK poques hores després de la interacció del $Fc\gamma RIII A$ [128]. Encara que la seva funció específica és desconeguda, l'estricta regulació de la seva expressió podria ser indicativa d'un important paper durant l'activació limfocitària.

En els 6 casos testats el F4P va induir l'expressió de CD69, malgrat va ser variable l'intensitat de l'efecte en cada donant. En la **figura 21** es vol representar aquesta variabilitat, presentant la cinètica d'expressió del CD69 de dos donants diferents. Com es pot veure en un d'ells l'expressió de CD69, a les 12 hores de cultiu, és del 60 % en aquestes cèl·lules, mentre que en l'altre donant (histogrames de la **figura 22**) es va donar un pic a les 6 hores d'estímul amb un màxim del 37 % de cèl·lules NK positives

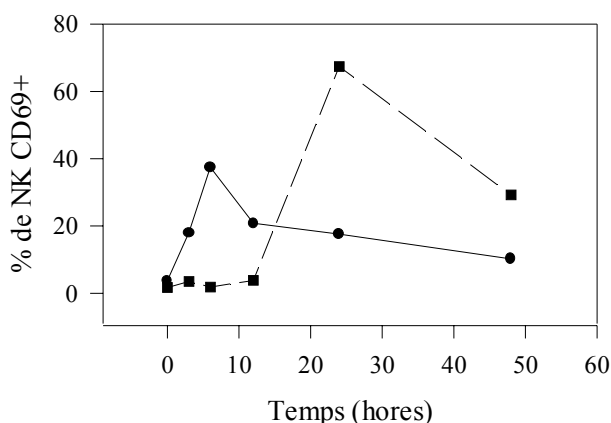


Figura 21 Cinètica d'expressió de la proteïna de membrana CD69 en les cèl·lules NK per efecte del F4P. Es posaren en cultiu 4×10^6 cèl·lules NK purificades / ml amb una dosi de 50 ng/ml de F4P. Transcorregut els diferents temps d'incubació es van recollir i rentar les cèl·lules. Cada una de les corbes (●)(■) correspon a la cinètica d'expressió del CD69 de dos donants diferents. El F4P en els dos casos va ser capaç d'estimular l'expressió de CD69, malgrat van ser diferents la intensitat i el temps d'estímul en cada un d'ells.

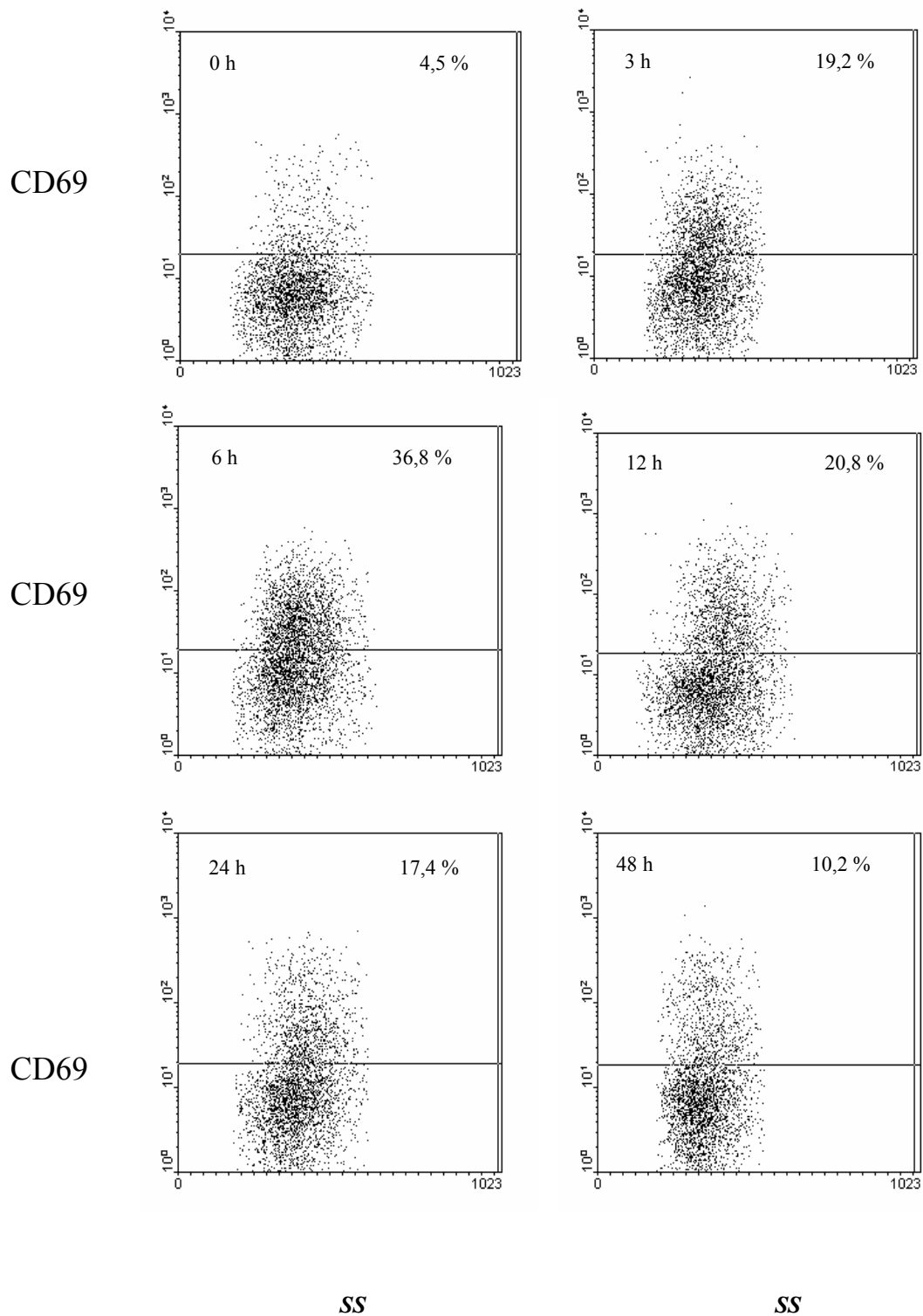


Figura 22 Aquests histogrames presenten la cinètica d'expressió de la proteïna de membrana CD69 en les cèl·lules NK per efecte del F4P. Es posaren en cultiu 4×10^6 cèl·lules NK purificades / ml amb una dosi de 50 ng/ml de F4P. Transcorreguts els temps d'incubació indicats en cada histograma es van recollir i rentar les cèl·lules. Cada histograma correspon a l'anàlisi per citometria de flux de $0,5 \times 10^6$ cèl·lules.

7.2. El F4P no indueix l'expressió de CD25.

També s'ha provat la inducció de l'expressió del CD25 ó Ag TAC. Aquesta cadena proteica s'engança en la membrana i associada al receptor d'afinitat intermitja de la IL-2 constituiran el receptor d'alta afinitat per aquesta citoquina. S'indueix la seva expressió en les NK a través de diferents estímuls com la mateixa IL-2 [28].

No hem observat cap efecte significatiu del F4P en l'expressió del CD25 en cap dels casos testats. En la **figura 24** es mostren els histogrames obtinguts després de 2 h i de 24 h de cultiu de cèl·lules NK amb 50 ng/ml de F4P. En ells es compara l'efecte del F4P en l'expressió del CD69 i del CD25 en un dels donants. En la **figura 25** es mostra la cinètica completa d'aquest donant per l'expressió d'aquests dos marcadors.

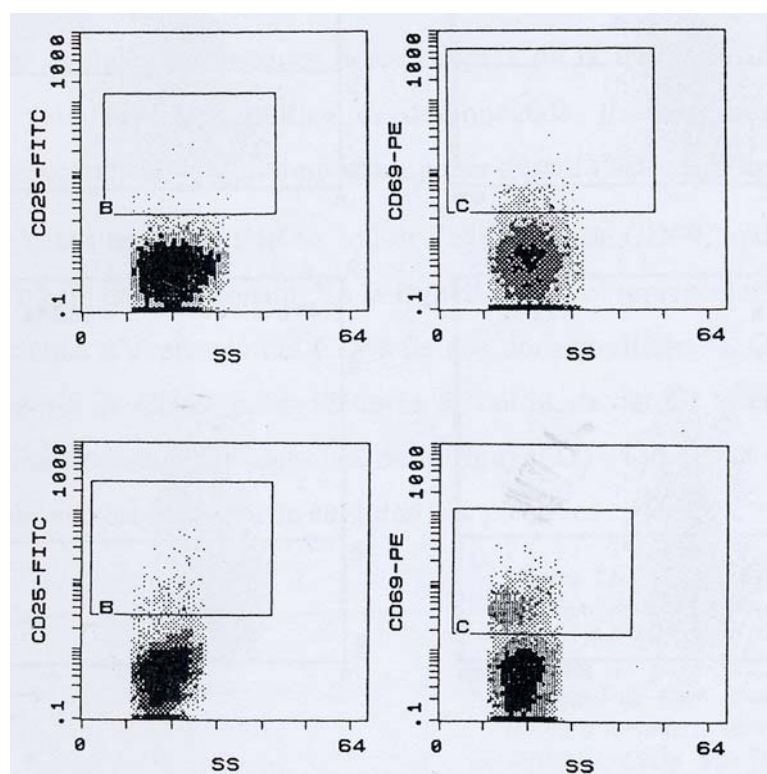


Figura 23 Es van posar en cultiu 4×10^6 cèl·lules NK purificades / ml amb una dosi de 50 ng/ml de F4P. Transcorregut el temps d'incubació indicat en cada histograma es va determinar el % d'expressió dels marcadors CD69 i CD25. No es va detectar cap efecte del F4P sobre l'expressió del CD25 en les mateixes condicions que indueix l'expressió de CD69.

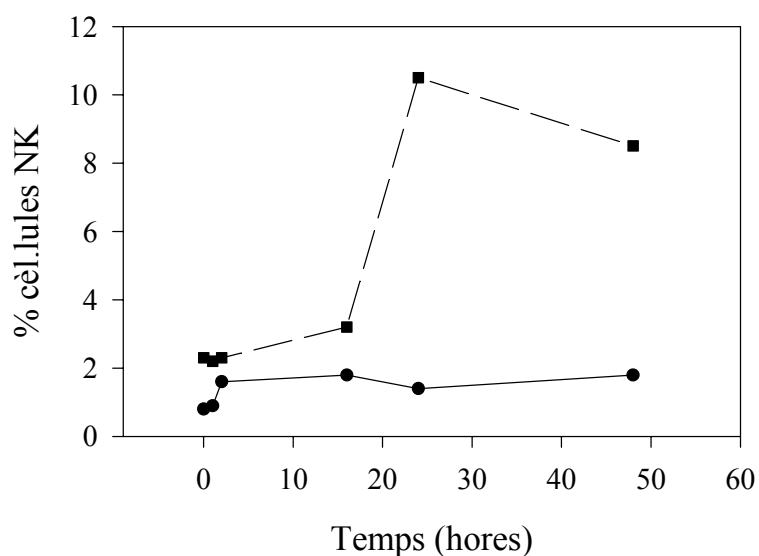


Figura 24 Aquest gràfic correspon a la cinètica completa de l'experiment anterior. Les cèl·lules NK es posaren en cultiu amb una concentració de 4×10^6 cèl·lules NK purificades / ml amb una dosi de 50 ng/ml de F4P. Transcorregut el temps d'incubació indicat en el gràfic es va determinar el % d'expressió dels marcadors CD69 i CD25, el F4P induïx l'expressió del CD69 (■) mentre que no té cap efecte sobre l'expressió del CD25 (●). Cèl·lules NK en les mateixes condicions però sense cap estimul no presentaren variacions en l'expressió d'aquests marcadors (dada no representada).

8. TRANSDUCCIÓ DE LA SENYAL INDUÏDA PEL F4P EN LES NK.

8.1. El F4P no induïx un increment del Ca^{2+} intracitoplasmàtic.

Com s'ha descrit en la introducció (*Introducció, apartat 6.5.*) la major part dels receptors de les quemoquines, caracteritzats fins el moment, són receptors de 7 segments de transmembrana. Aquest és un típic receptor acoblat a les proteïnes G que utilitzen el Ca^{2+} com a missatger secundari. La transducció de senyal mediada pel Ca^{2+} està associada a diferents mecanismes que introdueixen polsos de Ca^{2+} en el citosol amb aquesta finalitat.

Malgrat que actualment es desconeix amb exactitud la naturalesa del receptor del F4P, es va voler determinar si la transducció de la senyal responsable de l'efecte que havíem observat estava associada a un increment transitori de Ca^{2+} en el citosol. Els nostres resultats demostren que el F4P, en el rang de dosis en el que hem observat efecte sobre les cèl·lules NK, no induïx un increment de Ca^{2+} intracitoplasmàtic.

En la **figura 25** es presenten les variacions en temps real de la quantitat de Ca^{2+} (nM) intracitoplasmàtica de $1 \cdot 10^6$ cèl·lules NK per cada una de les corbes representades. En aquesta figura es demostra que a les dosis de 50 i 100 ng/ml de F4P no es va detectar cap canvi en la quantitat de Ca^{2+} intracitoplasmàtic.

En canvi quan estimulem aquestes cèl·lules en les mateixes condicions però a través de la via del CD16 detectem un increment de Ca^{2+} intracel·lular com prèviament havia estat descrit en la bibliografia [125], resultat que ens demostra l'eficiència del test. Per estimular les cèl·lules a través d'aquesta via utilitzem un AcMn anti-Fc γ RIIIA com és el clon 3G8 (ratolí anti-humà), a una concentració de 2 $\mu\text{g/ml}$, àmpliament descrit a la bibliografia per la seva capacitat per estimular les cèl·lules a través d'aquesta via [226].

Finalment per induir l'activació a través d'aquest Ac es va fixar* amb la fracció variable d'un segon Ac (F(ab')₂) d'ovella anti-ratolí (SAM) a una concentració de 16 $\mu\text{g/ml}$.

Com es va demostrar en *resultats apartat 2.3*, l'estímul a través del F4P i del lligam del receptor del CD16 tenen un efecte sinèrgic en el lliurament d'IL-8. Com es mostra en la **figura 26** aquest efecte sinèrgic no es correlaciona amb un increment en els nivells de Ca^{2+} intracel·lulars per l'efecte del CD16.

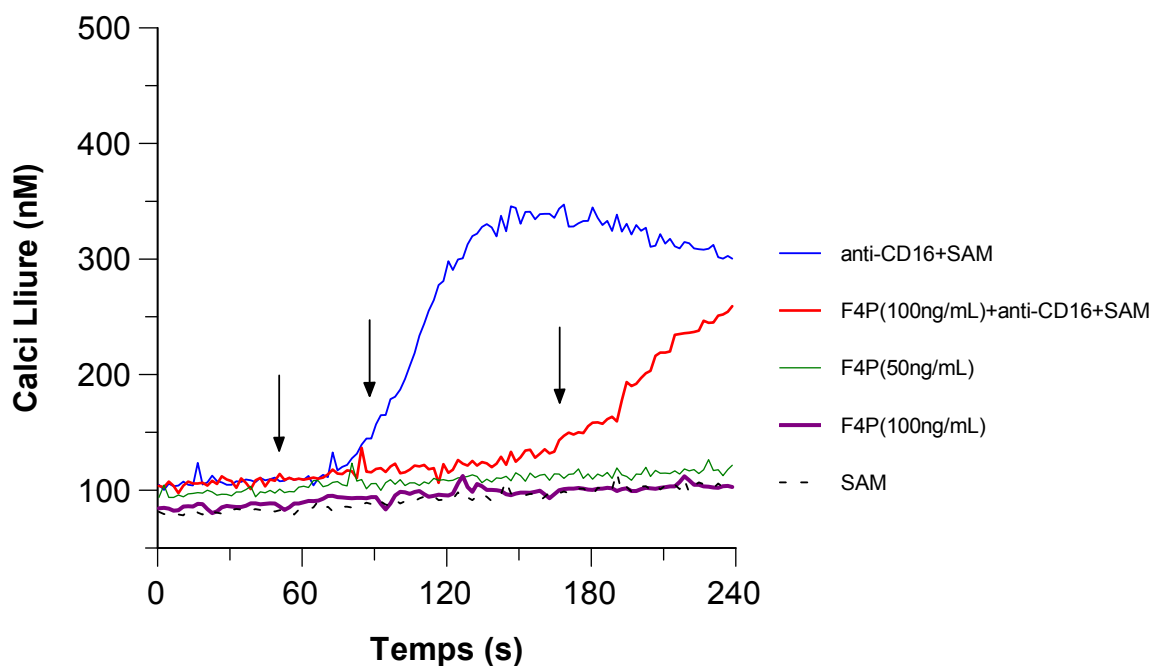


Figura 25 El F4P a les dosis indicades, no va ser capaç d'induir un increment de Ca^{2+} en cèl·lules NK purificades. En les mateixes condicions l'estímul a través del CD16 va mobilitzar el Ca^{2+} intracel·lular com havia estat prèviament descrit. Es van afegir les dosis de 50 i 100 ng/ml de F4P als 60 segons d'haver-se iniciat la mesura (primera fletxa). Per comparar amb l'estimulació a través del CD16 es van afegir 2 μ g/ml d'Ac 3G8 als 60 segons (primera fletxa), ó als 80 segons (segona fletxa) per detectar possibles coestimulacions amb el F4P). Posteriorment es va afegir 8 μ g/ml de la fracció SAM $F(ab)'_2$ (segona fletxa) ó als 180 segons (tercera fletxa) per detectar possibles coestimulacions amb el F4P.

* Utilitzem fixar com a traducció del terme anglès crosslinking.

Altres autors han demostrat que quimiocines com el MCP-1 són capaces d'incrementar la quantitat de Ca^{2+} intracel·lular en cèl·lules NK [178]. Malgrat que els efectes del F4P que observem en les NK tenen lloc en cèl·lules fresques i quiescents, vam voler determinar si el MCP-1 en aquestes condicions de treball era capaç d'induir un increment de Ca^{2+} , per comparar-lo amb l'efecte del F4P. El MCP-1 no va incrementar el Ca^{2+} en cèl·lules NK quiescents. En canvi, com es mostra en la **figura 26**, quan utilitzem el MCP-1 com a coestímul del CD16 detectem un pic de Ca^{2+} superior al que observem amb el CD16 sol, fenomen que no observem al coestimular les cèl·lules amb F4P i CD16.

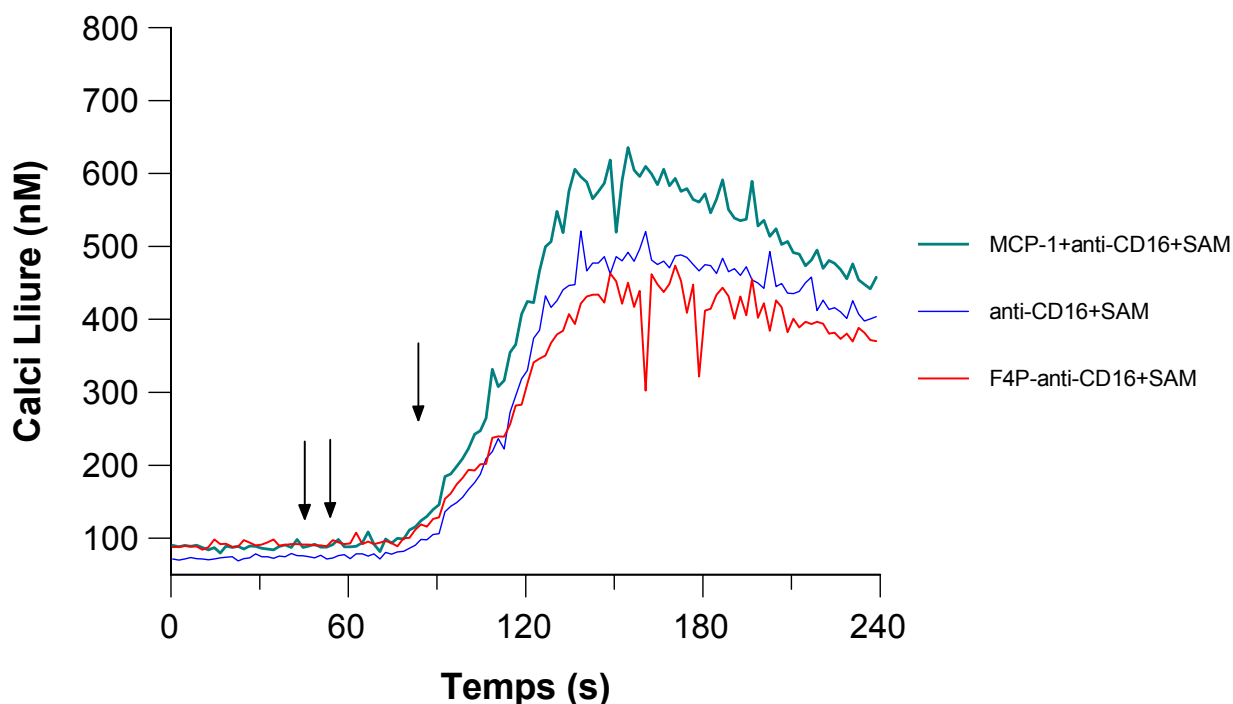


Figura 26 Variacions en temps real de la quantitat de Ca^{2+} (nM) intracitoplasmàtica de $1 \cdot 10^6$ cèl·lules NK. L'ordre en que es van afegir els estímuls al medi és el indicat en la llegenda, les fletxes indiquen el moment en que es van afegir. Es va afegir 100 ng/ml de MCP-1 ó 100 ng/ml de F4P abans dels 2 $\mu\text{g/ml}$ d'Ac 3G8 i 8 $\mu\text{g/ml}$ de la fracció SAM F(ab) $'_2$. Com a resultat d'aquest assaig es va observar que el MCP-1 augmenta els nivells de Ca^{2+} induïts pel CD16, fenomen que no es va observar en el cas del F4P.

Finalment es van pre-estimar cèl·lules NK purificades durant 12 hores amb anti-CD16 Fig. 27 (a), *material i mètodes, apartat 2.3.*, ó amb IL-2 (100 UI/ml) Fig 27 (b). Transcorregut aquest temps valorem si en aquestes condicions de pre-activació el F4P és capaç d'induir un increment de Ca^{2+} intracitoplasmàtic. Com es mostra en la **figura 27** el F4P no és capaç d'estimular un increment de Ca^{2+} intracitoplasmàtic en cèl·lules pre-estimulades en aquestes condicions.

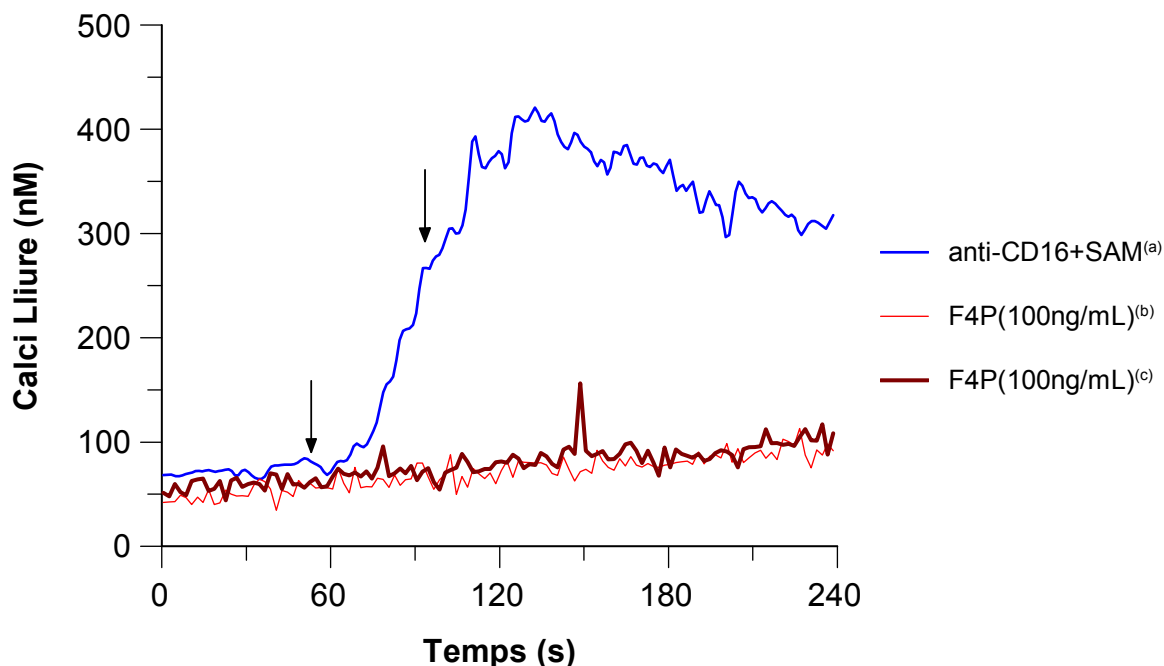


Figura 27 Cèl·lules NK purificades es van estimular durant 16 hores amb 3 μg d'anti-CD16 (b) ó amb 100 UI/ml d'IL-2 (c), transcorregut aquest temps en ambdós casos es van estimular les cèl·lules amb F4P. Com a control de l'experiment es va utilitzar, com en els altres casos, l'estímul amb CD16 (a). Transcorregut aquest temps es van determinar les variacions en temps real de la quantitat de Ca^{2+} (nM) intracitoplasmàtica en les mateixes condicions que els assaigs anteriors. Com a resultat observem que el F4P no es capaç d'estimular els nivells Ca^{2+} intracitoplasmàtic en cèl·lules NK purificades i pre-estimulades en les condicions indicades.

8.2. Implicació de les proteïnes G.

S'ha estudiat la implicació d'aquestes proteïnes per ser un pas primerenc en la transducció del senyal de varies quimiocines. Amb aquest objectiu es va determinar l'efecte induït pel F4P després de bloquejar una subfamília d'aquestes proteïnes.

8.2.1. Efecte de la toxina Pertússica

La toxina pertússica catalitza la ribosilació de l'ADP de la subunitat α de les proteïnes G_i prevenint que la subunitat interactui amb el seu receptor. Es va valorar l'efecte d'aquesta toxina sobre la capacitat del F4P per incrementar la síntesis d'IL-8. L'assaig es va realitzar sobre cèl·lules NK purificades que es van posar en cultiu en les condicions especificades en el *material i mètodes*, apartat 2.2. Les cèl·lules es van incubar durant 1

hora amb 1 µg/ml de toxina pertússica i posteriorment es va afegir 50 ng/ml de F4P. Transcorregudes 48 hores de cultiu es van recollir els sobrenadants i es va testar la quantitat d'IL-8 per la tècnica d'ELISA. En la **figura 28** es presenten els resultats obtinguts d'un cas representatiu de 3 que es van realitzar. En cap dels casos testats la toxina pertússica va tenir efecte sobre l'activitat del F4P.

D'aquest resultat es va concloure que les proteïnes G del tipus Gi no estan implicades en la via de transducció de senyal estimulada pel F4P.

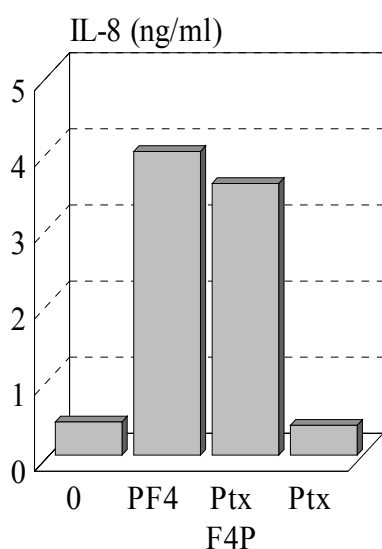


Figura 28 No es va observar cap efecte de la toxina pertússica sobre l'activitat del F4P per estimular la síntesis d'IL-8. L'estudi s'ha realitzat sobre cèl·lules NK purificades tractades amb una dosi de 1 µg/ml de toxina pertússica (Ptx) i 5 ng/ml de F4P.

8.2.2. Efecte de la toxina colèrica

Es va valorar l'efecte d'aquesta toxina sobre la capacitat del F4P per incrementar la síntesis d'IL-8. La toxina colèrica és un enzim que catalitza la transferència d'ADP ribosilat a la subunitat α de les proteïnes G_s . Aquest ADP ribosilat altera la subunitat α impeding la hidròlisi del GTP unit això provoca el manteniment de l'estat actiu de la proteïna estímulant indefinidament l'adenilat ciclase, el resultat és entre d'altres, un augment en els nivells d'AMPc. L'assaig es va realitzar sobre cèl·lules NK purificades que es posaren en cultiu en les condicions especificades en el *material i mètodes, apartat 2.2*. Les cèl·lules es van incubar durant 1 hora amb 1 ng/ml de toxina colèrica i posteriorment es va afegir 50 ng/ml de F4P. Transcorregudes 48 hores de cultiu es van recollir els sobrenadants i es va testar la quantitat d'IL-8 per la tècnica d'ELISA. En la **figura 29** es presenten els resultats obtinguts

d'un cas representatiu de 4 que es van realitzar. En 3 de 4 casos testats la toxina colèrica va tenir un clar efecte potenciador de la síntesis d'IL-8, tant augmentant l'efecte del F4P com estímulant la síntesis d'IL-8, sense cap altre estímul.

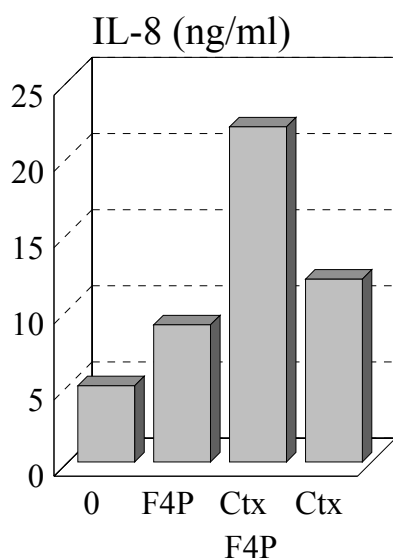


Figura 29 Quantitat antigènica d'IL-8 lliurada per les NK per efecte la Ctx i del F4P. Cèl·lules NK purificades es van posar en cultiu durant 1 hora amb 1 ng/ml de toxina colèrica (Ctx), posteriorment es van afegir 50 ng/ml de F4P. Transcorregudes 48 hores de cultiu es van recollir els sobrenadants i es va testar la quantitat d'IL-8 per la tècnica d'ELISA. La toxina colèrica potencia la capacitat de les cèl·lules NK per lliurar IL-8.

8.3. Implicació de la Protein Quinasa C (PKC)

Es va determinar la implicació de l'enzim PKC amb estimuladors i inhibidors més o menys específics de la seva activitat valorant la capacitat per revertir l'efecte del F4P per estimular la síntesis de IL-8. Com es descriu en la *Introducció, apartat 8.1.1.* aquesta via implica també l'activació de la PLC, la hidròlisi de fosfoinositols i un increment de Ca^{2+} intracel·lular entre d'altres efectes.

Amb aquest objectiu es va estudiar l'efecte del:

1. **PMA** (phorbol 12-Myristate 13-Acetate): capaç d'estimular específicament la PKC [196].
2. **PKCi (GF109203X)**: Inhibidor específic de PKC [197].
3. **Staurosporina**, inhibidor de PKC, però també d'altres quinases dependents de nucleòtids cíclics [197].

8.3.1. Efecte del PMA, un estimulador de la PKC.

Les cèl·lules es van posar en cultiu durant 1 hora amb 10 ng/ml de PMA, posteriorment es van afegir 50 ng/ml de F4P. Els sobrenadants es van recollir i testar per ELISA, a les 48 hores de cultiu. Com es mostra en la **figura 30** es va observar, novament, que cèl·lules NK purificades, sense cap estímul lliuren IL-8 al medi. En els 3 casos es va observar que l'activació de l'enzim PKC provoca una disminució en la capacitat d'aquestes cèl·lules per produir IL-8, la **figura 30** va ser un cas representatiu.

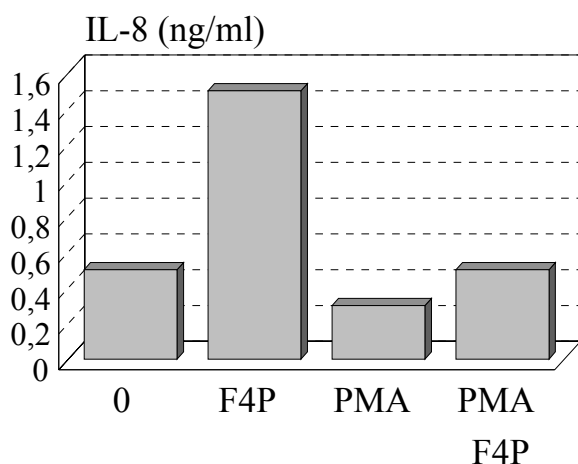


Figura 30 Quantificació de l'IL-8 alliberada per les cèl·lules NK per efecte del PMA i/o F4P. El pretractament de les cèl·lules NK amb un estimulador de PKC va provocar una disminució en aquestes cèl·lules de la seva capacitat per sintetitzar IL-8, disminuint tant la síntesis basal com la induïda pel F4P. Les dosis que es van utilitzar van ser de 10 ng/ml de PMA i 50 ng/ml de F4P.

8.3.2. Efecte dels inhibidors de la PKC: PKCi (GF109203X) i Staurosporina.

Les cèl·lules NK purificades es van tractar de la mateixa manera que en els casos anteriors: es van posar en cultiu durant 1 hora amb 1 μ M de PKCi ó 60 nM de staurosporina posteriorment es va afegir 50 ng/ml de F4P. Els sobrenadants es van recollir i testar per ELISA a les 48 hores de cultiu. En la **figura 31** es mostra com el bloqueig de l'activitat de l'enzim PKC amb un inhibidor específic, com el GF109203X, provoca en les NK un augment en la capacitat de síntesi d'IL-8. L'efecte de la staurosporina va ser el mateix, **figura 32**.

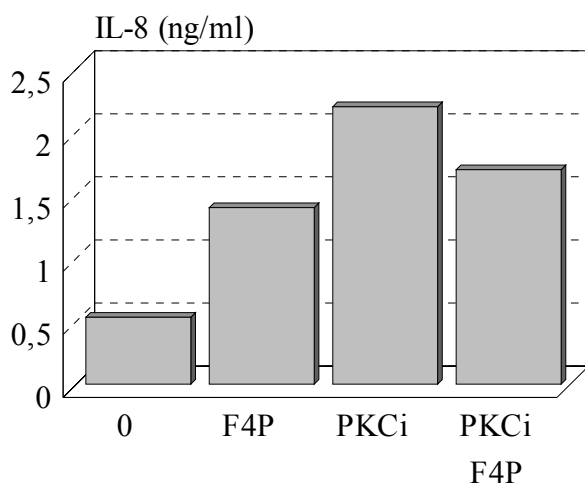


Figura 31 Quantificació de l'IL-8 alliberada per les cèl·lules NK per efecte del GF109203X i/o F4P. El pretractament de les cèl·lules NK amb un inhibidor específic de l'activitat dels enzims de la família PKC va provocar un augment en aquestes cèl·lules de la seva capacitat per sintetitzar IL-8. Les dosis utilitzades van ser de 1 μ M de PKCi i 50 ng/ml de F4P.

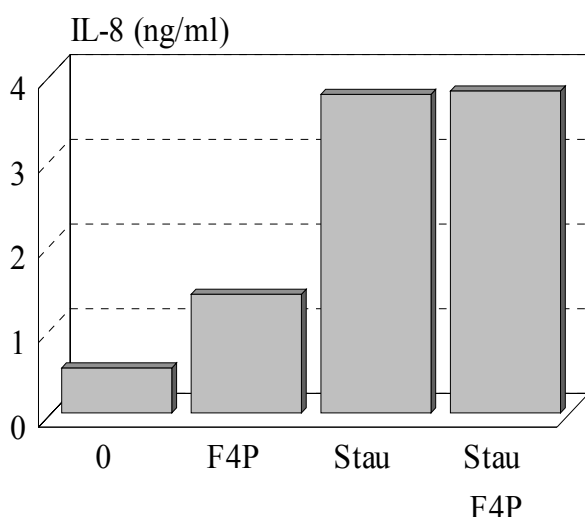


Figura 32 Quantificació de l'IL-8 alliberada per les cèl·lules NK per efecte de la Staurosporina (Stau) i/o F4P. El pretractament de les cèl·lules NK amb un altre inhibidor dels enzims de la família PKC va provocar també un augment en aquestes cèl·lules de la seva capacitat per sintetitzar IL-8. Les dosis que es van utilitzar van ser de 60 nM de staurosporina (Stau) i 50 ng/ml de F4P.

8.4. Implicació dels enzims amb activitat PTK.

Les cèl·lules NK purificades es van tractar de la mateixa manera que en els casos anteriors: es van posar en cultiu durant 1 hora amb 50 μ M de genisteïna ó 50 nM de wortmannin, posteriorment es van afegir 50 ng/ml de F4P, els sobrenadants es van recollir i testar per ELISA, transcorregudes 48 hores.

Es va estudiar l'efecte dels inhibidors següents:

1. **Genisteïna:** inhibidor d'enzims que fosforilen en residus tyr.
2. **Wortmannin:** inhibidor específic de l'enzim fosfoinositol 3-quinasa (PI3-K).

Els resultats obtinguts són els que es mostren en les **figures 33 i 34**, En tots els casos tant la genisteïna com el wortmannin van revertir l'efecte del F4P. Es va observar en tots els casos que el wortmannin inhibeix de forma parcial l'efecte del F4P, mentre que la genisteïna inhibeix completament el seu efecte. Aquests resultats ens van suggerir que el F4P indueix el seu efecte a través de l'enzim PI-3K, malgrat altres enzims amb activitat Tyr-K podrien veure's implicats en la via de transducció de senyal estimulada per aquesta quimiocina.

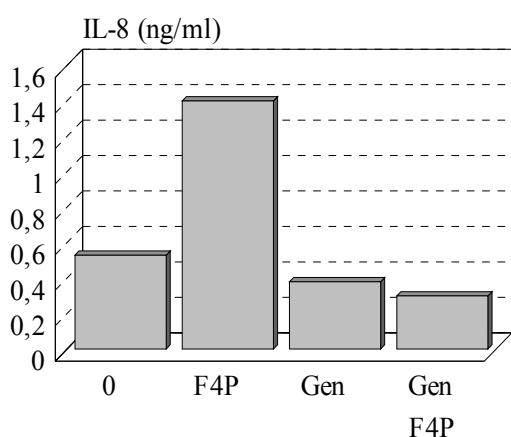
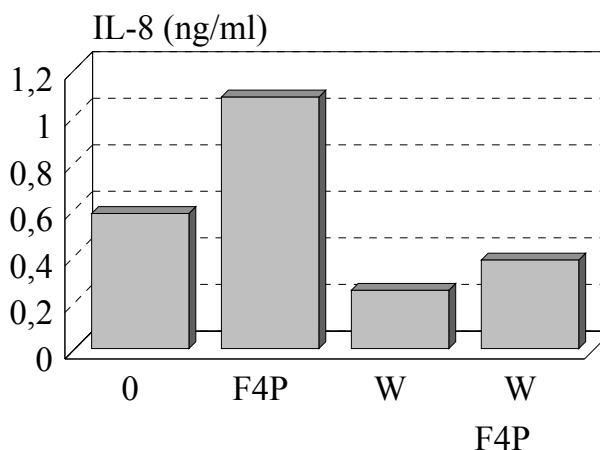


Figura 33 Quantificació de l'IL-8 alliberada per les cèl·lules NK per efecte de la genisteïna (Gen) i/o F4P El pretractament de les cèl·lules NK amb un inhibidor d'enzims amb activitat Tyr-K va provocar una disminució en aquestes cèl·lules de la seva capacitat per sintetitzar IL-8. Les dosis van ser de 50 μ M de genisteïna (Gen) i 50 ng/ml de F4P.

Figura 34 Quantificació de l'IL-8 alliberada per cèl·lules NK per efecte del wortmannin (W) i/o F4P El pretractament de les cèl·lules NK amb un inhibidor específic anti-PI3-K va provocar una disminució, en aquestes cèl·lules, de la seva capacitat per sintetitzar IL-8. Les dosis van ser de 50 nM de wortmannin (W) i 50 ng/ml de F4P.



8.5. Fosforilació en els residus Tirosina de l'enzim PI3-K per efecte del F4P.

Es va voler determinar amb un assaig més directe si efectivament la PI3-K estava involucrada en la via del F4P. En aquest estudi vam demostrar que aquesta quimiocina causa una ràpida fosforilació en els residus tirosina de la subunitat reguladora de l'enzim PI3-K ó p85. Com es mostra en la **figura 35**, el F4P indueix una fosforilació transitòria en els residus

tirosina d'aquest enzim en cèl·lules NK als 10 minuts d'iniciar-se l'estímul, i retorna als nivells basals als 30 minuts d'haver-se iniciat aquest.

Per realitzar aquest assaig es van utilitzar entre 10 i 15x10⁶ cèl·lules NK per cada condició i es van activar amb 50 ng/ml de F4P seguint les especificacions del *material i mètodes, apartat 8*.

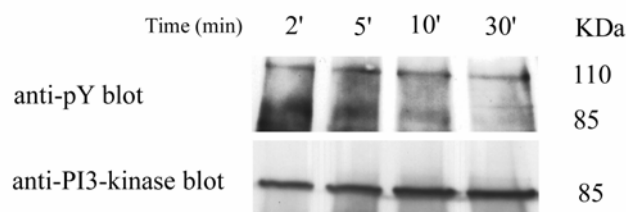


Figura 35 L'efecte del F4P requereix de la fosforilació en els residus tirosina de l'enzim PI3-K. Cèl·lules NK purificades van ser estimulades en els temps indicats amb F4P, com es mostra en la figura es va observar la fosforilació en Tyr als 2 min de l'estímul, sent no detectable als 30 min d'estímul amb la quimiocina. Per realitzar aquest assaig es va immunoprecipitar la PI3-Kinase amb partícules de proteïna A-Sefarose preconjugades amb anti-PI3-K. La proteïna es va separar per SDS-10% PAGE i immuno-detectar amb un Ac-antifosfotirosina, mAb 4G10, es va utilitzar com Ac secundari l'anti-ratolí IgG conjugat amb HRP (carril superior). Posteriorment la membrana es va rentar i es va tornar a immunodetectar amb un Ac contra la subunitat de 85 Kda de la PI3-K, l'Ac secundari va ser un anti-conill IgG conjugat-HRP.

9. VIES DE TRANSDUCCIÓ DE SENYAL EN LES CÈL·LULES NK

Malgrat la manca d'una demostració concloent, totes les evidències obtingudes en aquest treball ens apunten que les cèl·lules NK tenen capacitat pro-inflamadora basal, sent capaces de sintetitzar citocines com l'IL-8, IL-1_β, INF_γ, TNF_α i l'IL-6 sense necessitat de cap estímul previ. Per altra banda, una de les funcions característiques de les NK com és l'activitat citotòxica tampoc precisa d'un estímul previ per desencadenar-se. Malgrat tot, com ja hem dit, no podem descartar que aquest fenomen d'activitat basal en el lliurament de citocines es degui a l'efecte de la manipulació in vitro durant el procés de purificació.

El fet que inhibidors i activadors de determinades vies de transducció de senyal tinguessin efecte sobre la capacitat pro-inflamadora, inhibint-la o potenciant-la segons els casos, ens va fer pensar en la possibilitat de comparar els efectes d'aquests factors sobre la capacitat de síntesis de citocines com l'IL-8 en front de l'efecte que pugessin tenir sobre les

activitats citotòxiques, NK i LAK basals, pels resultats que havíem obtingut fins el moment caldria esperar que aquestes fossin diferents ó fins i tot contraposades.

Per duu a terme aquest estudi les cèl·lules es van tractar en les mateixes condicions i dosis que es van utilitzar en l'apartat anterior.

9.1. Implicació de les proteïnes G.

Els resultat que es van obtenir són els que es poden veure en les **figures 36 i 37**. Mentre que la toxina pertússica no té cap efecte sobre cap de les dues activitats, en el cas de la toxina colèrica es va obtenir un efecte invers. Aquesta toxina potencia la capacitat de les cèl·lules NK purificades per lliurar citocines, **figura 36**. Mentre que té una forta capacitat inhibidora de les activitats NK i LAK, **figura 37**.

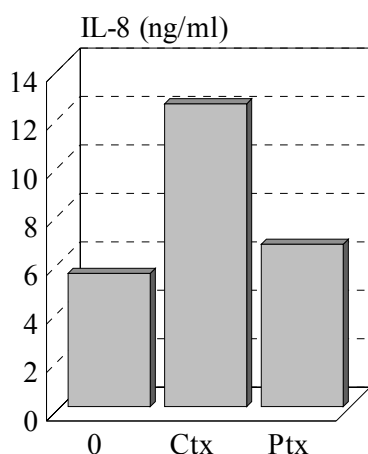
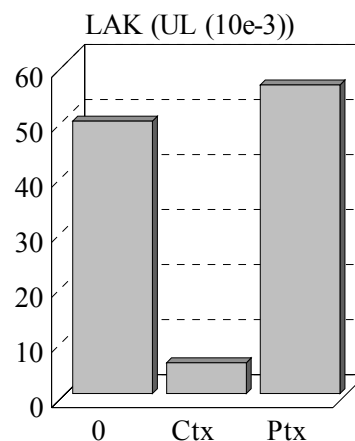
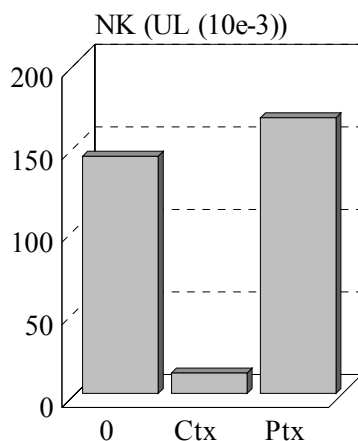


Figura 36 Quantificació de l'IL-8 alliberada per cèl·lules NK per efecte de les toxines colèrica i pertússica. Les cèl·lules NK es tractaren amb 1 ng/ml de toxina colèrica (Ctx) ó amb una dosi de 1 µg/ml de toxina pertússica (Ptx). Mentre que la Ctx va ser capaç de potenciar el lliurament d'IL-8, la Ptx no va induir cap efecte significatiu.

Figura 37 Determinació de l'efecte de les toxines colèrica i pertússica sobre l'activitat citotòxica. Les cèl·lules NK es van tractar amb 1 ng/ml de toxina colèrica (Ctx) ó amb una dosi de 1 µg/ml de toxina pertússica (Ptx). Mentre que la Ctx va provocar una disminució en l'activitat citotòxica basal, la Ptx no va induir cap efecte significatiu.



9.2. Implicació dels isoenzims PKC

Com en els assaigs anteriors es va comparar l'efecte d'estimuladors i inhibidors d'aquesta família d'isoenzims. En les següents figures es compara l'efecte d'inhibir (PKCi) ó estimular (PMA) la PKC, sobre la capacitat de síntesis d'IL-8, **figura 38**, en vers de l'activitat citotòxica, **figura 39**. Com es pot veure la inhibició específica d'aquests enzims va provocar l'estimulació del lliurament d'IL-8, mentre que les activitats citotòxiques NK i LAK van ser totalment inhibides. No es va valorar l'efecte del PMA sobre les activitats citotòxiques per estar ampliamet descrit la implicació d'aquests enzims en el senyal desencadenat pel reconeixement de la cèl·lula diana (*Introducció, apartat 8.1.1.*).

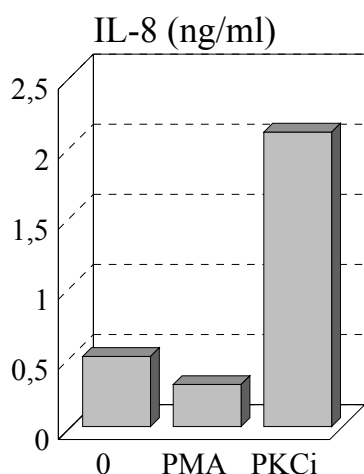
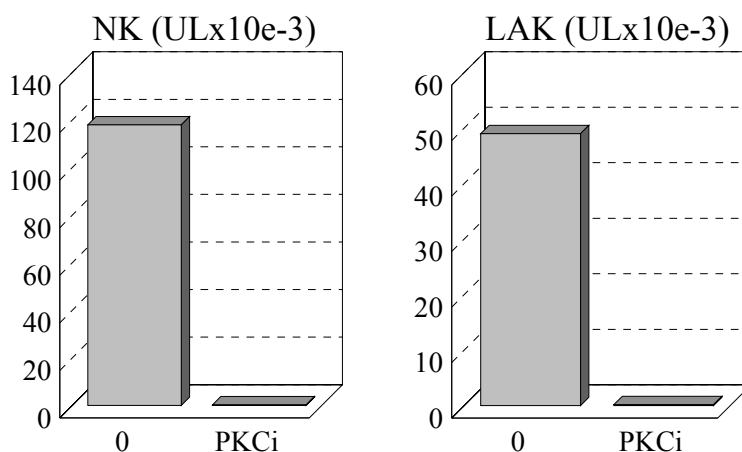


Figura 38. Quantificació de l'IL-8 alliberada per les cèl·lules NK per efecte del PMA ó PKCi. El pretractament de les cèl·lules NK amb un estimulador de PKC va provocar una disminució en aquestes cèl·lules de la seva capacitat per sintetitzar IL-8. La dosi que es va utilitzar va ser de 10 ng/ml de PMA. El pretractament de les cèl·lules NK amb un inhibidor específic de l'activitat dels enzims de la família PKC com és el GF109203X va provocar un augment en aquestes cèl·lules de la seva capacitat per sintetitzar IL-8. La dosi utilitzada va ser de 1 μ M PKCi.

L'efecte sobre les activitats citotòxiques NK i LAK va ser l'oposat.

Figura 39 Determinació de l'efecte de la PKCi sobre l'activitat citotòxica. El tractament de les cèl·lules NK amb un inhibidor específic de l'activitat dels enzims de la família PKC com és el GF109203X va provocar la total inhibició de l'activitat citotòxica d'aquestes cèl·lules. La dosi utilitzada va ser la mateixa que en els assaigs anteriors 1 μ M PKCi.



9.3. Implicació de l'enzim PI3-K.

Es va comparar l'efecte d'un inhibidor específic d'aquest enzim, el wortmannin. En les següents figures es mostra el resultat que es va obtenir amb aquest inhibidor sobre la capacitat de síntesis d'IL-8, **figura 40**, en vers de l'activitat citotòxica, **figura 41**. Com es pot veure la inhibició específica d'aquest va provocar una disminució parcial, però significativa, del lliurament d'IL-8, mentre que no es va detectar cap efecte sobre les activitats citotòxiques NK i LAK.

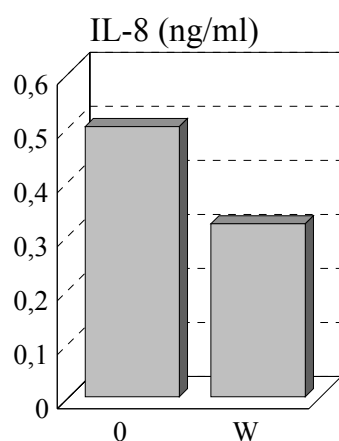


Figura 40 Quantificació de l'IL-8 alliberada per cèl·lules NK per efecte del wortmannin (W). El tractament de les cèl·lules NK amb un inhibidor específic anti-PI3-K va provocar una disminució significativa en la capacitat d'aquestes cèl·lules per sintetitzar IL-8. La dosi va ser de 50 nM de wortmannin (W).

L'efecte sobre les activitats citotòxiques NK i LAK, va ser l'oposat.

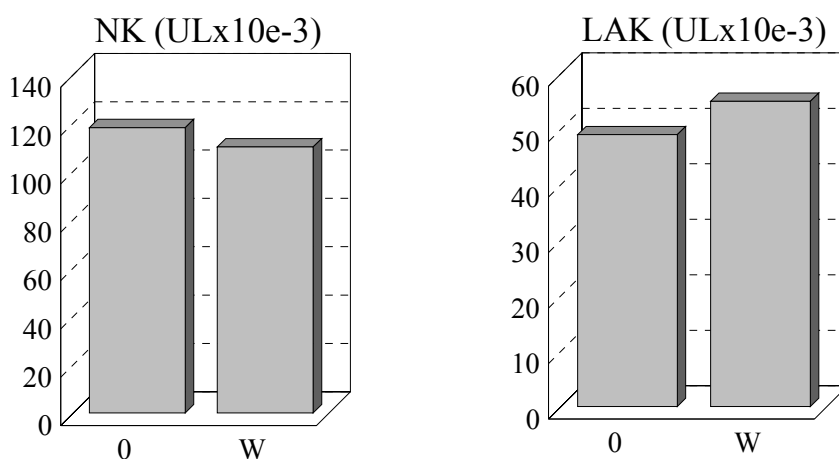


Figura 41 Determinació de l'efecte del wortmannin sobre l'activitat citotòxica. El tractament de les cèl·lules NK amb un inhibidor específic de l'activitat de l'enzim PI3-K com és el wortmannin no va provocar cap efecte significatiu. La dosi utilitzada va ser la mateixa que en els assaigs anteriors 50 nM de wortmannin (W).

1. ANTECEDENTS

Els organismes primitius com les esponges o d'altres invertebrats inferiors tenen un únic tipus de cèl·lula fagocítica amb múltiples funcions inflamadores. Aquestes cèl·lules contenen tots els components necessaris per la coagulació de teixits fluids així com per l'activitat antimicrobiana.

En organismes superiors com peixos i ocells trobem tipus cel·lulars diferents que desenvolupen de forma independent funcions com hemostàsia i la inflamació, els trombòcits i els leucòcits respectivament, encara que mantenen funcions solapades.

Finalment, en els mamífers, els trombòcits circulants passen a ser fragments anucleats, les plaquetes, amb funcions principalment dirigides en l'inici de l'hemostàsia, mentre que les proteïnes de la coagulació es localitzen extracel·lularment en el plasma. Malgrat aquesta especialització, les plaquetes dels mamífers mantenen a més a més nombroses capacitats inflamadores.

Algunes de les funcions inflamadores de les plaquetes són: l'augment de l'expressió de proteïnes d'adhesió; la producció de factors quimiotàctics; el lliurament de factors de creixement; ó la modulació de la funció dels leucòcits. Així doncs, el sistema hemostàtic interacciona amb el sistema immunològic en diferents condicions fisiològiques i patològiques, havent entre ells de manera forçosa una modulació recíproca de les seves respostes [9].

La resposta immune requereix, en primer terme, de la migració ordenada i estrictament regulada de diferents subsoques de leucòcits als llocs de la lesió [227, 228]. Diferents agents són capaços de modular aquesta migració, així, en el cas de les cèl·lules NK, factors com l'INF γ , l'IL-2 [81, 229-231] i determinades quimiocines, s'els hi ha descrit la capacitat per modular aquesta activitat [105, 178, 232].

Les quimiocines, malgrat es van descriure inicialment com citocines amb activitat quimiotàctica, s'ha observat que poden desencadenar altres activitats sobre els leucòcits. En el cas de les cèl·lules NK, les funcions d'aquests factors sobre altres paràmetres estan poc estudiats, i els resultats publicats són força controvertits. Algunes de les quimiocines que

s'han descrit amb capacitat per modular aquestes cèl·lules són l'IP-10, l'IL-8, el MIP-1 α ó el MCP-1 [81, 101, 103-105].

1.1. Resultats previs

En treballs previs, el nostra grup va mostrar evidències que les PLQ afectaven diferents paràmetres d'activitat limfocitària. Aquest fet va conduir a un primer estudi de l'efecte que les PLQ poden exercir en la resposta immunològica cel·lular.

Es van caracteritzar els factors plaquetars amb capacitat per modular aquesta resposta, i es va demostrar que aquests factors exerceixen una important modulació en les cèl·lules efectores de la resposta citotòxica natural, en general inhibint la seva activitat citotòxica i estimulants la capacitat per produir citocines.

Vam observar que el TGF β és el principal immunosupressor contingut en els grànuls- α de les plaquetes, sent capaç d'inhibir les activitats NK i LAK. El PDGF és un estimulador de l'activitat NK, mentre que no vam observar cap efecte sobre l'activitat LAK. També es va determinar que el principal immunomodulador generat en la via metabòlica de l'àcid araquidònic de les PLQ, la prostaglandina E₂, sobre cèl·lules NK purificades, inhibeix les activitats citotòxiques NK i LAK, i estimula la producció de citocines. Es va demostrar, també, que el F4P era capaç d'estimular la producció de citocines com l'INF γ ó el GM-CSF sent el seu efecte, en aquest cas, molt més evident que el TGF β ó el PDGF mentre que el seu efecte sobre les activitats NK i LAK es va observar força variable.

El fet de que el F4P es lliuri en els primers estadis del procés inflamatori ens va fer pensar que podria tenir un paper fonamental en la regulació d'aquest mecanisme. A més a més se sap que les cèl·lules NK aflueixen al focus de la inflamació en estadis també primerencs d'aquest procés [30]. Això ens va donar una important implicació fisiològica dels resultats preliminars obtinguts amb aquest factor sobre aquest tipus cel·lular. Així, l'objectiu d'aquest treball va ser, per un costat, una major caracterització dels efectes del F4P sobre les cèl·lules NK, i per l'altre una primera aproximació als mecanismes d'activació induïts pel F4P sobre aquest tipus cel·lular. Els resultats obtinguts, també posen de manifest l'important paper de les cèl·lules NK en el procés inflamatori.

2. OBTENCIÓ DE LES CÈL·LULES NK PURIFICADES.

Com a pas previ per l'estudi dels efectes del F4P sobre les diferents activitats de les cèl·lules NK, ens va caldre obtenir aquestes cèl·lules aïllades de la resta de poblacions cel·lulars presents a la sang.

El treball sobre la població cel·lular purificada permet evitar efectes indirectes degut a interaccions entre les diferents subpoblacions de CMNs, o fins i tot la detecció de l'activitat desenvolupada per un altre tipus cel·lular. En aquest sentit cal assenyalar que altres subpoblacions com PMNs ó de CMNs com els Monòcits ó els LT produeixen, també, citocines amb capacitat proinflamadora. Diferents treballs han demostrat a més a més la capacitat de les quimiocines per regular aquests tipus cel·lulars [144].

Per obtenir la subpoblació de cèl·lules NK purificades es va optar per la selecció negativa mitjançant AcMo capaços de reconèixer les poblacions de CMNs que es vol depreciar. Posteriorment es procedeix a la separació de les cèl·lules reconegudes amb partícules immunomagnètiques. La utilització d'aquesta tècnica té l'avantatge de la rapidesa i la reproductibilitat dels resultats obtinguts. Es va descartar la utilització de la selecció positiva aïllant directament la població desitjada per evitar que un tractament directe sobre les cèl·lules efectores podés afectar la seva funcionalitat.

Els nivells de puresa en finalitzar el procés van ser entre un 95 i un 99 % de cèl·lules NK, per aquesta raó considerem la població obtinguda com altament purificada.

3. EL F4P ESTIMULA LES NK A LLIURAR CITOCINES.

Hi ha forces estudis que descriuen l'efecte de les quimiocines sobre diferents paràmetres funcionals de les NK. S'ha estudiat, principalment, la capacitat de les quimiocines per estimular l'activitat quimiotàctica, la capacitat per mobilitzar Ca^{2+} intracel·lular, ó l'efecte sobre l'activitat citotòxica d'aquestes cèl·lules [105, 178, 233, 234]. Se sap poc, però, sobre la capacitat d'aquestes per modular el lliurament de citocines.

Els resultats obtinguts pel nostre grup van posar de manifest que les cèl·lules NK estimulades amb F4P, sense necessitat de cap altra estímul, sintetitzen i lliuren IL-8, IL-1 β ,

IL-6, TNF- α , GM-CSF i INF γ . La dosi de F4P a la que es va observar aquest efecte va ser variable segons el donant ó segons la citocina valorada, es va observar, però, efecte significatiu en un rang de dosis entre 10 i 100 ng/ml de F4P en tots els casos.

3.1. La dosi de F4P utilitzada és una dosi fisiològica.

Diferents característiques d'aquest factor fan aquest apartat de difícil resposta. Se sap que el F4P es magatzema en les grànuls- α de les plaquetes, quan aquestes s'activen com a resposta a un estímul inflamatori, lliuren en primer lloc el contingut d'aquests grànuls- α . Així, es lliuren en el medi diferents factors com tres quimiocines, entre d'altres. Aquestes quimiocines són el F4P, el CTAP-III/NAP-2 i el RANTES. En el cas del F4P, però, un cop es lliura de forma localitzada en el focus de la inflamació, desapareix ràpidament del torrent sanguini en unir-se als heparans sulfats localitzats en l'endoteli vascular [63, 64]. La primera dificultat, doncs, consisteix en que el valor que es troba, d'aquesta quimiocina, en el plasma no correspon a la quantitat de factor en el lloc de la lesió. Un altre dels problemes d'aquesta determinació és que la manipulació de la mostra de sang pot fer variar la quantitat de factor. Això es deu a una possible activació inespecífica de les plaquetes degut a la manipulació de la mostra [235].

En unes condicions de manipulació de la mostra el menys traumàtiques possible s'ha vist que el plasma conté aproximadament 2 ng/ml de F4P, dosi a la que no es va observar un efecte significatiu en l'activació de les cèl·lules NK. La quantitat en el plasma de β -TG és de 6 ng/ml, en aquest treball no es va detectar cap efecte significatiu de la β -TG, ni en aquesta dosi ni en cap de les testades, sobre les NK.

És interessant la determinació d'aquestes quimiocines en el plasma de pacients que pateixen el més proper a una malaltia inflamatòria sistèmica, això ens permet una aproximació a la quantitat de quimiocina en el focus de la inflamació. Així, per exemple, en pacients amb aterosclerosi es detecten quantitats de F4P, que malgrat ser superiors, no varien massa respecte als valors que es detecten en individus sans, en canvi s'observa un augment en els valors de β -TG. Aquesta pèrdua de paral·lelisme en les dosis d'aquests

factors ha estat explicada per la major capacitat del F4P per desaparèixer de la circulació sanguínia. En canvi, en pacients que han patit un bypass cardiopulmonar s'observa un increment en plasma de les dos quimiocines. Aquest fenomen podria ser degut a la heparinització a la que es sotmet aquests pacients. L'heparina exògena competiria per la unió amb el F4P amb els heparan sulfats de l'endoteli. Els valors en plasma de F4P d'aquests pacients van de 30 a 560 ng/ml, dosi suficient per induir l'estímul sobre les NK. També s'observa un increment en plasma de F4P en pacients que han patit una intervenció de cirurgia vascular amb quantitats de 12 a 30 ng/ml [235].

D'aquests resultats descrits en la bibliografia concloem que el rang de dosis de F4P necessari, per estimular les cèl·lules NK a produir citocines proinflamatòries, és el que trobem en la sang en un estat d'activació de la inflamació a nivell sistèmic. En individus sans la quantitat de F4P que es detecta en plasma, 2 ng/ml, segons els resultats obtinguts en aquest treball, no serien suficients per estimular les cèl·lules NK.

En aquest context, doncs, caldria esperar que, *in vivo*, en pacients que han patit un bypass cardiopulmonar veiessin augmentats els nivells d'aquestes citocines en el sèrum després de la intervenció quirúrgica. El nostre grup va realitzar determinacions en 8 pacients que van ser sotmesos a 6 hores de circulació extracorpòrea per una intervenció de bypass. Els nivells en sèrum de les citocines IL-1 β , TNF α i IL-6 abans i després de la intervenció es van analitzar com a dades aparellades. Els resultats obtinguts pel nostre grup demostra que els nivells d'aquestes citocines augmenten significativament després de la intervenció quirúrgica [236]. L'augment en el sèrum dels nivells de citocines podrien jugar un paper important en el desenvolupament dels efectes adversos associats als pacients després d'aquesta intervenció. Aquests efectes estarien causats, com ja s'ha dit, per una resposta inflamatòria sistèmica, que podria portar a la lesió tissular i a una major morbiditat postoperatoria [237].

3.2. Unió del F4P unit a heparan sulfat. El receptor de F4P.

En la bibliografia ha estat àmpliament descrita la capacitat del F4P per unir-se als heparan sulfats localitzats a l'endoteli vascular. Aquest fenomen facilita, en primer lloc, una

elevada concentració en el lloc de la lesió [62, 63]. S'ha suggerit, també, que aquesta unió protegeix el factor de la proteolisis i denaturalització, potenciant així la seva activitat biològica. Per tant, la matriu extracel·lular d'heparan sulfat actuaria com a reservori d'aquestes proteïnes in vivo [67].

El nostre objectiu amb aquest experiment va ser avaluar el possible efecte de la unió a l'heparina del F4P sobre la capacitat de incrementar la producció d'IL-8. Com es mostra en els *Resultats, apartat 2.5*, els conjugats de F4P-heparina-sepharosa van mantenir la capacitat del F4P per induir el lliurament d'IL-8 per les cèl·lules NK. Aquest resultat és interessant fisiològicament ja que el F4P, com a estímul inflamatori, es mantindria localitzat i actiu en el lloc de la lesió.

La relació entre l'activitat biològica de les quimiocines i la capacitat per unir-se a HS ha estat objecte de molts estudis. Es va demostrar que l'activitat angiostàtica del F4P queda inhibida quan aquest s'uneix a heparina, ja que, malgrat tenen dominis diferents aquests estan solapats [67]. Posteriorment es va caracteritzar un potent inhibidor de la proliferació de l'endoteli generat pel trencament proteolític del F4P, i que es caracteritzava per haver perdut la capacitat per unir-se a heparina [238].

Tant la capacitat per inhibir el creixement de cèl·lules leucèmiques [239] com la capacitat per inhibir la megacariocitopoiesis [240] queden bloquejades per la unió del F4P a heparina. Un treball posterior, però, va demostrar l'existència d'un altre centre actiu en la proteïna amb capacitat per inhibir la megacariocitopoiesis que no queda bloquejat per aquesta unió [58]. Aquest resultat ja posava de manifest el que cada cop sembla més evident, que aquestes proteïnes, a través de diferents dominis, tenen la capacitat per interaccionar amb la cèl·lula diana, probablement a través de diferents receptors, induint el mateix efecte o un efecte diferent.

Les quimiocines CXC són característicament proteïnes d'unió a heparina, algunes de les seves funcions estan associades a l'extrem carboxi-terminal, com algunes de les descrites anteriorment i, d'altres s'han associat a l'extrem amino-terminal. S'ha observat, també, que les quimiocines que presenten en el seu extrem NH₂-terminal el motiu ELR (*Introducció*

apartat 6.1.1) tenen capacitat angiogènica, mentre que la manca d'aquest motiu, com és el cas del F4P, és característic de quimiocines amb activitat angiostàtica [241].

També se sap que quimiocines com l'IP-10 s'uneixen de forma específica amb HSPG localitzats en les cèl·lules endotelials impeding la seva proliferació [68]. Per altra banda la unió del F4P als HS, específica ó inespecificadament, podria impedir la unió de citocines amb activitat proliferativa com FGF₂ ó vEGF₁₆₅ als seus receptors [242].

En els dos últims treball, Dudek et. al. i Sulpice et. al. [243-245] demostren, en progenitors hematopoètics i cèl·lules endotelials, respectivament, que el F4P té capacitat per mediar el seu efecte a través d'un receptor d'afinitat moderada mediat per GAG i un altre d'alta afinitat de 7 segments de transmembrana. Aquests dos grups demostren que el mecanisme a través del qual una quimiocina pot induir el seu efecte pot ser diferent segons la quantitat de quimiocina (la intensitat de l'estímul), i l'estat d'activació ó maduració de la cèl·lula diana que és el que determina, en últim terme, la diferent expressió dels seus receptors.

3.3. Implicacions fisiològiques del lliurament d'aquestes citocines

S'han descrit diferents funcions potenciadores de la inflamació sobre cada una de les citocines (IL-8, IL-1 β , IL-6, TNF- α , GM-CSF i INF γ) analitzades.

Totes elles són citocines amb la capacitat de desencadenar la maquinaria quimiotàctica de diferents leucòcits. A gran trets, la transmigració dels leucòcits en l'endoteli té lloc a través d'un gradient d'aquests substractes solubles quimioatracients, els quals poden alterar l'adhesivitat de les cèl·lules i la seva mobilitat. Aquest fenomen altament dinàmic provoca un determinat ordre en el patró de migració [75].

Factors solubles com el TNF α , INF γ ó IL-1 β indueixen l'expressió de noves molècules d'adhesió en cèl·lules endotelials, el que permet lligar cèl·lules efectores circulants [8]. Les quimiocines són, també, una família de factors amb capacitat per modular selectivament les molècules d'adhesió de les cèl·lules migratòries i de l'endoteli. En el cas, per exemple, de l'IL-8 aquesta té la capacitat per activar els LT augmentant l'avidés pels

receptors de fibronectina sense canvis en els nivells d'expressió pel seu receptor. En canvi, en neutròfils, l'IL-8 és capaç d'augmentar tant l'avidés com l'expressió de les integrines. Això promou la unió a l'endoteli d'aquestes cèl·lules presentadores per facilitar la seva transmigració [30]. L'IL-8 és, doncs, un factor amb capacitat per modular tant la immunitat inespecífica a través dels neutròfils, com la immunitat específica a través dels LT. La capacitat de les NK per lliurar IL-8 en estadis inicials del procés inflamatori els hi dona una important implicació en la regulació d'aquest procés, constituint un nou argument per ser considerades com cèl·lules pont entre la immunitat inespecífica i l'específica.

En aquest context, però, d'activació plaquetar amb el lliurament dels grànuls α , un altre quimiocina de la mateixa subfamília que el F4P es lliura al medi, aquest és el cas de la β -TG. La β -TG té una homologia del 51% amb el F4P a la que se l'hi ha descrit activitat biològica sobre neutròfils [93]. El F4P, en canvi, malgrat inicialment se li havia descrit la capacitat per estimular la maquinaria quimiotàctica dels neutròfils [113], treballs posteriors posen en evidència que l'elevada concentració necessària de factor per estimular aquestes cèl·lules podria deure's a la detecció d'un efecte degut al principal contaminant en les preparacions de F4P, la β -TG [76].

Per descartar que l'efecte observat pel F4P fos degut a la β -TG es van posar en cultiu cèl·lules NK amb una dosi de β -TG entre 10 i 200 ng/ml. En cap cas es va detectar l'activació de les cèl·lules NK per lliurar IL-8, descartant, així, la possibilitat de que l'activitat que es va observar fos deguda al principal contaminant de les mostres de F4P, la β -TG.

El grup de Petersen van demostrar que el F4P és capaç d'estimular el lliurament específic dels grànuls secundaris que contenen els neutròfils, aquesta activitat requereix, però, del coestímul del $\text{TNF}\alpha$. En canvi, l'activitat de la β -TG ó l'IL-8 per estimular l'exocitosis en els neutròfils és inespecífic i es desencadena pel trencament de filaments d'actina [246]. En aquesta situació és especialment interessant la capacitat del F4P per induir el lliurament de $\text{TNF}\alpha$ per part de les NK en estadis inicials del procés inflamatori. Per altra banda se sap que el F4P no requereix de l'addició de $\text{TNF}\alpha$ exògena per induir l'adhesió de cèl·lules PMN en la capa de cèl·lules endotelials [247]. Aquest fet junt amb la

capacitat del F4P per unir-se també a l'endoteli facilitaria l'activitat de les NK en aquest procés.

3.4. El F4P sinergitza amb l'estímul induït a través del Fc γ RIIIA.

Prèviament s'havia descrit la capacitat de diferents estímuls per induir el lliurament de citocines en les cèl·lules NK [125, 181]. En aquest sentit es va voler determinar un possible efecte sinèrgic amb els principals estímuls descrits per les cèl·lules NK (CD16 i IL-2) amb el F4P. Com es mostra en *els resultats, apartat 2.3*, es va observar un efecte sinèrgic en el lliurament d'IL-8 quan es van estimular aquestes cèl·lules a través del Fc γ RIIIA i el F4P. La quantitat d'IL-8 lliurada per efecte de l'estímul a través del CD16 en presència de F4P va ser entre 4 i 5 cops superior que els nivells induïts per l'Ac-anti-CD16 sol, mentre que els nivells van ser 10 cops superiors respecte el cultiu amb el F4P tot sol. En canvi no es va observar, en cap dels casos testats, cap efecte ni additiu ni sinèrgic entre el F4P i l'IL-2.

Aquests resultats ens van suggerir que el F4P i el lligam de Fc γ RIIIA tenen algun punt en comú en mecanisme de transducció de senyal (*discussió apartat 8*). En canvi l'IL-2 induiria, probablement, una via d'activació diferent en aquestes cèl·lules. Cal assenyalar que resultats posteriors, que es discutiran més tard, també van apuntar que possiblement l'estat d'activació induït pel F4P i per l'IL-2 són diferents.

3.5. Possible mecanisme regulador del F4P.

Es va procedir, en primer lloc, a la determinació de la cinètica de lliurament de l'IL-8 per les NK en resposta a aquest estímul. En el mateix assaig es va valorar el possible nivell de regulació de la quimiocina. Per realitzar aquest experiment es va afegir en el cultiu ó bé un inhibidor de la transcripció gènica com és l'actinomicina C, ó bé un inhibidor de la traducció, la cicloheximida.

Els resultats d'aquests assaigs ens mostren, en primer lloc, que les cèl·lules NK purificades i posades en cultiu sense cap estímul lliuren al medi quantitats significatives de

totes les citocines testades. A més a més es van obtenir quantitats detectables d'IL-8 en llisats de cèl·lules NK immediatament després de la purificació. En segon lloc observem un increment de la quantitat d'IL-8 fins a les 120 hores de cultiu d'aquestes cèl·lules amb el F4P, observant-se una bona viabilitat dels cultius amb aquest factor.

S'han considerat dos possibles interpretacions d'aquests resultats. En primer lloc que les cèl·lules NK sintetitzen citocines sense necessitat de cap estímul. En aquest sentit, altres funcions biològiques d'aquestes cèl·lules, com és l'activitat citotòxica, no precisen de cap activació previa per desencadenar-se malgrat diferents factors tenen la capacitat de modular-la [28]. En segon lloc també caldria considerar la possibilitat de que fos en algun moment de la manipulació de la mostra, des de l'extracció de sang fins el procés de purificació, la responsable de l'activació d'aquestes cèl·lules, previ a l'assaig. De totes maneres la demostració concloent d'aquesta funció en condicions bassals estrictes és, si més no, de difícil planteig, ja que tant sols l'obtenció de la mostra, com ja s'ha discutit abans, pot desencadenar l'activació inespecífica de les plaquetes lliurant al medi els diferents moduladors de l'activitat d'aquestes cèl·lules.

Els resultats obtinguts amb els inhibidors de la transcripció i de la traducció va ser, en els dos casos, la disminució de la quantitat de proteïna d'IL-8. D'aquests resultats concloïem que el F4P, probablement, estimula tant el lliurament com la síntesis d'aquestes citocines activant tant el lliurament de citocines preformades i emmagatzemades com la seva transcripció gènica. En aquest sentit es va determinar, posteriorment, les variacions de la quantitat de mRNA per efecte del F4P de cada una d'aquestes citocines.

3.6. El F4P incrementa el mRNA d'aquestes citocines.

Per realitzar aquesta determinació es va extreure el RNA de les cèl·lules amb diferents condicions, de dosis resposta i temps de cultiu, amb el F4P. Posteriorment a través d'una RT-PCR es va valorar de forma semiquantitativa els nivells de mRNA de cada citocina. Els resultats ens demostraren que el F4P és capaç d'augmentar el mRNA de citocines proinflamàtores en les NK de forma dosi-depenent. El rang de dosis de F4P necessaris per augmentar tant la quantitat de mRNA com la de proteïna d'aquestes citocines

va ser el mateix. En quasi tots els casos es va observar un pic en els nivells de mRNA a les 6 hores de l'exposició a l'estímul.

Es van realitzar els mateixos assaigs tractant les cèl·lules amb CHX abans de l'estímul amb F4P. El resultat va ser una correlació negativa entre la quantitat de proteïna i la quantitat de mRNA. L'efecte d'aquest inhibidor de la traducció va ser l'increment en els nivells de mRNA d'IL-8, respecte dels valors de mRNA en les cèl·lules tractades només amb F4P. En canvi la CHX provoca la disminució dels valors de citocina lliurada al medi. Aquest resultat el justifiquem per una acumulació de transcrits que no poden ser traduïts per efecte de la CHX.

Aquests resultats recolzen, novament, que el F4P podria induir el seu efecte, en la regulació en la síntesi d'aquestes citocines, a nivell transcripcional. Malgrat amb els resultats obtinguts aquest podria ser, amb més probabilitat, el mecanisme regulador, caldria descartar el mecanisme d'estabilització del mRNA per tècniques com el "run-off", cal assenyalar, però, que aquest és un mecanisme de regulació menys freqüent.

3.7. El F4P estimula les cèl·lules NK a lliurar IL-8 biològicament activa.

L'IL-8 és una quimiocina de la subfamília CXC amb capacitat per estimular el quimiotactisme de les cèl·lules PMN. Els monòcits han estat considerats com els principals productors d'aquesta quimiocina produint-la en forma monomèrica després de l'estímul amb LPS. Cèl·lules NK, en canvi, estimulades amb FcγRIIIA produeixen IL-8 dimèrica, amb una forta activitat sobre LT [30]. Per tant, el fet que diferents tipus cel·lulars, activats amb estímuls diversos, puguin produir diferents formes de la mateixa citocina amb activitats diferents ens va fer pensar en la necessitat de comprovar la capacitat biològica dels sobrenadants del cultiu de les NK estimulades amb F4P.

Per aquest assaig es van utilitzar els sobrenadants en els que es va detectar un augment de la producció antigènica de citocines proinflamatòries per efecte d'aquest factor. Com es mostra en els resultats observem una correlació entre la producció antigènica d'IL-8 i la inducció de quimiotactisme en PMN. Dels nostres resultats es desprèn, també, que

aquesta activitat quimiotàctica es deu principalment a l'IL-8 ja que, eliminant aquesta quimiocina del sobrenadant amb un AcMn lligat a proteïna-A-sepharosa, disminueix entre un 70 % i un 80 % la capacitat quimiotàctica d'aquest. L'activitat parcial que es manté després d'eliminar del medi l'IL-8, aproximadament un 20 %, podria ser deguda a d'altres factors proinflamadors lliurats per aquestes cèl·lules estimulades amb F4P. En la bibliografia està descrit que citocines com IL-1, TNF α ó el GM-CSF són capaces de mobilitzar PMN. Vam observar, també, que el F4P a les dosis utilitzades per estimular les NK, i que per tant es troben en els sobrenadants testats, no tenen efecte quimiotàctic directe sobre els PMN. Resultat ja descrit en la bibliografia [76].

Aquest assaig demostra de forma directe la capacitat proinflamadora de les cèl·lules NK, facilitant l'afluència de cèl·lules PMN en llocs on hi ha un increment de F4P.

4. EFECTE DEL F4P SOBRE L'ACTIVITAT CITOTÒXICA.

4.1. El F4P i l'IL-2 tenen efectes complementaris.

Com ja s'ha dit les cèl·lules NK actuen com a primera línia de defensa dels organismes gràcies a la seva activitat citotòxica NK i LAK. Aquestes cèl·lules, malgrat poden desencadenar el procés citotòxic sense necessitat de cap estímul previ, s'han descrit diferents factors capaços d'estimular aquesta funció citolítica com és l'IL-2 [28, 157].

L'activitat citotòxica és, però, un paràmetre força variable, malgrat se sap que les cèl·lules NK tenen activitat citotòxica basal, aquesta pot ser diferent per cada donant, mantenint sempre les mateixes condicions d'assaig. En els resultats s'ha representat els valors de les activitats citotòxiques basals NK i LAK, mesurades sobre CMN totals, de 203 donants sans en un diagrama de box-plot, aquesta representació ens permet veure les principals característiques de la població, podent valorar tant la tendència central com la dispersió, l'asimetria i els valors anòmals.

Per determinar l'efecte del F4P sobre les activitats citotòxiques es van fer 6 determinacions en diferents donants sobre cèl·lules NK purificades. D'aquestes, en 4 el F4P no va induir cap efecte sobre les activitats NK i LAK, les altres dos van donar resultats

dispar. En canvi, es va detectar un efecte potenciador del F4P sobre l'ADCC, en 5 dels donants.

Donat la variabilitat dels resultats, per poder realitzar un anàlisi estadístic adequat de les dades, es va optar per fer un número significatiu de casos analitzant l'efecte del factor sobre 20 donants sans. Aquests assaigs es van realitzar sobre cèl·lules mononucleades totals, donat l'elevat cost que suposa cada purificació cel·lular. Cal assenyalar que cèl·lules com les PMN que poden desencadenar activitat citotòxica queden descartades en el procés de purificació de les CMNs [248]. En aquests assaigs es va testar la capacitat de modular les activitats NK, LAK i ADCC del F4P i es va comparar amb la modulació induïda per l'IL-2. L'IL-2 és l'activador principal tant de l'activitat NK com de la LAK. En canvi, els resultats sobre la capacitat de l'IL-2 per regular l'ADCC són força controvertits [101, 158, 249]. Un possible motiu d'aquesta disparitat podrien ser les diferents condicions d'assaig en els que es realitzen aquests estudis, utilitzant-se, per exemple, diferents cèl·lules diana per la determinació de l'activitat citotòxica.

Com es mostra en els resultats observem que l'IL-2 incrementa les activitats NK i LAK com es descriu en la bibliografia [28]. En canvi, no detectem un efecte estadísticament significatiu de l'IL-2 sobre l'ADCC en les mateixes condicions d'assaig que es valora l'efecte del F4P (sobre cèl·lules quiescents i utilitzant p815 com a cèl·lules diana).

L'efecte del F4P observat va ser l'invers al de l'IL-2. Aquest factor no indueix cap efecte estadísticament significatiu sobre les activitats NK i LAK, mentre que si indueix un efecte significatiu sobre l'ADCC. Cal assenyalar que la dosi requerida de F4P per estimular l'ADCC coincideix amb la requerida per estimular la síntesi de citocines proinflamadores, obtenint-se corbes semblants de dosi resposta.

En general, els resultats que s'han obtingut en aquests estudis són, també, força contradictoris entre ells. Nosaltres pensem que això es deu a la utilització de diferents models, com el diferent grau de maduració ó preactivació cel·lular que s'ha utilitzat en els diferents estudis. Així, per exemple, s'han utilitzat com a models per estudiar aquestes activitats línies cel·lulars NK que requereixen factors de creixement com l'IL-2 [102], cèl·lules primàries preestimulades en temps llargs amb altes dosis d'IL-2 [103, 104],

estímuls curts i amb baixes dosis d'IL-2 [105], ó cèl·lules NK purificades i quiescents com en el nostre cas.

Particularment variables han estat els resultats obtinguts per la subfamília de les β -quimiocines. Diferents treballs mostren, per exemple, que el MCP-1 només indueix quimiotaxis sobre cèl·lules NK pre-estimulades [81]. En canvi, altres estudis observen la inducció de motilitat tant en cèl·lules pre-estimulades com quiescents [101].

La hipòtesi que nosaltres proposem, per tant, és que les diferències en els resultats es deuen a diferents estats d'activació previs a l'assaig. Hipòtesi que podria justificar també la variabilitat entre donants.

5. EL F4P NO TÉ EFECTE SOBRE LA PROLIFERACIÓ.

Varies citocines són capaces de regular l'activitat proliferativa de les cèl·lules NK com són l'IL-2, IL-10, IL-12, IL-15 [250], així com, també, s'ha descrit aquesta activitat en diferents quimiocines [100]. En aquest treball es va voler determinar si el F4P era capaç de modular la proliferació d'aquestes cèl·lules. Com es mostra en els resultats en dosis entre 10 i 200 ng/ml de F4P no vam observar cap efecte significatiu en la proliferació de les cèl·lules NK. També es va valorar si el F4P era capaç d'induir algun efecte sobre l'estímul proliferatiu desencadenat per l'IL-2, principal regulador conegut d'aquesta funció. Tampoc, en aquest cas, es va observar cap efecte significatiu.

6. EL F4P I L'IL-2 SEMBLEN TENIR EFECTES COMPLEMENTARIS SOBRE LES DIFERENTS FUNCIONS DE LES NK.

Així doncs, en cap dels paràmetres valorats, sobre les cèl·lules NK, on l'IL-2 té un efecte primordial, com són les activitats citotòxiques NK i LAK i la proliferació cel·lular, hem observat un efecte del F4P. En canvi, en funcions com són la producció de citocines ó l'ADCC on l'activitat de l'IL-2 és, si més no, controvertida, el F4P té un efecte significatiu. Aquestes funcions són regulades directe ó indirectament a través del receptor Fc γ RIIIA

(CD16). Finalment, observem en la síntesi de citocines, un efecte sinèrgic entre el F4P i el lligam de Fc γ R111A.

7. EL F4P INDUEIX CANVIS FENOTÍPICS.

La major part d'activadors provoquen en les cèl·lules diana canvis en les seves funcions, variacions en el seu fenotip. Així, es poden veure modificats l'expressió d'alguns receptors de membrana tant quantitativament com qualitativament.

Les cèl·lules NK varien l'expressió de receptors per l'estímul de determinades quimiocines. Se sap que l'IL-2 provoca l'increment de l'expressió del seu receptor d'afinitat intermitja (p75), indueix la síntesi del seu receptor d'alta afinitat Ag TAC (CD25), ó del CD69. Altres estímuls com l'activació a través del CD16 pot també induir l'expressió del CD69.

El nostra grup ha observat, per altra banda, que pacients pediàtrics de Neuroblastoma estadi IV tractats amb altes dosis de IL-2 tenen una expressió transitòria tant de CD69 com de CD25 post tractament amb IL-2 (dada no publicada).

L'estímul de les cèl·lules NK amb l' α -quimiocina F4P va provocar un estat d'activació associat, també, a canvis fenotípics. Es va observar la sobreexpressió del CD69, glicoproteïna de membrana homodimèrica. Malgrat no es coneix la funció específica d'aquesta molècula, se sap que és fosforilable i que és una de les primeres que s'expressa durant l'activació de les cèl·lules limfoides.

En tots els donants valorats, el F4P va ser capaç d'estimular l'expressió de CD69, malgrat que ni la cinètica ni els nivells màxims d'expressió van ser iguals en tots ells. En canvi, en cap dels casos testats es va detectar l'expressió de CD25 per efecte del F4P.

Aquest resultat ens van donar una nova evidència de que l'activació induïda pel F4P poc té a veure amb l'estat d'activació generat per l'IL-2. Doncs a més a més d'estimular diferents activitats, el fenotip observat en aquestes cèl·lules va ser diferent com a resultat de cada un d'aquests estímuls.

8. APROXIMACIÓ AL MECANISME DE TRANSDUCCIÓ DEL SENYAL INDUÏT PEL F4P.

Per duu a terme aquest estudi es van utilitzar diferents factors amb capacitat per modular l'activitat biològica d'alguns dels enzims implicats en les diferents vies de transducció del senyal.

Com ja s'ha dit la major part de receptors de les quimiocines, caracteritzats fins el moment, són de 7-segments de transmembrana acoblats a proteïnes d'unió a GTP (proteïnes G) que activen la fosfolipasa C, generen fosfoinositols i provoquen un transitori increment de Ca^{2+} intracitoplasmàtic. Per poder valorar una possible implicació d'un receptor d'aquestes característiques pel F4P, es va determinar per un costat el possible augment transitori de Ca^{2+} intracitoplasmàtic així com la implicació de proteïnes G amb la utilització d'inhibidors específics per algun dels membres d'aquesta família de proteïnes.

8.1. El F4P no indueix un augment transitori de Ca^{2+} intracitoplasmàtic.

Els resultats que es van obtenir ens demostren que l'efecte del F4P sobre les cèl·lules NK no està associat a la mobilització de Ca^{2+} intracitoplasmàtic. En les mateixes condicions, en canvi, i com es descriu en la bibliografia, es va detectar un increment de Ca^{2+} transitori en estimular aquestes cèl·lules amb un AcMn anti-Fc γ RIIIA (anti-CD16). Per altra, banda l'activitat sinèrgica que s'observa en el lliurament d'IL-8 en estimular les NK amb F4P i anti-CD16 no es correlaciona amb l'augment en el pic de Ca^{2+} que té lloc per efecte de l'anti-CD16.

Diferents treballs descriuen que determinades quimiocines mobilitzen Ca^{2+} intracitoplasmàtic en cèl·lules NK activades, com és el cas del MCP-1. En canvi, nosaltres no detectem, per efecte del MCP-1, en cap dels casos testats, un increment de Ca^{2+} significatiu en cèl·lules NK quiescents. Observem però, un efecte coestimulador del MCP-1 i l'anti-CD16, detectant un pic de Ca^{2+} superior que amb l'estímul de l'anti-CD16 tot sol.

Finalment cèl·lules NK activades durant un temps curt de 16 hores, i amb dosis baixes d'IL-2 ó anti-CD16 tampoc mobilitzen Ca^{2+} per efecte del F4P.

Hi ha en la bibliografia altres casos descrits de quimiocines que indueixen un efecte sense estar associat la mobilització de Ca^{2+} . Per exemple, el RANTES una quimiocina també d'origen plaquetar, interacciona amb el receptor CCR5. Aquest receptor s'expressa en LT activats, té una estructura de 7 segments de transmembrana i indueix la mobilització de Ca^{2+} . Tanmateix s'ha descrit que el RANTES és capaç de modular l'activitat de LT en estat quiescent, i que per tant no expressen CCR5. Aquesta funció del RANTES no està associada a un augment de Ca^{2+} intracel·lular [116]. Un cas semblant és el de l'IP-10, aquesta és la quimiocina més homòloga al F4P, interacciona amb el receptor CXCR3, un receptor de 7-TM que indueix la mobilització de Ca^{2+} . El CXCR3 s'expressa en LT activats i cèl·lules NK infiltrades en llocs on hi ha inflamació [114]. Tanmateix s'ha descrit una unió específica de l'IP-10 a un receptor de naturalesa heparan sulfat proteoglican, capaç d'induir un efecte biològic sense la mobilització de Ca^{2+} [68].

Alguns treballs que s'han realitzat sobre el receptor del F4P apunten a que aquest no té una naturalesa de receptor de 7 segments de transmembrana. A més a més l'efecte del F4P sobre cèl·lules PMN no es va poder associar a un augment en la concentració de Ca^{2+} en el citoplasma [76]. Finalment els mateixos autors han caracteritzat un receptor específic pel F4P en Neutròfils humans de naturalesa condritin sulfat proteoglicà [94].

Finalment, en el treball de Lasagni et al [251] caracteritzen un receptor pel F4P. Aquest receptor, un splicing alternatiu del CXCR3 (CXCR3B), no augmenta el Ca^{2+} intracitoplasmàtic en interaccionar amb el lligam.

8.2. Implicació de les Proteïnes G.

Per determinar la implicació d'aquesta família de proteïnes en el mecanisme de transducció del senyal del F4P sobre les cèl·lules NK es va valorar l'efecte de dos inhibidors específics d'algunes de les subfamílies d'aquestes proteïnes, la toxina pertússica i la toxina colèrica. Per un costat la toxina pertússica no va induir cap efecte sobre la capacitat del F4P per estimular la síntesis d'IL-8 en les NK. D'aquest resultat podem concloure que el F4P estimula una via de transducció del senyal on no es veuen implicades proteïnes G de la subfamília Gi ó Gq.

El resultat que es va obtenir de l'efecte de la toxina colèrica, en canvi, és força interessant. La toxina colèrica és un enzim que catalitza la transferència d'ADP ribosilat a la subunitat α de les proteïnes G_s . Aquest ADP ribosilat altera la subunitat α impeding la hidròlisi del GTP unit, això provoca el manteniment de l'estat actiu de la proteïna estimulant indefinidament l'adenilat ciclase, el resultat és, entre d'altres, un augment en els nivells d'AMPc.

Per altra banda, el receptor CXCR3-B que s'expressa en cèl·lules endotelials, i que podria ser el responsable de l'efecte del F4P estimula l'adenilat ciclase augmentant els nivells d'AMPc [251]. Aquest mecanisme podria ser una possible explicació del resultat que nosaltres varem obtenir amb l'efecte aditiu del F4P i la toxina colèrica.

8.3. L'efecte del F4P implica l'activació d'enzims PTK i no PKC.

Es van preincubar les cèl·lules NK amb activadors ó inhibidors més ó menys específics d'aquests enzims abans de l'estímul amb F4P. Posteriorment es va valorar com afectaven aquests moduladors a la síntesis d'IL-8.

L'efecte que es va obtenir va ser l'invers del que calia esperar, ambdós inhibidors, tant la Staurosporina com la PKCi foren capaços de potenciar la síntesis d'IL-8 en aquestes cèl·lules. En canvi, un factor amb la capacitat d'estimular l'efecte d'aquests enzims com és el PMA produeix una disminució en la síntesis d'IL-8 per part de les NK, revertint l'efecte del F4P. D'aquests resultats pensem, en primer lloc, que l'efecte del F4P no es desencadena a través d'una via de transducció del senyal on estan implicats la família d'enzims PKC. I que, possiblement, la inhibició d'alguna d'aquestes vies potenciaria indirectament l'efecte d'aquest factor.

En canvi, tant la genisteïna com el wortmannin, un inhibidor poc específic d'enzims amb activitat tirosin-quinasa i un inhibidor específic de PI3-K respectivament, inhibeixen la producció d'IL-8, revertint l'estímul del F4P. D'aquest resultat vam concloure que el F4P transdueix una senyal d'activació en la cèl·lula on estan implicats enzims amb activitat tirosin-quinasa. El resultat obtingut amb el wortmannin ens indica que probablement un d'aquests enzims amb activitat tirosin-quinasa és la PI3-K.

Finalment per obtenir una evidència més directe sobre la implicació de l'enzim PI3-K es va realitzar un western blot. Com es pot veure en els resultats es va poder associar l'estímul del F4P amb un augment transitori de fosforilació en els residus tirosina d'aquest, indicant amb tota probabilitat un estat d'activació en aquest enzim. Altres autors han trobat la implicació de la PI3-K en la transducció de la senyal induïda per altres quimiocines. Aquest és el cas del RANTES que es va observar que era capaç d'estimular LT quiescents sense la implicació d'un increment de Ca^{2+} transitori, però amb l'activació de la PI3-K [116].

8.4. Les activitats citotòxiques NK i LAK estan associades a l'activació de la família d'enzims PKC.

L'objectiu d'aquest assaig va ser determinar si la diferent capacitat d'efecte del F4P sobre les activitats biològiques de les NK es correlaciona amb diferències amb els enzims implicats en la transducció de la senyal. Malgrat els resultats descrits en la bibliografia ja apuntaven aquest fenomen, es va voler comprovar aquest resultat en el nostre model.

Les activitats citolítiques NK i LAK estan associades a una ràpida hidròlisi de fosfoinositols i a un increment de Ca^{2+} intracel·lular, fenòmens que desencadenen l'activació de la PKC. A més a més les proteïnes G també estan implicades en el procés d'activació de l'exocitosi de grànuls [191]. Per un altra banda és força interessant el fet que l'IL-2 en interaccionar amb el seu receptor desencadena un mecanisme d'activació semblant, on també es veuen implicades l'activació de la PKC i la mobilització de Ca^{2+} [252].

Com es mostra en els *resultats, apartat 9.2*, l'estímul d'aquestes cèl·lules amb PMA estimula les activitats citotòxiques NK i LAK. Mentre que un inhibidor específic de PKC, PKCi provoca la total desaparició d'aquestes activitats, fins i tot inhibint l'activitat NK basal.

La mateixa dosi d'inhibidor de PKC amb la que observem la total desaparició de l'activitat NK, aplicada sobre cèl·lules del mateix donant, va ser capaç de potenciar el lliurament d'IL-8 uns 4 cops per sobre de l'efecte del F4P. No observem un efecte significatiu del wortmannin, sobre les activitats citotòxiques NK i LAK.

Finalment també va ser força interessant el resultat obtingut en l'efecte dels inhibidors de les proteïnes G sobre les activitats citotòxiques NK i LAK. Un altre cop, l'efecte observat va ser l'invers a l'obtingut amb la síntesis de citocines, donat que la toxina col·lèrica va tenir un efecte inhibidor. La toxina pertússica no va tenir efecte sobre les activitats NK i LAK.

Les activitats citotòxiques NK i LAK i la proliferació cel·lular són funcions regulades per l'IL-2. Malgrat no vam observar una inhibició significativa per part de l'IL-2 en vers de les funcions proinflamadores si detectem una tendència de disminució de la síntesi de citocines, que es va repetir en la major part dels casos. Caldria, però, realitzar un major número d'assaigs per poder determinar la significació d'aquest resultat.

8.5. L'Activitat Citotòxica dependent d'Anticòs.

L'ADCC desencadena el seu efecte a través del receptor que reconeix la fracció cristal·litzable de les Ig, el Fc γ RIIIA (CD16). Aquest receptor s'expressa en cèl·lules NK així com en PMN, per tant, ambdós poden desencadenar l'activitat ADCC. En cèl·lules NK, però, el CD16 té una cua intracitoplasmàtica amb la capacitat d'estimular una via de transducció del senyal que induirà l'activació d'altres funcions [253]. Aquesta via de transducció té com a missatger secundari l'increment transitori de Ca²⁺ intracitoplasmàtic [125]. Hi ha treballs on s'ha estudiat la implicació de les proteïnes G a través del Fc γ RIIIA els resultats són però controvertits [203, 205]. També se li ha associat un augment dels nivells d'AMPc [203]. Finalment, altres treballs demostren que l'estímul a través del Fc γ RIIIA també provoca l'activació d'enzims Tyr-K [254, 255], com l'enzim PI3-K [210].

Els mecanismes que poden explicar el sinergisme que observem en l'activació del F4P i el CD16 poden ser diferents. Tant el CD16 [210] com el F4P (segons els nostres resultats) transduïxen la senyal a través de l'activació de l'enzim PI3-K. Per altre banda també podria ser comú en els dos mecanismes un augment en els nivells d'AMPc [203, 251] i també d'acord amb els resultats que nosaltres obtenim amb la toxina colèrica.

Malgrat no es coneix exactament tot el procés implicat en la transducció del senyal de cada una de les activitats citotòxiques s'han apuntat diferències substancials entre cadascuna d'elles. Mentre que les activitats citotòxiques NK i LAK induïxen el lliurament de grànuls citotòxics a través d'una via de transducció del senyal on està implicada la PKC, l'ADCC desencadena el seu efecte a través d'un mecanisme independent a aquesta família d'enzims. En l'ADCC sembla que l'enzim directament responsable del lliurament de grànuls és la PI3-K. Per altra banda, observacions en diferents models cel·lulars han demostrat que la PI3-K té un paper fonamental en la regulació del transport selectiu de vesícules [200]. L'ADCC constituiria, de les activitats citotòxiques desencadenades per les NK, la més selectiva i regulada. Aquesta requereix, en primer lloc, del reconeixement de la cèl·lula diana amb un Ac i en segon lloc el mecanisme de lliurament de vesícules seria probablement més selectiu.

S'ha demostrat que el F4P i la interacció amb el CD16 tenen un efecte sinèrgic en estimular aquestes cèl·lules per lliurar citocines. El fet que ambdós tinguin implicada la PI3-K, la qual ha estat associada al lliurament selectiu de vesícules, ens fa pensar en aquest com un possible punt en comú en aquests dos estímuls.

Per altre banda el grup de Frank Petersen han descrit característiques semblants per l'efecte del F4P sobre els neutròfils [94, 243]. Ells observen que el F4P és capaç de modular el transport selectiu de vesícules en aquestes cèl·lules, mecanisme que tampoc poden associar a un receptor de 7-segments de transmembrana.

Pot ser la possible implicació a nivell fisiològic d'aquests resultats és el més interessant. En un procés inflamatori on pot haver associat un mecanisme de reparació de teixits és important la funció de diferents factors lliurats per les plaquetes, com el TGF β , que inhibeixen l'activitat NK [46]. Potser el procés inflamatori potenciaria l'activitat ADCC per ser de característiques més selectives. Recolzaria aquesta hipòtesis el fet que el desencadenament d'aquesta activitat potencia el mateix procés inflamatori activant la capacitat d'aquestes cèl·lules per lliurar citocines proinflamatòries.

En aquest context són interessants les funcions que el nostre grup demostra pel F4P. Aquest factor, lliurat per les plaquetes en estadis primerencs del procés inflamatori, no

induiria cap efecte sobre les activitats citotòxiques NK i LAK. Activitats citotòxiques, que tant altres grups com nosaltres mateixos hem constatat poden ser inhibides per altres factors lliurats en el mateix procés [46]. En canvi el F4P potenciarà l'activitat ADCC. Donat a més a més l'efecte sinèrgic que observem entre aquests dos estímuls pel lliurament de citocines ambdós tindrien la capacitat per potenciar la inflamació.

9. PAPER FISIOLÒGIC DE LES CÈL·LULES NK.

Les quimiocines tenen un paper central en la migració i localització dels LT i LB in vivo, el que va fer pensar que aquests factors pugessin tenir un efecte similar en la biologia de les cèl·lules NK. El primer fenomen que corrobora aquesta idea és la diferent expressió dels receptors de les quimiocines associat a un diferent patró d'expressió de les molècules d'adhesió per les CD56^{+brigh} i les CD56^{+dim}. Aquests resultats suggereixen que aquestes dues subpopulacions de cèl·lules NK tenen una diferent localització in vivo [174, 175]. Així, per exemple, els elevats nivells d'expressió de CCR7 i L-selectina en NK CD56^{+brigh} podria dirigir aquestes cèl·lules als òrgans limfoides secundaris [174, 175]. Aquesta subpopulació de cèl·lules NK, quan s'activa, produeix grans quantitats d'INF γ i altres citocines amb capacitat per estimular LT i LB en els òrgans limfàtics secundaris. En canvi les cèl·lules CD56^{+dim} quiescents no expressen ni CCR7 ni L-selectina però sí LFA-1 i d'altres molècules d'adhesió, probablement això els facilita la localització en teixits perifèrics no limfoides. Quan aquestes cèl·lules s'activen, com a resposta, per exemple, a un estímul inflamatori, expressen CCR7 el que podria promoure la seva migració dels teixits perifèrics als òrgans limfàtics. Les quimiocines també poden regular l'activitat citolítica i la proliferació de les cèl·lules NK regulant, així, la seva resposta a tumors o a patògens infecciosos.

Dels resultats que hem obtingut en aquest treball nosaltres especulem la següent implicació fisiològica: Les cèl·lules NK actuen, com ja és sabut, com a primera línia de defensa dels organismes en processos com les infeccions víriques o el creixement neoplàstic. En aquest context les cèl·lules NK són potents agents amb capacitat per desencadenar un procés citotòxic sense necessitat d'un estímul previ. Diferents factors són capaços de potenciar aquesta activitat, encara que els principals són les citocines i entre elles

l'IL-2. Per efecte de l'IL-2 les cèl·lules NK veuen potenciada la seva capacitat proliferativa, incrementant la capacitat citotòxica, i augmentant el rang de cèl·lules diana que poden llisar.

L'altre funció de les cèl·lules NK, malgrat ser menys estudiada no és menys important, és la capacitat per modular la inflamació. Com ja s'ha dit el procés inflamatori pot anar associat a altres processos com la reparació de teixits, que pot tenir semblances importants amb la forma de creixement de les cèl·lules neoplàssiques. Això fa que la regulació de les funcions de les NK a dins d'aquest procés sigui fonamental.

Les cèl·lules NK en estat quiescent són capaces de desencadenar activitat citotòxica, tenen receptors d'afinitat intermitja per l'IL-2 el que els hi fa susceptibles del seu efecte sense necessitat d'un estímul previ com en el cas dels LT. Com s'ha demostrat, tant pel contingut d'IL-8 dels llisats cel·lulars com per la presència de mRNA de les diferents citocines immediatament després de la purificació de les cèl·lules, les NK sintetitzen i magatzemen citocines sense necessitat de cap estímul. L'activació desencadenada pel F4P activa la immediata alliberació d'aquestes citocines, així com la seva síntesis de nou.

El fet que observem la potenciació d'un efecte en aquestes cèl·lules en afegir en el cultiu un inhibidor d'una via de transducció del senyal, ens fa especular si aquestes cèl·lules es troben en un balanç entre dos activitats podríem dir proinflamatoria i procitolítica. Possiblement l'estímul d'una de les dos activitats provocaria la inhibició de l'altre. Aquesta hipòtesi justificaria tant les diferències que observem entre els diferents donants sans en els que s'ha realitzat l'assaig com també les diferències que trobem en la bibliografia en l'efecte d'un determinat factor sobre les NK, quan aquests treballen sobre diferents models de NK.

10. PROPIETATS DEL F4P

A més a més de les propietats associades amb la inflamació, el F4P exerceix una activitat procoagulant prevenint la formació estable del complexa heparina-antitrombina III-trombina. També impedeix la unió als seus receptors de factors de creixement amb receptors associats a heparina com el FGF, vEGF, ó TGF β . Aquest bloqueig del receptor és un dels mecanismes que es proposen per explicar l'efecte antiangiogènic del F4P. Estudis posteriors

demostren l'habilitat del F4P per unir-se *in vivo* específicament a les àrees d'angiogènesi activa i inhibir el creixement del tumor, probablement com a conseqüència de la supressió de la neovascularització induïda pel tumor.

Aquest fet revela la possibilitat d'utilitzar el F4P com a agent terapèutic en el tractament d'alguns tumors considerant que la inhibició de l'angiogènesi podria retardar el creixement del tumor. La inhibició de l'angiogènesi sembla tenir un efecte citostàtic més que citotòxic i per tant la inhibició del creixement del tumor podria requerir un manteniment prolongat de la teràpia amb el F4P. En aquest cas la teràpia gènica podria potencialment crear una regió aïllada de continua inhibició de l'angiogènesi per la transducció local de gens, com per exemple el F4P [256].

Altres estudis demostren que el F4P és un potent inhibidor de l'hematopoesis, particularment de la megacariocitopoesis *in vitro*. El F4P també preserva la viabilitat i supervivència de cèl·lules hematopoètiques i redueix la seva quimiosensibilitat als efectes citotòxics de varis agents quimioteràpics. Aquest efecte és força interessant ja que sembla ser restrictiu a cèl·lules normals i no protegeix a cèl·lules tumorals. Aquests resultats tenen importants implicacions en la utilització del F4P com a teràpia en el tractament del càncer associada a tractaments com la quimioteràpia i radioteràpia [58, 70].

Per tot l'esmentat creiem que és crucial entendre els mecanismes i funcions moleculars del F4P per ser considerat com un agent terapèutic. En aquest treball contribuïm a entendre l'important paper del F4P com un regulador inflamatori a través dels efectes en les cèl·lules Natural Killer.

CONCLUSIONS

El F4P estimula l'activitat proinflamadora de les cèl·lules NK activant la capacitat per sintetitzar i lliurar citocines proinflamadores, potenciant l'activitat citotòxica depenent d'anticòs i facilitant l'expressió transitòria del CD69.

- El F4P, a una dosi fisiològica en un procés inflamatori, potencia les cèl·lules NK a sintetitzar i lliurar les citocines IL-1 β , IL-6, IL-8, INF γ , TNF α i GM-CSF. Aquest factor és capaç de desencadenar aquest efecte sense necessitat de cap altre estímul. Observem, però un efecte sinèrgic del F4P amb l'estímul a través del receptor Fc γ RIIIA i no amb l'IL-2.
- El F4P, a la dosi abans citada, és capaç de potenciar l'activitat ADCC, al contrari que l'IL-2. A més a més no detectem un efecte significatiu del F4P sobre les activitats biològiques en les que l'IL-2 és el principal activador, com ara les activitats citotòxiques NK, LAK i la proliferació cel·lular.
- El F4P indueix una expressió transitòria del receptor CD69, mentre que no estimula l'expressió del CD25, receptor d'alta afinitat de l'IL-2.
- El F4P unit a heparina manté la capacitat de potenciar l'activitat proinflamadora de les cèl·lules NK.
- Les cèl·lules NK estimulades amb F4P lliuren citocines amb capacitat per estimular l'activitat quimiotàctica dels neutròfils. També s'ha demostrat que el 70% del potencial quimiotàctic induït pels factors lliurats per les cèl·lules NK estimulades amb F4P, es deu a l'efecte de l'IL-8 lliurada per aquestes cèl·lules.

L'efecte del F4P sobre les cèl·lules NK quiescents no està associat a un increment transitori de Ca^{2+} intracitoplasmàtic. Observem un efecte potenciador de la toxina colèrica sobre el F4P, mentre que no detectem cap efecte significatiu de la toxina pertússica. L'estímul a través del F4P s'ha pogut associar a l'activació d'enzims PTK i més concretament a la fosforilació en els residus Tyr de l'enzim PI3-K. Finalment, els resultats obtinguts amb inhibidors de la transcripció, per una banda, i de la traducció per l'altre apunten que el F4P indueix la síntesi de citocines estimulants la seva transcripció gènica.

Els resultats suggereixen l'existència en les cèl·lules NK de dos vies complementàries i contraposades que semblen bloquejar-se mútuament dirigint l'activitat d'aquestes cèl·lules vers un comportament citolític o pro-inflamatori.

BIBLIOGRAFIA

1. Lechler, R.I. (1988) Structure-function relationships of MHC molecules. *Immunology.* ; **S1**: 252-26.
2. Moretta, L., Ciccone, E., Mingari, M.C., Biassoni, R., Moretta, A. (1994) Human natural killer cells: origin, clonality, specificity, and receptors. *Adv Immunol.* ; **55**: 341-80.
3. Spits, H., Lanier, L.L., Phillips, J.H. (1995) Development of human T and natural killer cells. *Blood.* ; **85**: 2654-70.
4. Julius, M., Maroun, C.R., Haughn, L. (1993) Distinct roles for CD4 and CD8 as co-receptors in antigen receptor signalling. *Immunol Today.* ; **14**: 177-83.
5. Seder, R.A., Paul, W.E. (1994) Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4+ T cells. *Annu Rev Immunol.* ; **12**: 635-73.
6. Trinchieri, G. (1995) Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. *Annu Rev Immunol.* ; **13**: 251-76.
7. Solana, R., Mariani, E. (2000) NK and NK/T cells in human senescence. *Vaccine.* ; **18**: 1613-20.
8. Mantovani, A., Dejana, E. (1989) Cytokines as communication signals between leukocytes and endothelial cells. *Immunol Today.* ; **10**: 370-5.
9. *Inflammation: basic principles and clinical correlates.* Raven Press, New York, 1992.
10. Pruzanski, W., Vadas, P. (1991) Phospholipase A2--a mediator between proximal and distal effectors of inflammation. *Immunol Today.* ; **12**: 143-6.
11. Jefferis, R. (1991) Structure-function relationships in human immunoglobulins. *Neth J Med.* ; **39**: 188-98.

12. Frank, M.M., Fries, L.F. (1991) The role of complement in inflammation and phagocytosis. *Immunol Today.* ; **12**: 322-6.
13. Braquet, P., Paubert-Braquet, M., Bourgain, R.H., Bussolino, F., Hosford, D. (1989) PAF/cytokine auto-generated feedback networks in microvascular immune injury: consequences in shock, ischemia and graft rejection [published erratum appears in *J Lipid Mediat* 1989 Nov-Dec;1(6):361]. *J Lipid Mediat.* ; **1**: 75-112.
14. Baggiolini, M., Dahinden, C.A. (1994) CC chemokines in allergic inflammation. *Immunol Today.* ; **15**: 127-33.
15. Baggiolini, M., Dewald, B., Moser, B. (1997) Human chemokines: an update. *Annu Rev Immunol.* ; **15**: 675-705.
16. Spry, C.J., Kay, A.B., Gleich, G.J. (1992) Eosinophils 1992 [see comments]. *Immunol Today.* ; **13**: 384-7.
17. Hamawy, M.M., Mergenhagen, S.E., Siraganian, R.P. (1994) Adhesion molecules as regulators of mast-cell and basophil function. *Immunol Today.* ; **15**: 62-6.
18. Bainton, D.F. *The cell biology of inflammation*. Elsevier/North-Holland, New York, 1980.
19. Banchereau, J., Steinman, R.M. (1998) Dendritic cells and the control of immunity. *Nature.* ; **392**: 245-52.
20. Doherty, P.C., Allan, J.E., Lynch, F., Ceredig, R. (1990) Dissection of an inflammatory process induced by CD8⁺ T cells. *Immunol Today.* ; **11**: 55-9.
21. Duijvestijn, A., Hamann, A. (1989) Mechanisms and regulation of lymphocyte migration. *Immunol Today.* ; **10**: 23-8.
22. Zucker-Franklin, D., Grusky, G. (1972) The actin and myosin filaments of human and bovine blood platelets. *J Clin Invest.* ; **51**: 419-425.
23. Harrison, P., Cramer, E.M. (1993) Platelet alpha-granules. *Blood Rev.* ; **7**: 52-62.

24. Kaplan, K.L., Broekman, M.J., Chernoff, A., Lesznik, G.R., Drillings, M. (1979) Platelet α -granule proteins: studies on release and subcellular localization. *Blood.* ; **53**: 604-618.
25. Fava, R.A., Casey, T.T., Wilcox, J., Pelton, R.W., Moses, H.L., Nanney, L.B. (1990) Synthesis of Transforming Growth Factor β -1 by Megakaryocytes and its localization to Megakaryocyte and Platelet α -Granules. *Blood.* ; **76**: 1946-1955.
26. Girard, J.P., Springer, T.A. (1995) High endothelial venules (HEVs): specialized endothelium for lymphocyte migration. *Immunol Today.* ; **16**: 449-57.
27. Osborn, L. (1990) Leukocyte adhesion to endothelium in inflammation. *Cell.* ; **62**: 3-6.
28. Robertson, M.J., Ritz, J. (1990) Biology and clinical relevance of human natural killer cells. *Blood.* ; **76**: 2421-38.
29. Allavena, P., Paganin, C., Martin-Padura, I., Peri, G., Gaboli, M., Dejana, E., Marchisio, P.C., Mantovani, A. (1991) Molecules and structures involved in the adhesion of natural killer cells to vascular endothelium. *J Exp Med.* ; **173**: 439-48.
30. Somersalo, K., Carpen, O., Saksela, E. (1994) Stimulated natural killer cells secrete factors with chemotactic activity, including NAP-1/IL-8, which supports VLA-4- and VLA-5- mediated migration of T lymphocytes. *Eur J Immunol.* ; **24**: 2957-65.
31. Prescott, S.M., Zimmerman, G.A., McIntyre, T.M. (1990) Platelet-activating factor. *J Biol Chem.* ; **265**: 17381-4.
32. Hayashi, N., Chihara, J., Kobayashi, Y., Kakazu, T., Kurachi, D., Yamamoto, T., Nakajima, S. (1994) Effect of platelet-activating factor and platelet factor 4 on eosinophil adhesion. *Int Arch Allergy Immunol.* ; **1**: 57-9.
33. Falus, A., Meretey, K. (1992) Histamine: an early messenger in inflammatory and immune reactions. *Immunol Today.* ; **13**: 154-6.

34. Strober, W., Kelsall, B., Fuss, I., Marth, T., Ludviksson, B., Ehrhardt, R., Neurath, M. (1997) Reciprocal IFN-gamma and TGF-beta responses regulate the occurrence of mucosal inflammation. *Immunol Today.* ; **18**: 61-4.
35. O'Neill, L.A., Dinarello, C.A. (2000) The IL-1 receptor/toll-like receptor superfamily: crucial receptors for inflammation and host defense [In Process Citation]. *Immunol Today.* ; **21**: 206-9.
36. Barbara, J.A., Smith, W.B., Gamble, J.R., Van Ostade, X., Vandenabeele, P., Tavernier, J., Fiers, W., Vadas, M.A., Lopez, A.F. (1994) Dissociation of TNF-alpha cytotoxic and proinflammatory activities by p55 receptor- and p75 receptor-selective TNF-alpha mutants. *Embo J.* ; **13**: 843-50.
37. Pardi, R., Inverardi, L., Bender, J.R. (1992) Regulatory mechanisms in leukocyte adhesion: flexible receptors for sophisticated travelers [see comments]. *Immunol Today.* ; **13**: 224-30.
38. Mazer, B., Clay, K.L., Renz, H., Gelfand, E.W. (1990) Platelet-activating factor enhances Ig production in B lymphoblastoid cell lines. *J Immunol.* ; **145**: 2602-7.
39. Behrens, T.W., Goodwin, J.S. (1990) Control of human T cell proliferation by platelet-activating factor. *Int J Immunopharmacol.* ; **12**: 175-84.
40. Naldini, A., Carney, D.H. (1996) Thrombin modulation of natural killer activity in human peripheral lymphocytes. *Cell Immunol.* ; **172**: 35-42.
41. Kumar, R., Yoneda, J., Bucana, C.D., Fidler, I.J. (1998) Regulation of distinct steps of angiogenesis by different angiogenic molecules. *Int J Oncol.* ; **12**: 749-57.
42. Diaz-Flores, L., Gutierrez, R., Varela, H. (1994) Angiogenesis: an update. *Histol Histopathol.* ; **9**: 807-43.
43. Battegay, E.J. (1995) Angiogenesis: mechanistic insights, neovascular diseases, and therapeutic prospects. *J Mol Med.* ; **73**: 333-46.
44. Pepper, M.S. (1997) Transforming growth factor-beta: vasculogenesis, angiogenesis, and vessel wall integrity. *Cytokine Growth Factor Rev.* ; **8**: 21-43.

-
45. Gerwins, P., Skoldenberg, E., Claesson-Welsh, L. (2000) Function of fibroblast growth factors and vascular endothelial growth factors and their receptors in angiogenesis. *Crit Rev Oncol Hematol.* ; **34**: 185-194.
 46. Bellone, G., Aste-Amezaga, M., Trinchieri, G., Rodeck, U. (1995) Regulation of NK cell functions by TGF-beta 1. *J Immunol.* ; **155**: 1066-73.
 47. Gray, J.D., Hirokawa, M., Ohtsuka, K., Horwitz, D.A. (1998) Generation of an inhibitory circuit involving CD8+ T cells, IL-2, and NK cell-derived TGF-beta: contrasting effects of anti-CD2 and anti-CD3. *J Immunol.* ; **160**: 2248-54.
 48. Fargeas, C., Wu, C.Y., Nakajima, T., Cox, D., Nutman, T., Delespesse, G. (1992) Differential effect of transforming growth factor beta on the synthesis of Th1- and Th2-like lymphokines by human T lymphocytes. *Eur J Immunol.* ; **22**: 2173-6.
 49. Drake, W.T., Issekutz, A.C. (1993) Transforming growth factor-beta 1 enhances polymorphonuclear leucocyte accumulation in dermal inflammation and transendothelial migration by a priming action. *Immunology.* ; **78**: 197-204.
 50. Gersuk, G.M., Westermark, B., Mohabeer, A.J., Challita, P.M., Pattamakom, S., Pattengale, P.K. (1991) Inhibition of human natural killer cell activity by platelet-derived growth factor (PDGF). III. Membrane binding studies and differential biological effect of recombinant PDGF isoforms. *Scand J Immunol.* ; **33**: 521-32.
 51. de Visser, K.E., Kast, W.M. (1999) Effects of TGF-beta on the immune system: implications for cancer immunotherapy. *Leukemia.* ; **13**: 1188-99.
 52. Rak, J., Filmus, J., Finkenzeller, G., Grugel, S., Marme, D., Kerbel, R.S. (1995) Oncogenes as inducers of tumor angiogenesis. *Cancer Metastasis Rev.* ; **14**: 263-77.
 53. Bastida, E., Ordinas, A., Escolar, G., G.A., J. (1984) Tissue factor in microvesicles shed from U87MG human glioblastoma cells induces coagulation, platelet aggregation and thrombogenesis. *Blood.* ; : 177-184.
 54. Grignani, G., Alamasio, P., Pachiarini, L., Ricetti, M.M., Serra, L., Gamba, G. (1983) Interaction between neoplastic cells with different metastasizing capacity and platelet function. *Eur J Cancer Clin Oncol.* ; **4**: 519-525.

55. Karpatkin, S., Pearlstein, E. (1981) Role of platelets in tumor cell metastasis. *Ann Intern Med.* ; **95**: 636-641.
56. Blomqvist, G., Skolnik, G., Dahlstrom, A., Ahlman, H. (1986) Increase in blood serotonin levels in the hepatic venous outflow after intraportal tumor cell injection. *Inv Met.* ; **6**: 95-100.
57. Melchers, F., Rolink, A.G., Schaniel, C. (1999) The role of chemokines in regulating cell migration during humoral immune responses. *Cell.* ; **99**: 351-4.
58. Lecomte-Raclet, L., Alemany, M., Sequira-Le Grand, A., Amiral, J., Quentin, G., Vissac, A.M., Caen, J.P., Han, Z.C. (1998) New insights into the negative regulation of hematopoiesis by chemokine platelet factor 4 and related peptides. *Blood.* ; **91**: 2772-80.
59. Broxmeyer, H.E., Kim, C.H., Cooper, S.H., Hangoc, G., Hromas, R., Pelus, L.M. (1999) Effects of CC, CXC, C, and CX3C chemokines on proliferation of myeloid progenitor cells, and insights into SDF-1-induced chemotaxis of progenitors. *Ann N Y Acad Sci.* ; **872**: 142-62.
60. Gupta, S.K., Singh, J.P. (1994) Inhibition of endothelial cell proliferation by platelet factor-4 involves a unique action on S phase progression. *J Cell Biol.* ; **127**: 1121-7.
61. Han, Z.C., Maurer, A.M., Bellucci, S., Wan, H.Y., Krovianski, Y., Bertrand, O., Caen, J.P. (1992) Inhibitory effect of platelet factor 4 (PF4) on the growth of human erythroleukemia cells: proposed mechanism of action of PF4. *J Lab Clin Med.* ; **120**: 645-60.
62. Handin, R.I., Cohen, H.J. (1976) Purification and binding properties of human platelet factor four. *J Biol Chem.* ; **251**: 4273-82.
63. Stringer, S.E., Gallagher, J.T. (1997) Specific binding of the chemokine platelet factor 4 to heparan sulfate. *J Biol Chem.* ; **272**: 20508-14.
64. Ihrcke, N.S., Wrenshall, L.E., Lindman, B.J., Platt, J.L. (1993) Role of heparan sulfate in immune system-blood vessel interactions. *Immunol Today.* ; **14**: 500-5.

65. Hermodson, M., Schmer, G., Kurachi, K. (1977) Isolation, crystallization, and primary amino acid sequence of human platelet factor 4. *J Biol Chem.* ; **252**: 6276-9.
66. Rybak, M.E., Gimbrone, M.A., Jr., Davies, P.F., Handin, R.I. (1989) Interaction of platelet factor four with cultured vascular endothelial cells. *Blood.* ; **73**: 1534-9.
67. Maione, T.E., Gray, G.S., Hunt, A.J., Sharpe, R.J. (1991) Inhibition of tumor growth in mice by an analogue of platelet factor 4 that lacks affinity for heparin and retains potent angiostatic activity. *Cancer Res.* ; **51**: 2077-83.
68. Luster, A.D., Greenberg, S.M., Leder, P. (1995) The IP-10 chemokine binds to a specific cell surface heparan sulfate site shared with platelet factor 4 and inhibits endothelial cell proliferation. *J Exp Med.* ; **182**: 219-31.
69. Whitson, R.H., Jr., Wong, W.L., Itakura, K. (1991) Platelet factor 4 selectively inhibits binding of TGF-beta 1 to the type I TGF-beta 1 receptor. *J Cell Biochem.* ; **47**: 31-42.
70. Han, Z.C., Lu, M., Li, J., Defard, M., Boval, B., Schlegel, N., Caen, J.P. (1997) Platelet factor 4 and other CXC chemokines support the survival of normal hematopoietic cells and reduce the chemosensitivity of cells to cytotoxic agents. *Blood.* ; **89**: 2328-35.
71. Broxmeyer, H.E., Cooper, S., Cacalano, G., Hague, N.L., Bailish, E., Moore, M.W. (1996) Involvement of Interleukin (IL) 8 receptor in negative regulation of myeloid progenitor cells in vivo: evidence from mice lacking the murine IL-8 receptor homologue. *J Exp Med.* ; **184**: 1825-32.
72. Sarris, A.H., Broxmeyer, H.E., Wirthmueller, U., Karasavvas, N., Cooper, S., Lu, L., Krueger, J., Ravetch, J.V. (1993) Human interferon-inducible protein 10: expression and purification of recombinant protein demonstrate inhibition of early human hematopoietic progenitors. *J Exp Med.* ; **178**: 1127-32.
73. Oppenheim, J.J., Zachariae, C.O., Mukaida, N., Matsushima, K. (1991) Properties of the novel proinflammatory supergene "intercrine" cytokine family. *Annu Rev Immunol.* ; **9**: 617-48.

74. Baggiolini, M., Moser, B., Dewald, B. (1997) Blocking chemokine receptors
Interleukin-8 and related chemotactic cytokines--CXC and CC chemokines. *J Exp Med.* ; **186**: 1189-91.
75. Baggiolini, M. (1998) Chemokines and leukocyte traffic. *Nature.* ; **392**: 565-8.
76. Petersen, F., Ludwig, A., Flad, H.D., Brandt, E. (1996) TNF-alpha renders human neutrophils responsive to platelet factor 4. Comparison of PF-4 and IL-8 reveals different activity profiles of the two chemokines. *J Immunol.* ; **156**: 1954-62.
77. Baggiolini, M., Loetscher, P. (2000) Chemokines in inflammation and immunity. *Immunol Today.* ; **21**: 418-20.
78. Gasperini, S., Marchi, M., Calzetti, F., Laudanna, C., Vicentini, L., Olsen, H., Murphy, M., Liao, F., Farber, J., Cassatella, M.A. (1999) Gene expression and production of the monokine induced by IFN-gamma (MIG), IFN-inducible T cell alpha chemoattractant (I-TAC), and IFN- gamma-inducible protein-10 (IP-10) chemokines by human neutrophils. *J Immunol.* ; **162**: 4928-37.
79. Schumacher, C., Clark-Lewis, I., Baggiolini, M., Moser, B. (1992) High- and low-affinity binding of GRO alpha and neutrophil-activating peptide 2 to interleukin 8 receptors on human neutrophils. *Proc Natl Acad Sci U S A.* ; **89**: 10542-6.
80. Ludwig, A., Petersen, F., Zahn, S., Gotze, O., Schroder, J.M., Flad, H.D., Brandt, E. (1997) The CXC-chemokine neutrophil-activating peptide-2 induces two distinct optima of neutrophil chemotaxis by differential interaction with interleukin-8 receptors CXCR-1 and CXCR-2. *Blood.* ; **90**: 4588-97.
81. Miller, M.D., Krangel, M.S. (1992) Biology and biochemistry of the chemokines: a family of chemotactic and inflammatory cytokines. *Crit Rev Immunol.* ; **12**: 17-46.
82. Wolf, M., Delgado, M.B., Jones, S.A., Dewald, B., Clark-Lewis, I., Baggiolini, M. (1998) Granulocyte chemotactic protein 2 acts via both IL-8 receptors, CXCR1 and CXCR2. *Eur J Immunol.* ; **28**: 164-70.

83. Broxmeyer, H.E., Cooper, S., Hague, N., Benninger, L., Sarris, A., Cornetta, K., Vadhan-Raj, S., Hendrie, P., Mantel, C. (1995) Human chemokines: enhancement of specific activity and effects in vitro on normal and leukemic progenitors and a factor-dependent cell line and in vivo in mice. *Ann Hematol.* ; **71**: 235-46.
84. Cook, D.N. (1996) The role of MIP-1 alpha in inflammation and hematopoiesis. *J Leuk Biol.* ; **59**: 61-6.
85. Gerszten, R.E., Garcia-Zepeda, E.A., Lim, Y.C., Yoshida, M., Ding, H.A., Gimbrone, M.A., Jr., Luster, A.D., Luscinskas, F.W., Rosenzweig, A. (1999) MCP-1 and IL-8 trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions. *Nature.* ; **398**: 718-23.
86. Gu, L., Rutledge, B., Fiorillo, J., Ernst, C., Grewal, I., Flavell, R., Gladue, R., Rollins, B. (1997) In vivo properties of monocyte chemoattractant protein-1. *J Leuk Biol.* ; **62**: 577-80.
87. Hennemann, B., Tam, Y.K., Tonn, T., Klingemann, H.G. (1999) Expression of SCM-1alpha/lymphotactin and SCM-1beta in natural killer cells is upregulated by IL-2 and IL-12. *DNA Cell Biol.* ; **18**: 565-71.
88. Fong, A.M., Robinson, L.A., Steeber, D.A., Tedder, T.F., Yoshie, O., Imai, T., Patel, D.D. (1998) Fractalkine and CX3CR1 mediate a novel mechanism of leukocyte capture, firm adhesion, and activation under physiologic flow. *J Exp Med.* ; **188**: 1413-9.
89. Deuel, T.F., Keim, P.S., Farmer, M., Henrikson, R.L. (1977) Amino acid sequence of human platelet factor 4. *Proc Natl Acad Sci U S A.* ; **74**: 2256-8.
90. Loscalzo, J., Melnick, B., Handin, R.I. (1985) The interaction of platelet factor four and glycosaminoglycans. *Arch Biochem Biophys.* ; **240**: 446-55.
91. Brandt, E., Petersen, F., Ludwig, A., Ehlert, J.E., Bock, L., Flad, H.D. (2000) The beta-thromboglobulins and platelet factor 4: blood platelet-derived CXC chemokines with divergent roles in early neutrophil regulation. *J Leukoc Biol.* ; **67**: 471-8.

92. Harter, L., Petersen, F., Flad, H.D., Brandt, E. (1994) Connective tissue-activating peptide III desensitizes chemokine receptors on neutrophils. Requirement for proteolytic formation of the neutrophil-activating peptide 2. *J Immunol.* ; **153**: 5698-708.
93. Baggiolini, M., Dewald, B., Moser, B. (1994) Interleukin-8 and related chemotactic cytokines--CXC and CC chemokines. *Adv Immunol.* ; **55**: 97-179.
94. Petersen, F., Bock, L., Flad, H.D., Brandt, E. (1998) A chondroitin sulfate proteoglycan on human neutrophils specifically binds platelet factor 4 and is involved in cell activation. *J Immunol.* ; **161**: 4347-55.
95. Rajarathnam, K., Sykes, B.D., Kay, C.M., Dewald, B., Geiser, T., Baggiolini, M., Clark-Lewis, I. (1994) Neutrophil activation by monomeric interleukin-8. *Science.* ; **264**: 90-2.
96. Hoogewerf, A.J., Kuschert, G.S., Proudfoot, A.E., Borlat, F., Clark-Lewis, I., Power, C.A., Wells, T.N. (1997) Glycosaminoglycans mediate cell surface oligomerization of chemokines. *Biochemistry.* ; **36**: 13570-8.
97. Tunnacliffe, A., Majumdar, S., Yan, B., Poncz, M. (1992) Genes for beta-thromboglobulin and platelet factor 4 are closely linked and form part of a cluster of related genes on chromosome 4. *Blood.* ; **79**: 2896-900.
98. Eisman, R., Surrey, S., Ramachandran, B., Schwartz, E., Poncz, M. (1990) Structural and functional comparison of the genes for human platelet factor 4 and PF4alt. *Blood.* ; **76**: 336-44.
99. Bacon, K.B., Quinn, D.G., Aubry, J.P., Camp, R.D. (1993) Interleukin-8-stimulated polyphosphoinositide hydrolysis in human peripheral blood lymphocytes. *Blood.* ; **81**: 430-6.
100. Taub, D.D., Ortaldo, J.R., Turcovski-Corrales, S.M., Key, M.L., Longo, D.L., Murphy, W.J. (1996) Beta chemokines costimulate lymphocyte cytotoxicity, proliferation, and lymphokine production. *J Leukoc Biol.* ; **59**: 81-9.

101. Taub, D.D., Sayers, T.J., Carter, C.R., Ortaldo, J.R. (1995) Alpha and beta chemokines induce NK cell migration and enhance NK-mediated cytotoxicity. *J Immunol.* ; **155**: 3877-88.
102. Anegón, I., Cuturi, M.C., Trinchieri, G., Perussia, B. (1988) Interaction of Fc receptor (CD16) ligands induces transcription of interleukin 2 receptor (CD25) and lymphokine genes and expression of their products in human natural killer cells. *J Exp Med.* ; **167**: 452-72.
103. Sebok, K., Woodside, D., al-Aoukaty, A., Ho, A.D., Gluck, S., Maghazachi, A.A. (1993) IL-8 induces the locomotion of human IL-2-activated natural killer cells. Involvement of a guanine nucleotide binding (Go) protein. *J Immunol.* ; **150**: 1524-34.
104. Maghazachi, A.A., Skalhegg, B.S., Rolstad, B., Al-Aoukaty, A. (1997) Interferon-inducible protein-10 and lymphotactin induce the chemotaxis and mobilization of intracellular calcium in natural killer cells through pertussis toxin-sensitive and -insensitive heterotrimeric G- proteins. *Faseb J.* ; **11**: 765-74.
105. Allavena, P., Bianchi, G., Zhou, D., van Damme, J., Jilek, P., Sozzani, S., Mantovani, A. (1994) Induction of natural killer cell migration by monocyte chemotactic protein-1, -2 and -3. *Eur J Immunol.* ; **24**: 3233-6.
106. Natori, Y., Ou, Z.L., Yamamoto-Shuda, Y. (1998) Expression of lymphotactin mRNA in experimental crescentic glomerulonephritis. *Clin Exp Immunol.* ; **113**: 265-8.
107. Vester, B., Müller, K., Solbach, W., Laskay, T. (1999) Early gene expression of NK cell-activating chemokines in mice resistant to *Leishmania major*. *Infect Immun.* ; **67**: 3155-9.
108. Yoneda, O., Imai, T., Goda, S., Inoue, H., Yamauchi, A., Okazaki, T., Imai, H., Yoshie, O., Bloom, E.T., Domae, N., Umehara, H. (2000) Fractalkine-mediated endothelial cell injury by NK cells. *J Immunol.* ; **164**: 4055-62.

109. Mantovani, A. (1999) The chemokine system: redundancy for robust outputs. *Immunol Today.* ; **20**: 254-7.
110. Omann, G.M., Swann, W.N., Oades, Z.G., Parkos, C.A., Jesaitis, A.J., Sklar, L.A. (1987) N-formylpeptide-receptor dynamics, cytoskeletal activation, and intracellular calcium response in human neutrophil cytoplasts. *J Immunol.* ; **139**: 3447-55.
111. Johnston, J.A., Ferris, D.K., Wang, J.M., Longo, D.L., Oppenheim, J.J., Kelvin, D.J. (1994) Staurosporine restores signaling and inhibits interleukin-8-induced chemotactic desensitization. *Eur J Immunol.* ; **24**: 2556-62.
112. Clark-Lewis, I., Dewald, B., Geiser, T., Moser, B., Baggiolini, M. (1993) Platelet factor 4 binds to interleukin 8 receptors and activates neutrophils when its N terminus is modified with Glu-Leu-Arg. *Proc Natl Acad Sci U S A.* ; **90**: 3574-7.
113. Bebawy, S.T., Gorka, J., Hyers, T.M., Webster, R.O. (1986) In vitro effects of platelet factor 4 on normal human neutrophil functions. *J Leukoc Biol.* ; **39**: 423-34.
114. Loetscher, M., Gerber, B., Loetscher, P., Jones, S.A., Piali, L., Clark-Lewis, I., Baggiolini, M., Moser, B. (1996) Chemokine receptor specific for IP10 and mig: structure, function, and expression in activated T-lymphocytes [see comments]. *J Exp Med.* ; **184**: 963-9.
115. Weng, Y., Siciliano, S.J., Waldburger, K.E., Sirotina-Meisher, A., Staruch, M.J., Daugherty, B.L., Gould, S.L., Springer, M.S., DeMartino, J.A. (1998) Binding and functional properties of recombinant and endogenous CXCR3 chemokine receptors. *J Biol Chem.* ; **273**: 18288-91.
116. Turner, L., Ward, S.G., Westwick, J. (1995) RANTES-activated human T lymphocytes. A role for phosphoinositide 3-kinase. *J Immunol.* ; **155**: 2437-44.
117. Sozzani, S., Molino, M., Locati, M., Luini, W., Cerletti, C., Vecchi, A., Mantovani, A. (1993) Receptor-activated calcium influx in human monocytes exposed to monocyte chemotactic protein-1 and related cytokines. *J Immunol.* ; **150**: 1544-53.

118. Sallusto, F., Lanzavecchia, A., Mackay, C.R. (1998) Chemokines and chemokine receptors in T-cell priming and Th1/Th2- mediated responses. *Immunol Today.* ; **19**: 568-74.
119. Koren, H.S., R.B., H. (1983) Natural killing-resent and figure (summary of workshop on natural killer cells). *J Natl Cancer Inst.* ; **70**: 785-786.
120. Moretta, L., Ciccone, E., Moretta, A., Hoglund, P., Ohlen, C., Karre, K. (1992) Allorecognition by NK cells: nonself or no self? *Immunol Today.* ; **13**: 300-6.
121. Gumperz, J.E., Parham, P. (1995) The enigma of the natural killer cell. *Nature.* ; **378**: 245-8.
122. Trinchieri, G. (1994) Recognition of major histocompatibility complex class I antigens by natural killer cells. *J Exp Med.* ; **180**: 417-21.
123. Lanier, L.L. (1998) NK cell receptors. *Annu Rev Immunol.* ; **16**: 359-93.
124. Moretta, L., Ciccone, E., Poggi, A., Mingari, M.C., Moretta, A. (1994) Ontogeny, specific functions and receptors of human natural killer cells. *Immunol Lett.* ; **40**: 83-8.
125. Cassatella, M.A., Anegon, I., Cuturi, M.C., Griskey, P., Trinchieri, G., Perussia, B. (1989) Fc gamma R(CD16) interaction with ligand induces Ca²⁺ mobilization and phosphoinositide turnover in human natural killer cells. Role of Ca²⁺ in Fc gamma R(CD16)-induced transcription and expression of lymphokine genes. *J Exp Med.* ; **169**: 549-67.
126. Sulica, A., Metes, D., Gherman, M., Whiteside, T.L., Herberman, R.B. (1996) Divergent effects of Fc gamma RIIIA ligands on the functional activities of human natural killer cells in vitro. *Eur J Immunol.* ; **26**: 1199-203.
127. Testi, R., D'Ambrosio, D., De Maria, R., Santoni, A. (1994) The CD69 receptor: a multipurpose cell-surface trigger for hematopoietic cells. *Immunol Today.* ; **15**: 479-83.

128. Borrego, F., Pena, J., Solana, R. (1993) Regulation of CD69 expression on human natural killer cells: differential involvement of protein kinase C and protein tyrosine kinases. *Eur J Immunol.* ; **23**: 1039-43.
129. Lotzová, E. (1984) The role of Natural Killer Cells in Immune surveillance. *The Cancer Bulletin.* ; **36**: 215-226.
130. Lanier, L.L., Chang, C., Spits, H., Phillips, J.H. (1992) Expression of cytoplasmic CD3 epsilon proteins in activated human adult natural killer (NK) cells and CD3 gamma, delta, epsilon complexes in fetal NK cells. Implications for the relationship of NK and T lymphocytes. *J Immunol.* ; **149**: 1876-80.
131. Brooks, C.G., Georgiou, A., Jordan, R.K. (1993) The majority of immature fetal thymocytes can be induced to proliferate to IL-2 and differentiate into cells indistinguishable from mature natural killer cells. *J Immunol.* ; **151**: 6645-56.
132. Nagler, A., Lanier, L.L., Phillips, J.H. (1990) Constitutive expression of high affinity interleukin 2 receptors on human CD16-natural killer cells in vivo. *J Exp Med.* ; **171**: 1527-33.
133. Robertson, M.J. (2002) Role of chemokines in the biology of natural killer cells. *J Leukoc Biol.* ; **71**: 173-83.
134. Robertson, M.J., Manley, T.J., Donahue, C., Levine, H., Ritz, J. (1993) Costimulatory signals are required for optimal proliferation of human natural killer cells. *J Immunol.* ; **150**: 1705-14.
135. Krahenbuhl, O., Tschopp, J. (1991) Debate: the mechanism of lymphocyte-mediated killing. Perforin-induced pore formation. *Immunol Today.* ; **12**: 399-402.
136. Griffiths, G.M., Mueller, C. (1991) Expression of perforin and granzymes in vivo: potential diagnostic markers for activated cytotoxic cells. *Immunol Today.* ; **12**: 415-9.
137. Oshimi, Y., Oda, S., Honda, Y., Nagata, S., Miyazaki, S. (1996) Involvement of Fas ligand and Fas-mediated pathway in the cytotoxicity of human natural killer cells. *J Immunol.* ; **157**: 2909-15.

138. Vujanovic, N.L., Nagashima, S., Herberman, R.B., Whiteside, T.L. (1996) Nonsecretory apoptotic killing by human NK cells. *J Immunol.* ; **157**: 1117-26.
139. Liu, C.C., Walsh, C.M., Young, J.D. (1995) Perforin: structure and function. *Immunol Today.* ; **16**: 194-201.
140. Smyth, M.J., Trapani, J.A. (1995) Granzymes: exogenous proteinases that induce target cell apoptosis. *Immunol Today.* ; **16**: 202-6.
141. Arase, H., Arase, N., Saito, T. (1995) Fas-mediated cytotoxicity by freshly isolated natural killer cells. *J Exp Med.* ; **181**: 1235-8.
142. Eischen, C.M., Schilling, J.D., Lynch, D.H., Krammer, P.H., Leibson, P.J. (1996) Fc receptor-induced expression of Fas ligand on activated NK cells facilitates cell-mediated cytotoxicity and subsequent autocrine NK cell apoptosis. *J Immunol.* ; **156**: 2693-9.
143. Conti, P., Dempsey, R.A., Reale, M., Barbacane, R.C., Panara, M.R., Bongrazio, M., Mier, J.W. (1991) Activation of human natural killer cells by lipopolysaccharide and generation of interleukin-1 alpha, beta, tumour necrosis factor and interleukin-6. Effect of IL-1 receptor antagonist. *Immunology.* ; **73**: 450-6.
144. Biron, C.A., Nguyen, K.B., Pien, G.C., Cousens, L.P., Salazar-Mather, T.P. (1999) Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annu Rev Immunol.* ; **17**: 189-220.
145. Cuturi, M.C., Anegon, I., Sherman, F., Loudon, R., Clark, S.C., Perussia, B., Trinchieri, G. (1989) Production of hematopoietic colony-stimulating factors by human natural killer cells. *J Exp Med.* ; **169**: 569-83.
146. Roncarolo, M.G., Bigler, M., Haanen, J.B., Yssel, H., Bacchetta, R., de Vries, J.E., Spits, H. (1991) Natural killer cell clones can efficiently process and present protein antigens. *J Immunol.* ; **147**: 781-7.
147. Murphy, W.J., Longo, D.L. (1997) The potential role of NK cells in the separation of graft-versus-tumor effects from graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation. *Immunol Rev.* ; **157**: 167-76.

148. Murphy, W.J., Reynolds, C.W., Tiberghien, P., Longo, D.L. (1993) Natural killer cells and bone marrow transplantation. *J Natl Cancer Inst.* ; **85**: 1475-82.
149. Carayol, G., Robin, C., Bourhis, J.H., Bennaceur-Griscelli, A., Chouaib, S., Coulombel, L., Caignard, A. (1998) NK cells differentiated from bone marrow, cord blood and peripheral blood stem cells exhibit similar phenotype and functions. *Eur J Immunol.* ; **28**: 1991-2002.
150. Yamamoto, H., Hirayama, M., Genyeva, C., Kaplan, J. (1994) TGF-beta mediates natural suppressor activity of IL-2-activated lymphocytes. *J Immunol.* ; **152**: 3842-7.
151. Billingham, M.E. (1987) Cytokines as inflammatory mediators. *Br Med Bull.* ; **43**: 350-70.
152. Pohlman, T.H., Stanness, K.A., Beatty, P.G., Ochs, H.D., Harlan, J.M. (1986) An endothelial cell surface factor(s) induced in vitro by lipopolysaccharide, interleukin 1, and tumor necrosis factor-alpha increases neutrophil adherence by a CDw18-dependent mechanism. *J Immunol.* ; **136**: 4548-53.
153. Levine, L., Xiao, D.M. (1985) The stimulations of arachidonic acid metabolism by recombinant murine interleukin 1 and tumor promoters or 1-oleoyl-2-acetyl-glycerol are synergistic. *J Immunol.* ; **135**: 3430-3.
154. Lopez-Botet, M., Moretta, L. (1985) Functional characterization of human thymocytes: a limiting dilution analysis of precursors with proliferative and cytolytic activities. *J Immunol.* ; **134**: 2299-304.
155. Ortaldo, J.R., Mason, A., Overton, R. (1986) Lymphokine-activated killer cells. Analysis of progenitors and effectors. *J Exp Med.* ; **164**: 1193-205.
156. Verfaillie, C., Kay, N., Miller, W., McGlave, P. (1990) Diminished A-LAK cytotoxicity and proliferation accompany disease progression in chronic myelogenous leukemia. *Blood.* ; **76**: 401-8.
157. Marti, F., Pardo, N., Peiro, M., Bertran, E., Amill, B., Garcia, J., Cubells, J., Rueda, F. (1995) Progression of natural immunity during one-year treatment of residual

- disease in neuroblastoma patients with high doses of interleukin-2 after autologous bone marrow transplantation. *Exp Hematol.* ; **23**: 1445-52.
158. Muralikrishna, K., Varalakshmi, C., Khar, A. (1997) Differential modulation of LAK and ADCC functions of natural killer cells from AK-5 tumor-bearing rats by IL-2, IL-12 and IFN-gamma. *Cytokines Cell Mol Ther.* ; **3**: 51-8.
159. Nguyen, Q.H., Roberts, R.L., Ank, B.J., Lin, S.J., Lau, C.K., Stiehm, E.R. (1998) Enhancement of antibody-dependent cellular cytotoxicity of neonatal cells by interleukin-2 (IL-2) and IL-12. *Clin Diagn Lab Immunol.* ; **5**: 98-104.
160. Spits, H., Yssel, H., Paliard, X., Kastelein, R., Figdor, C., de Vries, J.E. (1988) IL-4 inhibits IL-2-mediated induction of human lymphokine-activated killer cells, but not the generation of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes in mixed leukocyte cultures. *J Immunol.* ; **141**: 29-36.
161. Warren, H.S., Kinnear, B.F., Phillips, J.H., Lanier, L.L. (1995) Production of IL-5 by human NK cells and regulation of IL-5 secretion by IL-4, IL-10, and IL-12. *J Immunol.* ; **154**: 5144-52.
162. Naume, B., Gately, M.K., Desai, B.B., Sundan, A., Espevik, T. (1993) Synergistic effects of interleukin 4 and interleukin 12 on NK cell proliferation. *Cytokine.* ; **5**: 38-46.
163. Smyth, M.J., Ortaldo, J.R. (1991) Comparison of the effect of IL-2 and IL-6 on the lytic activity of purified human peripheral blood large granular lymphocytes. *J Immunol.* ; **146**: 1380-4.
164. Naume, B., Espevik, T. (1991) Effects of IL-7 and IL-2 on highly enriched CD56+ natural killer cells. A comparative study. *J Immunol.* ; **147**: 2208-14.
165. Carson, W.E., Lindemann, M.J., Baiocchi, R., Linett, M., Tan, J.C., Chou, C.C., Narula, S., Caligiuri, M.A. (1995) The functional characterization of interleukin-10 receptor expression on human natural killer cells. *Blood.* ; **85**: 3577-85.

166. Rabinowich, H., Herberman, R.B., Whiteside, T.L. (1993) Differential effects of IL12 and IL2 on expression and function of cellular adhesion molecules on purified human natural killer cells. *Cell Immunol.* ; **152**: 481-98.
167. Fehniger, T.A., Shah, M.H., Turner, M.J., VanDeusen, J.B., Whitman, S.P., Cooper, M.A., Suzuki, K., Wechsler, M., Goodsaid, F., Caligiuri, M.A. (1999) Differential cytokine and chemokine gene expression by human NK cells following activation with IL-18 or IL-15 in combination with IL-12: implications for the innate immune response. *J Immunol.* ; **162**: 4511-20.
168. Hyodo, Y., Matsui, K., Hayashi, N., Tsutsui, H., Kashiwamura, S., Yamauchi, H., Hiroishi, K., Takeda, K., Tagawa, Y., Iwakura, Y., Kayagaki, N., Kurimoto, M., Okamura, H., Hada, T., Yagita, H., Akira, S., Nakanishi, K., Higashino, K. (1999) IL-18 up-regulates perforin-mediated NK activity without increasing perforin messenger RNA expression by binding to constitutively expressed IL-18 receptor. *J Immunol.* ; **162**: 1662-8.
169. Jewett, A., Bonavida, B. (1994) Activation of the human immature natural killer cell subset by IL-12 and its regulation by endogenous TNF-alpha and IFN-gamma secretion. *Cell Immunol.* ; **154**: 273-86.
170. Bonavida, B., Lebow, L.T., Jewett, A. (1993) Natural killer cell subsets: maturation, differentiation and regulation. *Nat Immunol.* ; **12**: 194-208.
171. Boehm, U., Klamp, T., Groot, M., Howard, J.C. (1997) Cellular responses to interferon-gamma. *Annu Rev Immunol.* ; **15**: 749-95.
172. Rollins, B.J. (1997) Chemokines. *Blood.* ; **90**: 909-28.
173. Yoshie, O., Imai, T., Nomiyama, H. (2001) Chemokines in immunity. *Adv Immunol.* ; **78**: 57-110.
174. Campbell, J.J., Qin, S., Unutmaz, D., Soler, D., Murphy, K.E., Hodge, M.R., Wu, L., Butcher, E.C. (2001) Unique subpopulations of CD56+ NK and NK-T peripheral blood lymphocytes identified by chemokine receptor expression repertoire. *J Immunol.* ; **166**: 6477-82.

175. Frey, M., Packianathan, N.B., Fehniger, T.A., Ross, M.E., Wang, W.C., Stewart, C.C., Caligiuri, M.A., Evans, S.S. (1998) Differential expression and function of L-selectin on CD56bright and CD56dim natural killer cell subsets. *J Immunol.* ; **161**: 400-8.
176. Yoshida, R., Nagira, M., Imai, T., Baba, M., Takagi, S., Tabira, Y., Akagi, J., Nomiyama, H., Yoshie, O. (1998) EBI1-ligand chemokine (ELC) attracts a broad spectrum of lymphocytes: activated T cells strongly up-regulate CCR7 and efficiently migrate toward ELC. *Int Immunol.* ; **10**: 901-10.
177. Cooper, M.A., Fehniger, T.A., Caligiuri, M.A. (2001) The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol.* ; **22**: 633-40.
178. Loetscher, P., Seitz, M., Clark-Lewis, I., Baggiolini, M., Moser, B. (1996) Activation of NK cells by CC chemokines. Chemotaxis, Ca²⁺ mobilization, and enzyme release. *J Immunol.* ; **156**: 322-7.
179. Nieto, M., Navarro, F., Perez-Villar, J.J., del Pozo, M.A., Gonzalez-Amaro, R., Mellado, M., Frade, J.M., Martinez, A.C., Lopez-Botet, M., Sanchez-Madrid, F. (1998) Roles of chemokines and receptor polarization in NK-target cell interactions. *J Immunol.* ; **161**: 3330-9.
180. Scala, G., Allavena, P., Djeu, J.Y., Kasahara, T., Ortaldo, J.R., Herberman, R.B., Oppenheim, J.J. (1984) Human large granular lymphocytes are potent producers of interleukin-1. *Nature.* ; **309**: 56-9.
181. Smyth, M.J., Zachariae, C.O., Norihisa, Y., Ortaldo, J.R., Hishinuma, A., Matsushima, K. (1991) IL-8 gene expression and production in human peripheral blood lymphocyte subsets. *J Immunol.* ; **146**: 3815-23.
182. Trinchieri, G., Peritt, D., Gerosa, F. (1996) Acute induction and priming for cytokine production in lymphocytes. *Cytokine Growth Factor Rev.* ; **7**: 123-32.
183. Hoshino, T., Wiltrout, R.H., Young, H.A. (1999) IL-18 is a potent coinducer of IL-13 in NK and T cells: a new potential role for IL-18 in modulating the immune response. *J Immunol.* ; **162**: 5070-7.

184. Hoshino, T., Winkler-Pickett, R.T., Mason, A.T., Ortaldo, J.R., Young, H.A. (1999) IL-13 production by NK cells: IL-13-producing NK and T cells are present in vivo in the absence of IFN-gamma. *J Immunol.* ; **162**: 51-9.
185. Ye, J., Ortaldo, J.R., Conlon, K., Winkler-Pickett, R., Young, H.A. (1995) Cellular and molecular mechanisms of IFN-gamma production induced by IL-2 and IL-12 in a human NK cell line. *J Leukoc Biol.* ; **58**: 225-33.
186. Aramburu, J., Balboa, M.A., Rodriguez, A., Melero, I., Alonso, M., Alonso, J.L., Lopez-Botet, M. (1993) Stimulation of IL-2-activated natural killer cells through the Kp43 surface antigen up-regulates TNF-alpha production involving the LFA-1 integrin. *J Immunol.* ; **151**: 3420-9.
187. Ryan, J.C., Seaman, W.E. (1997) Divergent functions of lectin-like receptors on NK cells. *Immunol Rev.* ; **155**: 79-89.
188. Helander, T.S., Carpen, O., Turunen, O., Kovanen, P.E., Vaheri, A., Timonen, T. (1996) ICAM-2 redistributed by ezrin as a target for killer cells. *Nature.* ; **382**: 265-8.
189. Renard, V., Cambiaggi, A., Vely, F., Blery, M., Olcese, L., Olivero, S., Bouchet, M., Vivier, E. (1997) Transduction of cytotoxic signals in natural killer cells: a general model of fine tuning between activatory and inhibitory pathways in lymphocytes. *Immunol Rev.* ; **155**: 205-21.
190. Chow, S.C., Ng, J., Nordstedt, C., Fredholm, B.B., Jondal, M. (1988) Phosphoinositide breakdown and evidence for protein kinase C involvement during human NK killing. *Cell Immunol.* ; **114**: 96-103.
191. Ting, A.T., Schoon, R.A., Abraham, R.T., Leibson, P.J. (1992) Interaction between protein kinase C-dependent and G protein-dependent pathways in the regulation of natural killer cell granule exocytosis. *J Biol Chem.* ; **267**: 23957-62.
192. Weiss, A., Littman, D.R. (1994) Signal transduction by lymphocyte antigen receptors. *Cell.* ; **76**: 263-74.

193. Einspahr, K.J., Abraham, R.T., Binstadt, B.A., Uehara, Y., Leibson, P.J. (1991) Tyrosine phosphorylation provides an early and requisite signal for the activation of natural killer cell cytotoxic function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* ; **88**: 6279-83.
194. Whalen, M.M., Doshi, R.N., Homma, Y., Bankhurst, A.D. (1993) Phospholipase C activation in the cytotoxic response of human natural killer cells requires protein-tyrosine kinase activity. *Immunology.* ; **79**: 542-7.
195. Divecha, N., Irvine, R.F. (1995) Phospholipid signaling. *Cell.* ; **80**: 269-78.
196. Bell, R.M. (1986) Protein kinase C activation by diacylglycerol second messengers. *Cell.* ; **45**: 631-2.
197. Toullec, D., Pianetti, P., Coste, H., Bellevergue, P., Grand-Perret, T., Ajakane, M., Baudet, V., Boissin, P., Boursier, E., Loriolle, F., et al. (1991) The bisindolylmaleimide GF 109203X is a potent and selective inhibitor of protein kinase C. *J Biol Chem.* ; **266**: 15771-81.
198. Wilks, A.F. (1990) Structure and function of the protein tyrosine kinases. *Prog Growth Factor Res.* ; **2**: 97-111.
199. Xu, X., Chong, A.S. (1995) Cross-linking of CD45 on NK cells stimulates p56lck-mediated tyrosine phosphorylation and IFN-gamma production. *J Immunol.* ; **155**: 5241-8.
200. Bonnema, J.D., Karnitz, L.M., Schoon, R.A., Abraham, R.T., Leibson, P.J. (1994) Fc receptor stimulation of phosphatidylinositol 3-kinase in natural killer cells is associated with protein kinase C-independent granule release and cell-mediated cytotoxicity. *J Exp Med.* ; **180**: 1427-35.
201. Maghazachi, A.A. (2000) Chemokines, G proteins and natural killer cells. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz).* ; **48**: 65-72.
202. Neer, E.J. (1995) Heterotrimeric G proteins: organizers of transmembrane signals. *Cell.* ; **80**: 249-57.

203. Procopio, A.D., Paolini, R., Vecchio, I., Frati, L., Santoni, A. (1991) GTP-binding proteins transduce signals generated via human FC gamma receptor IIIA (CD16). *J Immunol.* ; **146**: 3550-6.
204. Thomas, G.M., Cunningham, E., Fensome, A., Ball, A., Totty, N.F., Truong, O., Hsuan, J.J., Cockcroft, S. (1993) An essential role for phosphatidylinositol transfer protein in phospholipase C-mediated inositol lipid signaling. *Cell.* ; **74**: 919-28.
205. Ting, A.T., Einspahr, K.J., Abraham, R.T., Leibson, P.J. (1991) Fc gamma receptor signal transduction in natural killer cells. Coupling to phospholipase C via a G protein-independent, but tyrosine kinase- dependent pathway. *J Immunol.* ; **147**: 3122-7.
206. Clapham, D.E. (1995) Calcium signaling. *Cell.* ; **80**: 259-68.
207. Ravetch, J.V., Kinet, J.P. (1991) Fc receptors. *Annu Rev Immunol.* ; **9**: 457-92.
208. Sanchez-Mejorada, G., Rosales, C. (1998) Signal transduction by immunoglobulin Fc receptors. *J Leukoc Biol.* ; **63**: 521-33.
209. Manciuola, M., Rabinowich, H., Sulica, A., Lin, W.C., Whiteside, T.L., DeLeo, A., Herberman, R.B., Corey, S.J. (1996) Divergent phosphotyrosine signaling via Fc gamma RIIIA on human NK cells. *Cell Immunol.* ; **167**: 63-71.
210. Kanakaraj, P., Duckworth, B., Azzoni, L., Kamoun, M., Cantley, L.C., Perussia, B. (1994) Phosphatidylinositol-3 kinase activation induced upon Fc gamma RIIIA-ligand interaction. *J Exp Med.* ; **179**: 551-8.
211. Varticovski, L., Harrison-Findik, D., Keeler, M.L., Susa, M. (1994) Role of PI 3-kinase in mitogenesis. *Biochim Biophys Acta.* ; **1226**: 1-11.
212. O'Shea, J.J., McVicar, D.W., Kuhns, D.B., Ortaldo, J.R. (1992) A role for protein tyrosine kinase activity in natural cytotoxicity as well as antibody-dependent cellular cytotoxicity. Effects of herbimycin A. *J Immunol.* ; **148**: 2497-502.

213. Brumbaugh, K.M., Binstadt, B.A., Billadeau, D.D., Schoon, R.A., Dick, C.J., Ten, R.M., Leibson, P.J. (1997) Functional role for Syk tyrosine kinase in natural killer cell-mediated natural cytotoxicity. *J Exp Med.* ; **186**: 1965-74.
214. Waldmann, T.A. (1993) The IL-2/IL-2 receptor system: a target for rational immune intervention. *Immunol Today.* ; **14**: 264-70.
215. Adunyah, S.E., Wheeler, B.J., Cooper, R.S. (1997) Evidence for the involvement of LCK and MAP kinase (ERK-1) in the signal transduction mechanism of interleukin-15. *Biochem Biophys Res Commun.* ; **232**: 754-8.
216. Yoneda, K., Osaki, T. (1994) NK-LAK induction with IL-2 is regulated by tyrosine phosphorylation of a 105-110 kDa protein. *Immunobiology.* ; **192**: 10-23.
217. Johnston, J.A., Wang, L.M., Hanson, E.P., Sun, X.J., White, M.F., Oakes, S.A., Pierce, J.H., O'Shea, J.J. (1995) Interleukins 2, 4, 7, and 15 stimulate tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrates 1 and 2 in T cells. Potential role of JAK kinases. *J Biol Chem.* ; **270**: 28527-30.
218. Yu, C.R., Lin, J.X., Fink, D.W., Akira, S., Bloom, E.T., Yamauchi, A. (1996) Differential utilization of Janus kinase-signal transducer activator of transcription signaling pathways in the stimulation of human natural killer cells by IL-2, IL-12, and IFN-alpha. *J Immunol.* ; **157**: 126-37.
219. Rueda, F., Marti, F., Pinol, G., Remacha, A. (1989) Artefactual low lymphocyte activity caused by platelet contamination in the mononuclear cell preparations. *Am J Hematol.* ; **31**: 126-7.
220. Henney, C.S. (1971) Quantitation of the cell-mediated immune response. I. The number of cytolytically active mouse lymphoid cells induced by immunization with allogeneic mastocytoma cells. *J Immunol.* ; **107**: 1558-66.
221. Davidson, W.F. (1977) Cellular requirements for the induction of cytotoxic T cells in vitro. *Immunol Rev.* ; **35**: 261-304.

222. Marti, F., Miralles, A., Peiro, M., Amill, B., de Dalmases, C., Pinol, G., Rueda, F., Garcia, J. (1993) Differential effect of cryopreservation on natural killer cell and lymphokine-activated killer cell activities. *Transfusion.* ; **33**: 651-5.
223. Lagoo-Deenadayalan, S., Lagoo, A.S., Barber, W.H., Hardy, K.J. (1993) A standardized approach to PCR-based semiquantitation of multiple cytokine gene transcripts from small cell samples. *Lymphokine Cytokine Res.* ; **12**: 59-67.
224. Chomczynski, P., Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* ; **162**: 156-9.
225. Grynkiewicz, G., Poenie, M., Tsien, R.Y. (1985) A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem.* ; **260**: 3440-50.
226. Azzoni, L., Kamoun, M., Salcedo, T.W., Kanakaraj, P., Perussia, B. (1992) Stimulation of Fc gamma RIIIA results in phospholipase C-gamma 1 tyrosine phosphorylation and p56lck activation. *J Exp Med.* ; **176**: 1745-50.
227. Springer, T.A. (1994) Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell.* ; **76**: 301-14.
228. Butcher, E.C., Picker, L.J. (1996) Lymphocyte homing and homeostasis. *Science.* ; **272**: 60-6.
229. Whiteside, T.L., Herberman, R.B. (1994) Role of human natural killer cells in health and disease. *Clin Diagn Lab Immunol.* ; **1**: 125-33.
230. Bottazzi, B., Introna, M., Allavena, P., Villa, A., Mantovani, A. (1985) In vitro migration of human large granular lymphocytes. *J Immunol.* ; **134**: 2316-21.
231. Pirelli, A., Allavena, P., Mantovani, A. (1988) Activated adherent large granular lymphocytes/natural killer (LGL/NK) cells change their migratory behaviour. *Immunology.* ; **65**: 651-3.

232. Maghazachi, A.A., al-Aoukaty, A., Schall, T.J. (1994) C-C chemokines induce the chemotaxis of NK and IL-2-activated NK cells. Role for G proteins. *J Immunol.* ; **153**: 4969-77.
233. Maghazachi, A.A., Al-Aoukaty, A. (1998) Chemokines activate natural killer cells through heterotrimeric G- proteins: implications for the treatment of AIDS and cancer. *Faseb J.* ; **12**: 913-24.
234. Maghazachi, A.A. (1999) Intracellular signalling pathways induced by chemokines in natural killer cells. *Cell Signal.* ; **11**: 385-90.
235. Files, J.C., Malpass, T.W., Yee, E.K., Ritchie, J.L., Harker, L.A. (1981) Studies of human platelet alpha-granule release in vivo. *Blood.* ; **58**: 607-18.
236. Marti, F., Munoz, J., Peiro, M., Bertran, E., Ferran, C., Octavio, C., Garcia, J., Rueda, F. (1995) Higher cytotoxic activity and increased levels of IL-1 beta, IL-6, and TNF-alpha in patients undergoing cardiopulmonary bypass. *Am J Hematol.* ; **49**: 237-9.
237. Westaby, S. (1987) Organ dysfunction after cardiopulmonary bypass. A systemic inflammatory reaction initiated by the extracorporeal circuit. *Intensive Care Med.* ; **13**: 89-95.
238. Gupta, S.K., Hassel, T., Singh, J.P. (1995) A potent inhibitor of endothelial cell proliferation is generated by proteolytic cleavage of the chemokine platelet factor 4. *Proc Natl Acad Sci U S A.* ; **92**: 7799-803.
239. Maurer, A.M., Han, Z.C., Dhermy, D., Briere, J. (1996) Inhibitory effect of platelet factor 4 on human erythroleukemic cells is dependent on cell surface heparan sulfate. *J Lab Clin Med.* ; **127**: 382-90.
240. Han, Z.C., Bellucci, S., Shen, Z.X., Maffrand, J.P., Pascal, M., Petitou, M., Lormeau, J., Caen, J.P. (1996) Glycosaminoglycans enhance megakaryocytopoiesis by modifying the activities of hematopoietic growth regulators. *J Cell Physiol.* ; **168**: 97-104.

241. Belperio, J.A., Keane, M.P., Arenberg, D.A., Addison, C.L., Ehlert, J.E., Burdick, M.D., Strieter, R.M. (2000) CXC chemokines in angiogenesis. *J Leukoc Biol.* ; **68**: 1-8.
242. Gengrinovitch, S., Greenberg, S.M., Cohen, T., Gitay-Goren, H., Rockwell, P., Maione, T.E., Levi, B.Z., Neufeld, G. (1995) Platelet factor-4 inhibits the mitogenic activity of VEGF121 and VEGF165 using several concurrent mechanisms. *J Biol Chem.* ; **270**: 15059-65.
243. Petersen, F., Brandt, E., Lindahl, U., Spillmann, D. (1999) Characterization of a neutrophil cell surface glycosaminoglycan that mediates binding of platelet factor 4. *J Biol Chem.* ; **274**: 12376-82.
244. Sulpice, E., Bryckaert, M., Lacour, J., Contreres, J.O., Tobelem, G. (2002) Platelet factor 4 inhibits FGF2-induced endothelial cell proliferation via the extracellular signal-regulated kinase pathway but not by the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *Blood.* ; **100**: 3087-94.
245. Dudek, A.Z., Nesmelova, I., Mayo, K., Verfaillie, C.M., Pitchford, S., Slungaard, A. (2003) Platelet factor 4 promotes adhesion of hematopoietic progenitor cells and binds IL-8: novel mechanisms for modulation of hematopoiesis. *Blood.* ; **101**: 4687-94.
246. Brandt, E., Petersen, F., Flad, H.D. (1992) Recombinant tumor necrosis factor-alpha potentiates neutrophil degranulation in response to host defense cytokines neutrophil-activating peptide 2 and IL-8 by modulating intracellular cyclic AMP levels. *J Immunol.* ; **149**: 1356-64.
247. Petersen, F., Bock, L., Flad, H.D., Brandt, E. (1999) Platelet factor 4-induced neutrophil-endothelial cell interaction: involvement of mechanisms and functional consequences different from those elicited by interleukin-8. *Blood.* ; **94**: 4020-8.
248. Boyum, A. (1968) Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of monuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by

- combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand J Clin Lab Invest Suppl.* ; **97**: 77-89.
249. Nguyen, Q.H., Roberts, R.L., Ank, B.J., Lin, S.J., Thomas, E.K., Stiehm, E.R. (1998) Interleukin (IL)-15 enhances antibody-dependent cellular cytotoxicity and natural killer activity in neonatal cells. *Cell Immunol.* ; **185**: 83-92.
250. Warren, H.S. (1996) NK cell proliferation and inflammation. *Immunol Cell Biol.* ; **74**: 473-80.
251. Lasagni, L., Francalanci, M., Annunziato, F., Lazzeri, E., Giannini, S., Cosmi, L., Sagrinati, C., Mazzinghi, B., Orlando, C., Maggi, E., Marra, F., Romagnani, S., Serio, M., Romagnani, P. (2003) An alternatively spliced variant of CXCR3 mediates the inhibition of endothelial cell growth induced by IP-10, Mig, and I-TAC, and acts as functional receptor for platelet factor 4. *J Exp Med.* ; **197**: 1537-49.
252. Miyajima, A., Kitamura, T., Harada, N., Yokota, T., Arai, K. (1992) Cytokine receptors and signal transduction. *Annu Rev Immunol.* ; **10**: 295-331.
253. Ravetch, J.V., Perussia, B. (1989) Alternative membrane forms of Fc gamma RIII(CD16) on human natural killer cells and neutrophils. Cell type-specific expression of two genes that differ in single nucleotide substitutions. *J Exp Med.* ; **170**: 481-97.
254. Pignata, C., Prasad, K.V., Robertson, M.J., Levine, H., Rudd, C.E., Ritz, J. (1993) Fc gamma RIIIA-mediated signaling involves src-family lck in human natural killer cells. *J Immunol.* ; **151**: 6794-800.
255. Galandrini, R., Palmieri, G., Piccoli, M., Frati, L., Santoni, A. (1996) CD16-mediated p21ras activation is associated with Shc and p36 tyrosine phosphorylation and their binding with Grb2 in human natural killer cells. *J Exp Med.* ; **183**: 179-86.
256. Tanaka, T., Manome, Y., Wen, P., Kufe, D.W., Fine, H.A. (1997) Viral vector-mediated transduction of a modified platelet factor 4 cDNA inhibits angiogenesis and tumor growth. *Nat Med.* ; **3**: 437-42.