

18392

Universidad Complutense de Madrid.
Facultad de Ciencias Químicas.
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular.



BIOSINTESIS DEL FACTOR ACTIVADOR DE LAS
PLAQUETAS EN LOS LEUCOCITOS
POLIMORFONUCLEARES HUMANOS. ESTUDIO DE
LOS MECANISMOS IMPLICADOS EN LA
TRANSDUCCION DE LA SEÑAL.

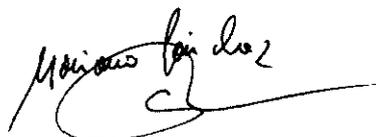
Director: D. Mariano Sánchez Crespo.
Profesor de Investigación del CSIC.

TESIS DOCTORAL.
Carolina García Rodríguez.
Madrid, 1993.

D. Mariano Sánchez Crespo, Doctor en Medicina y Profesor del Consejo Superior de Investigaciones Científicas de Madrid.

CERTIFICA: Que Doña Carolina García Rodríguez, Licenciada en Ciencias Químicas por la Universidad Complutense de Madrid, ha realizado bajo su dirección las experiencias necesarias para la realización de la presente Tesis Doctoral.

Y para que conste, firmo la presente en Madrid, a 6 de Abril de 1993.



Fdo. Director: Dr. Mariano Sánchez Crespo.



Fdo. Tutor: Nieves Olmo.



Fdo. Doctorando: Carolina García Rodríguez.

A mi familia.

A Pedro.

AGRADECIMIENTOS

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en el Servicio de Nefrología de la Fundación Jiménez Díaz, bajo la dirección del Dr. Mariano Sánchez Crespo. Quiero dar las gracias por haberme dado la oportunidad de entrar en el mundo de la investigación, así como por su dedicación y estímulo constante durante estos cuatro años.

Al Dr. Santos Casado, Jefe del Servicio de Nefrología de la Fundación Jiménez Díaz, por su apoyo a todo el trabajo científico allí desarrollado, y en particular, por haberme permitido continuar esta Tesis Doctoral en el Laboratorio de Nefrología. En este mismo sentido, agradezco a los Drs. Carlos Caramelo y Jesús Egido, su generosidad al poner a mi disposición todos los medios que poseen.

A la Fundación Jiménez Díaz, que ha aportado todos los medios técnicos y humanos, y al Ministerio de Educación y Ciencia, por la concesión de la beca de Formación de Personal Investigador, gracias a la cual se ha podido llevar a cabo esta Tesis Doctoral.

A mis compañeros del laboratorio, tanto a los que trabajan en la cuarta planta de la Fundación Jiménez Díaz como a los que marcharon a otras tierras, por su sincera amistad y por dejarse "exprimir" un poco de sangre, sin la cual no habría sido posible la realización del trabajo experimental. Igualmente agradezco a Pilar, Adeli y a las enfermeras de Diálisis su ayuda en la obtención de las muestras de sangre.

A Carmen Gómez, Carmen Bustos, Mar, Mabel, Sylvia, Benito, y Sagrario, por la ayuda, cariño y amistad incondicional que siempre me han brindado.

A Pilar, mi hermana y profesora de Informática. Por su indispensable colaboración en la presentación de esta Tesis Doctoral.

RESUMEN

Esta Tesis Doctoral se ha llevado a cabo con el fin de estudiar la síntesis del factor activador de las plaquetas (PAF) en los leucocitos polimorfonucleares humanos, estimulados con el péptido quimiotáctico N-formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLP).

La estimulación de los neutrófilos con fMLP produce la activación de la enzima acetil-CoA:liso-PAF acetiltransferasa, la síntesis y liberación del PAF, la liberación al medio extracelular de la β -glucuronidasa y de una fosfolipasa A_2 de tipo lisosomal, y la liberación de ácido araquidónico.

Para que el neutrófilo pueda responder al fMLP es necesaria la presencia de citocalasina B en el medio de estimulación. Puesto que ésta no es una molécula fisiológica, hemos intentado suplir su efecto con el TNF- α , pero no hemos encontrado ningún resultado positivo a este respecto.

Hemos encontrado que el calcio y el ácido fosfatídico juegan un papel importante como segundos mensajeros en nuestro sistema, ya que parecen estar implicados en la transducción de la señal inducida por el fMLP.

En cuanto a las posibles vías que participan en la síntesis del PAF, sugerimos la existencia de una ruta alternativa de síntesis del mediador, a través de la transacilasa CoA-independiente. Asimismo, nuestros resultados sugieren que la enzima acetil-CoA:liso-PAF acetiltransferasa es el paso limitante en la síntesis del PAF.

INDICE

I. INTRODUCCION.

| | |
|---|----|
| 1. ESTRUCTURA QUIMICA DEL PAF | 3 |
| 2. PROCEDIMIENTOS UTILIZADOS PARA LA MEDIDA DEL PAF EN MUESTRAS BIOLOGICAS | 5 |
| 3. METABOLISMO DEL PAF Y ETER-LIPIDOS | 6 |
| 3.1. Biosíntesis | 6 |
| 3.2. Inactivación y catabolismo | 9 |
| 3.3. Regulación del metabolismo del PAF | 10 |
| 4. EL PAF COMO MEDIADOR | 18 |
| 4.1. Liberación por las células | 19 |
| 4.2. Actividad biológica | 19 |
| 4.2.1. Células blanco | 20 |
| 4.2.2. Organos aislados | 23 |
| 4.2.3. Efectos de la administración <i>in vivo</i> | 24 |
| 5. RECEPTORES DEL PAF | 25 |
| 5.1. Anticuerpos anti-PAF | 27 |
| 5.2. Clonaje del receptor | 27 |

| | |
|---|----|
| 6. TRANSDUCCION DE LA SEÑAL INDUCIDA POR EL PAF | 31 |
| 6.1. Metabolismo de fosfolípidos | 32 |
| 6.2. Proteínas G | 33 |
| 6.3. Tirosina quinasas y proteína quinasa C | 34 |
| 6.4. Regulación de la señal | 35 |
| 6.5. Expresión de genes | 35 |
| | |
| 7. RETENCION INTRACELULAR DEL PAF | 36 |
| | |
| 8. ESPECIES MOLECULARES DEL PAF | 41 |
| | |
| 9. ANTAGONISTAS E INHIBIDORES DEL PAF | 46 |
| | |
| 10. FISIOLOGIA Y PATOLOGIA | 47 |

II. OBJETIVOS.

| | |
|---|----|
| 1. RESPUESTAS PRODUCIDAS EN EL NEUTROFILO POR LA ESTIMULACION CON fMLP | 52 |
| | |
| 2. VIAS DE TRANSDUCCION DE LA SEÑAL DE ACTIVACION | 52 |
| | |
| 3. ANALISIS DE LA VIA METABOLICA QUE CONDUCE A LA BIOSINTESIS DEL PAF | 52 |

III. MATERIALES Y METODOS.

| | |
|--|----|
| 1. REACTIVOS: ORIGEN Y PREPARACION | 54 |
| 2. TAMPONES Y SOLUCIONES | 60 |
| 3. METODOS EXPERIMENTALES | 63 |
| 3.1. Obtención de plaquetas de conejo y marcaje con [³ H]-Serotonina | 63 |
| 3.2. Preparación del zimósán | 64 |
| 3.3. Cultivo de <i>Escherichia coli</i> | 64 |
| 3.4. Determinación del fósforo asociado a los fosfolípidos | 65 |
| 3.5. Obtención de leucocitos polimorfonucleares humanos | 66 |
| 3.6. Estimulación de neutrófilos con distintos agonistas | 67 |
| 3.7. Medida de la actividad acetil-CoA:liso-PAF acetiltransferasa | 69 |
| 3.8. Cuantificación del PAF por bioensayo en plaquetas de conejo | 70 |
| 3.9. Medida de liberación de β-glucuronidasa | 71 |
| 3.10. Medida de fosfolipasa A ₂ | 72 |
| 3.11. Marcaje de PMNs con ácido [³ H]-araquidónico | 73 |
| 3.12. Medida de la liberación de ácido araquidónico | 73 |
| 3.13. Medida del flujo de calcio | 74 |
| 3.14. Marcaje de neutrófilos con [³ H]-liso-PAF | 74 |
| 3.15. Medida de la formación de diglicérido y ácido fosfatídico | 75 |
| 3.16. Medida de la desacilación de [³ H]-alquil-GPC | 76 |
| 3.17. Medida de la incorporación de [¹⁴ C]-acetil-CoA | 76 |
| 3.18. Actividad transacilasa CoA-independiente | 77 |
| 3.19. Desacilación de 1-radil-2-[³ H]-araquidonoil-GPC | 77 |
| 3.20. Análisis estadístico | 78 |

IV. RESULTADOS.

| | |
|---|-----|
| 1. EFECTO DE LA ESTIMULACION DE LOS NEUTROFILOS CON fMLP | 80 |
| 1.1. Activación dosis-dependiente de la acetil-CoA: liso-PAF acetiltransferasa por fMLP | 80 |
| 1.2. Producción del PAF en respuesta al fMLP | 82 |
| 1.3. Cinética de activación de la acetiltransferasa y de la síntesis del PAF | 83 |
| 1.4. Actividad acetiltransferasa y producción total del PAF. Variabilidad de la medida | 85 |
| 1.5. Distribución del PAF producido en la estimulación | 86 |
| 1.6. Liberación de β -glucuronidasa por fMLP | 89 |
| 1.7. Medida de actividad fosfolipasa A_2 en PMNs | 92 |
| 1.8. Caracterización de la actividad fosfolipasa A_2 liberada al medio extracelular. Dependencia de los iones Ca^{2+} y del pH | 100 |
| 1.9. Liberación de ácido araquidónico por los PMNs | 103 |
| 2. EFECTO DEL FACTOR DE NECROSIS TUMORAL ALFA (TNF- α) EN LA ESTIMULACION DE NEUTROFILOS CON fMLP | 106 |
| 2.1. Actividad acetiltransferasa | 107 |
| 2.2. Síntesis del PAF | 109 |
| 2.3. Liberación de β -glucuronidasa | 110 |

| | |
|--|-----|
| 3. PAPEL DE LOS IONES CALCIO EN LA RESPUESTA DE LOS NEUTROFILOS AL fMLP | 113 |
| 3.1. Cambios en la concentración de calcio intracelular inducidos por fMLP | 113 |
| 3.2. Actividad acetiltransferasa | 116 |
| 3.3. Producción del PAF | 118 |
| 3.4. Liberación de β -glucuronidasa | 118 |
| | |
| 4. INFLUENCIA DE LOS PRODUCTOS DE LA FOSFOLIPASA D EN LA ESTIMULACION DE LOS PMNs CON fMLP | 120 |
| 4.1. Propanolol | 120 |
| 4.1.1. Actividad acetiltransferasa | 122 |
| 4.1.2. Producción y liberación del PAF | 123 |
| 4.1.3. Liberación de β -glucuronidasa | 125 |
| 4.1.4. Flujos de calcio | 126 |
| 4.2. Diglicéridos | 128 |
| 4.3. Acido fosfatídico | 129 |
| 4.3.1. Actividad acetiltransferasa | 129 |
| 4.3.2. Producción y liberación del PAF | 131 |
| 4.3.3. Liberación de β -glucuronidasa | 133 |
| 4.3.4. Flujos de calcio | 134 |
| | |
| 5. VIAS ALTERNATIVAS DE LA SINTESIS DEL PAF: ACTIVIDAD TRANSACILASA CoA-INDEPENDIENTE | 136 |
| 5.1. Incorporación de [14 C]-acetil-CoA en PMNs marcados con 1-[3 H]-alquil-2-liso-GPC | 137 |
| 5.2. Desacilación de 1-[3 H]-alquil-2-acil-GPC en PMNs marcados con 1-[3 H]-alquil-2-liso-GPC | 139 |
| 5.3. Medida de la actividad transacilasa CoA-independiente | 142 |
| 5.4. Desacilación de 1-radil-2-[3 H]-araquidonoil-GPC en PMNs marcados con ácido [3 H]-araquidónico | 143 |

V. DISCUSION.

| | |
|---|-----|
| 1. ESTIMULACION DE LOS NEUTROFILOS CON fMLP | 146 |
| 1.1. Actividad acetil-CoA:liso-PAF acetiltransferasa, producción total y liberación del PAF y de enzimas lisosomales. Estudios de dosis-respuesta en neutrófilos estimulados con fMLP | 148 |
| 1.2. Actividad acetil-CoA:liso-PAF acetiltransferasa, producción total y liberación del PAF y de enzimas lisosomales. Estudios cinéticos en neutrófilos estimulados con fMLP | 151 |
| 1.3. Variabilidad de la medida de la actividad acetiltransferasa y de la síntesis del PAF | 152 |
| 2. INVESTIGACION DE POSIBLES MOLECULAS QUE PUEDAN DESEMPEÑAR EL PAPEL DE LA CITOCALASINA B. EFECTO DEL FACTOR DE NECROSIS TUMORAL ALFA (TNF- α) | 153 |
| 3. VIAS METABOLICAS INVOLUCRADAS EN LA BIOSINTESIS DE MEDIADORES LIPIDICOS POR LOS PMNs | 158 |
| 4. VIAS ALTERNATIVAS DE LA SINTESIS DEL PAF: ACTIVIDAD TRANSACILASA CoA-INDEPENDIENTE | 165 |
| 4.1. Acetil-CoA | 166 |
| 4.2. Liso-PAF. | 167 |
| 4.3. Importancia de la actividad acetiltransferasa en la síntesis del PAF | 171 |

| | |
|--|-----|
| 5. VIAS DE TRANSDUCCION DE LA SEÑAL INDUCIDA POR fMLP | 172 |
| 5.1. Efecto de los iones calcio en la estimulación de los neutrófilos con fMLP | 172 |
| 5.2. Influencia de los productos de la fosfolipasa D en la estimulación de los PMNs con fMLP | 175 |
| 5.2.1. Efecto de los diglicéridos | 179 |
| 5.2.2. Efecto del ácido fosfatídico | 180 |

VI. CONCLUSIONES.

| | |
|---|-----|
| 1. ESTIMULACION DE LOS NEUTROFILOS CON fMLP | 184 |
| 2. EFECTO DEL FACTOR DE NECROSIS TUMORAL ALFA (TNF- α) | 184 |
| 3. POSIBLES VIAS DE TRANSDUCCION DE LA SEÑAL INDUCIDAS POR LA ESTIMULACION CON fMLP | 185 |
| 4. VIA ALTERNATIVA DE LA SINTESIS DEL PAF | 186 |

REFERENCIAS.

ABREVIATURAS.

I. INTRODUCCION

Henson y col. (1) describieron por primera vez la existencia de una interacción entre leucocitos y plaquetas a través de un "mediador de fase fluida", que era liberado por los leucocitos de conejo sensibilizados al ponerse en contacto con el antígeno específico. Este mediador era capaz de activar las plaquetas y producir la liberación de aminas vasoactivas. Esto explica por qué esta reacción, denominada liberación de histamina dependiente de leucocitos (LDHR), fue considerada una reacción de hipersensibilidad inmediata, similar a las que se producen en muchos fenómenos alérgicos. Posteriormente, en un estudio clásico de Benveniste, Henson y Cochrane (2) se logró caracterizar el mecanismo que conducía a la liberación de este mediador soluble, y se identificó a los leucocitos basófilos activados por un mecanismo dependiente de inmunoglobulina E (IgE) como la fuente de la sustancia responsable de LDHR y de la agregación de las plaquetas. Estos investigadores llamaron factor activador de plaquetas (de cuyas iniciales en inglés deriva el acrónimo PAF) a esta sustancia con actividad biológica.

Estudios posteriores dirigidos a esclarecer la estructura química responsable de la actividad biológica descrita permitieron aclarar sus propiedades de solubilidad, comportamiento cromatográfico en sílice y su sensibilidad al tratamiento con lipasas (3,4). De todo ello se dedujo su naturaleza lipídica y propiedades polares.

La primera estructura que se propuso del factor activador de las plaquetas fue la de un 1-liso-2-acil-glicerofosfolípido teniendo en cuenta las características antes mencionadas, junto a su comportamiento cromatográfico entre la esfingomiélin y la liso-fosfatidilcolina en sistemas de solventes habituales para la cromatografía en capa fina de fosfolípidos; y el hecho de que el tratamiento con lipasa A_1 de *Rhizopus arrhizus* no afectara a su actividad biológica, mientras que las fosfolipasas A_2 , C y D la destruían completamente.

1. ESTRUCTURA QUIMICA DEL PAF.

En el otoño de 1979, tres laboratorios (5-7) describieron independientemente que los glicerofosfolípidos de colina pertenecientes a la subclase alquil-éter, o plasmanilcolina (de acuerdo con la nomenclatura de la IUPAC), poseían propiedades biológicas idénticas al factor activador de plaquetas (PAF) y al lípido polar renal antihipotensivo (APRL). Este hecho permitió la elaboración de un nuevo acrónimo AGEPC (derivado de acetil-gliceril-éter-fosfocolina) para adaptar la terminología química a la actividad biológica ya descrita. Este aspecto ha sido objeto de revisión detallada en las referencias 8-14.

El PAF es un derivado del D-glicerol asimétricamente sustituido (8) cuyas propiedades estructurales más notables son las siguientes (Figura nº 1):

- Posición *sn-1*: enlace éter (O-alquil) con una cadena de 16 ó 18 carbonos.
- Posición *sn-2*: grupo acetilo.
- Posición *sn-3*: cabeza polar de fosfocolina.

El PAF es una molécula quiral, con configuración R en el carbono 2 del esqueleto del glicerol, y sólo el esteroisómero natural del PAF (la forma L, es decir, la que tiene fosfocolina en posición *sn-3*) tiene actividad biológica (15), lo que sugiere que el PAF produce su acción por un mecanismo altamente selectivo que implica la ocupación de un receptor. Cabría esperar que la disposición espacial de los sustituyentes del glicerol fuera fundamental para la actividad del mediador. Sin embargo, no es éste el caso, ya que existe muy poca diferencia estructural entre los distintos isómeros de posición. Por tanto, sólo hay que tener en cuenta la quiralidad del carbono asimétrico.

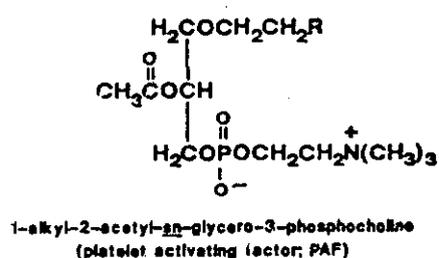


FIGURA 1: Estructura química del factor activador de plaquetas.

La presencia del enlace éter en posición *sn-1* tiene mucha importancia, ya que la sustitución de este enlace por un éster provoca una gran pérdida de actividad del compuesto (16). Tampoco puede aumentarse la longitud de la cadena acil en *sn-2*, porque con más de tres carbonos se disminuye la potencia del mediador.

Es necesaria la presencia de grupos metilo en posición *sn-3*, ya que la eliminación progresiva de estos grupos va disminuyendo la actividad biológica hasta la pérdida total de la misma, que se produce cuando la cabeza polar es fosfoetanolamina (17). La distancia entre el grupo fosfato y la carga positiva de la cabeza polar también es crítica: el aumento de longitud de este puente da lugar a una pérdida gradual pero progresiva de actividad (18). Por tanto, la estructura química del PAF puede modificarse muy poco sin que se pierda su actividad biológica.

2. PROCEDIMIENTOS UTILIZADOS PARA LA MEDIDA DEL PAF EN MUESTRAS BIOLÓGICAS.

Se han descrito varios métodos para medir el PAF en muestras biológicas:

- **Bioensayos:** generalmente se realizan con plaquetas de conejo, aunque en algún caso se han utilizado respuestas producidas en leucocitos polimorfonucleares humanos. Se basan en la capacidad que tiene el PAF para producir la activación plaquetaria y causar agregación o reacción de liberación (19). En este último caso se puede medir la liberación al medio de la serotonina plaquetaria.

Es el primer método que se utilizó para medir el PAF. Es un ensayo fácil, barato y que mide la actividad biológica del mediador. Sin embargo, es necesaria la purificación de las muestras, sobre todo si se mide el PAF en fluidos biológicos complejos, debido a la presencia de sustancias que interfieren en el experimento. Este procedimiento es muy sensible, reproducible y preciso.

- **Cromatografía líquida de alta presión y análisis por espectrometría de masas:** estos métodos han recibido mucha atención recientemente. Dan precisión, especificidad, buena cuantificación e información estructural de la molécula. Sin embargo, son caros y requieren un trabajo muy tedioso para la preparación de las muestras.

El análisis del PAF por espectrometría de masas necesita un paso previo consistente en la hidrólisis y derivatización de la molécula, por tratamiento de la muestra con cloruro de pentafluorobenzoilo a 150°C. Con este método, pueden llegar a detectarse cantidades muy pequeñas del mediador, del orden de picogramos.

- **Marcaje metabólico:** es un procedimiento muy utilizado en estudios de síntesis del PAF en células. Se fundamenta en la incorporación de precursores marcados radiactivamente del factor activador de las plaquetas al medio de incubación de las células, como acetato, colina o glicerol. Es un método fácil y rápido, pero precisa una adecuada separación y purificación de otros compuestos que puedan incorporar los precursores marcados.
- **Radio-inmuno análisis (RIA):** el PAF se puede medir en muestras biológicas por radio-inmuno análisis, ya que se han desarrollado anticuerpos policlonales anti-PAF con buena especificidad (no dan reacción cruzada ni con liso-PAF ni con lípidos naturales como lecitina y lisolecitina). Tienen especificidad (por el grupo acetato en posición *sn-2*) y sensibilidad. Presentan una afinidad para unir el PAF con una $K_d = 3 \times 10^{-9}$ M, que está casi en el rango estimado para los receptores del PAF en varios tejidos. Es un método cómodo, pero caro y de menor precisión que los bioensayos (20).

3. METABOLISMO DEL PAF Y ETÉR-LÍPIDOS.

3.1. Biosíntesis.

El PAF no se encuentra almacenado en las células en la forma en la que puede desarrollar sus actividades biológicas, sino que se genera rápidamente en respuesta a estímulos específicos. Pertenece pues a lo que en general se conoce como mediadores secundarios. Se puede sintetizar enzimáticamente por dos rutas: la vía de remodelación y la síntesis *de novo* (Figura nº 2) (8).

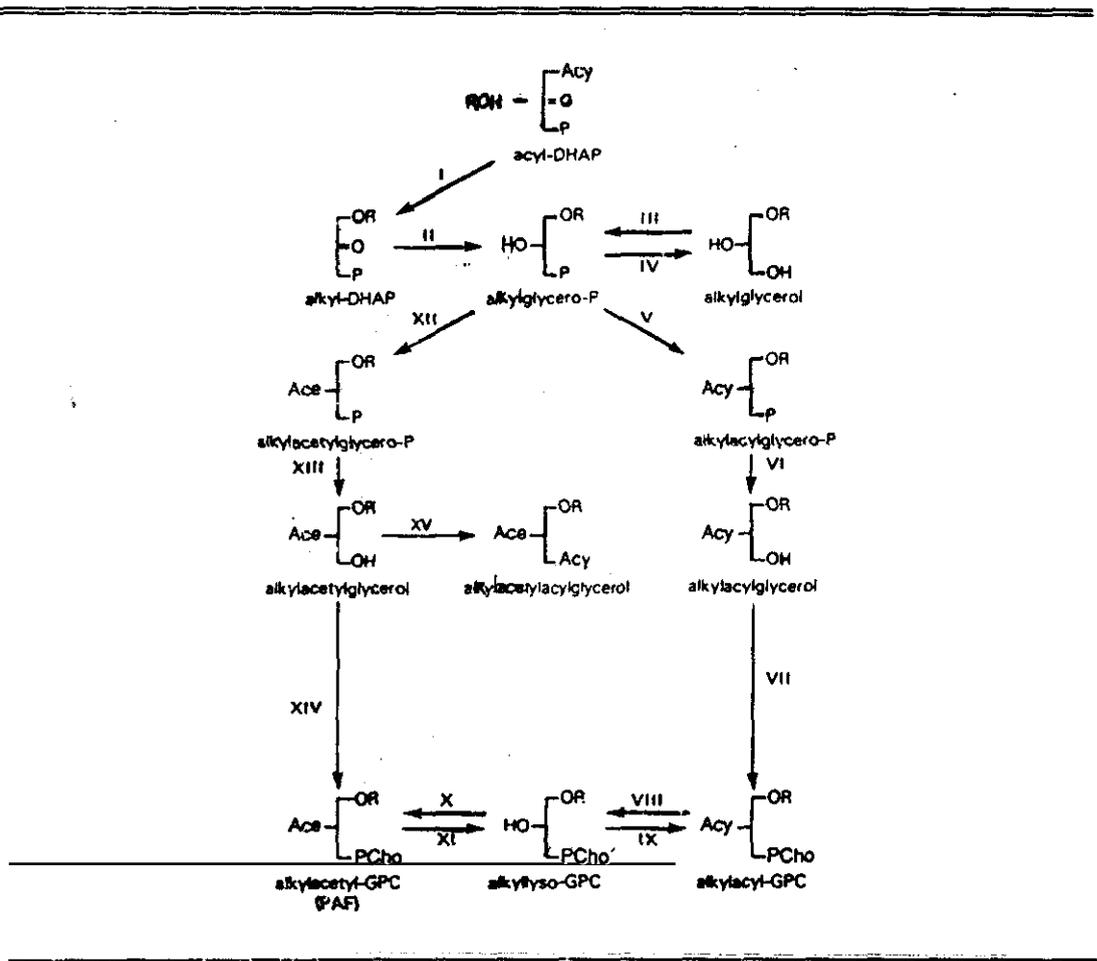


FIGURA 2: Vías generales del metabolismo de alquil-éter-lípidos y PAF. Los números romanos se refieren a las siguientes enzimas: (I) alquil-DHAP sintetasa; (II) NADPH:alquil-DHAP oxidoreductasa; (III) ATP:1-alquil-*sn*-glicero-3-P fosfotransferasa; (IV) 1-alquil-2-liso-*sn*-glicero-3-P fosfotransferasa; (V) acil-CoA:1-alquil-2-liso-*sn*-3-P aciltransferasa; (VI) 1-alquil-2-acil-*sn*-glicero-3-P fosfohidrolasa; (VII) CDP-colina:1-alquil-2-acil-*sn*-glicerol colinafosfotransferasa sensible a DTT; (VIII) fosfolipasa A₂; (IX) fosfatidilcolina:1-alquil-2-liso-*sn*-glicero-3-fosfocolina transacilasa CoA-independiente; (X) acetil-CoA:1-alquil-2-liso-*sn*-glicero-3-fosfocolina acetiltransferasa; (XI) 1-alquil-2-acetil-*sn*-glicero-3-fosfocolina acetilhidrolasa; (XII) acetil-CoA:1-alquil-2-liso-*sn*-glicero-3-P acetiltransferasa; (XIII) 1-alquil-2-acetil-*sn*-glicero-3-P fosfohidrolasa; (XIV) CDP-colina:1-alquil-2-acetil-*sn*-glicerol colinafosfotransferasa; y (XV) acil-CoA:1-alquil-2-acetil-*sn*-glicerol aciltransferasa.

- **Vía de remodelación:** Hasta la fecha, la descripción más usual de esta vía centra el proceso en el compuesto 1-alquil-2-acil-*sn*-glicero-3-fosfocolina, como especie molecular más abundante de éter-lípidos en la membrana. Su conversión en PAF (compuesto con actividades biológicas) se realiza por la acción combinada de una fosfolipasa A₂ (VIII), que hidroliza el grupo acil en *sn*-2, y de la acetil-CoA:liso-PAF acetiltransferasa (X), que introduce un grupo acetato en esa posición. Ambas enzimas aumentan su actividad durante la estimulación celular.
- **Síntesis *de novo*:** Esta vía es análoga a la de la síntesis de fosfatidilcolina, pero las enzimas son específicas para los precursores del mediador. El compuesto 1-alquil-2-liso-*sn*-glicero-3-P se transforma en PAF por reacciones secuenciales de acetilación (XII), pérdida del grupo fosfato (XIII), y transferencia de fosfocolina (XIV). La vía *de novo* no se activa en respuesta a estímulos proinflamatorios, sino que parece estar implicada en la producción de pequeñas cantidades de PAF (o de sus intermediarios) de forma continuada.

Características de la vía de remodelación

- Estimulable por agentes proinflamatorios.
- Acoplada a la formación de eicosanoides.
- Las enzimas implicadas se encuentran en la forma de baja actividad en células en reposo.

Características de la vía de síntesis *de novo*.

- Mantiene los niveles fisiológicos del PAF.
- No esta acoplada a la formación de eicosanoides.
- Alta actividad específica de las enzimas implicadas en células en reposo.
- No estimulable por agentes proinflamatorios.

La existencia de dos vías de síntesis del PAF hace pensar que este mediador está implicado en procesos fisiológicos y patológicos en las que sea necesario aumentar los niveles del mediador de forma aguda:

- La síntesis *de novo* serviría para mantener los niveles fisiológicos del PAF, mientras que la vía de remodelación, que requiere un estímulo, daría lugar a la superproducción del PAF asociada a condiciones patológicas, como reacciones inflamatorias y alérgicas.
- La mayoría de los tejidos tienen las enzimas necesarias para la síntesis *de novo* del PAF, mientras que sólo un número limitado de células (neutrófilos, plaquetas, macrófagos, basófilos, endoteliales, etc.) tienen la maquinaria necesaria para producir PAF por la vía de remodelación.
- El control farmacológico de una excesiva producción del PAF por la vía de remodelación se puede conseguir con inhibidores específicos, de forma que no se interfiera con las enzimas responsables de la síntesis *de novo* y se mantengan los niveles del PAF necesarios para una buena función fisiológica.

3.2. Inactivación y catabolismo.

La ruta primaria para la inactivación intracelular del PAF está catalizada por la enzima 1-alkil-2-acetil-*sn*-glicero-3-fosfocolina acetilhidrolasa citosólica, que hidroliza el grupo acetato en posición *sn*-2 (21) y produce liso-PAF. Este intermediario se recicla rápidamente por una transacilasa microsomal (22), de manera que se transforma nuevamente en el precursor del PAF y se almacena en las membranas hasta que vuelve a ser utilizado. Esta es la forma más común de degradación del mediador en las células inflamatorias. Esta vía de inactivación del PAF es independiente de la activación celular.

Así, una vez que el PAF se ha unido a su receptor específico, es atacado por enzimas citosólicas y de membrana, con lo que se hidroliza a liso-PAF y posteriormente se reacila. A continuación, parece que se transfiere a fracciones subcelulares (23).

El PAF también puede ser degradado por una lisofosfolipasa D o por rotura del enlace alquil. En este caso, el PAF no se almacena en la célula en la forma de su precursor inmediato: 1-alkil-2-acil-GPC (24).

La fosfolipasa C también parece estar implicada en la inactivación directa del PAF en varios tejidos (25). Sin embargo, se ha visto que la actividad específica de esta enzima es bastante menor que la de la acetilhidrolasa, con lo que la significación biológica de la fosfolipasa C en el catabolismo del PAF es cuestionable.

3.3. Regulación del metabolismo del PAF.

El control de los niveles del PAF depende de un gran número de factores, como la disponibilidad de sustratos, presencia de iones metálicos, ácidos grasos, pH, compartimentalización, activación de las enzimas que lo sintetizan y de la actividad de la acetilhidrolasa (que degrada el PAF a liso-PAF). A continuación, vamos a analizar estos factores:

- **Disponibilidad de sustratos:** las células fagocíticas han tenido mucho interés como fuente principal del PAF, ya que contienen gran cantidad de éter-lípidos en los glicerofosfolípidos de colina (plasmanilcolina). Sin embargo, es evidente que el hígado produce PAF a pesar de que los hepatocitos tienen pocos éter-lípidos en la membrana.

El PAF posee gran potencia como mediador inflamatorio, ya que aunque se produzca en concentraciones muy bajas, es capaz de producir un efecto notable, por lo que la disponibilidad del precursor del PAF en la membrana no parece ser el paso limitante en la síntesis.

Se ha visto que agentes que aumentan los niveles intracelulares de AMPc bloquean la producción del PAF por inhibición de la fosfolipasa A₂ sin afectar a la acetil-CoA:liso-PAF acetiltransferasa (26). Este efecto se revierte parcialmente por la adición de liso-PAF exógeno, con lo que la disponibilidad de liso-PAF puede ser un factor limitante en la biosíntesis del PAF por la vía de remodelación.

La producción del PAF en neutrófilos humanos estimulados con distintos secretagogos (ionóforo de calcio A23187, zimosán opsonizado, ésteres de forbol, etc.) está aumentada por la presencia de cuerpos cetónicos (acetoacetato y β-hidroxibutirato). Estos compuestos se incorporan y metabolizan en los tejidos para dar lugar a acetil-CoA: parece que esta es la razón por la cual aumentan la síntesis del PAF. Los niveles de los cuerpos cetónicos se incrementan en algunas condiciones patológicas, de forma que se podría ampliar el daño tisular al ser favorecida la síntesis del PAF (27).

- **Nucleótidos cíclicos:** muchos estímulos producen un aumento en la concentración de AMPc (zimosán opsonizado, fMLP, etc.). El AMPc inhibe la producción del PAF, según se ha detectado utilizando inhibidores de la fosfodiesterasa (metilisobutilxantina, teofilina), que producen una elevación en los niveles de AMPc (28).

- **Iones calcio:** este ión no sólo inhibe las actividades acetiltransferasa, fosfolipasa y colina fosfotransferasa insensible a DTT de la vía *de novo*, sino que también puede inhibir los pasos de transacilación y desacilación de la vía de remodelación tanto *in vivo* como *in vitro*. Por otra parte, el calcio es esencial para la activación de enzimas clave en la síntesis del PAF por la vía de remodelación, como son la fosfolipasa A₂ y la acetiltransferasa.
- **Acidos grasos:** el ácido araquidónico parece jugar un papel muy importante en la regulación de la síntesis del PAF por la vía de remodelación. Así, utilizando PMNs peritoneales de rata deplecionados de este ácido graso y estimulados con ionóforo A23187, se observa una inhibición del 86 % en la incorporación de acetato en la fracción del PAF, y esta inhibición se revierte al administrar ácido araquidónico exógeno (29).

La generación de eicosanoides y PAF desde un intermediario común es muy atractiva en términos de economía enzimática, y sugiere interacción entre los productos. Así, se ha descrito que los productos de la 5-lipoxigenasa (5-HETE, LTB₄, etc.) son capaces de potenciar la acción de la fosfolipasa A₂, con lo que se aumenta la disponibilidad de liso-PAF y se favorece la formación del PAF (30).

Por otra parte, tanto la fosfolipasa A₂ (31) como la acetiltransferasa (26) se inhiben por ácidos grasos poli-insaturados por un mecanismo competitivo. La inhibición de estas enzimas por ácido araquidónico dependerá del equilibrio entre desacilación y reacilación, así como de la conversión de este ácido graso por la 5-lipoxigenasa a eicosanoides.

- **Compartimentalización:** la mayoría de las enzimas responsables de la síntesis del PAF se encuentran asociadas a membranas de distintos orgánulos subcelulares:

- . La fosfolipasa A_2 se ha purificado tanto del citosol como asociada a membrana, y la forma soluble se trasloca a la membrana en respuesta al calcio (32).
- . La acetiltransferasa de la vía de remodelación se localiza en PMNs en una fracción enriquecida en retículo endoplásmico (33).
- . La acetilhidrolasa del PAF se encuentra tanto en el citosol de las células como en el plasma. Sin embargo, en el interior celular su lugar de acción debe estar cerca de la membrana, que es donde se encuentra el PAF generalmente.

En experimentos de marcaje metabólico se ha encontrado el PAF en retículo endoplásmico y en otros orgánulos subcelulares (33,34). Por tanto, las transformaciones metabólicas del PAF están catalizadas por enzimas localizadas en una variedad de membranas subcelulares. Esto implica que debe existir un movimiento específico intermembrana del PAF y sus metabolitos para que todos estos procesos estén compartimentalizados. Así, el PAF debe ser transportado desde el lugar de síntesis hasta la membrana plasmática, seguramente unido a una proteína transportadora (35), que proteja al mediador de la acción de la acetilhidrolasa presente en el citosol. Sin embargo, la forma precisa en la que el PAF es procesado intracelularmente y el mecanismo de liberación al medio extracelular no han sido aún bien establecidos.

- **CDP-colina colinafosfotransferasa:** esta enzima cataliza la transferencia de la cabeza polar de fosfocolina a 1-alkuil-2-acetil-*sn*-glicerol. Se ha caracterizado en numerosos tejidos, como bazo de rata, PMNs humanos (36) y plaquetas de conejo. Esta actividad enzimática es independiente de la activación celular y de la presencia de calcio. Junto con la enzima 1-alkuil-2-liso-*sn*-glicero-3-P acetiltransferasa, constituye el paso limitante en la síntesis *de novo* del PAF.

- **Metiltransferasa:** se puede obtener fosfatidilcolina partiendo de fosfatidiletanolamina por dos metilaciones sucesivas catalizadas por una metiltransferasa, que utiliza S-adenosil-metionina como donante de grupos metilo. En teoría, la inhibición de esta enzima podría reducir los niveles del PAF. Sin embargo, las células contienen 1-alkil-2-acil-*sn*-glicero-3-fosfolina en exceso, y por tanto, éste no sería nunca un paso limitante en la biosíntesis del PAF.
- **Acetil-CoA: liso-PAF acetiltransferasa:** esta enzima parece ser el punto limitante en la formación del PAF: cataliza el último paso de la síntesis del mediador por la vía de remodelación, que consiste en la acetilación de liso-PAF.

La distinción entre la acción de la acetiltransferasa y la aciltransferasa está basada en la diferente sensibilidad a los detergentes, y en el hecho de que el acetil-CoA no inhibe de forma competitiva a la aciltransferasa. Además esta última enzima se inhibe por calcio, mientras que la acetiltransferasa necesita la presencia de este ión para activarse. Aquí tenemos dos efectos opuestos del calcio en el metabolismo del PAF: inhibición de la reacilación de liso-PAF y activación de su acetilación, lo que aumenta la síntesis del mediador.

La activación de esta enzima requiere la entrada de calcio. Se activa por una modificación covalente, que es una fosforilación reversible vía proteína quinasa A (PKA) en PMNs (37) (aunque en glándulas parótidas de cobaya la proteína quinasa responsable de la fosforilación parece ser la proteína quinasa dependiente de calcio/calmodulina (38)). Se ha localizado en la membrana del retículo endoplásmico en PMNs (33) y se ha caracterizado y purificado parcialmente de bazo de rata (39). Tiene una K_m de $137 \mu M$ para acetil-CoA, una $V_{m\acute{a}x} = 0.82 \mu mol/min.mg$ proteína, un pH óptimo entre 7.6 y 8.2 y un peso molecular aparente de 30 kDa.

Ninio y col. (40) han observado que la velocidad de la reacción catalizada por la acetiltransferasa en neutrófilos humanos estimulados con ionóforo A23187 es dos veces más rápida en presencia de liso-PAF 16:0 que en el caso del liso-PAF 18:0, de tal forma que en un medio con concentraciones iguales de las dos especies de liso-PAF, se forma 5 veces más PAF 16:0 que 18:0. Por tanto, parece que la acetiltransferasa tiene preferencia por las cadenas alquílicas 16:0. Esto tiene importancia biológica, ya que el PAF 16:0 es dos veces más potente que el 18:0.

Lee y col. (41) han encontrado que los requerimientos de sustrato y especificidad de la acetiltransferasa coinciden con los requerimientos estructurales que necesita el PAF para tener actividad, de tal forma que esta enzima puede controlar la estructura química del PAF sintetizado *in vivo*.

- **Fosfolipasa A₂**: la fosfolipasa A₂ hidroliza los fosfolípidos en posición *sn*-2 produciendo ácidos grasos libres y lisofosfolípidos. Esta enzima se encuentra presente en las secreciones pancreáticas (PLA₂ de tipo I, muy parecida a la fosfolipasa presente en los venenos de serpientes), y en las células (PLA₂ de tipo II), tanto en forma soluble (fosfolipasas A₂ tipo II de bajo peso molecular) como asociada a membranas (fosfolipasas A₂ tipo II de alto peso molecular) (42). Las más importantes son las fosfolipasas A₂ de tipo II de alto peso molecular, porque parece ser que son las implicadas en el proceso de producción de eicosanoides, de liso-PAF para la síntesis del PAF, participan en la remodelación de fosfolípidos por el ciclo de desacilación/reacilación y en la protección de las membranas al daño por oxidación.

Las fosfolipasas A₂ de tipo II de alto peso molecular tienen una gran dependencia con el calcio, están asociadas a la membrana plasmática o se asocian a ella tras la estimulación, presentan un peso molecular elevado (más de 50 kDa), y un pH óptimo entre 7 y 9.

Tienen preferencia por la presencia de ácido araquidónico en posición *sn-2*, mientras que no la tienen para la posición *sn-1*: hidrolizan a la misma velocidad especies 1-alkil y 1-acil. Se inhiben por ácidos grasos poli-insaturados (31) y por lipocortinas (proteínas reguladas por glucocorticoides), aunque en este último caso la inhibición parece que se debe más a una interacción de estas proteínas con el sustrato que a una acción directa sobre la fosfolipasa A_2 . Dentro de este tipo de fosfolipasas, se han purificado y clonado las fosfolipasas A_2 del citosol de la línea celular de macrófagos murinos RAW 264.7 (43), del citosol de plaquetas de conejo (44), y de la línea celular monocítica U937 (45-48).

- **PAF-acetilhidrolasa:** como ya hemos visto, esta enzima cataliza la hidrólisis del PAF a liso-PAF. Se encuentra presente tanto en el citosol de las células (21) como en el plasma sanguíneo (49,50).

La acetilhidrolasa de plasma humano se ha purificado casi a homogeneidad (49), y tiene un peso molecular aproximado de 43 kDa. Es independiente de calcio y se encuentra asociada a lipoproteínas de alta (HDL) y baja densidad (LDL), para lo cual posee un dominio hidrofóbico. En condiciones similares a las que se dan *in vivo* (enzima en exceso y baja concentración de sustrato), es mucho más activa la forma unida a lipoproteínas de baja densidad (50). No parece que se trate de dos enzimas diferentes, ya que esta actividad se puede transferir de una lipoproteína a otra en un proceso específico, que depende del pH.

En contraste con la fosfolipasa A_2 , la acetilhidrolasa del PAF tiene una gran preferencia por la presencia de cadenas cortas en posición *sn-2*. Sin embargo, no hay especificidad ni por el enlace éter ni por la cabeza polar: la enzima degradativa es menos específica que el receptor.

La acetilhidrolasa también reconoce fosfolípidos que tengan ácidos grasos en posición *sn*-2 que se han fragmentado por oxidación (51). Estos fosfolípidos oxidados tienen acciones farmacológicas análogas al PAF y producen su efecto a través del mismo receptor.

Esta enzima se secreta por los macrófagos, pero no por los monocitos, que son los precursores de los macrófagos. Además, durante la diferenciación de monocitos a macrófagos aumenta 260 veces la síntesis de la acetilhidrolasa (52). De esta manera, la migración de los monocitos a los tejidos y su conversión a macrófagos, permitiría la liberación de esta enzima, de forma que ayudaría a controlar la formación del PAF en un proceso de daño tisular.

La forma extracelular parece tener las mismas propiedades catalíticas que la enzima intracelular, y se piensa que la acetilhidrolasa del plasma podría ser la misma enzima que la forma intracelular, pero glicosilada para poder secretarse al exterior. Una prueba de este hecho es que la forma extracelular es resistente a proteasas y además, tiene un peso molecular algo mayor que la enzima intracelular (53). Sin embargo, se ha visto recientemente que ambas enzimas no dan reacción inmunológica cruzada, por tanto, existe la posibilidad de que se trate de dos enzimas diferentes.

El control de la concentración del PAF en el medio extracelular depende de los niveles y actividad de la acetilhidrolasa del plasma y de la capacidad de las células vecinas para captar y metabolizar la molécula. La vida media del PAF en el plasma es pequeña y parece que es dependiente de la distribución de la acetilhidrolasa entre los distintos tipos de lipoproteínas, así como de la presencia de sustancias que modulan esta actividad enzimática.

- **Acilación de liso-PAF:** este intermediario de la biosíntesis y de la degradación del PAF es citotóxico, porque al igual que todos los lisofosfolípidos, posee acción detergente. Su eliminación se consigue por acilación. Robinson y col. (54) han descrito la existencia de tres formas de acilación de lisofosfolípidos: transacilación CoA-independiente, transacilación CoA-dependiente y acilación CoA-dependiente. La acilación de liso-PAF se produce principalmente por la acción de la transacilasa CoA-independiente, que transfiere el ácido graso en posición *sn*-2 de PC (preferentemente ácido araquidónico) a liso-PAF. Inicialmente el ácido araquidónico se incorpora en PC por la acción de la aciltransferasa CoA-dependiente.

La reacilación de liso-PAF se inhibe por calcio, lo que sugiere que al producirse el flujo de calcio con la activación celular, se inhibiría esta enzima permitiendo una acumulación transitoria de liso-PAF, con lo que se favorece la síntesis del mediador.

4. EL PAF COMO MEDIADOR.

Para que una molécula sea considerada como un mediador debe cumplir las siguientes características, propias de los mediadores de la comunicación célula-célula:

- Ser liberado por las células.
- Poseer actividades biológicas.
- Interaccionar con receptores específicos en las células blanco.
- Existencia de mecanismos de inhibición o inactivación que limiten su acción.

4.1. Liberación por las células.

Se han descrito un gran número de tipos celulares capaces de producir cantidades significativas del PAF en respuesta a un determinado estímulo. Entre ellos, se ha dado mucha importancia a las células proinflamatorias (neutrófilos (55,56), monocitos (56,57), macrófagos (58), eosinófilos (55), basófilos (4), linfocitos (59), plaquetas (60), pero también son capaces de sintetizarlo células tisulares, como las endoteliales (61), epiteliales, fibroblastos, hepatocitos, neuronas (62), mesangiales (63), etc.

Sin embargo, para determinar si una célula es capaz o no de sintetizar PAF es necesario:

- Asegurarse de la pureza de la población celular (unos pocos macrófagos pueden dar cuenta de una cantidad detectable del mediador).
- Medir los niveles intra y extracelulares del mediador.
- Caracterizar el PAF producido biológica y estructuralmente.
- Definir las vías de síntesis implicadas, demostrar la presencia de las enzimas de estas vías y determinar el estímulo que provoca la activación celular.

4.2. Actividad biológica.

Hay muchos tipos celulares, tejidos y órganos capaces de responder a este mediador cuando se utiliza como estímulo. Vamos a ver algunos ejemplos:

4.2.1. Células blanco.

- **Plaquetas:** El PAF se descubrió como un agente activador de las plaquetas, y verdaderamente, es capaz de activar estas células en la mayoría de las especies animales tanto *in vivo* como *in vitro*, y tanto en células aisladas, como en el torrente sanguíneo. Los efectos que produce el PAF en estas células son:

- . Cambios de forma.
- . Liberación del contenido granular.
- . Pérdida de sensibilidad del receptor por el ligando tras una segunda estimulación: se produce en la mayoría de sus células blanco. Es una forma de regulación que limita la acción de este potente mediador. Parece que se produce más por un descenso en la afinidad del receptor que por una pérdida de sitios de unión.
- . Agregación.
- . Aumento de la concentración de calcio intracelular, debido a la movilización de iones calcio de los depósitos y a un aumento del flujo de calcio a través de canales de la membrana plasmática.
- . Fosforilación de proteínas.
- . Activación del ciclo del inositol.
- . Estimulación de la cascada del ácido araquidónico, con producción de tromboxano A₂ y ácido hidroxieicosatetraenólico.

- **Neutrófilos:** el PAF ejerce múltiples acciones sobre el neutrófilo, entre las que se encuentran:

- . Liberación del contenido granular y consiguiente liberación de enzimas lisosomales.
- . Agregación.
- . Quimiotaxis.

- . Pérdida de sensibilidad del receptor por el ligando tras una segunda estimulación: se produce una disminución en el número de receptores de alta afinidad (64).
- . Aumento de la concentración de calcio intracelular, que se atribuye en un 70 % a la liberación del catión de los depósitos intracelulares y sólo en un 30 % a la entrada de calcio extracelular.
- . Estimulación de la cadena respiratoria y producción de ión superóxido.
- . Alteraciones en el contenido catiónico de la membrana y en las cargas de superficie.
- . Aumento de la adherencia celular.
- . Estimulación de la cascada del ácido araquidónico. Los metabolitos que se producen preferentemente son 5-HETE y LTB₄.
- . Pre-estimulación (*priming*): en este caso, la exposición de las células a concentraciones subóptimas del PAF altera la reactividad celular, de forma que la respuesta a otro segundo estímulo está muy aumentada. Este proceso parece no estar mediado por un aumento en el número de receptores para el segundo estímulo, sino en una alteración de las vías de transducción de la señal.

Se ha demostrado que el factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) aumenta la síntesis de leucotrieno B₄, la disponibilidad de ácido araquidónico y la activación de la 5-lipoxigenasa en PMNs humanos en respuesta al PAF (65). El GM-CSF por si mismo no es capaz de activar ninguno de los dos procesos, sin embargo, aumenta la capacidad del PAF para activarlos.

La implicación biológica de este fenómeno podría estar en la existencia de dos niveles de activación en las células inflamatorias: la migración a los tejidos dañados se produciría con una mínima activación de los procesos oxidativos y secretorios.

Sin embargo, una vez que se ha llegado al sitio de la inflamación, la célula pre-estimulada puede tener una respuesta muy amplificada. Así, se ha visto que los neutrófilos obtenidos de enfermos de sepsis tienen una respuesta muy exagerada frente a la estimulación (66): este puede ser un ejemplo de la existencia de la pre-estimulación *in vivo*.

- **Células endoteliales:** el PAF es capaz de alterar la organización molecular de las proteínas del citoesqueleto que controlan la permeabilidad endotelial. Así, las células endoteliales estimuladas con PAF se retraen y pierden el contacto entre ellas, de manera que se forman huecos a través de los cuales pasan los PMNs en su camino hacia el tejido dañado.

- **Cooperación celular:** El PAF participa en procesos de cooperación celular leucocito-plaqueta y leucocito-célula endotelial:
 - . En un sistema PMNs-plaqueta humanos, se ha visto que la activación de plaquetas aumenta la adhesión, liberación de enzimas lisosomales y síntesis de leucotrienos en neutrófilos. Por otra parte, productos derivados de leucocitos promueven la agregación, liberación de serotonina y movimientos de calcio citoplasmático en plaquetas: el PAF producido por los neutrófilos queda retenido en la superficie celular, de forma que es capaz de producir la agregación plaquetaria (67,68). De esta forma, la interacción neutrófilo-plaqueta puede aumentar y propagar la inflamación.
 - . Las células endoteliales producen fundamentalmente un análogo del PAF, 1-acil-2-acetil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (acil-PAF) (69). De esta manera, las células endoteliales no pueden estimular directamente a los neutrófilos, pero si los pre-estimulan, de forma que al llegar al tejido dañado pueden tener una respuesta muy aumentada.

- . El PAF induce la adhesión de plaquetas al endotelio *in vitro* cuando hay PMNs presentes, de forma que se produce una interacción entre PMNs y plaquetas en su adhesión a las células endoteliales (70).
- . Fradin y col. (71) miden la producción del PAF en neutrófilos estimulados con zimosán, y la comparan con la obtenida en sangre completa: observan que la producción del PAF en sangre es menor que la obtenida en los PMNs aislados, sin que se altere la cinética de aparición del PAF. Concluyen que este resultado es debido a que en sangre completa se da el catabolismo transcelular del mediador, con lo que se observa una disminución en la medida del PAF.

Este estudio de la producción de mediadores lipídicos en una población mixta de células nos da una idea de lo que ocurre en los tejidos, donde se da la síntesis y el catabolismo transcelular debido al contacto entre distintos tipos celulares.

4.2.2. Organos aislados.

- **Hígado:** el PAF tiene un efecto muy pronunciado en el metabolismo del fosfatidilinositol en hepatocitos aislados, y también es capaz de estimular la glicogenolisis en hígado de rata intacto (72).
- **Músculo liso:** estimula la contracción del músculo liso. No se sabe si es una acción directa del PAF o si se produce a través de la liberación de otros mediadores secundarios, como el tromboxano.
- **Circulación sanguínea:** tiene una acción vasodilatadora y permeabilizante, que produce extravasación de proteínas plasmáticas. Tiene marcadas propiedades antihipertensivas.

- **Pulmón:** produce broncoconstricción, hipertensión pulmonar, edema, necrosis del epitelio alveolar, cambios degenerativos en las células endoteliales, acumulación de macrófagos en el espacio alveolar, acumulación de PMNs y plaquetas en capilares alveolares, y aumento de la resistencia pulmonar.

- **Riñón:** el PAF tiene diversas acciones en el riñón: disminuye el flujo sanguíneo renal, el grado de filtración glomerular, el volumen de orina y la secreción de Na⁺. Además, estimula la contracción de las células mesangiales aumentando la permeabilidad de la pared capilar glomerular.

La actividad hipotensora del PAF y su formación en riñón casi exclusivamente por la vía *de novo* (73) parecen indicar que el PAF ejerce un papel fisiológico en este órgano, contribuyendo al control de la presión sanguínea.

4.2.3. Efectos de la administración *in vivo*.

Sus efectos varían con la forma de administración y con la especie animal empleada: la administración intravenosa del PAF a cobayas produce broncoconstricción (74), y en conejos induce un incremento de la resistencia pulmonar, agregación intravascular de plaquetas, trombocitopenia, neutropenia, basopenia, hipotensión sistémica y bradicardia (75).

5. RECEPTORES DEL PAF.

La existencia de un receptor para el PAF en sus células blanco se sugiere fundamentalmente por cuatro motivos:

- Sólo el esteroisómero natural del PAF tiene actividad biológica.
- El PAF es activo a muy bajas concentraciones (normalmente inferiores a 0.1 nM).
- Después de la exposición de un tejido a esta molécula se produce una pérdida específica de sensibilidad del receptor por el ligando.
- Hay una inhibición específica por PAF-antagonistas.

Una gran variedad de experimentos de unión de [³H]-PAF han demostrado la existencia de receptores de alta afinidad en plaquetas humanas (76), de conejo (77), de perro (78), neutrófilos humanos (23), células Kupffer de rata (79), células de músculo liso (77), línea celular de macrófagos murinos P388D₁ (80), y tejido de pulmón humano (81). En todos los casos, la unión del PAF es específica (si se elimina el grupo acetato en posición *sn-2* se elimina la unión al receptor), saturable y desplazable por PAF frío o antagonistas del receptor.

Se han descrito propiedades diferentes de los sitios de unión del PAF en varios tejidos, lo que sugiere o la presencia de un estado multiconformacional de un sólo tipo de receptor, o bien múltiples poblaciones de receptores para esta molécula. En PMNs humanos se han detectado dos tipos de sitios (82): uno de alta afinidad y baja capacidad ($K_d = 0.11$ nM, 5×10^6 receptores/célula), y otro de baja afinidad y gran capacidad de unión, que se considera un sitio no específico y no está asociado a un proceso mediado por receptor.

Hay evidencias de que existe heterogeneidad en los receptores para PAF tanto en distintas poblaciones celulares (los PMNs humanos tienen muchos más receptores para PAF que las plaquetas de la misma especie, lo que puede explicar la gran reactividad de los neutrófilos para este mediador) como dentro de la misma célula (las plaquetas humanas, de conejo, y de perro tienen receptores para PAF, mientras que las plaquetas de rata carecen de ellos). Esto abre un campo apasionante de modulación farmacológica del mediador.

Tampoco se puede ignorar la presencia de análogos del PAF, que como ya se verá más adelante, pueden inducir respuestas biológicas a través de los receptores del PAF.

Las propiedades de unión del PAF a su receptor se pueden modular por varios iones, como K^+ , Rb^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} y Mn^{2+} , que potencian la unión, mientras que ésta se inhibe por Na^+ y Li^+ (83). Por tanto, parece que el receptor del PAF presenta distintos estados conformacionales.

La unión del PAF a su receptor es un aspecto difícil de estudiar por los problemas que implica trabajar con un ligando de naturaleza lipídica y que además, es capaz de unirse a la albúmina (84), que se encuentra normalmente presente en el medio de incubación. Así, la concentración de PAF libre es menor de lo que se cree, lo que lleva a cálculos erróneos de constantes de disociación y de unión inespecífica. Un modo de abordar este estudio consiste en utilizar antagonistas marcados radiactivamente que tengan suficiente especificidad y afinidad por el receptor.

Se han hecho varios intentos de aislar el receptor del PAF en plaquetas humanas y llegó a purificarse una proteína de 160 kDa (85), pero no se pudo seguir caracterizándola bioquímicamente debido a la dificultad que entrañaba la solubilización de proteínas de membrana. Sin embargo, la caracterización se ha conseguido con el clonaje del receptor.

5.1. Anticuerpos anti-PAF.

Wang y col. (86) han creado anticuerpos monoclonales anti-PAF (3C3F3E4 y 10D3F8H7) que interaccionan con el receptor del mediador, ya que desplazan específicamente la unión de [³H]-PAF al receptor y estimulan la agregación plaquetaria. El éxito de este estudio se basa en la obtención de anticuerpos frente a la región donde el PAF se une a su receptor.

Estos anticuerpos se pueden utilizar como herramientas para caracterizar el receptor del PAF, como agentes para su purificación, para determinar si existen receptores intracelulares, para estudiar la regulación y las vías de transducción de la señal, etc. (87).

5.2. Clonaje del receptor.

El receptor del PAF de pulmón de cobaya ha sido clonado recientemente por Honda y col. (88) utilizando un abordaje de expresión funcional en oocitos de *Xenopus laevis*. Este sistema tiene gran capacidad de síntesis de proteínas y un canal de Cl⁻ sensible a Ca²⁺. De esta forma, la microinyección del mRNA aislado de pulmón de cobaya que contiene el mRNA del receptor del PAF, conduce fácilmente a su expresión funcional, y tras la administración del ligando y la estimulación de la entrada de calcio, el aumento de la concentración de Ca²⁺ intracelular conduce a la activación de un canal de Cl⁻, cuya actividad se puede seguir mediante técnicas de *patch clamp*.

Sólo se ha conseguido demostrar hasta la fecha la transcripción de una sola copia del receptor del PAF, aunque se han observado diferencias en la estructura de dos promotores del gen.

El receptor clonado pertenece a la superfamilia de las proteínas G con los siete segmentos transmembrana característicos. Tiene 342 aminoácidos con un peso molecular de 38982 Da; varios sitios de fosforilación (algunos de ellos en el tallo citoplasmático) y un sitio de N-glicosilación en el extremo N-terminal (Figura nº 3) (12).

Hay varios aminoácidos altamente conservados:

- Un aspártico en el segundo segmento transmembrana.
- Dos cisteínas en el segundo y tercer bucle extracelular, que pueden formar un puente disulfuro.
- Tres prolinas en el sexto y séptimo segmentos transmembrana.

Estos seis aminoácidos pueden ser claves en la formación de la estructura en forma de bolsillo a la que se une el ligando, como se ha demostrado para receptores β -adrenérgicos.

El tallo citoplasmático tiene cuatro serinas y cinco treoninas, que son posibles sitios de fosforilación. Este proceso podría originar la pérdida de sensibilidad del receptor por el ligando que se produce tras una segunda estimulación.

Ha sido el primer receptor de un mediador lipídico que ha sido clonado. Al ser clonado posteriormente el receptor del tromboxano A_2 , se ha observado una homología del 50% en la secuencia de nucleótidos, mientras que la homología de aminoácidos es sólo del 18%. Esta homología es inferior a la encontrada en la mayor parte de los 156 receptores del tipo rodopsina caracterizados hasta ahora.

El hecho de que los receptores de autacoides lipídicos formen un subgrupo dentro de esta superfamilia es una posibilidad factible.

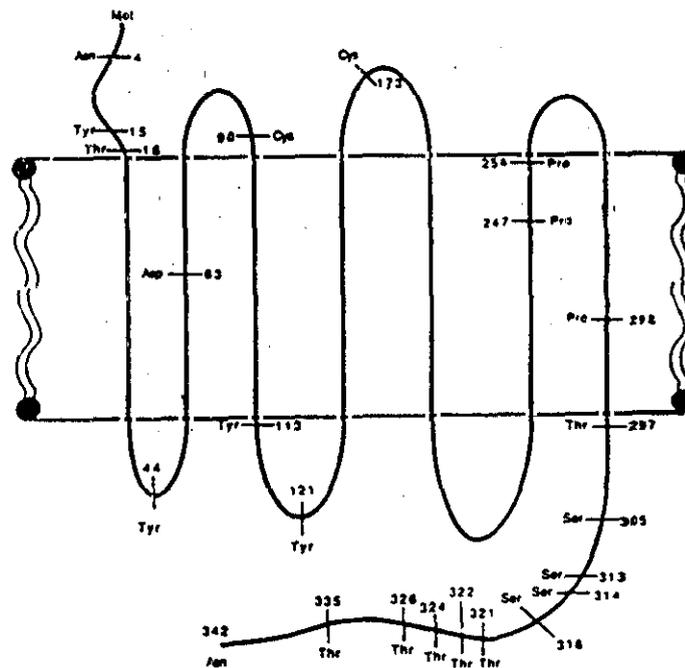


FIGURA 3: Representación del receptor del PAF. Se han indicado esquemáticamente los siete dominios transmembrana junto con los segmentos intra y extracelular. Los números indican la localización de los aminoácidos en el receptor de PAF clonado de pulmón de cobaya.

Estudios más recientes acerca de la expresión del receptor del PAF han mostrado su presencia en neuronas de hipocampo, hipotálamo y médula oblongata.

Asimismo, se ha demostrado que factores como el butirato, que favorecen la diferenciación de los eosinófilos, aumentan la expresión del receptor del PAF.

Aunque normalmente el clonaje del DNA complementario de un determinado receptor ayuda en el diseño de nuevos agentes terapéuticos, no es éste el caso, ya que la secuencia de aminoácidos correspondiente no da suficiente información como para trabajar sobre ello. Pero el conocimiento de la secuencia del receptor puede permitir desarrollar oligonucleótidos que puedan suprimir la expresión del receptor.

También se ha clonado el cDNA del receptor del PAF en células HL-60 (89) y en leucocitos humanos (90). Se ha visto que tienen también 342 aminoácidos, los mismos seis aminoácidos muy conservados y los siete posibles segmentos transmembrana, pero carecen del sitio de N-glicosilación en el extremo N-terminal, de lo que se deduce que la glicosilación no es esencial en la función básica del receptor. Hay una gran homología de secuencia entre estos receptores y el de pulmón de cobaya (en torno a un 83 % si se compara toda la secuencia y de un 90 % si se comparan los posibles segmentos transmembrana).

Kunz y col. (91) han clonado el cDNA de células mieloides humanas basándose en la homología de secuencia con el cDNA del receptor del PAF de pulmón de cobaya (88). Estos autores expresan este cDNA en células COS-7, y observan que da lugar a un receptor funcional. Además, modifican este cDNA introduciendo una secuencia de 30 aminoácidos que es reconocida por un anticuerpo. Expresan el cDNA para el receptor modificado en COS-7, dando lugar también a un receptor funcional, que además es reconocido por el anticuerpo. Esto puede ser de gran utilidad a la hora de intentar la purificación del receptor, ya que puede utilizarse como herramienta esta característica del receptor modificado de poder ser reconocido por un anticuerpo.

6. TRANSDUCCIÓN DE LA SEÑAL INDUCIDA POR EL PAF.

La unión del PAF a su receptor pone en marcha una serie de señales bioquímicas que median la transducción de la señal (Figura nº 4) (12).

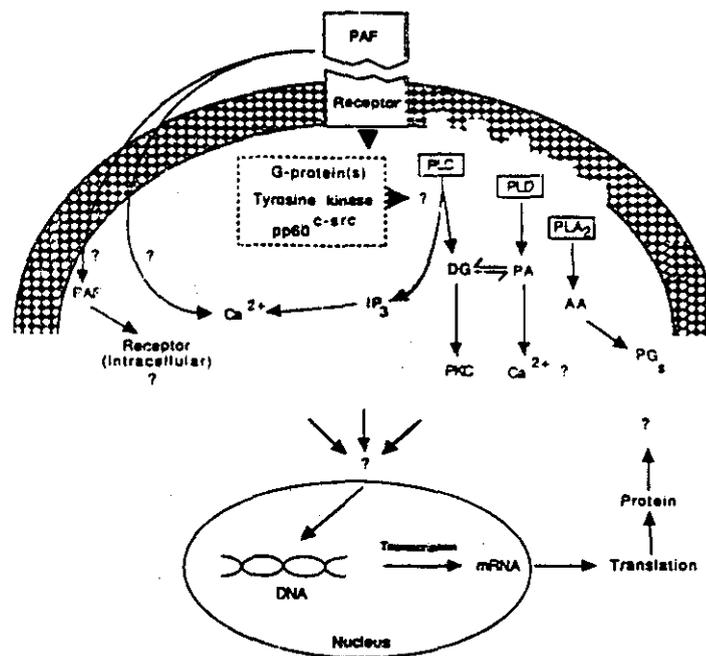


FIGURA 4: Representación de las vías de transducción de la señal acopladas al receptor del PAF.

La figura reproduce un esquema simplificado de las rutas estimuladas por PAF. El recuadro discontinuo indica que los detalles de la interacción entre los distintos componentes no se conoce. AA, ácido araquidónico; PG_s, prostaglandinas, PLA₂, fosfolipasa A₂; PLC, fosfolipasa C; PLD, fosfolipasa D.

6.1. Metabolismo de fosfolípidos.

Gran parte de las vías de transducción de la señal estimuladas por el PAF se producen a través de un mecanismo en el que participan proteínas G, y que conducen a la activación de las fosfolipasas A₂, C y D. Como resultado de la acción de estas enzimas, se producen mensajeros lipídicos.

- **Fosfolipasa C:** El PAF estimula la hidrólisis de fosfatidilinositoles vía fosfolipasa C. Esta activación se produce en pocos segundos, y provoca un aumento en los niveles de IP₃, IP₄, IP₅ y diglicérido, que actúan como segundos mensajeros induciendo la movilización del calcio intracelular y la activación de la proteína quinasa C (PKC), respectivamente. Este proceso se bloquea por antagonistas del receptor del PAF.

Varios estudios han descrito que en ausencia de calcio extracelular, el PAF produce un aumento del calcio intracelular, presumiblemente por movilización del catión de los depósitos intracelulares vía IP₃ (92). Del aumento total del calcio citosólico producido por el PAF, una cuarta parte es debido a la movilización de calcio inducida por IP₃. Por tanto, el mediador produce un aumento del calcio citosólico que proviene mayoritariamente del exterior. El mecanismo por el cual se produce el flujo de calcio se desconoce, aunque se ha visto que el PAF activa el intercambiador Na⁺/Ca²⁺ (93). Recientemente se ha demostrado que la movilización del calcio de los depósitos intracelulares en células mieloides conduce a la apertura de los canales de la membrana citoplasmática mediante un mecanismo que se denomina hipótesis de la capacitancia, según el cual la señal que relaciona la depleción de los depósitos intracelulares con la apertura de los canales es un producto del metabolismo del citocromo P-450 (94,95).

- **Fosfolipasa A₂**: En muchas células y tejidos, el PAF causa la liberación de ácido araquidónico y la acumulación de sus metabolitos, por la activación de una fosfolipasa A₂. Esto ocurre en plaquetas y en líneas monocitoides, como la línea P388D1 preestimulada con lipopolisacárido bacteriano. El mecanismo de activación es dependiente de la unión del PAF a su receptor y se bloquea por PAF-antagonistas (96).
- **Fosfolipasa D**: El ácido fosfatídico (PA), producto de la acción de la fosfolipasa D, puede tener un papel en la transmisión de la señal inducida por PAF, al igual que se produce en respuesta a otros agonistas.

El PA puede también hidrolizarse a diglicérido por la fosfohidrolasa del ácido fosfatídico (PPH), que puede activar la proteína quinasa C.

6.2. Proteínas G.

El PAF estimula la actividad GTPasa (83,97) en varios sistemas. En PMNs humanos, esta activación se inhibe por las toxinas del cólera y de Pertussis, mientras que esta inhibición no se manifiesta en plaquetas humanas (97).

Estos resultados sugieren que el receptor del PAF está acoplado a proteínas G, pero no se sabe a cual de ellas. Esto concuerda con la homología encontrada entre el receptor del PAF y los receptores acoplados a proteínas G.

6.3. Tirosina quinasas y proteína quinasa C.

El PAF es capaz de activar tirosina quinasas de forma que se produce la fosforilación de varias proteínas:

- En plaquetas, el PAF produce fosforilación en tirosina de proteínas de 50, 60, 71, 82 y 300 kDa. La respuesta es rápida y se bloquea por antagonistas del PAF (98).
- En PMNs humanos, también se produce fosforilación en tirosina de proteínas de 41, 54, 66, 104, y 116 kDa. Este efecto es dependiente de la concentración del PAF y se observa a concentraciones tan bajas como 1 nM (99).

Estos estudios sugieren que el PAF afecta a tirosina quinasas y/o fosforil tirosina fosfatasas directa o indirectamente, y que pueden estar implicados otros tipos de quinasas y fosfatasas.

El receptor del PAF tiene residuos de tirosina en el tallo citoplasmático: actualmente no se conoce si estos residuos son capaces de fosforilarse o si el propio receptor posee actividad tirosina quinasa.

El PAF también produce activación de la proteína quinasa C. En PMNs humanos estimulados con PAF se ha visto que se produce la traslocación de PKC del citosol hacia la membrana (100). Los activadores de la proteína quinasa C en neutrófilos humanos estimulados con PAF producen una reducción en el número de sitios de unión de alta afinidad para PAF, inhiben el aumento en la concentración de calcio intracelular ($[Ca^{2+}]_i$) y aumentan o disminuyen la liberación del contenido granular en función de la concentración (101).

Por tanto, la activación de la quinasa C produce una regulación de los receptores del PAF. Esta regulación negativa permite controlar las respuestas celulares provocadas por el mediador, y asimismo, podría explicar la pérdida de sensibilidad del receptor por el ligando que se produce tras una segunda estimulación con PAF.

6.4. Regulación de la señal.

En muchos sistemas (plaquetas, neutrófilos, hígado, etc.), la unión del PAF a su receptor produce una pérdida de sensibilidad homóloga del receptor por el ligando. Esto puede ser debido a una internalización del receptor (97,102). También es posible que la fosforilación del receptor juegue un papel en este fenómeno, como se ha visto en receptores adrenérgicos.

6.5. Expresión de genes.

El PAF induce la expresión de genes de respuesta temprana, como el c-fos, en varios tipos y líneas celulares (103). Es un proceso dependiente del receptor, en el que pueden estar implicadas la PKC y tirosina quinasas. Por tanto, el receptor del PAF parece estar acoplado a vías de transducción de la señal que producen la expresión de ciertos genes. En el futuro habrá que estudiar qué tipo de genes son los que se inducen y qué papel tienen en la respuesta celular al mediador.

7. RETENCION INTRACELULAR DEL PAF.

El PAF se describió originalmente en la sangre como un factor soluble. Sin embargo, muchos tipos celulares sólo secretan al medio extracelular una parte minoritaria de la totalidad del PAF que sintetizan. Así, Lynch y col. (104) demostraron que la mayor parte del PAF sintetizado por los PMNs humanos permanece asociado a las células. Este proceso presenta las siguientes características:

- No depende del método utilizado en la obtención de los PMNs.
- No es función de la dosis del estímulo.
- No se debe a que el PAF sintetizado se hidrolice rápidamente por la acetilhidrolasa que libera el neutrófilo activado, ni a que se metabolice o reabsorba por las células.
- Es un fenómeno general: se da en PMNs humanos, de conejo, monocitos humanos, de conejo, macrófagos humanos y células endoteliales humanas y bovinas.
- Tampoco depende del estímulo utilizado, ya que se obtiene el mismo resultado con zimosán, ionóforo A23187, y citocalasina B junto con fMLP, aunque este último estímulo es el que más PAF libera al medio externo.
- Aunque esté unido a la superficie celular, es capaz de servir de señal a otras células blanco. En condiciones fisiológicas, las células sanguíneas están separadas del endotelio. En condiciones de estimulación, las células endoteliales sintetizan PAF que queda retenido en la superficie, de manera que produce la unión de los PMNs (105). Esta unión requiere la presencia de un receptor funcional para PAF en el neutrófilo.

La retención del PAF en la célula está en contradicción con el papel predominante del mediador en los procesos de comunicación intercelular. Sin embargo, hay que tener en cuenta que el PAF es un mediador tan potente que es capaz de producir efectos completos aunque se libere en escasa cantidad. Además, el PAF retenido podría tener alguna acción en el interior celular, como:

- Unión a receptores intracelulares que puedan responder a la molécula: en plaquetas se ha encontrado que cuando el PAF se une al receptor, se produce una internalización del complejo (102), y en PMNs se han encontrado sitios de unión del PAF en membranas de gránulos intracelulares (97). Los receptores internos y externos del PAF tendrían distintos sistemas efectores en la célula.
- Aumento de la fluidez de la membrana, por lo que podría participar en fenómenos de fusión de membranas. Los lisofosfolípidos son fusogénicos y el PAF es muy parecido a un lisofosfolípido: puede aumentar la fusión de los gránulos y otras vesículas a la membrana plasmática. También puede aumentar las propiedades de la membrana asociadas a la fagocitosis.
- Participación en otras vías de fosfolípidos de membrana implicadas en la activación celular.
- Acetilación de fosfolípidos para impedir la acumulación de lisofosfolípidos que son tóxicos para las células (debido a su acción detergente).
- El PAF podría ser un segundo mensajero dentro de la célula: Stewart y col. (106) han observado en PMNs de conejo estimulados con fMLP que la producción de eicosanoides se inhibe con antagonistas del PAF.

Se ha intentado muchas veces ver cómo afecta la técnica de experimentación a la medida de la liberación del PAF, y se ha visto que depende del tipo celular (107), especie (104), agonista (104,107), estado de adherencia (107), presencia de albúmina en el medio extracelular (108), pH (109), calcio (110) y densidad celular (109):

- Ludwig y col. (108) han observado que la presencia de albúmina de suero humano (HSA) en el medio de incubación de neutrófilos humanos estimulados con fMLP y citocalasina B produce un aumento tanto en la síntesis como en la liberación del PAF al medio extracelular. También se ha visto que en ausencia de calcio extracelular se producen cantidades muy pequeñas del PAF sin que haya liberación; en cambio, en presencia de calcio, se aumenta la síntesis y se inicia la liberación del mediador.

Por tanto, parece que la albúmina, así como otros factores celulares, modulan la síntesis y liberación de este potente mediador lipídico. De todas formas, aún en las mejores condiciones de experimentación, el PAF sigue retenido en la célula. Sin embargo, el PAF se detecta en una gran variedad de fluidos fisiológicos, por lo cual, las células realmente liberan este mediador. En la mayoría de los estudios del PAF se utilizan suspensiones celulares bastante concentradas (5×10^6 cel/ml o más) para obtener una buena señal. Esto tiene que influir en la bioquímica y fisiología de estas células:

- Cluzel y col. (111) han utilizado tres sistemas distintos de suspensión celular, estando todos en las mismas condiciones de estimulación: uno de células concentradas (1×10^7 cel/ml), otro diluido (1.3×10^6 cel/ml) y otro con las células (1×10^7 cel/ml) suspendidas en una matriz estacionaria y perfundidas con tampón a un flujo constante (sistema dinámico). Ellos observan que en el sistema dinámico se libera un 40 % más de PAF que en el concentrado. Lógicamente, la cantidad de una sustancia absorbida por la célula depende de su concentración en la vecindad celular y del tiempo que esté expuesta a dichas células.

En una solución concentrada, el PAF liberado se encuentra a una concentración elevada y en contacto con las células. Sin embargo, en el sistema dinámico, el PAF se elimina rápidamente del entorno celular y sólo es accesible a la reabsorción por un período corto de tiempo.

- Recientemente, Miwa y col. (112) han descrito la existencia en suero de una proteína que es capaz de unir el PAF liberado por los PMNs humanos (y que es distinta de albúmina), de forma que impide la retención intracelular del mediador. El complejo formado es muy resistente a la hidrólisis por la acetilhidrolasa del PAF, y además, es capaz de activar a otras células. Este factor puede ser una proteína transportadora del PAF en la sangre, que protege al mediador de la hidrólisis pero permite su actividad (en esto se distinguiría del complejo que forma el PAF con las lipoproteínas HDL, en el que el mediador no es activo por estar muy atrapado en el complejo (113)).

La existencia de proteínas capaces de unir PAF distintas de albúmina ya se ha sugerido en la membrana de plaquetas humanas (114) y en el citosol de macrófagos de pulmón de vaca (35). Esta proteína parece ser distinta de la presente en plaquetas y macrófagos, e incluso de las proteínas que transfieren lípidos intra y extracelularmente.

- Se ha observado que las células proinflamatorias en reposo exhiben una asimetría en la disposición de varias clases de fosfolípidos en la membrana. El mantenimiento de esta asimetría parece estar implicado en la estabilización de la membrana plasmática por el citoesqueleto. Con la activación celular, se producen cambios físicos que permiten un aumento del movimiento transbicapa de los fosfolípidos (flip-flop) con pérdida de la asimetría de membrana. Bratton y col. (115) sugieren que en las células que sintetizan PAF, la activación celular puede aumentar el movimiento flip-flop del mediador en la membrana plasmática, haciéndolo accesible a moléculas aceptoras o a membranas celulares adyacentes, lo que puede provocar su liberación.

Así, el movimiento flip-flop del PAF puede ser un paso fundamental en el movimiento de la molécula desde el lugar de síntesis al de su liberación. De esta manera, el estado de la membrana puede regular la liberación del mediador.

- También hay que tener en cuenta que la célula, una vez que ha liberado el PAF, puede captarlo de nuevo y metabolizarlo. Por tanto, la cantidad del PAF en el medio extracelular no sólo depende de los mecanismos de síntesis y liberación, sino también de la captación, catabolismo y reciclaje de la molécula.

Bratton y col. (116) han estudiado la internalización del PAF en neutrófilos humanos, tanto en reposo como estimulados, y han observado:

- . Es dependiente del estado de activación celular.
- . No es específica para PAF: no hay requerimientos para las posiciones *sn-1*, *sn-2* o la cabeza polar.
- . No depende del receptor, metabolismo, endocitosis o exocitosis: se da con estímulos muy diversos.
- . Se aumenta al producirse el movimiento transbicapa de fosfolípidos durante la estimulación celular.
- . Parece ser el paso limitante en el metabolismo del PAF.

Como consecuencia de esto, al producirse la activación celular se aumenta el movimiento flip-flop de los fosfolípidos en la membrana, lo que da lugar a un aumento en la internalización del PAF. Este proceso puede modular la síntesis y liberación del mediador en células proinflamatorias.

8. ESPECIES MOLECULARES DEL PAF.

El PAF producido de forma natural por las células posee mayor heterogeneidad de la que se imaginó originalmente. Esto hace que algunos autores consideren al PAF como una familia de mediadores fosfolipídicos compuesta por diversos análogos. La naturaleza de estos fosfolípidos, varía de acuerdo al estado de reposo o estimulación de la célula (117), y dentro del mismo tipo celular varía de una especie animal a otra (118). Vamos a ver algunos ejemplos:

- **Variaciones en la cadena 1-O-alkil:** Las especies predominantes sintetizadas por los leucocitos polimorfonucleares estimulados con ionóforo de calcio A23187 son las que tienen cadenas 16:0, 18:0 y 18:1 en posición *sn-1* (118,119), aunque es mayoritaria la forma 16:0.

Los PMNs humanos estimulados con citocalasina B y fMLP (120) producen PAF 16:0 junto con otras cuatro especies moleculares más, que son minoritarias (<5 % del total).

El PAF de cadena alkil 16:0 es más activo que el de cadena 18:0 (121,122), y las especies con cadenas alquílicas insaturadas se han descrito como más potentes que las saturadas en algunos sistemas (123), pero no en todos (122).

- **Variaciones en la cabeza polar:** Se ha demostrado que los PMNs humanos estimulados con ionóforo A23187, zimósán o fMLP producen 1-O-alkenil-2-acetil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina de forma coincidente con la síntesis del PAF (124).

Lee y col. (125) han demostrado en células HL60 la presencia de una transacetilasa CoA-independiente que participa en la síntesis de alquenil-acetil-GPE, catalizando la transferencia del grupo acetato entre el PAF y alquenil-liso-GPE.

- **Acil-PAF:** También se han encontrado especies moleculares que contienen cadenas acil en *sn-1* (126).

Las células humanas implicadas en reacciones inflamatorias se pueden dividir en dos grupos de acuerdo al tipo predominante de 1-radil-2-acetil-GPC que producen: mastocitos, basófilos y células endoteliales sintetizan fundamentalmente 1-acil-2-acetil-GPC; mientras que neutrófilos, eosinófilos y macrófagos producen alquil-PAF casi de forma exclusiva (127).

La ruta de biosíntesis de 1-acil-2-acetil-GPC todavía no está bien establecida. Hay evidencia de que la enzima acetil-CoA:liso-PAF acetiltransferasa también es capaz de acetilar 1-acil-2-liso-GPC (128). La síntesis de una u otra molécula vendrá controlada, al menos en parte, por la concentración de 1-radil-2-liso-GPC que produzcan las células tras la activación, así como por la forma en que se regule la degradación de estos compuestos.

Parece que la acetiltransferasa y la fosfolipasa A₂ no tienen preferencias en cuanto a la utilización de acil-PC o alquil-PC en la síntesis del PAF. Parece que el que se encuentre una mayor concentración de una u otra molécula depende más bien de la vía de degradación de estos compuestos que de preferencias de sustrato en la síntesis (129).

Triggiani y col. (130) han encontrado que los neutrófilos humanos catabolizan dos veces más deprisa el acil-PAF que el alquil-PAF, y además, ambos compuestos se catabolizan de forma diferente: en el acil-PAF se hidroliza primero el grupo acil por una fosfolipasa A_1 (que tiene preferencia por la presencia de cadenas cortas en *sn-2*), y luego se hidroliza el grupo acetato en *sn-2* o la cabeza polar de colina (aunque una parte del acil-PAF sigue la misma ruta de catabolismo del PAF). Estos resultados pueden explicar porqué en los PMNs estimulados con ionóforo A23187 se encuentra más alquil-PAF que acil-PAF (mayor catabolismo de la especie acil que de la alquil).

En cuanto al papel biológico de 1-acil-2-acetil-GPC, se ha visto que, aunque es mucho menos potente que el PAF (131), es capaz de inhibir algunas respuestas biológicas inducidas por este mediador en neutrófilos (132) y en basófilos (131).

El mecanismo de inhibición del acil-PAF parece estar en un paso inicial de la activación producida por el alquil-PAF, ya sea por disminución en el número de receptores o por que desacopla el receptor de su mecanismo de transducción de la señal. Esto sugiere que este compuesto podría tener un papel como regulador de las respuestas mediadas por PAF.

- **Variaciones en la posición *sn-2*:** Smiley y col. (133) han descrito en PMNs que la oxidación de moléculas de fosfatidilcolina que tienen ácidos grasos poli-insaturados en *sn-2*, produce la fragmentación del residuo en esta posición a especies de cadena más corta, que pueden ser reconocidas por el receptor del PAF (se ha visto que su efecto se inhibe al utilizar antagonistas del PAF), e incluso son reconocidas por la acetilhidrolasa del PAF.

Estos fosfolípidos podrían generarse de forma natural en condiciones patológicas en las que se produzcan radicales del oxígeno. De esta manera se aumentaría el daño celular por una activación inapropiada de los PMNs.

Se han detectado fosfolípidos oxidados similares a éstos en cerebro (134), que son capaces de producir hipotensión y agregación plaquetaria (135): por tanto, estos fosfolípidos pueden aparecer *in vivo*. Este hecho tiene una gran importancia:

- . La formación no enzimática de fosfolípidos proinflamatorios por oxidación vía radicales libres, da lugar a una activación celular no regulable. Esto contrasta con la síntesis del PAF, que es un proceso totalmente modulado.
- . Los antagonistas del PAF no distinguen entre éste y los fosfolípidos oxidados, y por tanto, son capaces de bloquear los dos tipos de respuestas.

Como se puede observar en la tabla I (8), el término PAF no se refiere a una sola molécula, sino a toda una familia de compuestos muy relacionados químicamente entre sí, aunque con menos potencia que el PAF genuino inicialmente descrito.

TABLA I

*Actividad biológica relativa de varios fosfolípidos análogos del PAF.*ALTA ACTIVIDAD (10^{-11} - 10^{-10} M)

PAF (1-alkuil-2-acetil-GPC)
1-alkuil-2-propionil-GPC
1-alkuil-2-N-metilcarbamil-GPC

ACTIVIDAD INTERMEDIA (10^{-9} - 10^{-8} M)

1-alkuil-2-acetil-*sn*-dimetiletanolamina
1-alkuil-2-acetil-*sn*-monometiletanolamina
1-alkuil-2-acetil-*sn*-glicerol

BAJA ACTIVIDAD (10^{-8} - 10^{-7} M)

1-alkuil-2-etoxi-GPC
1-alkuil-2-butilil-GPC
1-alkuil-2-hexanoil-GPC
1-alkuil-2-N-acetil-GPC

INACTIVOS ($> 10^{-7}$ M)

1-acil-2-acetil-GPC
1,2-diacetil-GPC
2-acetil-3-alkuil-*sn*-glicero-1-fosfocolina
1-alkuil-2-octadecanoil-GPC
1-alkuil-2-liso-GPC
1-alkuil-2-metoxi-GPC
1-alkuil-2-benzoxi-GPC
1-alkuil-2-N-formil-GPC
1-alkuil-2-N-hexadecanoil-GPC
1-alkuil-2-dimetil-GPC
1-alkuil-2-propil-GPC
1-alkuil-2-isopropil-GPC
1-alkuil-2-isobutilil-GPC
1-alkuil-2-acetil-GPE
1-alkuil-2-acetil-*sn*-glicero-3-fosfoetanol
1-alkuil-2-acetil-*sn*-glicero-3-fosfato

La actividad se calcula en función de la respuesta obtenida en agregación de plaquetas de conejo o por su efecto hipotensivo en ratas.

9. ANTAGONISTAS E INHIBIDORES DEL PAF.

Hay un gran número de industrias farmacéuticas interesadas en la producción de antagonistas del PAF. En los pasados años, se han obtenido una gran variedad de antagonistas del receptor del PAF:

- Vía síntesis química, como CV 3988 (136), L 652731 (137), WEB 2086 (138), BN 52111 y BN 52115 (139), etc.
- Por aislamiento a partir de productos naturales, como kadsurenona (140) y BN 52021 (97).

Estos compuestos tienen estructuras muy diferentes y no es fácil explicar su función como antagonistas del receptor en términos de su naturaleza física y bioquímica: la estructura química de CV 3988 es similar al PAF, mientras que las de kadsurenona, WEB 2086, y BN 52021 son muy diferentes de éste. Sin embargo, los estudios computerizados de la disposición espacial de estas moléculas revelan que todas tienen una estructura común, que es la responsable de su unión al receptor del PAF.

La mayoría de estos PAF-antagonistas se han testado utilizando el bioensayo de plaquetas. Aunque es una aproximación perfectamente válida, se podrían desarrollar otro tipo de antagonistas utilizando métodos de ensayo diferentes, ya que existen muchos tipos de receptores para el mediador (distintos a los presentes en plaquetas).

Su utilización no es sólo interesante como terapia contra procesos patogénicos inducidos por PAF, sino que pueden ser una herramienta muy útil para conocer a nivel bioquímico los procesos en los que participa esta molécula.

Hay algunos trabajos que describen la existencia de inhibidores o antagonistas naturales de la acción del PAF en mamíferos (141,142). Estos compuestos han recibido menos atención que los antagonistas del PAF, pero también son agentes terapéuticos potenciales. Además, hay que tener en consideración los agentes que promueven la destrucción del PAF en el entorno extracelular.

10. FISIOLÓGIA Y PATOLOGÍA.

El PAF ha recibido mucha atención como mediador en procesos patológicos, ya que está implicado en gran variedad de situaciones fisiopatológicas tales como trombosis arterial, inflamación aguda, shock endotóxico, reacciones alérgicas agudas y embarazo. Para establecer si este mediador está implicado en un determinado proceso fisiopatológico hay que documentar los siguientes aspectos:

- Identificar la molécula en el tejido afectado.
- Demostrar que una vez eliminado el PAF se previene su efecto. Esto se puede conseguir utilizando antagonistas, bloqueando la síntesis o liberación del PAF, o creando animales o tejidos incapaces de responder al mediador (por deplección del receptor, por ejemplo). Lo más sencillo es la utilización de antagonistas, pero su efectividad depende directamente de su especificidad. Lo más válido es utilizar varios antagonistas que provengan de muy distintas familias moleculares.

Vamos a detallar algunos procesos fisiopatológicos en los que participa el PAF:

- **Inflamación:** es el aspecto más estudiado. La inyección intradérmica del PAF en humanos produce una respuesta inflamatoria bifásica, con componentes agudos y retardados. Se produce daño endotelial, infiltrado perivascular de monocitos, acumulación intravascular temprana de neutrófilos y aparición tardía de linfocitos e histiocitos (24 horas).

- **Enfermedades pulmonares, particularmente el asma:** hay una conexión histórica entre el PAF y las reacciones inflamatorias y alérgicas. La respuesta alterada de las vías respiratorias (broncoconstricción, hipersensibilidad bronquial no específica) seguida de reacción inflamatoria en animales de experimentación puede ser reducida por antagonistas del PAF; y al contrario, la administración del PAF en humanos produce hiperreactividad de las vías respiratorias (143).

- **Alteraciones cardiovasculares:** aquí se incluyen alteraciones en permeabilidad, redistribución del volumen de sangre, shock cardíaco, arritmias, vasoconstricción y vasodilatación. No está claro si estos procesos los produce el PAF directamente o si están mediados por la acción de la molécula en el tejido vascular o en las células inflamatorias circulantes.

EL PAF participa en procesos tromboembólicos: aumenta la activación de plaquetas en agregados leucocito-plaqueta (trombos) debido a la interacción entre los dos tipos celulares entre si y con el endotelio, con lo que se amplifica mucho la respuesta.

También puede estar implicado en procesos vasculares crónicos, como la arteriosclerosis.

Hay una percepción general de que la implicación del PAF en el sistema cardiovascular no es puramente patológica: podría estar relacionado con el mantenimiento del tono vascular, con lo que una exposición prolongada a antagonistas podría producir alteraciones graves.

- **PAF como mediador de los efectos de la endotoxina bacteriana:** muchos investigadores han demostrado que un gran número de los efectos patológicos producidos por endotoxina se suprimen por la administración de antagonistas del PAF.

Esto podría indicar que las acciones de la endotoxina están mediadas por PAF, aunque en ellas también juegan un papel principal varias citoquinas, como el TNF. Este hecho hace que se conceda gran importancia al papel del PAF en la patogenia del shock endotóxico, que es un proceso complicado en el que se produce hipotensión sistémica, daño endotelial, activación de diferentes sistemas plasmáticos (kalicreina, fibrinólisis, etc.) y de células circulantes (leucocitos y plaquetas).

- **Acciones en el sistema nervioso:** Se ha detectado la presencia del PAF en neuronas (62) tanto en procesos fisiológicos (interacción célula-célula) como patológicos (toxicidad en células neurales).
- **Riñón:** Las células mesangiales del glomérulo son capaces de sintetizar PAF (63), de manera que puede ser generado durante el desarrollo de la glomerulonefritis. También se ha sugerido la implicación del PAF en el daño inmune renal y en la proteinuria.
- **PAF en el embarazo:** Se ha detectado PAF en el líquido amniótico y también en el pulmón del feto. Podría jugar un papel en las alteraciones cardiovasculares que acompañan al nacimiento o bien participar en la producción de la cantidad de surfactante pulmonar necesaria para poder existir en un sistema no fluido (144).

- **PAF en otros órganos:** El tracto gastrointestinal, el sistema genitourinario, piel, córnea y retina son blancos potenciales de las acciones del PAF en procesos tanto fisiológicos (efectos apropiados en el aporte sanguíneo a estos órganos) como patológicos (reacciones inflamatorias).

Hay que tener en cuenta que en estos procesos el PAF no actúa como una molécula aislada, sino en conjunto con otros tipos de mediadores presentes en estos procesos: el PAF es un potente mediador por si solo, pero sería un error aislarlo de la familia de citoquinas que se producen a la vez que el PAF, ya que pueden modificar sus efectos.

II. OBJETIVOS

Este trabajo tiene por objeto el estudio de la estimulación de los leucocitos polimorfonucleares humanos con el péptido quimiotáctico N-formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLP), con el fin de aclarar los siguientes aspectos:

1. RESPUESTAS PRODUCIDAS EN EL POLIMORFONUCLEAR POR LA ESTIMULACION CON fMLP.

- Biosíntesis y liberación del PAF al medio extracelular.
- Activación de la enzima acetil-CoA:liso-PAF acetiltransferasa.
- Liberación de β -glucuronidasa, como expresión de la liberación del contenido granular.

2. VIAS DE TRANSDUCCION DE LA SEÑAL DE ACTIVACION.

- Papel de las variaciones de la concentración de calcio intracelular ($[Ca^{2+}]_i$).
- Activación de la fosfolipasa D y producción de segundos mensajeros lipídicos: diglicérido y ácido fosfatídico.

3. ANALISIS DE LA VIA METABOLICA QUE CONDUCE A LA BIOSINTESIS DEL PAF.

- Participación de la fosfolipasa A_2 .
- Relación con el mecanismo de liberación de ácido araquidónico.
- Dependencia de la transacilación de fosfolípidos.

III. MATERIALES Y METODOS

1. REACTIVOS: ORIGEN Y PREPARACION.

Sigma Chemical Company. St. Louis. (MO). U.S.A.

- Acido araquidónico (AA) (Pm = 304.5 g/mol).
- Albúmina de suero bovino delipidada (BSA delipidada).
- Indometacina. (Pm = 357.8 g/mol).
- 1-O-hexadecil-2-acetil-*sn*-glicero-3-fosfocolina (PAF).
(Pm = 523.7 g/mol).
- Acido etilendiamino tetraacético (EDTA). (Pm = 336.2 g/mol).
- Citocalasina B (CB). (Pm = 479.6 g/mol). Se disuelve en dimetilsulfóxido (DMSO), de forma que la concentración final de DMSO en la reacción sea menor del 0.2 %.
- N-formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLP). Se disuelve en DMSO, de forma que la concentración final de DMSO en la reacción sea menor del 0.02 %.
- Acido etilenglicol-bis-(β -aminoetiléter)-N,N,N',N'-tetraacético (EGTA).
(Pm = 380.4 g/mol).
- Fenilmetilsulfonil fluoruro (PMSF). (Pm = 174.2 g/mol).
- Zimosán de levadura de cerveza.
- Acido fenolftalein- β -glucurónico. (Pm = 516.4 g/mol).
- Patrones lipídicos para cromatografía en capa fina.
- 1-O-hexadecil-2-liso-*sn*-glicero-3-fosfocolina (liso-PAF).
(Pm = 481.7 g/mol).
- 1,2-dioctanoil-*sn*-glicerol (Dioleina). (Pm = 344.5 g/mol).
- 1-Oleoil-2-liso-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina (liso-PE). (Pm = 479.6 g/mol).
- 1-estearoil-2-araquidonoil-*sn*-glicero-3-fosfato (estearoil-araquidonoil-GP).
(Pm = 725 g/mol). Se comercializa disuelto en cloroformo a 10 mg/ml. Las diluciones posteriores se hacen como se indica a continuación.

- 1,2-dilauroil-*sn*-glicero-3-fosfato (dilauroil-GP). ($P_m = 536.7$ g/mol). Se comercializa en polvo: el ácido fosfatídico se disuelve muy mal en la mayoría de los disolventes habituales, hay que disolverlo en una mezcla de cloroformo/ácido acético (9:1) a la concentración de 25 mg/ml. Las diluciones posteriores se hacen en una mezcla de etanol y agua destilada, aumentando cada vez el agua presente en la mezcla, de forma que se reduzca el contenido en cloroformo (que interfiere en los ensayos).
- 1,2-dioleoil-*sn*-glicero-3-fosfato (dioleoil-GP). ($P_m = 701.0$ g/mol). Se disuelve igual que en el caso anterior.
- 1-oleoil-2-liso-*sn*-glicero-3-fosfato (oleoil-liso-GP). ($P_m = 436.5$ g/mol). Se disuelve igual que en el caso anterior.
- Fósforo atómico (Pi).

Boehringer Mannheim GmbH. Biochemica. Mannheim. Alemania.

- Albúmina de suero bovino (BSA).
- Ionóforo de calcio A23187 (ION A23187). ($P_m = 1068$ g/mol). Se disuelve en DMSO, de forma que la concentración final de DMSO en la reacción sea menor del 0.2 %.
- Acetil-Coenzima A. ($P_m = 827.4$ g/mol).

Pharmacia-LKB Biotechnology AB. Uppsala. Suecia.

- Líquido de centelleo Optiphase Hisafe II.
- Dextrano T-500.

ICN-FLOW. Bucks. Gran Bretaña.

- Medio de separación de linfocitos: Lymphoprep. ($d = 1.070 \text{ g/cm}^3$).
- Acido N-2-Hidroxietilpiperacina-N'-2-etanosulfónico (Hepes).
($P_m = 238.31 \text{ g/mol}$).

Molecular Probes. Eugene. (OR). U.S.A.

- Fura-2/AM. ($P_m = 1001.9 \text{ g/mol}$).

Alltech Associates, INC. Applied Science Labs. Deerfield. (IL). U.S.A.

- Placas de cromatografía en capa fina Prechannel Adsorbosil Plus 1,
de 20 cm x 20 cm.

Industrias Palex, S.A. Grupo B. Braun. Barcelona. España.

- Solución isotónica de cloruro sódico al 0.9 % (solución salina isotónica).

New England Nuclear Research Products (NEN). Wilmington. (DE). U.S.A.

- 5-[1,2-³H(N)]-hidroxitriptamina binoxalato ([³H]-Serotonina). (27.6 Ci/mmol).
- [³H]-acetil-Coenzima A. (3.3 Ci/mmol).
- Acido [5,6,8,9,11,12,14,15-³H-(N)]-araquidónico. (100 Ci/mmol).

Scharlau, S.A. Barcelona. España.

- Hidróxido sódico. (Pm = 40 g/mol).
- D-glucosa anhidra. (Pm = 180.16 g/mol).
- Metanol. (d = 0.79 g/cm³, Pm = 32.04 g/mol)
- Acido acético. (Pm = 60.05 g/mol)
- Dietil éter. (d = 0.71 g/cm³, Pm = 74.12 g/mol).
- N-hexano. (Pm = 86.18 g/mol).
- Etanol absoluto. (d = 0.79 g/cm³, Pm = 46.07 g/mol).
- Metanol para HPLC.
- N-hexano para HPLC.
- Alcohol isopropílico para HPLC. (Pm = 60.10 g/mol).

Genzyme Corporation. Boston. (MA). U.S.A.

- Factor de necrosis tumoral recombinante humano (TNF- α). Actividad específica: 2×10^7 U/mg. (Pm = 36 KDa). Las diluciones posteriores se hacen en tampón fosfato-salino 0.15 M (PBS) con 0.01 % de BSA.

Difco Laboratories. Detroit. (MI). U.S.A.

- Medio de cultivo de *Escherichia coli* (hidrolizado de tripsina de soja deshidratado).
- Bacto-gelatina (gelatina).

ICI-FARMA. Madrid. España.

- Clorhidrato de N-[2-hidroxi-3-(1-naftiloxi)-propil]-isopropilamina (propranolol). (Pm = 259.34 g/mol).

Amersham. Buckinghamshire. Gran Bretaña.

- Acido [¹⁴C]-oléico. (53.9 mCi/mmol).
- 1-O-[³H]-alquil-2-liso-*sn*-glicero-3-fosfocolina ([³H]-liso-PAF). (45.8 Ci/mmol).
- [¹⁴C]-acetil coenzima A. (54 mCi/mmol).
- 1-O-[³H]-alquil-2-acetil-*sn*-glicero-3-fosfocolina ([³H]-PAF). (90 Ci/mmol).

Calbiochem. San Diego. (CA). U.S.A.

- 1-O-hexadecil-2-acetil-*sn*-glicerol (DG-PAF). (Pm = 358.6 g/mol).

Merck. Darmstadt. Alemania.

- Heptamolibdato amónico tetrahidratado. (Pm = 1235.86 g/mol).
- Acido L(+)-ascórbico. (Pm = 176.13 g/mol).
- Acido perclórico 70-72 %. (d = 1.67 g/cm³, Pm = 100.46 g/mol).
- Azul de toluidina.
- Triton X-100. (d = 1.05 g/cm³, Pm = 646.87 g/mol).
- Dihidrogenofosfato de potasio. (Pm = 136.09 g/mol).
- Cloruro potásico. (Pm = 74.56 g/mol).
- Acetato sódico trihidratado. (Pm = 136.08 g/mol).
- Citrato trisódico dihidratado. (Pm = 294.1 g/mol).
- Glicina. (Pm = 75.07 g/mol).
- Dimetil sulfóxido (DMSO). (d = 1.1 g/cm³, Pm = 78.13 g/mol).
- Saponina.
- TRIS-(hidroximetil)-aminometano (TRIS). (Pm = 121.14 g/mol).
- Cloruro cálcico dihidratado. (Pm = 110.99 g/mol).
- Cloruro de magnesio hexahidratado. (Pm = 203.3 g/mol).
- Acido cítrico monohidratado. (Pm = 210.14 g/mol).
- Hidrogenofosfato de di-sodio dihidratado. (Pm = 177.99 g/mol).

Panreac. Montplet & Esteban, S.A. Barcelona. España.

- Bicarbonato sódico. (Pm = 84.01 g/mol).
- Acido clorhídrico 35 %. (22° Bé, d = 1.18 g/cm³, Pm = 36.47 g/mol).
- Cloruro sódico. (Pm = 58.44 g/mol).
- Triclorometano (cloroformo). (Pm = 119.38 g/mol).
- Acetona. (d = 0.79 g/cm³, Pm = 58.08 g/mol).
- Acido nítrico. (40° Bé, d = 1.38 g/cm³, Pm = 63.01 g/mol).

2. TAMPONES Y SOLUCIONES.

Tampón Hepes-salino.

- Hepes 4.74 g/l.
- Cloruro sódico 8.18 g/l.
- Cloruro potásico 0.37 g/l.
- Ajustar pH = 7.4.

Tampón Hepes-glucosa-BSA.

- Tampón Hepes-salino pH = 7.4 suplementado con 1 g/l de glucosa anhidra (5.5 mM) y 2.5 g/l de albúmina de suero bovino (0.25 %).

Colorante de leucocitos para recuento al microscopio.

Se prepara a partir de la mezcla de las soluciones siguientes: 40 ml de solución A, 11 ml de la solución B y 1 ml de la solución C.

- A: 50 mg de azul de toluidina y 850 mg de NaCl en 100 ml de agua destilada.
- B: Etanol al 95 %.
- C: Saponina saturada en etanol al 95 %.
- Filtrar la mezcla y calentar 15 minutos en baño de agua a ebullición.

Solución citrato-dextrosa (ACD).

- Citrato trisódico dihidratado 25 g/l, pH = 7.2.
- Acido cítrico 13.65 g/l.
- Glucosa anhidra 20 g/l.

Tampón Tyrode-gelatina.

- Bicarbonato sódico 1 g/l.
- Cloruro sódico 8.18 g/l.
- Cloruro potásico 0.37 g/l.
- Cloruro de magnesio 0.1 g/l.
- Glucosa anhidra 1 g/l.
- Gelatina 2.5 g/l.
- EGTA 0.2 mM.
- Guardar a -20°C en alícuotas de 100 ml, y cuando se vaya a utilizar, descongelar y ajustar pH = 6.5.

Tampón TRIS-gelatina.

- TRIS 1.21 g/l.
- Cloruro sódico 8.18 g/l.
- Cloruro cálcico 0.2 g/l.
- Cloruro potásico 0.37 g/l.
- Cloruro de magnesio 0.1 g/l.
- Gelatina 2.5 g/l.

- Guardar a -20°C en alícuotas de 50 ml, y cuando se vaya a utilizar, descongelar y ajustar $\text{pH} = 7.4$.

Triton X-100 al 1 %.

Primero se prepara una solución Triton-nítrico con 5 % de ácido nítrico y 10 % de triton X-100 en agua destilada. A continuación, se prepara la solución Triton-nítrico al 1 % en tampón Hepes-glucosa-BSA $\text{pH} = 7.4$.

Solución $\text{CaCl}_2/\text{MgCl}_2$ 0.1 M.

- Cloruro cálcico 11.099 g/l.
- Cloruro de magnesio 20.33 g/l.

Tampón citrato/fosfato.

- Acido cítrico 0.1 M.
- Hidrogenofosfato de di-sodio hidratado 0.1 M.
- Para conseguir $\text{pH} < 5$: tomar la solución de citrato y ajustar el pH con solución fosfato.
- Para conseguir $\text{pH} = 5$: mezclar las dos soluciones en proporción 1:1.
- Para conseguir $\text{pH} > 5$: tomar la solución de fosfato y ajustar el pH con solución citrato.

Tampón fosfato-salino 0.15 M (PBS).

- Cloruro sódico 8 g/l.
- Cloruro potásico 0.20 g/l.
- Hidrogenofosfato de di-sodio hidratado 1.15 g/l.
- Dihidrogeno fosfato de potasio 0.20 g/l.
- No hace falta ajustar el pH, queda a pH = 7.2.

3. METODOS EXPERIMENTALES.

3.1. Obtención de plaquetas de conejo y marcaje con [³H]-Serotonina.

Se utilizan como donantes conejos Nueva Zelanda blancos de 2.5 a 3.5 Kg de peso, que se sangran por la arteria central de la oreja. La sangre se anticoagula con solución citrato-dextrosa (ACD), en la proporción de 1 volumen de ACD por 10 volúmenes de sangre.

La sangre se diluye con 3-5 ml de solución salina isotónica, y se centrifuga 30 minutos a 150 x g y 20°C, de lo que se obtiene el plasma rico en plaquetas (PRP). Este sobrenadante se incuba con 1 μ Ci de [³H]-Serotonina por cada ml de plasma rico en plaquetas durante 30 minutos a 37°C en un baño termostático sin agitación, para proceder al marcaje de las plaquetas. Transcurrido este tiempo, las células se lavan dos veces en tampón Tyrode-gelatina pH=7.5 (centrifugación a 1000 x g y 4°C durante 15 minutos) y finalmente se resuspenden en este mismo tampón a la concentración aproximada de $3-5 \times 10^8$ plaquetas/ml.

3.2. Preparación del zimosán.

Las partículas de zimosán se hierven durante 30 minutos en solución salina isotónica. Se lavan 5 veces en el mismo medio (centrifugando 15 minutos a 1000 x g y temperatura ambiente) y se almacenan a -20°C en alícuotas de 10-20 mg/ml hasta el momento de empleo, en que se centrifugan de nuevo y se resuspenden en solución salina isotónica.

La opsonización del zimosán se realiza incubando 10-20 mg de zimosán con 1 ml de suero a 37°C en un baño termostático con agitación durante 30 minutos. Tras 5 lavados en solución salina isotónica, las partículas de zimosán opsonizado se resuspenden finalmente en 1 ml de tampón Hepes-glucosa-BSA pH = 7.4.

3.3. Cultivo de *Escherichia coli*.

La bacteria *Escherichia coli* (*E. coli*) de la cepa K-12 se siembra en placas de agar sangre y posteriormente se cultiva en condiciones estériles en un medio líquido (hidrolizado de tripsina de soja) durante una noche. Al día siguiente se hace un subcultivo, que consiste en repartir este medio con bacterias en tubos con medio nuevo haciendo una dilución 1:9, y se deja incubar 75 minutos. Las bacterias se marcan con 0.4 $\mu\text{Ci/ml}$ de ácido [^{14}C]-oléico durante 2 horas por incubación a 37°C con agitación, luego se centrifugan 30 minutos a 2400 x g y temperatura ambiente, se añade medio nuevo, y se dejan incubar otros 30 minutos, para aumentar el rendimiento del marcaje.

Después, las bacterias se lavan dos veces en el mismo medio, se resuspenden en solución salina isotónica, y se autoclavan 15 minutos a 120°C y 2.7 Kg/cm². De esta forma, se inactiva la fosfolipasa A₂ presente en las bacterias. La *E. coli* marcada radiactivamente se utiliza como sustrato en la medida de fosfolipasa A₂ en neutrófilos, por tanto, es necesario inactivar esta enzima en las bacterias, para evitar señales erróneas en el ensayo.

Una vez que tenemos las bacterias marcadas y autoclavadas, hay que medir el fósforo asociado a los fosfolípidos de la bacteria, para poder relacionar después la radiactividad con la concentración de fosfolípido.

3.4. Determinación del fósforo asociado a los fosfolípidos.

El método se fundamenta en producir la hidrólisis del fósforo contenido en los fosfolípidos con ácido perclórico (HClO₄), proceder a su medida, y a continuación, interpolar los valores obtenidos en una curva patrón realizada con concentraciones conocidas de fósforo inorgánico (Pi) (145).

La reacción se lleva a cabo en matraces Kjeldahl, en los que se añade la muestra y se evapora a sequedad en corriente de N₂. Después, se añaden 0.9 ml de ácido perclórico al 70 %, y las muestras se incuban 25 minutos a 250°C en un baño de arena. La reacción se detiene enfriando los matraces con agua corriente. Posteriormente se añaden 7 ml de H₂O destilada, 1 ml de heptamolibdato amónico al 2.5 % (p/v), 1 ml de ácido ascórbico al 10 % (p/v), se calienta la mezcla 7 minutos al baño de agua y se mide la absorbancia a 820 nm.

3.5. Obtención de leucocitos polimorfonucleares humanos.

Los neutrófilos humanos se obtienen de sangre periférica de donantes sanos, anticoagulada con una solución de EDTA 0.2 M pH=7.4 en la proporción de 1 ml de solución de EDTA para 40 ml sangre.

La sangre se deja sedimentar durante 30-45 minutos añadiendo Dextrano T-500 al 6 % (p/v) (en solución salina isotónica) en la proporción de 1.3 volúmenes de solución de Dextrano para 4.7 volúmenes de sangre. Los leucocitos y plaquetas permanecen en el sobrenadante, mientras que los hematíes tienden a sedimentar. El sobrenadante se centrifuga a 1000 x g durante 15 minutos y 20°C.

El sedimento celular resultante se resuspende en tampón Hepes-glucosa-BSA pH = 7.4, se deposita suavemente sobre Ficoll-Hipaque (Lymphoprep) (doble volumen de Ficoll que de células), y se centrifuga 30 minutos a 500 x g y 20°C. De esta manera se forma un gradiente de densidad que permite separar los PMNs de los monocitos.

El precipitado obtenido se resuspende en el tampón anterior para proceder a la lisis hiposmótica de los eritrocitos que aún persisten. Para ello, por cada ml de tampón con células se añaden 3 ml de agua destilada, y 45 segundos más tarde, se añade 1 ml de NaCl al 3,5 % para restablecer el equilibrio iónico, completando inmediatamente el volumen del tubo de 50 ml con tampón Hepes-glucosa-BSA pH=7.4. A continuación, se centrifuga 5 minutos a 150 x g y 20°C, y tras dos lavados en el mismo medio, los PMNs obtenidos se resuspenden en el mismo tampón y se procede a la determinación de la concentración por recuento microscópico en una cámara Malassez.

3.6. Estimulación de neutrófilos con distintos agonistas.

Las células obtenidas se incuban a la concentración de 5×10^6 PMNs/ml en tubos Eppendorf con 1 ml de tampón HEPES-glucosa-BSA pH = 7.4.

- **Estimulación con fMLP:** el medio de incubación se suplementa con CaCl_2 1 mM, MgCl_2 1 mM y 5 $\mu\text{g/ml}$ de citocalasina B. Los tubos se preincuban durante 5 minutos a 37°C con agitación y, posteriormente, se estimulan las células con 1 μM de fMLP durante el tiempo indicado en cada caso. La reacción se para por enfriamiento en hielo y el procesamiento posterior depende del propósito del experimento. Cuando es necesario separar células de sobrenadante para obtener homogeneizados celulares, se procede a centrifugar en una microfuga Eppendorf a 13000 rpm durante 5 minutos.

Tanto el sobrenadante como el precipitado celular se suplementan con EGTA y PMSF 1 mM, para evitar la acción de proteasas.

El precipitado celular se resuspende en tampón TRIS/HCl 0.1 M pH = 7.5, y a continuación se sonica durante 25 segundos en un sonicador de punta, modelo Branson B-12, en posición 3 para conseguir el homogeneizado celular.

- **Preincubación con distintos compuestos:** se han realizado varios experimentos preincubando las células con varias moléculas antes de la estimulación con fMLP:
 - **TNF- α :** tras la incubación de 5 minutos con citocalasina B, las células se preincuban 30 minutos con distintas concentraciones de TNF- α (entre 10 y 1000 U/ml), antes de añadir el fMLP.

- . Propanolol: Las células se preincuban 5 minutos con distintas concentraciones de propanolol. Una vez transcurrido este tiempo, las células se estimulan con citocalasina B y fMLP como se ha indicado anteriormente.

- . Diglicéridos: Se utilizan dioleína y DG-PAF a distintas concentraciones, y se añaden en el mismo momento que la citocalasina B. Posteriormente se estimulan las células con fMLP.

- . Acido fosfatídico: se utilizan varias especies de ácido fosfatídico, como 1-estearoil-2-araquidonoil-GP, 1,2-dilauroil-GP, 1,2-dioleoil-GP y 1-oleoil-2-liso-GP, que se añaden al mismo tiempo que la citocalasina B en distintas concentraciones. Posteriormente, las células se estimulan con fMLP.

- **Estimulación con partículas de zimosán opsonizado**: al medio de incubación se añade CaCl_2 y MgCl_2 1 mM y 2 mg/ml de zimosán opsonizado, y se incuba el tiempo indicado en cada caso. La reacción se para como se describe en la estimulación con fMLP.

- **Estimulación con ionóforo de calcio A23187**: Estos experimentos han tenido la particularidad de haberse realizado en células previamente marcadas con ácido araquidónico. Al medio de incubación se añade CaCl_2 y MgCl_2 1 mM y ionóforo A23187 10 μM , y se incuba durante el tiempo indicado a 37°C con agitación. La reacción se para como se describe en la estimulación con fMLP.

3.7. Medida de la actividad acetil-CoA:liso-PAF acetiltransferasa.

La actividad 1-O-alkil-2-liso-*sn*-glicero-3-fosfolina: acetil-CoA acetiltransferasa (EC 2.3.1.67) se mide según el método descrito por Wykle y col. (146).

El homogeneizado de 5×10^6 PMNs/ml se incuba 15 minutos a 37°C con agitación en un 1 ml de tampón TRIS/HCl 0.1 M pH=7.5, en presencia de 20 μM de liso-PAF en 10 μl de etanol, 0.5 μCi de [^3H]-acetil-CoA y 100 μM de acetil-CoA no marcado. La reacción se detiene por la adición de 3.7 ml de metanol/cloroformo/ácido acético (49:25:1 v/v), para la extracción de los lípidos por el método de Bligh & Dyer (147). La fase clorofórmica obtenida se evapora a sequedad en corriente de N_2 , se resuspende en cloroformo/metanol (9:1 v/v) y se separa el [^3H]-PAF formado por cromatografía en capa fina (TLC) utilizando el sistema cloroformo/metanol/ácido acético/agua (50:25:8:6 v/v). Las áreas de las placas coincidentes con el R_f de un estándar del PAF sintético se raspan y se cuantifica la radiactividad por contaje en un contador beta LS 2800, de Beckman.

Los datos se expresan en pmoles/min. 5×10^6 PMNs, o bien en % de la actividad acetiltransferasa control cuando se testan moléculas con acción inhibitoria.

Cuando se quiere determinar si algunos compuestos tienen un efecto directo sobre la actividad acetiltransferasa, éstos se añaden al medio de reacción, de forma que se prueban directamente estas sustancias sobre el homogeneizado celular.

3.8. Cuantificación del PAF por bioensayo en plaquetas de conejo.

El procedimiento se ha aplicado a la cuantificación del PAF en sobrenadante, homogeneizado celular y en células totales (homogeneizado celular más el sobrenadante). De todas estas fracciones se obtiene el extracto lipídico por el método de Bligh & Dyer, se evapora a sequedad en corriente de N₂ y se resuspende en el medio utilizado como fase móvil de HPLC, para purificar la muestra antes de realizar el bioensayo.

La separación del PAF de los otros lípidos extraídos se realiza por HPLC en una columna de sílice Spheri-5 utilizando como fase móvil: medio A [96 % isopropanol/hexano 1:1 (v/v) suplementado con un 0.005 % de ácido acético] y medio B [4 % agua bidestilada] que se va aumentando hasta un 8 % en un período de 15 minutos (148). La columna se eluye durante 60 minutos a 2 ml/min, y las fracciones de 2 ml se recogen, se evaporan a sequedad y se resuspenden en 100 µl de tampón Hepes-glucosa-BSA, pH = 7.4 para proceder al bioensayo en plaquetas de conejo marcadas con [³H]-Serotonina, según el procedimiento descrito por Henson y col. (149).

La reacción se lleva a cabo en tubos de plástico con 400 µl de tampón TRIS-gelatina, suplementados con 5 µM de indometacina (de esta forma se inhibe la actividad cicloxigenasa que conduce a la formación de tromboxano A₂, que podría interferir en el ensayo), a los que se añaden 100 µl de las muestras a medir. La reacción se incuba 10 minutos a 37°C sin agitación y se detiene por centrifugación durante 15 minutos a 1000 x g y 4°C. A continuación se mide en un contador beta la cantidad de [³H]-Serotonina presente en 200 µl de sobrenadante.

En cada experimento, es necesario hacer una curva patrón con concentraciones conocidas de una solución de PAF sintético (donde luego se interpolarán los valores obtenidos en las distintas muestras). También se incluyen muestras suplementadas con 10 μ l de Triton X-100 al 1 %, para lisar las células y poder conocer el total de [3 H]-Serotonina incorporada en las plaquetas.

Una vez interpolados los datos en la curva patrón, éstos se dan como ng equivalentes de PAF/ 5×10^6 PMNs.

3.9. Medida de liberación de β -glucuronidasa.

Se mide utilizando ácido fenolftalein- β -glucurónico como sustrato, el cual es hidrolizado por la β -glucuronidasa presente en la muestra dando lugar a fenolftaleína, que se detecta por la medida de absorbancia a 540 nm.

La reacción se lleva a cabo en un medio con 200 μ l de acetato sódico 0.1 M pH = 4.0; 250 μ l de la muestra a medir (en este caso sobrenadante de PMNs) y 50 μ l de una solución 10 mM de ácido fenolftalein- β -glucurónico. La reacción se incuba 2 horas a 37°C con agitación en ausencia de luz, y se detiene por la adición de 1.5 ml de glicina 0.4 M pH = 10.7. Tras una breve agitación, se lee la absorción de la mezcla resultante a 540 nm en un espectrofotómetro U-2000, de Hitachi.

En cada experimento es necesario incluir un blanco (tampón en el que se encuentra la muestra a medir) para hacer el autocero en el aparato, y un tubo en el que se han lisado las células por sonicación, lo que representa el 100 % del contenido celular de β -glucuronidasa. De esta forma se puede expresar la liberación en porcentaje de la actividad enzimática total contenida en la célula.

3.10. Medida de fosfolipasa A₂.

La reacción se lleva a cabo en el homogeneizado celular y en el sobrenadante de PMNs estimulados tanto con citocalasina B y fMLP, como con partículas de zimosán opsonizado.

El ensayo consiste en la incubación de la muestra a medir con la bacteria *Escherichia coli* (*E. coli*) marcada con ácido [¹⁴C]-oléico autoclavada, que contiene de 12-24 nmol de fosfolípido. Así, la fosfolipasa A₂ presente en la muestra, hidroliza los fosfolípidos de la membrana de la bacteria, con lo que se produce la liberación de [¹⁴C]-oleato al sobrenadante, mientras que las bacterias marcadas radiactivamente quedan en el precipitado.

El medio de reacción contiene tampón TRIS/HCl 0.1 M, pH = 7.5, 1 mg/ml de BSA delipidada y 1 mM de CaCl₂ en un volumen final de 0.1 ml. La reacción se incuba 30 minutos a 37°C con agitación y se para por la adición de 40 µl de HCl 2 N frío y 20 µl de una solución 100 mg/ml de BSA delipidada, seguido de centrifugación en una microfuga Eppendorf a 13000 rpm durante 5 minutos.

La radiactividad presente en el sobrenadante se cuantifica en un contador beta, y se expresa como pmol/min.5x10⁶ PMNs.

Cuando se desea estudiar la dependencia de calcio de la reacción, la concentración final de calcio se varía utilizando tampón Ca²⁺/EGTA, de manera que la concentración real de calcio se calcula por la constante de asociación del complejo Ca²⁺-EGTA.

Para medir esta actividad enzimática a distintos pH se utilizan dos tipos de tampones diferentes:

- Tampón citrato/fosfato 0.1 M entre pH = 4.5-7.0.
- Tampón TRIS/HCl 0.1 M entre pH = 7.5-9.0.

3.11. Marcaje de PMNs con ácido [³H]-araquidónico.

Los leucocitos polimorfonucleares se resuspenden a la concentración de 20×10^6 PMNs/ml en tampón HEPES-salino pH = 7.4 suplementado con 0.28 % de BSA delipidada, que contiene 1 μ Ci/ml de ácido [³H]-araquidónico (evaporado a sequedad en corriente de N₂ y resuspendido en el medio anterior). Las células se incuban 1 hora a 37°C con agitación, y la reacción se detiene por centrifugación a 1000 x g durante 15 minutos y 4°C. A continuación, las células se lavan dos veces en el mismo tampón y finalmente se resuspenden en tampón HEPES-glucosa-BSA pH = 7.4, para proceder a su estimulación con distintos agonistas.

3.12. Medida de la liberación de ácido araquidónico.

A las células marcadas con ácido [³H]araquidónico y estimuladas con distintos agonistas se añaden 3.7 ml de metanol/cloroformo/ácido acético (49:25:1 v/v) y 10 μ g de ácido araquidónico no marcado como standard interno, para la extracción de los lípidos según el método de Bligh & Dyer. La fase clorofórmica obtenida, se evapora a sequedad en corriente de N₂, se resuspende en cloroformo/metanol (9:1 v/v) y se separa el ácido [³H]-araquidónico liberado por cromatografía en capa fina (TLC) utilizando el sistema hexano/éter etílico/ácido acético (80:20:1 v/v). Se raspan las áreas de las placas correspondientes a [³H]-PC y ácido [³H]-araquidónico, y se cuantifica la radiactividad por conteo en un contador beta.

Los resultados se expresan en % dpm de las especies de PC y AA respecto al 100 % de dpm totales.

3.13. Medida del flujo de calcio.

Los neutrófilos se cargan con fura-2 por incubación con 2-4 μM de fura-2/AM durante 30 minutos a temperatura ambiente, como se describe en la referencia 94. Las células se lavan dos veces y se resuspenden en la proporción de un citocrito de 0.5-1 % en medio estándar. La concentración de calcio intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) se mide a 37°C bajo agitación magnética en un fluorímetro de Cairn Research Ltd. (Newnham, Sittingbourne, Kent, U.K.), que permite la detección simultánea a dos longitudes de onda de excitación a 340 y 380 nm. La longitud de onda de emisión se fija a 530 nm.

Las lecturas de fluorescencia se integran a intervalos de 1 segundo, y la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ se calcula por la razón entre la fluorescencia a 340 y 380 nm (150).

3.14. Marcaje de neutrófilos con [^3H]-liso-PAF.

Los neutrófilos recién obtenidos se procesan como en el caso del marcaje con [^3H]-araquidonato, excepto que se utiliza 1 $\mu\text{Ci/ml}$ de 1-O- ^3H -alquil-2-liso-*sn*-glicero-3-fosfocolina ([^3H]-liso-PAF) para 20×10^6 PMNs/ml. La incubación se mantiene 1 hora a 37°C con agitación. Pasado este tiempo se detiene por centrifugación a 1000 x g durante 15 minutos y 4°C.

A continuación las células se lavan dos veces en el mismo tampón y al final se resuspenden en tampón Hepes-glucosa-BSA, pH=7.4 para proceder a la estimulación de los neutrófilos con fMLP.

3.15. Medida de la formación de diglicérido y ácido fosfatídico.

Cuando se quiere ver el efecto del propanolol sobre los niveles de diglicérido y ácido fosfatídico de las células, se procede como anteriormente, pero se parte de neutrófilos marcados con [³H]-liso-PAF y procesados como anteriormente se describe, excepto que se utilizan como standard internos dilauroil-GP y DG-PAF.

El sistema utilizado para separar por TLC diglicérido de ácidos grasos libres es cloroformo/metanol/acetona/ácido acético/agua (50:15:15:10:5 v/v). La separación de diglicérido de ácido fosfatídico se realiza en el sistema hexano/dietil éter/ácido acético (60:40:1 v/v).

A continuación, se raspan las áreas de las placas correspondientes a [³H]-PA y [³H]-DG y se cuantifican ambas especies por contaje de la radiactividad en un contador beta.

Los datos se expresan en % de dpm de las especies de PA y DG respecto al 100 % de dpm totales.

3.16. Medida de la desacilación de [³H]-alquil-GPC.

Las células se marcan previamente con 1-O-[³H]-alquil-2-liso-*sn*-glicero-3-fosfocolina ([³H]-liso-PAF), que se incorpora con una eficiencia muy alta en [³H]-PC. A continuación, los neutrófilos marcados se estimulan con citocalasina B y fMLP o se dejan en reposo, se centrifugan y se resuspenden en tampón TRIS/HCl 0.1 M pH = 7.5 suplementado con EGTA 2 mM.

La reacción de desacilación se realiza en el medio anterior con el homogeneizado correspondiente a 5×10^6 PMNs/ml, al que se añade liso-PAF o liso-PE 20 μ M y 100 μ M de acetil-CoA. Tras una incubación de 15 minutos a 37°C, la reacción se detiene por la adición de 3.7 ml de metanol/cloroformo/ácido acético (49:25:1 v/v) y se separan por TLC [³H]-liso-PAF, [³H]-PAF y [³H]-PC en el sistema cloroformo/metanol/ácido acético/agua (50:25:8:6 v/v).

Los datos se expresan como % de dpm de cada especie referidos al número total de dpm (100 %).

3.17. Medida de la incorporación de [¹⁴C]-acetil-CoA.

Las células se marcan previamente con 1-O-[³H]-alquil-2-liso-*sn*-glicero-3-fosfocolina ([³H]-liso-PAF). A continuación se estimulan con citocalasina B y fMLP durante 5 minutos a 37°C, o se dejan en reposo. El homogeneizado celular correspondiente a 5×10^6 PMNs/ml se incuba en 1 ml de tampón Hepes-glucosa-BSA pH = 7.4 con 100 μ M de acetil-CoA, 0.2 μ Ci de [¹⁴C]-acetil-CoA y 20 μ M de liso-PAF durante 10 minutos a 37°C con agitación.

La reacción se detiene y se procesa como en el método anterior.

Los datos se expresan como % de dpm de cada especie referidos al número total de dpm (100 %).

3.18. Actividad transacilasa CoA-independiente.

La medida se realiza según el método descrito por Venable y col. (151). El homogeneizado de 5×10^6 PMNs/ml (tanto estimulados con citocalasina B y fMLP como en reposo) se incuba 15 minutos a 37°C con agitación en un 1 ml de tampón TRIS/HCl 0.1 M, pH = 7.5 suplementado con 2 mM de EGTA, en presencia de 20 μ M de liso-PAF o de liso-PE, y 0.2 μ Ci de [³H]-liso-PAF. La reacción se detiene y se separan el [³H]-liso-PAF que no ha reaccionado de la [³H]-PC formada.

Los datos se expresan como % de dpm de cada especie referidos al número total de dpm (100 %).

3.19. Desacilación de 1-radil-2-[³H]-araquidonoil-GPC.

Los neutrófilos marcados con ácido [³H]-araquidónico ([³H]-AA) se estimulan en las condiciones usuales o se dejan en reposo, y se resuspenden en tampón TRIS/HCl 0.1 M pH = 7.5 suplementado con EGTA 2 mM.

La reacción de desacilación se realiza en el tampón anterior con el homogeneizado correspondiente a 5×10^6 PMNs/ml, al que se añade liso-PAF o liso-PE $20 \mu\text{M}$. Los tubos se incuban 15 minutos a 37°C con agitación, y la reacción se detiene por la adición de 3.7 ml de metanol/cloroformo/ácido acético (49:25:1 v/v). La separación de la [^3H]-PC que no ha reaccionado del ácido [^3H]-araquidónico liberado se realiza por TLC en el sistema hexano/dietil éter/ácido acético (80:20:1 v/v).

Los datos se expresan como % de dpm de cada especie referidos al número total de dpm (100 %).

3.20. Análisis estadístico.

Los resultados se expresan como la media y el error estándar (media \pm SEM) o como experimento representativo.

Para el análisis de la significación, las poblaciones se comparan utilizando el test no pareado de Wilcoxon. Se considera que una medida es significativa cuando $p < 0.05$.

IV. RESULTADOS

1. EFECTO DE LA ESTIMULACION DE LOS NEUTROFILOS CON fMLP.

Varios estudios anteriores han permitido establecer que la estimulación de leucocitos polimorfonucleares humanos con distintos agonistas produce la síntesis del PAF. Sin embargo, existen escasas referencias en cuanto al papel de los péptidos formilados como N-formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLP), que son metabolitos bacterianos con intensa capacidad para estimular a los leucocitos y constituyen el ejemplo más fisiológico de secretagogo en estas células. En el grupo de experimentos que se describen a continuación se detalla el efecto del fMLP sobre los siguientes parámetros:

- Actividad acetil-CoA:liso-PAF acetiltransferasa.
- Producción y liberación del PAF.
- Liberación de β -glucuronidasa, como marcador de la secreción del contenido granular.
- Actividad fosfolipasa A₂.
- Liberación de ácido araquidónico.

1.1. Activación dosis-dependiente de la acetil-CoA:liso-PAF acetiltransferasa por fMLP.

Los neutrófilos se estimulan en presencia de citocalasina B y calcio extracelular, con concentraciones variables de fMLP durante 10 minutos. Como se observa en la figura nº 5, el fMLP es capaz de activar esta enzima en forma dosis-dependiente.

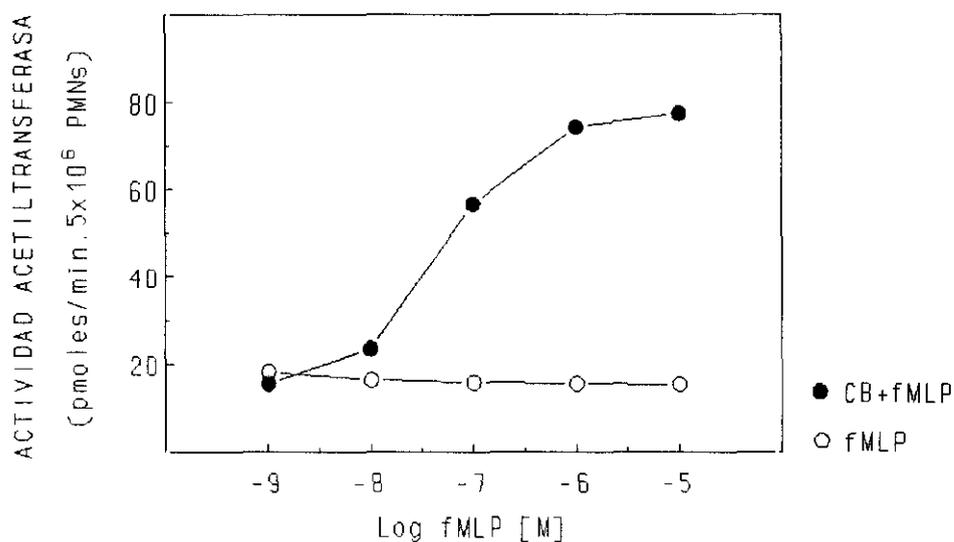


FIGURA 5: Efecto de la concentración de fMLP en la actividad acetil-CoA:liso-PAF acetiltransferasa en PMNs. Se preincubaban 5×10^6 PMNs en 1 ml de tampón Hepes-glucosa-BSA pH=7.4 con $5 \mu\text{g/ml}$ de citocalasina B en presencia de calcio 1 mM durante 5 minutos a 37°C con agitación. Al final de este período, se añaden distintas concentraciones de fMLP, y se incuba durante 10 minutos. A continuación, se mide la actividad acetiltransferasa en el homogeneizado celular. Círculos blancos: células estimuladas con fMLP en ausencia de citocalasina B. Círculos negros: células estimuladas con fMLP y citocalasina B. Actividad acetiltransferasa en el control: $16.3 \text{ pmoles/min.} 5 \times 10^6 \text{ PMNs}$. Experimento representativo de otros cuatro hechos por duplicado.

Esta activación se observa con concentraciones de fMLP de $0.01 \mu\text{M}$ ($23.5 \text{ pmoles/min.} 5 \times 10^6 \text{ PMNs}$, frente a $16.3 \text{ pmoles/min.} 5 \times 10^6 \text{ PMNs}$ del control), aunque la máxima activación se alcanza con una concentración de fMLP de $1 \mu\text{M}$ ($74.3 \text{ pmoles/min.} 5 \times 10^6 \text{ PMNs}$).

La presencia de citocalasina B en el medio de reacción es un requerimiento absoluto para que se produzca la activación de la acetiltransferasa, ya que no se observa ninguna diferencia entre las células en reposo (16.3 pmoles/min. 5×10^6 PMNs) y las estimuladas sólo con fMLP 10^{-6} M (15.5 pmoles/min. 5×10^6 PMNs), ni con las células incubadas sólo con citocalasina B.

1.2. Producción del PAF en respuesta al fMLP.

Puesto que el fMLP es capaz de producir el paso de la forma de baja actividad de la acetiltransferasa a la de alta actividad, se realizó paralelamente el estudio de la síntesis del PAF.

La producción total del PAF en PMNs estimulados con fMLP es también dosis-dependiente, comenzándose a detectar al estimular con una concentración de fMLP de $0.1 \mu\text{M}$ (0.41 ng equivalentes de PAF/ 5×10^6 PMNs, frente a 0.07 ng equivalentes de PAF/ 5×10^6 PMNs del control), y alcanzándose el máximo de producción con una concentración de fMLP más alta que en el apartado anterior: $10 \mu\text{M}$ (1.64 ng equivalentes de PAF/ 5×10^6 PMNs) (figura nº 6).

La cantidad total del PAF producido en respuesta al fMLP es comparable a la obtenida con otros agonistas, como ionóforo A23187, que no actúa por unión a un receptor, y zimosán opsonizado, que es un estímulo fagocitable.

Al igual que se observó con la activación de la acetiltransferasa, el fMLP sólo induce producción del PAF en presencia de citocalasina B (0.17 ng equivalentes de PAF/ 5×10^6 PMNs en células estimuladas sólo con fMLP 10^{-6} M frente a 0.07 ng equivalentes de PAF/ 5×10^6 PMNs del control).

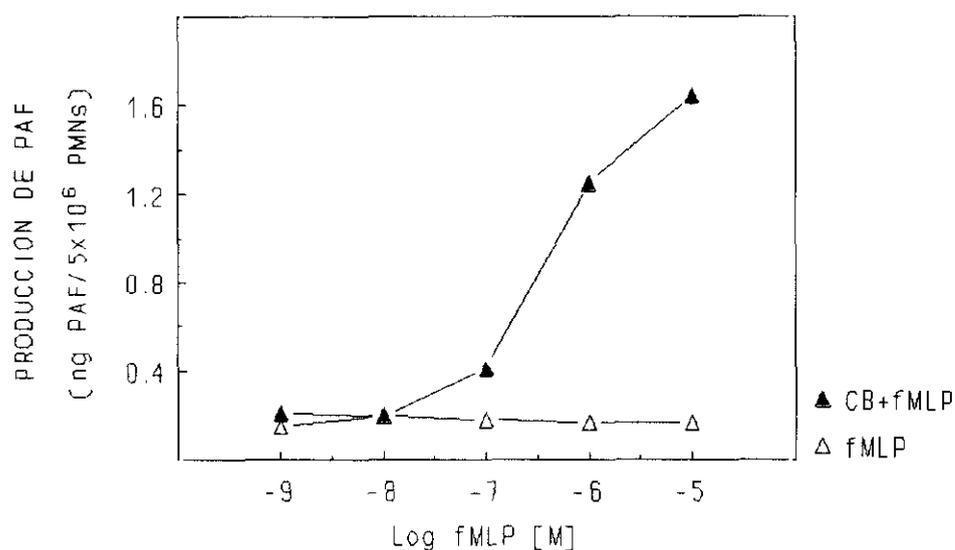


FIGURA 6: Efecto de la concentración de fMLP en la producción total de PAF en PMNs. Se preincubaron 5×10^6 PMNs en 1 ml de tampón HEPES-glucosa-BSA pH=7.4 con $5 \mu\text{g/ml}$ de citocalasina B y calcio 1 mM durante 5 minutos, a 37°C con agitación. A continuación, se añaden distintas concentraciones de fMLP, que se incubó durante 10 minutos. Una vez parada la reacción, los lípidos se extraen por el método de Bligh & Dyer, se purifica el PAF por HPLC, y se mide por bioensayo en plaquetas. Triángulos blancos: células estimuladas con fMLP en ausencia de citocalasina B. Triángulos negros: células estimuladas con fMLP y citocalasina B. PAF total producido por el control: 0.07 ng equivalentes de PAF/ 5×10^6 PMNs. Experimento representativo de otros tres hechos por duplicado.

1.3. Cinética de la activación de la acetiltransferasa y de la síntesis del PAF.

El perfil de la actividad acetiltransferasa y la producción total del PAF a lo largo del período de estimulación se muestra en la figura nº 7.

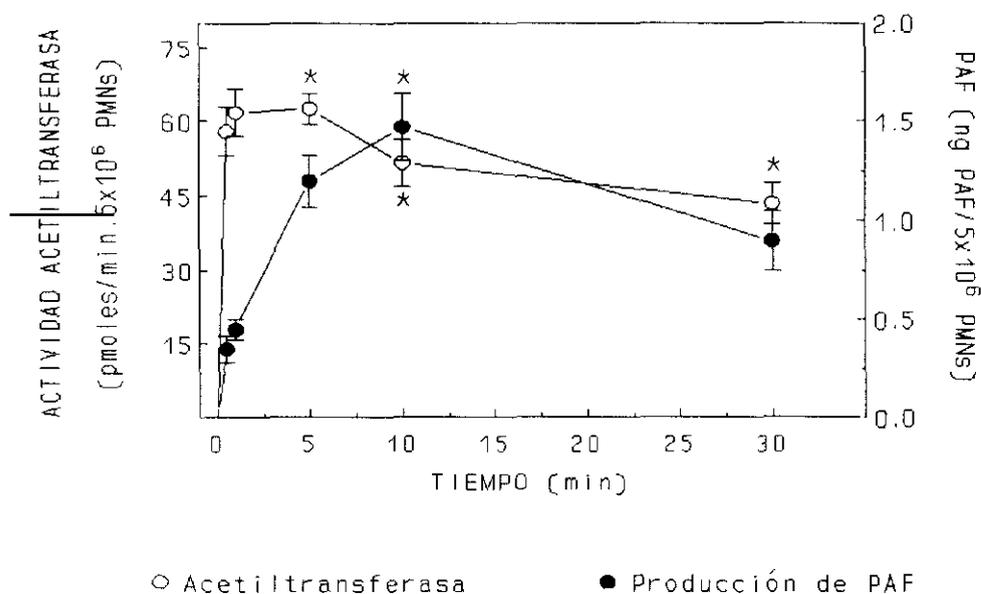


FIGURA 7: Actividad acetiltransferasa y producción total de PAF en PMNs estimulados con fMLP: estudio cinético. Las células (5×10^6 PMNs/ml) se estimulan durante 5 minutos con $5 \mu\text{g/ml}$ de citocalasina B y calcio 1 mM , y a continuación, se incuban con fMLP $1 \mu\text{M}$ a distintos tiempos. Círculos blancos: actividad acetyl-CoA:liso-PAF acetiltransferasa. Círculos negros: producción total de PAF. Actividad acetiltransferasa del control a 10 minutos: 12.5 ± 1.6 pmoles/min. 5×10^6 PMNs. Producción total de PAF por el control a 10 minutos: 0.09 ± 0.02 ng equivalentes de PAF/ 5×10^6 PMNs. Los resultados se expresan como la media \pm SEM de 4 experimentos hechos por duplicado. Significación: * = $p < 0.05$.

La activación de la acetiltransferasa es muy temprana, pues se llega muy cerca del máximo de activación a los 30 segundos (58.0 ± 5.0 pmoles/min. 5×10^6 PMNs en células estimuladas con CB + fMLP, frente al control de 10.2 ± 2.2 pmoles/min. 5×10^6 PMNs), aunque sigue aumentando hasta los 5 minutos (62.5 ± 3.2 pmoles/min. 5×10^6 PMNs, frente al control de 11.8 ± 2.7 pmoles/min. 5×10^6 PMNs -muy significativo-).

La activación se mantiene hasta los 10 minutos (51.6 ± 4.6 pmoles/min. 5×10^6 PMNs -extremadamente significativo-), y a partir de entonces, comienza a decaer lentamente, ya que a los 30 minutos de incubación con el agonista se mantiene todavía el 70 % del valor máximo.

La producción total del PAF sigue una cinética más lenta: la máxima producción se alcanza a los 10 minutos de incubación (1.47 ± 0.27 ng equivalentes de PAF/ 5×10^6 PMNs en células estimuladas con CB + fMLP, frente a 0.09 ± 0.02 ng equivalentes de PAF/ 5×10^6 PMNs del control -extremadamente significativo-), indicando que la acumulación de una cantidad detectable del mediador requiere un período de tiempo, después de la activación de la acetiltransferasa. La producción del PAF disminuye a partir de los 10 minutos de estimulación, de forma que a 30 minutos, el PAF detectado es el 60 % del máximo (0.90 ± 0.15 ng equivalentes de PAF/ 5×10^6 PMNs, frente a 0.10 ± 0.03 ng equivalentes de PAF/ 5×10^6 PMNs del control a 30 minutos).

1.4. Actividad acetiltransferasa y producción total del PAF. Variabilidad de la medida.

Se observa una gran variabilidad en ambos parámetros al utilizar células de distintos donantes, aunque éstos sean individuos sanos de características similares:

- A los 10 minutos de incubación, el valor de la actividad acetiltransferasa en células en reposo varía entre 4.3 y 30.2 pmoles/min. 5×10^6 PMNs, mientras que en células estimuladas con citocalasina B y fMLP $1 \mu\text{M}$, la actividad varía entre 13.9 y 209.8 pmoles/min. 5×10^6 PMNs.

- A los 10 minutos de incubación, el control de la producción total del PAF varía entre 0.01 y 0.18 ng equivalentes de PAF/5x10⁶ PMNs, mientras que en células estimuladas con citocalasina B y fMLP 1 μ M, la producción total del PAF varía entre 0.14 y 3.08 ng equivalentes de PAF/5x10⁶ PMNs.

Hay diferencias significativas de estas medidas entre varios donantes, e incluso en el mismo donante en estudios realizados en distintos días. Esta variación afecta más a la magnitud detectada que a su variación a lo largo del tiempo. La razón de estas variaciones es desconocida, y no parece depender de la técnica de aislamiento o de las condiciones de estimulación de las células.

1.5. Distribución del PAF producido en la estimulación.

Hemos señalado en la Introducción que la retención intracelular del PAF sintetizado por las células es un fenómeno compartido por muchos tipos celulares y que se observa con distintos tipos de agonistas, por lo que decidimos analizar su distribución en respuesta al fMLP.

En todas las concentraciones de fMLP probadas (Figura nº 8), siempre es mayor la cantidad del PAF retenida en la célula que la liberada al medio de incubación. Así el porcentaje del PAF retenido en las células es del 80.5, 62.4, y 55.5% al estimular con fMLP 10⁻⁷, 10⁻⁶, y 10⁻⁵ M respectivamente. Sin embargo, el fMLP es un estímulo más eficiente que otros agonistas para producir la liberación del PAF al medio extracelular. También se observa que a medida que se aumenta la concentración de fMLP se aumenta el PAF liberado, llegando a ser el 45 % del PAF total sintetizado al estimular con fMLP 10 μ M.

En células en reposo, no se detecta PAF ni en el sobrenadante ni en el precipitado (PAF detectado en el control: 0.07 ng equivalentes de PAF/ 5×10^6 PMNs), y además la citocalasina B no afecta al reparto del PAF entre las células y el medio de incubación. Como en los casos anteriores, es necesaria la presencia de citocalasina B para que se produzca tanto la síntesis como la liberación del mediador al medio externo.

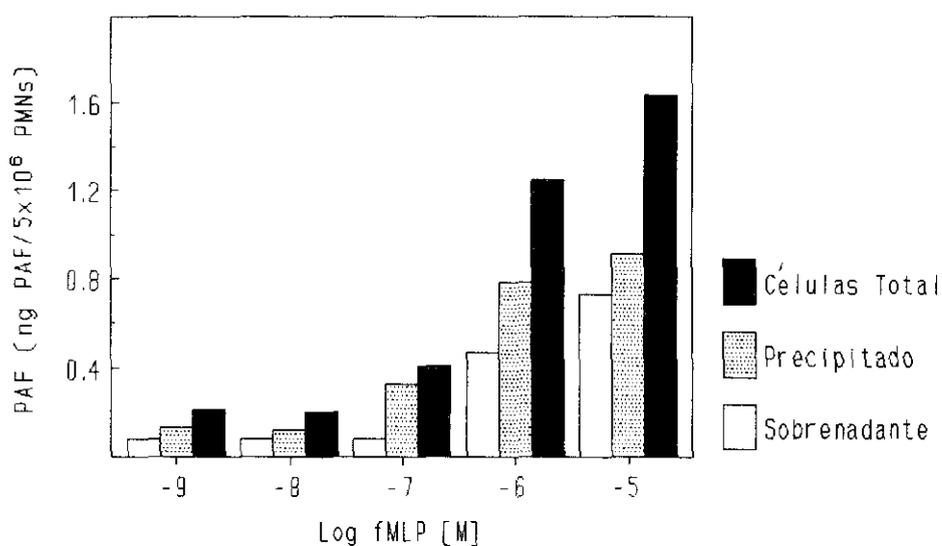


FIGURA 8: *Distribución del PAF sintetizado por los PMNs en respuesta a distintas concentraciones de fMLP.* Las células (5×10^6 PMNs) se estimulan en 1 ml de tampón Hepes-glucosa-BSA pH=7.4 con distintas concentraciones de fMLP, en presencia de 5 μ g/ml de citocalasina B (5 minutos de preincubación) y calcio 1 mM durante 10 minutos. En el sobrenadante se mide el PAF liberado (barras blancas: sobrenadante), y en el precipitado, el PAF que queda retenido en la célula (barras punteadas: precipitado). La producción total de PAF se da como suma del PAF detectado en ambas fracciones (barras negras: células total). PAF producido por el control en células totales: 0.07 ng equivalentes de PAF/ 5×10^6 PMNs. Experimento representativo de otros tres hechos por duplicado.

En la figura nº 9 se estudia la distribución del PAF sintetizado por los neutrófilos estimulados con fMLP en función del tiempo: la liberación del PAF al medio extracelular es máxima a los 5 minutos de incubación (0.90 ± 0.11 ng equivalentes de PAF/ 5×10^6 PMNs, frente a 0.18 ± 0.02 ng equivalentes de PAF/ 5×10^6 PMNs del control).

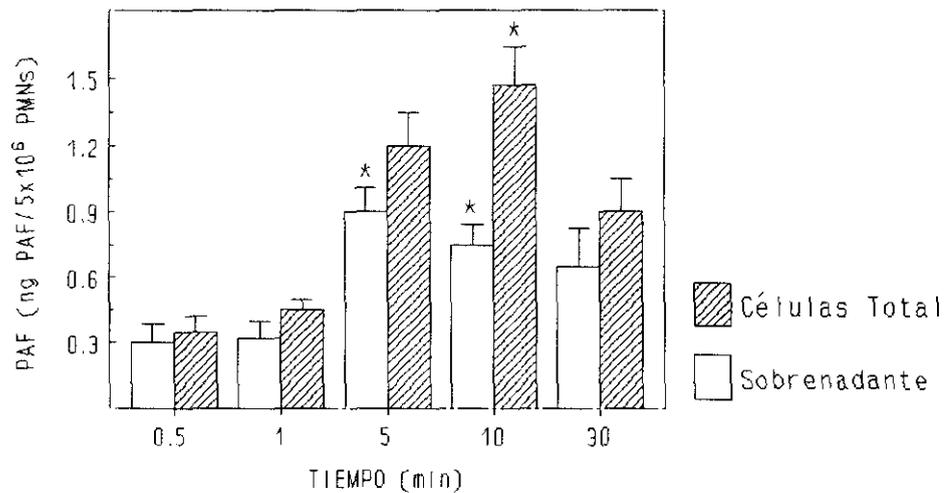


FIGURA 9: Variación de la distribución del PAF sintetizado por los PMNs en función del tiempo. Las células (5×10^6 PMNs) se estimulan en 1 ml de tampón HEPES-glucosa-BSA pH=7.4 con $1 \mu\text{M}$ de fMLP a distintos tiempos, en presencia de $5 \mu\text{g/ml}$ de citocalasina B (5 minutos de preincubación) y calcio 1 mM. Se mide liberación de PAF al sobrenadante (barras blancas) y producción total de PAF (barras diagonales: células total). PAF detectado en el control: 0.09 ± 0.02 ng equivalentes de PAF/ 5×10^6 PMNs en células totales y 0.12 ± 0.01 ng equivalentes de PAF/ 5×10^6 PMNs en sobrenadante. Los resultados se expresan como la media \pm SEM de 4 experimentos hechos por duplicado. Significación: * = $p < 0.05$.

Después, empieza a disminuir, aunque de forma bastante lenta: a los 5 minutos de incubación se libera el 75 % del PAF sintetizado, mientras que a los 10 minutos se libera el 51 %.

También se observa que la máxima liberación del PAF (5 minutos) precede al máximo de producción total (10 minutos). Esto podría significar que aunque en los primeros minutos de estimulación el neutrófilo esté sintetizando pequeñas cantidades del PAF, la mayoría se libera al medio extracelular, para que el mediador pueda ejercer su función. También podría indicar que el mecanismo de liberación del PAF es saturable, de forma que se libera menos PAF cuanto más se produce. Así se evitaría el acúmulo de grandes cantidades del PAF que pudieran producir efectos fisiológicos indeseables.

1.6. Liberación de β -glucuronidasa por fMLP.

La secreción de enzimas lisosomales por el neutrófilo juega un papel fundamental tanto en la digestión de los microorganismos fagocitados como en el daño tisular que se produce en la inflamación. Hemos medido la liberación de β -glucuronidasa como medida de la liberación de enzimas lisosomales de los PMNs en respuesta a la estimulación con FMLP.

Como se observa en la figura nº 10, al estimular los neutrófilos con citocalasina B y distintas concentraciones de fMLP se produce la liberación de β -glucuronidasa al medio extracelular, a concentraciones tan bajas de fMLP como 10^{-8} M (9.50 ± 1.48 % en células estimuladas, frente a 4.72 ± 1.47 % del control), y se alcanza el máximo de liberación con una concentración de fMLP de 10^{-5} M (39.48 ± 3.35 %).

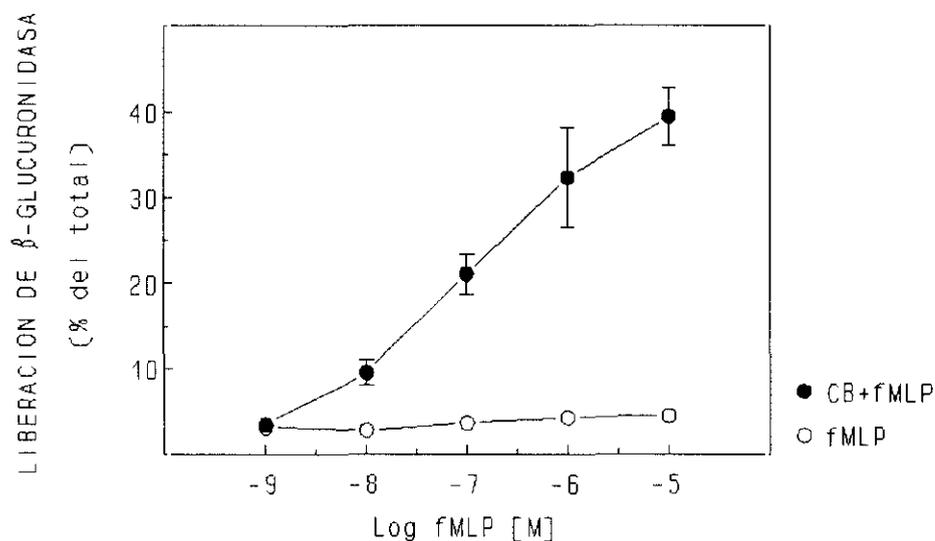


FIGURA 10: Efecto de la concentración de fMLP en la liberación de β-glucuronidasa por los neutrófilos. Las células (5×10^6 PMNs/ml) se estimulan con distintas concentraciones de fMLP y $5 \mu\text{g/ml}$ de citocalasina B (5 minutos de preincubación) durante 10 minutos, en presencia de calcio 1 mM . Una vez parada la reacción se mide la β-glucuronidasa en el sobrenadante. Círculos blancos: células estimuladas con fMLP en ausencia de citocalasina B. Círculos negros: células estimuladas con fMLP y citocalasina B. β-Glucuronidasa liberada por el control: $4.72 \pm 1.47 \%$. Los datos representan la media \pm SEM de tres experimentos hechos por duplicado.

La liberación de β-glucuronidasa requiere también citocalasina B, ya que en su ausencia no hay diferencias entre los PMNs en reposo ($4.72 \pm 1.47 \%$) y los estimulados sólo con fMLP ($4.20 \pm 0.45 \%$ en células estimuladas con fMLP 10^{-6} M).

En la figura nº 11 se estudia la liberación de β-glucuronidasa en función del tiempo en PMNs estimulados con fMLP $1 \mu\text{M}$.

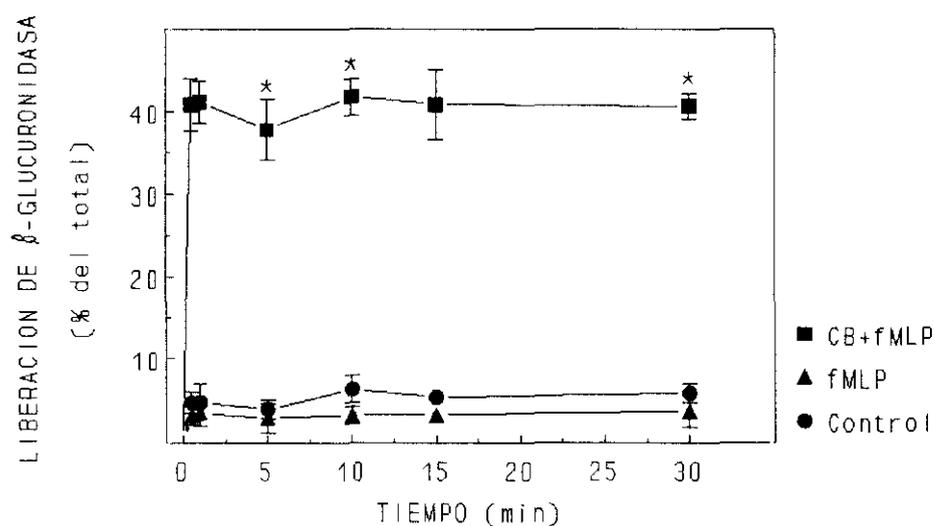


FIGURA 11: Variación de la liberación de β -glucuronidasa en PMNs en función del tiempo. Las células (5×10^6 PMNs) se estimulan en 1 ml de tampón Hepes-glucosa-BSA pH = 7.4 con $1 \mu\text{M}$ de fMLP en presencia de $5 \mu\text{g/ml}$ de citocalasina B (5 minutos de preincubación) y calcio 1 mM a distintos tiempos. Círculos: células control. Triángulos: células estimuladas con $1 \mu\text{M}$ de fMLP en ausencia de citocalasina B. Cuadrados: células estimuladas con $1 \mu\text{M}$ de fMLP y citocalasina B. β -Glucuronidasa liberada por el control a 10 minutos de incubación: 6.37 ± 1.61 %. Los resultados se expresan como la media \pm SEM de cinco experimentos hechos por duplicado. Significación: * = $p < 0.05$.

La liberación es muy precoz, pues se alcanza el máximo a los 30 segundos de incubación (40.87 ± 4.02 % en células estimuladas con CB + fMLP, frente a 3.59 ± 0.22 % del control). Una vez liberada la β -glucuronidasa al medio, se mantiene la actividad constante a lo largo del período de estudio (40.69 ± 1.55 % en células estimuladas durante 30 minutos -muy significativo-). Por tanto, esta respuesta del neutrófilo es máxima a los pocos segundos de producirse la activación y se mantiene constante a tiempos largos.

Igual que en los casos anteriores, no se produce liberación de enzimas lisosomales si no está presente en el medio de reacción la citocalasina B.

Como resumen final de los estudios descritos, podemos delinear la siguiente secuencia temporal de activación de los neutrófilos: la respuesta más inmediata es la liberación de β -glucuronidasa, seguida de la activación de la enzima acetil-CoA:liso-PAF acetiltransferasa, que conduce a la producción y liberación del PAF sintetizado.

Del resultado de estos experimentos cinéticos y de dosis-respuesta hemos elegido las condiciones de activación de los neutrófilos para los estudios subsiguientes: estimulación con fMLP 1 μ M durante 5-10 min.

1.7. Medida de actividad fosfolipasa A_2 en PMNs.

Las interpretaciones más usuales han asignado a la fosfolipasa A_2 un papel fundamental en la biosíntesis del PAF por la vía de la remodelación, ya que hidroliza el precursor del PAF almacenado en las membranas 1-alquil-2-acil-GPC, a 1-alquil-2-liso-GPC (liso-PAF). Este intermediario es sustrato de la acetiltransferasa, que lo convierte en PAF. La fosfolipasa A_2 no sólo produce el sustrato de esta enzima, sino que además da lugar a ácido araquidónico libre, que es utilizado para la producción de eicosanoides. Además, se ha encontrado que los PMNs son capaces de liberar una fosfolipasa A_2 al medio extracelular tras la activación con distintos secretagogos. Por esta razón, hemos medido esta actividad enzimática tanto en homogeneizados como en sobrenadantes de neutrófilos.

La razón de elegir como sustrato la bacteria *Escherichia coli* marcada con ácido [¹⁴C]-oléico y autoclavada, se debe a que de esta forma el sustrato es mejor reconocido por la enzima, puesto que se encuentra en una membrana biológica. Este es un procedimiento de medida ampliamente difundido y reconocido.

También hemos probado micelas de fosfolípidos sintéticos como fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, o mezcla de ambas, e incluso micelas mixtas de fosfolípidos y detergentes. A pesar de la variedad de procedimientos probados, sólo hemos conseguido medir la fosfolipasa A₂ de neutrófilos utilizando membranas de *E. coli* marcadas radiactivamente. En contraste, y como control de los procedimientos utilizados, sí hemos logrado medir esta actividad en plaquetas humanas utilizando como sustrato micelas de fosfolípidos sintéticos (datos no mostrados).

En todas las medidas hemos utilizado como control positivo del ensayo plasma de enfermos de septicemia, que contiene grandes cantidades de fosfolipasa A₂.

La actividad detectada en sobrenadante de PMNs estimulados con distintas concentraciones de fMLP y en ausencia o presencia de citocalasina B se muestra en la figura nº 12. La actividad detectada es pequeña en comparación con la presente en el plasma de enfermos de sepsis, aunque es mayor que la detectada en los controles.

La mayor actividad se obtiene al estimular con CB+fMLP 0.1 μM (225.5 ± 17.7 pmoles/min.5x10⁶ PMNs, frente a 130.1 ± 17.8 pmoles/min.5x10⁶ PMNs del control), pero no se observa una dependencia clara con la concentración del estímulo.

Al igual que en los demás parámetros analizados hasta ahora, es necesaria la presencia de citocalasina B en el medio de incubación para que se produzca la liberación de la fosfolipasa A_2 al medio externo: 108.6 ± 36.0 pmoles/min. 5×10^6 PMNs en células estimuladas sólo con fMLP $0.1 \mu\text{M}$.

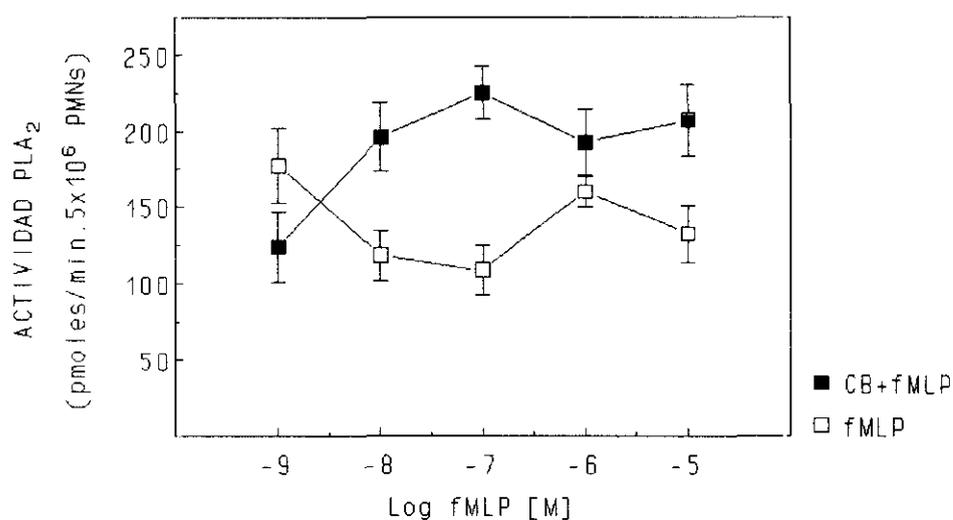


FIGURA 12: Medida de fosfolipasa A_2 en sobrenadante de PMNs estimulados con distintas concentraciones de fMLP. Las células (5×10^6 PMNs/ml) se estimulan con $5 \mu\text{g/ml}$ de citocalasina B (5 minutos de preincubación) en presencia de calcio 1 mM y distintas concentraciones de fMLP durante 30 minutos. El ensayo de actividad de la fosfolipasa A_2 consiste en la incubación, durante 30 minutos, de los sobrenadantes de las células en $100 \mu\text{l}$ de tampón TRIS/HCl 0.1 M $\text{pH} = 7.5$, con *E. coli* marcada con ácido [^{14}C]-oléico ($12\text{-}24 \text{ nmol}$. de fosfolípido), 1 mg/ml de BSA delipidada y 1 mM de calcio. La fosfolipasa A_2 se mide en sobrenadante, tanto en células estimuladas solo con fMLP (cuadrados blancos) como con citocalasina B y fMLP (cuadrados negros). Actividad fosfolipasa A_2 del control: 130.1 ± 17.8 pmoles/min. 5×10^6 PMNs. Los resultados se expresan como la media \pm SEM de tres experimentos hechos por duplicado.

Por tanto, hemos observado que se produce la liberación de la fosfolipasa A_2 al medio extracelular al estimular los neutrófilos con citocalasina B y fMLP, aunque la actividad detectada es pequeña comparada con la señalada por otros autores, tanto en PMNs como en otros sistemas.

Con el propósito de comparar con otros agonistas se midió la liberación de fosfolipasa A_2 en respuesta a partículas de zimosán opsonizado.

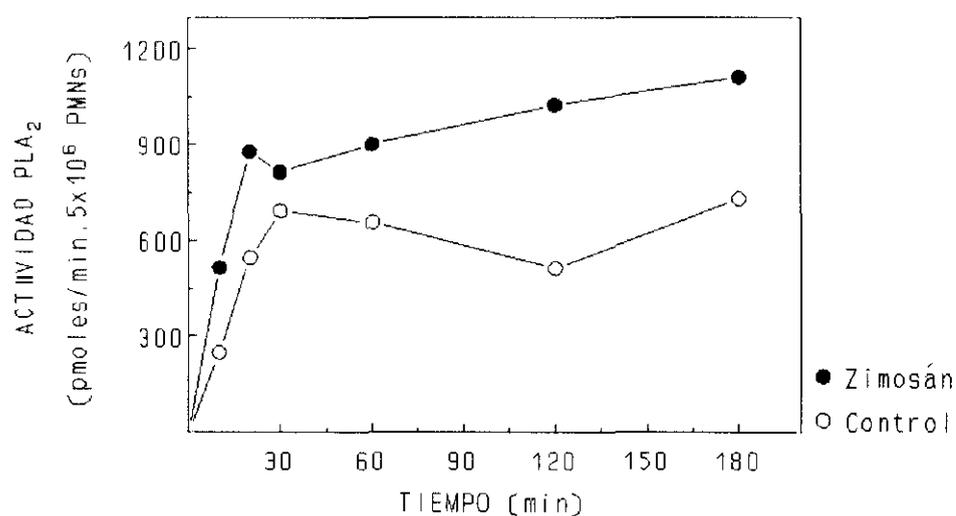


FIGURA 13: *Medida de fosfolipasa A_2 en sobrenadante de PMNs estimulados con zimosán opsonizado: estudio cinético.* Las células (5×10^6 PMNs) se estimulan a distintos tiempos en 1 ml de tampón HEPES-glucosa-BSA pH = 7.4, con 2 mg/ml de zimosán opsonizado, y 1 mM de calcio. La fosfolipasa A_2 se mide en sobrenadante, tanto en células estimuladas (círculos negros) como en células en reposo (círculos blancos). Experimento representativo de otros cuatro hechos por duplicado.

Como se observa en la figura nº 13, la estimulación de los PMNs con zimosán opsonizado produce la liberación de la fosfolipasa A₂ al medio extracelular, pero en cantidades mayores que las producidas por el fMLP.

La actividad específica detectada es de 812.5 pmoles/min.5x10⁶ PMNs en células estimuladas con 2 mg/ml de zimosán durante 30 minutos, frente a 192.9 ± 22.0 pmoles/min.5x10⁶ PMNs en células estimuladas con CB + fMLP 10⁻⁶ M durante 30 minutos.

La enzima liberada al medio fue detectable incluso 3 horas después de la adición del zimosán (1111.9 pmoles/min.5x10⁶ PMNs, frente a 730 pmoles/min.5x10⁶ PMNs en el control).

Vamos a analizar a continuación la actividad fosfolipasa A₂ presente en el homogeneizado de células estimuladas con citocalasina B y fMLP o zimosán opsonizado.

La actividad fosfolipasa A₂ en homogeneizados de PMNs estimulados con citocalasina B y fMLP (Figura nº 14) es similar en magnitud a la encontrada en los sobrenadantes de PMNs estimulados con este mismo agonista.

No se encuentran diferencias significativas entre células estimuladas con CB + fMLP y en reposo a ninguna de las concentraciones de fMLP ensayadas: 210.1 ± 9.9 pmoles/min.5x10⁶ PMNs en células estimuladas con CB + fMLP 10⁻⁶ M, frente a 220.6 ± 17.8 pmoles/min.5x10⁶ PMNs del control. Tampoco se observan diferencias entre los neutrófilos estimulados con fMLP en ausencia o presencia de citocalasina B (210.1 ± 9.9 pmoles/min.5x10⁶ PMNs en células estimuladas con CB + fMLP 10⁻⁶ M, frente a 189.4 ± 27.4 pmoles/min.5x10⁶ PMNs en células estimuladas sólo con fMLP 10⁻⁶ M).

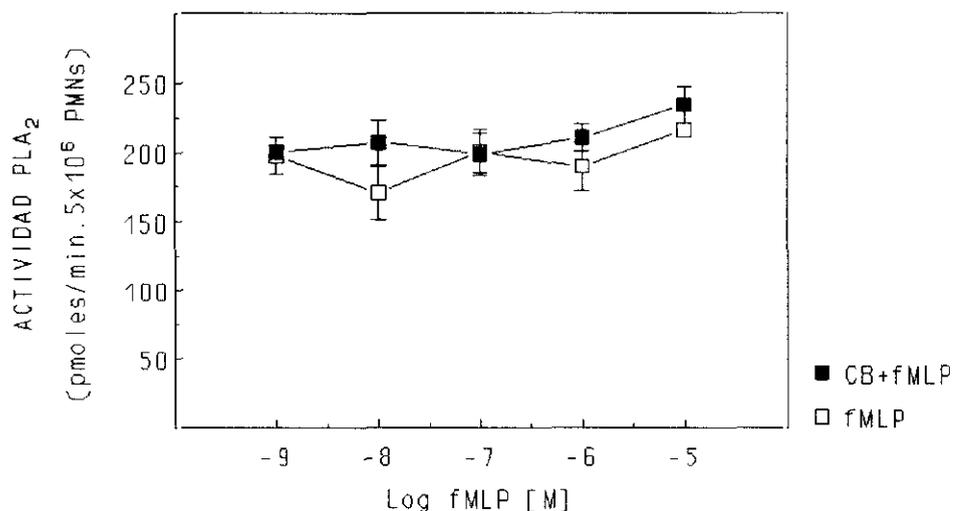


FIGURA 14: Medida de fosfolipasa A_2 en homogeneizado de PMNs estimulados con distintas concentraciones de fMLP. Las células (5×10^6 PMNs/ml) se estimulan durante 30 minutos con $5 \mu\text{g/ml}$ de citocalasina B y distintas concentraciones de fMLP. La fosfolipasa A_2 se mide en el homogeneizado, tanto en células estimuladas solo con fMLP (cuadrados blancos) como con citocalasina B y fMLP (cuadrados negros). Actividad fosfolipasa A_2 del control: 220.6 ± 17.8 pmoles/min. 5×10^6 PMNs. Los resultados se expresan como la media \pm SEM de cuatro experimentos hechos por duplicado.

Comparamos el resultado obtenido de la medida de fosfolipasa A_2 en homogeneizado de PMNs estimulados con citocalasina B y fMLP con el otro estímulo utilizado: partículas de zimosán opsonizado (Figura nº 15).

Se observa una actividad fosfolipasa A_2 algo mayor que la detectada en los sobrenadantes de neutrófilos estimulados con zimosán.

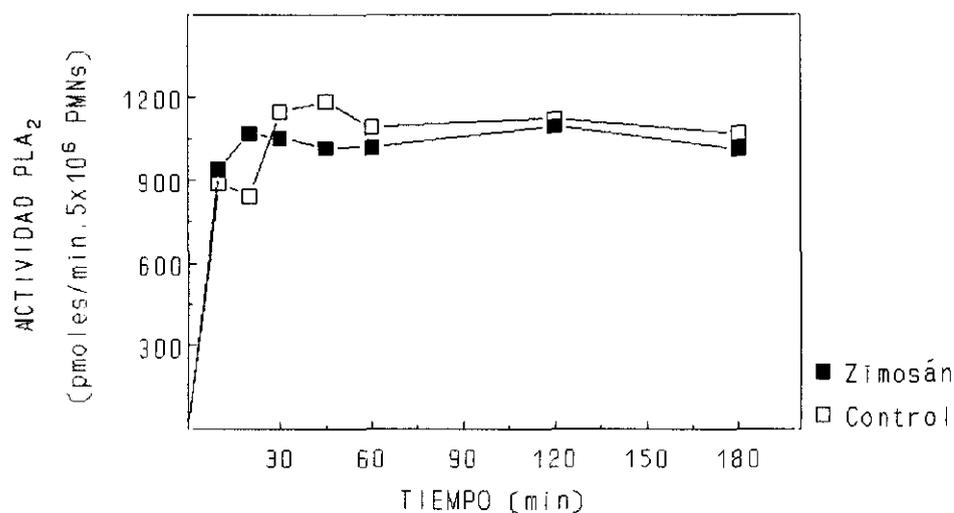


FIGURA 15: Medida de fosfolipasa A_2 en homogeneizado de PMNs estimulados con zimosán opsonizado: estudio cinético. Las células (5×10^6 PMNs) se estimulan por incubación a distintos tiempos en 1 ml de tampón Hepes-glucosa-BSA pH = 7.4, con 2 mg/ml de zimosán opsonizado, y 1 mM de calcio. La fosfolipasa A_2 se mide en el homogeneizado de células estimuladas (cuadrados negros) y en células en reposo (cuadrados blancos). Experimento representativo de otros cuatro hechos por duplicado.

Como diferencia con los sobrenadantes, no se observan diferencias entre las células estimuladas y las células control a ninguno de los tiempos de incubación estudiados. Incluso en algunos puntos, los controles tienen más actividad que los homogeneizados de células estimuladas: 1012.5 pmoles/min. 5×10^6 PMNs en células estimuladas durante 3 horas, frente a 1068.6 pmoles/min. 5×10^6 PMNs en células en reposo.

Al comparar los dos estímulos, fMLP y zimosán, se observa que ambos tienen el mismo efecto sobre la actividad enzimática fosfolipasa A_2 : los dos son capaces de activar una fosfolipasa A_2 presente en el neutrófilo que se libera al medio extracelular (aunque el zimosán opsonizado es más potente que el fMLP), y ambos estímulos son incapaces de activar la fosfolipasa A_2 presente en el homogeneizado celular. Así, el efecto observado sobre esta enzima no depende del estímulo utilizado.

Por tanto, sólo medimos fosfolipasa A_2 en sobrenadante de PMNs estimulados, mientras que en el homogeneizado de estas células detectamos una actividad fosfolipasa A_2 que no se activa ni por la estimulación con el péptido quimiotáctico fMLP ni por la estimulación con zimosán opsonizado.

Estos resultados no descartan la existencia de alguna forma de fosfolipasa A_2 activable en el homogeneizado de polimorfonucleares humanos, sino que sólo indican nuestra dificultad para detectarla en este sistema celular, a pesar de haber intentado varios ensayos con distintos sustratos.

Esta dificultad en la medida de la fosfolipasa A_2 puede ser debida a la presencia de inhibidores intracelulares, de sustancias que interfieran con el sustrato, o a una extrema labilidad de la enzima que no admita las condiciones necesarias para el paso de células íntegras a homogeneizados celulares.

1.8. Caracterización de la actividad fosfolipasa A₂ liberada al medio extracelular. Dependencia de los iones Ca²⁺ y del pH.

Se utilizan como fuente de enzima sobrenadantes de PMNs estimulados con zimosán opsonizado, ya que con este estímulo se consigue una mayor liberación de fosfolipasa A₂.

El efecto de los iones Ca²⁺ se muestra en la figura nº 16, observándose que la fosfolipasa A₂ liberada por el neutrófilo se detecta en ausencia de calcio (640.1 pmoles/min.5x10⁶ PMNs en presencia de EGTA 5 mM).

Presenta el máximo de actividad con una concentración de calcio de 10⁻⁴ M (1320.3 pmoles/min.5x10⁶ PMNs) y se inhibe con concentraciones superiores a 10 mM (560.1 pmoles/min.5x10⁶ PMNs).

Por tanto, la actividad fosfolipasa A₂ liberada al sobrenadante sólo es ligeramente dependiente de la presencia de calcio en el medio de incubación: la enzima se puede medir en un medio sin calcio, aunque su actividad aumenta en presencia de concentraciones moderadas del catión, y llega a inhibirse a concentraciones elevadas.

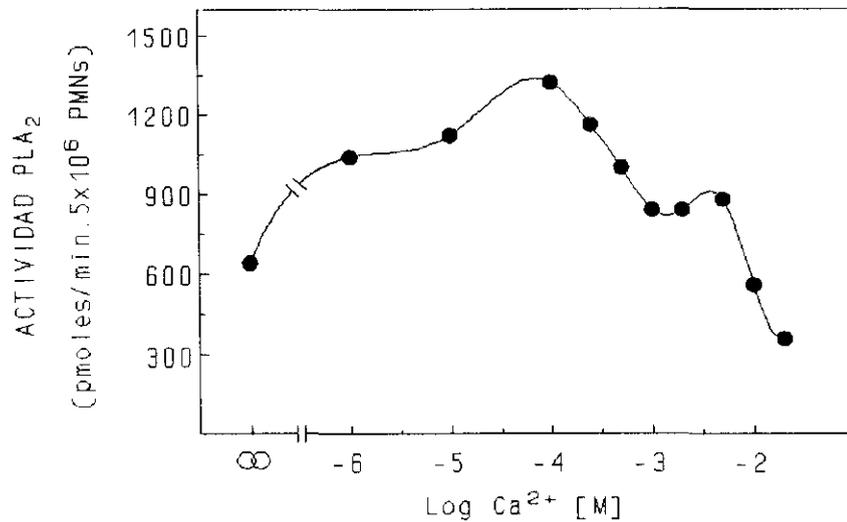


FIGURA 16: Efecto de la concentración de los iones Ca^{2+} en la actividad fosfolipasa A_2 del sobrenadante de PMNs estimulados con zimósán opsonizado. Las células (5×10^6 PMNs) se estimulan por incubación durante 30 minutos en 1 ml de tampón HEPES-glucosa-BSA pH=7.4, con 2 mg/ml de zimósán opsonizado, y 1 mM de calcio. El ensayo de actividad de la fosfolipasa A_2 se realiza en presencia de distintas concentraciones de calcio: se utiliza una solución Ca^{2+} /EGTA en la que la concentración de calcio libre se calcula por la constante de asociación del complejo Ca^{2+} -EGTA. Experimento representativo de otros dos hechos por duplicado.

El análisis de la dependencia de la fosfolipasa A_2 con el pH (Figura nº 17) indica que esta enzima posee actividad óptima a pH=5 (1311.7 pmoles/min. 5×10^6 PMNs), muestra una inflexión a pH=5.5 (280.2 pmoles/min. 5×10^6 PMNs), y permanece constante entre pH=6.5-9.0.

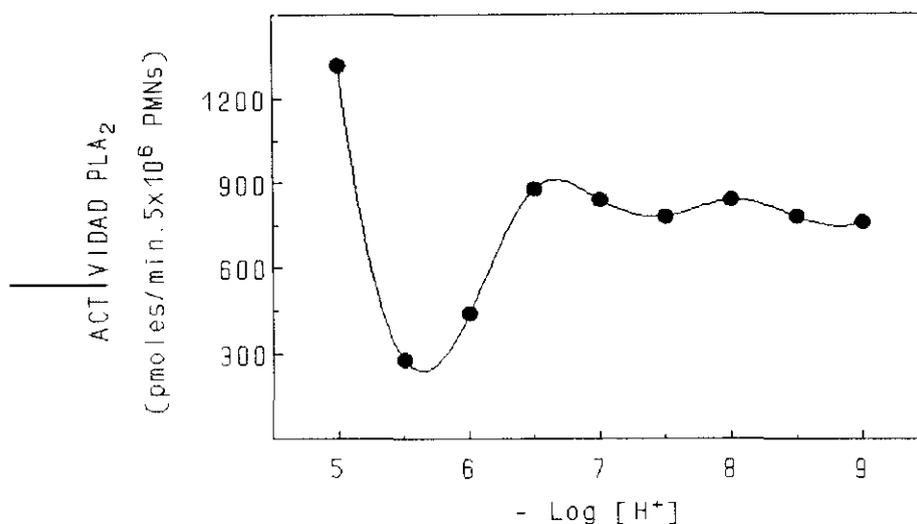


FIGURA 17: Efecto del pH en la actividad fosfolipasa A₂ de sobrenadante de PMNs estimulados con zimosán opsonizado. Las células (5x10⁶ PMNs) se estimulan por incubación durante 30 minutos en 1 ml de Hapes-glucosa-BSA pH=7.4, con 2 mg/ml de zimosán opsonizado, y 1 mM de calcio. El ensayo de actividad de fosfolipasa A₂ se realiza en 100 μl de tampón citrato/fosfato 0.1 M (pH=5.0-7.0) o tampón TRIS/HCl 0.1 M (pH=7.5-9.0). Experimento representativo de otros tres hechos por duplicado.

Por tanto, esta enzima es activa en ausencia de calcio y tiene un pH óptimo ácido. Estas son características de una enzima de origen lisosomal, más que de una enzima modulada por condiciones fisiológicas e implicada en la producción de mediadores lipídicos.

1.9. Liberación de ácido araquidónico por los PMNs.

Las células previamente marcadas con ácido [^3H]-araquidónico y estimuladas con citocalasina B y fMLP, liberan ácido araquidónico de forma dependiente del tiempo de incubación con el estímulo, como se muestra en la figura n° 18.

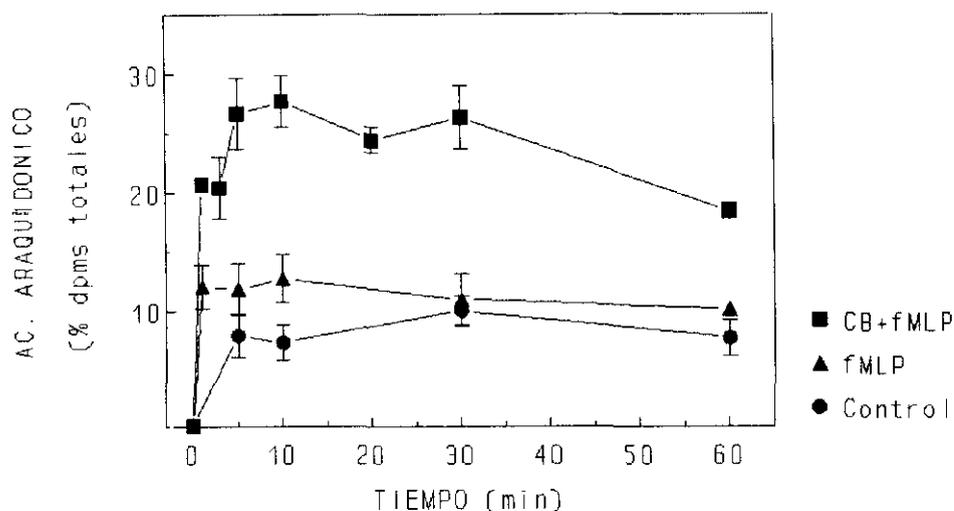


FIGURA 18: Liberación de ácido [^3H]-araquidónico en PMNs estimulados con fMLP: estudio cinético. Las células se marcan con ácido [^3H]-araquidónico, y se lavan para eliminar el marcaje que no se haya incorporado. Después, se estimulan a la concentración de 5×10^6 PMNs/ml con fMLP $1 \mu\text{M}$ en presencia o ausencia de $5 \mu\text{g/ml}$ de citocalasina B a distintos tiempos. Luego se para la reacción, se extraen los lípidos por el método de Bligh & Dyer, y se separan por cromatografía en capa fina. Círculos: células en reposo. Triángulos: células estimuladas sólo con fMLP $1 \mu\text{M}$. Cuadrados: células estimuladas con citocalasina B y fMLP $1 \mu\text{M}$. Los datos se expresan en % de dpm respecto al marcaje total incorporado en PC. Los resultados se expresan como la media \pm SEM de cuatro experimentos hechos por duplicado.

La generación de ácido araquidónico no esterificado alcanza el máximo a tiempos cortos: a los 10 minutos de incubación se libera el 27.68 ± 4.17 % del total que se había incorporado en PC durante el marcaje, frente a un 7.22 ± 2.56 % del control.

La liberación de araquidónico en células estimuladas con citocalasina B y fMLP se mantiene estable hasta los 30 minutos de incubación (26.32 ± 3.71 %), y posteriormente empieza a disminuir, de manera que a los 60 minutos sólo se detecta una liberación del 18.45 ± 0.69 %.

El fMLP en ausencia de citocalasina B es capaz de liberar ácido araquidónico, pero en menor concentración que en presencia de citocalasina B: 12.7 ± 2.04 % en células estimuladas sólo con fMLP 10^{-6} M, frente a 7.22 ± 2.56 % del control, aunque las diferencias entre células en reposo y estimuladas sólo con fMLP van disminuyendo al aumentar el tiempo de incubación.

De todas formas, sigue siendo necesaria la presencia de citocalasina B en el medio de incubación para que se obtenga una liberación de araquidónico significativa.

Vamos a comparar la capacidad del fMLP como estímulo con otro agonista: el ionóforo de calcio A23187.

Como se observa en la figura nº 19, el ionóforo de calcio es más potente que el fMLP para promover la liberación de ácido araquidónico: 27.68 ± 4.17 % en PMNs estimulados con CB + fMLP 10^{-6} M durante 10 minutos, frente a 41.18 ± 4.88 % en PMNs estimulados con ionóforo $10 \mu\text{M}$.

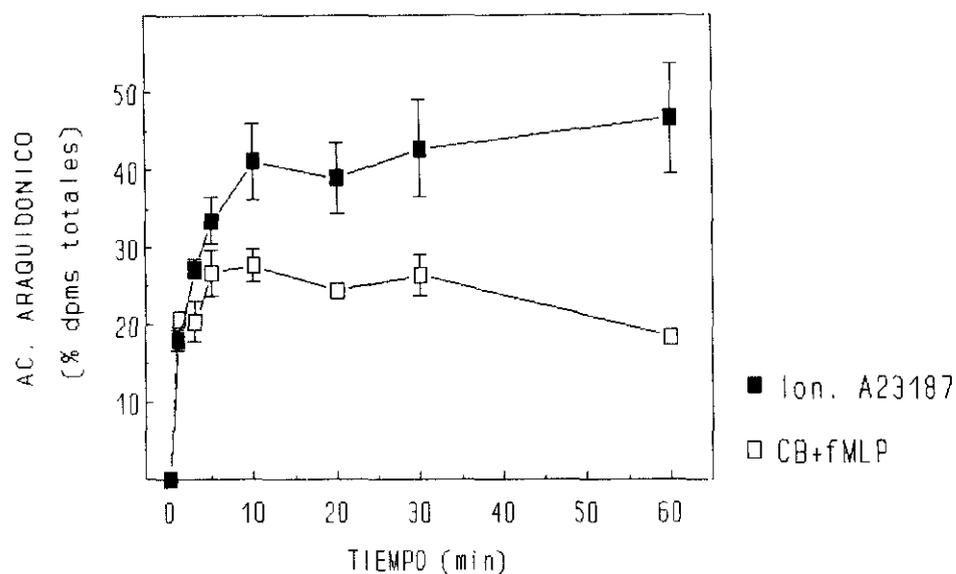


FIGURA 19: Liberación de ácido $[^3\text{H}]$ -araquidónico en PMNs estimulados con ionóforo de calcio A23187 y fMLP: estudio cinético. Las células se marcan con ácido $[^3\text{H}]$ -araquidónico, y se estimulan a la concentración de 5×10^6 PMNs/ml con fMLP $1 \mu\text{M}$ en presencia de citocalasina B o con ionóforo A23187 $10 \mu\text{M}$ a distintos tiempos. Luego se para la reacción, se extraen los lípidos por el método de Bligh & Dyer, y se separan por cromatografía en capa fina. Cuadrados blancos: células estimuladas con citocalasina B y fMLP. Cuadrados negros: células estimuladas con $10 \mu\text{M}$ de ionóforo A23187. Los datos se expresan en % de dpm respecto al marcaje total incorporado en PC. Los resultados se expresan como la media \pm SEM de cuatro experimentos hechos por duplicado.

Además, al aumentar el tiempo de incubación, aumenta la capacidad del ionóforo para liberar este ácido graso: 46.64 ± 7.03 % en PMNs estimulados con ionóforo $10 \mu\text{M}$ durante 60 minutos.

Por tanto, el fMLP es capaz de liberar ácido araquidónico de los neutrófilos, lo que en principio podría atribuirse a la acción de la fosfolipasa A₂, ya que la liberación de ácido araquidónico es una medida indirecta de la actividad de esta enzima.

2. EFECTO DEL FACTOR DE NECROSIS TUMORAL ALFA (TNF- α) EN LA ESTIMULACION DE NEUTROFILOS CON fMLP.

A lo largo de los experimentos precedentes hemos observado la necesidad de añadir citocalasina B al medio de incubación para poder ver el efecto del fMLP. Esto sugeriría que la citocalasina B está promoviendo cambios en la célula, de manera que al administrar el agonista (fMLP), se observa una activación mucho mayor que la observada sólo con fMLP.

Con el propósito de buscar moléculas fisiológicas que pudieran desempeñar *in vivo* el papel que hemos observado con la citocalasina B *in vitro*, decidimos estudiar el efecto de algunas citoquinas, y elegimos el factor de necrosis tumoral, TNF- α , a la vista de las numerosas referencias que sugerían que pudiese desempeñar este papel.

Hemos estudiado los efectos de esta citoquina sobre la actividad acetiltransferasa, producción total del PAF y liberación de β -glucuronidasa; para poder ver si es capaz de pre-estimular las células de la misma manera que lo hace la citocalasina B.

2.1. Actividad acetiltransferasa.

Los neutrófilos se preincubaban 5 minutos con citocalasina B o tampón, y 30 minutos más en presencia de distintas concentraciones de TNF- α , antes de la adición del fMLP.

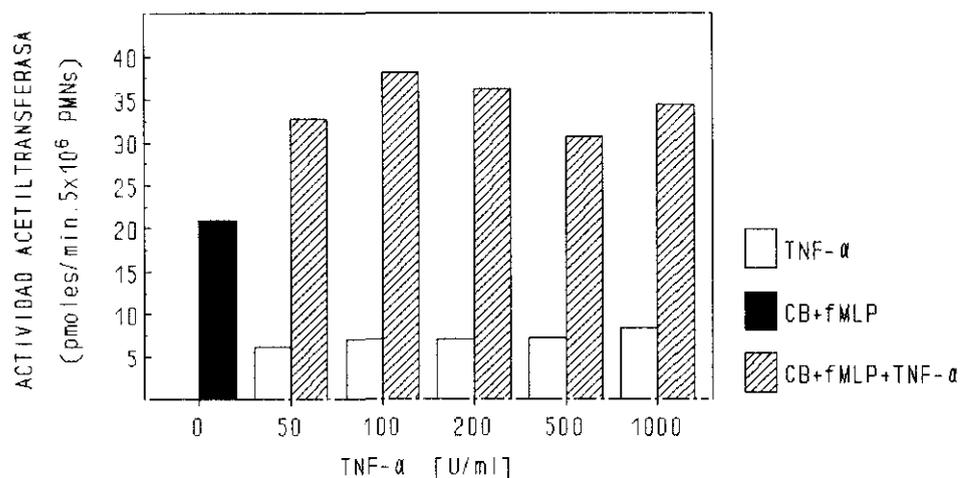


FIGURA 20: Efecto del TNF- α en la actividad acetiltransferasa en PMNs. Se preincubaban 5×10^6 PMNs en 1 ml de tampón HEPES-glucosa-BSA pH=7.4 con $5 \mu\text{g/ml}$ de citocalasina B en presencia de calcio 1 mM durante 5 minutos. A continuación, se añaden distintas concentraciones de TNF- α durante 30 minutos y luego se añade el fMLP $1 \mu\text{M}$ durante 10 minutos. Una vez parada la reacción de estimulación, se procede a la medida de actividad de la acetiltransferasa. Barras blancas: células estimuladas sólo con TNF- α . Barra negra: células estimuladas con CB+fMLP. Barras diagonales: células estimuladas con TNF- α y CB+fMLP. Actividad acetiltransferasa en el control: $5.1 \text{ pmoles/min. } 5 \times 10^6 \text{ PMNs}$. Experimento representativo de otros tres hechos por duplicado.

En la figura n° 20, podemos observar que el TNF- α por sí sólo no produce la activación de la acetiltransferasa a ninguna de las concentraciones ensayadas (8.44 pmoles/min. 5×10^6 PMNs en células estimuladas con 1000 U/ml de TNF- α (1.4 nM) frente a 5.1 pmoles/min. 5×10^6 PMNs del control).

Los resultados que se obtienen al incubar las células con distintas concentraciones de TNF- α junto al fMLP son prácticamente iguales a los obtenidos con TNF- α en ausencia de fMLP (9.01 pmoles/min. 5×10^6 PMNs en células estimuladas con 1000 U/ml de TNF- α y fMLP 1 μ M frente a 5.1 pmoles/min. 5×10^6 PMNs del control). Por tanto, parece que el TNF- α junto con fMLP no es capaz de activar la acetiltransferasa en la forma que lo hacía la citocalasina B en presencia de fMLP.

Sin embargo, al estimular los neutrófilos con citocalasina B, TNF- α y fMLP sí que se produce un aumento en la actividad acetiltransferasa respecto al resultado obtenido al incubar con fMLP y citocalasina B: 34.4 pmoles/min. 5×10^6 PMNs en células estimuladas con 1000 U/ml de TNF- α y CB + fMLP frente a 21 pmoles/min. 5×10^6 PMNs al estimular sólo con CB + fMLP.

Este efecto es dependiente de la dosis de TNF- α utilizada, y se observa a dosis tan bajas como 50 U/ml (69.4 pM): 32.8 pmoles/min. 5×10^6 PMNs en células estimuladas con 50 U/ml de TNF- α y CB + fMLP frente a 21 pmoles/min. 5×10^6 PMNs al estimular sólo con CB + fMLP.

Este resultado puede ser un ejemplo de la cooperación entre distintos estímulos proinflamatorios, que conduce a un incremento de la respuesta celular.

2.2. Síntesis del PAF.

En la figura nº 21 podemos observar el efecto del TNF- α sobre la síntesis del PAF en neutrófilos estimulados con CB+fMLP 1 μ M durante 10 minutos.

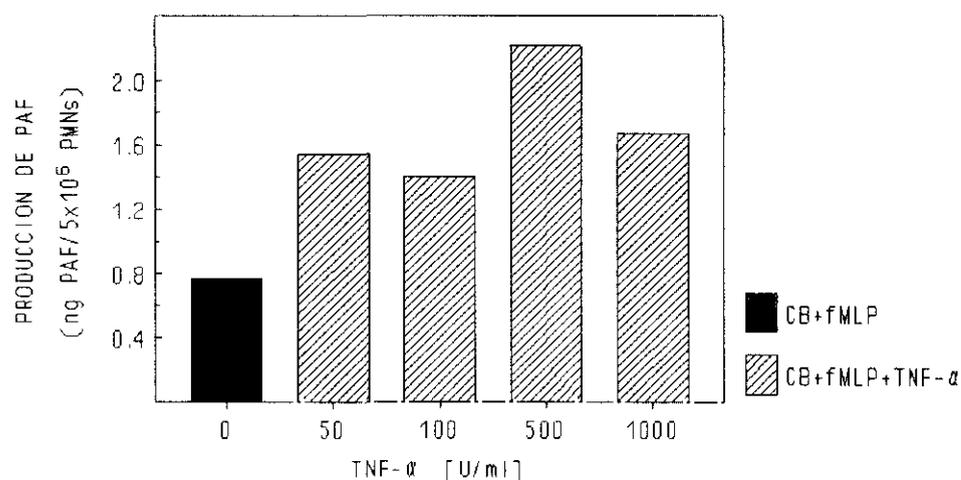


FIGURA 21: Efecto del TNF- α en la producción total de PAF en PMNs. Se preincubaban 5×10^6 PMNs en 1 ml de tampón HEPES-glucosa-BSA pH=7.4 con 5 μ g/ml de citocalasina B en presencia de calcio 1 mM durante 5 minutos. A continuación, se añaden distintas concentraciones de TNF- α durante 30 minutos y luego se añade el fMLP 1 μ M durante 10 minutos. Una vez parada la reacción de estimulación, se procede a la estimación del PAF total sintetizado por la célula. Barra negra: células estimuladas con CB+fMLP. Barras diagonales: células estimuladas con TNF- α y CB+fMLP. PAF producido por el control: 0.01 ng equivalentes de PAF/ 5×10^6 PMNs. Experimento representativo de otros tres hechos por duplicado.

El TNF- α por sí sólo o en presencia de fMLP es incapaz de provocar la síntesis del PAF. En cambio, al estimular las células con TNF- α en presencia de citocalasina B y fMLP, se produce un aumento en la producción total respecto a la producida por citocalasina B y fMLP: 2.22 ng equivalentes de PAF/5x10⁶ PMNs en células estimuladas con 500 U/ml de TNF- α en presencia de CB+fMLP, frente a 0.768 ng equivalentes de PAF/5x10⁶ PMNs en células estimuladas con CB+fMLP.

Este aumento en la síntesis del PAF se detecta en todas las concentraciones de TNF- α ensayadas, excepto en 10 U/ml (0.715 ng equivalentes de PAF/5x10⁶ PMNs, frente a 0.768 ng equivalentes de PAF/5x10⁶ PMNs en células estimuladas sólo con CB+fMLP).

2.3. Liberación de β -glucuronidasa.

El efecto del TNF sobre la liberación de β -glucuronidasa se muestra en la figura nº 22.

El TNF- α no es capaz de producir la liberación de β -glucuronidasa ni por sí solo ni en combinación con fMLP 1 μ M.

Tampoco es capaz de aumentar significativamente la liberación de esta enzima al estimular las células con TNF- α en presencia de fMLP y citocalasina B.

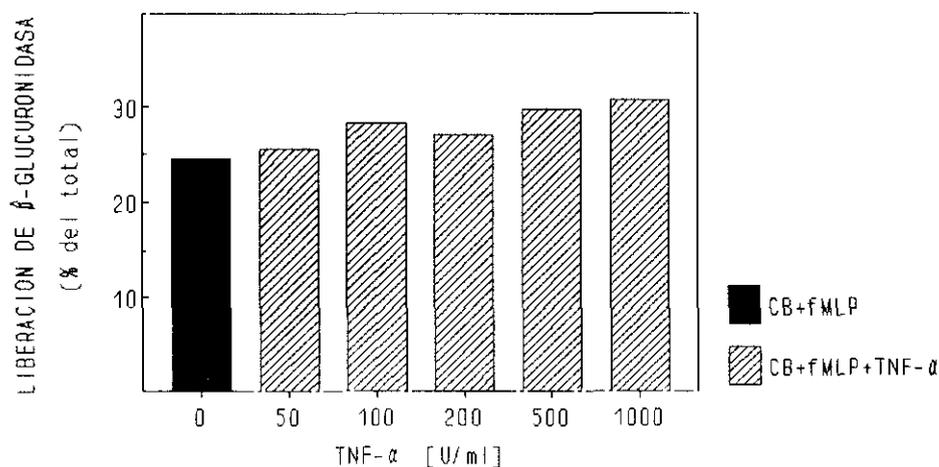


FIGURA 22: Efecto del $TNF-\alpha$ en la liberación de β -glucuronidasa en PMNs. Se preincubaban 5×10^6 PMNs en 1 ml de tampón Hepes-glucosa-BSA pH = 7.4 con $5 \mu\text{g/ml}$ de citocalasina B en presencia de calcio 1 mM durante 5 minutos. A continuación, se añaden distintas concentraciones de $TNF-\alpha$ durante 30 minutos y luego se añade el fMLP $1 \mu\text{M}$ durante 10 minutos. Una vez parada la reacción, se mide la β -glucuronidasa en el sobrenadante. Barra negra: células estimuladas con CB + fMLP. Barras diagonales: células estimuladas con $TNF-\alpha$ y CB + fMLP. β -Glucuronidasa liberada por el control: 7.05 %. Experimento representativo de otros tres hechos por duplicado.

En otros experimentos hemos utilizado concentraciones de fMLP inferiores a las óptimas (10^{-8} M) junto con concentraciones variables de $TNF-\alpha$, de manera que estuviéramos en condiciones de observar más claramente el efecto de pre-estimulación del TNF si lo hubiera, ya que en los experimentos anteriores podría estar enmascarado por estimular los neutrófilos con una concentración óptima de fMLP.

En estas últimas condiciones, tampoco se observa ningún efecto al estimular las células con TNF- α y fMLP. Si se siguió observando, sin embargo, el aumento de la actividad acetiltransferasa y de producción del PAF al estimular los neutrófilos con TNF- α en presencia de citocalasina B y fMLP:

- 0.07 ng equivalentes de PAF/5x10⁶ PMNs en células estimuladas con TNF- α 100 U/ml en presencia de CB+fMLP 10⁻⁸ M, frente a 0.02 ng equivalentes de PAF/5x10⁶ PMNs en células estimuladas con CB+fMLP 10⁻⁸ M (está al mismo nivel del control: 0.02 ng equivalentes de PAF/5x10⁶ PMNs).
- 28.9 pmoles/min.5x10⁶ PMNs en células estimuladas con TNF- α 50 U/ml en presencia de CB+fMLP 10⁻⁸ M, frente a 19.2 pmoles/min.5x10⁶ PMNs en células estimuladas con CB+fMLP 10⁻⁸ M (está al mismo nivel del control: 16.1 pmoles/min.5x10⁶ PMNs).

También hemos estudiado si esta citoquina influía en la activación o en la liberación al medio extracelular de la fosfolipasa A₂, puesto que se ha descrito que el TNF- α puede producir la liberación de esta enzima. Sin embargo, no hemos conseguido resultados que apoyen esta hipótesis (datos no mostrados).

Por tanto, a la vista de los resultados obtenidos, no podemos decir que el TNF- α sea la citoquina que ejerce *in vivo* el papel de la citocalasina B en la pre-estimulación celular observada *in vitro*.

3. PAPEL DE LOS IONES CALCIO EN LA RESPUESTA DE LOS NEUTROFILOS AL fMLP.

Hemos estudiado las posibles vías de transducción de la señal que median entre el proceso de estimulación celular y la aparición de respuestas en los neutrófilos. Empezaremos analizando el papel del calcio en este proceso.

3.1. Cambios en la concentración de calcio intracelular inducidos por fMLP.

La incubación de los neutrófilos con fMLP 1 μ M en un medio que contiene 1 mM de calcio, produce un rápido aumento en la concentración de calcio intracelular ($[Ca^{2+}]_i$), que vuelve al nivel basal al cabo de 1-2 minutos de estimulación (Figuras nº 23 y 24).

Cuando los PMNs se incuban con fMLP en presencia de citocalasina B, se observa un aumento de la magnitud y de la duración del pico de calcio producido sólo con fMLP. Además, esta respuesta inicial se sigue de un segundo pico más ancho y de menor magnitud que el anterior, de tal forma que la $[Ca^{2+}]_i$ no vuelve a los valores basales hasta que transcurren unos 8-10 minutos, aproximadamente.

Durante los 5 minutos de preincubación de las células con citocalasina B no se observan cambios significativos en la concentración de calcio intracelular.

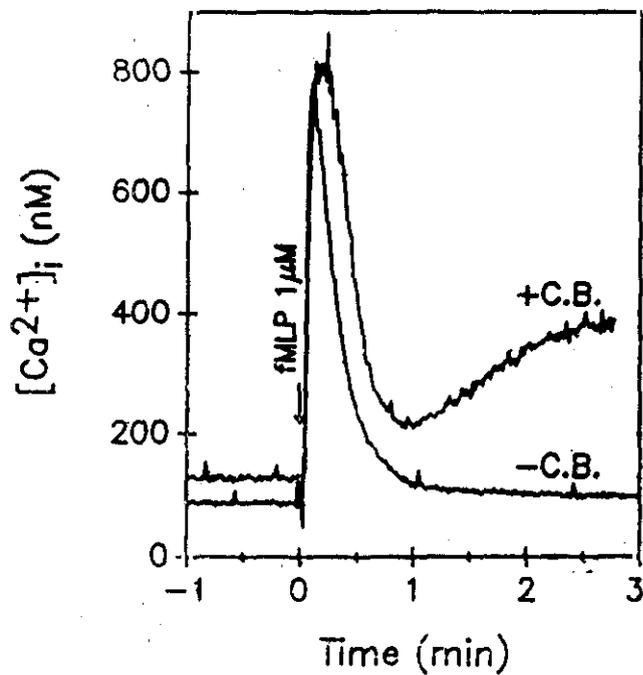


FIGURA 23: Medida de la concentración de calcio intracelular en la estimulación de PMNs con fMLP y citocalasina B. Las células (5×10^6 PMNs) previamente cargadas con fura-2 se estimulan con $1 \mu\text{M}$ de fMLP tanto en ausencia como en presencia de $5 \mu\text{g/ml}$ de citocalasina B (5 minutos de preincubación) en 1 ml de tampón HEPES-glucosa-BSA pH = 7.4. La adición de fMLP y citocalasina B se marca con flechas en la figura.

Las variaciones en la concentración de Ca^{2+} citosólico podrían deberse, bien a la salida de calcio de los depósitos intracelulares, o bien a un aumento del flujo de calcio extracelular. Para distinguir entre ambas posibilidades, se añadió EGTA 5 mM al medio de incubación antes de la adición del fMLP.

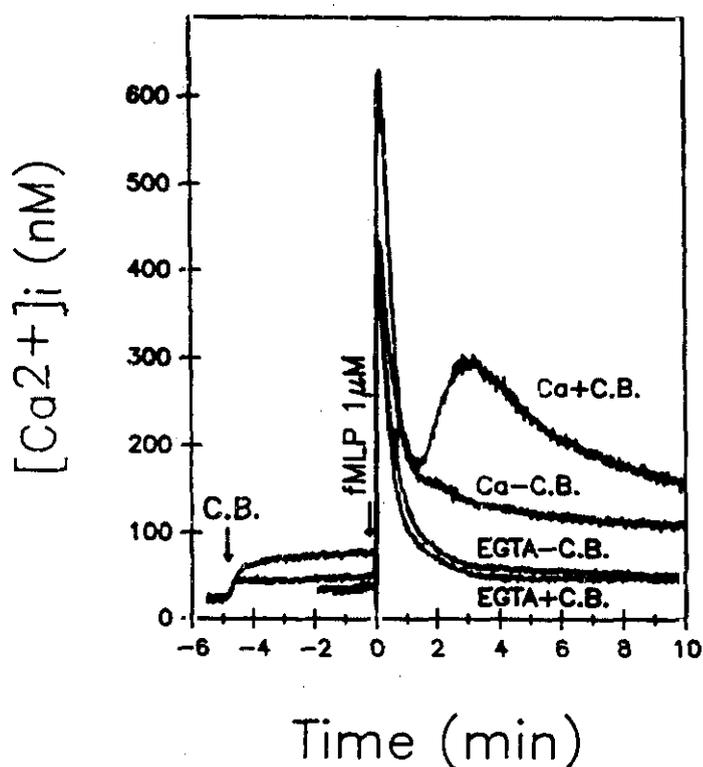


FIGURA 24: Medida de la concentración de calcio intracelular en la estimulación de PMNs con fMLP y citocalasina B. Influencia del calcio extracelular. Las células (5×10^6 PMNs), previamente cargadas con fura-2, se estimulan con $1 \mu\text{M}$ de fMLP tanto en ausencia como en presencia de $5 \mu\text{g/ml}$ de citocalasina B (5 minutos de preincubación) en 1 ml de tampón HEPES-glucosa-BSA pH = 7.4. La adición de fMLP y citocalasina B se marca con flechas en la figura. Cuando se quiere quelar el calcio extracelular (curvas de EGTA + o - CB), se añade 5 mM de EGTA y 2 mM de TRIS inmediatamente antes de la adición del fMLP.

Como se observa en la figura nº 24, al estimular los PMNs en presencia de EGTA, disminuye la intensidad del primer pico inducido por fMLP y desaparece el segundo pico detectado al estimular las células en presencia de citocalasina B.

Por tanto, la estimulación con fMLP produce un aumento transitorio en la $[Ca^{2+}]_i$, que en su mayor parte parece debido a la salida de calcio de los lugares de almacenamiento intracelulares, ya que no desaparece al incubar las células en presencia de un quelante del calcio extracelular.

Cuando se estimulan los neutrófilos en presencia de citocalasina B, se aumenta el flujo de calcio producido por fMLP y aparece otro pico, menor en magnitud pero de mayor duración en el tiempo. Este pico, parece reflejar una entrada de calcio extracelular, ya que desaparece al estimular las células en presencia de EGTA.

Los experimentos siguientes se dirigieron a aclarar la relación entre este patrón de movilización de calcio y la respuesta del neutrófilo a la estimulación por fMLP.

3.2. Actividad acetiltransferasa.

Los neutrófilos se estimulan en presencia de 1 mM de calcio o 5 mM de EGTA, con fMLP y citocalasina B durante 10 minutos. A continuación se mide la actividad acetiltransferasa en el homogeneizado celular.

Como se observa en la figura nº 25, la acetiltransferasa es una enzima totalmente dependiente de la presencia de calcio en el medio de estimulación.

Esta enzima no se activa en un medio con EGTA: 62.5 ± 3.2 pmoles/min. 5×10^6 PMNs en células estimuladas durante 5 minutos en presencia de calcio 1 mM, frente a 7.8 ± 1.7 pmoles/min. 5×10^6 PMNs en células estimuladas en presencia de 5 mM de EGTA.

Además, esta enzima sólo se activa si en el medio de incubación está presente la citocalasina B.

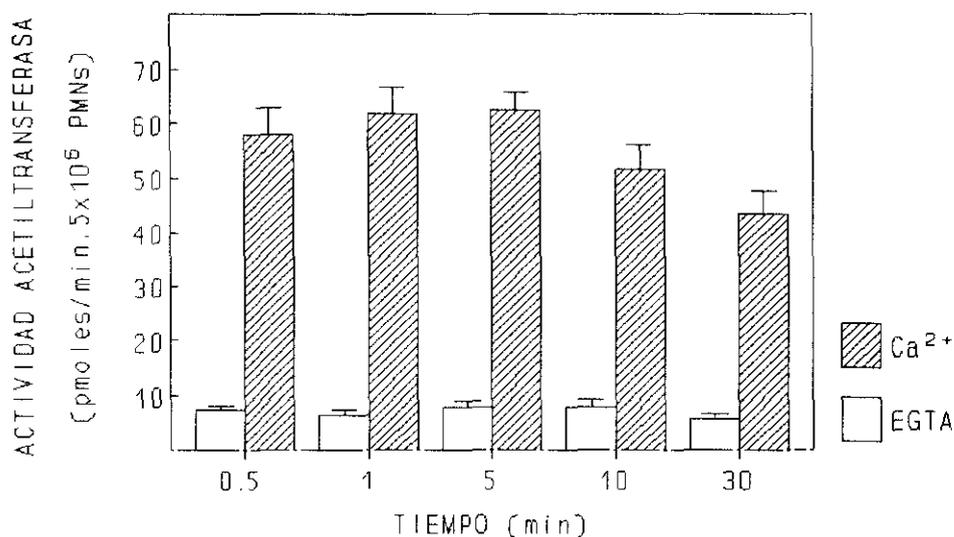


FIGURA 25: Efecto del calcio en la actividad acetiltransferasa en PMNs. Se preincubaban 5×10^6 PMNs en 1 ml de tampón Hepes-glucosa-BSA pH=7.4 en presencia de calcio 1 mM o EGTA 5 mM, con $5 \mu\text{g/ml}$ de citocalasina B (5 minutos de preincubación) y fMLP $1 \mu\text{M}$, que se incubaba a distintos tiempos. Una vez parada la reacción de estimulación, se procede a la medida de actividad de la acetiltransferasa. Barras blancas: células estimuladas con CB + fMLP en presencia de EGTA. Barras diagonales: células estimuladas con CB + fMLP en presencia de calcio. Actividad acetiltransferasa en el control: 10.2 ± 2.2 pmoles/min. 5×10^6 PMNs (en presencia de calcio) y 8.7 ± 1.3 pmoles/min. 5×10^6 PMNs (en presencia de EGTA). Los resultados se expresan como la media \pm SEM de cuatro experimentos hechos por duplicado.

Esto sugeriría que aunque el fMLP por sí sólo es capaz de producir un aumento en la $[Ca^{2+}]_i$, parece que éste no es suficiente para que la acetiltransferasa se active.

En cambio, cuando se pre-estimulan las células con citocalasina B, se aumenta aún más la concentración de calcio en el interior de los neutrófilos, por el incremento del flujo de calcio extracelular, que permite alcanzar los niveles de calcio necesarios para la activación de la enzima.

Estos resultados concuerdan con lo descrito en cuanto a la dependencia de la activación de la acetiltransferasa de la presencia de calcio extracelular.

3.3. Producción del PAF.

En ausencia de calcio extracelular, no se detecta producción del PAF por los neutrófilos en respuesta al fMLP, incluso cuando la citocalasina B está presente en el medio de incubación (datos no mostrados).

3.4. Liberación de β -glucuronidasa.

La liberación de β -glucuronidasa al medio extracelular es también dependiente de la presencia de calcio extracelular en el medio de incubación: mientras que en un medio con 1 mM de calcio se libera el 41.90 ± 2.22 % de la enzima presente en las células a los 10 minutos de incubación, no existe liberación en un medio con 5 mM de EGTA (los valores están al mismo nivel que los controles: 4.23 ± 1.21 % a los 10 minutos, frente a 3.24 ± 1.33 % del control) (Figura nº 26).

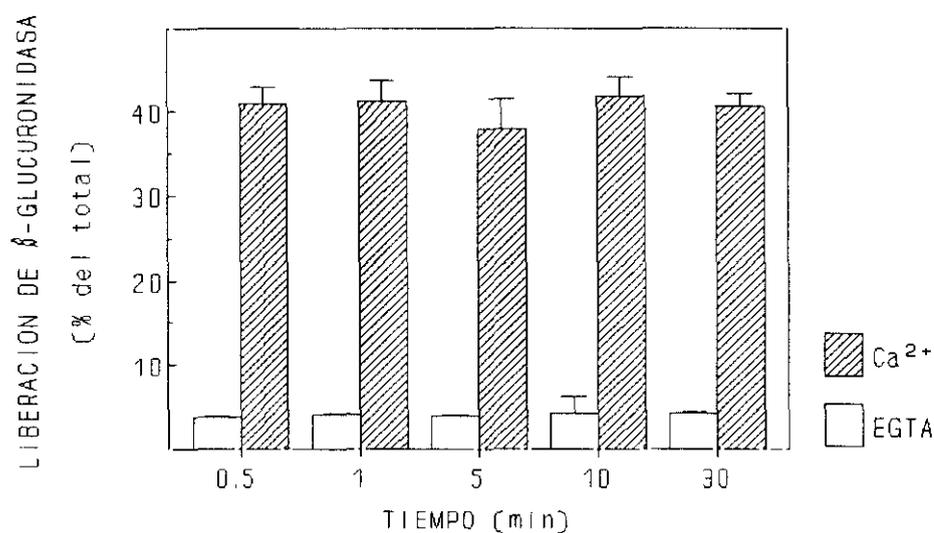


FIGURA 26: Efecto del calcio en la liberación de β -glucuronidasa en PMNs. Se preincubaban 5×10^6 PMNs en 1 ml de tampón Hepes-glucosa-BSA pH=7.4 en presencia de calcio 1 mM o EGTA 5 mM, con 5 μ g/ml de citocalasina B (5 minutos de preincubación) y fMLP 1 μ M, que se incubaba a distintos tiempos. Una vez parada la reacción, se procede a la medida de β -glucuronidasa en el sobrenadante. Barras blancas: células estimuladas con CB + fMLP en presencia de EGTA. Barras diagonales: células estimuladas con CB + fMLP en presencia de calcio. Liberación de β -glucuronidasa por el control: 4.01 ± 1.10 % (en presencia de calcio) y 3.23 ± 1.32 % (en presencia de EGTA). Los resultados se expresan como la media \pm SEM de cuatro experimentos hechos por duplicado.

Hemos observado que es necesaria la presencia de calcio extracelular y de citocalasina B en el medio de incubación para que se produzcan la activación de la enzima acetiltransferasa, la síntesis del PAF y la liberación de β -glucuronidasa.

Como se puede observar en los registros de medida de la concentración de calcio intracelular, la citocalasina B produce un aumento de los niveles de Ca^{2+} citosólico, debido en su mayoría al aumento del flujo de calcio extracelular que se da durante la estimulación celular.

4. INFLUENCIA DE LOS PRODUCTOS DE LA FOSFOLIPASA D EN LA ESTIMULACION DE LOS PMNs CON fMLP.

Hemos observado en el apartado anterior que el calcio juega un papel fundamental como segundo mensajero en nuestro sistema. Vamos a analizar otra posible vía de transducción de la señal a través de los productos de la fosfolipasa D, enzima que es la fuente principal de segundos mensajeros celulares tan importantes como los diglicéridos y el ácido fosfatídico.

4.1. Propanolol.

Como primera aproximación de este estudio, hemos realizado experimentos con propanolol, que es un inhibidor de la fosfohidrolasa de ácido fosfatídico (PPH), enzima que cataliza la conversión de ácido fosfatídico en diglicérido por hidrólisis del grupo fosfato.

Como se observa en la figura nº 27, la preincubación de las células con propanolol produce la acumulación de ácido fosfatídico (7.9 % al preincubar con propanolol 400 μM , frente a 4.8 % en células estimuladas con CB + fMLP y 2.6 % en células en reposo) y un descenso en los niveles de diglicérido (10.7 % con propanolol 400 μM , frente a 18.1 % en células estimuladas con CB + fMLP y 11.3 % en células en reposo).

Estos resultados sugieren que el propanolol está actuando en este sistema como un inhibidor de la fosfohidrolasa del ácido fosfatídico cuando se utiliza a concentraciones superiores a 200 μM , sin que se descarte que pueda, además, tener otro tipo de acciones.

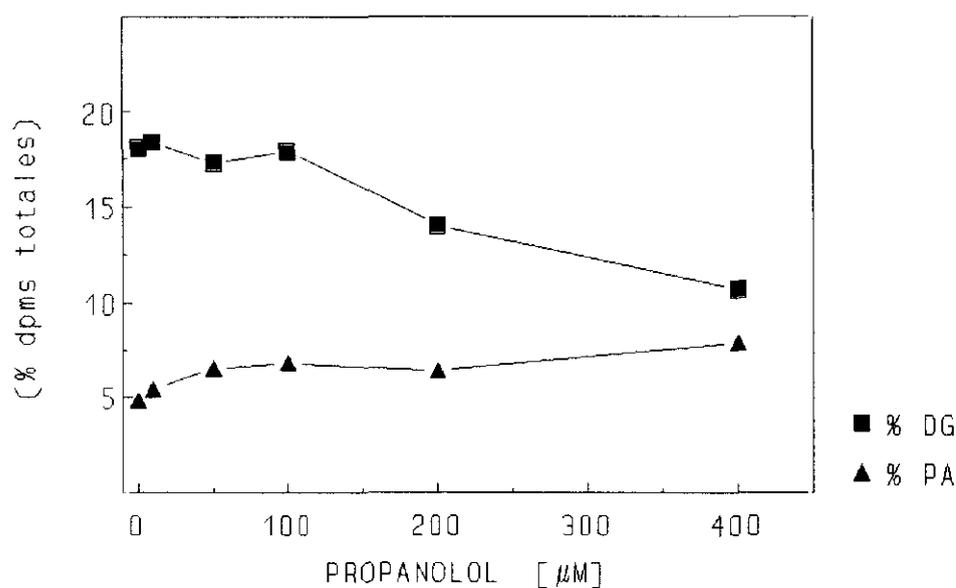


FIGURA 27: Efecto de la concentración de propanolol en PMNs estimulados con fMLP. Las células (5×10^6 PMNs/ml), previamente marcadas con 1- ^3H -alquil-2-liso-GPC, se preincubaban 5 minutos con distintas concentraciones de propanolol, antes de la adición de citocalasina B y fMLP. La reacción se deja transcurrir durante 10 minutos, tras lo cual se extraen los lípidos y se separan las distintas especies por cromatografía en capa fina. Triángulos: % ácido fosfatídico (PA). Cuadrados: % diglicérido (DG). PA del control: 2.6 %. DG del control: 11.3 %. Los resultados se expresan como % de las dpm totales incorporadas en PC, de un experimento representativo de otros dos hechos por duplicado.

Vamos a realizar experimentos con propanolol, de manera que podamos observar cómo afecta la inhibición de la fosfohidrolasa (PPH) (con la consiguiente acumulación de ácido fosfatídico y disminución de los niveles de diglicérido) a los tres parámetros de la estimulación del neutrófilo que estamos estudiando.

4.1.1. Actividad acetiltransferasa.

Para analizar el posible efecto del propanolol a nivel de la actividad acetiltransferasa, las células se preincubaban con distintas concentraciones de propanolol antes de la adición de la citocalasina B y el fMLP.

En la figura nº 28 se puede ver cómo el propanolol, añadido durante la activación de los neutrófilos, produce una inhibición dosis-dependiente de la acetiltransferasa, de forma que esta actividad alcanza valores similares a los de las células en reposo ($10.4 \text{ pmoles/min.} \cdot 5 \times 10^6 \text{ PMNs}$) con una concentración de propanolol de $400 \mu\text{M}$ (círculos negros).

Esta inhibición podría deberse a una acción directa de la droga sobre la enzima, o a una interferencia del propanolol con el mecanismo de activación. Para analizar este punto, se añadió el propanolol directamente al medio de reacción donde se ensaya esta actividad enzimática (círculos blancos). Como se aprecia en la figura, no se observó ningún efecto directo del propanolol sobre la acetiltransferasa.

Este resultado nos llevó a pensar que la inhibición observada podría ser debida a la acción de esta droga como inhibidora de la fosfohidrolasa del ácido fosfatídico, bien por inducir acumulación de ácido fosfatídico, o disminución de los niveles de diglicérido.

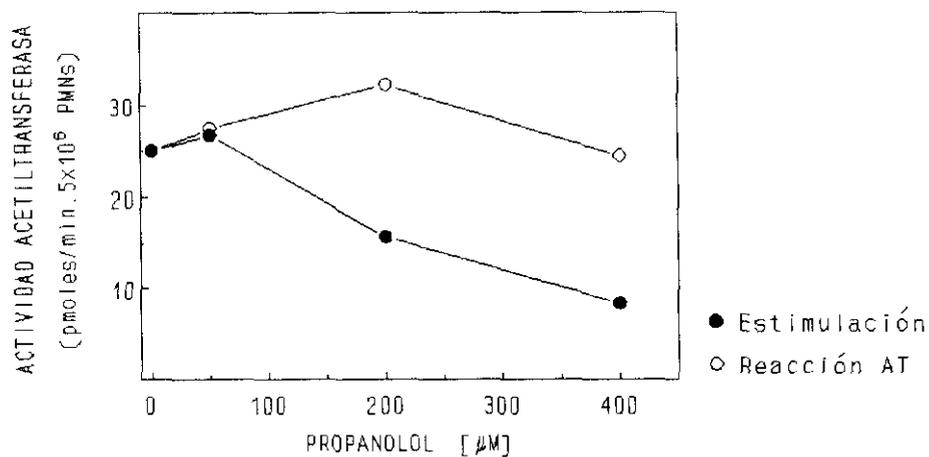


FIGURA 28: Efecto de la concentración de propanolol sobre la actividad acetiltransferasa en PMNs estimulados con fMLP. Las células (5×10^6 PMNs/ml) se preincubaban 5 minutos con distintas concentraciones de propanolol, antes de la adición de citocalasina B y fMLP. La reacción se deja transcurrir durante 10 minutos, tras lo cual se procede a la medida de la actividad acetiltransferasa. Círculos blancos: el propanolol se añade directamente al medio de reacción en el que se mide la acetiltransferasa. Círculos negros: el propanolol se añade al medio de estimulación de los neutrófilos. Actividad acetiltransferasa del control: 6.6 pmoles/min. 5×10^6 PMNs. Experimento representativo de otros cuatro hechos por duplicado.

4.1.2. Producción y liberación del PAF.

En la figura nº 29 se representa el efecto del propanolol sobre la producción y liberación del PAF formado durante la estimulación celular.

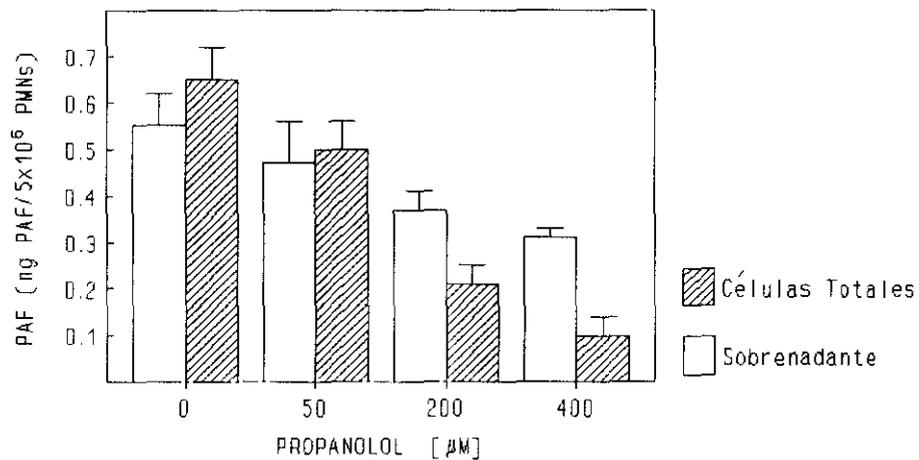


FIGURA 29: Efecto del propranolol en la producción y liberación de PAF en PMNs. Las células (5×10^6 PMNs/ml) se preincubaban 5 minutos con distintas concentraciones de propranolol, antes de la adición de citocalasina B y fMLP. La reacción se deja transcurrir durante 10 minutos, tras lo cual se procede a la estimación del PAF por bioensayo en plaquetas. Barras blancas: PAF liberado al medio extracelular (sobrenadante). Barras diagonales: PAF total producido por las células (células totales). PAF total producido por el control: 0.02 ± 0.02 ng equivalentes de PAF/ 5×10^6 PMNs. PAF liberado por el control: 0.10 ± 0.04 ng equivalentes de PAF/ 5×10^6 PMNs. Los resultados se expresan como la media \pm SEM de cinco experimentos hechos por duplicado.

Al igual que se observaba en el apartado anterior, se produce una inhibición dependiente de la dosis tanto de la producción total como de la liberación al medio externo del PAF producido (0.10 ± 0.04 ng equivalentes de PAF/ 5×10^6 PMNs en células totales y 0.31 ± 0.02 ng equivalentes de PAF/ 5×10^6 PMNs en sobrenadante, en presencia de $400 \mu\text{M}$ de propranolol).

El efecto inhibitorio del propanolol es mucho más acusado en la síntesis del mediador que en su liberación al medio extracelular: al preincubar las células con 400 μM de propanolol se produce una inhibición de la producción total del PAF del 85 %, mientras que la liberación al medio externo sólo se inhibe en un 44 %.

4.1.3. Liberación de β -glucuronidasa.

En la figura nº 30 podemos observar que el propanolol también produce una inhibición dosis-dependiente de la liberación de β -glucuronidasa, de manera que al preincubar con 400 μM de propanolol se produce una inhibición del 70 % en la liberación de esta enzima lisosomal.

Por tanto, el propanolol inhibe, de forma dependiente de la dosis, varias respuestas del neutrófilo inducidas por el fMLP, lo que sugiere que el propanolol está actuando en algún nivel del mecanismo de transducción de la señal que afectaría a todas las repuestas celulares estudiadas.

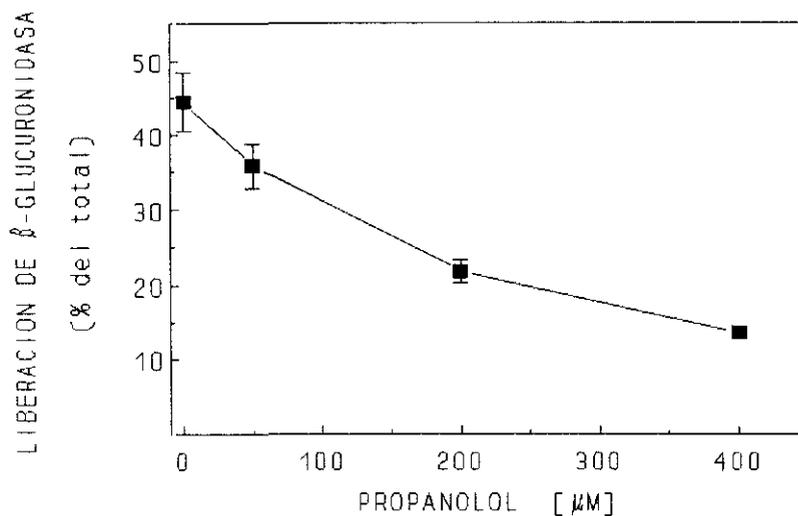


FIGURA 30: *Efecto del propanolol en la liberación de β-glucuronidasa en PMNs.* Las células (5×10^6 PMNs/ml) se preincubaban 5 minutos con distintas concentraciones de propanolol, antes de la adición de citocalasina B y fMLP durante 10 minutos. A continuación, se procede a la medida de β-glucuronidasa en el sobrenadante. Liberación de β-glucuronidasa por el control: 4.90 ± 0.51 %. Los resultados se expresan como la media \pm SEM de cuatro experimentos hechos por duplicado.

4.1.4. Flujos de calcio.

Como se puede observar en la figura nº 31, el propanolol produce una inhibición dependiente de la dosis del flujo de Ca^{2+} inducido durante la estimulación celular: se anula el aumento de la concentración de calcio intracelular con una concentración de propanolol de aproximadamente $400 \mu\text{M}$.

Esta droga inhibe tanto el pico de calcio característico del fMLP como el hombro posterior atribuido a la citocalasina B.

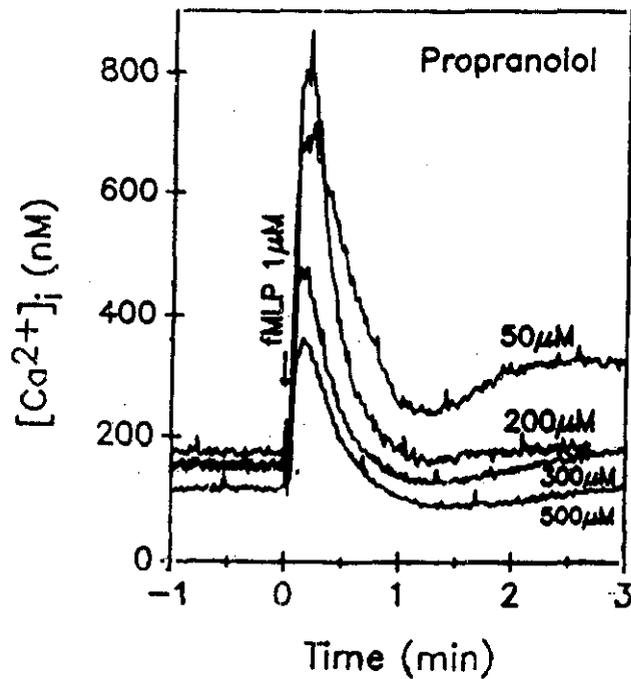


FIGURA 31: Medida de la concentración de calcio intracelular en la estimulación de PMNs con fMLP. Efecto del propanolol. Las células (5×10^6 PMNs/ml) previamente cargadas con fura-2 se preincubaban 5 minutos con distintas concentraciones de propanolol y se estimulan con CB + fMLP. La adición de fMLP se marca con una flecha en la figura.

Estos resultados nos indican otra posible vía de acción del propanolol: la inhibición del aumento de la $[Ca^{2+}]_i$.

El efecto del propanolol sobre la fosfohidrolasa del ácido fosfatídico, conduce a la disminución de los niveles de diglicérido y a la acumulación de ácido fosfatídico. Vamos a analizar si las variaciones en la concentración de estos segundos mensajeros, pueden explicar el efecto del propanolol sobre los neutrófilos.

4.2. Diglicéridos.

Los PMNs se trataron con distintas concentraciones de dioleína (1,2-dioctanoil-*sn*-glicerol) y diglicérido relacionado estructuralmente con el PAF (1-O-hexadecil-2-acetil-*sn*-glicerol). No se encontró ningún efecto de los diglicéridos probados sobre la actividad acetiltransferasa y la liberación de β -glucuronidasa. Tan sólo se observó un aumento del contenido del PAF de las muestras, cuando se incubaron las células en presencia de dosis crecientes de 1-O-hexadecil-2-acetil-*sn*-glicerol, efecto no observado cuando se utilizó dioleína.

Este hecho fue analizado con más profundidad, puesto que se ha descrito que los diglicéridos pueden activar las plaquetas y producir la liberación de serotonina. En experimentos en los que añadimos 1-O-hexadecil-2-acetil-*sn*-glicerol a plaquetas de conejo, observamos la liberación de serotonina en un proceso aparentemente relacionado con la estimulación a través del receptor del PAF, puesto que se inhibe por un antagonista del receptor del PAF: PCA 4248.

La interpretación más factible de estos resultados sería que tanto el PAF como el 1-O-hexadecil-2-acetil-*sn*-glicerol estarían activando las plaquetas a través del mismo receptor. Por tanto, el aumento del contenido del PAF observado en estos experimentos se debería a una interferencia de la actividad residual de esta molécula en el bioensayo.

Con el fin de determinar si el efecto del propanolol estaba relacionado con la disminución de la acumulación de diglicérido, se intentó revertir este efecto con la adición de un diglicérido exógeno. Sin embargo, no se observó ninguna variación, y ello nos indujo a probar experimentalmente la hipótesis de que el efecto del propanolol guardase relación con la acumulación de fosfatidato.

4.3. Acido fosfatídico.

Hemos realizado estudios de dosis-respuesta, que se llevaron a cabo preincubando las células con distintas concentraciones de dilauroil-GP (1,2-dilauroil-*sn*-glicerol-fosfato) y citocalasina B durante 5 minutos, antes de la adición del fMLP.

4.3.1. Actividad acetiltransferasa.

En la figura nº 32 se muestra el efecto del dilauroil-GP (1,2-dilauroil-*sn*-glicerol-fosfato) sobre la actividad acetiltransferasa.

Podemos ver que se produce una inhibición dosis-dependiente al estimular las células en presencia de ácido fosfatídico, de forma similar a la que veíamos para el propanolol: se obtiene una inhibición del 50 % al incubar con dilauroil-GP 3×10^{-6} M (círculos negros).

No hemos aumentado más la concentración de ácido fosfatídico en el medio de incubación para evitar posibles interferencias del vehículo en que se encuentra disuelto este fosfolípido (ver Materiales y Métodos).

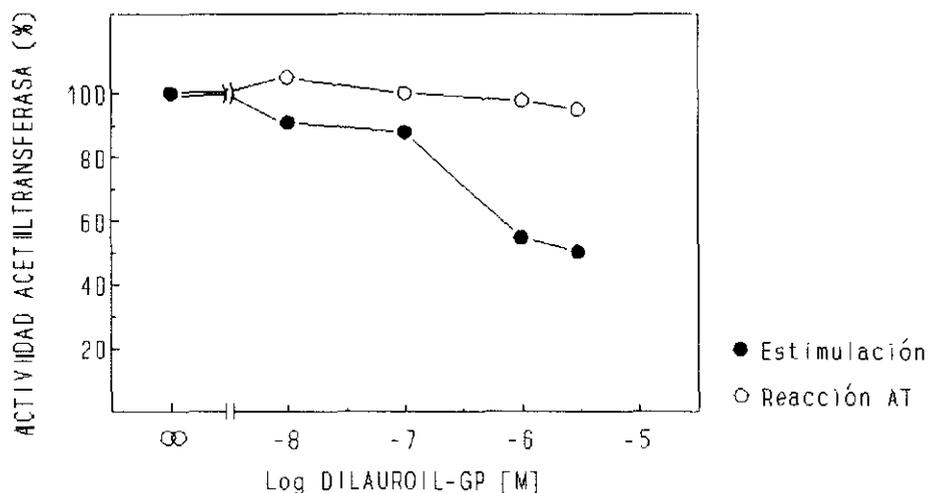


FIGURA 32: Efecto de la concentración de dilauril-GP sobre la actividad acetiltransferasa en PMNs estimulados con fMLP. Las células (5×10^6 PMNs/ml) se preincubaron 5 minutos con distintas concentraciones de dilauril-GP y citocalasina B, antes de la adición del fMLP. La reacción se deja transcurrir durante 10 minutos, tras lo cual se procede a la medida de la actividad acetiltransferasa. Círculos blancos: el ácido fosfatídico se añade directamente al medio de reacción de la acetiltransferasa. Círculos negros: el ácido fosfatídico se añade al medio de estimulación. Los resultados se expresan en % de la actividad acetiltransferasa en cada punto, tomando como 100 % la actividad acetiltransferasa detectada en las células estimuladas con CB + fMLP. Experimento representativo de otros cinco hechos por duplicado.

La inhibición por dilauril-GP no es el resultado de un efecto directo del fosfolípido sobre la acetiltransferasa, ya que al añadir dilauril-GP directamente sobre el medio en que se ensaya la actividad acetiltransferasa no se observa inhibición (círculos blancos).

4.3.2. Producción y liberación del PAF.

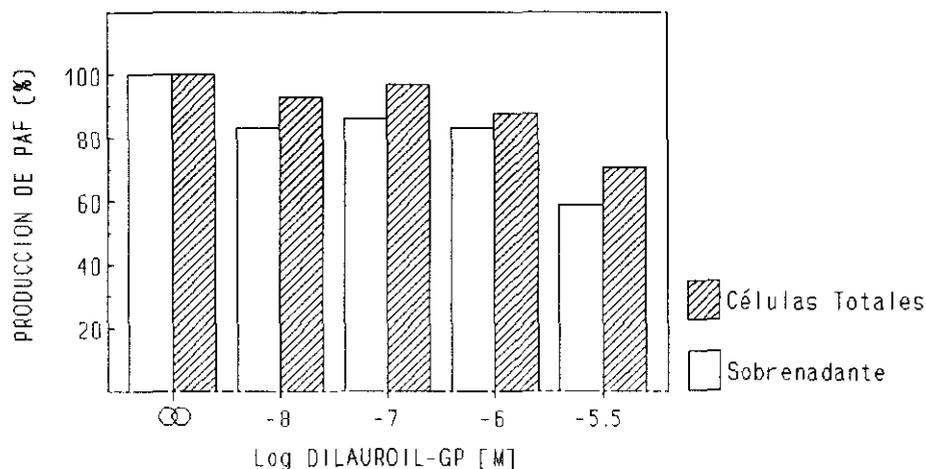


FIGURA 33: Efecto del dilauril-GP en la producción y liberación de PAF en PMNs. Las células (5×10^6 PMNs/ml) se preincubaban 5 minutos con distintas concentraciones de dilauril-GP y citocalasina B, antes de la adición del fMLP. La reacción se deja transcurrir durante 10 minutos, tras lo cual se procede a la estimación del PAF por bioensayo en plaquetas. Barras blancas: PAF liberado al medio extracelular (sobrenadante). Barras diagonales: PAF total producido por las células (células totales). Los resultados se expresan en % de la producción total o liberación de PAF en cada punto, tomando como 100 % la medida obtenida para células estimuladas con CB + fMLP. Experimento representativo de otros cuatro hechos por duplicado.

El ácido fosfatídico también produce una inhibición dosis-dependiente de la síntesis y liberación del PAF, aunque menos marcada que en el caso de la acetiltransferasa: al incubar las células en presencia de dilauril-GP 3×10^{-6} M, se obtiene una inhibición del 30 % en la producción total, y del 40 % en la liberación del PAF al medio extracelular (Figura nº 33).

A diferencia del efecto observado con el propanolol, el ácido fosfatídico inhibe en mayor grado la liberación del mediador que su producción, aunque la diferencia entre ambas inhibiciones es reducida.

Hemos probado si utilizando otras especies de ácido fosfatídico, así como un ácido liso-fosfatídico, se consigue el mismo efecto inhibitorio.

TABLA II

Efecto inhibitorio de diferentes especies moleculares de ácido fosfatídico y liso-fosfatídico sobre la actividad acetiltransferasa y producción del PAF en PMNs inducida por fMLP.

| Especie molecular | IC ₅₀ | |
|-------------------------------|------------------|----------------------|
| | Producción PAF | A. Acetiltransferasa |
| 1-estearoil-2-araquidonoil-GP | 5 μ M | 5 μ M |
| 1,2-dilauroil-GP | 9 μ M | 10 μ M |
| 1,2-dioleoil-GP | 9 μ M | 8 μ M |
| 1-oleoil-2-liso-GP | > 100 μ M | > 100 μ M |

Las distintas especies de PA y liso-PA se añaden junto con la citocalasina B, 5 minutos antes de la adición de fMLP. Los valores de IC₅₀ se obtienen por interpolación en una curva de inhibición frente al logaritmo de la concentración. Los resultados representan los valores medios de cuatro experimentos realizados por duplicado.

En la tabla II podemos ver los IC_{50} de tres especies de ácido fosfatídico y una de liso-fosfatídico en cuanto a su capacidad para inhibir tanto la acetiltransferasa como la producción del PAF.

Se observa que todas las especies de ácido fosfatídico ensayadas producen inhibición con una potencia bastante similar, según se deduce al comparar sus IC_{50} . Sin embargo, el ácido liso-fosfatídico (1-oleoil-2-liso-GP) no manifiesta este efecto.

4.3.3. Liberación de β -glucuronidasa.

En la figura nº 34 podemos ver el efecto del dilauroil-GP sobre la liberación de β -glucuronidasa.

También vemos una inhibición de esta respuesta del neutrófilo, aunque es menos importante que la observada en la activación de la acetiltransferasa, producción y liberación del PAF: se consigue una inhibición de sólo un 20 % al incubar las células en presencia de dilauroil-GP 3×10^{-6} M.

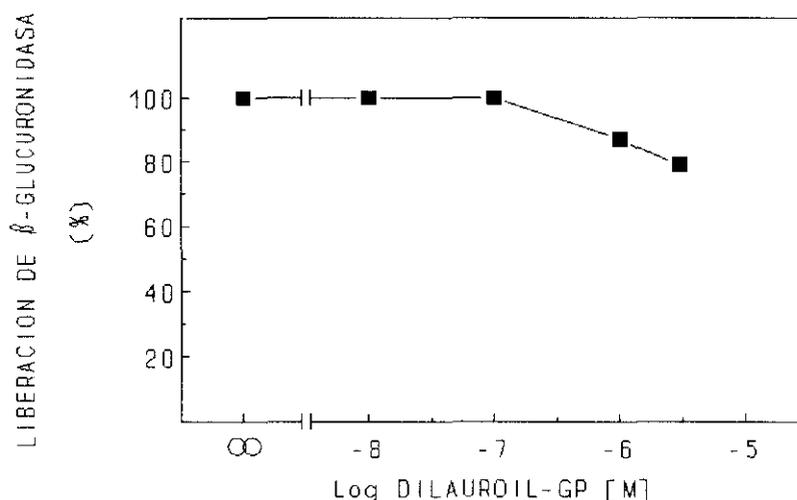


FIGURA 34: Efecto del dilauril-GP en la liberación de β -glucuronidasa en PMNs. Las células (5×10^6 PMNs/ml) se preincubaban durante 5 minutos con distintas concentraciones de dilauril-GP y citocalasina B, antes de la adición del fMLP. La reacción se deja transcurrir durante 10 minutos, tras lo cual se procede a la medida de la β -glucuronidasa en el sobrenadante. Los resultados se expresan en % de la liberación de β -glucuronidasa en cada punto, tomando como 100 % la liberación obtenida en células estimuladas con CB + fMLP. Experimento representativo de otros cuatro hechos por duplicado.

4.3.4. Flujos de calcio.

En la figura nº 35 podemos ver que el ácido fosfatídico, a concentraciones a las que produce inhibición de la actividad acetiltransferasa y producción del PAF, no es capaz de modificar el incremento de la concentración de calcio intracelular producida por fMLP.

A la vista de estos resultados, una gran parte de los efectos del propanolol podría explicarse por la acumulación de ácido fosfatídico, aunque este fosfolípido tenga menor potencia que el propanolol.

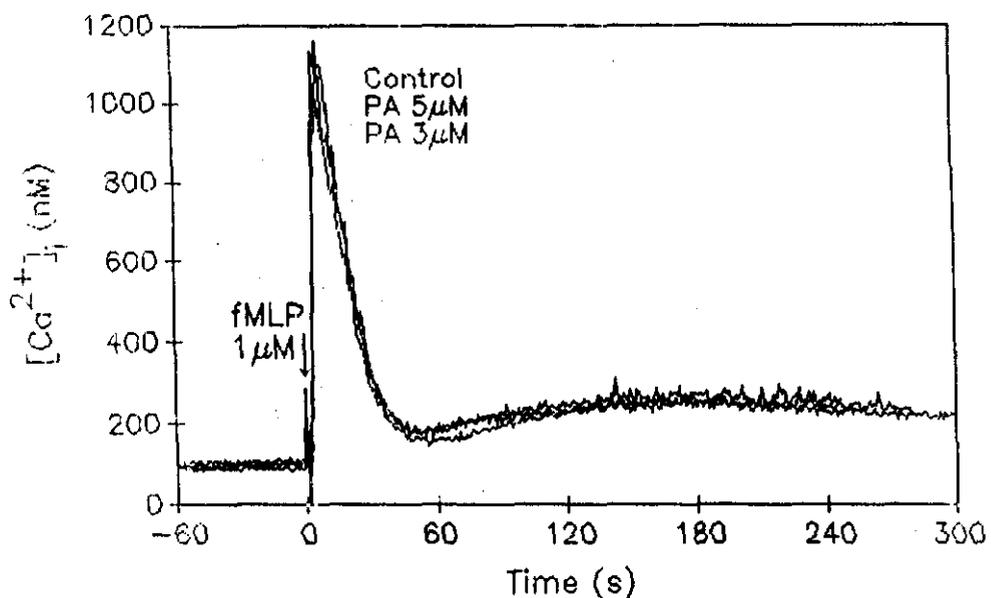


FIGURA 35: Medida de la concentración de calcio intracelular en la estimulación de PMNs con fMLP. Efecto del dilauril-GP. Las células (5×10^8 PMNs/ml) previamente cargadas con fura-2 se preincubaban con citocalasina B y distintas concentraciones de dilauril-GP durante 5 minutos, y luego se estimulan con fMLP. La adición de fMLP se marca con una flecha en la figura.

5. VIAS ALTERNATIVAS DE LA SINTESIS DEL PAF: ACTIVIDAD TRANSACILASA CoA-INDEPENDIENTE.

La síntesis del PAF en neutrófilos se produce a través de la vía de la remodelación, que usualmente se explica a través de la hidrólisis de 1-alkil-2-acil-GPC a 1-alkil-2-liso-GPC (liso-PAF) por la acción de la fosfolipasa A₂, seguida de la acetilación en posición *sn*-2 del lisofosfolípido por la acetil-CoA:liso-PAF acetiltransferasa.

En la estimulación de los neutrófilos con fMLP y citocalasina B hemos observado que se produce la activación de la acetiltransferasa, y concomitantemente, la síntesis del PAF. Sin embargo, respecto al primer paso de la vía de la remodelación, no hemos observado la activación de una fosfolipasa A₂ asociada a membrana, que pueda ser la responsable de la hidrólisis de fosfatidilcolina a liso-PAF. La única fosfolipasa A₂ detectada tiene características similares a una enzima de origen lisosomal, que se libera al medio extracelular tras la estimulación celular.

A la vista de estos resultados hemos buscado actividades enzimáticas del metabolismo de fosfolípidos que, alternativamente, pudieran ser capaces de producir el liso-PAF necesario para la síntesis del PAF.

Con este propósito hemos realizado experimentos en PMNs marcados radiactivamente con 1-[³H]-alkil-2-liso-GPC ([³H]-liso-PAF), que se incorpora con una eficiencia muy alta en la membrana celular como 1-[³H]-alkil-2-acil-GPC ([³H]-PC). Estas células marcadas se estimulan o se mantienen en reposo para ver el efecto de la estimulación sobre la hidrólisis de [³H]-PC, de manera que podamos seguir la aparición de liso-PAF y PAF a través del marcaje radiactivo.

5.1. Incorporación de [^{14}C]-acetil-CoA en PMNs marcados con 1- ^3H -alquil-2-liso-GPC.

Los neutrófilos previamente marcados con 1- ^3H -alquil-2-liso-GPC se dejan en reposo o se estimulan con fMLP y citocalasina B. A continuación, el homogeneizado celular se incuba con acetil-CoA marcado y liso-PAF, para analizar la incorporación del [^{14}C]-acetil-CoA en las distintas fracciones lipídicas (Tabla III).

En las células en reposo se observa la hidrólisis de plasmanilcolina (abreviado PC cuando no se considera necesaria una mayor precisión acerca de las subclases de glicerofosfolípidos de colina) a liso-PAF: 87.6 % de PC y 6.8 % de liso-PAF. El [^{14}C]-acetil-CoA no se incorpora en PAF, sino en la fracción de lípidos neutros (89.7 % de LN). Por tanto, vemos una vez más que es condición indispensable para la síntesis del PAF que la acetiltransferasa esté en la forma de alta actividad.

En neutrófilos estimulados con fMLP y citocalasina B se observa una mayor hidrólisis de fosfatidilcolina (77.2 %) y una menor presencia de liso-PAF: esto se debe a que este producto se está convirtiendo en PAF, lo que provoca su disminución. En cuanto a la incorporación de acetil-CoA, vemos cómo aparece en la fracción de PAF (44.5 %) y disminuye en la de lípidos neutros (52.2 %).

En este experimento medimos la radiactividad en ^3H y ^{14}C asociada a cada fracción, pero con la dificultad añadida de que el PAF formado tiene doble marcaje (1- ^3H -alquil-2- ^{14}C -acetil-GPC), y bajo estas condiciones, el marcaje en ^3H no se puede medir con precisión debido a la interferencia del marcaje en ^{14}C .

A pesar de las limitaciones, este experimento permitió definir la ruta de incorporación de acetil-CoA en condiciones de reposo y de estimulación celular, aunque no permitió precisar los aspectos cuantitativos.

TABLA III

Incorporación de [¹⁴C]-acetil-CoA en glicerofosfolípidos de colina y lípidos neutros en PMNs en reposo y estimulados con fMLP, marcados previamente con 1-[³H]-alquil-2-liso-GPC.

| | [³ H]-liso-PAF | [³ H]-[¹⁴ C]-PAF | [³ H]-PC | [¹⁴ C]-LN |
|---------------------------|----------------------------|--|----------------------|-----------------------|
| <i><u>Reposo</u></i> | | | | |
| [³ H] | 6.8 | 5.6 | 87.6 | 0 |
| [¹⁴ C] | 2.2 | 5.5 | 2.6 | 89.7 |
| <i><u>Estimulados</u></i> | | | | |
| [³ H] | 4.6 | 18.1 | 77.2 | 0 |
| [¹⁴ C] | 2.4 | 44.5 | 1.0 | 52.2 |

Los neutrófilos se marcan con 1-[³H]-alquil-2-liso-GPC y se estimulan con fMLP y citocalasina B durante 5 minutos o se dejan en reposo. A continuación, el homogeneizado celular se incuba con 0.2 μ Ci de [¹⁴C]-acetil-CoA, 100 μ M de acetil-CoA frío y 20 μ M de 1-alquil-2-liso-GPC durante 15 minutos a 37°C. La reacción se detiene y el extracto lipídico se separa por cromatografía en capa fina. Los resultados se expresan en % de las dpm totales de cada isótopo. Experimento representativo de otros dos hechos por duplicado. PC, fosfatidilcolina. LN, lípidos neutros.

Hemos puesto de manifiesto que la hidrólisis de plasmanilcolina a liso-PAF se produce tanto en reposo como durante la estimulación celular, en contra de lo que podría esperarse si existiera una fosfolipasa A_2 activable. Este resultado nos sugiere la existencia de actividades enzimáticas que pueden ser alternativas a la fosfolipasa A_2 para la producción de liso-PAF, como la transacilasa CoA-independiente. Esta enzima cataliza la transferencia de un ácido graso entre un fosfolípido que actúa como donante y un lisofosfolípido aceptor. Como producto de esta reacción se obtiene un lisofosfolípido distinto del inicial.

5.2. Desacilación de 1-[3 H]-alquil-2-acil-GPC en PMNs marcados con 1-[3 H]-alquil-2-liso-GPC.

Partimos de neutrófilos marcados radiactivamente con 1-[3 H]-alquil-2-liso-GPC, que se incorpora en 1-[3 H]-alquil-2-acil-GPC. A continuación, las células se estimulan o se dejan en reposo, y se homogeneizan para medir la hidrólisis de 1-[3 H]-alquil-2-acil-GPC en las mismas condiciones de medida de la actividad transacilasa CoA-independiente.

En la tabla IV se mide: la hidrólisis de [3 H]-PC, la producción de [3 H]-liso-PAF, la posterior acetilación a [3 H]-PAF, y el marcaje en la fracción de lípidos neutros, todo ello variando las condiciones en cada punto, es decir, añadiendo acetil-CoA y/o un lisofosfolípido aceptor. Los resultados más destacados se resumen a continuación.

TABLA IV

Desacilación de 1-[³H]-alquil-2-acil-GPC en PMNs previamente marcados con 1-[³H]-alquil-2-liso-GPC. Efecto de la estimulación con fMLP.

| | [³ H]-liso-PAF | [³ H]-PAF | [³ H]-PC | [³ H]-LN |
|------------------------------|----------------------------|-----------------------|----------------------|----------------------|
| <i>Reposo</i> | | | | |
| Sin adición | 2.0 ± 0.4 | 2.0 ± 0.4 | 90.2 ± 1.1 | 5.8 ± 0.4 |
| Alquil-liso-GPC | 5.1 ± 1.0 | 2.1 ± 0.4 | 86.3 ± 1.4 | 6.5 ± 0.5 |
| Acetil-CoA | 2.7 ± 0.6 | 2.6 ± 0.3 | 89.8 ± 1.3 | 6.2 ± 0.7 |
| Acil-liso-GPE | 4.8 ± 1.5 | 2.3 ± 0.3 | 86.4 ± 2.2 | 6.6 ± 0.9 |
| Alquil-liso-GPC + Acetil-CoA | 4.7 ± 0.9 | 2.8 ± 0.6 | 87.2 ± 1.3 | 6.4 ± 0.5 |
| Acil-liso-GPE + Acetil-CoA | 4.3 ± 0.9 | 2.1 ± 0.2 | 87.4 ± 1.4 | 6.3 ± 0.6 |
| <i>Estimulados</i> | | | | |
| Sin adición | 2.9 ± 0.4 | 3.9 ± 0.8 | 80.4 ± 1.6 | 12.8 ± 0.7 |
| Alquil-liso-GPC | 4.3 ± 0.5 | 4.2 ± 0.9 | 78.9 ± 1.3 | 12.7 ± 0.5 |
| Acetil-CoA | 3.3 ± 0.4 | 4.4 ± 0.6 | 81.4 ± 2.9 | 13.6 ± 0.8 |
| Acil-liso-GPE | 4.1 ± 0.8 | 5.3 ± 1.0 | 77.8 ± 1.9 | 12.7 ± 0.8 |
| Alquil-liso-GPC + Acetil-CoA | 3.9 ± 0.5 | 4.4 ± 0.8 | 78.7 ± 1.2 | 12.9 ± 0.5 |
| Acil-liso-GPE + Acetil-CoA | 3.6 ± 0.6 | 5.0 ± 0.9 | 77.5 ± 1.8 | 13.9 ± 1.0 |

Los neutrófilos se marcan con 1-[³H]-alquil-2-liso-GPC y se estimulan con fMLP y citocalasina B durante 5 minutos o se dejan en reposo. El homogeneizado celular se incuba con 100 μM de acetil-CoA y/o 20 μM de liso-fosfolípido (según se indica en cada caso) durante 15 minutos. Luego, se para la reacción, se extraen los lípidos y se separan por TLC. Los datos se dan en % de dpm totales. Los resultados se expresan como la media ± SEM de cinco experimentos hechos por duplicado. PC, fosfatidilcolina. LN, lípidos neutros.

- . Hidrólisis de [³H]-PC.- Se produce tanto en células en reposo como estimuladas, aunque es mayor en este último caso.

- . Producción de [³H]-liso-PAF.- Como en el caso anterior, se produce tanto en células en reposo como estimuladas con fMLP, pero se detecta mejor en neutrófilos en reposo, ya que durante la estimulación desaparece para formar el PAF. En ambos casos se observa un aumento en la aparición de liso-PAF al añadir un lisofosfolípido al medio de reacción: en estas condiciones estamos favoreciendo la reacción catalizada por la transacilasa CoA-independiente.

- . Producción de [³H]-PAF.- No hay síntesis del PAF en células en reposo, aunque haya liso-PAF disponible. Sin embargo, en células estimuladas, hay producción del PAF, que se aumenta ligeramente al añadir acetil-CoA y/o lisofosfolípidos al medio de reacción.

- . Marcaje en lípidos neutros.- observamos que se duplica el marcaje en esta fracción durante la estimulación celular, sin que varíen los porcentajes por la adición de acetil-CoA o lisofosfolípidos.

Por tanto, vemos que se produce liso-PAF en las condiciones en las que se mide la transacilasa CoA-independiente, es decir, en ausencia de calcio extracelular. De todas formas, estos experimentos no permiten afirmar de forma unívoca que ésta molécula haya podido aparecer por la acción de la transacilasa, y la acción de una fosfolipasa A₂ no se descarta en estas condiciones experimentales.

Habría que comprobar que en estas condiciones se mide la actividad transacilasa CoA-independiente y no la actividad fosfolipasa A₂.

5.3. Medida de la actividad transacilasa CoA-independiente.

Para medir esta actividad enzimática partimos de neutrófilos sin marcar, estimulados o en reposo.

TABLA V

Actividad transacilasa CoA-independiente en PMNs en reposo o estimulados con fMLP.

| | [³ H]-liso-PAF | [³ H]-PC |
|---|----------------------------|----------------------|
| <u>Reposo</u> | | |
| Sin adición | 94.3 ± 0.7 | 1.1 ± 0.2 |
| [³ H]-Alquil-liso-GPC + Alquil-liso-GPC | 94.2 ± 0.6 | 1.6 ± 0.4 |
| [³ H]-Alquil-liso-GPC + Acil-liso-GPE | 86.8 ± 3.7 | 8.5 ± 3.9 |
| <u>Estimulados</u> | | |
| Sin adición | 95.1 ± 0.5 | 0.8 ± 0.1 |
| [³ H]-Alquil-liso-GPC + Alquil-liso-GPC | 94.5 ± 0.3 | 1.2 ± 0.2 |
| [³ H]-Alquil-liso-GPC + Acil-liso-GPE | 90.5 ± 1.3 | 5.3 ± 1.6 |

Los neutrófilos no marcados se estimulan con fMLP y citocalasina B durante 5 minutos o se dejan en reposo. A continuación, el homogeneizado celular se incuba con 0.2 μ Ci de 1-[³H]-alquil-2-liso-GPC y 20 μ M de liso-fosfolípido (según se indica en cada caso) durante 15 minutos a 37°C. Luego se detiene la reacción, se extraen los lípidos y se separan por cromatografía en capa fina. Los datos se dan en % de las dpm totales. Los resultados se expresan como la media \pm SEM de cuatro experimentos hechos por duplicado. PC, fosfatidilcolina.

Al homogeneizado celular se añade un lisofosfolípido marcado radiactivamente (1-[³H]-alquil-2-liso-GPC) que sirva como aceptor del ácido graso transferido, de forma que como producto de la reacción aparezca fosfatidilcolina marcada (1-[³H]-alquil-2-acil-GPC).

En la tabla V vemos que esta enzima se mide tanto en células en reposo como estimuladas con fMLP y citocalasina B. Esta es una característica de esta actividad enzimática, que no es activable y por tanto, posee actividad en condiciones basales.

También podemos observar que es mejor aceptor del ácido graso la lisofosfatidiletanolamina que el liso-PAF: 8.5 ± 3.9 % de [³H]-PC en células en reposo incubadas con liso-fosfatidiletanolamina, frente a 1.6 ± 0.4 % en células incubadas con liso-PAF.

5.4. Desacilación de 1-radil-2-[³H]-araquidonoil-GPC en PMNs marcados con ácido [³H]-araquidónico.

Hemos visto en los apartados anteriores que se produce liso-PAF en condiciones en las que se mide la transacilasa CoA-independiente. Pero este liso-PAF también podría proceder de la acción de la fosfolipasa A₂. Por tanto, hay que analizar si en esas condiciones se observa liberación de ácido araquidónico, como consecuencia de la actividad fosfolipasa A₂. Para ello, se emplearon PMNs cuyo *pool* de 1-radil-2-araquidonoil-GPC se marcó por incubación con ácido [³H]-araquidónico.

En la tabla VI vemos que la liberación basal de ácido araquidónico no se modifica ni por el estado de reposo o estimulación de la célula, ni por la adición de lisofosfolípidos exógenos.

TABLA VI

Desacilación de 1-radil-2-[³H]-araquidonil-GPC en PMNs previamente marcados con ácido [³H]-araquidónico: efecto de la estimulación con fMLP.

| | [³ H]-PC | A. [³ H]-araquidónico |
|--------------------|----------------------|-----------------------------------|
| <u>Reposo</u> | | |
| Sin adición | 86.0 ± 2.9 | 14.0 ± 2.9 |
| Alquil-liso-GPC | 86.9 ± 1.9 | 13.1 ± 1.9 |
| Acil-liso-GPE | 86.6 ± 1.5 | 13.4 ± 1.5 |
| <u>Estimulados</u> | | |
| Sin adición | 85.2 ± 1.1 | 14.8 ± 1.1 |
| Alquil-liso-GPC | 84.9 ± 1.0 | 15.1 ± 1.0 |
| Acil-liso-GPE | 83.8 ± 0.9 | 16.1 ± 0.9 |

Los neutrófilos se marcan con ácido [³H]-araquidónico y se estimulan con fMLP y citocalasina B durante 5 minutos o se dejan en reposo. A continuación, el homogeneizado celular se incuba con 20 μ M de liso-fosfolípido (según se indica en cada caso) durante 15 minutos a 37°C. Los lípidos se separan por cromatografía en capa fina. Los datos se dan en % de las dpm totales. Los resultados se expresan como la media \pm SEM de cuatro experimentos hechos por duplicado. PC, fosfatidilcolina.

Estos resultados sugieren que en las condiciones de ensayo, la fosfolipasa A₂ parece no ser la responsable de la aparición de liso-PAF, y que por lo tanto deben considerarse actividades enzimáticas alternativas, como la actividad transacilasa CoA-independiente, que puedan dar cuenta de la producción de liso-PAF en este sistema.

V. DISCUSSION

1. ESTIMULACION DE LOS NEUTROFILOS CON fMLP.

Este trabajo experimental se ha llevado a cabo estimulando los leucocitos polimorfonucleares humanos con el péptido formilado fMLP, un agonista fisiológico que actúa a través de la unión a su receptor específico.

- **N-formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLP).**- los oligopéptidos N-formilados constituyen una familia de compuestos aislados inicialmente del sobrenadante de cultivos bacterianos, pero que se encuentran también en eucariontes. El fMLP es el péptido formilado sintético más estudiado, y se piensa que es la molécula que mejor reproduce el comportamiento biológico de esta familia de compuestos.

La unión del fMLP a su receptor específico en los neutrófilos induce varias respuestas celulares:

- . Aparición de pseudópodos a los 2.5 segundos de la estimulación (células adherentes) o alteración de la superficie celular (células en suspensión).
- . Fosforilación de miosina.
- . Cambios en el estado de polimerización de los microtúbulos, que conduce al aumento de su longitud.
- . Quimiotaxis.
- . Liberación del contenido granular.
- . Producción de radicales del oxígeno.
- . Liberación de ácido araquidónico.

En la transducción de estas respuestas juegan un papel importante el estado de polarización de la membrana plasmática, las variaciones en la concentración de calcio intracelular y en los niveles de AMP_c.

- **Receptor del fMLP.**- este receptor se encuentra tanto en la membrana plasmática como en membranas internas. Se han detectado distintas formas del receptor, con distinto peso molecular y punto isoeléctrico.

Está fuertemente anclado a la membrana. Posee un sitio de ruptura por papaína, lo que no implica la pérdida de la actividad biológica. También tiene puntos de ruptura para otras proteasas en el tallo citoplasmático, y dos sitios de glicosilación, que se encuentran en la porción extracelular del receptor.

Hay mucha discrepancia en la literatura en cuanto al número de receptores por célula y al estado de afinidad de éstos en los neutrófilos humanos. Se piensa que estas variaciones se deben a modificaciones en el aislamiento de las células o en el ensayo de unión al receptor. Tennenberg y col. (152) han encontrado un sólo tipo de receptores de alta afinidad (unos 6000 receptores por célula) con una $K_d = 15.5$ nM, en neutrófilos humanos aislados y mantenidos a 4°C.

El receptor parece estar acoplado a proteínas G (la unión del fMLP al receptor se inhibe con el análogo no hidrolizable del GTP, y además, es sensible a la toxina de Pertussis) (153).

Hemos estudiado la respuesta de los neutrófilos a la estimulación con fMLP en diversos aspectos:

- Actividad acetiltransferasa.
- Producción y liberación del PAF.
- Liberación de β -glucuronidasa.

1.1. Actividad acetil-CoA:liso-PAF acetiltransferasa, producción total y liberación del PAF y de enzimas lisosomales. Estudios de dosis-respuesta en neutrófilos estimulados con fMLP.

Los estudios de dosis-respuesta con fMLP llevados a cabo en presencia de citocalasina B han puesto de manifiesto que se produce la activación de la enzima acetiltransferasa responsable de la síntesis del PAF por la vía de la remodelación. De forma coincidente con este hecho se observa la síntesis del PAF y su liberación, así como la de enzimas lisosomales (liberación de β -glucuronidasa). En todos los casos, la respuesta obtenida es dependiente de la dosis del estímulo, de forma que la concentración óptima de fMLP es de 10^{-6} M (Figuras 5, 6, 8 y 10).

En comparación con otros agonistas, observamos una actividad acetiltransferasa similar a la obtenida por otros autores en estas mismas células utilizando el ionóforo de calcio A23187 como agonista (122 ± 24 pmol/min. 10^7 PMNs al estimular durante 10 minutos con $10 \mu\text{M}$ de ionóforo A23187) (26). En cambio, la producción total del PAF es menor con fMLP que utilizando como agonistas ionóforo A23187 o zimosán (entre 40 y 50 ng equivalentes de PAF/ 10^7 PMNs al estimular durante 45 minutos con 2 mg/ml de zimosán opsonizado o $5 \mu\text{M}$ de ionóforo de calcio A23187 (30,154).

Por tanto, obtenemos una actividad similar de acetiltransferasa pero una menor síntesis del PAF. Esto puede ser debido a que falte uno de los sustratos necesarios para la síntesis o bien, a que la disponibilidad de éstos esté regulada de una forma distinta con otros agonistas.

El primer aspecto que llama la atención es la necesidad de preincubar las células con citocalasina B para iniciar la respuesta de los polimorfonucleares. Este hecho tiene varias interpretaciones posibles: facilitación por la citocalasina B de la exposición de receptores en la superficie del polimorfonuclear, relacionado con la distribución de éstos entre la membrana plasmática y las membranas internas; o interferencia de la citocalasina B con la transducción de la señal. Este efecto es similar al denominado mecanismo de *priming* o pre-estimulación de las células, de manera que se aumenta su respuesta al estímulo.

En este sentido puede mencionarse que el *priming* se ha relacionado con mecanismos implicados en la movilización de iones calcio (155), activación de la fosfolipasa D y acumulación de diglicéridos (156,157), y con fosforilación de tirosinas (158). Como veremos más adelante, una parte importante de este estudio ha ido dirigida a relacionar el efecto de la citocalasina B sobre la síntesis del PAF con la movilización del calcio, sobre la base de la abundante bibliografía que destaca la dependencia de la actividad de las enzimas implicadas en la biosíntesis del PAF de los iones calcio; y asimismo, por el papel de los mecanismos de fosforilación dependientes de calcio en el paso de la forma de baja actividad de la acetiltransferasa a la de alta actividad.

Hay otros autores que han observado la síntesis del PAF utilizando fMLP como estímulo (104,108,159). En todos estos casos, es necesario añadir citocalasina B al medio de reacción para poder detectar la síntesis del mediador. Sólo en un caso se ha encontrado producción del PAF con fMLP en ausencia de citocalasina B: en neutrófilos peritoneales de conejo estimulados con una concentración subóptima de fMLP (10^{-8} M) (106). Estas células están pre-estimuladas *in vivo*, con lo cual se explica que se pueda observar síntesis del PAF en ausencia de citocalasina B.

En cuanto a la liberación del PAF sintetizado en respuesta a la estimulación con fMLP, se observa en la figura n° 8 que se produce esta liberación al medio extracelular en un proceso dependiente de la dosis del agonista.

Como ya se ha comentado en la Introducción (Retención intracelular del PAF), éste es un aspecto muy estudiado en distintos tipos celulares. Frente a los estudios iniciales en los que se observaba la retención intracelular del mediador, se ha visto más recientemente que el PAF se libera al medio externo, pero no en su totalidad. Aunque se ha descrito que el PAF también juega un papel como segundo mensajero intracelular, cada vez es más aceptado que el PAF se libera al medio externo.

El PAF se produce y se libera como consecuencia de la estimulación de las células, ya que este hecho se observa con estímulos particulados, no particulados o con agonistas que actúan vía receptor.

La observación de la liberación de este mediador depende de las condiciones de experimentación: tipo celular, especie, agonista, estado de adherencia, movimiento transmembrana de los fosfolípidos, presencia de albúmina, pH, calcio y densidad celular.

Nosotros observamos que los neutrófilos estimulados con citocalasina B y fMLP 10^{-6} liberan al medio externo el 40 % del PAF sintetizado (0.47 ng equivalentes de PAF/ 5×10^6 PMNs).

Aunque la mayor parte quede retenido en la célula, el fMLP es un estímulo capaz de liberar el PAF en mayor concentración que el resto de los agonistas utilizados en estas células, como el ionóforo de calcio A23187, partículas de zimosán opsonizado, etc.

Esta cantidad del PAF liberada es suficiente para que la molécula pueda ejercer su función como mediador de la inflamación y como mensajero intercelular, produciendo respuestas en otros tipos celulares presentes en el tejido dañado.

1.2. Actividad acetil-CoA:liso-PAF acetiltransferasa, producción total y liberación del PAF y de enzimas lisosomales. Estudios cinéticos en neutrófilos estimulados con fMLP.

En el estudio cinético (Figuras 7, 9 y 11) observamos que la activación de la acetiltransferasa y liberación de β -glucuronidasa son muy tempranas (30 segundos), y ambas anteceden a la síntesis del PAF (máximo a los 10 minutos de incubación). Por tanto, la estimulación de las células con este agonista es muy rápida, más que la obtenida al estimular los neutrófilos con 2 mg/ml de zimosán o con 5 μ M de ionóforo A23187 (máxima actividad acetiltransferasa a los 10 minutos y 5 minutos de incubación respectivamente) (154).

La diferencia de tiempo entre la máxima activación de la acetiltransferasa y la producción del PAF nos indican la existencia de un período de latencia entre la activación de esta enzima y la síntesis del mediador. Sin embargo, la liberación del PAF es máxima a los 5 minutos de incubación, con lo cual, la célula no espera a tener una síntesis del PAF elevada para comenzar su liberación, sino que ésta empieza durante este período de latencia. Así, el PAF puede ir ejerciendo su papel en el exterior, de forma que la comunicación entre las células sea lo más rápida posible.

La síntesis del PAF y la activación de acetiltransferasa se mantienen paralelas hasta los 30 minutos, aunque a partir de los 10 minutos de incubación ambas respuestas comienzan a disminuir.

La cinética de liberación del PAF y de enzimas lisosomales es diferente (el máximo de liberación de β -glucuronidasa antecede al máximo de liberación del PAF). Esto nos indica que el PAF no es un constituyente de los gránulos (ni soluble ni unido a las membranas), y por consiguiente, la liberación del mediador no es una consecuencia de la liberación de las enzimas lisosomales, aunque todos los estímulos que provocan degranulación también producen la formación del PAF.

Por tanto, vemos aquí la diferencia entre distintos agonistas: aunque el zimosán y el ionóforo A23187 son más potentes que el fMLP en cuanto a la síntesis del PAF, el fMLP es más rápido que ambos y más potente en la liberación del mediador al medio extracelular.

En el estudio cinético también queda patente la necesidad de la presencia de la citocalasina B para poder observar la estimulación celular.

1.3. Variabilidad en la medida de la actividad acetiltransferasa y de la síntesis del PAF.

Hemos encontrado una gran variación en las respuestas de los PMNs en cuanto a la concentración del PAF sintetizado y a la actividad acetiltransferasa obtenidas al utilizar neutrófilos de distintos donantes, e incluso dentro del mismo donante en experimentos realizados en distintos días. Esta variación se ha observado más claramente en la intensidad de la respuesta detectada que en una variación de los patrones cinéticos.

Este hecho ya ha sido referido por otros autores (104,108,112,160) en PMNs humanos estimulados con distintos agonistas (fMLP, zimósán o ionóforo A23187). De ello se deduce que estos resultados no dependen del estímulo ni del método utilizado en el aislamiento de las células, puesto que se han observado bajo distintas condiciones experimentales.

El mecanismo por el cual se produce esta variación es desconocido, ya que en todos los casos se han elegido donantes sanos dentro de un grupo de edad homogéneo. Quizá este hecho refleja la distinta capacidad de estimulación de las células, o bien, el distinto estado basal de los neutrófilos, que en algunos casos, pueden estar pre-estimulados aunque el individuo se encuentre aparentemente sano.

2. INVESTIGACION DE POSIBLES MOLECULAS QUE PUEDAN DESEMPEÑAR EL PAPEL DE LA CITOCALASINA B. EFECTO DEL FACTOR DE NECROSIS TUMORAL ALFA (TNF- α).

Hemos observado que todas las respuestas del neutrófilo al fMLP necesitan que la citocalasina B esté presente en el medio de reacción. De alguna manera, la citocalasina B está pre-estimulando a las células, de forma que tras la adición del segundo estímulo, el neutrófilo es capaz de producir una respuesta completa.

Hay otros autores que han encontrado que la estimulación de los neutrófilos humanos con fMLP necesita de la presencia de citocalasina B (104,159,161,162). En todos los casos se observa que no existe respuesta de las células ni al fMLP ni a la citocalasina B por separado, mientras que si la hay cuando las dos moléculas están presentes en el medio de incubación.

Las citocalasinas son un grupo de metabolitos de bajo peso molecular que provienen de los hongos, y ejercen una gran variedad de efectos en células de mamíferos. Se pueden dividir en dos categorías principales:

- C,D y E: se unen sólo a sitios de baja actividad.
- A y B: se unen tanto a sitios de alta como de baja actividad.

Todas las citocalasinas inhiben la polimerización de la actina y provocan el desensamblaje de los microfilamentos en células eucarióticas intactas: las citocalasinas se unen al extremo en crecimiento del polímero de actina de forma independiente de calcio, de manera que se reduce la longitud de los filamentos (163).

Pueden tanto inhibir como activar respuestas de leucocitos estimulados: inhiben quimiotaxis, citoquinesis y fagocitosis; y estimulan la secreción, prolongan la explosión oxidativa inducida por péptidos quimiotácticos y aumentan la estimulación mitogénica (164).

Los agentes que alteran el citoesqueleto celular aumentan las señales celulares. Hay evidencia de que el citoesqueleto interacciona con el receptor de fMLP, y que la función del receptor se correlaciona inversamente a esta asociación. La citocalasina B rompe esta unión, de forma que potencia la respuesta del fMLP. Otra de las acciones de las citocalasinas consiste en que son capaces de aumentar la concentración de calcio intracelular.

Deben existir *in vivo* otras moléculas que pre-estimulen el neutrófilo igual que lo hace la citocalasina B *in vitro*, ya que este compuesto no es fisiológico. Un grupo de moléculas que podría desempeñar ese papel en condiciones fisiológicas es la familia de las citoquinas, pues su participación en el reclutamiento y potenciación de las respuestas inflamatorias está bien documentado.

El hecho de haber considerado como candidato más probable al TNF- α , se ha debido a su carácter de molécula polifuncional y a que se ha descrito su capacidad para potenciar las respuestas del neutrófilo a estímulos tanto solubles como particulados.

El factor de necrosis tumoral (TNF) es una familia, que incluye dos proteínas muy relacionadas estructural y funcionalmente: TNF- α o caquectina y TNF- β o linfotoxina. El TNF- α es producido principalmente por monocitos y macrófagos, mientras que el TNF- β es producto de las células linfoides. Ambos son capaces de unirse a las células a través de los mismos receptores de membrana, y tienen un espectro de actividades muy similar (165).

La pre-estimulación de neutrófilos con TNF- α se caracteriza por la *potenciación de una serie de respuestas de estas células: producción de ión superóxido, adherencia a células endoteliales, migración, liberación de enzimas lisosomales, traslocación de la proteína quinasa C a la membrana y activación de las fosfolipasas C y D. La transducción de estas señales se ha relacionado con la proteína quinasa C, con tirosina quinasas e incluso con la hidrólisis de esfingolípidos por esfingomielinasa neutra.*

Sin embargo, existe gran controversia en cuanto al efecto del TNF- α en los neutrófilos. En algunos casos se ha descrito que es capaz de activar las células actuando como único agonista, pero en otros casos se ha descrito sólo su capacidad para favorecer la respuesta a otros estímulos, a modo de efecto *priming*.

Varios autores han descrito la pre-estimulación de los leucocitos polimorfonucleares con TNF- α : Utsumi y col. (166) documentan que existe *pre-estimulación con TNF- α y GM-CSF de los neutrófilos humanos estimulados con fMLP en cuanto a la producción de ión superóxido.*

Petersen y col. (167) observan la pre-estimulación con TNF- α en neutrófilos humanos estimulados con zimósán opsonizado en cuanto a la producción de LTB₄. Bauldry y col. (156) han estudiado la pre-estimulación con TNF- α de neutrófilos humanos estimulados con fMLP en ausencia de citocalasina B en cuanto a la producción de ión superóxido.

Estos autores han encontrado que el TNF- α es capaz de suplir el efecto de la citocalasina B, produciendo un aumento en la producción de ión superóxido y en la activación de la fosfolipasa D.

Nuestros resultados indican que el TNF- α por si solo, o combinado con fMLP, no es capaz de sustituir los efectos de la citocalasina B. En ambos casos, tanto la actividad acetiltransferasa, como la síntesis del PAF y liberación de enzimas lisosomales están al mismo nivel que el control (Figuras 20, 21 y 22). Tampoco se observa ningún efecto al incubar las células con TNF- α a concentraciones subóptimas de fMLP (10^{-8} M).

Al preincubar las células con TNF- α en presencia de fMLP y citocalasina B se observa un aumento en la activación de la acetiltransferasa y en la síntesis del PAF (sobre todo en esta última) con respecto a la respuesta obtenida en ausencia de TNF- α . Bauldry y col. (168) también observan un aumento en la producción del PAF y LTB₄ en PMNs preincubados con TNF- α y estimulados con citocalasina B y fMLP.

La liberación de β -glucuronidasa apenas aumenta al preincubar los neutrófilos con TNF- α , quizás porque esta liberación ya ha alcanzado el máximo al estimular con CB + fMLP. O'Flaherty y col. (169) observan un ligero aumento en la liberación de β -glucuronidasa al preincubar los neutrófilos humanos con TNF- α y estimularlos con citocalasina B y fMLP, a la vez que encuentran un aumento en el número de receptores para fMLP. Estos autores sugieren que el TNF- α está pre-estimulando las células por un aumento en el número de receptores para el estímulo.

Este resultado sugiere que los neutrófilos pueden estimularse por distintos agonistas, de los cuales sólo algunos serían capaces de producir una respuesta completa.

Esto nos da una idea de lo complicada que puede ser la interrelación de las distintas citoquinas *in vivo* y de su capacidad de colaboración en cuanto a la activación celular. El TNF- α no sería la citoquina responsable de la estimulación heteróloga de los neutrófilos en nuestro sistema, y por lo tanto, no es capaz de emular los efectos de la citocalasina B.

Se ha observado la pre-estimulación de los polimorfonucleares con otras citoquinas: Wirthmueller y col. (160) encuentran que se produce este efecto con GM-CSF en neutrófilos humanos estimulados con fMLP para producir PAF. En experimentos no mostrados, hemos sido incapaces de reproducir ese hecho, y dado que el número de citoquinas que habría de probar en este sistema es extraordinariamente elevado, no parece razonable insistir en estos estudios sin estudios adicionales que faciliten la tarea.

Dahinden y col. (170) también encuentran que el GM-CSF aumenta la activación de los PMNs humanos estimulados con fMLP en cuanto a la síntesis de leucotrienos. En este mismo sentido, Worthen y col. (171) observan que el lipopolisacárido bacteriano pre-estimula los PMNs humanos estimulados con fMLP para producir PAF de forma tiempo y dosis-dependiente.

Como ejemplo de esta complejidad debe mencionarse que el efecto *priming* de la endotoxina bacteriana y de algunas citoquinas sólo se observa cuando los experimentos se realizan en sangre completa, o cuando el medio se suplementa con una proteína sérica que actúa como cofactor (172).

3. VIAS METABOLICAS INVOLUCRADAS EN LA BIOSINTESIS DE MEDIADORES LIPIDICOS POR LOS PMNs.

La hipótesis de partida consideraba la fosfolipasa A₂ como posible enzima limitante de la síntesis del PAF por la vía de remodelación, puesto que verosímilmente sería responsable de la formación de liso-PAF. La medida de esta enzima ha sido abordada de formas distintas, en la abundante bibliografía dedicada al tema.

En algunos casos se ha considerado que la liberación del ácido araquidónico es sinónimo de esta actividad, dado que este ácido se encuentra principalmente esterificado en la posición *sn*-2 de los glicerofosfolípidos de colina y de etanolamina, y la activación de los PMNs por agonistas completos como el ionóforo de calcio A23187 conduce a la formación simultánea del PAF y metabolitos del ácido araquidónico. Estos estudios, sin embargo, no consideran la posibilidad de que la activación de los PMNs conduzca a la producción simultánea, pero por distintas vías metabólicas, de las dos familias de mediadores lipídicos. Por otro lado, la medida de la actividad fosfolipasa A₂, plantea notables diferencias con la medida de enzimas activas sobre sustratos solubles a los que se puede aplicar el formalismo de Michaelis-Menten.

En estos experimentos hemos elegido como sustrato membranas de *Escherichia coli* marcadas con ácido [¹⁴C]-oléico, puesto que la mayoría de las fosfolipasas A₂ son activas sobre este sustrato, en el que el fosfolípido se encuentra dispuesto en una bicapa en configuración similar a la que se da *in vivo*. En cualquier caso, y como se menciona en los Resultados, hemos utilizado otros sustratos, pero no hemos conseguido detectar esta actividad en fracciones de PMNs más que al utilizar membranas de *E. coli*.

Al medir la fosfolipasa A_2 en neutrófilos estimulados con fMLP (Figuras 12 y 14), encontramos más actividad en sobrenadante que en homogeneizado. En ambos casos, la actividad específica detectada es bastante reducida.

Sólo observamos activación de la fosfolipasa A_2 en el sobrenadante, aunque no se observa una dependencia clara con la concentración del estímulo. Por tanto, la enzima que estamos midiendo es capaz de secretarse al medio extracelular.

Al encontrar una actividad fosfolipasa A_2 tan pequeña, decidimos probar a estimular los neutrófilos con otro agonista, con el fin de comprobar si el resultado obtenido dependía del estímulo utilizado, o si por el contrario, era una característica del sistema. Para ello, estimulamos los neutrófilos con partículas de zimosán opsonizado (Figuras 13 y 15).

Con este agonista medimos una actividad fosfolipasa A_2 mayor que con fMLP, pero la distribución celular de la enzima es la misma: observamos una fosfolipasa A_2 en el sobrenadante, mientras que en el homogeneizado, los valores obtenidos con células en reposo no se diferencian de los de células estimuladas.

Con el fin de caracterizar la enzima detectada en sobrenadante, realizamos estudios de la dependencia de esta actividad con el calcio y el pH (Figuras 16 y 17), utilizando como fuente de enzima el sobrenadante de neutrófilos estimulados con zimosán, ya que la señal es mayor que estimulando con fMLP.

Encontramos que esta enzima es capaz de medirse en un medio sin calcio (aunque la máxima actividad se consigue con una concentración de calcio de 10^{-4} M), y que se inhibe a concentraciones superiores a 10^{-3} M.

En cuanto a la dependencia con el pH, la fosfolipasa A₂ tiene un máximo de actividad a pH=5.5, aunque luego decae y vuelve a aumentar para mantenerse constante entre pH=7-9. Estas características coinciden con las de una enzima de origen lisosomal. La función de esta fosfolipasa A₂ puede reflejar el papel de los gránulos en la acción antimicrobiana del neutrófilo sobre el material ingestado.

Albert y col. (173) han encontrado resultados similares en macrófagos alveolares de rata estimulados con zimosán opsonizado o con ionóforo A23187. Estos agonistas son capaces de producir la liberación de una fosfolipasa A₂ que se mide en un medio con EDTA 1 mM y tiene un pH óptimo de 4.5.

También encuentran una fosfolipasa A₂ microsomal que requiere calcio y tiene un pH óptimo de 8.5. Al medir la fosfolipasa A₂ en células enteras, no observan que esta actividad aumente como consecuencia de la estimulación, lo que puede reflejar la presencia de inhibidores, o bien, que los agonistas producen la liberación de la enzima al medio extracelular más que la activación.

Traynor y col. (174) también observan la liberación de una fosfolipasa A₂ lisosomal al estimular los PMNs peritoneales de conejo con zimosán opsonizado. Esta enzima tiene una cinética similar a la de la liberación de enzimas lisosomales, pero es dependiente de calcio.

Lanni y col. (175) detectan la liberación de una fosfolipasa A₂ al estimular los PMNs peritoneales de conejo con fMLP. Sus condiciones experimentales son similares a las nuestras, ya que utilizan el mismo estímulo y miden la fosfolipasa A₂ con membranas de *E. coli*. Igual que en nuestro caso, es necesaria la presencia de citocalasina B para que se produzca la liberación.

La cinética es muy rápida y coincide con la de la liberación de lisozima. Es dependiente de calcio, aunque se detecta actividad en ausencia del catión, y tiene un pH óptimo entre 7 y 9, pero también se mide a pH = 5.5. Todos estos autores encuentran que la cinética de liberación de la fosfolipasa A₂ es similar a la de las enzimas lisosomales.

Más recientemente, y tras la caracterización de nuevas fosfolipasas, se tiende a clasificar estas enzimas de células eucarióticas en dos formas principales: secretable y citosólica, si bien esta última tiene capacidad para asociarse a las membranas.

La enzima secretable se moviliza al compartimento extracelular al igual que otros productos de secreción. Así, algunas fosfolipasas A₂ están presentes en las secreciones como un constituyente fisiológico:

- en plasma seminal humano, que parece participar en la síntesis de prostanoides seminales.
- en las secreciones pancreáticas, donde desempeña funciones digestivas de los fosfolípidos de la dieta.

Sin embargo, en algunas situaciones patológicas, los niveles excesivos de fosfolipasa A₂ pueden contribuir a la inflamación y al daño tisular. La elevación de esta enzima en suero se correlaciona con el desarrollo del colapso e insuficiencia respiratoria en el shock séptico por gérmenes gram negativos. Esta clase de enzimas se designan como fosfolipasas A₂ de tipo II de bajo peso molecular: tienen bajo requerimiento de calcio, bajo peso molecular (aproximadamente 14 kDa), pH óptimo neutro y se cree que no participan en la liberación de araquidónico por las siguientes razones:

- Hidrolizan por igual fosfolípidos con ácido araquidónico o linoléico en posición *sn-2* (no son específicas para ácido araquidónico).
- El análisis de las secuencias de las fosfolipasas A_2 clonadas de bajo peso molecular revela que tienen una secuencia señal con las propiedades típicas de las proteínas extracelulares, de ahí que se secreten tanto *in vivo* como *in vitro* (31).

Por tanto, se considera que este grupo de fosfolipasas A_2 de bajo peso molecular tienen un papel fisiológico en el medio extracelular, sea cual sea el origen de la enzima. Dentro de este grupo de fosfolipasas, se han purificado y clonado las enzimas de placenta (177) y de líquido sinovial de pacientes con artritis reumatoide (178-180).

Las fosfolipasas A_2 asociadas a membranas se designan como fosfolipasas A_2 de tipo II de alto peso molecular: tienen especificidad por ácido araquidónico en posición *sn-2*, gran dependencia con el calcio, están asociadas a la membrana plasmática o se asocian a ella tras la estimulación, tienen un pH óptimo entre neutro y alcalino, un peso molecular elevado (más de 50 kDa) y se cree que son las responsables de la liberación de ácido araquidónico que se produce tras la estimulación celular.

Dentro de este tipo de fosfolipasas, se han purificado y clonado las fosfolipasas A_2 del citosol de la línea celular de macrófagos murinos RAW 264.7 (43), del citosol de plaquetas de conejo (44), y de la línea celular monocítica U937 (45-47).

Creemos que la enzima que estamos midiendo en nuestro sistema es distinta de este último tipo, y por lo tanto es dudoso que participe en la liberación de ácido araquidónico para la síntesis de eicosanoides. No podemos asegurar que el neutrófilo no posea esa fosfolipasa A_2 , sino que nosotros no podemos detectarla en este sistema con nuestras condiciones experimentales.

Meshulam y col. (191) tampoco observan la activación de esta fosfolipasa A₂ en neutrófilos humanos estimulados con fMLP (tanto en presencia como en ausencia de citocalasina B).

Esto podría deberse a la presencia de inhibidores, ya que es un hecho bastante común el aumento de la actividad fosfolipasa A₂ durante el curso de su purificación (182,183). A este respecto se ha descrito que los ácidos grasos poli-insaturados son inhibidores de esta actividad enzimática (31), y que las lipocortinas, idénticas a las calpactinas, son capaces de inhibir la fosfolipasa A₂ por unirse a los fosfolípidos y causar depleción de sustrato.

Vamos a analizar a continuación la liberación de ácido araquidónico en respuesta a la estimulación con fMLP, ya que es una medida indirecta de la fosfolipasa A₂ encargada de la síntesis de eicosanoides.

El ácido araquidónico y sus metabolitos (los eicosanoides) actúan de muchas formas diferentes como mensajeros intra e intercelulares. La concentración de ácido araquidónico libre se mantiene a un nivel muy bajo en células en reposo, pero aumenta mucho durante la estimulación celular. Los niveles de ácido araquidónico libre en las células están controlados por la fosfolipasa A₂, y por el grado de reacilación.

En la figura nº 18 se estudia la liberación de este ácido graso en neutrófilos previamente marcados con ácido [³H]-araquidónico y estimulados con fMLP.

Observamos que estas células son capaces de liberar ácido araquidónico de forma tiempo-dependiente, tanto con fMLP solo como en presencia de citocalasina B, aunque en presencia de ésta se potencia mucho la liberación. Se obtiene el máximo de liberación de este ácido graso a tiempos cortos (5 minutos de incubación con el agonista), y se mantiene hasta los 30 minutos para luego decaer de forma progresiva.

A continuación, vamos a comparar el fMLP como agonista con otro estímulo, el ionóforo A23187 (Figura 19), del cual está ampliamente descrita en la bibliografía su capacidad para liberar ácido araquidónico en los neutrófilos (29,30,184).

Observamos que el ionóforo es un estímulo más potente que el fMLP, y además, presenta una cinética más larga: sigue aumentando la liberación de ácido araquidónico incluso a 60 minutos de incubación, mientras que a ese tiempo el fMLP ya ha comenzado a decaer. El ionóforo de calcio A23187 es un estímulo más potente que el fMLP en la mayoría de las respuestas del neutrófilo que estamos analizando, pero también hay que tener en cuenta que el fMLP es un agonista más fisiológico, con lo cual sus respuestas, aunque sean menores, serán más parecidas a las que se dan *in vivo*.

Por consiguiente, estas células son capaces de liberar ácido araquidónico de su precursor en las membranas. Ya hemos comentado anteriormente que esta es una medida indirecta de la fosfolipasa A₂ presente en las membranas de los neutrófilos, enzima que nosotros no podemos detectar en el ensayo directo de actividad.

Se ha descrito en muchos sistemas la síntesis acoplada del PAF y eicosanoides a través de un precursor común, 1-alkil-2-araquidonil-*sn*-glicero-3-fosfocolina, que es hidrolizado por la fosfolipasa A₂ para dar lugar a liso-PAF y ácido araquidónico libre (29,185). Esta hipótesis es muy atractiva en términos de economía enzimática, y también sugiere la interacción entre los productos (30).

Pero también hay algunas pruebas en contra de este "ciclo del PAF" (186). Dulioust y col. (187) han observado síntesis separada del PAF y LTC₄ en macrófagos peritoneales de ratón cultivados 1 ó 2 días.

Croft y col. (188) encuentran que una dieta rica en ácido eicosapentanoico produce una disminución del 35 % en el contenido de ácido araquidónico en los neutrófilos con una reducción del 50 % en la síntesis de LTB₄, sin que se afecte la síntesis del PAF. En estos casos, no parece que se cumpla la hipótesis de la síntesis común del PAF y eicosanoides.

Nosotros observamos síntesis del PAF y liberación de ácido araquidónico al estimular los neutrófilos con fMLP en presencia de citocalasina B. Nuestros datos muestran la síntesis conjunta del PAF y eicosanoides, pero no son concluyentes para deducir necesariamente que la síntesis se produzca vía fosfolipasa A₂.

4. VIAS ALTERNATIVAS DE LA SINTESIS DEL PAF: ACTIVIDAD TRANSACILASA CoA-INDEPENDIENTE.

La síntesis del PAF en leucocitos polimorfonucleares se realiza por la vía de la remodelación, que implica la acción de dos enzimas: la fosfolipasa A₂ y la acetil-CoA:liso-PAF acetiltransferasa. Hemos estudiado ya la actividad de estas dos enzimas en los neutrófilos estimulados con fMLP y citocalasina B. Con la estimulación se produce la activación de la acetiltransferasa, pero sin embargo, no hemos encontrado ninguna relación entre la estimulación y la actividad fosfolipasa A₂, aunque si que hemos podido medir uno de los productos de su reacción: el ácido araquidónico.

A continuación, vamos a analizar la disponibilidad de los sustratos necesarios para la síntesis del PAF, acetil-CoA y liso-PAF, y las vías metabólicas que podrían conducir a la formación de liso-PAF.

4.1. Acetil-CoA.

Este sustrato no suele ser limitante en la síntesis del PAF, ya que se encuentra en las células en una alta concentración. Sin embargo, hay autores que describen que un aumento en los niveles de acetil-CoA en las células produce un incremento en la síntesis del PAF. Sugiura y col. (27) han encontrado que la producción del PAF en neutrófilos humanos estimulados con distintos agonistas (ionóforo A23187, éster de forbol, zimosán opsonizado) se aumenta por la presencia de cuerpos cetónicos. Estos compuestos son captados y metabolizados rápidamente por los tejidos periféricos para formar acetil-CoA.

Hemos estudiado las rutas de incorporación del acetil-CoA en los neutrófilos, y hemos visto que existen variaciones en función de la estimulación celular.

En la Tabla III se estudia la incorporación de [^{14}C]-acetil-CoA en distintas fracciones lipídicas de PMNs previamente marcados con [^3H]-liso-PAF, que se incorpora con una alta eficiencia en [^3H]-alquil-acil-GPC.

Los resultados indican que no existe formación del PAF en células en reposo, y que el acetil-CoA exógeno se incorpora en la fracción de lípidos neutros, es decir, se utiliza para la síntesis *de novo* de ácidos grasos. En cambio, al producirse la estimulación celular, un 44 % del acetil-CoA exógeno se utiliza en la síntesis del PAF, mientras que el resto, se sigue incorporando en la fracción de lípidos neutros.

4.2. Liso-PAF.

Ante la falta de evidencia de una fosfolipasa A_2 activable que de lugar a la formación de liso-PAF en nuestro sistema, hemos estudiado otra enzima que puede conducir a la acumulación del mismo producto: la transacilasa CoA-independiente. Esta enzima cataliza la transferencia de un ácido graso de la posición *sn*-2 de un fosfolípido a un lisofosfolípido en una reacción independiente de coenzima A. Si el fosfolípido donante que participa en esta reacción pertenece a la subclase alquil-éter, el producto sería liso-PAF.

Esta enzima se encuentra presente en un gran número de células: macrófagos alveolares de conejo (22), plaquetas humanas (189), de rata (190), neutrófilos humanos (151), células HL60 (191), células U937 (192), etc.

Es independiente de calcio, tiene preferencia por ácido araquidónico (193), tiene un pH óptimo neutro y no es estimulable: es activa tanto en células en reposo como estimuladas por distintos agonistas (151).

En primer lugar hemos analizado la desacilación de 1- ^3H -alquil-2-acil-GPC en neutrófilos (estimulados y en reposo) marcados previamente con ^3H -liso-PAF, en las mismas condiciones en que se mide la transacilasa CoA-independiente (Tabla IV). En estos experimentos observamos que se produce la hidrólisis de ^3H -PC a ^3H -liso-PAF tanto en células estimuladas como en reposo, y esta hidrólisis se aumenta cuando en el medio de reacción hay lisofosfolípidos (se necesita un lisofosfolípido aceptor del ácido graso en la reacción de transacilación). En cuanto a la síntesis del PAF, sólo se produce en células estimuladas, especialmente en presencia de lisofosfolípidos exógenos.

Estos resultados concuerdan con la hipótesis de la intervención de una transacilasa independiente de CoA en la producción de liso-PAF, y su significado aumenta en vista de que se puede medir esta actividad enzimática en el homogeneizado celular. La Tabla V muestra la actividad transacilasa independiente de CoA cuando se añade al medio de reacción un lisofosfolípido aceptor. En estas condiciones se observa que la liso-fosfatidiletanolamina es mejor aceptor que la liso-fosfatidilcolina.

Hemos comprobado hasta ahora que el liso-PAF producido en las condiciones de medida de la transacilasa puede ser el producto de la reacción de esta enzima. Para descartar que el liso-PAF pueda aparecer debido a la acción de la fosfolipasa A_2 medimos la liberación de ácido araquidónico en este sistema, como medida indirecta de esta actividad enzimática.

En la tabla VI vemos que no se produce ningún aumento de la liberación de ácido araquidónico ni con la estimulación ni en condiciones en las que se favorece la reacción de la transacilasa (presencia de lisofosfolípidos). Por tanto, en estas condiciones, el liso-PAF producido por la desacilación de alquil-acil-GPC parece ser producto de la transacilasa CoA-independiente y no de la fosfolipasa A_2 .

Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Venable y col. (151) en neutrófilos humanos estimulados con ionóforo de calcio A23187. Estos autores encuentran que la transacilasa CoA-independiente puede proporcionar liso-PAF cuando en el medio de reacción hay lisofosfolípidos aceptores (sobre todo con liso-fosfatidiletanolamina). En estas condiciones observan la formación del PAF sin que se vea liberación de ácido araquidónico (194).

Los resultados aquí obtenidos sugieren la presencia en el neutrófilo de una vía alternativa de generación de liso-PAF vía transacilasa CoA-independiente.

Sin embargo, no podemos descartar por completo una contribución de la fosfolipasa A_2 a la producción de liso-PAF en la síntesis del mediador, ni tampoco que pueda tener otro papel dentro de este esquema de síntesis, ya que debe existir un mecanismo por el cual se suministre el lisofosfolípido aceptor necesario para que se de la reacción de la transacilasa CoA-independiente.

Del total de ácido araquidónico presente en los PMNs, el 70 % se encuentra en fosfatidiletanolamina, y a su vez, el 70-80 % de este ácido graso está en la subclase de plasmalógenos. De esta manera, los plasmalógenos de etanolamina constituyen el mayor reservorio de araquidonato en los neutrófilos humanos.

Tessner y col. (195) han demostrado que los neutrófilos estimulados liberan más ácido araquidónico de fosfatidiletanolamina que de fosfatidilcolina. En otro estudio, Tessner y col. (124) han observado la síntesis de un análogo del PAF, 1-alquenil-2-acetil-GPE, para el cual proponen el siguiente esquema de síntesis:

. la acción de la fosfolipasa A_2 sobre 1-alquenil-2-araquidonoil-GPE produciría 1-alquenil-2-liso-GPE, que luego sería acetilado por la acetiltransferasa a 1-alquenil-2-acetil-GPE.

En este esquema, la fosfolipasa A_2 produce el lisofosfolípido que mejor funciona como aceptor en la reacción de transacilación.

Hay varios trabajos en los que se ha encontrado una fosfolipasa A_2 que hidroliza ácido araquidónico de fosfatidiletanolamina:

- . Díez y col. (196) han encontrado en neutrófilos humanos y en células U937 una fosfolipasa A_2 que hidroliza el ácido araquidónico preferentemente de fosfatidiletanolamina.
- . Fonteh y col. (197) han observado que los mastocitos de ratón estimulados con antígeno o ionóforo A23187, liberan ácido araquidónico principalmente de fosfatidiletanolamina, a la vez que se produce la transferencia de araquidonato de fosfatidilcolina a fosfatidiletanolamina.
- . En plaquetas humanas estimuladas con colágeno se produce lisoplasmeniletanolamina vía fosfolipasa A_2 , de forma independiente de la síntesis de eicosanoides (198).
- . Colard y col. (199) han encontrado la presencia de una fosfolipasa A_2 específica para fosfatidiletanolamina en plaquetas de rata.

Todos estos estudios sugieren que la fosfolipasa A_2 puede estar implicada en la producción de liso-fosfatidiletanolamina, que a su vez se comportaría como el lisofosfolípido aceptor en la reacción de transacilación.

Aunque la hidrólisis de alquil-acil-GPC vía fosfolipasa A_2 es la ruta más directa para la producción de liso-PAF, estos resultados demuestran que existen otras vías alternativas que pueden jugar un papel muy importante en la síntesis del PAF. Uemura y col. observan que la adición de lisofosfolípidos estimula la formación de liso-PAF en células HL60 (191). Nieto y col. (194) encuentran que la adición de alquenil-liso-GPE a neutrófilos humanos en presencia de acetil-CoA, estimula la síntesis del PAF. Estos autores proponen un esquema alternativo para la síntesis del mediador:

- . la fosfolipasa A_2 actúa sobre alquenil-araquidonoil-GPE para producir ácido araquidónico libre y alquenil-liso-GPE.
- . la transacilasa CoA-independiente transfiere el ácido araquidónico en posición sn-2 de alquil-araquidonoil-GPC a la liso-fosfatidiletanolamina producida en la reacción anterior, produciendo liso-PAF.
- . la acetiltransferasa acetila el liso-PAF con acetil-CoA para producir PAF.

Este esquema permite la liberación del PAF, ácido araquidónico y la producción de análogos del PAF (acil-PAF y alquenil-acetil-GPE).

La síntesis del PAF y eicosanoides puede estar ligada o separada, dependiendo de las circunstancias. Nies y col. (200) han demostrado que existe síntesis del PAF sin producción de eicosanoides en riñón de rata perfundido. Es posible que la disponibilidad de liso-PAF en esta situación pueda regular independientemente la liberación de ácido araquidónico vía transacilasa CoA-independiente. Aunque esta enzima no sea estimulable, su actividad vendrá controlada por la disponibilidad del lisofosfolípido aceptor.

4.3. Importancia de la actividad acetiltransferasa en la síntesis del PAF.

Hemos estudiado cómo la síntesis del PAF depende de la presencia de sus sustratos. Sin embargo, los resultados aquí presentados sugieren que la acetiltransferasa es el paso limitante en la síntesis del PAF, ya que este mediador no se sintetiza si esta enzima no está en la forma de alta actividad, aunque en el medio de reacción haya una concentración suficiente de acetil-CoA y liso-PAF.

Este mismo resultado ha sido referido por Albert y col. (173). Estos autores sugieren que el paso limitante en la síntesis del PAF es la acetilación y no la desacetilación: al estimular macrófagos alveolares de rata con PMA, se produce liso-PAF, pero como no se activa la acetiltransferasa, no se forma PAF ni aún en presencia de acetil-CoA exógeno. En este mismo sentido, Holland y col. (201) observan en células endoteliales que al mantener el estado de activación de la acetiltransferasa se aumenta la síntesis del PAF: en este caso el liso-PAF debe estar en exceso, bien por la hidrólisis directa de fosfatidilcolina vía fosfolipasa A₂ o indirectamente, por hidrólisis de fosfatidiletanolamina a través de la acción de la fosfolipasa A₂ y posterior transacetilación. Estos autores proponen que la activación de la acetiltransferasa es el paso limitante en la síntesis del PAF en este tipo celular.

Por tanto, la síntesis del PAF es un proceso muy regulado. Esto es lógico, debido a la gran potencia de este fosfolípido como mediador.

5. VIAS DE TRANSDUCCION DE LA SEÑAL INDUCIDA POR fMLP.

5.1. Efecto de los iones calcio en la estimulación de los neutrófilos con fMLP.

Entre los mecanismos de señalización intracelular, el calcio es un segundo mensajero que regula un gran número de respuestas celulares, de forma que tanto su concentración como su localización subcelular están controladas en un rango muy estrecho. Los iones calcio se encuentran en cuatro sitios diferentes en las células: medio extracelular, citoplasma, mitocondria y retículo endoplásmico.

Sólo el calcio presente en el citoplasma actúa como segundo mensajero, mientras que el retículo constituye el principal orgánulo que libera y secuestra el catión del citoplasma.

La estimulación de los leucocitos polimorfonucleares humanos con distintos agonistas produce un aumento en la concentración intracelular de calcio, que proviene tanto de la liberación de los depósitos intracelulares como de la entrada de calcio extracelular. Montero y col. (94) han estudiado el mecanismo por el cual los agonistas producen este aumento de la concentración de calcio citosólico en neutrófilos humanos. Los estímulos producen la salida del Ca^{2+} de los depósitos intracelulares. A continuación, se aumenta la permeabilidad de la membrana plasmática al calcio, de manera que se vuelven a llenar los depósitos, y así la célula queda preparada para responder a un nuevo estímulo.

La incubación de los neutrófilos con fMLP 10^{-6} M produce un rápido aumento en la concentración de calcio intracelular, que es debido en su mayor parte a la salida del catión de los depósitos intracelulares (Figuras 23 y 24).

Al preincubar las células con citocalasina B, se aumenta la magnitud y la duración del pico de calcio obtenido con fMLP, y además, aparece un segundo pico que implica otro aumento del calcio más sostenido en el tiempo.

El aumento de la concentración de iones calcio producido por la citocalasina B parece debido a la entrada de calcio extracelular, ya que no se produce al incubar las células en un medio con EGTA.

Por tanto, la estimulación de los neutrófilos con citocalasina B y fMLP provoca un aumento de la concentración de calcio intracelular con dos componentes: uno debido a la salida del calcio de los lugares de almacenamiento intracelular y otro a la entrada de calcio extracelular.

Está descrito que las citocalasinas y el fMLP producen un aumento del flujo de calcio en varios sistemas (164,202). Al estimular las células con ambas moléculas se produce un aumento de la concentración de calcio intracelular más prolongado (entre 8 y 10 minutos), siempre que exista calcio extracelular en el medio. Este resultado sugiere que una de las formas en que la citocalasina B potencia la respuesta a fMLP es esta prolongación en el tiempo del flujo de calcio inducido por fMLP.

Como se observa en las figuras 25 y 26, es necesaria la presencia de calcio extracelular en el medio de incubación para que se produzca la activación de la acetiltransferasa y la liberación de las enzimas lisosomales en neutrófilos estimulados con citocalasina B y fMLP. El calcio extracelular también regula la síntesis del PAF (110), puesto que ésta no se da en ausencia de calcio extracelular.

La regulación de las respuestas de los neutrófilos por iones calcio es un hecho bien documentado. Lew y col. (203) observan la correlación entre el aumento de la concentración de calcio intracelular con la exocitosis y la producción de ión superóxido en neutrófilos estimulados con fMLP o ionóforo A23187. Nieto y col. (37) han descrito la necesidad de bajas concentraciones de este catión para la óptima expresión de la acetiltransferasa en PMNs. Este efecto de los iones calcio parece independiente de la reacción de fosforilación, y no da cuenta de los cambios en la $V_{máx.}$ que distinguen la actividad acetiltransferasa entre células en reposo y estimuladas.

Por consiguiente, el aumento de la concentración de calcio intracelular producido en la estimulación de los PMNs es necesario para la activación de las respuestas metabólicas, e indica que la señalización vía Ca^{2+} juega un papel fundamental en este sistema.

Así, hemos observado la necesidad de la presencia de calcio extracelular para que se produzca la activación de la acetiltransferasa y la liberación de β -glucuronidasa. Este hecho nos proporciona alguna información acerca de porqué el fMLP por si solo no es capaz de activar estas respuestas en el neutrófilo: el flujo de calcio producido por el fMLP se da a expensas de la salida del calcio de los depósitos intracelulares, sin que se produzca una entrada externa de calcio. Este aumento transitorio de la concentración de calcio intracelular (1-2 minutos) no es suficiente para desencadenar la respuesta. Sin embargo, al preincubar las células con citocalasina B, se aumenta la duración del flujo de calcio por la entrada de calcio extracelular (8-10 minutos), que permite una respuesta total de la célula. Esta puede ser una razón fundamental de la necesidad de la presencia de citocalasina B en este sistema.

5.2. Influencia de los productos de la fosfolipasa D en la estimulación de los PMNs con fMLP.

La fosfolipasa D hidroliza los fosfolípidos de membrana para dar lugar a ácido fosfatídico, que posteriormente es hidrolizado por la fosfohidrolasa del ácido fosfatídico, PPH, a diglicérido.

Varios autores han demostrado que la estimulación de los neutrófilos provoca la activación de la fosfolipasa D: Pai y col. (204) dan la primera evidencia directa de la activación de la fosfolipasa D dependiente de receptor en un sistema de células intactas (línea celular HL60 al estimular con citocalasina B y fMLP). Estos resultados se han confirmado posteriormente por otros autores en neutrófilos humanos estimulados con fMLP y citocalasina B (205-207). En todos los casos es necesaria la presencia de citocalasina B para que se produzca la activación de esta fosfolipasa.

La activación de la fosfolipasa D con producción de diglicérido y ácido fosfatídico se da también en neutrófilos estimulados con otros agonistas, tanto dependientes como independientes de receptor, como ésteres de forbol, C5a, etc. (208).

La activación de esta enzima determina los niveles de diglicérido y ácido fosfatídico en las células. Se ha mostrado que la activación de la fosfolipasa D es más lenta que la de la fosfolipasa C (207). La fosfolipasa C también produce diglicérido en los primeros segundos de estimulación, pero el aumento de los niveles de este mensajero, más tardíos y prolongados, se deben a la acción de la fosfolipasa D.

No se sabe si los productos de la fosfolipasa C tienen un papel en la activación de la fosfolipasa D, o si esta activación está acoplada a un mecanismo dependiente de receptor, ya que hay evidencia de la existencia de un acoplamiento del receptor del fMLP con la fosfolipasa D a través de tirosina quinasas (209).

Como primera aproximación para ver si los productos de la fosfolipasa D juegan un papel en nuestro sistema, hemos realizado experimentos con propanolol.

Esta comprobado por muchos autores que esta droga inhibe la fosfohidrolasa del ácido fosfatídico, de manera que se produce una acumulación de ácido fosfatídico y un descenso en los niveles de diglicérido (208,210-212).

Hemos comprobado que esta hipótesis se cumple en nuestro sistema: en la figura 27 vemos que la preincubación de las células con concentraciones de propanolol superiores a 200 μ M, produce una acumulación de ácido fosfatídico, que se correlaciona con un descenso en los niveles de diglicérido.

También observamos que la preincubación de las células con distintas concentraciones de propanolol produce una inhibición dosis-dependiente de la actividad acetiltransferasa (sin que se observe un efecto directo de esta droga sobre la enzima), síntesis y liberación del PAF (es más acusado el efecto inhibitorio sobre la síntesis que sobre la liberación) y en la liberación de β -glucuronidasa (Figuras 28, 29 y 30). Por tanto, el propanolol está afectando a distintas respuestas del neutrófilo, lo que sugiere que esta droga actúa a un nivel común a todas ellas.

En cuanto al efecto del propanolol sobre los flujos de calcio producidos en la estimulación celular, vemos en la figura nº 31 que esta droga provoca una inhibición dependiente de la dosis del aumento de la concentración de calcio intracelular producido por fMLP y citocalasina B.

Estos resultados sugieren que el propanolol también es capaz de interferir en los flujos de calcio, que como ya hemos mencionado, constituyen una vía fundamental de la transducción de la señal en nuestro sistema. Al inhibir el aumento de la concentración de calcio en el citoplasma (actuando tanto a nivel de la salida de calcio de los depósitos intracelulares como a nivel de la entrada de calcio extracelular) puede inhibir la activación de la acetiltransferasa, síntesis del PAF y liberación de enzimas lisosomales.

La inhibición de estas respuestas del neutrófilo se dan a una concentración de propanolol a la cual hemos comprobado que es capaz de inhibir a la fosfohidrolasa del ácido fosfatídico. Esto nos indica que el propanolol, además de interferir en los flujos de calcio, también posee el efecto sobre la acumulación de productos derivados de la fosfolipasa D al que nos habíamos referido inicialmente, y que nos sugirió su empleo.

La variación en los niveles de ácido fosfatídico y de diglicérido inducida por el propanolol afecta a otras respuestas del leucocito polimorfonuclear humano. El aspecto más estudiado es la producción de ión superóxido: Gay y col. (210) han observado que la incubación de los neutrófilos con 150 μM de propanolol aumenta la producción de ión superóxido en respuesta a estímulos dependientes de receptor (fMLP, C5a, LTB₄), y lo inhibe con estímulos independientes de receptor (PMA, ionóforo A23187). Este efecto parece que está mediado por el aumento en los niveles de ácido fosfatídico, mientras que el diglicérido parece tener poca importancia.

El propanolol tiene efectos inhibitorios en un amplio espectro de estímulos independientes de receptor. Así, el papel del ácido fosfatídico es diferente con estímulos dependientes e independientes de receptor.

El propanolol es una molécula catiónica anfipática. Entre los efectos farmacológicos del propanolol se incluye el bloqueo de receptores β -adrenérgicos y también tiene propiedades como anestésico local. El esteroisómero L es más potente que el D, aunque ambos tienen las mismas propiedades anestésicas a altas concentraciones.

Los efectos del propanolol, sobre todo a concentraciones elevadas, pueden ser distintos de la inhibición de la fosfolipasa del ácido fosfatídico: puede inhibir directamente la fosfolipasa D, disminuyendo la producción de ácido fosfatídico y diglicérido, y por tanto, la producción de ión superóxido (210).

Sozzani y col. (213) han observado que el propanolol también es capaz de inhibir directamente la proteína quinasa C en neutrófilos humanos. Por tanto, esta droga es capaz de producir efectos directos en las células, no sólo a través de la acumulación de fosfatidato y de la disminución de los niveles de diglicérido.

El efecto del propanolol en los neutrófilos no se da por el bloqueo de receptores β -adrenérgicos, sino por sus propiedades anfipáticas. Esta droga se concentra en la parte interna de la membrana, en la zona de la bicapa donde predominan fosfatidilserina y fosfatidilcolina. La interacción del propanolol con estos fosfolípidos, produce cambios en la fluidez de las membranas: aumenta la fluidez y el grado de desorden de la membrana (214). Este puede ser el modo en el cual esta droga ejerce sus efectos en estas células.

5.2.1. Efecto de los diglicéridos.

Hemos probado distintas especies de diglicéridos (dioleína y diglicérido de PAF) en los neutrófilos estimulados con fMLP y citocalasina B, pero no hemos encontrado ningún efecto, ni inhibidor ni activador, sobre la actividad acetiltransferasa y liberación de enzimas lisosomales.

El efecto activador de la síntesis y liberación del PAF observado al incubar con diglicérido de PAF (y no con dioleína) parece debido más bien a una interferencia de este compuesto en el bioensayo de plaquetas.

Satouchi y col. (215) han encontrado que el diglicérido de PAF es capaz de producir agregación plaquetaria y que, cuando se añade exógenamente tras un tiempo de latencia, las plaquetas son capaces de metabolizarlo y transformarlo en PAF.

Nosotros encontramos que el diglicérido de PAF produce la liberación de serotonina por las plaquetas en un proceso dependiente del receptor del PAF, ya que se inhibe con el antagonista del PAF PCA 4248.

Los diglicéridos probados tampoco son capaces de revertir la inhibición de las respuestas del neutrófilo inducida por propanolol. Estos resultados sugieren que los diglicéridos no tienen un papel como segundos mensajeros en nuestro sistema.

5.2.2. Efecto del ácido fosfatídico.

El ácido fosfatídico es el producto que se acumula como consecuencia de la activación de los PMNs en presencia de propanolol y posee un papel bien caracterizado como segundo mensajero implicado en la transducción de la señal de un gran número de respuestas celulares:

- activa la NADPH oxidasa en neutrófilos humanos estimulados con fMLP y citocalasina B (216).
- produce agregación y flujos de calcio en plaquetas (217).

- modula la síntesis de DNA, fosfolipasa C y la expresión del mRNA del factor de crecimiento derivado de plaquetas en células mesangiales de riñón humano (218).
- aumenta la concentración de calcio intracelular por salida de calcio de los depósitos intracelulares, aumenta el pH citoplasmático, induce expresión de proto-oncogenes c-fos y c-myc y estimula la síntesis de DNA en células de carcinoma humano A431 (219).

En nuestro sistema, la preincubación de los neutrófilos con dilauoil-GP antes de la estimulación con fMLP y citocalasina B produce una inhibición dosis-dependiente de la actividad acetiltransferasa (sin que tenga efecto directo sobre la enzima), síntesis y liberación del PAF (es más pronunciado el efecto sobre la liberación del mediador que sobre su síntesis) y liberación de β -glucuronidasa (Figuras 32, 33 y 34).

Al probar distintas especies de ácido fosfatídico (1-estearoil-2-araquidonoil-GP, 1,2-dilauoil-GP y 1,2-dioleoil-GP) y un ácido lisofosfatídico (1-oleoil-2-liso-GP) vemos que todos los ácidos fosfatídicos probados tienen el mismo efecto inhibitorio con un IC_{50} bastante similar, mientras que el ácido lisofosfatídico carece de actividad (Tabla II).

Como el propranolol es capaz de inhibir los flujos de calcio inducidos en la estimulación, hemos probado si el ácido fosfatídico tiene este mismo efecto. Este fosfolípido, a concentraciones iguales a las que produce la inhibición de las respuestas celulares, no es capaz de modificar el flujo de calcio como lo hace el propranolol (Figura nº 35).

Estos resultados sugieren que la acumulación de ácido fosfatídico producida al incubar las células con propanolol, puede dar cuenta, al menos en parte, del efecto inhibitorio del propanolol sobre los neutrófilos.

La inhibición de la activación de acetiltransferasa, síntesis del PAF y liberación de enzimas lisosomales es menos acusada con ácido fosfatídico que con propanolol, e incluso se observa que la inhibición por propanolol afecta más a la síntesis del PAF que a su liberación, mientras que el efecto del ácido fosfatídico afecta más a la liberación que a la síntesis del mediador.

Por consiguiente, no todos los efectos del propanolol son debidos a la acumulación de este fosfolípido. Además, el propanolol es capaz de inhibir el flujo de calcio inducido en la estimulación, mientras que el ácido fosfatídico carece de este efecto. Por tanto, sugerimos que la inhibición por propanolol de las respuestas del neutrófilo se produce al menos por dos mecanismos independientes: la acumulación de ácido fosfatídico y la inhibición de la movilización de iones calcio.

A pesar de que podamos descartar una relación entre el efecto del ácido fosfatídico y la movilización de iones calcio, no conocemos el mecanismo por el que se produce su efecto inhibitorio.

En conclusión, la biosíntesis del PAF es un proceso que posee una modulación múltiple y estrecha, que se justifica por la potente actividad biológica de este mediador y los riesgos que produciría su formación incontrolada.

VI. CONCLUSIONES

1. ESTIMULACION DE LOS NEUTROFILOS CON fMLP.

La estimulación de los neutrófilos humanos con fMLP en presencia de citocalasina B produce las siguientes respuestas:

- Activación de la enzima acetil-CoA:liso-PAF acetiltransferasa.
- Síntesis y liberación del factor activador de las plaquetas (PAF).
- Liberación de enzimas lisosomales (β -glucuronidasa).
- Liberación de una fosfolipasa A_2 al medio extracelular.
- Liberación de ácido araquidónico.

La activación de la acetiltransferasa y la liberación de β -glucuronidasa son muy tempranas (30 segundos), y ambas anteceden a la síntesis y liberación del PAF.

El máximo en la liberación del PAF se produce con anterioridad a la síntesis máxima del mediador.

2. EFECTO DEL FACTOR DE NECROSIS TUMORAL ALFA (TNF- α).

Para que el neutrófilo sea capaz de desarrollar estas respuestas inducidas por fMLP es necesaria la presencia de citocalasina B en el medio de incubación.

De los experimentos dirigidos a identificar sustancias que, en condiciones fisiológicas pudieran jugar el papel de la citocalasina B, se deduce que el TNF- α , añadido al medio de incubación antes de la estimulación con fMLP, es capaz de potenciar algunas respuestas del polimorfonuclear, pero no supe la función de la citocalasina B.

3. POSIBLES VIAS DE TRANSDUCCION DE LA SEÑAL INDUCIDAS POR LA ESTIMULACION CON fMLP.

Hemos estudiado dos vías posibles de transducción de la señal en la estimulación de los neutrófilos humanos con fMLP: calcio y productos de la fosfolipasa D.

La elevación de la concentración de calcio intracelular como consecuencia de la entrada de calcio extracelular es un mecanismo de señalización de la máxima importancia en la mediación de la respuesta al fMLP.

El efecto de la citocalasina B en la activación de los polimorfonucleares por fMLP guarda relación con su efecto sobre la movilización de calcio y la prolongación del aumento de la concentración de iones calcio en el citosol, que tiene lugar a expensas de la entrada de calcio extracelular.

El fMLP es capaz por sí sólo de producir un aumento de la concentración de calcio intracelular debida, en su mayor parte, a la movilización del catión de los depósitos intracelulares. Sin embargo, no es capaz de desarrollar las respuestas celulares que hemos estudiado. En cambio, la citocalasina B, al producir la entrada de calcio extracelular, produce una respuesta completa en el neutrófilo.

La acumulación de fosfatidato como consecuencia de la acción de una fosfolipasa D produce un efecto inhibitorio sobre la respuesta del polimorfonuclear humano al fMLP, y probablemente puede contribuir a la generación de señales de terminación tras la activación celular.

La acumulación de fosfatidato sería uno de los mecanismos que explican el efecto inhibitorio del propanolol sobre la activación de los polimorfonucleares.

El propanolol posee un efecto adicional inhibitorio sobre los flujos de iones calcio, que también puede contribuir a explicar la inhibición de la activación de los neutrófilos inducida por propanolol. El ácido fosfatídico carece de este efecto.

4. VIA ALTERNATIVA DE LA SINTESIS DEL PAF.

No hemos encontrado una prueba directa de la activación de la fosfolipasa A_2 de la vía de remodelación en la estimulación de los polimorfonucleares humanos.

Hemos obtenido resultados que pueden indicar la existencia de una vía alternativa de producción del liso-PAF a través de la actividad transacilasa CoA-independiente.

La existencia de la transacilasa independiente de CoA sugiere un esquema alternativo de biosíntesis del PAF, que se iniciaría con la hidrólisis de fosfatidiletanolamina vía fosfolipasa A_2 , que generaría ácido araquidónico (observamos que se libera durante la estimulación con fMLP) y liso-fosfatidiletanolamina. La liso-fosfatidiletanolamina actuaría como lisofosfolípido aceptor en una reacción de transacilación que da lugar a liso-PAF. El ciclo metabólico se cerraría al obtenerse de nuevo fosfatidiletanolamina con ácido araquidónico en posición *sn-2*.

Ni la producción de liso-PAF ni la presencia de acetyl-CoA son los pasos limitantes en la síntesis del PAF, ya que en presencia de estos dos sustratos, no hay síntesis del mediador si no está activada la acetiltransferasa.

La actividad liso-PAF:acetyl-CoA acetiltransferasa parece ser el paso limitante en la biosíntesis del PAF, y a su regulación contribuyen los niveles de Ca^{2+} intracelulares y la acumulación de fosfatidato.

REFERENCIAS

REFERENCIAS

- 1.- Henson, P.M. Release of vasoactive amines from rabbit platelets induced by sensitized mononuclear leukocytes and antigen. (1970). **J. Exp. Med.** 131: 287-306.
- 2.- Benveniste, J., Henson, P.M., Cochrane, C.G. Leukocyte-dependent histamine release from rabbit platelets. The role of IgE, basophils, and platelet-activating factor. (1972). **J. Exp. Med.** 136: 1356-1377.
- 3.- Benveniste, J., Le Couedic, J.P., Polonsky, J., Tence, M. Structural analysis of purified platelet-activating factor by lipase. (1977). **Nature.** 269: 170-171.
- 4.- Pinckard, R.N., Farr, R.S., Hanahan, D.J. Physicochemical and functional identity rabbit platelet-activating factor (PAF) released *in vivo* during IgE anaphylaxis with PAF released *in vitro* from IgE sensitized basophils. (1979). **J. Immunol.** 123: 1847-1857.
- 5.- Demopoulos, C.A., Pinckard, R.N., Hanahan, D.J. Platelet-activating factor. Evidence for 1-O-alkyl-2-acetyl-3-phosphorylcholine as the active component (a new class of lipid chemical mediators). (1979). **J. Biol. Chem.** 254: 9355-9358.
- 6.- Blank, M.L., Snyder, F., Byers, L.W., Brooks, B., Muirhead, E.E. Antihypertensive activity of an alkyl ether analog of phosphatidylcholine. (1979). **Biochim. Biophys. Res. Commun.** 90: 1194-1200.

- 7.- Benveniste, J., Tence, M., Varenne, P., Bidault, J., Bouillet, C., Polonsky, J. Semi-synthese et structure purpousee du facteur activant les plaquettes (PAF); PAF-acether, un alkyl ether analogue de la lysophosphatidylcholine. (1979). **C. R. Acad. Sci. [D] (Paris)**. 289: 1037-1040.
- 8.- Snyder, F. Biochemistry of platelet-activating factor: a unique class of biologically active phospholipids. (1989). **P.S.E.B.M.** 190: 125-135.
- 9.- Snyder, F. Metabolism of platelet-activating factor and related ether lipids: enzymatic pathways, subcellular sites, regulation and membrane processing. (1988). In **Biological membranes: aberrations in membrane structure and function**. 57-72.
- 10.- Prescott, S.M., Zimmerman, G.A., McIntyre, T.M. Platelet-activating factor. (1990). **J. Biol. Chem.** 265: 17381-17384.
- 11.- Ninio, E., Joly, F. Transmembrane signalling and PAF-acether biosynthesis. (1991). **Lipids**. 26: 1034-1037.
- 12.- Shukla, S.D. Platelet-activating factor receptor and signal transduction mechanism. (1992). **FASEB. J.** 6: 2296-2301.
- 13.- Hanahan, D.J. Platelet-activating factor: a biologically active phosphoglyceride. (1986). **Ann. Rev. Biochem.** 55: 483-509.
- 14.- Braquet, P., Touqui, L., Shen, T.Y., Vargaftig, B.B. Perspectives in platelet-activating factor research. (1987). **Pharmacol. Rev.** 39: 97-145.

- 15.- Wykle, R.L., Miller, C.H., Lewis, J.C., Schmitt, J.D., Smith, J.A., Surles, J.R., Piantadosi, C., O'Flaherty, J.T. Sterospecific activity of 1-O-alkyl-2-O-acetyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine and comparision of analogs in the degranulation of platelets and neutrophils. (1981). **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 100: 1651-1658.
- 16.- Tence, M., Coeffier, E., Heymans, F., Polonski, J., Godfroid, J.J., Benveniste, J. Structural analogs of platelet-activating factor (PAF-acether). (1981). **Biochimie.** 63: 723-727.
- 17.- Satouchi, K., Pinckard, R.N., McManus, L.M., Hanahan, D.J. Modification of the polar head group of acetyl glyceryl ether phosphorylcholine and subsequent effects upon platelet activation. (1981). **J. Biol. Chem.** 256: 4425-4432.
- 18.- Wissner, A., Schaub, R.E., Sum, P.E., Hohler, C.A., Goldstein, B.M. Analogues of platelet-activating factor. 4. Some modifications of the phosphocholine moiety. (1986). **J. Med. Chem.** 29: 328-333.
- 19.- Ammit, A.J., O'Neill, C. Rapid and selective measurement of platelet-activating factor using a quantitative bioassay of platelet aggregation. (1991). **J. Pharmacol. Methods.** 26: 7-21.
- 20.- Smal, M.A., Baldo, B.A., McCaskill, A. A specific, sensitive radioimmunoassay for platelet-activating factor (PAF). (1990). **J. Immunol. Methods.** 128: 183-188.
- 21.- Blank, M.L., Lee, T.C., Fitzgerald, V., Snyder, F. A specific acetylhydrolase for 1-alkyl-2-acetyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (a hypotensive and platelet-activating lipid). (1981). **J. Biol. Chem.** 256: 175-178.

- 22.- Sugiura, T., Masuzawa, Y., Nakagawa, Y., Waku, K. Transacylation of lyso-platelet-activating factor and other lysophospholipids by macrophage microsomes. (1987). **J. Biol. Chem.** 262: 1199-1205.
- 23.- O'Flaherty J.T., Surles, J.R., Redman, J., Jacobson, D., Piantadosi, C., Wykle, R.L. Binding and metabolism of platelet-activating factor by human neutrophils. (1986). **J. Clin. Inves.** 78: 381-388.
- 24.- Kawasaki, T., Snyder, F. The metabolism of platelet-activating factor (1-O-alkyl-2-acetyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine) by a calcium-dependent lysophospholipase D in rabbit kidney medulla. (1987). **Biochem. Biophys. Acta.** 920: 85-93.
- 25.- Okayasu, T., Hoshii, K., Seyama, K., Ishibashi, T., Imai, Y. Metabolism of platelet-activating factor in primary cultured adult rat hepatocytes by a new pathway involving phospholipase C and alkyl monooxygenase. (1986). **Biochim. Biophys. Acta.** 876: 58-64.
- 26.- García, M.C., Fernández-Gallardo, S., Gijón, M.A., García, C., Nieto, M.L., Sánchez-Crespo, M. Biosynthesis of platelet-activating factor (PAF) in human polymorphonuclear leukocytes. The role of lyso-PAF disposal and free arachidonic acid. (1990). **Biochem. J.** 268: 91-98.
- 27.- Sugiura, T., Uchiyama, A.O., Masuzawa, Y., Waku, K. Augmented production of platelet-activating factor in human polymorphonuclear leukocytes by ketone bodies. (1989). **FEBS. Lett.** 258: 351-354.
- 28.- Alonso, F., Sánchez-Crespo, M., Mato, J.M. Modulatory role of cyclic AMP in the release of platelet-activating factor from human polymorphonuclear leukocytes. (1982). **Immunol.** 45: 493-500.

- 29.- Ramesha, C.S., Pickett, W.C. Platelet-activating factor and leukotriene biosynthesis is inhibited in polymorphonuclear leukocytes depleted of arachidonic acid. (1986). **J. Biol. Chem.** 261: 7592-7595.
- 30.- Billah, M.M., Bryant, R.W., Siegel, M.I. Lipoxygenase products of arachidonic acid modulate biosynthesis of platelet-activating factor (1-O-alkyl-2-acetyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine) by human neutrophils via phospholipase A₂. (1985). **J. Biol. Chem.** 260: 6899-6906.
- 31.- Ballou, L.R., Cheung, W.Y. Inhibition of human platelet phospholipase A₂ activity by unsaturated fatty acids. (1985). **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 82: 371-375.
- 32.- Whatley, R.E., Nelson, P., Zimmerman, G.A., Stevens, D.L., Parker, D.L., McIntyre, T.M., Prescott, S.M. The regulation of platelet-activating factor production in endothelial cells. (1989). **J. Biol. Chem.** 264: 6325-6333.
- 33.- Mollinedo, F., Gómez-Cambronero, J., Cano, E., Sánchez-Crespo, M. Intracellular localization of platelet-activating factor synthesis in human polymorphonuclear leukocytes. (1988). **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 154: 1232-1239.
- 34.- Riches, D.W., Young, S.C., Seccombe, J.F., Henson, J.E., Clay, K.L., Henson, P.M. The subcellular distribution of platelet-activating factor in stimulated human polymorphonuclear leukocytes. (1990). **J. Immunol.** 145: 3062-3070.
- 35.- Banks, J.B., Wykle, R.L., O'Flaherty, J.T., Lumb, R.H. Evidence for protein-catalyzed transfer of platelet-activating factor by macrophages cytosol. (1988). **Biochim. Biophys. Acta.** 961: 48-52.

- 36.- Alonso, F., Gil, M.G., Sánchez-Crespo, M., Mato, J.M. Activation of 1-alkyl-2-lyso-*sn*-glycero-3-phosphocholine: acetyl-CoA transferase during phagocytosis in human polymorphonuclear leukocytes. (1982). **J. Biol. Chem.** 257: 3376-3378.
- 37.- Nieto, M.L., Velasco, S., Sánchez-Crespo, M. Modulation of acetyl-CoA: 1-O-alkyl-2-lyso-*sn*-glycero-3-phosphocholine (lyso-PAF) acetyltransferase in human polymorphonuclears. The role of cyclic AMP-dependent and phospholipid sensitive, calcium-dependent protein kinases. (1988). **J. Biol. Chem.** 263: 4607-4611.
- 38.- Domenech, C., Machado-De Domenech, E., Soling, H.D. Regulation of acetyl-CoA: 1-alkyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine O²-acetyltransferase (lyso-PAF-acetyltransferase) in exocrine glands. Evidence for an activation via phosphorylation by calcium/calmodulin-dependent protein kinase. (1987). **J. Biol. Chem.** 262: 5671-5676.
- 39.- Gómez-Cambronero, J., Velasco, S., Sánchez-Crespo, M., Vivanco, F., Mato, J.M. Partial purification and characterization of 1-O-alkyl-2-lyso-*sn*-glycero-3-phosphocholine: acetyl-CoA acetyltransferase from rat spleen. (1986). **Biochem. J.** 237: 439-445.
- 40.- Ninio, E., Bessou, G. Biosynthesis of paf-acether. XVI. Acetyltransferase specificity determines composition of paf-acether molecular species in human polymorphonuclear neutrophils. (1991). **Biochim. Biophys. Acta.** 1085: 136-139.
- 41.- Lee, T.C. Biosynthesis of platelet-activating factor. Substrate specificity of 1-alkyl-2-lyso-*sn*-glycero-3-phosphocholine: acetyl-CoA acetyltransferase in rat spleen microsomes. (1985). **J. Biol. Chem.** 260: 10952-10955.

- 42.- Bereziat, G., Etienne, J., Kokkinidis, M., Olivier, J.L., Pernas, P. New trends in mammalian non-pancreatic phospholipase A₂ research. (1990). **J. Lipid Mediat.** 2: 159-172.
- 43.- Leslie, C.C., Voelker, D.R., Channon, J.Y., Wall, M.M., Zelarney, P.T. Properties and purification of an arachidonoyl-hydrolyzing phospholipase A₂ from a macrophage cell line, RAW 264.7. (1988). **Biochim. Biophys. Acta.** 963: 476-492.
- 44.- Kim, D.K., Kudo, I., Inoue, K. Purification and characterization of rabbit platelet cytosolic phospholipase A₂. (1991). **Biochim. Biophys. Acta.** 1083: 80-88.
- 45.- Diez, E., Mong, S. Purification of a phospholipase A₂ from human monocytic leukemic U937 cells. Calcium-dependent activation and membrane association. (1990). **J. Biol. Chem.** 265: 14654-14661.
- 46.- Kramer, R.M., Roberts, E.F., Manetta, J., Putnam, J.E. The Ca²⁺-sensitive cytosolic phospholipase A₂ is a 100-kDa protein in human monoblast U937 cells. (1991). **J. Biol. Chem.** 266: 5268-5272.
- 47.- Sharp, J.D., White, D.L., Chiou, X.G., Goodson, T., Gamboa, G.C., McClure, D., Burgett, S., Hoskins, J., Skatrud, P.L., Sportsman, J.R., Becker, G.W., Kang, L.H., Roberts, E.F., Kramer, R.M. Molecular cloning and expression of human Ca²⁺-sensitive cytosolic phospholipase A₂. (1991). **J. Biol. Chem.** 266: 14850-14853.
- 48.- Clark, J.D., Lin, L-L., Kriz, R.W., Ramesha, C.S., Sultzman, L.A., Lin, A.Y., Milona, N., Knopf, J.L. A novel arachidonic acid-selective cytosolic PLA₂ contains a Ca²⁺-dependent translocation domain with homology to PKC and GAP. (1991). **Cell.** 65: 1043-1051.

- 49.- Stafforini, D.M., Prescott, S.M., McIntyre, T.M. Human plasma platelet-activating factor acetylhydrolase. Purification and properties. (1987). **J. Biol. Chem.** 262: 4223-4230.
- 50.- Stafforini, D.M., Carter, M.E., Zimmerman, G.A., McIntyre, T.M., Prescott, S.M. Lipoproteins alter the catalytic behavior of the platelet-activating factor acetylhydrolase in human plasma. (1989). **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 86: 2393-2397.
- 51.- Stremmer, K.E., Stafforini, D.M., Prescott, S.M., Zimmerman, G.A., McIntyre, T.M. An oxidized derivative of phosphatidylcholine is a substrate for the platelet-activating factor acetylhydrolase from human plasma. (1989). **J. Biol. Chem.** 264: 5331-5334.
- 52.- Elstad, M.R., Stafforini, D.M., McIntyre, T.M., Prescott, S.M., Zimmerman, G.A. Platelet-activating factor acetylhydrolase increases during macrophage differentiation. A novel mechanism that regulates accumulation of platelet-activating factor. (1989). **J. Biol. Chem.** 264: 8467-8470.
- 53.- Blank, M.L., Hall, M.N., Cress, E.A., Snyder, F. Inactivation of 1-alkyl-2-acetyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine by a plasma acetylhydrolase: Higher activities in hypertensive rats. (1983). **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 113: 666-671.
- 54.- Robinson, M., Blank, M.L., Snyder, F. Acylation of lysophospholipids by rabbit alveolar macrophages. Specificities of CoA-dependent, and CoA-independent reactions. (1985). **J. Biol. Chem.** 260: 7889-7895.

- 55.- Lee, T.C., Malone, B., Wasserman, S.I., Fitzgerald, V., Snyder, F. Activities of enzymes that metabolize platelet-activating factor (1-O-alkyl-2-acetyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine) in neutrophils and eosinophils from humans and the effect of a calcium ionophore. (1982). **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 105: 1303-1308.
- 56.- Sánchez-Crespo, M., Alonso, F., Egido, J. Platelet-activating factor in anaphylaxis and phagocytosis. 1. Release from human peripheral polymorphonuclears and monocytes during the stimulation of ionophore A23187 and phagocytosis but not from degranulating basophils. (1980). **Immunology.** 40: 645-655.
- 57.- Camussi, G., Bussolino, F., Tetta, C., Piacibello, W., Aglietta, M. Biosynthesis and release of platelet-activating factor from human monocytes. (1983). **Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.** 70: 245-251.
- 58.- Arnoux, B., Duval, D., Benveniste, J. Release of platelet-activating factor (PAF-acether) from alveolar macrophages by the calcium ionophore A23187 and phagocytosis. (1980). **Eur. J. Clin. Inves.** 10: 437-441.
- 59.- Malavasi, F., Tetta, C., Funaro, A., Bellone, G., Ferrero, E., Franzone, A.C., Dellabona, P., Rusci, R., Matera, L., Camussi, G., Caligaris-Cappio, F. Fc receptor triggering induces expression of surface activation antigens and release of platelet-activating factor in large granular lymphocytes. (1986). **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 83: 2443-2447.
- 60.- Chignard, M., Le Couedic, J.P., Vargaftig, B.B., Benveniste, J. Platelet-activating factor (PAF-acether) secretion from platelets: effects of aggregating agents. (1980). **Br. J. Haematol.** 46: 455-464.

- 61.- Camussi, G., Aglietta, M., Malavasi, F., Tetta, C., Piacibello, W., Sanavio, F., Bussolino, F. The release of platelet-activating factor from human endothelial cells in culture. (1983). **J. Immunol.** 131: 2397-2403.
- 62.- Kornecki, E., Ehrlich, Y.H. Neuroregulatory and neuropathological actions of the ether-phospholipid platelet-activating factor. (1988). **Science.** 240: 1792-1794.
- 63.- Schlondorff, D., Goldwasser, P., Neuwirth, R., Satriano, J.A., Clay, K.L. Production of platelet-activating factor in glomeruli and cultured glomerular mesangial cells. (1986). **Am. J. Physiol.** 250: F1123-F1127.
- 64.- O'Flaherty, J.T., Jacobson, D.P., Redman, J.F. Regulation of platelet-activating factor receptors and the desensitization response in polymorphonuclear neutrophils. (1992). **Biochem. J.** 288: 241-248.
- 65.- McColl, S.R., Krump, E., Naccache, P.H., Poubelle, P.E., Braquet, P., Braquet, M., Borgeat, P. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor increases the synthesis of leukotriene B₄ by human neutrophils in response to platelet-activating factor. Enhancement of both arachidonic acid availability and 5-lipoxygenase activation. (1991). **J. Immunol.** 146: 1204-1211.
- 66.- McCall, C.E., Bass, D.A., De Chatelet, L.R., Link, A.S. Jr., Mann, M. *In vitro* responses of human neutrophils to N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine: correlation with effects of acute bacterial infection. (1979). **J. Infect. Dis.** 140: 277-286.
- 67.- Del Maschio, A., Evangelista, V., Rajtar, G., Chen, Z.M., Cerletti, C., De Gaetano, G. Platelet activation by polymorphonuclear leukocytes exposed to chemotactic agents. (1990). **Am. J. Physiol.** 258: H870-H879.

- 68.- Ninio, E., Leyravaud, S., Bidault, J., Jurgens, P., Benveniste, J. Cell adhesion by membrane bound platelet-activating factor. (1991). **Int. Immunol.** 3: 1157-1163.
- 69.- Garcia, M.C., Mueller, H.W., Rosenthal, M.D. C₂₀ polyunsaturated fatty acids and phorbol myristate acetate enhance agonist-stimulated synthesis of 1-acyl-2-acetyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine in vascular endothelial cells. (1991). **Biochim. Biophys. Acta.** 1083: 37-45.
- 70.- Hirafuji, M., Shinoda, H. Platelet-leukocyte interaction in adhesion to endothelial cells induced by platelet-activating factor *in vitro*. (1991). **Br. J. Pharmacol.** 103: 1333-1338.
- 71.- Fradin, A., Zirrolli, J.A., Maclouf, J., Vausbinder, L., Henson, P.M., Murphy, R.C. Platelet-activating factor and leukotriene biosynthesis in whole blood. (1989). **J. Immunol.** 143: 3680-3685.
- 72.- Shukla, S.D., Buxton, D.B., Olson, M.S., Hanahan, D.J. Acetylglycerol ether phosphorylcholine. A potent activator of hepatic phosphoinositide metabolism and glycogenolysis. (1983). **J. Biol. Chem.** 258: 10212-10214.
- 73.- Woodard, D.S., Lee, T.C., Snyder, F. The final step in *the novo* biosynthesis of platelet-activating factor. Properties of a unique CDP-choline:1-alkyl-2-acetyl-*sn*-glycerol cholinephosphotransferase in microsomes from the renal inner medulla of rats. (1987). **J. Biol. Chem.** 262: 2520-2527.
- 74.- Vargaftig, B.B., Lefort, J., Chignard, M., Benveniste, J. Platelet-activating factor induces a platelet-dependent bronchoconstriction unrelated to the formation of prostaglandin derivatives. (1980). **Eur. J. Pharmacol.** 65: 185-192.

- 75.- McManus, L.M., Hanahan, D.J., Demopoulos, C.A., Pinckard, R.N. Pathobiology of the intravenous infusion of acetyl glyceryl ether phosphorylcholine (AGEPC), a synthetic platelet-activating factor (PAF), in the rabbit. (1980). *J. Immunol.* 124: 2919-2924.
- 76.- Kloprogge, E., Akkerman, J.W.N. Binding kinetics of PAF-acether (1-O-alkyl-2-acetyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine) in intact human platelets. (1984). *Biochem. J.* 223: 901-909.
- 77.- Hwang, S.B., Lee, C.L., Cheah, M.J., Shen, T.Y. Specific receptor sites for 1-O-alkyl-2-acetyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (platelet-activating factor) on rabbit platelet and guinea pig smooth muscle membranes. (1983). *Biochemistry.* 22: 4756-4763.
- 78.- Janero, D.R., Burghardt, B., Burghardt, C. Specific binding of 1-O-alkyl-2-acetyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (platelet-activating factor) to the intact canine platelet. (1988). *Thromb. Res.* 50: 789-802.
- 79.- Chao, W., Liu, H., DeBuysere, M., Hanahan, D.J., Olson, M.S. Identification of receptors for platelet-activating factor in rat Kupffer cells. (1989). *J. Biol. Chem.* 264: 13591-13598.
- 80.- Valone, F.H. Identification of platelet-activating factor receptors in P388D₁ murine macrophages. (1988). *J. Immunol.* 140: 2389-2394.
- 81.- Hwang, S.B., Lam, M.H., Shen, T.Y. Specific binding sites for platelet-activating factor in human lung tissues. (1985). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 128: 972-979.
- 82.- Valone, F.H., Goetzl, E.J. Specific binding by human polymorphonuclear leucocytes of the immunological mediator 1-O-hexadecyl/octadecyl-2-acetyl-*sn*-glycero-3-phosphorylcholine. (1983). *Immunol.* 48: 141-149.

- 83.- Hwang, S. Specific receptors for platelet-activating factor, receptor heterogeneity, and signal transduction mechanism. (1990). **J. Lipid Mediat.** 2: 123-158.
- 84.- Clay, K.L., Johnson, C., Henson, P. Binding of platelet-activating factor to albumin. (1990). **Biochim. Biophys. Acta.** 1046: 309-314.
- 85.- Nishihara, J., Ishibashi, T., Imai, Y., Marumatsu, T. Purification and characterization of the specific binding protein for platelet-activating factor from human platelets. (1985). **Tohoku J. Exp. Med.** 147: 145-152.
- 86.- Wang, C.J., Tai, H.H. Monoclonal anti-idiotypic antibodies to platelet-activating factor (PAF) and their interaction with PAF receptors. (1990). **J. Biol. Chem.** 266: 12372-12378.
- 87.- Nishihira, J., Ishibashi, T., Imai, Y. Production and characterization of specific antibodies against 1-O-alkyl-2-acetyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (a potent hypotensive and platelet-activating ether-linked phospholipid). (1984). **Biochem. J.** 95: 1247-1251.
- 88.- Honda, Z., Nakamura, M., Miki, I., Minami, M., Watanabe, T., Seyama, Y., Okado, H., Toh, H., Ito, K., Miyamoto, T., Shimizu, T. Cloning by functional expression of platelet-activating factor receptor from guinea-pig lung. (1991). **Nature.** 349: 342-346.
- 89.- Ye, R.D., Prossnitz, E.R., Zou, A., Cochrane, C.G. Characterization of a human cDNA that encodes a functional receptor for platelet-activating factor. (1991). **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 180: 105-111.

- 90.- Nakamura, M., Honda, Z.I., Izumi, T., Sakanaka, C., Mutoh, H., Minami, M., Bito, H., Seyama, Y., Matsumoto, T., Noma, M., Shimizu, T. Molecular cloning and expression of platelet-activating factor receptor from human leukocytes. (1991). *J. Biol. Chem.* 266: 20400-20405.
- 91.- Kunz, D., Gerard, N.P., Gerard, C. The human leukocyte platelet-activating factor receptor. cDNA cloning, cell surface expression, and construction of a novel epitope-bearing analog. (1992). *J. Biol. Chem.* 267: 9101-9106.
- 92.- Yue, T.L., Gleason, M.M., Hallenbeck, J., Feurstein, G. Characterization of PAF induced elevation of cytosolic free-calcium level in neurohybrid NCB-20 cells. (1991). *Neuroscience.* 41: 177-185.
- 93.- Kester, M., Kumar, R., Hanahan, D.J. Alkylacetyl-glycerophosphocholine stimulates Na^+ - Ca^{2+} exchange, protein phosphorylation and polyphosphoinositide turnover in rat ileal plasmalemmal vesicles. (1986). *Biochim. Biophys. Acta.* 888: 306-315.
- 94.- Montero, M., Alvarez, J., García-Sancho, J. Agonist-induced Ca^{2+} influx in human neutrophils is secondary to the emptying of intracellular calcium stores. (1991). *Biochem. J.* 277: 73-79.
- 95.- Alvarez, J., Montero, M., García-Sancho, J. High affinity inhibition of Ca^{2+} -dependent K^+ channels by cytochrome P-450 inhibitors. (1992). *J. Biol. Chem.* 267: 11789-11793.
- 96.- Glaser, K.B., Asmis, R., Dennis, E.A. Bacterial lipopolysaccharide priming of P388D₁ macrophage-like cells for enhanced arachidonic acid metabolism: PAF receptor activation and regulation of phospholipase A₂. (1990). *J. Biol. Chem.* 265: 8658-8664.

- 97.- Hwang, S.B. Identification of a second putative receptor for platelet-activating factor from human polymorphonuclear leukocytes. (1988). **J. Biol. Chem.** 263: 3225-3233.
- 98.- Dhar, A., Paul, A.K., Shukla, S.D. Platelet-activating factor stimulation of tyrosine kinase and its relationship to phospholipase C: studies with genistein and monoclonal antibody to phosphotyrosine. (1990). **Mol. Pharmacol.** 37: 519-525.
- 99.- Gómez-Cambronero, J., Wang, E., Johnson, G., Huang, C.K., Sha'afi, R.I. Platelet-activating factor induces tyrosine phosphorylation in human neutrophils. (1991). **J. Biol. Chem.** 266: 6240-6245.
- 100.- O'Flaherty, J.T., Redman, J.F., Jacobson, D.P., Rossi, A.G. Stimulation and priming of protein kinase C translocation by a Ca^{2+} transient-independent mechanism: studies in human neutrophils challenged with platelet-activating factor and other receptor agonist. (1990). **J. Biol. Chem.** 265: 21619-21623.
- 101.- O'Flaherty, J.T., Jacobson, D.P., Redman, F.F. Bidirectional effects of protein kinase C activators. Studies with human neutrophils and platelet-activating factor. (1989). **J. Biol. Chem.** 264: 6836-6843.
- 102.- Korth, R., Benveniste, J. BN 52021 displaces [3H]-paf acether from, and inhibits its binding to intact human platelets. (1987). **Eur. J. Pharmacol.** 142: 331-341.
- 103.- Ho, Y., Lee, W.M.F., Snyderman, R. Chemoattractant-induced activation of c-fos gene expression in human monocytes. (1987). **J. Exp. Med.** 165: 1524-1538.

- 104.- Lynch, J.M., Henson, P.M. The intracellular retention of newly synthesized platelet-activating factor. (1986). *J. Immunol.* 137: 2653-2661.
- 105.- Zimmerman, G.A., McIntyre, T.M., Mehra, M., Prescott, S.M. Endothelial cell-associated platelet-activating factor: a novel mechanism for signaling intercellular adhesion. (1990). *J. Cell Biol.* 110: 529-540.
- 106.- Stewart, A.G., Dubbin, P.N., Harris, T., Dusting, G.J. Platelet-activating factor may act as a second messenger in the release of icosanoids and superoxide anions from leukocytes and endothelial cells. (1990). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87: 3215-3219.
- 107.- Elstad, M.R., Prescott, S.M., McIntyre, T.M., Zimmerman, G.A. Synthesis and release of platelet-activating factor by stimulated human mononuclear phagocytes. (1987). *J. Immunol.* 140: 1618-1624.
- 108.- Ludwig, J.C., Hoppens, C.L., McManus, L.M., Mott, G.E., Pinckard, R.N. Modulation of platelet-activating factor (PAF) synthesis and release from human polymorphonuclear leukocytes (PMN): role of extracellular albumin. (1985). *Arch. Biochem. Biophys.* 241: 337-347.
- 109.- Leyravaud, S., Benveniste, J. Regulation of cellular retention of PAF-acether by extracellular pH and cell concentration. (1989). *Biochim. Biophys. Acta.* 1005: 192-195.
- 110.- Ludwig, J.C., McManus, L.M., Clark, P.O., Hanahan, D.J., Pinckard, R.N. Modulation of platelet-activating factor (PAF) synthesis and release from human polymorphonuclear leukocytes (PMN): role of extracellular Ca^{2+} . (1984). *Arch. Biochem. Biophys.* 232: 102-110.

- 111.- Cluzel, M., Udem, B.J., Chilton, F.H. Release of platelet-activating factor and the metabolism of leukotriene B₄ by the human neutrophil when studied in a cell superfusion model. (1989). **J. Immunol.** 143: 3659-3665.
- 112.- Miwa, M., Sugatani, J., Ikemura, T., Okamoto, Y., Ino, M., Saito, K., Suzuki, Y., Matsumoto, M. Release of newly synthesized platelet-activating factor (PAF) from human polymorphonuclear leukocytes under *in vivo* conditions. (1992). **J. Immunol.** 148: 872-880.
- 113.- Benveniste, J., Nuñez, D., Korth, R., Bidault, J., Fruchart, J.C. Preformed PAF-acether and lyso PAF-acether are bound to blood lipoproteins. (1988). **FEBS Lett.** 226: 371-376.
- 114.- Valone, F.H. Isolation of a platelet membrane protein which binds the platelet-activating factor 1-O-hexadecyl-2-acetyl-SN-glycero-3-phosphocholine. (1984). **Immunol.** 52: 169-174.
- 115.- Bratton, D.L., Kailey, J.M., Clay, K.L., Henson, P.M. A model for the extracellular release of platelet-activating factor: the influence of plasma membrane phospholipid asymmetry. (1991). **Biochim. Biophys. Acta.** 1062: 24-34.
- 116.- Bratton, D.L., Dreyer, E., Kailey, J.M., Fadok, V.A., Clay, K.L., Henson, P.M. The mechanism of internalization of platelet-activating factor in activated human neutrophils. (1992). **J. Immunol.** 148: 514-523.
- 117.- Ramesha, C.S., Pickett, W.C. Human neutrophil platelet-activating factor: Molecular heterogeneity in unstimulated and ionophore-stimulated cells. (1987). **Biochim. Biophys. Acta.** 921: 60-66.

- 118.- Ramesha, C.S., Pickett, W.C. Species-specific variations in the molecular heterogeneity of the platelet-activating factor. (1987). **J. Immunol.** 138: 1559-1563.
- 119.- Weintraub, S.T., Ludwig, J.C., Mott, G.E., McManus, L.M., Lear, L.M., Pinckard, R.N. Fast atom bombardment-mass spectrometric identification of molecular species of platelet-activating factor produced by stimulated human polymorphonuclear leukocytes. (1985). **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 129: 868-876.
- 120.- Pinckard, R.N., Jackson, E.M., Hoppens, C., Weintraub, S.T., Ludwig, J.C., McManus, L.M., Mott, G.E. Molecular heterogeneity of platelet-activating factor produced by stimulated human polymorphonuclear leukocytes. (1984). **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 122: 325-332.
- 121.- Satouchi, K., Pinckard, R.N., Hanahan, D.J. Influence of alkyl ether chain length of acetyl glyceryl ether phosphorylcholine and its ethanolamine analog on biological activity toward rabbit platelets. (1981). **Arch. Biochem. Biophys.** 211: 683-688.
- 122.- Surles, J.R., Wykle, R.L., O'Flaherty, J.T., Salzer, W.L., Thomas, M.J., Snyder, F., Piantadosi, C. Facile synthesis of platelet-activating factor and racemic analogues containing unsaturation in the *sn-1*-alkyl chain. (1985). **J. Med. Chem.** 28: 73-78.
- 123.- Czarnetzki, B.M., Muramatsu, T. Saturated and unsaturated 1-O-alkyl-2-O-acetyl-*sn*-glycero-3-phosphocholines derived from rat fish liver oil: Effect on human leukocyte migration. (1981). **Chem. Phys. Lipids.** 29: 309-315.

- 124.- Tessner, T.G., Wykle, R.L. Stimulated neutrophils produce an ethanolamine plasmalogen analog of platelet-activating factor. (1987). **J. Biol. Chem.** 262: 12660-12664.
- 125.- Lee, T.C., Uemura, Y., Snyder, F. A novel CoA-independent transacetylase produces de ethanolamine plasmalogen and acyl analogs of platelet-activating factor (PAF) with PAF as the acetate donor in HL-60 cells. (1992). **J. Biol. Chem.** 267: 19992-20001.
- 126.- Satouchi, K., Oda, M., Saito, K. 1-Acyl-2-acetyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine from stimulated human polymorphonuclear leukocytes. (1987). **Lipids.** 22: 285-287.
- 127.- Triggiani, M., Schleimer, R.P., Warner, J.A., Chilton, F.H. Differential synthesis of 1-acyl-2-acetyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine and platelet-activating factor by human inflammatory cells. (1991). **J. Immunol.** 147: 660-666.
- 128.- Ninio, E., Mencia-Huerta, J.M., Benveniste, J. Biosynthesis of platelet-activating factor (PAF-acether). V. Enhancement of acetyltransferase activity in murine peritoneal cells by calcium ionophore A23187. (1983). **Biochim. Biophys. Acta.** 751: 298-304.
- 129.- Sturk, A., Schaap, M.C.L., Prins, A., Wouter ten Cate, J., van den Bosch, H. Synthesis of platelet-activating factor by human blood platelets and leukocytes. Evidence against selective utilization of cellular ether-linked phospholipids. (1989). **Biochim. Biophys. Acta.** 993: 148-156.
- 130.- Triggiani, M., D'Souza, D.M., Chilton, F.H. Metabolism of 1-acyl-2-acetyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine in the human neutrophil. (1991). **J. Biol. Chem.** 266: 6928-6935.

- 131.- Culombo, M., Horowitz E.M., Patella, V., Kagey-Sobotka, A., MacGlashan Jr., D.W., Chilton, F.H., Lichtenstein, L.M. The effects of 1-alkyl-2-acetyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (PAF) and 1-acyl-2-acetyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (AAPC) on human basophil mediator release. (1991). **J. Allergy Clin. Immunol.** 87: 241. (Abstr. 408).
- 132.- Triggiani, M., Goldman, D.W., Chilton, F.H. Biological effects of 1-acyl-2-acetyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine in the human neutrophil. (1991). **Biochim. Biophys. Acta.** 1084: 41-47.
- 133.- Smiley, P.L., Stremier, K.E., Prescott, S.M., Zimmerman, G.A., McIntyre, T.M. Oxidatively fragmented phosphatidylcholines activate human neutrophils through the receptor for platelet-activating factor. (1991). **J. Biol. Chem.** 266: 11104-11110.
- 134.- Tokumura, A., Asai, T., Takauchi, K., Kamiyasu, K., Ogawa, T., Tsukatani, H. Novel phospholipids with aliphatic dicarboxylic acid residues in a lipid extract from bovine brain. (1988). **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 155: 863-869.
- 135.- Yoshida, J., Tokumura, A., Fukuzawa, K., Terao, M., Takauchi, K., Tsukatani, H. A platelet-aggregating and hypotensive phospholipid isolated from bovine brain. (1986). **J. Pharm. Pharmacol.** 38: 878-882.
- 136.- Terashita, Z., Imura, Y., Nishikawa, K. Inhibition by CV-3988 of the binding of [³H]-platelet-activating factor (PAF) to the platelet. (1985). **Biochem. Pharmacol.** 34: 1491-1495.
- 137.- Hwang, S-B., Lam, M-H., Biftu, T., Beattie, T.R., Shen, T-Y. Trans-2,5-bis-(3,4,5-trimethoxyphenyl)tetrahydrofuran. An orally active specific and competitive receptor antagonist of platelet-activating factor. (1985). **J. Biol. Chem.** 261: 15639-15645.

- 138.- Casals-Stenzel, J., Muacevic, G., Weber, K.H. Pharmacological actions of WEB 2086, a new specific antagonist of platelet-activating factor. (1987). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 241: 974-981.
- 139.- Pons, F., Touvay, C., Lejeune, V., Carre, C., Vilain, B., Braquet, C., Mencia-Huerta, J.M., Braquet, P. Action of platelet-activating factor (PAF) antagonists on the bronchopulmonary effects of PAF in the guinea-pig. (1989). *J. Lipid. Mediat.* 1: 329-340.
- 140.- Shen, T.Y., Hwang, S-B., Chang, M.N., Doebber, T.W., Lam, M-H.T., Wu, M.S., Wang, X., Han, G.Q., Li, R.Z. Characterization of a platelet-activating factor receptor antagonist isolated from haifenteng (*Piper futokadsura*): specific inhibition of *in vitro* and *in vivo* platelet-activating factor-induced effects. (1985). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82: 672-676.
- 141.- Miwa, M., Hiil, C., Kumar, R., Sugatani, J., Olson, M.S., Hanahan, D.J. Occurrence of an endogenous inhibitor of platelet-activating factor in rat liver. (1987). *J. Biol. Chem.* 262: 527-530.
- 142.- Nakayama, R., Yasuda, K., Saito, K. Existence of endogenous inhibitors of platelet-activating factor (PAF) with PAF in rat uterus. (1987). *J. Biol. Chem.* 262: 13174-13179.
- 143.- Mencia-Huerta, J.M., Hosford, D., Braquet, P. Acute and long-term pulmonary effects of platelet-activating factor. (1989). *Clin. Exp. Allergy.* 19: 125-142.
- 144.- Johnston, J.M., Bleasdale, J.E., Hoffman, D.R. Functions of platelet-activating factor (PAF) in reproduction and development: Involvement of PAF in fetal lung maturation and parturition. (1987). In: **Snyder F, Ed. Platelet-activating factor and related lipid mediators. New York: Plenum Press.** 375-402.

- 145.- Dawson, R.M. A hydrolytic procedure for the identification and estimation of individual phospholipids in biological samples. (1960). **Biochem. J.** 75: 45-53.
- 146.- Wykle, R.L., Malone, B., Snyder, F. Enzymatic synthesis of 1-alkyl-2-acetyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine, a hypotensive and platelet-aggregating lipid. (1980). **J. Biol. Chem.** 255: 10256-10260.
- 147.- Bligh, E.G., Dyer, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. (1959). **Can. J. Biochem. Physiol.** 37: 911-919.
- 148.- Blank, M.L., Snyder, F. Improved high-performance liquid chromatographic method for isolation of platelet-activating factor from other phospholipids. (1983). **J. Chromatography.** 273: 415-420.
- 149.- Henson, P.M. Activation and desensitization of platelets by platelet-activating factor (PAF) derived from IgE-sensitized basophils. I. Characteristics of the secretory response. (1976). **J. Exp. Med.** 143: 937-952.
- 150.- Gryniewicz, G., Poenie, M., Tsien, R. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. (1985). **J. Biol. Chem.** 260: 3440-3450.
- 151.- Venable, M.E., Nieto, M.L., Schmitt, J.D., Wykle, R.L. Conversion of 1-O-[³H]-alkyl-2-arachidonoyl-*sn*-glycero-3-phosphorylcholine to lyso platelet-activating factor by the CoA-independent transacylase in membrane fractions of human neutrophils. (1991). **J. Biol. Chem.** 266: 18691-18698.

- 152.- Tennenberg, S.D., Zemlan, F.P., Solomkin, J.S. Characterization of N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine receptors on human neutrophils. Effects of isolation and temperature on receptor expression and functional activity. (1988). **J. Immunol.** 141: 3937-3944.
- 153.- Omann, G.M., Allen, R.A., Bokoch, G.M., Painter, R.G., Traynor, A.E., Skylar, R.A. Signal transduction and cytoskeletal activation in the neutrophil. (1987). **Physiol. Rev.** 67: 285-322.
- 154.- Nieto, M.L., Velasco, S., Sánchez-Crespo, M. Biosynthesis of platelet-activating factor in human polymorphonuclear leukocytes. Involvement of the cholinephosphotransferase pathway in response to the phorbol esters. (1988). **J. Biol. Chem.** 263: 2217-2222.
- 155.- Hagenlocker, B.E., Walker, B.A.M., Ward, P.A., Superoxide responses of immune complex-stimulated rat alveolar macrophages. Intracellular calcium and priming. (1990). **J. Immunol.** 144: 3898-3906.
- 156.- Bauldry, S.A., Bass, D.A., Cousart, S.L., McCall, C.E. Tumor necrosis factor α priming of phospholipase D in human neutrophils. Correlation between phosphatidic acid production and superoxide generation. (1991). **J. Biol. Chem.** 266: 4173-4179.
- 157.- Bourgoin, S., Plante, E., Gaudry, M., Naccache, P.H., Borgeat, P., Poubelle, P.E. Involvement of a phospholipase D in the mechanism of action of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF): priming of human neutrophils in vitro with GM-CSF is associated with accumulation of phosphatidic acid and diradylglycerol. (1990). **J. Exp. Med.** 172: 767-777.

- 158.- Grinstein, S., Furuya, W. Chemoattractant-induced tyrosine phosphorylation and activation of microtubule-associated protein kinase in human neutrophils. (1992). **J. Biol. Chem.** 267: 18122-18125.
- 159.- Betz, S.J., Henson, P.M. Production and release of platelet-activating factor: dissociation from degranulation and superoxide production in human polymorphonuclear leukocytes. (1980). **J. Immunol.** 125: 2756-2763.
- 160.- Wirthmueller, U., De Weck, A.L., Dahinden, C.A. Platelet-activating factor production in human neutrophils by sequential stimulation with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and the chemotactic factors C5a or formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine. (1989). **J. Immunol.** 142: 3213-3218.
- 161.- Tyagi, S.R., Burnham, D.N., Lambeth, J.D. On the biological occurrence and regulation of 1-acyl and 1-O-alkyl-diradylglycerols in human neutrophils. Selective destruction of diacyl species using *Rhizopus* lipase. (1989). **J. Biol. Chem.** 264: 12977-12982.
- 162.- Grimminger, F., Sibellius, U., Aktories, K., Just, I., Seeger, W. Suppression of cytoskeletal rearrangement in activated human neutrophils by botulinum C₂ toxin. Impact on cellular signal transduction. (1991). **J. Biol. Chem.** 266: 19276-19282.
- 163.- Frank, R.S. Time-dependent alterations in the deformability of human neutrophils in response to chemotactic activation. (1990). **Blood.** 76: 2606-2612.

- 164.- Treves, S., Di Virgilio, F., Vaselli, V.M., Pozzan, T. Effect of cytochalasins on cytosolic-free calcium concentration and phosphoinositide metabolism in leukocytes. (1987). **Exp. Cell Research**. 168: 285-298.
- 165.- Vilcek, J., Lee, T.H. Tumor necrosis factor. New insights into the molecular mechanism of its multiple actions. (1991). **J. Biol. Chem.** 266: 7313-7316.
- 166.- Utsumi, T., Klostergaard, J., Akimaru, K., Edashige, K., Sato, E.F., Utsumi, K. Modulation of TNF- α -priming and stimulation-dependent superoxide generation in human neutrophils by protein kinase inhibitors. (1992). **Arch. Biochem. Biophys.** 294: 271-278.
- 167.- Petersen, M., Steadman, R., Hallet, M.B., Matthews, N., Williams, J.D. Zymosan-induced leukotriene B₄ generation by human neutrophils is augmented by rhTNF- α but not chemotactic peptide. (1990). **Immunol.** 70: 75-81.
- 168.- Bauldry, S.A., McCall, C.E., Cousart, S.L., Bass, D.A. Tumor necrosis factor- α priming of phospholipase A₂ activation in human neutrophils. An alternative mechanism of priming. (1991). **J. Immunol.** 146: 1277-1285.
- 169.- O'Flaherty, J.T., Rossi, A.G., Redman, J.F., Jacobson, D.P. Tumor necrosis factor- α regulates expression of receptors for formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine, leukotriene B₄, and platelet-activating factor. (1991). **J. Immunol.** 147: 3842-3847.

- 170.- Dahinden, C.A., Zingg, J., Maly, F.E., De Weck, A.L. Leukotriene production in human neutrophils primed by recombinant human granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and stimulated with the complement component C5a and fMLP as second signals. (1988). **J. Exp. Med.** 167: 1281-1295.
- 171.- Worthen, G.S., Seccombe, J.F., Clay, K.L., Guthrie, L.A., Johnston Jr, R.B. The priming of neutrophils by lipopolysaccharide for production of intracellular platelet-activating factor. Potential role in mediation of enhanced superoxide secretion. (1988). **J. Immunol.** 140: 3553-3559.
- 172.- Tobias, P.S., Soldau, K., Morse I.S. Isolation of a lipopolysaccharide-binding acute phase reactant from rabbit serum. (1986). **J. Exp. Med.** 164: 777-793.
- 173.- Albert, D.H., Snyder, F. Biosynthesis of PAF from 1-alkyl-2-acyl-sn-glycero-3-phosphocholine by rat alveolar macrophages. (1983). **J. Biol. Chem.** 258: 97-102.
- 174.- Traynor, J.R., Authi, K.S. Phospholipase A₂ activity of lysosomal origin secreted by polymorphonuclear leukocytes during phagocytosis or on treatment with calcium. (1981). **Biochim. Biophys. Acta.** 665: 571-577.
- 175.- Lanni, C., Becker, E.L. Release of phospholipase A₂ activity from rabbit peritoneal neutrophils by f-met-leu-phe. (1983). **Am. J. Pathol.** 113: 90-94.
- 176.- Mizushima, H., Kudo, I., Horigome, K., Murakami, M., Hayakawa, M., Kim, D.K., Kondo, E., Tomita, M., Inoue, K. Purification of rabbit platelet secretory phospholipase A₂ and its characteristics. (1989). **J. Biochem. Tokyo.** 105: 520-525.

- 177.- Pernas, P., Masliah, J., Olivier, J.L., Salvat, C., Rubkine, T., Bereziat, G. Type II phospholipase A₂ recombinant overexpression enhances stimulated arachidonic acid release. (1991). **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 178: 1298-1305.
- 178.- Stefanski, E., Pruzanski, V., Sternby, B., Vadas, P. Purification of a soluble phospholipase A₂ from synovial fluid in rheumatoid arthritis. (1986). **Biochem. J.** 100: 1297-1303.
- 179.- Seilhamer, J.J., Pruzanski, V., Vadas, P., Plant, S., Miller, J.A., Kloss, J., Johnson, L.K. Cloning and recombinant expression of phospholipase A₂ present in rheumatoid arthritic synovial fluid. (1989). **J. Biol. Chem.** 264: 5335-5338.
- 180.- Kramer, R.M., Hession, C., Johansen, B., Hayes, G., McGray, P., Chow, E.P., Tizard, R., Pepinsky, R.B. Structure and properties of a human non-pancreatic phospholipase A₂. (1989). **J. Biol. Chem.** 264: 5768-5775.
- 181.- Meshulam, T., Herscovitz, H., Casavant, D., Bernardo, J., Roman, R., Haugland, R.P., Strohmeier, G.S., Diamond, R.D., Simons, E.R. Flow cytometric kinetic measurements of neutrophil phospholipase A activation. (1992). **J. Biol. Chem.** 267: 21465-21470.
- 182.- Jesse, R.L., Franson, R.C. Modulation of purified phospholipase A₂ activity from human platelets by calcium and indomethacin. (1979). **Biochim. Biophys. Acta.** 575: 467-470.
- 183.- Ballou, L.R., Cheung, W.Y. Marked increase of human platelet phospholipase A₂ activity *in vitro* and demonstration of an endogenous inhibitor. (1983). **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 80: 5203-5207.

- 184.- Bauldry, S.A., Wykle, R.L., Bass, D.A. Phospholipase A₂ activation in human neutrophils. Differential actions of diacylglycerols and alkylacylglycerols in priming cells for stimulation by N-formyl-met-leu-phe. (1988). **J. Biol. Chem.** 263: 16787-16795.
- 185.- McIntyre, T.M., Reinhold, S.L., Prescott, S.M., Zimmerman, G.A. Protein kinase C activity appears to be required for the synthesis of platelet-activating factor and leukotriene B₄ by human neutrophils. (1987). **J. Biol. Chem.** 263: 15370-15376.
- 186.- Horii, T., Satouchi, K., Kobayashi, Y., Saito, K., Watanabe, S., Yoshida, Y., Okuyama, H. Effect of dietary α -linoleate on platelet-activating factor production in rat peritoneal polymorphonuclear leukocytes. (1991). **J. Immunol.** 147: 1607-1613.
- 187.- Dulioust, A., Vivier, E., Meslier, N., Roubin, R., Haye-Legrand, I., Benveniste, J. Biosynthesis of platelet-activating factor. Paf-acether but not leukotriene C₄ production is impaired in cultured macrophages. (1989). **Biochem. J.** 263: 165-171.
- 188.- Croft, K.D., Codde, J.P., Barden, A., Vandongen, R., Beilin, L.J. Effect of dietary fish oils on the formation of leukotriene B₄ and B₅, thromboxane and platelet-activating factor by rat leukocytes. (1988). **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.** 15: 517-525.
- 189.- Kramer, R.M., Deykin, D. Arachidonoyl transacylase in human platelets. Coenzyme A-independent transfer of arachidonate from phosphatidylcholine to lysoplasmylethanolamine. (1983). **J. Biol. Chem.** 258: 13806-13811.

- 190.- Masrar, H., Bereziat, G., Colard, O. Very high proportion of disaturated molecular species in rat platelet diacyl-glycerophosphocholine: involvement of CoA-dependent transacylation reactions. (1990). **Arch. Biochem. Biophys.** 281: 116-123.
- 191.- Uemura, Y., Lee, T.C., Snyder, F. A CoA-independent transacylase is linked to the formation of platelet-activating factor (PAF) by generating lyso-PAF intermediate in the remodelling pathway. (1991). **J. Biol. Chem.** 266: 8268-8272.
- 192.- Winkler, J.D., Sung, C.M., Bennett, C.F., Chilton, F.H. Characterization of CoA-independent transacylase activity in U937 cells. (1991). **Biochim. Biophys. Acta.** 1081: 339-346.
- 193.- MacDonald, J.I.S., Sprecher, H. Phospholipid fatty acid remodeling in mammalian cells. (1991). **Biochim. Biophys. Acta.** 1084: 105-121.
- 194.- Nieto, M.L., Venable, M.E., Bauldry, S.A., Greene, D.G., Kennedy, M., Bass, D.A., Wykle, R.L. Evidence that hydrolysis of ethanolamine plasmalogens triggers synthesis of platelet-activating factor via a transacylase reaction. (1991). **J. Biol. Chem.** 266: 18699-18706.
- 195.- Tessner, T.G., Greene, D.G., Wykle, R.L. Selective deacylation of arachidonate-containing ethanolamine-linked phosphoglycerides in stimulated human neutrophils. (1990). **J. Biol. Chem.** 265: 21032-21038.
- 196.- Díez, E., Balsinde, J., Mollinedo, F. Subcellular distribution of fatty acids, phospholipids and phospholipase A₂ in human neutrophils. (1990). **Biochim. Biophys. Acta.** 1047: 83-89.

- 197.- Fonteh, A.N., Chilton, F.H. Rapid remodeling of arachidonate from phosphatidylcholine to phosphatidylethanolamine pools during mast cell activation. (1992). *J. Immunol.* 148: 1784-1791.
- 198.- Turini, M.E., Holub, B.J. Eicosanoid/thromboxane A₂-independent and -dependent generation of lysoplasmethyleneamine via phospholipase A₂ in collagen-stimulated human platelets. (1993). *Biochem. J.* 289: 641-646.
- 199.- Colard, O., Breton, M., Bereziat, G. Hydrolysis of endogenous phospholipids by rat platelet phospholipase A₂: ether or acyl bond and polar head group selectivity. (1987). *Biochim. Biophys. Acta.* 921: 333-340.
- 200.- Nies, A.S., Tunney, A., Barden, A., Sturm, M., Vandongen, R. Release of platelet-activating factor by the isolated kidney is not linked to the production of prostaglandins. (1991). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 259: 590-594.
- 201.- Holland, M.R., Venable, M.E., Whatley, R.E., Zimmerman, G.A., McIntyre, T.M., Prescott, S.M. Activation of the acetyl-coenzyme A:lysoplatelet-activating factor acetyltransferase regulates platelet-activating factor synthesis in human endothelial cells. (1992). *J. Biol. Chem.* 267: 22883-22890.
- 202.- Truett, A.P., Verghese, M.W., Dillon, S.B., Snyderman, R. Calcium influx stimulates a second pathway for sustained diacylglycerol production in leukocytes activated by chemoattractants. (1988). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85: 1549-1553.

- 203.- Lew, P.D., Wollheim, C.B., Waldvogel, F.A., Pozzan, T. Modulation of cytosolic-free calcium transients by changes in intracellular calcium-buffering capacity: correlation with exocytosis and O_2^- production in human neutrophils. (1984). *J. Cell Biol.* 99: 1212-1220.
- 204.- Pai, J.K., Siegel, M.I., Egan, R.W., Billah, M.M. Phospholipase D catalyzes phospholipid metabolism in chemotactic peptide-stimulated HL-60 granulocytes. (1988). *J. Biol. Chem.* 263: 12472-12477.
- 205.- Billah, M.M., Eckel, S., Mullmann, T.J., Egan, R.W., Siegel, M.I. Phosphatidylcholine hydrolysis by phospholipase D determines phosphatidate and diglyceride levels in chemotactic peptide-stimulated human neutrophils. (1989). *J. Biol. Chem.* 264: 17069-17077.
- 206.- Rossi, F., Grzeskowiak, M., Della-Bianca, V., Calzetti, F., Gandini, G. Phosphatidic acid and not diacylglycerol generated by phospholipase D is functionally linked to the activation of the NADPH oxidase by fMLP in human neutrophils. (1990). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 168: 320-327.
- 207.- Thompson, N.T., Tateson, J.E., Randall, R.W., Spacey, G.D., Bonser, R.W., Garland, L.G. The temporal relationship between phospholipase activation, diradylglycerol formation and superoxide production in the human neutrophil. (1990). *Biochem. J.* 271: 209-213.
- 208.- Mullmann, T.J., Siegel, M.I., Egan, R.W., Billah, M.M. Phorbol-12-myristate-13-acetate activation of phospholipase D in human neutrophils leads to the production of phosphatidates and diglycerides. (1990). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 170: 1197-1202.

- 209.- Uings, I.J., Thompson, N.T., Randall, R.W., Spacey, G.D., Bonser, R.W., Hudson, A.T., Garland, L.G. Tyrosine phosphorylation is involved in receptor coupling to phospholipase D but not phospholipase C in the human neutrophil. (1992). **Biochem. J.** 281: 597-600.
- 210.- Gay, J.C., Murray, J.J. Differential effects of propranolol on responses to receptor-dependent and receptor-independent stimuli in human neutrophils. (1991). **Biochim. Biophys. Acta.** 1095: 236-242.
- 211.- English, D., Taylor, G.S. Divergent effects of propranolol on neutrophil superoxide release: involvement of phosphatidic acid and diacylglycerol as second messengers. (1991). **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 175: 423-429.
- 212.- Lin, P., Wiggan, G.A., Gilfillan, A.M. Activation of phospholipase D in a rat mast (RBL 2H3) cell line. A possible unifying mechanism for IgE-dependent degranulation and arachidonic acid metabolite release. (1991). **J. Immunol.** 146: 1609-1616.
- 213.- Sozzani, S., Agwu, D.E., McCall, C.E., O'Flaherty, J.T., Schmitt, J.D., Kent, J.D., McPhail, L.C. Propranolol, a phosphatidate phosphohydrolase inhibitor, also inhibits protein kinase C. (1992). **J. Biol. Chem.** 267: 20481-20488.
- 214.- Dash, D., Rao, G.R.K. Characterization of the effects of propranolol on the physical state of platelet membrane. (1990). **Arch. Biochem. Biophys.** 276: 343-347.
- 215.- Satouchi, K., Oda, M., Saito, K., Hanahan, D.J. Metabolism of 1-O-alkyl-2-acetyl-*sn*-glycerol by washed rabbit platelets: formation of platelet-activating factor. (1984). **Arch. Biochem. Biophys.** 234: 318-321.

- 216.- Agwu, D.E., McPhail, L.C., Sozzani, S., Bass, D.A., McCall, C.E. Phosphatidic acid as a second messenger in human polymorphonuclear leukocytes. (1991). **J. Clin. Inves.** 88: 531-539.
- 217.- Benton, A.M., Gerrard, J.M., Michiel, T., Kindom, S.E. Are lysophosphatidic acids or phosphatidic acids involved in stimulus activation coupling in platelets? (1982). **Blood.** 60: 642-649.
- 218.- Knauss, T.C., Jaffer, F.E., Abboud, H.E. Phosphatidic acid modulates DNA synthesis, phospholipase C, and platelet-derived growth factor mRNAs in cultured mesangial cells. Role of protein kinase C. (1990). **J. Biol. Chem.** 265: 14457-14463.
- 219.- Moolenaar, W.H., Kruijer, W., Tilly, B.C., Verlaan, I., Bierman, A.J., Laat, S.W. Growth factor-like action of phosphatidic acid. (1986). **Nature.** 323: 171-173.

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS.

- PAF.- Factor activador de las plaquetas. 1-O-hexadecil-2-acetil-*sn*-glicero-3-fosfocolina. Acetil-gliceril-éter-fosfocolina (AGEPC).
- liso-PAF.- 1-O-hexadecil-2-liso-*sn*-glicero-3-fosfocolina.
- DG-PAF.- Diglicérido del PAF. 1-O-hexadecil-2-acetil-*sn*-glicerol.
- 5-HETE.- Acido 5-hidroxieicosatetraenóico.
- LTB₄.- Leucotrieno B₄.
- LTC₄.- Leucotrieno C₄.
- GPC.- *sn*-glicero-3-fosfocolina.
- PC.- Fosfatidilcolina.
- GP.- *sn*-glicero-3-fosfato.
- PA.- Acido fosfatídico.
- Liso-PA.- Acido liso-fosfatídico.
- GPE.- *sn*-glicero-3-fosfoetanolamina.
- PE.- Fosfatidiletanolamina.
- Liso-PE.- Liso-fosfatidiletanolamina.
- AA.- Acido araquidónico.
- DG.- Diglicérido.
- LN.- Lípidos neutros.
- PGs.- Prostaglandinas.
- IP₃.- Inositol trifosfato.
- IP₄.- Inositol tetrafosfato.
- IP₅.- Inositol pentafosfato.
- PMNs.- Leucocitos polimorfonucleares.
- TLC.- Cromatografía en capa fina.
- HPLC.- Cromatografía líquida de alta presión.
- IC₅₀.- Concentración de inhibidor a la cual produce el 50 % de su efecto.
- K_d.- Constante de disociación.
- K_m.- Constante de Michaelis-Menten.

- V_{máx.}- Velocidad máxima de una reacción enzimática.
- Da.- Dalton.
- KDa.- Kilodalton.
- CoA.- Coenzima A.
- AMPc.- 3' 5' fosfato cíclico de adenosina.
- CDP-colina.- Citidil-difosfo colina.
- DTT.- Ditioneitol.
- GTP.- Guanosina 5'-trifosfato.
- HSA.- Albúmina de suero humano.
- BSA.- Albúmina de suero bovino.
- EDTA.- Acido etilendiamino tetraacético.
- EGTA.- Acido etilenglicol-bis-(β-aminoetiléter)-N,N,N'N'-tetraacético.
- DMSO.- dimetilsulfóxido.
- CB.- Citocalasina B.
- CB + fMLP.- Estimulación de los neutrófilos con fMLP 1 μM y citocalasina B 5 μg/ml.
- PMSF.- Fenilmetilsulfonil fluoruro.
- Pi.- Fósforo atómico.
- Hepes.- Acido N-2-Hidroxietilpiperacina-N'-2-etanosulfónico.
- TRIS.- TRIS-(hidroximetil)-aminometano.
- ACD.- Solución citrato-dextrosa.
- [Ca²⁺]_i.- Concentración de calcio intracelular.
- PLA₂.- Fosfolipasa A₂.
- PLC.- Fosfolipasa C.
- PLD.- Fosfolipasa D.
- PKA.- Proteína quinasa A.
- PKC.- Proteína quinasa C.
- AT.- Enzima acetil-CoA:liso-PAF acetiltransferasa.
- HDL.- Lipoproteínas de alta densidad.
- LDL.- Lipoproteínas de baja densidad.
- PPH.- Fosfohidrolasa del ácido fosfatídico.
- fMLP.- N-formil-metionil-leucil-fenilalanina.

-
- ION. A23187.- Ionóforo de calcio A23187.
 - GM-CSF.- Factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos.
 - TNF- α .- Factor de necrosis tumoral alfa.
 - PMA.- Forbol 12-miristato 13-acetato.
 - C5a.- Anafilatoxina liberada tras la activación del quinto componente del sistema del complemento (C5) por la acción de la C5-convertasa.
 - mRNA.- Acido ribonucleico mensajero.
 - cDNA.- Acido desoxirribonucleico complementario.