

R.10975
T 889

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA,
BROMATOLOGIA Y TOXICOLOGIA.

**ESTUDIO DE LA VARIACION DE LA ACTIVIDAD
INMUNOLOGICA DE MACROFAGOS DURANTE EL
ENVEJECIMIENTO**

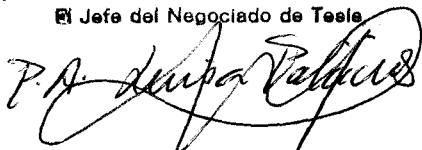
Tesis que presenta la Lda.
Eloísa Álvarez Sánchez
para optar al grado de Doctora
en Farmacia.

Sevilla, Mayo de 1995

Queda registrada esta Tesis Doctoral
al folio 14 número 161 del libro
correspondiente.

Sevilla, 23 MAYO 1995

El Jefe del Negociado de Tesis

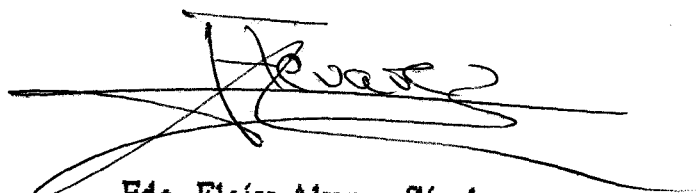


UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE FARMACIA

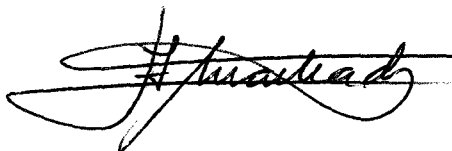
**DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA,
BROMATOLOGIA Y TOXICOLOGIA.**

Tesis que presenta la Lda. Eloísa Alvarez Sánchez para
optar el grado de Doctora en Farmacia.



Fdo. Eloísa Alvarez Sánchez

Director



Fdo. Dr. Alberto Machado
de la Quintana

Director

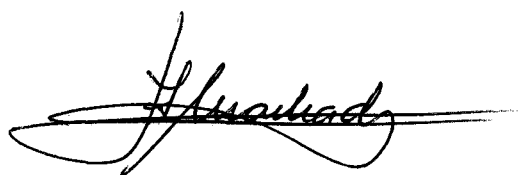


Fdo. Dra. Consuelo Santa María
Pérez

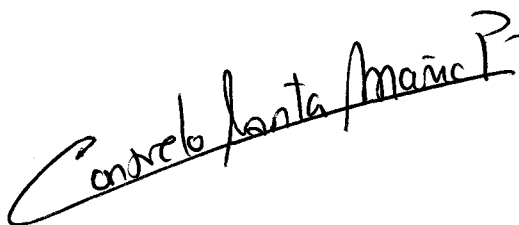
ALBERTO MACHADO DE LA QUINTANA, CATEDRATICO
NUMERARIO Y CONSUELO SANTA MARIA PEREZ,
PROFESORA TITULAR, DEL DEPARTAMENTO DE
BIOQUIMICA, BROMATOLOGIA Y TOXICOLOGIA DE LA
UNIVERSIDAD DE SEVILLA.

CERTIFICAN: Que la tesis doctoral titulada "**Estudio de la variación de la actividad inmunológica de macrófagos durante el envejecimiento**", presentada por la Lda. ELOISA ALVAREZ SANCHEZ para optar al grado de Doctora en Farmacia, ha sido realizada en el Departamento de Bioquímica, Bromatología y Toxicología de la Universidad de Sevilla, reuniendo los requisitos exigidos.

Y para que así conste, firmamos el presente certificado en
Sevilla, 23 de Mayo de 1995.



Fdo. Alberto Machado
de la Quintana

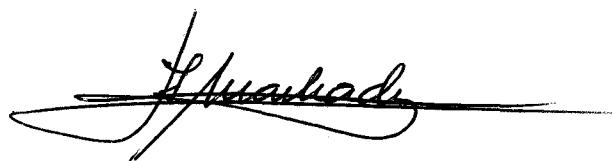


Fdo. Consuelo Santa María
Pérez

ALBERTO MACHADO DE LA QUINTANA, DIRECTOR DEL
DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA, BROMATOLOGIA Y
TOXICOLOGIA DE LA UNIVERSIDAD DE SEVILLA.

CERTIFICA: Que la tesis doctoral titulada "**Estudio de la variación de la actividad inmunológica de macrófagos durante el envejecimiento**", presentada por la Lda. ELOISA ALVAREZ SANCHEZ para optar al grado de Doctora en Farmacia, ha sido realizada en el Departamento de Bioquímica, Bromatología y Toxicología de la Universidad de Sevilla, reuniendo los requisitos exigidos.

Y para que así conste, firmamos el presente certificado en
Sevilla, 23 de Mayo de 1995.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'A. Machado', is written over a horizontal line. The signature is fluid and cursive.

Fdo. Alberto Machado de la Quintana

A mis seres más queridos

Los resultados presentados en esta Tesis han sido publicados parcialmente, con anterioridad en:

Alvarez, E., Ruiz-Gutiérrez, V., Santa María, C. y Machado, A. (1993) Age-dependent modification of lipid composition and lipid structural order parameter of rat peritoneal macrophage membranes. *Mech. Ageing Dev.* 71, 1-12.

Alvarez, E., Santa María, C. y Machado, A. (1993) Respiratory burst reaction changes with age in rat peritoneal macrophages. *Biochim. Biophys. Acta* 1179, 247-252.

Alvarez, E., Conde, M., Machado, A., Sobrino, F. y Santa María, C. Free radicals (O_2^- , $NO\cdot$) production decreases with age in rat peritoneal macrophages. *Biochem. J.* (en prensa).

Alvarez, E., Machado, A., Sobrino, F. y Santa María, C. Nitric oxide and superoxide anion production decrease with age in resident and activated rat peritoneal macrophages. *Immunology* (en revisión).

INDICE

I. INTRODUCCION

1. EL MACROFAGO

1.1	Papel del macrofago en el sistema inmune	1
1.2	Características metabólicas del macrófago	4
1.3	Estados funcionales del macrófago	5

2. ESTALLIDO RESPIRATORIO

2.1	Concepto de estallido respiratorio	8
2.2	Inducción del estallido respiratorio	11
2.3.	Productos liberados: radicales libres de oxígeno	12
2.4	Base enzimática de la producción de O_2^- :	
2.4.1	Propiedades de la NADPH oxidasa	15
2.4.2	Componentes de la NADPH oxidasa	17
2.4.3	Mecanismos de activación de la NADPH oxidasa	21
2.5	Integridad de la membrana	28
2.6	Efectos de los radicales libres de oxígeno	30
2.7	Mecanismos de defensa frente a los radicales	31

3. PRODUCCION DE RADICALES LIBRES DE NITROGENO: OXIDO NITRICO

3.1	Síntesis de óxido nítrico	33
3.2	Mecanismos de acción de los radicales libres del nitrógeno	36

4. ENVEJECIMIENTO Y SISTEMA INMUNE

4.1	Generalidades	39
4.2	Linfocitos y envejecimiento	40

4.3 Células fagocíticas y envejecimiento	42
II. OBJETIVOS	44
III. MATERIALES Y METODOS	
1. Materiales	46
2. Anamíles y tratamientos	47
3. Obtención de células	
3.1 Obtención de macrófagos peritoneales de rata	48
3.2 Obtención de monocitos humanos	48
3.3 Determinación de la viabilidad celular por exclusión con azul de tripán y conteo celular	49
4. Medida de la producción de anión superóxido:	
4.1 Fundamento	50
4.2 Preparación de agentes estimulantes del estallido respiratorio	50
4.3 Producción de O_2^- por células intactas	50
4.4 Producción de O_2^- por sistemas libres de células: actividad NADPH-oxidasa:	
4.4.1 Preparación del sobrenadante postnuclear	51
4.4.2 Medida de la actividad enzimática	51
5. Medida de la producción de peróxido de hidrógeno:	
5.1 Fundamento	53
5.2 Determinación de la producción de H_2O_2	54
5.3 Curva de calibración de H_2O_2	54
6. Medida de la producción de óxido nítrico:	
6.1 Fundamento	55
6.2 Cultivo de macrófagos	55

6.3 Cuantificación de nitritos	55
7. Medida de actividades enzimáticas:	
7.1 Preparación de los macrófagos peritoneales para los ensayos enzimáticos	57
7.2 Enzimas estudiadas	57
8. Determinación de los niveles de NADP y NADPH	60
9. Determinación de los niveles de lactato	61
10. Actividad del ciclo de las pentosas fosfato	62
11. Transporte de glucosa	63
12. Cuantificación lipídica en membranas de macrófagos peritoneales:	
12.1 Aislamiento de membranas	64
12.2 Medidas de fluidez	64
12.3 Extracción y separación de lípidos	65
12.4 Análisis de ácidos grasos	66
13. Medida de la concentración de proteínas	67

IV. RESULTADOS

1. Obtención y conteo de macrófagos residentes, inflamados y activados obtenidos de la cavidad peritoneal de ratas	68
2. Producción de O_2^- por macrófagos peritoneales de rata: dependencia de la concentración de PMA	70
3. Efecto de la concentración de glucosa sobre la producción de O_2^- por macrófagos peritoneales de rata estimulados con PMA	70
4. Producción de O_2^- por macrófagos peritoneales de rata estimulados con PMA	73
5. Producción de O_2^- por macrófagos peritoneales de rata	

estimulados con N-FMLP y Con-A	75
6. Producción de O_2^- por macrófagos peritoneales de rata: dependencia del estado funcional del macrófago	79
7. Producción de O_2^- por monocitos humanos estimulados con PMA	79
8. Producción de H_2O_2 por macrófagos peritoneales de rata estimulados con PMA	81
9. Actividad NADPH oxidasa en macrófagos peritoneales de rata	84
10. Producción de NO_2^- por macrófagos peritoneales de rata	84
11. Ruta de las pentosas fosfato en macrófagos peritoneales de rata:	
11.1 Cuantificación de la actividad enzimática de la G6P-DH y de la 6PG-DH	88
11.2 Flujo de las pentosas fosfato	88
11.3 Medida de los niveles de NADP y NADPH	91
11.4 Cuantificación de la actividad de la enzima málica	94
12. Estudio del transporte de glucosa y efecto de diferentes concentraciones de glucosa sobre la producción de O_2^- :	
12.1 Transporte y acumulación de glucosa en macrófagos peritoneales de rata	96
12.2 Efecto de la concentración de glucosa en los niveles de producción de O_2^- por macrófagos peritoneales de rata	96
13. Estudio de las actividades de enzimas detoxificantes en macrófagos peritoneales de rata	101
14. Flujo glucolítico en macrófagos peritoneales de rata:	
14.1 Actividades de enzimas glucolíticas	101
14.2 Actividades de enzimas del ciclo de Krebs	106
14.3 Cuantificación de los niveles de lactato	111
15. Fluidez de membrana de macrófagos peritoneales de rata	113

16. Composición lipídica de membranas de macrófagos peritoneales de rata	117
17. Contenido en ácidos grasos de las membranas de macrófagos peritoneales de rata	117
V. DISCUSION	122
VI. CONCLUSIONES	140
VII. BIBLIOGRAFIA	142

I. INTRODUCCION

1 EL MACROFAGO

El término macrófago, definido por Metchnikoff en 1905, designa a células que residen en los tejidos intersticiales y que tienen la capacidad de emigrar hacia los tejidos inflamados (quimiotaxia), reconocer microorganismos o células tumorales opsonizadas y fagocitarlas.

Forman parte de los denominados fagocitos profesionales mononucleares que incluyen a promonocitos a nivel de médula ósea, monocitos circulantes y macrófagos tisulares. La migración de los monocitos a los diferentes tejidos parece ser un fenómeno casual en ausencia de inflamación localizada. Una vez en los tejidos los monocitos se transforman en macrófagos, los cuales van a tener propiedades morfológicas y funcionales que van a ser características para el tejido en el que residen, e incluso reciben distintos nombres: macrófagos alveolares, en el pulmón; células Kupffer, en hígado; histiocitos, en la piel; microglia, en el cerebro; etc.

1.1 PAPEL DEL MACROFAGO EN EL SISTEMA INMUNE

Los macrófagos poseen múltiples funciones:

- Tienen la capacidad para ingerir y destruir parásitos intracelulares tales como *Leishmania*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Toxoplasma*, *Listeria*, etc; y algunos hongos. Pueden eliminar células tumorales, células dañadas o muertas (ej: eritrocitos) y restos de tejidos. Una vez que una partícula extraña ha sido fagocitada, los lisosomas y otros orgánulos entran en contacto con la vesícula fagocitaria y vierten en ella su contenido enzimático (hidrolasas ácidas, proteasas, lipasas, lisozimas ...). Además de esta digestión lisosómica los macrófagos también poseen agentes bactericidas, se trata de especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno (Figura A).

- Además están implicados en la presentación de antígenos a los linfocitos T. Los linfocitos T, a diferencia de los B que son capaces de producir anticuerpos

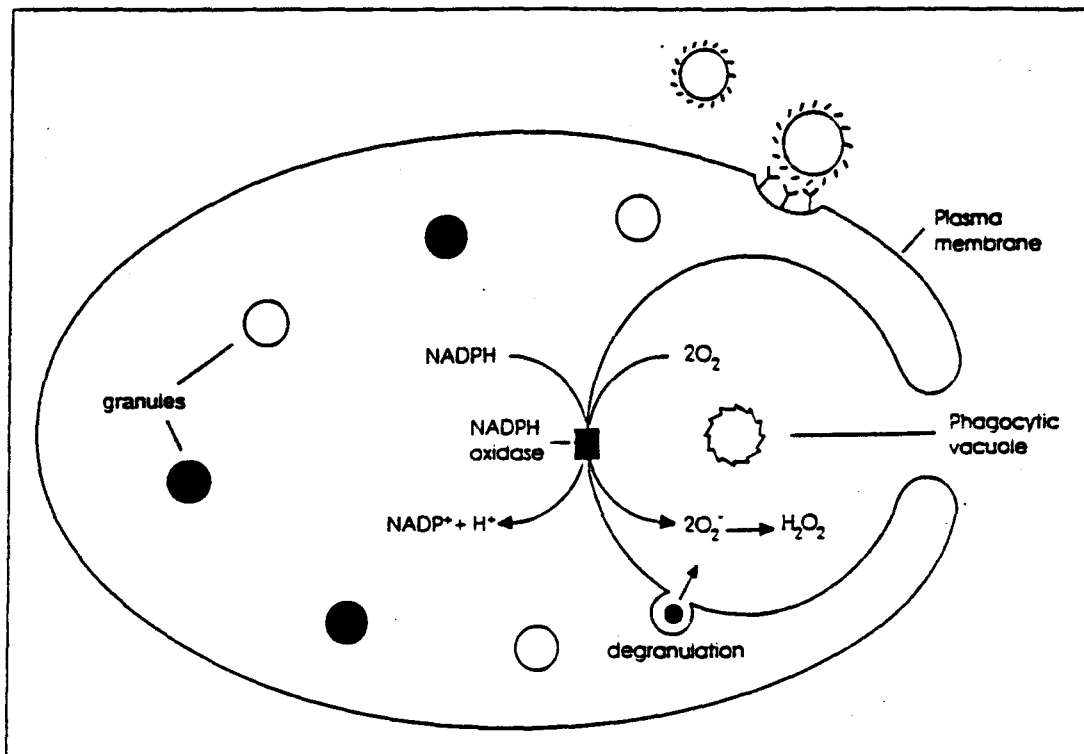


Figura A: Esquema representativo del proceso de fagocitosis de un microorganismo. La enzima NADPH oxidasa es activada selectivamente en la pared de la vacuola fagocítica generando anión superóxido y peróxido de hidrógeno en el interior de dicha vacuola, donde también se produce liberación de una serie de enzimas por degranulación de gránulos citoplasmáticos.

frente a antígenos muy variados (péptidos, proteínas, polisacaridos, ácidos nucleicos, lípidos...), sólo reconocen a péptidos. Por otro lado, es necesario que dicho péptido se asocie con proteínas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) y se expresen a nivel de la superficie celular.

Los macrófagos forman parte de las denominadas células presentadoras de antígenos (APC) las cuales expresan proteínas del MHC tipo II. A estas proteínas se unen péptidos exógenos antigénicos que, una vez asociados a MHC II y situados a nivel de la superficie celular, pueden ser reconocidos e interaccionar con linfocitos CD4⁺ o cooperadores activándolos y desencadenando la secreción de citoquinas por los mismos.

- Son células secretoras extraordinariamente activas. Secretan enzimas hidrolíticas tales como hidrolasas ácidas, proteínas neutras y activador del plasminógeno. También liberan prostaglandinas, factores del complemento, interleuquinas, interferón, factor de necrosis tumoral (TNF), arginasa y otras moléculas implicadas en la perpetuación del proceso inflamatorio y en la regulación de las funciones de otras células (Nathan, 1987). Son de especial importancia la IL-1 y el TNF (Le y Vilcek, 1987), que suelen actuar de forma sinérgica. IL-1 estimula la proliferación de linfocitos T y B, incrementa el número de neutrófilos en sangre y estimula la producción de sustancias inmunes por el hígado (di Giovine y Duff, 1990). La producción de dicha interleuquina se estimula durante la presentación del antígeno al linfocito por el macrófago, bien por contacto directo entre ambas células o por la producción y liberación por el linfocito T de TNF (Weaver y col., 1986; Weaver y col. 1989). TNF estimula la acumulación de leucocitos en los sitios de inflamación y los activa para matar microorganismos, induce la síntesis de factores estimuladores de colonias por células endoteliales y fibroblastos y a su vez estimula la síntesis de IL-1 por el macrófago. Además, ambas citoquinas pueden directamente iniciar la producción de oxidantes por los fagocitos (Klebanoff y col., 1986) o preparar a dichas células de tal manera que éstas presentarán una aumentada producción de O₂⁻ cuando sean estimuladas con agonistas (Warren y col., 1988).

Por otro lado, la función de los macrófagos puede ser modulada o intensificada por factores liberados por las células T, por ej: interferón d (IFN d), el cual es entre todas las citoquinas el más potente activador de los macrófagos tanto in vivo como in vitro (Nathan, 1986). Tras la unión de esta citoquina con receptores de macrófagos se ha observado un aumento en la concentración de

Ca²⁺ intracelular (Somers, y col., 1986) y un aumento de la actividad de la PKC, independiente de fosfatidilinositol (Sebaldt y col., 1991). Se ha observado que macrófagos infectados con *Leishmania major* y tratados con IFN γ in vitro, desarrollaron capacidad para destruir estos parásitos intracelulares (Nacy y col., 1985). Esta linfoquina prepararía al macrófago para que junto con TNF induzcan al óxido nítrico (NO) el cual está involucrado en la destrucción de *Leishmania* (Green y col. 1990). Existen otras linfoquinas producidas por el linfocito T que pueden estimular varios mecanismos funcionales del macrófagos tales como IL-2 y IL-4 que aumentan la citotoxicidad frente a tumores y microorganismos, inducen una expresión de moléculas MHC-II e incrementan la capacidad presentadora del antígeno (Nacy y Meltzer, 1991).

El proceso de activación del macrófago por el linfocito T puede tener consecuencias negativas para este último. El NO es liberado por el macrófago en respuesta a la estimulación por LPS o γ IFN. Mediante estudios con inhibidores de la óxido nítrico sintasa con los que se bloquea la producción de NO, se demostró la capacidad de éste para inhibir la proliferación de células T (Mills, 1991). También los linfocitos B sufren la acción supresora del macrófago activado pero por un mecanismo diferente al NO aunque también estimulado por el IFN γ y que es dependiente de la producción de ácido araquidónico (Albina y col., 1991).

1.2 CARACTERISTICAS METABOLICAS DEL MACROFAGO

Los macrófagos presentan una gran actividad metabólica caracterizada por altas razones de secreción de proteínas y un elevado recambio de los constituyentes de la membrana. Esta alta razón de síntesis proteica requiere altos niveles de producción de ARNm para lo cual purinas, pirimidinas y ribosa fosfato son necesarias y por otro lado, la síntesis de lípidos requiere la formación de glicerol-3-fosfato.

Estas células principalmente utilizan la glucosa como fuente de energía aunque también son capaces de utilizar glutamina, piruvato, ácidos grasos de cadena larga y cuerpos cetónicos. Presentan altos valores de actividad hexoquinasa superiores a los de la fosforilasa o 6-fosfofructoquinasa sugiriendo que la glucosa es un sustrato energético más importante que el glucógeno. También presentan

altos valores de actividad G6P-DH y 6PG-DH lo que pone de manifiesto la importancia de la vía de las pentosas fosfato, elevada actividad citrato sintasa y oxoglutarato deshidrogenasa sugiriendo que el ciclo de los ácidos tricarbónicos también puede ser importante en la generación de energía en estas células y gran actividad glutaminasa lo que indica que también poseen altos índices de utilización de glutamina (Newsholme y col., 1986).

Los macrófagos degradan activamente la glucosa y la convierten en lactato con una alta tasa de producción del mismo, y sin embargo sólo una pequeña parte de la glucosa es oxidada al igual que sucede con la glutamina (Newsholme y col., 1987) y el piruvato. Curi y col. (1988) sugieren que las bajas razones de oxidación del piruvato derivado de la glucosa o de la glutamina, son debidas a la baja concentración de piruvato probablemente causadas por la competencia por dicho sustrato llevada a cabo por la enzima láctico deshidrogenasa cuya actividad es muy superior a la piruvato deshidrogenasa.

Son células con tasas de glucólisis y glutaminólisis semejantes a las que presentan células en fase proliferativa aunque los macrófagos sean células totalmente diferenciadas que generalmente han perdido su capacidad para dividirse y que presentan una razón de síntesis de ADN baja (van Furth y col., 1985). La hipótesis propuesta para explicar estos hechos es la de proporcionar unas condiciones ideales para la adecuada regulación de los procesos que utilizan algunos de los intermediarios de las mismas, tales como la glucosa 6 fosfato (para la formación de ribosa fosfato), glicerol-3-fosfato (para la síntesis de lípidos) y glutamina y aspartato (para la síntesis de purinas y pirimidinas) (Newsholme y col., 1987).

1.3 ESTADOS FUNCIONALES DEL MACROFAGO

Los macrófagos pueden presentarse en tres estados funcionales diferentes: residentes, inflamados y activados:

- Macrófagos residentes son aquellos obtenidos de animales que no han sido previamente tratados ni con agentes inflamatorios ni inmunológicos. La mayoría de estos macrófagos representan una población de células que se asemejan a los monocitos tanto morfológica como funcionalmente. Con estímulos apropiados se

pueden inducir modificaciones en dichas células y evolucionar a macrófagos inflamados y/o activados (Adams y Hamilton, 1984).

- Macrófagos inflamados son los que se obtienen de animales previamente tratados con agentes inflamatorios no microbianos tales como caseinato sódico, endotoxina, tioglicolato o glucógeno. Estas sustancias se inyectan intraperitonealmente unos 3 ó 4 días antes del sacrificio de los animales y se extraen los macrófagos de la cavidad peritoneal, obteniéndose una población compuesta por macrófagos residentes transformados y otros derivados de monocitos sanguíneos emigrados (Cohn, 1978).

Pueden tener muchas características bioquímicas similares a los activados pero estos últimos poseen mayor capacidad antimicrobiana y antitumoral (Cohn, 1978). Con respecto a macrófagos residentes, presentan diferencias morfológicas ya que son de mayor tamaño; diferencias bioquímicas: mayor contenido en hidrolasas ácidas, proteasas neutras, diferencias notables en el contenido de varias ectoenzimas; así como un incremento en el metabolismo oxidativo de la glucosa y del consumo de oxígeno.

- El término de macrófagos activados fue introducido por Mackaness en 1969 para describir los cambios adaptativos intrínsecos que permiten a los macrófagos expresar una resistencia antimicrobiana aumentada. La activación de los macrófagos está determinada por la exposición a productos de linfocitos T sensibilizados (linfoquinas, interferón o productos de activación de los componentes de complemento). La activación "in vitro" del macrófago se consigue mediante la exposición conjunta de un tipo de linfoquina, IFN γ , y un producto de la pared bacteriana, LPS. La activación "in vivo" se puede llevar a cabo inyectando al animal parásitos intracelulares, ej: *Listeria*, *E. coli*. Asimismo, pueden obtenerse inyectando en la cavidad peritoneal del animal, antígenos microbianos no viables tales como componentes de la pared bacteriana o microorganismos muertos por calor (Wahl y col., 1979).

Con respecto a los macrófagos residentes presentan diferencias morfológicas ya que son de mayor tamaño; diferencias bioquímicas: aumento de actividades enzimáticas tales como LDH, fosfatasa ácida, y sin embargo la actividad ecto-5-nucleotidasa disminuye un 50%; mayor secreción de sustancias que intervienen en la activación de linfocitos y en el proceso inflamatorio como por ejemplo interferón, IL-1 y activador del plasminógeno; existen evidencias de

que son más eficientes en la presentación del antígeno a linfocitos (Unanue y Allen, 1987) y diferencias metabólicas: aumento del transporte de glucosa, incremento de la producción de lactato (Bustos y col., 1992) y de la oxidación de la glucosa por la vía de las hexosas monofosfato.

2 ESTALLIDO RESPIRATORIO

2.1 CONCEPTO DE ESTALLIDO RESPIRATORIO

En 1933 Baldrige y Gerard observaron un incremento en el consumo de oxígeno por neutrófilos caninos durante un proceso de fagocitosis bacteriana. Esta aumentada respuesta metabólica fue en principio atribuida a un incremento en la generación de energía mitocondrial con la finalidad de cubrir las necesidades del proceso fagocitario. Staehelin y col. (1957) descubrieron que el consumo de oxígeno de neutrófilos estimulado por la fagocitosis estaba acompañado de un incremento del catabolismo de la glucosa por la vía de las hexosas monofosfato. Becker y col. (1958) y posteriormente Sbarra y Karnousky (1959), pusieron claramente de manifiesto que este aumento en la respiración era insensible a inhibidores de la respiración mitocondrial (cianida, antimicina A y dinitrofenol), y que la energía que necesitaban los neutrófilos para la fagocitosis se obtenía a través de la glucólisis.

Durante el proceso fagocitario tiene lugar la activación de una ruta metabólica (inactiva en células en reposo), conocida como estallido respiratorio (ER). El término estallido respiratorio fue definido por Babior (1978) como una serie coordinada de procesos metabólicos que tiene lugar en los fagocitos cuando son expuestos a un estímulo apropiado y cuyo resultado final es la producción de agentes microbicidas altamente reactivos obtenidos por la reducción parcial del oxígeno. Dichos procesos incluyen:

- 1.- Incremento del consumo de oxígeno insensible a inhibidores de la respiración mitocondrial.
- 2.- Incremento de la actividad de la vía de las hexosas monofosfato.
- 3.- Producción de radicales de oxígeno incluyendo anión superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), oxígeno singlete (1O_2), radical hidroxilo ($OH\cdot$) y derivados (Babior, 1978; Badwey y Karnovsky, 1980).

El primer producto de dicho proceso es el anión superóxido (Babior y col., 1973).



Dicho anión en sí tiene poco efecto bactericida. Su importancia radica en poder generar a partir de él otras especies más activas. Así, al pH y condiciones iónicas existentes en la célula, dicho anión puede sufrir un proceso de dismutación formándose H_2O_2 y O_2 .



Iyer y col. (1961) sugirieron que dicho H_2O_2 podía ser detectado en el medio externo de los fagocitos estimulados y que estos podían usarlo como agente bactericida. Este hecho constituyó la primera conexión entre el ER y los mecanismos microbicidas de los fagocitos. Klebanoff (1970) establece que el H_2O_2 formado durante el ER y la mieloperoxidasa (MPO) liberada de los gránulos azurófilos constituían un poderoso sistema microbicida de los fagocitos. Con posterioridad, se demostró que altas cantidades de ácido hipocloroso (HOCl) eran generadas durante el ER en neutrófilos (Weiss y col., 1982) y en monocitos (Lampert y Weiss, 1983) por el sistema MPO.



En 1964 fue descrito en neutrófilos de cobaya la existencia de una oxidasa dependiente de nucleótidos de piridina, más activa con NADPH que con NADH, la cual era responsable del ER (Rossi y Zatti, 1964; Rossi, 1986).

La importancia real del ER fue puesta de manifiesto cuando en 1967 Baehner y Nathan y, Holmes y col. descubrieron que leucocitos de pacientes con enfermedad crónica granulomatosa no presentaban ER durante la fagocitosis. Quie y col. demostraron que esos leucocitos tenían una actividad bactericida deficiente (Smith y Curnutte, 1991). A partir de aquí se concluía que la activación del metabolismo respiratorio durante la fagocitosis está involucrado en la destrucción de los microorganismos ingeridos.

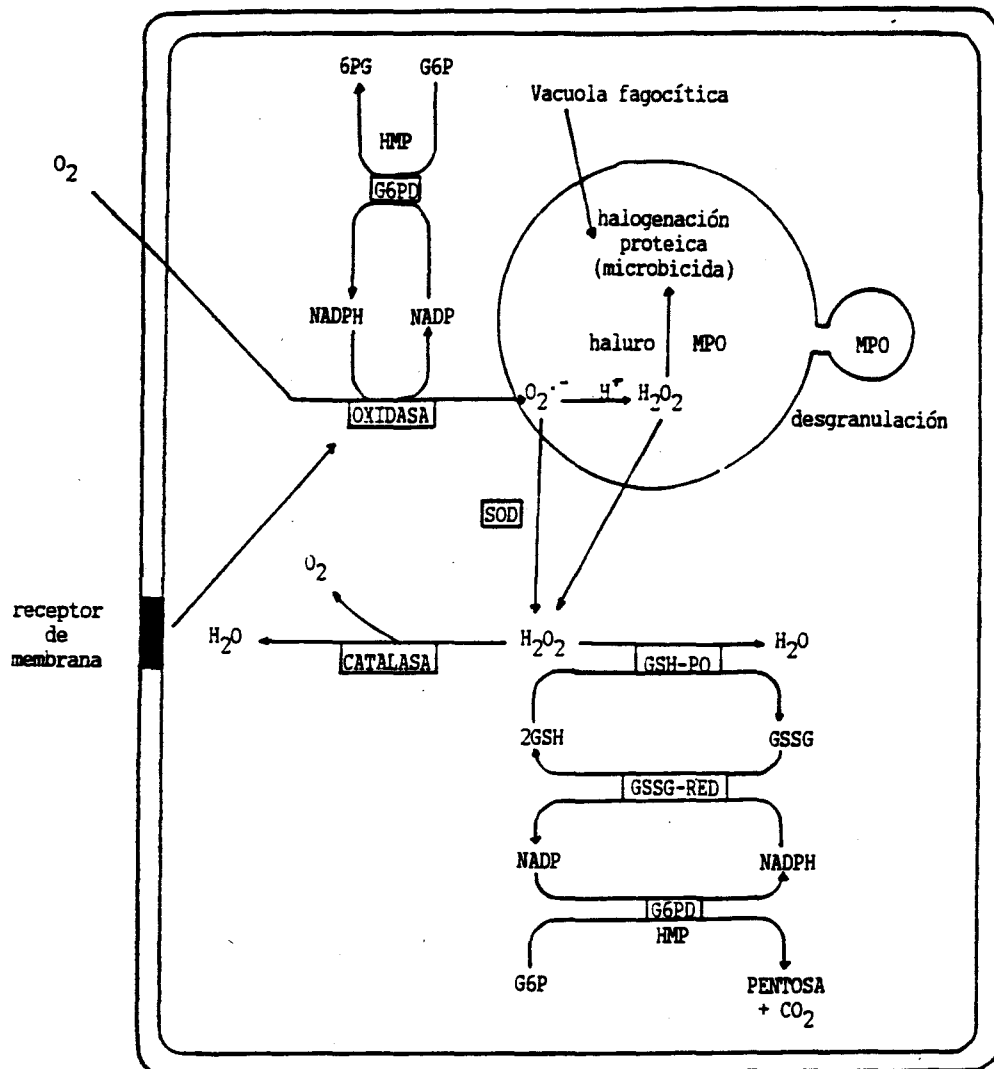


Figura B . Acontecimientos que ocurren durante el estallido respiratorio. HMP: ciclo de las hexosas monofosfato; MPO: mieloperoxidasa; SOD: superóxido dismutasa; GSH-PO: glutatión peroxidasa; GSH: glutatión reducido; GSSG: glutatión oxidado; G6PD: glucosa-6-fosfato deshidrogenasa; G6P: glucosa-6-fosfato; 6PG: ácido 6-fosfogluconico.

2.2 INDUCCION DEL ESTALLIDO RESPIRATORIO

El ER es un proceso que tiene lugar en todas las células denominadas fagocitos profesionales: neutrófilos (Babior y col., 1973), monocitos y macrófagos (Badwey y Karnovsky, 1980) y también se ha descrito en eosinófilos (DeChatelet y col., 1977). El grado de activación de dicho proceso depende del tipo celular, especie animal y en el caso de los macrófagos de su estado funcional (residentes, inflamados, activados).

Se ha detectado actividad oxidasa en algunas células no fagocíticas, aunque con menos intensidad que en neutrófilos. Este es el caso de linfocitos B transformados por el virus de Epstein-Barr, cuando son tratados con ésteres de forbol (Volkman y col., 1984) y también en algunos linfocitos B no transformados (Maly et al., 1989). La función del sistema oxidasa en linfocitos permanece aún desconocida. Fibroblastos (Meier y col., 1989) y células endoteliales (Matsubara y Ziff, 1986) pueden liberar pequeñas cantidades de anión superóxido. Este hecho podría estar relacionado con la participación de los fibroblastos en procesos de artritis reumatoide y con la alteración de la membrana de los vasos sanguíneos y del tejido conectivo circundante en el caso de las células endoteliales.

Aunque el ER está íntimamente ligado a la fagocitosis, existen agentes que pueden desencadenar dicho proceso. Los agentes estimulantes tradicionalmente han sido clasificados en dos grandes grupos: agentes solubles y agentes particulados. Los estímulos más eficaces están presentes en los sitios de inflamación: microorganismos opsonizados, el péptido del complemento C5a formado tras la interacción de los microorganismos con los anticuerpos, péptidos quimiotácticos secretados por las bacterias o liberados tras la lisis de microorganismos muertos, lípidos bioactivos secretados por las células activadas como el factor activador de plaquetas (PAF) y el leucotrieno B₄ (LTB₄) (Snyderman y Uting, 1988), y varias proteínas activadoras de neutrófilos: NAP 1 ó interleukina 8 (Waltz y col., 1989) y NAP 2 (Baggiolini y col., 1989). Además de los anteriores hay otros estímulos no fisiológicos: ión fluoruro, PMA y otros forbol diésteres, A 23187, Con-A y zimosán opsonizado.

La mayoría de los estímulos inducen más de una respuesta: quimiotaxis, secreción, agregación, estallido respiratorio, etc. Estas diferentes respuestas son inducidas a diferentes concentraciones del agente estimulante.

La activación del ER comienza cuando una partícula interacciona con la membrana plasmática, está asociado con el proceso de engullido de la misma y cesa cuando el acto fagocitario ha concluido. El ER también es inducido cuando los fagocitos se adhieren a sustratos no factibles de ser fagocitados, por ejemplo superficies recubiertas con inmunocomplejos.

2.3 PRODUCTOS LIBERADOS: RADICALES LIBRES DE OXIGENO

Un radical libre puede ser definido como cualquier especie que tiene uno o más electrones desapareados en sus orbitales más externos. La reactividad de estas especies deriva de su inestabilidad como consecuencia de su configuración electrónica, la cual permite la extracción de electrones de otras fuentes para aparearlos con los ya existentes en dichas especies y así poder estabilizarse.

Todos los radicales libres de oxígeno sintetizados por el macrófago derivan de un precursor inicial común: el **anión superóxido**, el cual es liberado fuera de la célula o al interior de la vacuola de fagocitosis.

En estado de reposo, el oxígeno molecular (O_2) tiene dos electrones desapareados en sus orbitales más externos. Estos electrones ocupan orbitales separados teniendo sus espines en la misma dirección. Cada uno de estos orbitales exteriores pueden acomodar un electrón adicional. La adición de un electrón origina el anión superóxido (O_2^-) mientras que la adición de dos electrones produce el anión peroxi (O_2^{2-}). Dos radicales O_2^- pueden interaccionar de tal modo que uno es reducido y el otro es oxidado formándose H_2O_2 y O_2 (reacción de dismutación).



Las células aeróbicas contienen el metaloenzima superóxido dismutasa, el cual promueve la reacción de dismutación a pH neutro o cercano al neutro (rango de pH citoplasmático).

Más del 90% del oxígeno consumido por el organismo, es usado por la citocromo oxidasa mitocondrial sin la producción de intermediarios activos del oxígeno (Antonini y col., 1970). Sin embargo, los fagocitos son células que generan O_2^- como producto mayoritario de la reducción del oxígeno.

El O_2^- por sí mismo tiene una reactividad limitada. La importancia de dicho radical reside en su capacidad para reaccionar con H_2O_2 generando $OH\cdot$ y 1O_2 (Halliwell y Aruoma, 1991).

Peróxido de hidrógeno: Se puede originar por reducción del oxígeno molecular con dos electrones, por dismutación espontánea de O_2^- o catalizada por SOD.



El H_2O_2 por sí sólo tiene cierto poder bactericida y de hecho se considera que actúa en combinación con el ácido ascórbico (Nowak y col. 1991) y ciertos iones metálicos para matar los microorganismos ingeridos (Drath y Karnovsky, 1974). Sin embargo, su potencia es considerablemente aumentada por la acción de una enzima presente en la mayoría de las células fagocíticas, la mieloperoxidasa (MPO). Dicha enzima cataliza la oxidación de iones haluros a hipohalitos por H_2O_2



X^- puede ser Cl^- , Br^- y I^- , pero como el ión cloruro es el más abundante en leucocitos parece que dichas células pueden matar microorganismos por la generación de ácido hipocloroso (Klebanof y Clark, 1978).

La mayor parte del H_2O_2 producido es liberado al interior de los fagosomas o al medio extracelular, pero una parte difunde al citoplasma donde se lleva a cabo su detoxificación. Una parte del H_2O_2 es destruido por la GP mediante la oxidación del glutatión reducido y éste es regenerado por la GR

acompañándose de la oxidación del NADPH. Otra parte del H_2O_2 es transformado en H_2O y O_2 por la catalasa.

Radical hidroxilo: Dicho radical puede generarse por la interacción de O_2^- y H_2O_2 a través de la denominada reacción de Haber-Weiss:



Existe otra reacción catalizada por el hierro (reacción de Fenton) en la cual el H_2O_2 también actúa como precursor de $OH\cdot$:



Iones cobre también pueden reaccionar con H_2O_2 para dar origen al radical hidroxilo (Aruoma y col., 1991).

Otro mecanismo, que no requiere catálisis metálica, para la formación de $OH\cdot$ a partir de O_2 y $HOCl$ ha sido sugerido por Candeias y col. (1993), siendo más eficiente que la interacción entre O_2^- y H_2O_2 :



De las reacciones anteriores se deduce que la mayor parte de la toxicidad de O_2^- y H_2O_2 in vivo es derivada de su reacción con iones hierro y cobre, formando radical hidroxilo y otras especies oxidantes (Pellmar y col., 1991).

Oxígeno singlete: Puede presentarse en dos estados electrónicos diferentes denominados forma delta y sigma, siendo la forma delta la más estable y por ello se piensa que puede ser la responsable de la mayor parte de la reactividad y efectos observados.

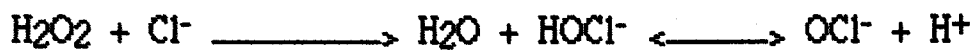
Existen distintas posibles fuentes de producción de 1O_2 :

- Allen (1975) postuló que el oxígeno producido durante la dismutación del anión superóxido podía ser oxígeno singlete:



- Existen experimentos in vitro que muestran que sistemas generadores de O_2^- , principalmente el sistema xantina-oxidasa, pueden generar 1O_2 (Karnovsky, 1994).

- También puede originarse como producto del sistema MPO/H₂O₂/Cl⁻ (Steinbeck y col., 1992):



- Interacción del anión superóxido con el radical hidroxil o con diacil peróxidos (Danen y Arudi, 1978):



Dado que este radical presenta un orbital desocupado, tiene una alta tendencia a reaccionar con moléculas que contengan regiones de alta densidad electrónica tales como compuestos con dobles enlaces.

2.4 BASE ENZIMATICA DE LA PRODUCCION DE O_2^-

Los primeros estudios sobre las bases enzimáticas del ER fueron llevados a cabo por Karnovsky, Quastal y Rossi en la década de los 60. Actualmente es universalmente aceptado que el sistema enzimático responsable del ER es el de una NADPH oxidasa inicialmente sugerida por Rossi y Zatti (1964).

2.4.1 Propiedades de la NADPH oxidasa

Esta enzima cataliza la oxidación de NADPH, formado a partir del metabolismo de la glucosa por la vía de las hexosas monofosfato, de acuerdo con la siguiente reacción:



Dicha enzima es un sistema de múltiples componentes que cuando las células están en reposo es completamente inactivo y cuando las células son activadas por los estímulos apropiados, se ensamblan en la membrana plasmática y se inicia la formación de anión superóxido a partir de oxígeno molecular (Babior, 1991). La actividad de dicho sistema tampoco es detectable en pacientes con enfermedad crónica granulomatosa (Curnutte, 1993).

La existencia de esta enzima ha sido puesta de manifiesto en neutrófilos (Babior y col., 1973), eosinófilos (DeChatelet y col., 1977), fagocitos mononucleares (Badwey y Karnovsky, 1980) y en linfocitos B (Dorseuil y col., 1992).

Esta enzima es activa en un amplio rango de pH siendo el pH óptimo alrededor de 7-7.5. El potencial redox de NADPH es de -320 mV a pH 7.0 y por lo tanto puede ser el donador de electrones en este sistema ya que la reducción del O_2 a O_2^- tiene un potencial medio de -160 mV en condiciones fisiológicas.

La actividad es insensible a inhibidores de la respiración mitocondrial (KCN, rotenona, antimicina A), pero es inhibida por agentes reactivos sulfidrilos, análogos de FAD, agentes quelantes de metales, análogos de piridin nucleótidos, trifluorperacina y análogos de quinasa (Rossi, 1986). La actividad es aumentada por Ca^{2+} y Mg^{2+} e inhibida por EDTA (Suzuki y col., 1985).

La purificación de la enzima es difícil dado que es altamente termolábil y se inactiva con el uso de detergentes fuertes. Por otro lado, requiere un ambiente lipídico que permita conservar el complejo proteico en una conformación activa.

La activación de las células fagocíticas está asociada con cambios en el potencial de membrana plasmática (Morel y col., 1991). La mayor parte de los autores admiten que se produce una despolarización de la membrana. Grinstein y col. (1986) pusieron de manifiesto que el citosol de neutrófilos llegaba a acidificarse tras la estimulación con PMA. El incremento en la concentración de H^+ era debido probablemente a la acción de la NADPH oxidasa que producía un H^+ por cada electrón transferido al oxígeno. Henderson y col. (1988) sugirieron que los H^+ generados por la actividad de la oxidasa salían de la célula por un canal localizado en la membrana plasmática que era sensible a Zn^{2+} y Ca^{2+} y que

actuaría como carga compensadora para evitar la excesiva despolarización de la membrana y una fuerte disminución del pH intracelular. Sin embargo, existiría una pequeña despolarización y descenso del pH intracelular asociado al inicio de la actividad oxidasa.

Por otro lado, se ha sugerido que tras la activación de la oxidasa durante la fagocitosis, se produce un aumento del pH en el interior de la vacuola. Existe un tránsito de electrones acompañado de consumo de H^+ (la dismutación del O_2^- consume protones para formar H_2O_2) originando alcalinización del medio. El contenido de los gránulos se mantiene en estado inactivo a pH sobre 5.0 y las proteinasas se activan cuando son expuestas al medio relativamente alcalino creado en el interior de la vacuola. Segal y col. (1981) indicaron que este aumento de pH contribuye a la muerte y destrucción de los microorganismos o partículas ingeridas por las células fagocíticas.

La actividad de la oxidasa puede ser desencadenada por un gran número de compuestos tales como ésteres de forbol, péptidos quimiotácticos, ácidos grasos, etc. Henderson y col. (1993) sugirieron que el ácido araquidónico (AA) es el activador inmediato de la oxidasa y que otros activadores pueden funcionar incrementando la síntesis de AA. Se ha demostrado que el AMPc inhibe la activación de la oxidasa por inhibición de la movilización de araquidónico (Nielson y col., 1992).

Existen moléculas capaces de preparar a la oxidasa para producir un respuesta aumentada tras un posterior estimulación ("priming"). Algunas sustancias que pueden producir este efecto: IFN- δ , IL-1 α , IL-6, IL-8, TNF, factores estimulantes de colonias...

2.4.2 Componentes de la NADPH oxidasa

Se ha sugerido que la actividad NADPH oxidasa de los fagocitos es una cadena de transporte electrónico con varios componentes que transportarían un electrón desde el sustrato hasta el oxígeno molecular.

Los estudios más recientes indican que este sistema oxidasa consta de:

- Dos componentes a nivel de la membrana plasmática: citocromo b558 constituido por dos subunidades de 22 KDa y 91 KDa y, una flavoproteína.
- Dos componentes citosólicos: una proteína de 67 KDa y otra fosforilada de 47 KDa.

Recientemente se han puesto de manifiesto otro dos componentes, uno a nivel de membrana (Raps) y otro citosólico (Racs), que al parecer son esenciales en el proceso de ensamblaje (Umeki, 1994).

Citocromo b558

Está localizado en la membrana plasmática, la cual en el proceso de invaginación pasará a constituir la pared de la vacuola fagocítica.

Este citocromo tiene un potencial redox de -245 mV, bastante más bajo que el de la mayoría de los citocromos b y lo suficientemente bajo como para reducir el oxígeno a anión superóxido. Es abundante en macrófagos, monocitos, neutrófilos y eosinófilos pero también se ha descrito en fibroblastos, linfocitos T y B y en células mesangiales del riñón (Morel y col., 1991; Dorseuil y col., 1992).

Es un heterodímero consistente en una pequeña subunidad α de 22 KDa (p22-phox) y una subunidad β de 91 KDa (gp91-phox) altamente glicosilada.

Los estudios sobre dicho citocromo se iniciaron a partir de la observación de la relación existente entre su ausencia en neutrófilos de pacientes con enfermedad crónica granulomatosa ligada al cromosoma X, y el hecho de que dichos neutrófilos no presentaran ER.

La subunidad p22-phox es una proteína de unión al grupo hemo y se cree que puede ser el componente terminal de la cadena de transporte electrónico. Se trata de una proteína transmembrana (Verhoeven y col., 1989) a igual que la subunidad gp91-phox (Imajoh-Ohmi y col., 1992). La porción glicosilada de ésta última no es esencial para la actividad de la oxidasa pero puede ser requerida para

la óptima producción o estabilidad del citocromo b558 (Kleinberg y col., 1989). La subunidad gp91-phox media las interacciones con otras proteínas citosólicas esenciales para la activación del ER tales como p47-phox y p67-phox (Rotrosen y col., 1990). Además parece ser que puede jugar un papel central en la regulación del proceso de ensamblaje del heterodímero citocromo b558.

Basado en la evidencia de que el citocromo b558 purificado es completamente dependiente de FAD exógeno, Sumimoto y col. (1992) indicaron que porciones intermedias y carboxil terminal de gp91-phox son propablemente sitios de unión de FAD y NADPH. Similares resultados fueron sugeridos por Segal y col. (1992), hablándose de dicho citocromo como un flavocitocromo.

Quinn y col. (1992b) encontraron una proteína de 22 KDa localizada junto al flavocitocromo b558 en neutrófilos humanos y que era translocado con el flavocitocromo durante la activación de la oxidasa. Es una proteína que une GTP identificada como Rap-1 y, cuya actividad puede ser inhibida por fosforilación con AMPc (Bokoch y col., 1991). Dicha proteína se ha relacionado estructural y funcionalmente con la actividad de la NADPH oxidasa.

Flavoproteína

Aun no está claro qué proteína es la flavoproteína que transfiere electrones desde del NADPH al grupo hemo como grupo prostético en la oxidasa. Existen muchas evidencias que ponen de manifiesto que el cofactor es FAD y que una flavoproteína que une FAD es uno de los transportados electrónicos del sistema NADPH oxidasa. Yea y col. (1990) haciendo uso de un inhibidor de específico de NADPH oxidasa, difenilioduro (DPI), obtuvieron una banda simple de 45 KDa (por SDS/PAGE) en neutrófilos. Usando bajas concentraciones de DPI se incrementaba la elución de la proteína, lo que estaba de acuerdo con la sugerencia hecha por Cross y col. (1986) según la cual el DPI y el NADPH competirían por el mismo sitio de unión.

La proteína purificada mostraba una razón de unión a FAD de 1.09 mol de FAD/mol de prot. y tenía un espectro similar al del FAD libre.

El uso de anticuerpos contra esta proteína inhibía la generación del O_2^- en niveles dependientes de la dosis, en sistemas libres de células conteniendo una mezcla de restos de membrana y/o citosol. Esto sugería que dicha proteína

presentaba una doble localización, en membrana y en citosol. Por otro lado, estos anticuerpos precipitaban el polipéptido de 45 KDa junto con una proteína de 23 KDa de características similares a la subunidad a del citocromo b. A partir de estos resultados Yea y col. concluyeron que esta proteína de 45 KDa era la flavoproteína implicada en la donación de electrones del NADPH al componente terminal de la oxidasa, el citocromo b558.

Componentes citosólicos

Según recientes estudios al menos tres diferentes proteínas citosólicas son necesarias para la actividad de la oxidasa: p47-phox, p67-phox y Rac 1/2.

Ya que estos componentes son citosólicos, han de experimentar una translocación a la membrana plasmática cuando los fagocitos son estimulados y se activa la oxidasa.

La subunidad p47-phox se fosforila cuando los neutrófilos son activados y pierden el fósforo cuando dichas células vuelven a su estado de reposo. Distintos autores han puesto de manifiesto que no parece ser obligatoria la fosforilación de dicha subunidad para la actividad oxidasa y que dicho proceso puede estar asociado con su translocación a la membrana plasmática durante la activación (Rotrosen y col., 1990; Nauseef y col., 1991). Estudios de translocación de factores citosólicos han indicado que p47-phox es el factor que interacciona directamente con la membrana y que la translocación de p67-phox es dependiente del normal funcionamiento de p47-phox. P67-phox se considera que está al menos parcialmente acompañado con p47-phox en el citosol (Park, y col., 1992).

Pacientes con enfermedad crónica granulomatosa autosómica recesiva presentan una alteración en el proceso de fosforilación de la subunidad de 47KDa (Heyworth y Segal, 1986).

La dependencia de NADPH oxidasa de GTP sugería la implicación de una proteína de unión a dicho nucleótido. Abo y col. (1991) identificaron un heterodímero denominado delta¹ constituido por dos proteínas de 22 y 24 KDa que se corresponden con rac1 p21 (ó rac2 p21) y rho GDI. Pick y col. (1993) llevaron a cabo estudios de disociación confirmando lo anterior y demostrando que el monómero rac1 p21 podía activar la oxidasa y que el dímero constituido artificialmente también era un potente activador de la enzima. Estos autores

pusieron de manifiesto que delta¹ era activo en ausencia de GTP exógeno y su actividad no era aumentada por la adición de GTP, en contraste con lo indicado por otros autores (Gabig y col., 1990) y sin embargo rac1 p21 si mostraba dependencia de GTP. Por último, proponían la disociación del dímero como un paso esencial en la activación de la oxidasa y que el monómero rac1 p21 interaccionaba con otro componente del complejo oxidasa (probablemente p67-phox, Diekmann y col., 1994).

Según Fukumoto y col. (1990), el cambio de GDP/GTP en rac1 o rac2 está regulado por rho GDI el cual inhibe la disociación de GDP y por lo tanto la unión de GTP. Bromberg y col. (1994) indican que rac1 aislado de macrófagos formando dímero con rho GDI contiene exclusivamente GDP e indican que rac1 p21 unido a GDP es un potente activador de NADPH oxidasa en condiciones en las cuales el cambio de GDP por GTP no tiene lugar.

Sin embargo, la naturaleza de las interacciones entre los diferentes componentes y las modificaciones estructurales de los mismos durante el proceso de ensamblaje permanecen aún sin aclarar, por lo que se requieren estudios adicionales.

2.4.3 Mecanismos de activación de la NADPH oxidasa

Este proceso puede ser dividido en tres fases:

- I- Interacción entre el estímulo y la superficie celular (reconocimiento)
- II- Modificación molecular y funcional de la membrana plasmática y constituyentes intracelulares (transducción)
- III- Transición de la forma inactiva a activa del sistema enzimático responsable del ER (activación).

I.- **Fase de reconocimiento:** Supone la interacción entre el estímulo y la superficie celular.

Si el reconocimiento tiene lugar por una interacción ligando-receptor, en este caso el proceso de activación de NADPH oxidasa estará regulado por el rango

de ocupación, afinidad y número de receptores. El ER se inicia con sólo un 10-20% de los receptores ocupados.

La estimulación secuencial con estímulos homólogos conduce a una pérdida de respuesta o desensibilización al mismo estímulo una vez que cesa la primera respuesta. Este fenómeno se debe posiblemente a una disminución en el número de receptores disponibles (Rossi, 1986). Por el contrario, la exposición previa a una dosis no activadora de un agente estimulante potencia la respuesta oxidativa y reduce el periodo de latencia, en el caso de estímulos heterólogos (preactivación o priming) (Walker y col., 1991). El mecanismo preciso de este proceso no se conoce pero parece ser que el principal efecto se produce sobre los niveles de Ca^{2+} citosólico.

II.- La transducción constaría de varias fases (Figura C):

II.1 Proteína G: Se piensa que está asociada físicamente con el receptor de membrana (Ohta y col., 1985; Stutchfield y Crockcroft, 1991), el cual tras su unión con el ligando puede sufrir un cambio conformacional que se transmite a la proteína G la cual se une a GTP. A su vez esta última unión induce un cambio conformacional en dicha proteína que permitirá su interacción con la fosfolipasa C.

Las proteínas que unen nucleótidos de guanina pueden servir como sustratos para reacciones de modificación covalente catalizadas por ciertas toxinas Ej: toxina pertusis. Dicha modificación imposibilita a esta proteína G para vincular el receptor con la enzima efectora y por lo tanto inhibe el ER, en el caso de aquellos agentes en cuyo proceso de activación de la oxidasa está implicado esta proteína (Tabla 1).

II.2 Recambio de inositoles: Este proceso tiene lugar con agonistas que actúan a través de receptores que movilizan Ca^{2+} , tales como péptidos quimiotácticos, leucotrienos, Con-A, zimosán opsonizado, A23187 y no con estímulos cuya actividad no está relacionada con cambios en los niveles de Ca^{2+} citosólico como ésteres de forbol y diacilglicerol sintético (Figura A). En el caso de los primeros estímulos, activan una fosfolipasa C que hidroliza el fosfatidilinositol 4,5 bifosfato a inositol 1,4,5 trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DG). El IP3 es responsable de la movilización del Ca^{2+} intracelular y el DG puede estimular una proteína-quinasa

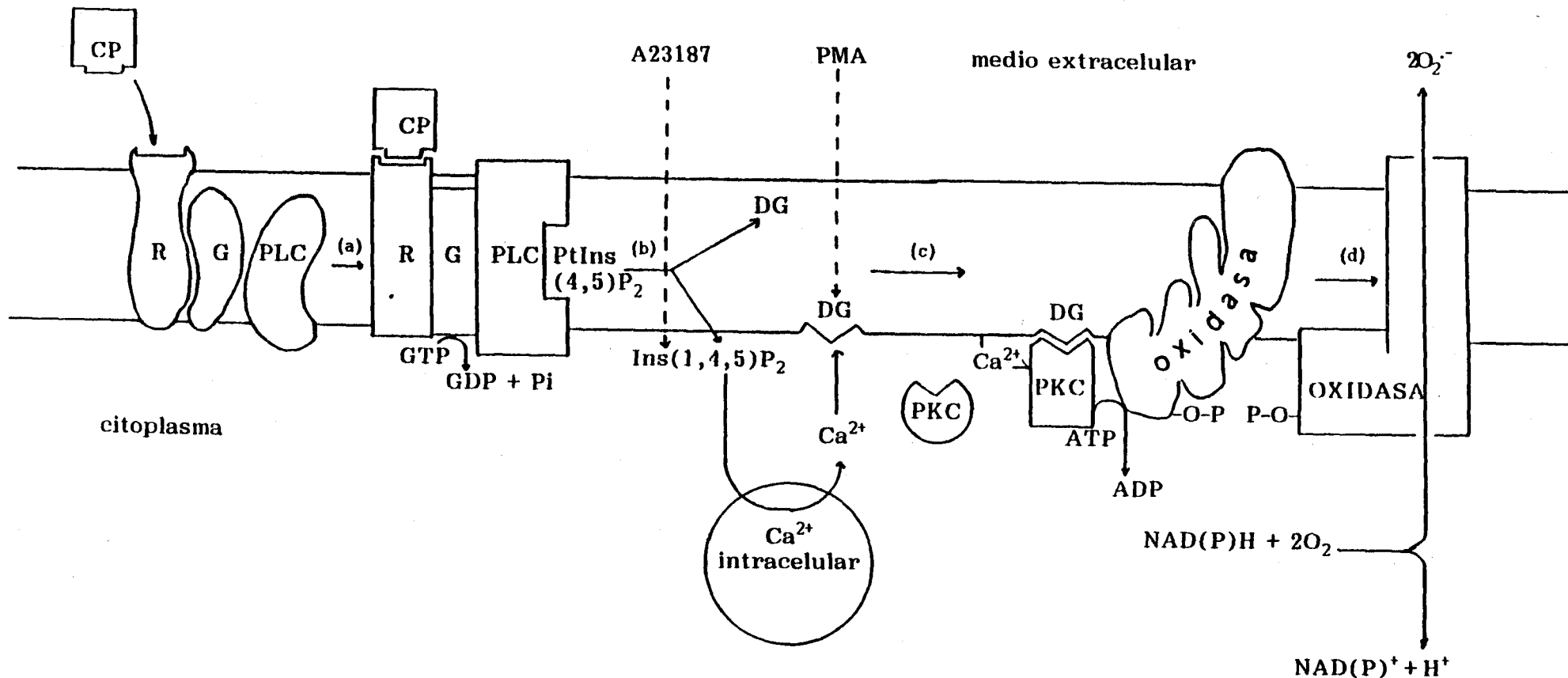


Figura C : Modelo del posible mecanismo de producción de O_2^- por neutrófilos estimulados con distintos agentes según Badwey y Karnovsky, (1986). Se desarrolla la siguiente secuencia: (a) ocupación del receptor específico del péptido quimiotáctico (CP) que conduce a un cambio conformacional del receptor (R) el cual se transmite a la fosfolipasa C (PLC) vía una proteína que hidroliza GTP; (b) la fosfolipasa C activada cataliza la hidrólisis de $PtIns(4,5)P_2$ a $Ins(1,4,5)P_3$ y diacilglicerol (DG), el $PtIns(4,5)P_2$ moviliza Ca^{2+} de los compartimentos intracelulares y el DG induce una perturbación de la membrana; (c) la proteína quinasa C (PKC) en presencia de Ca^{2+} se asocia con la región alterada de la membrana y se activa; (d) la PKC activada, con ATP como sustrato, fosforila un componente del complejo de la oxidasa activándola (la forma redondeada representa la forma inactiva y la forma rectangular representa la especie activa). El ionóforo del Ca^{2+} A23187 y el PMA activan las funciones de movilización de Ca^{2+} y DG, respectivamente.

TABLA 1

ALGUNAS DIFERENCIAS EN LAS REACCIONES DE TRANSDUCCION DEL ESTALLIDO RESPIRATORIO INDUCIDO POR DIFERENTES AGENTES ESTIMULANTES EN MACROFAGOS

Agente estimulante	Activación del recambio de fosfoinosoles	Incremento de [Ca ²⁺] _i	Dependencia [Ca ²⁺] _e	Sensibilidad a toxina pertussis	Translocación de PKC
PMA	no	no	no	no	sí
FMLP	sí	sí	sí	sí	no
Con-A	sí	sí	sí	no	no

dependiente de Ca^{2+} y fosfolípidos, proteína-quinasa C (PKC)(Asaoka y col., 1992) (Figura D).

II.3 Fosfolipasas: La unión de agonistas con sus receptores desencadenan la activación de una o más fosfolipasas a través de proteínas que unen GTP o a través de otros mecanismos menos clarificados. Estas fosfolipasas pueden ser: A₂, C y D, resultando de su activación un aumento de los niveles celulares de segundos mensajeros. Estos segundos mensajeros activan proteína-quinasa incluyendo la PKC (McPhail y col., 1993).

De la activación de la fosfolipasa C resultan dos productos: el DG que es un activador de la mayoría de las isoformas de la PKC, y el IP₃ el cual produce un incremento en los niveles de Ca^{2+} intracelular. Este aumento de Ca^{2+} también contribuirá a la activación de la PKC y puede inducir activación de proteína-quinasa dependientes de calmodulina (McPhail y col., 1992).

De la activación de la fosfolipasa D (cuyo principal sustrato es fosfatidilcolina) produce incremento de los niveles de ácido fosfatídico (PA). Por sí sólo, el PA puede activar la PKC (Stasek y col., 1993) y además a partir de él puede formarse DG (Agwu y col., 1989).

Existen numerosas evidencias de la implicación de la fosfolipasa A₂ en la activación de la oxidasa: un incremento de los niveles de ácido araquidónico (AA, producto de la fosfolipasa A₂) tiene lugar durante la activación de la oxidasa en neutrófilos o macrófagos (Cockcroft y col., 1991), inhibidores de fosfolipasa A₂ inhiben la producción de O₂⁻ estimulada por PMA y la adición de AA restaura la actividad de la oxidasa (Henderson y col., 1989). También se ha demostrado que el AA puede activar la NADPH oxidasa en un sistema libre de células (Steinbeck y col., 1991)

Las actividades de estas fosfolipasas son dependientes de Ca^{2+} y de GTP.

II.4 Proteína quinasa C (PKC): Dicha proteína cataliza la fosforilación de residuos de serina y treonina.

Esta proteína posee múltiple isoformas. Los isotipos dependientes de Ca^{2+} , fosfatidilserina y diacilglicerol se conocen como α , β , δ respectivamente.

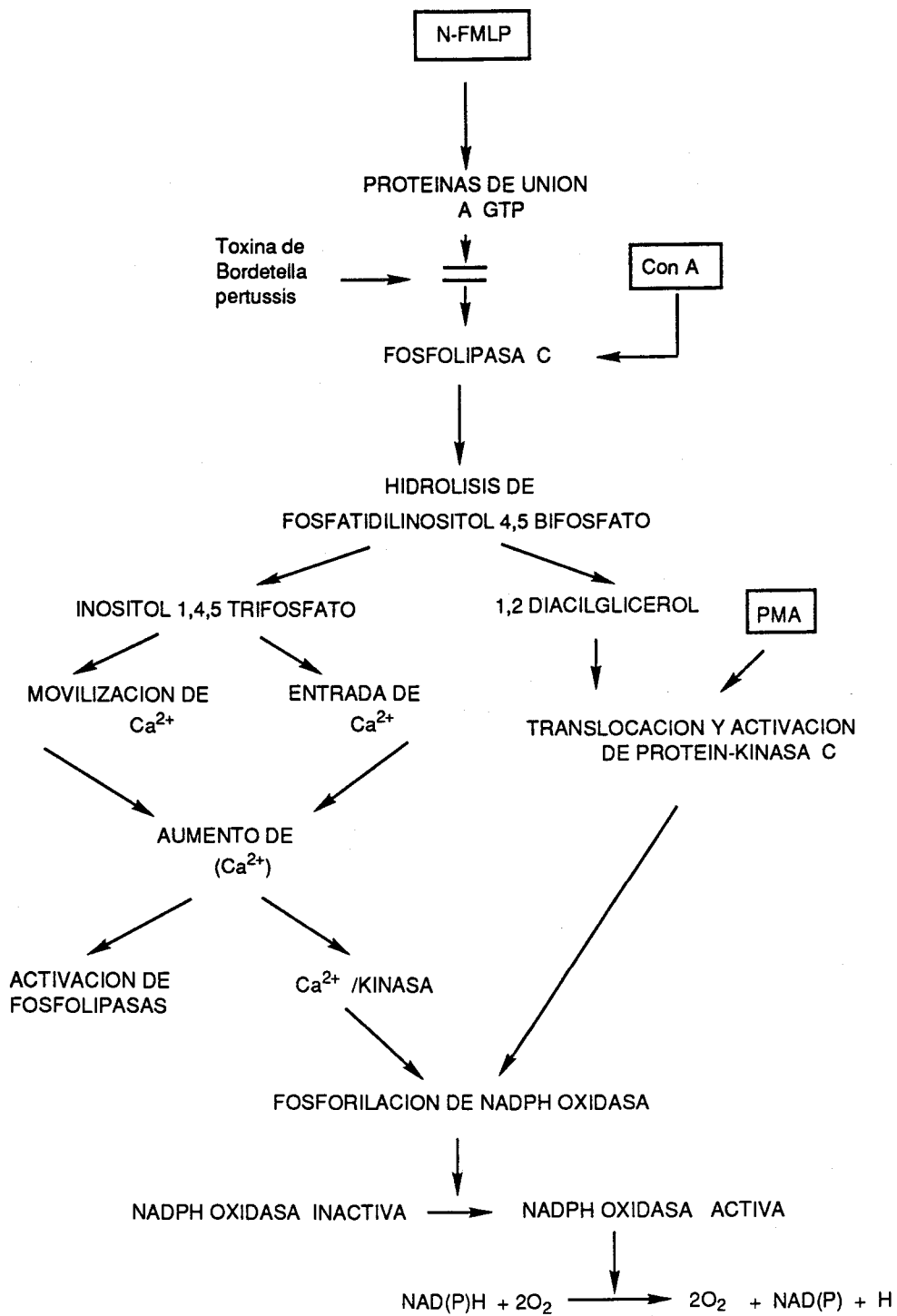


Figura D: Posible mecanismo de actuación de PMA, N-FMLP y Con-A en la producción de O_2^- .

La forma predominante varía de unas especies a otras y así, en neutrófilos humanos las isoformas mayoritarias son la α y β , fundamentalmente la α (Majumdar y col., 1991).

Se trata de una proteína citosólica y cuando las células son activadas, la PKC es translocada a la membrana plasmática (Christiansen, 1988).

La relación entre la actividad de PKC y el ER fue sugerida por el encuentro de que ésteres de forbol y otros promotores tumorales activaban tanto PKC como ER. Castagna y col. (1982) sugirieron que estas sustancias imitaban al DG (activador fisiológico de PKC) uniéndose a PKC con una alta afinidad. Este hecho fue confirmado viendo el efecto de activadores e inhibidores de PKC en la producción de O_2^- . Watson y col. (1991) han puesto de manifiesto que formilpéptidos, zimosán opsonizado... los cuales inducen una estimulación del ER que en principio es independiente de PKC, requieren de la actividad de dicha proteína transcurrido uno o dos minutos para sostener la producción de O_2^- .

Por otro lado, Schneider y col. (1981) establecieron una relación entre la actividad de la oxidasa y el grado de fosforilación de una serie de proteínas incluyendo una proteína citosólica de 47 KDa, posteriormente identificada como un componente del complejo oxidasa (p47-phox) y confirmada su fosforilación (Nauseef y col., 1990). Esta proteína se demostró que era un sustrato para PKC (Ross y col., 1983). Inhibidores específicos de PKC bloqueaban la fosforilación de p47 y la producción de O_2^- en células estimuladas con PMA (Kramer y col., 1989). Además de PKC, existen otras quinasas que pueden fosforilar a dicha subunidad.

III Fase de activación: Los mecanismos de activación del sistema oxidasa no son conocidos completamente. Se han barajado varios mecanismos posibles: una modificación covalente de los componentes de la oxidasa por fosforilación, una modificación del ambiente lipídico en el cual se encuentra localizada la NADPH oxidasa o el ensamblaje de los componentes de la cadena de transferencia electrónica lo cual puede ser consecuencia de las ya mencionadas modificaciones de lípidos y proteínas.

Se sabe que la activación de la oxidasa requiere la interacción a nivel de la membrana plasmática de los componentes citosólicos y de los que se encuentran a nivel de membrana. Las principales evidencias experimentales parecen sugerir

que el cambio de la oxidasa de la forma inactiva a activa está relacionado con procesos de fosforilación de varias proteínas citosólicas y de membrana (Schneider y col., 1981).

Estudios recientes llevados a cabo con neutrófilos estimulados con PMA, Con-A o FMLP han permitido llegar a las siguientes conclusiones (Dusi y col., 1993):

1.- Con todos los estímulos usados, la translocación de p47-phox y p67-phox son esenciales para la activación de la NADPH oxidasa.

2.- Una continua translocación es necesaria para mantener la oxidasa en su estado activado.

3.- Con PMA, la actividad de NADPH oxidasa está directamente correlacionada con la fosforilación y translocación de estas subunidades, y con la cantidad de proteína fosforilada a nivel de membrana plasmática. Primero habría una fosforilación de proteínas citosólicas por PKC (directamente activada por PMA) seguida de translocación y activación de la oxidasa.

4.- Con estímulos que provocan una interacción ligando-receptor, la translocación de las dos subunidades está relacionada con mecanismos que implican al Ca^{2+} y producción de segundos mensajeros por hidrólisis de fosfolípidos. Esta translocación es insensible a estaurosporina? (inhibidor de PKC) y puede claramente dissociarse del proceso de fosforilación. La no correlación entre la fosforilación de estas subunidades y la translocación y activación de la oxidasa, puede explicarse considerando que la fosforilación no es la única modificación de las proteínas citosólicas que promuevan su translocación tal como propuso Miyahara y col. (1988) y, Heyworth y Badway (1990).

2.5 INTEGRIDAD DE LA MEMBRANA

La membrana plasmática está constituida por proteínas, sistemas enzimáticos y receptores inmersos o asociados en la bicapa lipídica. Interacciones entre estas proteínas y los lípidos determinan las funciones propias de la membrana. Los constituyentes de la membrana pueden desplazarse por la bicapa

lipídica, esta movilidad es lo que se denomina fluidez de membrana y representa una propiedad biofísica de la misma.

La fluidez de la membrana parece estar condicionada por la composición lipídica, longitud de las cadenas de ácidos grasos y grado de saturación de los mismos. La razón molar colesterol/fosfolípidos se considera que es uno de los principales determinantes de la fluidez (Shinitzky y Barenholz, 1978). Así se han descrito variaciones en el contenido de colesterol de membrana y su correlación con cambios en su función (Brenner, 1990; Carmena y col., 1991); modificaciones del contenido fosfolipídico en macrófagos, linfocitos y monocitos humanos afecta a distintas actividades biológicas de los mismos tales como grado de estimulación celular, capacidad de adherencia, quimiotaxis, quimioluminiscencia, fluidez, etc. (Galdiero y col., 1991); el incremento en ácidos grasos saturados en los fosfolípidos de la membrana plasmática de macrófagos reducía tanto la fluidez como la capacidad de la célula para interiorizar su membrana, observándose por la tanto una disminución de los niveles de endocitosis (Mahoney y col., 1980).

Existen estudios que relacionan la disminución de la fluidez de membrana con glicosilaciones a nivel de proteínas de membrana (Bryszewska y Szosland, 1988; Winocour y col., 1992).

Varias modificaciones en la fluidez de la membrana plasmática de leucocitos han sido descritas en relación con el ER: Fiorini y col. (1990) hablan de un incremento del coeficiente de anisotropía de fluorescencia (r_s) durante el ER como consecuencia de la activación de la NADPH oxidasa; Masuda y col., (1990) describen cambios en la estructura fisicoquímica de la membrana debidas principalmente a la acción del H_2O_2 . También se ha sugerido que la disminución en la fluidez de membrana puede ser el resultado de la peroxidación lipídica (Curtis y col., 1984; Chen y Yu, 1994). Calder y col. (1994) pusieron de manifiesto las modificaciones en el contenido en ácidos grasos a nivel de la membrana, que se producen durante el proceso de activación de los linfocitos y su repercusión en la fluidez y en la función de dichas células.

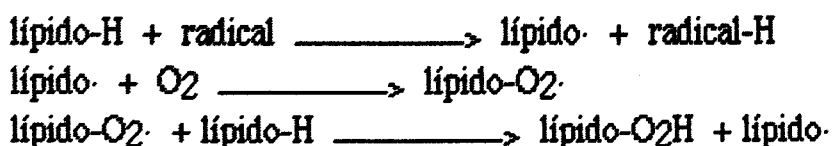
Badwey col. (1981) informaron de la capacidad de ácidos grasos poliinsaturados de inducir altos niveles de generación de superóxido, y sobre todo por el AA. Como ya señalamos con anterioridad, el AA está involucrado en la estimulación y en el mantenimiento del ER. Rubinek y Levy (1993) sugirieron

que el AA influye sobre la organización del complejo NADPH oxidasa estabilizándolo, incrementando el número de formas activas del mismo y aumentando su afinidad por NADPH. Otros ácidos grasos, tales como el linoleico y el oleico, tenían un efecto similar aunque menos potente, sobre los parámetros cinéticos de la oxidasa según estos autores.

2.6 EFECTOS DE LOS RADICALES LIBRES DE OXIGENO

Los productos derivados de la activación del ER en fagocitos son importantes mediadores de las reacciones de defensa y funciones inflamatorias de estas células. (REF CTUAL). Su actividad bactericida deriva de la capacidad que poseen para dañar células o moléculas: pueden originar daños a nivel de ADN, peroxidación de lípidos, daños en proteínas, etc.

Productos de la reacción de O_2^- , H_2O_2 e iones cobre o hierro, pueden iniciar procesos de peroxidación lipídica por extracción de un átomo de hidrógeno de ácidos grasos poliinsaturados (Lippman, 1989) de zonas donde hay dos o más carbonos con dobles enlaces. Dado que el oxígeno es abundante en las membranas, estos lípidos pueden reaccionar con dicho oxígeno formando un radical peroxi (lípidos- $O_2\cdot$). Estos radicales pueden abstraer átomos de hidrógeno de ácidos grasos adyacentes produciéndose una reacción en cadena que culmina con la generación de un lípido hidroperóxido (lípidos- O_2H). Esta reacción en cadena es terminada por la vit. E (Lippman, 1989).



Estos lípidos pueden escindirse generando pequeños hidrocarburos y aldehídos. La existencia de estos lípidos en la membrana altera considerablemente su función y, normalmente produce una disminución de su fluidez y de su permeabilidad (Halliwell, 1992).

Productos de la peroxidación lipídica, dañan a proteínas especialmente aquellas que poseen residuos de cisteína y triptofano lo cual puede resultar crucial para determinadas funciones enzimáticas (Gordillo y col., 1989?, Stadtman,

1990). Grupos sulfidrilos pueden reaccionar con aldehidos y malondialdehido. Las proteínas también pueden ser directamente atacadas por radicales hidroxilos (Riley y Behrman, 1991).

Los radicales libres también pueden actuar sobre polisacáridos (ej: despolimerización del ácido hialurónico; Matsama y col., 1966). Modulan los niveles de Ca^{2+} en compartimentos intracelulares (Orrenius y col., 1991).

El radical hidroxil puede reaccionar a gran velocidad con moléculas de ADN alterando residuos de azúcares o bases, y pueden inducir rotura de una o de las dos hebras del ADN (Halliwell y Aruoma, 1991). Aldehidos derivados de la peroxidación lipídica también tienen efectos citotóxicos y mutagénicos (Esterbauer y col., 1990).

Una importante vía por la cual las especies derivadas del oxígeno están implicadas en la respuesta inflamatoria es por su capacidad para estimular el metabolismo del AA generando eicosanoides, los cuales están altamente implicados en los procesos inflamatorios. Sporn y col. (1992) establecieron que el H_2O_2 inhibía la incorporación del AA a los fosfolípidos incrementando así la disponibilidad del AA en macrófagos alveolares.

2.7 MECANISMOS DE DEFENSA FRENTE A LOS RADICALES

Para evitar daños a las propias células, el organismo dispone de una serie de mecanismos de defensa. Se pueden establecer distintas líneas o mecanismos de defensa (Riley y Behrman, 1991):

Una primera línea de defensa es la formada por aquellas enzimas encargadas de la eliminación de los intermediarios de la reducción del oxígeno:

- **Superóxido dismutasa (SOD)**: se han descrito tres tipos distintos de esta enzima, una que contiene hierro (FeSOD) presente en procariotas y en algunas familias de plantas, la que contiene manganeso (MnSOD) presente en procariotas y en la matriz mitocondrial y, la que contiene cobre y zinc (Cu,ZnSOD) presente en el citosol de eucariotas y en cloroplastos. La MnSOD y FeSOD tienen grandes

homologías en cuanto a su secuencia aminoacídica. Todas ellas catalizan la misma reacción:



Los mecanismos catalíticos suponen un alternativa reducción y reoxidación del Cu (II), Mn (III) y Fe (III) durante las sucesivas interacciones con el O_2^- .

- **Catalasa:** es una hemoproteína localizada en los peroxisomas que cataliza la descomposición del H_2O_2 :



- **Peroxidasas:** reducen el peróxido de hidrógeno a agua empleando una alta variedad de donadores de electrones. Las hay que unen NADPH (glutathion reductasa), Glutathion (Glutathion peroxidasa), aminas aromáticas y fenoles como donadores electrónicos.

Una segunda línea es la que forman las **sustancias antioxidantes** las cuales evitan la iniciación o propagación de las reacciones en cadena y por lo tanto limitan el daño producido por los radicales. Algunos ejemplos de dichas sustancias: Vitamina E, vit. C, carotenos, ácido úrico, glutathion, metionina y bilirrubina. Los niveles de antioxidantes varían en los distintos tejidos, especies y con la edad (Rao y col., 1990; Pérez-Campo y col., 1990).

La última línea de defensa es para reparar los daños que se han producido. Existen fosfolipasas específicas que aceleran la hidrólisis de fosfolípidos oxidados, proteinasas que selectivamente degradan proteínas dañadas por procesos oxidativos y mecanismos para eliminar y reemplazar bases hidroxiladas a nivel de ADN.

3 PRODUCCION DE RADICALES LIBRES DE NITROGENO: OXIDO NITRICO

3.1 SINTESIS DE OXIDO NITRICO

Hasta 1987 el único mecanismo bioquímico que podía explicar la citotoxicidad de los macrófagos era la producción de radicales de oxígeno originada por la activación de la NADPH oxidasa. El hecho de que macrófagos que presentaban alguna alteración para producir el ER fuesen capaces de expresar citotoxicidad frente a parásitos extra o intracelulares (Scott y col., 1985; Gazzinelli y col., 1992) sugiría la existencia de otro mecanismo. Hibbs y col. (1987) pusieron de manifiesto que la citotoxicidad de macrófagos frente a células tumorales era dependiente de L-arginina y demostraron que la molécula activa era NO. Mostraron que macrófagos activados sintetizaban L-citrulina y NO_2^- a partir de L-arginina y que N-monometil L-arginina (L-NMMA) prevenía la síntesis de ambos productos así como la expresión de citotoxicidad.

El NO resulta de la oxidación del nitrógeno guanidínico terminal de L-arginina, siendo catalizado dicho proceso por la óxido nítrico sintasa (NOS) (Stuehr y col., 1991; Klatt y col., 1993). Dicha enzima ha sido caracterizado como una hemoproteína tipo citocromo P-450 reductasa que requiere tetrahidrobiopterina (BH_4), FMN, FAD y NADPH para su actividad.

Stuehr y col. (1991) propusieron el esquema que se ilustra en el Figura E como representativo de la formación de óxido nítrico.

Han sido caracterizadas distintos tipos de NOS:

- NOS constitutiva (NOS_c) presente en células endoteliales y neuronas, que es activada por Ca^{2+} y calmodulina (Lamas y col., 1992). Pequeñas cantidades de NO liberadas por estas isoformas están implicadas en mecanismos de transducción tales como los responsables de la regulación del tono vascular (Nathan, 1992) y neurotransmisión (Bredt y Snyder, 1992). Su activación conduce a la liberación de NO durante varios minutos.

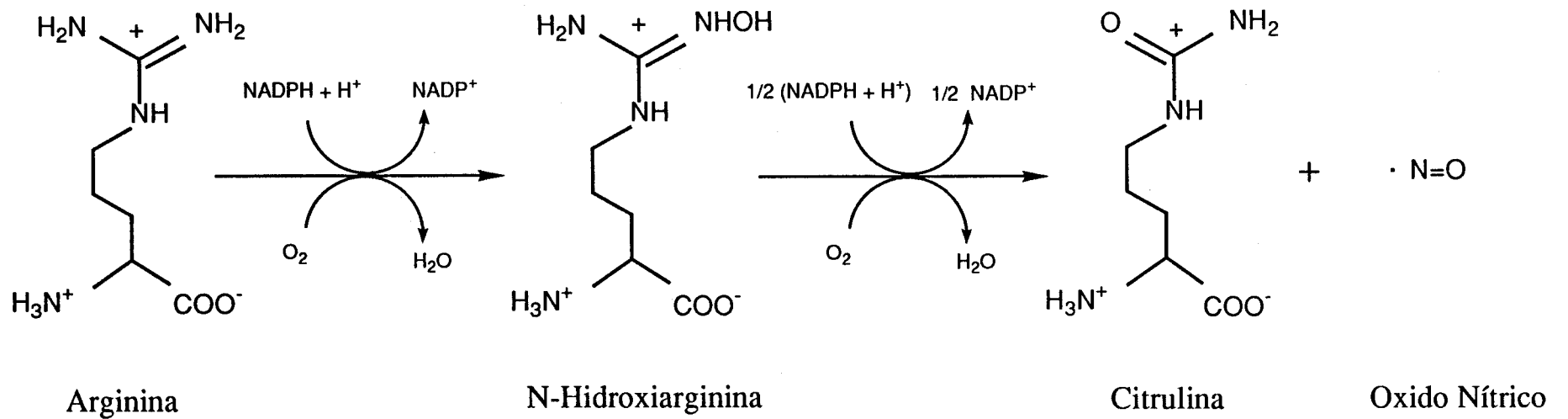
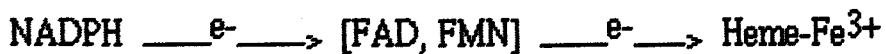


Figura E : Reacción de síntesis de óxido nítrico a partir de arginina, catalizada por la enzima óxido nítrico sintasa.

- NOS inducible (NOSi) la cual sólo se expresa en presencia de citoquinas (Moncada y col., 1991; Deng y col., 1993) y su actividad es independiente de elevadas concentraciones de Ca^{2+} y de calmodulina exógena (Xie y col., 1992). Genera grandes cantidades de NO durante varios días (Vodovotz y col., 1994).

Estudios de secuenciación aminoacídica de NOSc de cerebro de rata y de células endoteliales de aorta, y de NOSi de macrófagos de ratón ponen de manifiesto una homología del 50% aproximadamente. Los tres tipos de isoenzimas tienen una significativa similitud en su secuencia de aminoácidos con la enzima citocromo P-450 reductasa (Lowenstein y Snyder, 1992). Contienen una molécula de hierro (protoporfirina IX), FAD, FMN y cantidades variables de BH_4 , por subunidad (Baek y col., 1993). Se ha propuesto la siguiente secuencia de transferencia electrónica: electrones procedentes de NADPH son transferidos por las flavinas al grupo hemo capacitándolo para activar el oxígeno y catalizar la síntesis de NO.



La isoforma inducible ha sido descrita en numerosos tipos de células: neutrófilos, células Kupffer, células endoteliales, hepatocitos, fibroblastos... (Moncada, 1992). Ha sido ampliamente estudiada en macrófagos de ratón y no es detectable si no han sido activados por productos bacterianos sólo o en combinación con citoquinas. Martín y Edwards (1994) demostraron que IFN- γ solo no aumenta la producción de NO en macrófagos humanos. Existe una fuerte acción sinérgica entre IFN- γ y LPS al parecer mediada por una producción endógena de TNF- α el cual amplifica la síntesis y liberación de NO (Langermans y col., 1992). La activación de NOSi requiere de un agente preestimulante tal como IFN- γ seguido de un segundo agente que induce la síntesis de NO y que puede ser: IL-1 (no en macrófagos), lipopolisacárido (LPS), dipéptido murámico (MDP), TNF- α , IL-2, etc (Bastian y Hibbs, 1994).

Se sabe muy poco sobre la vía de transducción por la cual estímulos inmunológicos inducen la actividad de la NOS. Serven y col. (1992) indicaron que una PKC podía estar implicada en la síntesis de NO por IFN- γ . Hauschildt y col. (1991) mostraron que inhibidores de la ribosilación de ADP suprimían la producción de nitrito por macrófagos estimulados con LPS. Más recientemente, Pellat-Deceunynck y col. (1994) han indicado que nicotinamida y benzamida (dos

inhibidores de la ribosilación de ADP) previenen la inducción de la NOS llevada a cabo por IFN- γ sólo o en combinación con LPS.

El grado, duración y número de estímulos necesarios para la expresión de la NOSi variará en función del tipo celular (Oswald y col., 1994). Presenta un periodo de latencia de aproximadamente 8 horas, tiempo necesario para que la síntesis de NO $_2^-$ o NO $_3^-$ sea detectable y, dicha síntesis puede continuar mientras que exista sustrato o la célula muera. Wu y Brosnan (1992) indicaron que la citrulina producida por la NOS podía ser reciclada a arginina en macrófagos, y por lo tanto este ciclo arginina-citrulina podía contribuir a la regulación de la disponibilidad intracelular de arginina y prolongar la producción de NO por estas células.

Las grandes cantidades de NO producidas por esta NOSi durante prolongados periodos de tiempo actúan como parte de los mecanismos de defensa mediante efectos citotóxicos y citostáticos frente a microorganismos invasores (Nathan y Hibbs, 1991) pero también pueden ser nocivas para los tejidos y desencadenar estados patológicos: hipertensión y arterioesclerosis (Luscher, 1990), daños a nivel neuronal (Chao y col., 1992), respuesta inflamatoria consecuente al daño tisular (Mulligan y col., 1991). Pero existen mecanismos de regulación tanto a nivel de la NOSi (Assreuy y col., 1993) como de NOSc (Rogers y Ignarro, 1992). Estos mecanismos inhibidores están mediados por citoquinas tales como IL-4, IL-10 y TGF- β (Oswald y col., 1994).

3.2 MECANISMOS DE ACCION DE LOS RADICALES LIBRES DEL NITROGENO

Una vez formado el NO tiene una corta vida media. En un medio oxigenado y a pH fisiológico, reacciona con el O $_2$ para formar nitritos y nitratos:



El óxido nítrico suele cuantificarse como nitrito ya que entre un 50% y un 75% del NO formado aparece en forma de NO $_2^-$ (Stuehr y Marletta, 1987).

El NO puede reaccionar con el O_2^- formando peroxinitritos que en su forma protonada pueden fisionarse generando compuestos altamente oxidantes tales como $OH\cdot$ y NO_2 (Beckmann y col., 1990; Ischiropoulos y col., 1992).

El NO sintetizado puede tener funciones fisiológicas o patológicas (Oswald y col., 1994). Las acciones fisiológicas son mediadas por la NOSc la cual genera pequeñas cantidades de NO lo cual suele ir acompañado por un aumento de los niveles de GMPc por nitrosilación de la guanilato ciclasa (Mulsch y col., 1990) y su consiguiente activación, provocando: vasodilatación, inhibición de la agregación plaquetaria, transmisión neuronal y citostasis (Garthwaite, 1991). Por el contrario, las actividades patológicas resultan de una producción sostenida de altos niveles de NO a través de la NOSi, lo cual puede inactivar enzimas dependientes de hierro. La toxicidad del NO frente a microbios y células tumorales suele asociarse con esta vía de alta producción de NO inducida por citoquinas. El NO reacciona covalentemente con el hierro contenido en el grupo hemo de enzimas tales como ribonucleótido reductasa (Kwon y col., 1991) implicada en la síntesis de ADN, o produciendo nitrosilación de grupos Fe-S en moléculas como las de la cadena de transporte electrónico mitocondrial o la enzima aconitasa del ciclo de Krebs (Lancaster y Hibbs, 1990).

El NO también puede tener otras acciones que contribuyan al efecto citotóxico de macrófagos activados. La síntesis de NO va acompañada de un aumento en los niveles de GMPc. Nucleótidos cíclicos están implicados en la regulación de numerosas funciones de los macrófagos incluyendo fagocitosis, movilidad, respuesta a linfoquinas y síntesis de ADN. Luego, esto sugiere que la citotoxicidad de macrófagos puede estar relacionada con la formación de GMPc (Moncada y col., 1991).

El NO puede tener efectos citotóxicos o citostáticos dependiendo de la susceptibilidad al mismo de los diferentes tipos celulares. La razón de ello aún no está clara pero puede depender de la importancia de enzimas con grupos FE-S en la distintas células.

Jessup y col. (1992) señalaron un posible efecto inhibitor del NO en el proceso oxidativo de lipoproteínas de baja densidad (LDL) inducido por los macrófagos y su consiguiente efecto preventivo de procesos arterioescleróticos.

Se ha considerado que la producción de NO constituye un primer mecanismo de defensa frente a microorganismos intracelulares, hongos y helmintos que son demasiado grandes para ser fagocitados (Hibbs y col., 1990).

4 ENVEJECIMIENTO Y SISTEMA INMUNE

El proceso de envejecimiento es un fenómeno universal. Tiene lugar incluso bajo condiciones óptimas de vida y en ausencia de enfermedades. Sus manifestaciones y la expectativa media de vida, varía de unas especies a otras e incluso entre miembros de la misma especie. También está sujeto a influencias ambientales al igual que cualquier otro proceso metabólico. Kohn (1985) y Upton (1977) definen el envejecimiento como una acumulación de cambios responsables de las alteraciones que acompañan a la edad avanzada y del progresivo aumento de las posibilidades de enfermedad y muerte.

Muchas teorías han sido propuestas para intentar explicar el proceso de envejecimiento. Así, dicho proceso ha sido atribuido a cruzamientos celulares (Bjorksten, 1968), a cambios en la función inmunológica (Walford, 1969), daños por radicales libres (Harman, 1986; Harman, 1994) y a la existencia de genes "programados" para dicho proceso en el DNA (Hayflick, 1987). Ninguna de estas teorías por sí sola es completamente aceptada.

Centrándonos en la teoría de Harman, postula que el envejecimiento es causado por reacciones mediadas por radicales libres, las cuales ocurren al azar y de manera no específica, dando origen a un cúmulo de daños en las moléculas biológicas. Nohl (1993) de acuerdo con múltiples trabajos anteriores, indica que con el envejecimiento se produce un incremento de la descompensación entre la formación de prooxidantes y los niveles de antioxidantes. Habla de la existencia de una alta formación de radicales libres en tejidos aislados (fundamentalmente a nivel de mitocondrias), de la acumulación de daños debido a dichos radicales y de los cambios en la capacidad antioxidante observados en animales viejos.

Como ya se indicó en un capítulo anterior, los efectos de los radicales libres pueden ser múltiples y según muchos estudios sus efectos se ven agravados o son más patentes a medida que avanza la edad: provocan alteraciones en moléculas tales como colágeno (Dunn y col., 1991) o elastina (Bailey y col., 1977), originan acumulación de material inerte tal como ceroides y lipofuscina (Harman, 1990), provocan modificaciones en la estructura y función de proteínas (Gafni, 1990; Dean y Simpson, 1991; Stadtman, 1988), daños a nivel de ADN (Ames, 1989), etc.

El organismo dispone de diferentes mecanismos de protección o defensa contra dichos radicales (ya comentados con anterioridad) los cuales también se ven modificados con la edad (Rao y col., 1990; Sohal y col., 1990a,b).

El daño producido por los radicales libres en la función celular está asociado a un gran número de enfermedades: cáncer, aterosclerosis, hipertensión, demencia senil, deficiencia inmune asociada a la edad...

Otra de las teorías propuestas para intentar dar una explicación al proceso de envejecimiento postula cambios a nivel del sistema inmune. La disminución de la actividad del sistema inmune con la edad ha sido ampliamente puesta de manifiesto (Makinodan, 1980; Weksler y Siskind, 1984; Miller 1990). Experimentos llevados a cabo tanto en roedores como en humanos (Hirokawa y col., 1984; Roberts-Thomson, 1974), ponían de manifiesto una clara correlación entre el grado de funcionalidad del sistema inmune y las expectativas de vida.

4.1 LINFOCITOS Y ENVEJECIMIENTO

Estudios con distintas razas de ratones indicaban que: (1) La disminución de las funciones del sistema inmune tenían lugar primero en aquellas dependientes de los linfocitos T (2) Todos los cambios estaban precedidos por una involución del timo (3) Disminución en la respuesta de los linfocitos B a lipopolisacáridos (LPS) (Hirakawa, 1988).

Una posible razón por la cual las células T son más susceptibles al proceso de envejecimiento es el hecho de que el reclutamiento de dichas células por el timo desde la médula ósea ocurre durante un corto periodo, es muy limitado en la fase adulta y decrece de manera progresiva (Pérez-Mera y col., 1991). Sin embargo, esto no sucede en el caso de los linfocitos B ni en macrófagos. Luego en una fase temprana del desarrollo (aproximadamente en la pubertad) el timo comenzaría a perder capacidad para promover la diferenciación de las células T tanto a nivel cuantitativo como cualitativo, así por ejemplo, se vería alterada su capacidad proliferativa ante un estímulo antigénico (Hirokawa y col., 1992). Según estos autores con la edad se modificarían los niveles de los distintos tipos de linfocitos T en los tejidos periféricos indicando que, una de las posibles causas de la disminución de la capacidad proliferativa de dichos linfocitos con la edad puede

deberse a la disminución en el número de células productoras de IL-2 (citoquina producida por estos linfocitos y necesaria para la proliferación de los mismos).

En lo que respecta a la inmunidad humoral, parece ser que la concentración total de inmunoglobulinas en el suero no cambia significativamente con la edad, pero sí se modifica su distribución: las concentraciones de Ig A y Ig G aumentan con la edad mientras que los niveles de Ig M disminuyen. Por otro lado, los niveles de autoanticuerpos si se ven modificados con la edad, existe un aumento en la incidencia de enfermedades autoinmunes con la edad (Hayashi y col., 1989).

Kim y col. (1981) indicaron que aunque los linfocitos presentaban un menor capacidad de producción de anticuerpos con la edad, la producción de dichos anticuerpos por los linfocitos B no difería de manera significativa entre jóvenes y viejos. Por lo tanto, esa alteración en la producción de anticuerpos se debía principalmente a los linfocitos T que en jóvenes aumentaban la producción de anticuerpos mientras que en viejos la suprimían. Similares resultados fueron descritos por Snow (1987). Sin embargo, Hirokawa (1988) de acuerdo con otros muchos autores informaba de una disminuída capacidad de respuesta con la edad de los linfocitos B a LPS. Zharhary y Klinman (1984) indicaron que la capacidad de respuesta de estos linfocitos frente a determinados antígenos no cambiaba con la edad e incluso que la respuesta frente a ciertos estímulos antigénicos podía verse incrementada con la edad (Zharhary y Klinman, 1986). A partir de todo ello, se deduce que el efecto de la edad en la actividad de los linfocitos B no es tan concluyente como en el caso de los linfocitos T y además, existen múltiples evidencias de que la alteración de la función de las células B puede depender de la influencia de las células T en el proceso de maduración de las B.

Se han llevado a cabo muchos estudios para determinar las bases bioquímicas de la señal de transducción que tiene lugar como consecuencia de la interacción de receptores de células T con sus ligandos, lo cual determinará el paso de estas células de su estado de reposo a su estado activado y proliferativo. Dicha señal supone cambios a nivel del potencial de membrana, movilización del Ca^{2+} intracelular, activación y redistribución de la PKC, síntesis de proteínas, ADN y ARN, producción de linfoquinas, etc.

Se han descrito numerosos cambios en los mecanismos de transducción que pueden contribuir a las alteraciones observadas en la activación de las células del

sistema inmune con el envejecimiento (Fülöp, 1994): (1) Se ha señalado que la fluidez de membrana disminuye con la edad, por el contrario el potencial de membrana se incrementa y con respecto al pH intracelular no se han encontrado cambios significativos (2) Parece ser que ni el número ni la afinidad de los receptores de membrana se ven modificados con la edad en linfocitos y granulocitos (3) Cambios en los niveles de proteína G se han descrito en linfocitos y en leucocitos polimorfonucleares (4) En general se ha observado una disminución en la producción de inositol trifosfato en función de la edad (5) Los niveles de Ca^{2+} en linfocitos parecen no variar con la edad y sin embargo en granulocitos la concentración de Ca^{2+} intracelular se ve incrementada. La movilización del Ca^{2+} intracelular en las células del sistema inmune se ve alterada con la edad, aunque la causa exacta no se conoce (6) Alteraciones en la translocación de la PKC y disminución en la capacidad de generación de diacilglicerol, también han sido observadas con la edad (7) Deficiencias en la síntesis de nuevas proteínas. Toda esta serie de deficiencias pueden contribuir a una disminución en las competencias o en la normal activación de estas células del sistema inmune con la edad.

4.2 CELULAS FAGOCITICAS Y ENVEJECIMIENTO

Las células presentadoras de antígenos tales como macrófagos, células dendríticas y células B que fagocitan e hidrolizan sustancias antigénicas dando origen a pequeños péptidos los cuales posteriormente serán expresados en la superficie celular asociados con moléculas de complejo mayor de histocompatibilidad (CMH II), no experimentan cambios en dicha actividad con la edad (Ben-Yehuda y Weksler, 1992).

Los resultados concernientes a la actividad de los neutrófilos durante el proceso de envejecimiento no son concluyentes, sin embargo recientes estudios parecen indicar que en general su función disminuye con la edad. Usando estímulos varios, se ha demostrado que la producción de anión superóxido, citotoxicidad y la producción de enzimas líticas se encuentra disminuída con la edad (Fülöp y col., 1985; Niwa y col., 1989).

En cuanto a los efectos del proceso de envejecimiento en la función de los macrófagos y monocitos, los resultados son bastantes contradictorios. Algunos

autores indican que no hay diferencias en la capacidad para matar microorganismos o para generar citoquinas entre monocitos humanos de jóvenes y viejos (Nielsen y col., 1984; Rudd y Banerjee, 1989). Otros autores señalan que la capacidad de los macrófagos para presentar antígenos y para producir citoquinas se encuentra disminuida con la edad (Inamizu y col., 1985; Vetricka y col., 1985; Davila y col., 1990) e incluso otros informan de una aumentada actividad de estas células con la edad (Finger y col., 1982).

II. OBJETIVOS

En los últimos años se ha perfilado con mayor claridad el papel de los macrófagos en los procesos inmunológicos. El macrófago es una célula fagocítica, presentadora de antígeno y secretora. Gracias a su capacidad fagocítica, juegan un papel esencial en la defensa contra microorganismos y tumores, en las reacciones inmunológicas de rechazo de injerto contra huésped y en fisiopatología de la aterogénesis y carcinogénesis. Estas funciones están estrechamente regulada por factores extracelulares exógenos o endógenos (linfoquinas, factores del complemento, antígenos bacteriano...).

La función inmune disminuye con la edad, si bien se han descrito deficiencias tanto en los linfocitos B y T durante el envejecimiento, dichos cambios por sí solos no justifican el deterioro del sistema inmune. Por ello, fue nuestro propósito analizar los cambios que pudiera sufrir la capacidad funcional de los macrófagos con la edad. En base a ello nuestros objetivos fueron:

1. La estimación del proceso de estallido respiratorio de macrófagos peritoneales estimulados con PMA: producción de O_2^- y H_2O_2 . Medida de la actividad NADPH. Estudio de la producción de O_2^- empleando otros agentes, como el N-FMLP y Con-A. Estudio de la producción de O_2^- por macrófagos residentes y activados.
2. Ya que el NADPH requerido para la actividad oxidasa se obtiene a través del ciclo de las pentosas fosfato, fue nuestro objetivo estudiar el metabolismo de la glucosa por dicha vía. Analizamos el efecto de la edad en la actividad de dos enzimas claves de esta vía: G6P-DH y 6PG-DH. Determinar los niveles de NADPH y NADP en macrófagos peritoneales procedentes de ratas de distintas edades.
Estudiar la actividad de la enzima málica, la cual constituye otra fuente de suministro del NADPH requerido para la actividad oxidasa.
3. Dada la relación existente entre el transporte de glucosa y el ciclo de las pentosas fosfato, investigar posibles modificaciones del transporte de dicho sustrato con la edad.
4. Teniendo en cuenta la importancia del metabolismo de la glucosa, principal combustible para el macrófago, estudiar la actividad de enzimas

glucolíticas (hexoquinasa, piruvato quinasa y láctico deshidrogenasa) y del ciclo de Krebs (citrato sintasa).

5. El organismo dispone de mecanismos de defensa frente a la producción de radicales libres. Investigar el efecto de la edad en la actividad de enzimas responsables de la eliminación de especies reactivas del oxígeno: reductasa, glutatión peroxidasa, Cu/Zn superóxido dismutasa y catalasa.
6. Analizar la producción de óxido nítrico (lo cual constituye un segundo mecanismo mediante el cual los macrófagos realizan su función fagocítica) en función de la edad.
7. Dada la importancia de la integridad de la membrana plasmática en la función fagocítica de los macrófagos, otro de nuestros objetivos fue estudiar el efecto del envejecimiento en la fluidez y composición lipídica de la membrana de macrófagos peritoneales de ratas, con la edad.

III. MATERIAL Y METODOS

1. MATERIALES

Los reactivos químicos fueron de grado analítico y se obtuvieron de Merck, Darmstadt, Germany.

Los reactivos bioquímicos y enzimas fueron obtenidas de Boehringer, Mannheim, Germany o Sigma Chemical Co., St. Louis, MO. USA.

Los medios de cultivo fueron obtenidos de Flow Laboratories, Scotland.

Los productos radiactivos fueron suministrados por Amershan, U.K.

El DPH fue obtenido de Fluka Chemel AG, Buchs, Switzerland.

Los estándares metil-ésteres de ácidos grasos fueron obtenidos de Larodan Fine Chemicals, Malmö, Sweden.

2. ANIMALES Y TRATAMIENTOS

En todos los experimentos se utilizaron ratas hembras de la raza Wistar de 3, 12 y 24 meses. Las ratas se mantuvieron en ciclos de 12 horas luz-12 horas oscuridad, bajo condiciones apropiadas de humedad y temperatura y con libre acceso a agua y comida.

Los macrófagos peritoneales inflamados eran obtenidos de ratas a las cuales se les había inyectado 5 ml de una solución estéril de caseinato sódico al 6% (p/v) en ClNa 0.9% (p/v) 4 días antes de recoger las células, siguiendo el método descrito por Tsunawski y Nathan (1984).

De acuerdo con el método de Johnston y col. (1978), los macrófagos peritoneales activados fueron obtenidos de animales previamente tratados con extractos bacterianos. Para ello, se preparó un cultivo estacionario (10^9 células/ml) de *E. coli* K12 en medio estéril (triptona 1% (p/v), ClNa 0.5% (p/v), extractos de carne 0.5% (p/v) a 37°C durante 48 horas. La suspensión celular se separó en alícuotas que se conservaron a -20°C. En el día de su uso, se centrifugaron a 14.000xg durante 15 minutos a 4°C. El precipitado celular se resuspendió en el mismo volumen con ClNa 0.9% y se autoclavó. Un volumen de 2 ml de extracto bacteriano era inyectado en la cavidad peritoneal de las ratas, 7 días antes de la recogida de los macrófagos.

Los macrófagos residentes eran directamente obtenidos de la cavidad peritoneal de los animales, sin ser éstos sometidos a un tratamiento previo.

Los macrófagos peritoneales obtenidos tras la inflamación producida por caseína, fueron elegidos para la realización de esta investigación por varias causas: son fácilmente conseguibles, con un buen rendimiento y se obtiene una población celular homogénea y bien caracterizada.

3. OBTENCION DE CELULAS

3.1 Obtención de macrófagos peritoneales de rata

Los macrófagos eran obtenidos inmediatamente después del sacrificio y desangrado de los animales, mediante lavado peritoneal con ClNa 0.9% (p/v). Para ello, la pared abdominal era expuesta a una pequeña incisión en la línea media y 10 ml de solución salina eran inyectados vigorosamente evitando la inyección en el tracto gastrointestinal. Después de un masaje peritoneal de, aproximadamente, un minuto se exponía la cavidad peritoneal por una incisión en la pared abdominal y se recogía el exudado peritoneal (aproximadamente de 8-10 ml). La suspensión celular era transferida a un tubo de ensayo y centrifugada a 400xg a 4°C durante 5 minutos. El precipitado celular resultante se resuspendía en 1 ml de ClNa 0.2% durante 30 segundos, esto sometía a las células a un choque hipo-osmolar que determinaba la lisis de los hematíes contaminantes. La isoosmolaridad era restaurada añadiendo 10 ml de ClNa 0.9%. Por último se centrifugaba la suspensión celular a 400xg a 4°C durante 5 minutos y se resuspendía el precipitado celular en Krebs Ringer bicarbonato oxigenado pH 7.4 (KRB) que contenía ClNa 118 mM, KCl 4.75 mM, CaCl₂ 1.26 mM, KH₂PO₄ 1.18 mM, MgSO₄ 1.18 mM, NaHCO₃ 12.5 mM y Hepes [ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperacina-etanosulfónico] 10mM .

3.2 Obtención de monocitos humanos

Los monocitos se prepararon de sangre humana obtenida del Departamento de Inmunología, Hospital Virgen del Rocío, Sevilla, como fue previamente descrito por (buscar referencia). Diluimos la sangre, previamente tratada con EDTA-K₃, con PBS (tampón fosfato sódico) pH 7.2 en la proporción 1:1 y la colocabamos cuidadosamente sobre solución Ficoll-Histopaque (d=1.077) en tubos cónicos de centrifuga. Centrifugabamos a 400xg durante 20 minutos a 18°C y recogíamos el halo mononuclear que lavabamos 3 veces con PBS. Tras el último lavado resuspendíamos el botón celular en PBS y procedíamos a la identificación y conteo de los monocitos.

3.3 Determinación de la viabilidad celular por exclusión con azul Tripán y conteo celular

El método de exclusión de azul de Tripán se basa en la observación de que la membrana de las células viables es impermeable a ciertos colorantes mientras que las células no viables permiten que entre el colorante y tinte su contenido (Hathway y col., 1964).

La solución azul de Tripán se preparaba el día de su uso mezclando 4 partes de una solución de azul de tripán al 0.2% (p/v) en ClNa 0.9% con 1 parte de una solución de ClNa 4.25%.

El conteo celular se llevó a cabo haciendo uso de una cámara de Neubauer. Para ello, se tomaba una alícuota de la suspensión celular cuyo número y viabilidad se deseara determinar, se diluía 10 veces en KRB y se añadía un 5% de la preparación fresca de azul de tripán. Unos microlitros de esta preparación se colocaban en la cámara y se contaba el número de células viables (no teñidas) y muertas (teñidas). La viabilidad celular fue siempre superior al 95%.

4. MEDIDA DE LA PRODUCCION DE ANION SUPEROXIDO

4.1 Fundamento

La detección de dicho anión se efectuó mediante un ensayo colorimétrico basado en el método descrito por Babior y col. (1973)). Se basa este método en la capacidad del anión superóxido para reducir al ferricitocromo c.



Existen varios donadores de electrones que pueden reducir al citocromo c, pero de todos ellos sólo el anión superóxido se destruye por SOD (superóxido dismutasa) y por ello su producción es cuantificada por la medida de reducción de citocromo c inhibible por SOD.

4.2 Preparación de agentes estimulantes del estallido respiratorio

Como agentes activadores del estallido respiratorio usamos: PMA (12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato) 100 nM, N-FMLP (N-formil-metionil-leucil-fenilalanina) 1 μ M combinado con citochalasina B 5 μ g/ml, y Con-A (Concanavalina A) 50 μ g/ml.

El PMA fue preparado a una concentración de 1 mg/ml en DMSO (dimetilsulfóxido) y conservado a -20°C . Las posteriores diluciones eran efectuadas con agua. El péptido quimiotáctico (N-FMLP) se conservó a -20°C como una solución de concentración 2 mM en DMSO y se diluyó en KRB antes de su uso. La solución de Con-A fue preparada en KRB antes de su uso.

4.3 Producción de O_2^- por células intactas

La producción de O_2^- fue determinada en un espectrofotómetro Shimadzu UV-160A equipado con cubetas termostatazadas a 37°C .

Las células eran incubadas a esta temperatura a una concentración de $1-1.5 \times 10^6$ células/ml en KRB oxigenado que contenía glucosa 10 mM y citocromo c 80 μ M. Tras un periodo de incubación de 5 minutos, se añadía el agente activador del estallido respiratorio. La reducción del citocromo c se medía por

registro continuo del incremento de absorbancia a una longitud de onda de 550 nm. Los cambios de absorbancia eran convertidos a nanomoles de O_2^- empleando el coeficiente de extinción del citocromo c de $21.1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

En todos los experimentos se comprobó que no hay producción de O_2^- en ausencia de PMA y que la reducción del citocromo c se inhibe en un 98% en presencia de superóxido dismutasa.

4.4 Producción de O_2^- por sistemas libres de células. Actividad NADPH-oxidasa

La actividad NADPH-oxidasa fue determinada en el sobrenadante postnuclear obtenido de macrófagos estimulados con PMA, por la medida del rango de reducción del citocromo c dependiente de O_2^- en presencia de NADPH.

4.4.1 Preparación del sobrenadante postnuclear: Se llevó a cabo siguiendo el método descrito por Heyneman y Vercauteren (1984). Los macrófagos eran obtenidos por el método general y precalentados en $KRBO_2$ que contenía glucosa 10 mM a 37°C durante 3 minutos, antes de la adición del estímulo (PMA 100 nM) o del disolvente en los controles (DMSO). Las células eran incubadas a 37°C durante 5 minutos con agitación continua. La reacción se paró colocando los tubos en un baño de hielo a 4°C . Posteriormente, los tubos fueron centrifugados a $400\times g$ durante 5 minutos y el precipitado resultante se resuspendió en sacarosa 0.34 M tamponada con Tris-HCl 10 mM pH 7.2. A continuación las células se homogeneizaron con ayuda de un Potter-Elvehjem inmerso en un baño de agua helada hasta que el 90% de las mismas estuvieron rotas. La rotura celular se comprobó al microscopio óptico. Los núcleos y células intactas se eliminaron por centrifugación a $800\times g$ durante 10 minutos y el sobrenadante (llamado sobrenadante postnuclear) fue usado para determinar la actividad NADPH-oxidasa.

4.4.2 Medida de la actividad enzimática: La actividad NADPH-oxidasa fue determinada espectrofotométricamente midiendo la reducción del citocromo c a 550 nm. La mezcla de reacción contenía: tampón fosfato 10 mM pH 7.2, $ClNa$ 100 mM, $MgCl$ 1 mM, citocromo c 80 μM , NaN_3 2 mM y 100-200 μl del sobrenadante postnuclear (volumen final de reacción: 1 ml). La reacción se disparaba por la adición de NADPH 200 μM tras lo cual se registró el incremento de absorbancia a 550 nm. Se comprobó que no se producía reducción del

citocromo c en ausencia del nucleótido de piridina. Después de unos 5 minutos de registro, se añadía 90 $\mu\text{g/ml}$ de SOD a la mezcla de ensayo y se continuaba registrando el cambio de absorbancia en función del tiempo. La reducción del citocromo c dependiente de O_2^- se calculó por la sustracción del rango inicial de reacción después de la adición de SOD, del rango de reacción antes de la adición de dicho enzima. La actividadd enzimática se expresó como nmoles de O_2^- producidos por mg de proteína y por minuto.

5. MEDIDA DE LA PRODUCCION DE PEROXIDO DE HIDROGENO

5.1 Fundamento

El H_2O_2 producido durante el estallido respiratorio se puede aproximar a la cantidad de H_2O_2 liberado extracelularmente porque difunde libremente fuera de la célula. El H_2O_2 extracelular refleja el balance del H_2O_2 formado en la superficie celular así como la concentración intracelular alcanzada en competencia con las rutas catabólicas del H_2O_2 . Al ser el estallido respiratorio un proceso dependiente de la fagocitosis, la formación y liberación de peróxido de hidrógeno que tiene lugar durante dicho proceso se puede correlacionar directamente con el rango de fagocitosis y por lo tanto se puede usar para cuantificar este fenómeno indirectamente.

El H_2O_2 se puede poner de manifiesto mediante reacción con peroxidasas. En la técnica descrita por Root y col. (1975), se hace uso de una sustancia fluorescente, la escopoletina (7-hidroxi-6-metoxicumarina). Se trata de una sustancia donadora de electrones la cual se activa por la luz a una longitud de onda de 366 nm fluoresciendo a 460 nm con una intensidad directamente proporcional a su concentración en el medio. Cuando los niveles de peroxidasa y escopoletina son superiores a $1 \mu M$, la oxidación de la escopoletina y consecuentemente la extensión de su fluorescencia tiene lugar de manera directamente proporcional a la concentración de H_2O_2 . Por lo tanto, en presencia de un exceso de peroxidasa en el medio, la oxidación de la escopoletina proporciona un método sencillo para la cuantificación del H_2O_2 . Este método tiene una alta sensibilidad pues permite detectar concentraciones de $0.01 \mu M$ de peróxido de hidrógeno, y además es altamente específico ya que los únicos sustratos para la peroxidasa son el peróxido de hidrógeno y monoalkil peróxidos.

5.2 Determinación de la producción de H₂O₂

Se efectuaron medidas del peróxido de hidrógeno acumulado en un periodo de tiempo determinado (15 minutos). Las células ($1-1.5 \times 10^6$ macrófagos/ml de KRBO₂ que contenía glucosa 10mM y NaN₃ 1mM) eran preincubadas a 37°C durante 5 minutos antes de la adición de PMA 100 nM o DMSO en los controles. Tras 15 minutos de incubación con agitación continua a 37°C, la reacción era parada colocando la mezcla en un baño de hielo y las células eran eliminadas por centrifugación a 400xg durante 5 minutos. El H₂O₂ era medido en el sobrenadante y para ello se añadían 100-200 µl del sobrenadante a una cubeta que contenía escopoletina 2 µM, peroxidasa 45 U/ml y KRB en un volumen final de 1 ml. La producción de peróxido de hidrógeno se determinó por la medida del descenso lineal en la fluorescencia registrada después de añadir el estímulo. El escaso rango de oxidación de la escopoletina en el sobrenadante de células incubadas en ausencia de estímulo fue sustraído del rango registrado en el sobrenadante de células incubadas en presencia del mismo. La razón de disminución de la fluorescencia es constante de 2 a 5 minutos, hasta que el 70% de la escopoletina es oxidada.

Las medidas de producción de H₂O₂ se efectuaron en un espectrofluorímetro con cubeta termostaticada a 37°C y con agitación continua, siendo la longitud de onda de excitación de 366 nm y la de emisión de 460 nm.

5.3 Curva de calibración de H₂O₂

Para convertir los niveles de fluorescencia detectados en cantidades de H₂O₂ producidas, la variación en la fluorescencia para una concentración de H₂O₂ dada tiene que ser calibrada. Esto se consigue usando una curva estandar, partiendo de cantidades conocidas de H₂O₂ y en ausencia de células. Se preparó una solución de H₂O₂ 0.2 mM a partir de un dilución de H₂O₂ Foret 30% en tampón fosfato 50 mM pH 7.0. La concentración de esta solución diluída se determinó por espectrofotometría a 235 nm (a esta longitud de onda el coeficiente de extinción molar del H₂O₂ es 40) (Beers y Sizer, 1952). Se añadieron cantidades crecientes de H₂O₂ 0.2 mM a distintas cubetas que contenían KRB, escopoletina 2 µM y peroxidasa 45 U/ml. Se midió el descenso de fluorescencia en cada caso y se representó en función de la concentración de H₂O₂.

6. MEDIDA DE LA PRODUCCION DE OXIDO NITRICO

6.1 Fundamento

El óxido nítrico se cuantificó como nitrito acumulado en el sobrenadante de cultivos de macrófagos. El NO tiene una vida media muy corta (de 3 a 50 segundos) (Gryglewski y col., 1986). Bajo diferentes condiciones el NO puede ser inactivado por la reacción con O_2 y O_2^- . El oxígeno reacciona rápidamente con el NO para formar NO_2 el cual en solución forma nitrito (NO_2^-) y nitrato (NO_3^-), siendo ambas especies estables. Por otro lado, el NO también reacciona con el O_2^- formando NO_3^- . Según esto, el NO producido puede estimarse de manera aproximada por la medida del nitrito acumulado en el medio (Stuehr y Marletta, 1987).

6.2 Cultivo de macrófagos

Los macrófagos eran aislados en condiciones de máxima asepsia y tras ser centrifugados se resuspendían en medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con glutamina 2 mM, bicarbonato 2 gr/l, Hepes 10 mM, estreptomycin 50 μ g/ml y penicilina 50 U/ml. A continuación las células eran transferidas a placas de cultivo de 96 micropocillos, siendo la densidad celular de 0.5×10^6 células/pocillo. Se adicionaba a cada pocillo suficiente cantidad de medio de cultivo para obtener un volumen final de 300 μ l/pocillo. Las placas eran incubadas de 24 a 96 horas a 37°C en estufas al 5% de CO_2 . Finalizado el periodo de incubación, se tomaban alícuotas de los distintos pocillos para proceder a la cuantificación del nitrito o bien eran congeladas a -20°C hasta el momento de la determinación.

6.3 Cuantificación de nitritos

La técnica consiste en mezclar 100 μ l del sobrenadante del cultivo de macrófagos con 400 μ l de agua y 500 μ l de reactivo de Griess. Este reactivo está formado por la mezcla, llevada a cabo en el momento de su uso, a partes iguales de una solución de sulfanilamida al 1% (p/v) en ClH 3 N con una solución de N-(1)-naftilendiamina al 0.02% (p/v). La mezcla una vez agitada se deja a temperatura ambiente durante 20 minutos y el color desarrollado (el nitrito del medio reacciona con una arilamina y produce su diazotización, el producto se acopla para producir un azocromógeno de color púrpura ¿?) (Green y col., 1982)

se lee frente un blanco a 540 nm. El cálculo de la concentración de nitritos se llevó a cabo haciendo uso de una curva estandar realizada con NO_2Na de concentración 1, 2, 5, 10 y 20 μM .

7. MEDIDA DE ACTIVIDADES ENZIMATICAS

7.1 Preparación de los macrófagos peritoneales para los ensayos enzimáticos

Los macrófagos peritoneales eran obtenidos usando el método general y luego eran sonicados a 4°C 3-4 x 15 segundos. La rotura celular era puesta de manifiesto usando el método de exclusión de azul de Tripán. Posteriormente las células eran centrifugadas a 800xg durante 10 minutos y el sobrenadante era usado para la determinación de las actividades enzimáticas.

7.2 Enzimas estudiadas

δ-Fosfogluconato deshidrogenasa (6PGDH): fue medida según el método descrito por Levis y col. (1966) y modificado por Dror y col. (1970). La mezcla de reacción contenía: Tris-ClH 50 mM pH 7, Cl₂Mg 1.5 mM, NADP 0.25 mM, ácido 6-fosfogluconico 0.5 mM y 20 µl del extracto celular. La reacción era iniciada por la adición del ácido y la reducción del NADP era seguida espectrofotométricamente a 340 nm. *Glucosa-δ-fosfato deshidrogenasa* (G6PDH): fue medida usando el mismo método pero usando glucosa-6-fosfato como sustrato de la reacción.

Glutation peroxidasa (GP): fue cuantificada por la reducción de GSSG acoplada a la oxidación de NADPH por la glutacion reductasa a 365 nm (Lawrence y Burk, 1976). La mezcla de reacción contenía: tampón (fosfato potásico 50 mM, EDTA 1 mM, NaN₃ 1mM) pH 7, GSH 1 mM, NADPH 0.2 mM, 1 U glutacion reductasa y 20 µl del sobrenadante celular. Después de 5 minutos de preincubación, la reacción era iniciada por la adición de 0.1 ml de H₂O₂ 0.25 mM (volumen final: 1 ml).

Glutation reductasa (GR): fue determinada espectrofotométricamente por la medida de la oxidación de NADPH a 340 nm (Worthington y Rosemeyer, 1974). La mezcla de reacción contenía: tampón (fosfato potásico 20.5 mM, fosfato dipotásico 26.46 mM, KCl 200 mM, EDTA 1 mM) pH 7, NADPH 0.1 mM y una alícuota celular de 100 µl. Tras 5 minutos de preincubación a 37°C, la reacción era iniciada por la adición de 0.1 ml de GSSG 1 mM.

Superóxido dismutasa (SOD): cuantificada usando el método de la xantina oxidasa-citocromo c descrito por McCard y Fridovich (1969). Las concentraciones finales en cubeta fueron: tampón fosfato potásico 50 mM pH 7.8, EDTA 0.1 mM, citocromo c 10 μ M, xantina 50 μ M, cianuro 50 μ M ó 2 mM y catalasa 1 U. La reacción era iniciada por la adición de 1 U de xantina oxidasa. La inhibición de la xantina oxidasa fue seguida espectrofotométricamente a 550 nm.

Catalasa: fue ensayada siguiendo el método descrito por Beers y Sizer (1952), midiendo la disminución de la absorbancia a 240 nm tras la adición de peróxido de hidrógeno a un concentración final 100 mM. La mezcla de reacción contenía: tampón fosfato potásico 0.5 M pH 7.0, H₂O₂ 100 mM, 20 μ l del extracto celular y cantidad de H₂O suficiente hasta un volumen final de 1 ml.

Láctico deshidrogenasa (LDH): fue cuantificada espectrofotométricamente siguiendo la oxidación de NADPH (Tuengler y Pfeleiderer, 1977). La mezcla de reacción contenía: tampón fosfato potásico 0.15 M pH 7.4, piruvato sódico 5 mM, NADPH 1 mM y Tritón X-100 al 1%. La reacción era iniciada por la adición de una alícuota de la preparación celular (25-50 μ l), midiéndose el descenso de absorbancia a 340 nm.

Enzima málico: fue medida siguiendo el método descrito por Hsu y Lardy (1966). La mezcla de reacción contenía: Tris-HCl 100 mM pH 7.4, Cl₂Mn 1 mM, NADP 0.25 mM y ácido málico 1.5 mM. Después de 5 minutos de preincubación, la reacción era iniciada por la adición del málico y la reducción del NADP era seguida espectrofotométricamente a 340 nm.

Piruvato Kinasa: su actividad fue determinada mediante un sistema acoplado de enzimas, en el cual la producción de lactato está acoplada a la oxidación del NAD por la láctico deshidrogenasa (Feliu, 1975). La mezcla de ensayo contenía: Tris-HCl 50 mM pH 7.4, Cl₂Mg 2 mM, KCl 0.1 mM, ADP 2 mM, NADH 0.15 mM y LDH 1U/ml. Tras 5 minutos de preincubación, la reacción era iniciada por la adición de 0.1 ml de fosfoenolpiruvato (PEP) 2.5 mM.

Hexoquinasa: era ensayada cuantificando la formación del 6 fosfogluconato acoplada a la reducción del NADPH por la G6PDH (Walker y Holland, 1965). Las concentraciones finales en cubeta eran: tampón imidazol 75 mM pH 7, Cl₂Mg 7.5 mM, glucosa 0.5 mM, NADP 0.5 mM y G6PDH 0.2U/ml.

Después de 3 minutos de preincubación, la reacción era iniciada por la adición de 0.1 ml de ATP 5 mM.

Citrato sintasa: fue medida según lo descrito por Srere (1969). La mezcla de reacción contenía: Tris-HCl 0.5 mM pH 8, OAA 0.2 mM y DTNB 0.25 mM. La reacción era iniciada por la adición de 0.03 ml de Acetil Co-A 0.1 mM, midiendo el incremento de absorbancia a 412 nm.

Todas las medidas se llevaron a cabo en un espectrofotómetro Shimadzu 160A en cubetas de 1 ml con un paso de luz de 1 cm. Todas las enzimas fueron ensayadas a 25°C, excepto la glutatión reductasa y la enzima málica las cuales fueron medidas a 37°C. Las actividades específicas fueron expresadas como nmol/min/mg de proteína.

8. DETERMINACION DE LOS NIVELES DE NADP Y NADPH

El NADP y NADPH se determinaron según el método descrito por Greenbaum y col. (1965).

En ambos nucleótidos se cuantificaron por un lado los niveles basales y por otro los niveles existentes previa estimulación de la vía de las pentosas fosfato con PMA 100 nM.

Para la determinación de NADP, y una vez finalizado el periodo de preincubación de las muestras (dicha preincubación se llevaba a cabo con PMA o en ausencia del mismo en el caso de las muestras que permitirían la determinación de los niveles basales), se recogía un mililitro de la muestra a la que se le añadía 0.1 ml de ácido perclórico al 20%. En el caso del NADPH, a un mililitro de la muestra se le añadía 0.1 ml de KOH 2 N. Las muestras se mantenían en hielo durante 15 minutos y transcurrido este tiempo se sometían a 60°C durante 10 minutos en un baño de agua. Posteriormente eran neutralizadas a 0°C, se centrifugaban y se extraía el sobrenadante para la determinación del nucleótido correspondiente.

La mezcla de reacción contenía en un volumen final de 1 ml: tampón Tris-HCl 0.15 M pH 8.0, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa 1.2 mM, fenazina metosulfato 0.8mM, EDTA 0.6 mM, 10 unidades de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa y distintas cantidades del extracto ácido o alcalino. La reacción era iniciada por la adición de la enzima G6PDH y se medía el consumo de oxígeno a 37°C.

El cálculo de la concentración de ambos nucleótidos se realizó por comparación con un estándar interno de NADP o NADPH para cada muestra.

9. DETERMINACION DE LOS NIVELES DE LACTATO

La medida de los niveles de ácido láctico secretados al fluido intracelular, fue llevada a cabo haciendo uso de un Kit comercial (Kit N° MPR1 Lactate, Boehringer Mannheim).

Los macrófagos eran resuspendidos en tampón fosfato (PBS) a una concentración aproximada de 10^7 cel/ml e incubados con glucosa 10 mM durante 1 hora. A continuación se hacía uso de los reactivos del Kit: tampón carbonato (0.5 ml), NAD^+ (el NAD^+ comercial era disuelto en 4 ml de tampón fosfato 100 mM, pH 6.35) (0.25 ml), 10 μl de láctico deshidrogenasa, agua y muestras hasta un volumen final de 1.0 ml. La absorbancia de estas mezclas eran medidas a 340 nm frente a un blanco. Posteriormente, eran incubadas durante 45 minutos después de lo cual su absorbancia era nuevamente determinada.

La producción de lactato era calculada usando el coeficiente de absorción molar de $6.23 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

10. ACTIVIDAD DEL CICLO DE LAS PENTOSAS FOSFATO

[1-¹⁴C] glucosa y [6-¹⁴C] glucosa eran mantenidas a -20°C a una actividad específica de 50 µCi/250 µl. En el momento de uso se preparaba una dilución a partir de la solución stock con glucosa 10 mM (concentración final: 0.1 µCi/tubo).

Los macrófagos (10 x 10⁶ células/ml) eran resuspendidos en KRB que contenía glucosa 1 mM. Se usaron frascos Erlenmeyer cubiertos con tapón de goma y provistos de un compartimento central en forma de chimenea donde se introducía un papel de filtro Whatman impregnado con 0.2 ml de hidróxido de hiamina. Una vez colocados dichos filtros en los pocillos y añadida la suspensión celular, los frascos se cerraban de forma hermética con los tapones de goma y eran incubados con agitación continua a 37°C durante 3 horas (dicha incubación se llevó a cabo con células sin estimular y con células tratadas con PMA a una concentración final de 1 µg/ml). Para parar la reacción se inyectaban 0.5 ml de HClO₄ 8 N a través del tapón de goma (es necesario evitar la entrada de ácido en el interior del pocillo), se liberaba ¹⁴CO₂ del tampón y éste era absorbido por el hidróxido de hiamina. Las células eran de nuevo incubadas a la misma temperatura durante 1 hora. Transcurrido este tiempo, los filtros eran sacados de los pocillos, introducidos en líquido de centelleo y se procedía a la cuantificación de la radiactividad en un contador β.

La actividad del ciclo de las pentosas fosfato era determinada restando las cuentas obtenidas de la oxidación de la [1-¹⁴C] glucosa de las obtenidas de la oxidación de la [6-¹⁴C] glucosa (Revilla y col., 1987), según la siguiente ecuación:

$$CP = \frac{(CO_2)_1 - (CO_2)_6}{3-2 (CO_2)_1 - (CO_2)_6}$$

11. TRANSPORTE DE GLUCOSA

El transporte de 2-deoxi-D-glucosa (2dGlc) en macrófagos peritoneales de rata se llevó a cabo según el método descrito por Rist y col. (1990), con pequeñas modificaciones. Los macrófagos (10×10^6 células/ml) eran resuspendidos en KRB que contenía 2-deoxi-D-glucosa 0.1 mM (concentración final: 0.1 μ Ci/tubo. Tras incubar a diferentes tiempos (5, 15, 60 y 180 minutos), la reacción se paraba por centrifugación en microfuga a 12.000 rpm. El sobrenadante se eliminó y las células se lavaban dos veces con una solución isoosmótica que contenía: Tris-ClH 50 mM pH 7.4, citochalasin B 1 μ M y Cl₂Hg 1 μ M. Las células eran de nuevo centrifugadas para eliminar la radiactividad extracelular y, finalmente el precipitado celular se resuspendía en Tritón X-100 al 20% y se colocaba en líquido de centelleo.

12. CUANTIFICACION LIPIDICA EN MEMBRANAS DE MACROFAGOS PERITONEALES

12.1 Aislamiento de membranas

Las membranas de los macrófagos eran obtenidas según el método descrito por Bromberg y Pick (1985). Tras el aislamiento de los macrófagos por el método general, estas células eran resuspendidas en Hepes 5 mM con un cóctel de inhibidores de proteasas (bacitracina 10 mg/100 ml, leupeptina 1mg/100 ml, TLCK 1 mg/100 ml, PMSF 5 mg/100 ml y EDTA 1 mM) e incubadas a 4°C durante 15 minutos para originar la rotura hipotónica de las células. Las células eran sonicadas a 4°C 3-4 x 15 segundos, centrifugadas a 600xg durante 10 minutos y el sobrenadante volvía a centrifugarse a 30.000xg otros 30 minutos. El precipitado resultante era resuspendido en Hepes 20 mM, pH 7.5 con PMSF.

12.2 Medidas de fluidez

La fluidez de membrana se analizó mediante la cuantificación de una serie de parámetros de acuerdo con lo establecido por Vorbeck y col. (1982), usando DPH (trans-1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno). El DPH es una sustancia hidrofóbica capaz de emitir fluorescencia cuando está incorporada en un ambiente lipídico. Esta sustancia es estimulada con un corto pulso de luz polarizada y la medida de su emisión fluorescente se efectúa en dos planos, uno paralelo a la excitación (I_v) y otro perpendicular a ella (I_h) y, de estos datos puede obtenerse el denominado grado de polarización de fluorescencia (p) que viene dado:

$$p = I_v - I_h / I_v + I_h$$

La mezcla de reacción contenía: tampón (Tris-ClH 10 mM, sacarosa 0.25 M) pH 7.4, DPH 2 mM que era diluido 1000 veces (usando tetrahidrofurano como solvente) y una alícuota de la preparación de membranas equivalente a 50-150 µg de proteínas. El periodo de incubación era de 45 minutos. Las medidas se llevaron a cabo a 25°C y 37°C en un fluorímetro Perkin-Elmer 650-40. Las longitudes de onda de excitación y de emisión fueron de 365 y 430 nm respectivamente.

Medidas de r_s (anisotropía de fluorescencia) son sensibles a diferencias en las microviscosidades de las membranas y nosotros las hemos usado como índices de fluidez (Vorbeck y col., 1982).

$$r_s = 2 p / 3 - p$$

La anisotropía de fluorescencia límite (r_{∞}) y el parámetro de orden lipídico (SDPH) se calcularon de acuerdo a lo establecido por Pottel y col. (1983).

$$r_{\infty} = 4/3 r_s - 0.11 \text{ (where } 0.13 < r_s < 0.28 \text{)}$$

$$\text{SDPH} = (r_{\infty}/r_0)^{1/2} \text{ (where } r_{\infty}/r_0 = 4/3 r_s/r_0 - 0.28 \text{)}$$

12.3 Extracción y separación de lípidos

Dicha extracción fue llevada a cabo siguiendo el método descrito por Folch y col. (1957), en presencia de BTH como antioxidante. La disociación del tejido se llevó a cabo por homogenización en una mezcla fría de cloroformo-etanol 2:1 (v/v) que contenía un 0.01% de BTH y usando un UltraTurrax modelo Type TP-18-1.

El extracto lipídico se cuantificó gravimétricamente y se guardó en tubos de vidrio con cierre teflón en atmósfera de nitrógeno a -30°C hasta su uso. La cuantificación de los distintos tipos de lípidos y fosfolípidos se obtuvo por medias a través de la técnica de Iatroscan TCL/FID (Schrijver y Vermeulen, 1991; Shanta y Ackman, 1990). El Iatroscan MK-5 se usó en combinación con un Chromarod S. De cada disolución de la muestra, se tomaron $3 \mu\text{l}$ para la cuantificación, que se realizó mediante separación sobre microvarillas de cuarzo recubiertas con sílice (Chomarod S) usando un Iatroscan equipado con un detector de ionización de llama (velocidad de flujo de H_2 , 150 ml/min; velocidad de flujo de aire, 1750 ml/min), un escaner (velocidad de lectura, 0.47 cm/seg), un integrador y un registrador (sensibilidad, 10 mV; velocidad de carta, 0.42 cm/min).

Las varillas (tipo S) fueron desarrolladas sucesivamente usando las siguientes mezclas:

- 1.- Cloroformo:metanol:ácido acético:agua (67:28:2:3, v/v/v/v)
- 2.- Hexano:éter etílico:ácido fórmico (90:10:2, v/v/v).

12.3 Análisis de ácidos grasos

Los ácidos grasos se cuantificaron por cromatografía gaseosa (Ruiz-Gutiérrez y col., 1989; Molina y col., 1989; Molina y col., 1990). Las muestras eran saponificadas por calentamiento durante 5 minutos con 3-4 ml de metilato sódico 0.2 M (5 g de sodio metal en un litro de metanol), y calentadas de nuevo a 80°C durante 5 minutos con H₂SO₄ al 6% en metanol anhidro. Con la finalidad de extraer los ésteres metílicos formados se añadió hexano, y éstos eran analizados en un cromatógrafo de gases (Hewlett-Packard 5890) con detector de ionización capilar de sílice fundida, Omegawax 320 (30 m x 0.32 mm d.i., espesor de membrana 0.25 µm). Un microlitro de cada muestra era inyectado en el aparato equipado con una columna capilar, realizando un desarrollo isotérmico a 200°C durante 10 minutos y, programado de 200 a 260°C durante los 30 minutos siguientes, a una velocidad de 2°C/min. Como gas portador se utilizó helio, con una velocidad de 2 ml/min y 250 KPa de presión en cabeza de columna. La temperatura del inyector y detector fue de 250°C y 260°C respectivamente, y el flujo del gas auxiliar (nitrógeno) de 25 ml/min.

Para el análisis por espectrofotometría de masas se utilizó la misma columna capilar y gas portador (helio), pero la temperatura de la columna se programó desde 130°C hasta 200°C, con una velocidad de 2°C/min, siendo 250°C la temperatura del inyector. Las condiciones del espectrofotómetro de masas fueron las siguientes: ionización por impacto de electrones, 70 eV; voltaje de aceleración, 4.0 kV; corriente de emisión, 100 µA; temperatura de la fuente de iones, 200°C.

Cada ácido graso presente en el extracto se identificó mediante comparación de su tiempo de retención y espectro de masas, con los patrones correspondientes.

13. MEDIDA DE LA CONCENTRACION DE PROTEINAS

La concentración de proteínas fue determinada por el método modificado de Lowry (Markwell, 1965) empleando albúmina sérica bovina como estandar.

IV. RESULTADOS

1. Obtención y conteo de macrófagos residentes, inflamados y activados obtenidos de la cavidad peritoneal de ratas:

Las ratas fueron inyectadas intraperitonealmente con caseinato sódico cuatro días antes de la extracción de los macrófagos de la cavidad peritoneal (macrófagos inflamados) ó con un extracto de *E. coli* siete días antes de dicha extracción (macrófagos activados). Los macrófagos obtenidos de animales que no eran sometidos a ningún tratamiento previo eran macrófagos residentes.

El número de células obtenidas por animal, para cada edad y tipo de macrófago, se muestra en la Tabla I. A partir de estos resultados, se deduce que el tratamiento de los animales con agentes inflamatorios o inmunológicos aumentaba la afluencia de macrófagos a la cavidad peritoneal, obteniéndose un número máximo de células en el caso del tratamiento con *E. coli* para las tres edades estudiadas y los valores más bajos se obtenían en el caso de los macrófagos residentes.

El número de células residentes oscilaba entre $9-11 \times 10^6$ células/animal, en macrófagos inflamados entre $13-18 \times 10^6$ células/animal y en el caso de los macrófagos activados entre $18-22 \times 10^6$ células/animal.

Dentro de cada tipo celular, no se observaron diferencias significativas entre los valores obtenidos para las tres edades estudiadas. Sin embargo, si se obtenían diferencias significativas en el número de células que se recolectaban de los distintos tipos de macrófagos para cada edad. Para las tres edades estudiadas, el máximo número de células se obtenían en el caso de los macrófagos activados.

TABLA I

NUMERO DE MACROFAGOS OBTENIDOS DE LA CAVIDAD PERITONEAL DE RATAS: RELACION CON LA EDAD Y ESTADO FUNCIONAL DEL MACROFAGO

EDAD	Estado de las células		
	Residentes	Inflamados	Activados
3 meses	9.98 ± 1.004	14.71 ± 1.56 ^c	19.17 ± 0.82 ^{a,b}
12 meses	10.65 ± 0.67	17.13 ± 1.71 ^c	20.75 ± 1.53 ^{a,b}
24 meses	11.41 ± 0.73	15.99 ± 1.38 ^c	19.95 ± 1.13 ^{a,b}

Los resultados están expresados en millones de células/animal. Los valores representan la media ± D.E. de al menos cinco experimentos realizados por separado.

Significación estadística: a (diferencia entre Activados e Inflamados), b (diferencia entre Activados y Residentes), c (diferencia entre Inflamados y Residentes). Para 3 meses: a p<0.02, b p<0.001, c p<0.02; para 12 meses: a p<0.05, b p<0.02, c p<0.02; para 24 meses: a p<0.05, b p<0.02, c p<0.01.

2. Producción de O_2^- por macrófagos peritoneales de rata: dependencia de la concentración de PMA:

Se ensayó la capacidad de los macrófagos peritoneales de ratas jóvenes para liberar O_2^- en respuesta al PMA. La producción de O_2^- a diferentes concentraciones del éster de forbol se muestra en la Figura 1. Se comprobó que en ausencia de estímulo las células no liberaban O_2^- . Después de la adición de PMA al medio de incubación celular y tras un corto periodo de tiempo en el que las células no respondían al forbol (tiempo de latencia), se empezaba a registrar la reducción del citocromo c dependiente de O_2^- . Observamos un incremento de la producción de O_2^- a medida que se incrementaba la concentración del agente estimulante. Un comportamiento similar fue descrito por Sha'afi y col. (1983). En todos los ensayos llevados a cabo se obtenían los mayores niveles de producción de O_2^- a la concentración de 100 nM, lo que coincide con la concentración más utilizada en la literatura para la estimulación del ER de macrófagos.

La concentración utilizada por nosotros para todos los experimentos posteriores fue la de 100 nM.

El tiempo de latencia en la producción de O_2^- cambió en función de la concentración de PMA empleada de tal modo que un descenso en la concentración de PMA se acompañó de un retraso en el comienzo de la liberación de O_2^- (Tabla II).

3. Efecto de la concentración de glucosa sobre la producción de O_2^- por macrófagos peritoneales de rata estimulados con PMA:

Teniendo en cuenta que la reacción de formación de O_2^- es fuertemente dependiente de la concentración de NADPH en un sistema libre de células (Bromberg y Pick, 1985) y que la oxidación de la glucosa por la vía de las hexosas monofosfato (de la cual depende el suministro de dicho NADPH) se incrementa tras la estimulación celular con agentes que activan el ER,

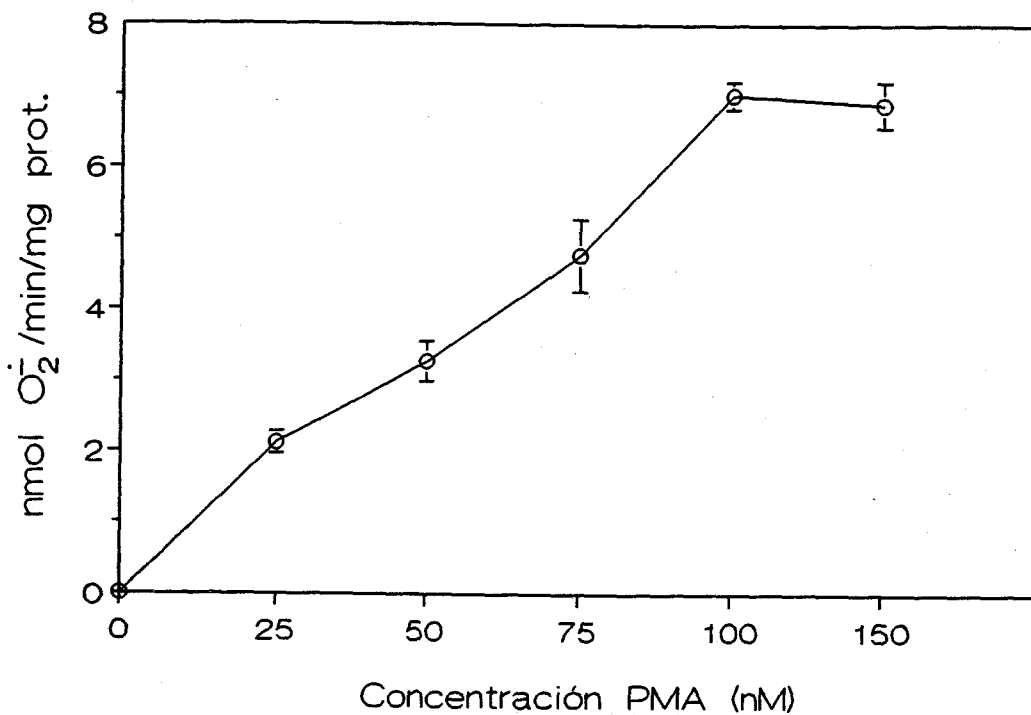


Figura 1: Producción de O_2^- por macrófagos peritoneales de ratas de 3 meses estimulados con diferentes concentraciones de PMA (25, 50, 75, 100 y 150 nM). Los resultados representan la media \pm D.E. de al menos cinco experimentos realizados por separado.

TABLA II

EFECTO DE LA CONCENTRACION DE PMA SOBRE EL TIEMPO DE LATENCIA EN LA PRODUCCION DE ANION SUPEROXIDO

PMA (nM)	Tiempo de latencia (seg.)
25	148 ± 19.2
50	88.2 ± 8.21
75	76.3 ± 6.50
100	61.5 ± 5.46
150	68.2 ± 3.34

Los macrófagos peritoneales eran incubados a 37°C en una cubeta del espectrofotómetro. A tiempo cero se añadía el PMA y se seguía la reducción del citocromo c. Los resultados expresados representan el tiempo transcurrido desde la adición del agente estimulante hasta el comienzo de la reducción del citocromo c.

investigamos el efecto de la glucosa como fuente de poder reductor en la producción de O_2^- por macrófagos estimulados con PMA.

Los macrófagos fueron incubados en presencia de distintas concentraciones de glucosa (5, 10, 15 y 20 mM) observándose una máxima capacidad de producción de anión superóxido a la concentración de 10 mM que es la habitualmente empleada en todos los experimentos de cuantificación de radicales libres. Es importante señalar que a una concentración de glucosa 15 mM y sobretodo 20 mM, se observaba un descenso sistemático de la producción de O_2^- (Tabla III).

Cuando las células fueron incubadas en ausencia de glucosa la liberación de O_2^- se inhibió completamente. Se ha demostrado que la inhibición de la glucólisis reduce la producción de O_2^- por neutrófilos estimulados con digitonina (Cohen y Chovaniec, 1978) y por N-FMLP (Simchowitzy col., 1979).

4. Producción de O_2^- por macrófagos peritoneales de rata estimulados con PMA:

Los ésteres de forbol son promotores tumorales siendo el PMA el más potente. Dicho éster induce altos niveles de producción de O_2^- en células fagocíticas (Borregaard, 1988). Estimula la liberación de anión superóxido por neutrófilos en unos rangos comparables a los observados durante la fagocitosis bajo condiciones óptimas (Curnutte y col., 1984).

Dicho agente se une y activa a fosfolípidos dependientes de PKC la cual sufre un proceso de translocación a la membrana donde activará a la NADPH oxidasa. Se ha demostrado en neutrófilos estimulados con dicho agente que no presentan rotura de fosfoinosítidos a inositol fosfato (Ohta y col., 1985) tal y como cabría esperar para un estímulo que evita el paso de la fosfolipasa C y activa directamente la PKC.

Los resultados obtenidos usando este estímulo, ponen de manifiesto una progresiva disminución en la capacidad de los macrófagos para producir anión superóxido en función de la edad, así se obtuvieron valores de 6.21 ± 0.24 nmol O_2^- /min/mg prot. en animales de 3 meses, y de 3.00 ± 0.56 nmol O_2^- /min/mg prot. en animales de 24 meses. Las diferencias encontradas entre las tres edades

TABLA III

EFFECTO DE LA CONCENTRACION DE GLUCOSA SOBRE LA PRODUCCION DE ANION SUPEROXIDO POR MACROFAGOS PERITONEALES

Glucosa (mM)	nmol O ₂ ⁻ /min/ mg. prot.
0	0
5	3.96 ± 0.52
10	7.02 ± 0.19
15	6.54 ± 0.65
20	5.74 ± 0.54

Los macrófagos eran incubados a 37°C en presencia de las distintas concentraciones de glucosa (0, 5, 10, 15 y 20 mM) y, tras la adición del PMA se seguía la reducción del citocromo c.

Los valores representan la media ± D.E. de al menos cinco experimentos realizados por separado.

estudiadas usando PMA, fueron en todos los casos estadísticamente significativas (Figura 2).

5. Producción de O_2^- por macrófagos peritoneales de rata estimulados con N-FMLP y Con-A:

Además del PMA, descrito como el agente estimulante más potente del ER, se estudió la producción de anión superóxido por otros estímulos que actúan por otras vías diferentes a las del éster de forbol. Estudiamos los niveles de O_2^- inducidos por N-FMLP y Con-A, a concentraciones descritas con anterioridad en la literatura.

Los péptidos quimiotácticos también son agentes activos en la estimulación de leucocitos polimorfonucleares aunque menos que el PMA. El N-FMLP actúa a través de receptores que movilizan Ca^{2+} por activación de fosfolipasa C la cual hidroliza fosfatidil 4,5 bifosfato dando origen a inositol trifosfato (que moviliza Ca^{2+} de compartimentos intracelulares) y diacilglicerol (el cual puede estimular a la PKC).

De forma similar al N-FMLP, la Con-A activa la hidrólisis de fosfatidilinositol 4,5 bifosfato pero no produce translocación de PKC y su activación es sensible a toxinas de Bordetella pertussis.

Cuando estimulamos los macrófagos con N-FMLP + citochalasin B (una droga que aumenta la producción de anión superóxido en macrófagos estimulados con el péptido quimiotáctico y no con otros agentes) encontramos un ligero aumento (no significativo) en ratas de 12 meses, sin embargo los valores encontrados en ratas de 24 meses fueron aproximadamente un 35% menores a los encontrados en animales jóvenes (Figura 3).

Usando Con-A como agente estimulante, al igual que con el péptido quimiotáctico, encontramos los valores más altos de producción de O_2^- en ratas de 12 meses aunque las diferencias no fueron significativas con respecto a los valores obtenidos en ratas de 3 meses. Los niveles de producción de anión superóxido en animales de 24 meses fueron significativamente diferentes a los observados en animales de 3 y 12 meses (Figura 4).

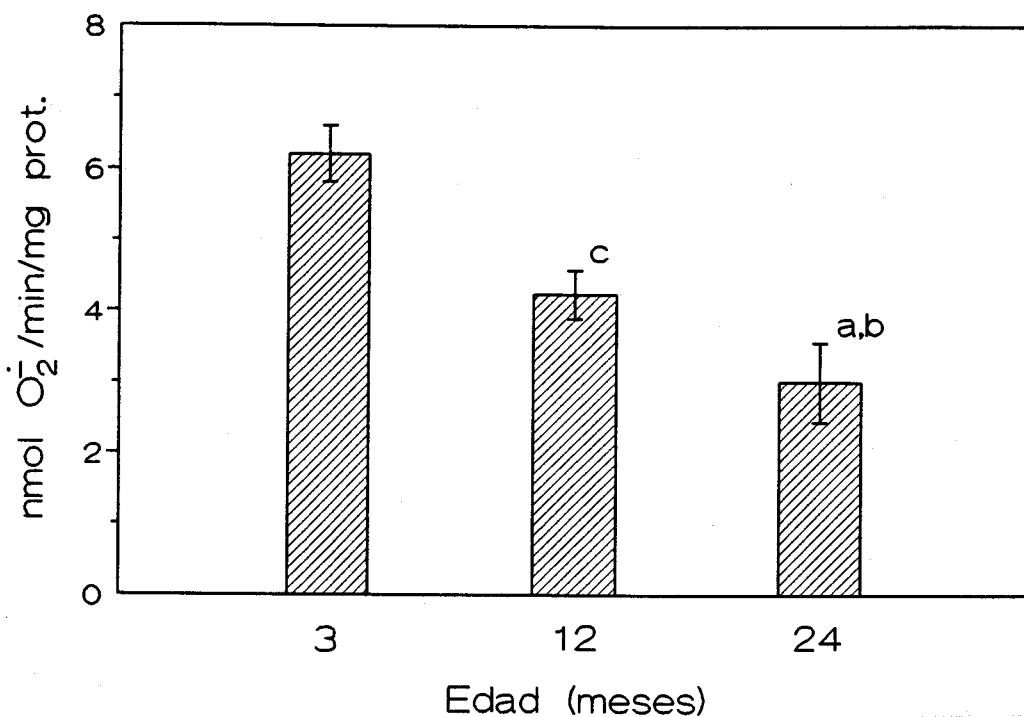


Figura 2: Producción de O_2^- por macrófagos peritoneales inducida por PMA 100 nM, en ratas de distintas edades. Los resultados son la media \pm D.E. de al menos cinco experimentos realizados por separado.

Significación estadística: a (diferencia entre 24 y 3 meses) $p < 0.001$, b (diferencia entre 24 y 12 meses) $p < 0.01$, c (diferencia entre 12 y 3 meses) $p < 0.001$.

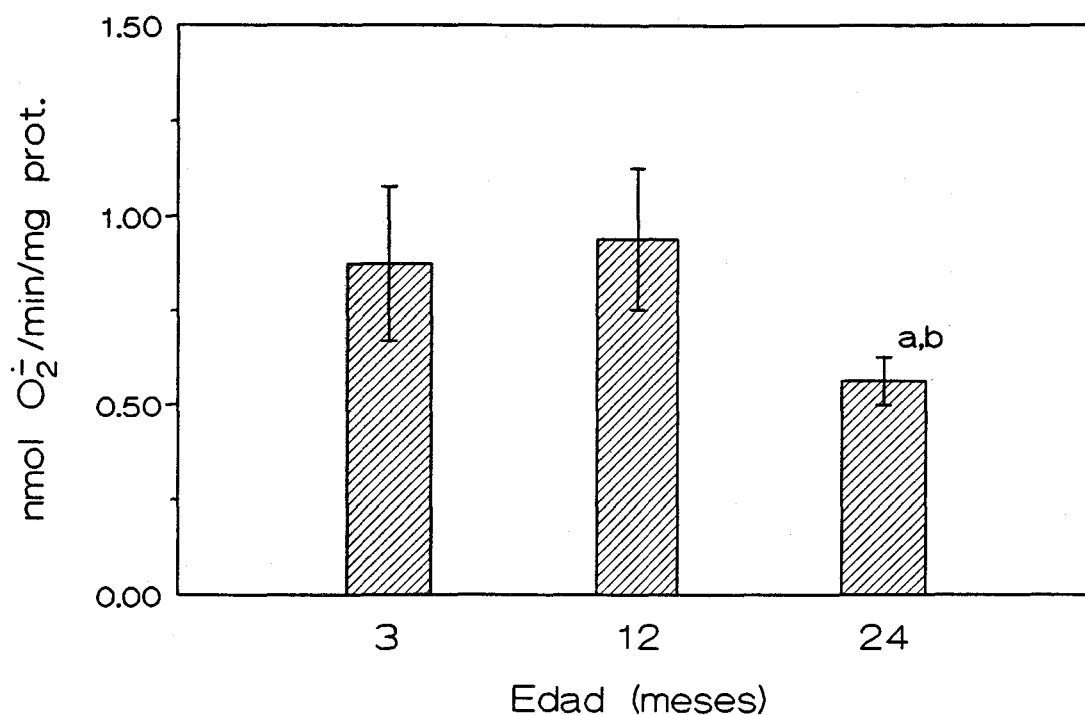


Figura 3: Producción de O_2^- por macrófagos peritoneales estimulados con N-FMLP $1\mu M$ + citochalasina β , en ratas de distintas edades. Los resultados son la media \pm D.E. de al menos cinco experimentos realizados por separado.

Significación estadística: a (diferencia entre 24 y 3 meses) $p < 0.02$, b (diferencia entre 24 y 12 meses) $p < 0.005$.

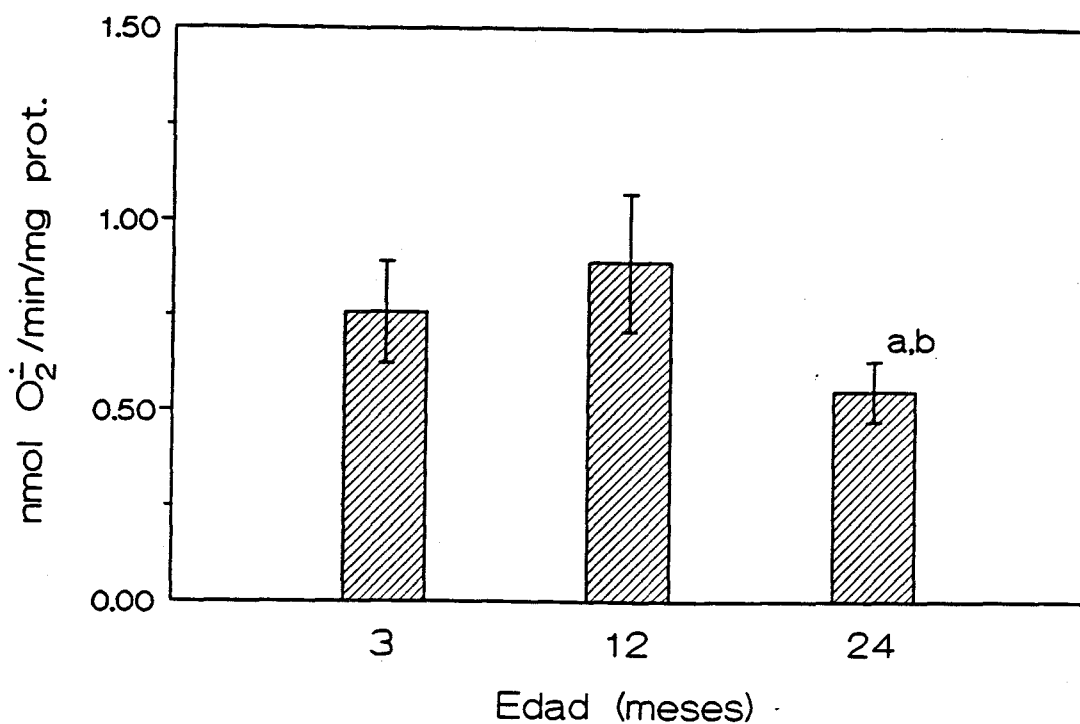


Figura 4: Producción de O_2^- por macrófagos peritoneales estimulados con Con-A 50 mg/ml, en ratas de distintas edades. Los resultados son la media \pm D.E. de al menos cinco experimentos realizados por separado.

Significación estadística: a (diferencia entre 24 y 3 meses) $p < 0.01$, b (diferencia entre 24 y 12 meses) $p < 0.005$.

6. Producción de O_2^- por macrófagos peritoneales de rata: dependencia del estado funcional del macrófago:

Como hemos indicado anteriormente observamos una disminución en la producción de dicho anión en función de la edad en macrófagos inflamados estimulados con PMA. Estos macrófagos eran obtenidos por tratamiento previo de los animales con caseinato sódico, sin embargo estas células pueden presentar otros estados funcionales que suponen diferencias morfológicas, bioquímicas y metabólicas: residente y activado.

Los resultados obtenidos indican que tanto en macrófagos residentes como en macrófagos activados también se observaba una disminución, dependiente de la edad, en la capacidad de estos macrófagos para producir dicho anión. Se observó un descenso de aproximadamente el 60% entre animales de 3 y 24 meses, independientemente de cual fuera el estado funcional de estas células. Los valores obtenidos para animales de 12 meses eran intermedios entre los obtenidos para animales jóvenes y viejos. Las diferencias encontradas entre las diferentes edades fueron estadísticamente significativas en todos los casos (Figura 5).

Por otro lado, estos valores ponen de manifiesto que tanto los macrófagos obtenidos por tratamiento con agentes inflamatorios como los obtenidos por tratamiento inmunológico, tienen una mayor capacidad para generar anión superóxido comparado con los macrófagos residentes.

Los valores máximos de producción de anión superóxido se obtuvieron en el caso de los macrófagos activados, para las tres edades estudiadas.

7. Producción de O_2^- por monocitos humanos estimulados con PMA:

Los monocitos, precursores sanguíneos de los macrófagos, presentan al igual que estos el fenómeno del estallido respiratorio.

Hemos estudiado la capacidad de producción de O_2^- por monocitos humanos procedentes de individuos de distintas edades y sexos. Hemos

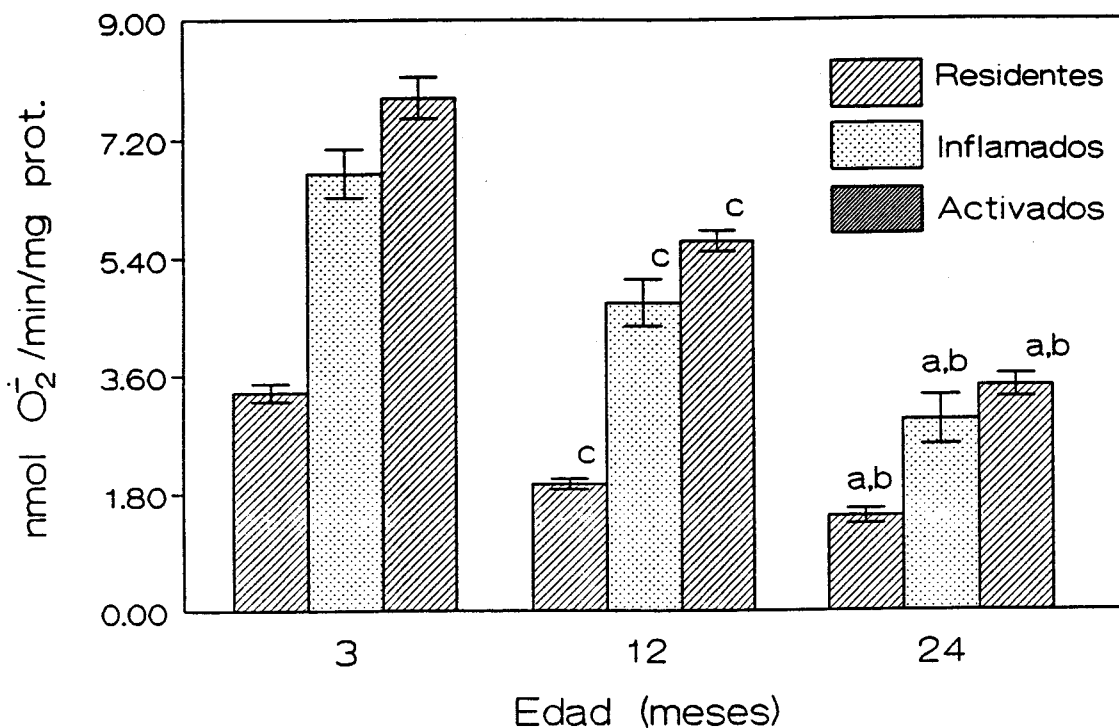


Figura 5: Relación entre el estado funcional del macrófago y la producción de anión superóxido inducida PMA. Los resultados representan la media \pm D.E de al menos cinco experimentos realizados por separado.

Significación estadística: a (diferencia entre 24 y 3 meses), b (diferencia entre 24 y 12 meses), c (diferencia entre 12 y 3 meses). Para Residentes: a $p < 0.001$, b $p < 0.05$, c $p < 0.001$; Inflamados: a $p < 0.001$, b $p < 0.001$, c $p < 0.001$; Activados: a $p < 0.001$, b $p < 0.02$, c $p < 0.05$.

seleccionado tres rangos de edades: 25-35 años, 45-55 años y 65-75 años, diferenciando también el sexo.

Como aparece reflejado en la Figura 6, conforme aumenta la edad disminuye la capacidad de los monocitos para producir anión superóxido:

En los hombres los valores obtenidos en el rango de edad de 35-35 años fue de 25.34 ± 1.87 nmol O_2^- /min/mg prot. y en el rango de 65 a 75 años fue de 14.14 ± 1.64 nmol O_2^- /min/mg prot., o sea, se produce una disminución de un 44.5%.

En mujeres los valores obtenidos en el rango de edad de 25 a 35 años fue de 37.87 ± 5.36 nmol O_2^- /min/mg prot. y en el grupo de 65 a 75 años fue de 10.11 ± 2.01 nmol O_2^- /min mg prot., es decir, un porcentaje de disminución del 73%.

Hemos podido observar además que la producción de O_2^- por monocitos humanos muestra una sexo-dependencia pues los valores encontrados en los grupos de 25-35 y 45-55 años de mujeres y hombres son significativamente diferentes. Esta diferencia entre sexos disminuye en el grupo poblacional de mayor edad (65-75 años).

8. Producción de H_2O_2 por macrófagos peritoneales de rata estimulados con PMA:

La disminución observada en función de la edad en los niveles de anión superóxido podrían deberse a la existencia de un mayor porcentaje de dismutación en los macrófagos procedentes de ratas de 12 y 24 meses. Por ello llevamos a cabo experimentos encaminados a determinar los niveles de producción de H_2O_2 inducidos por PMA en macrófagos peritoneales.

Se efectuaron ensayos con incubaciones celulares (durante 15 minutos) midiéndose la cantidad total de H_2O_2 liberada al medio extracelular. Encontramos una progresiva disminución en la capacidad de dichas células para producir este anión en función de la edad (Figura 7). La disminución detectada era de 10.09 ± 0.9 nmol/15 min/mg prot. en animales de 3 meses, a 2.6 ± 0.5 nmol/15min/mg

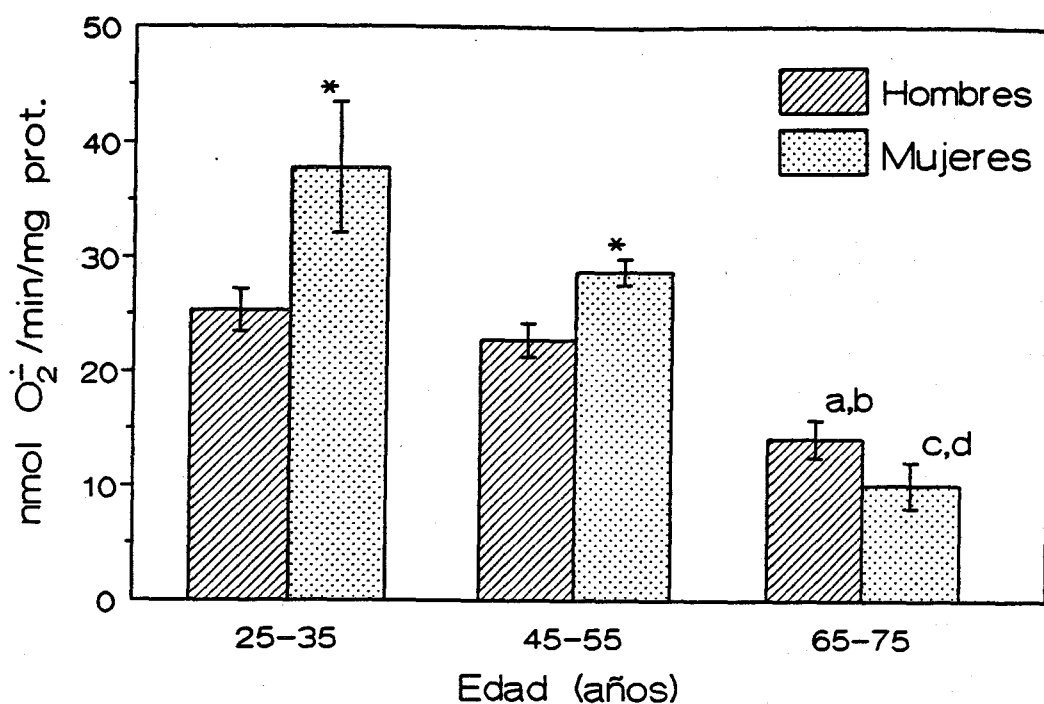


Figura 6: Producción de O₂⁻ por monocitos humanos estimulados con PMA 100 nM, en función de la edad y sexo. Los resultados son la media ± D.E. de al menos cinco experimentos realizados por separado.

Significación estadística: Diferencias entre sexos: * p<0.05
 Diferencias entre grupos de edades: a p<0.05 (diferencia entre mujeres de 25-35 años con mujeres de 65-75 años); b p<0.005 (diferencia entre mujeres de 45-55 años con mujeres de 65-75 años); c p<0.05 (diferencias entre hombres de 25-35 años y hombres de 65-75 años); d p<0.01 (diferencias entre hombres de 45-55 años y hombres de 65-75 años).

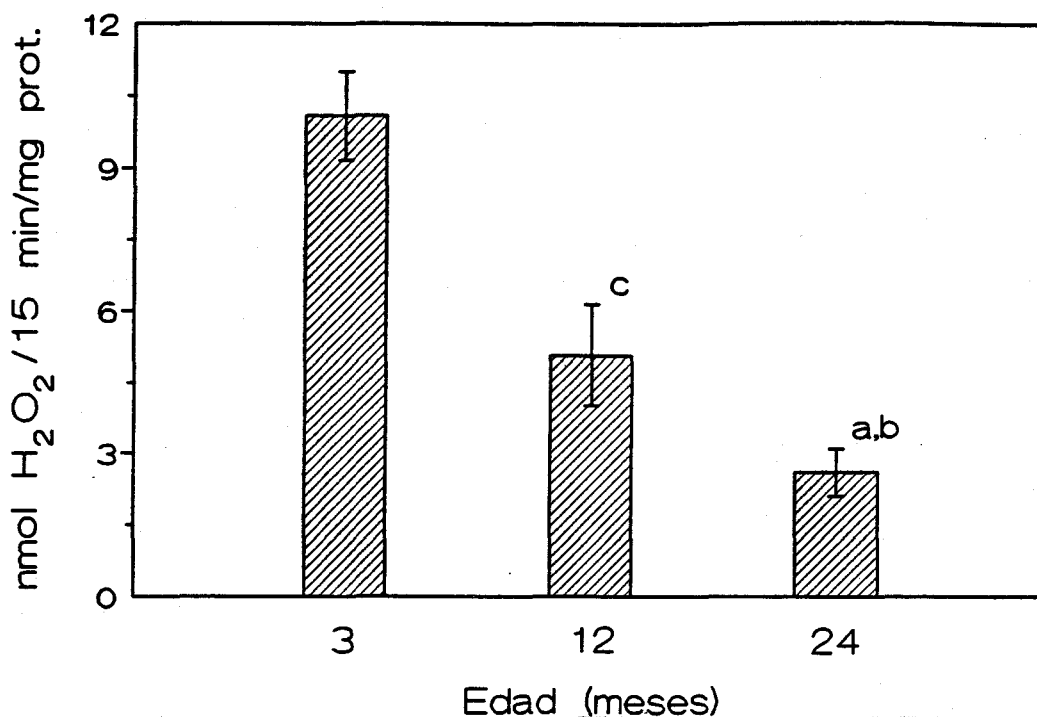


Figura 7: Producción de H₂O₂ por macrófagos peritoneales inducida por PMA 100 nM en ratas de distintas edades. Los resultados son la media \pm D.E. de al menos cinco experimentos realizados por separado.

Significación estadística: a (diferencia entre 24 y 3 meses) $p < 0.001$; b (diferencia entre 24 y 12 meses) $p < 0.005$; c (diferencia entre 12 y 3 meses) $p < 0.001$.

prot. en ratas de 24 meses. Las diferencias encontradas entre las tres edades estudiadas fueron en todos los casos estadísticamente significativas.

9. Actividad NADPH oxidasa en macrófagos peritoneales:

El complejo enzimático implicado en la producción de radicales libres es el de una NADPH oxidasa ligada a la membrana. Se han descrito muchos sistemas enzimáticos cuya actividad se ve afectada con la edad. Por ello cuantificamos la actividad de dicha enzima para comprobar si se veía modificada en función de la edad y así poder encontrar una posible explicación a la disminución observada a lo largo del proceso de envejecimiento en la producción de radicales libres.

Se ensayó la reducción del citocromo c dependiente d NADPH en extractos celulares obtenidos de macrófagos previamente estimulados con PMA. Dicha actividad fue analizada en el sobrenadante postnuclear y como muestra la Figura 8 no se encontraron diferencias entre las distintas edades. Los valores fueron: 3.61 ± 0.41 ; 3.54 ± 0.34 ; 3.73 ± 0.27 nmol O_2^- /min/mg prot. en animales de 3, 12 y 24 meses respectivamente.

10. Producción de NO_2^- por macrófagos peritoneales de rata:

Los macrófagos sintetizan óxido nítrico y citrulina a partir de L-arginina. El NO reacciona rápidamente con el oxígeno molecular generando NO_2 el cual finalmente dará origen a NO_2^- y NO_3^- a través de la hidrólisis de N_2O_3 y N_2O_4 . Es comumente aceptada la cuantificación del óxido nítrico como nitrito acumulado en el medio.

La producción de nitrito se cuantificó en cultivos de macrófagos procedentes de ratas de diferentes edades. Estos estudios se llevaron a cabo con los macrófagos en sus diferentes estados funcionales: residentes (R), inflamados (I) y activados (A).

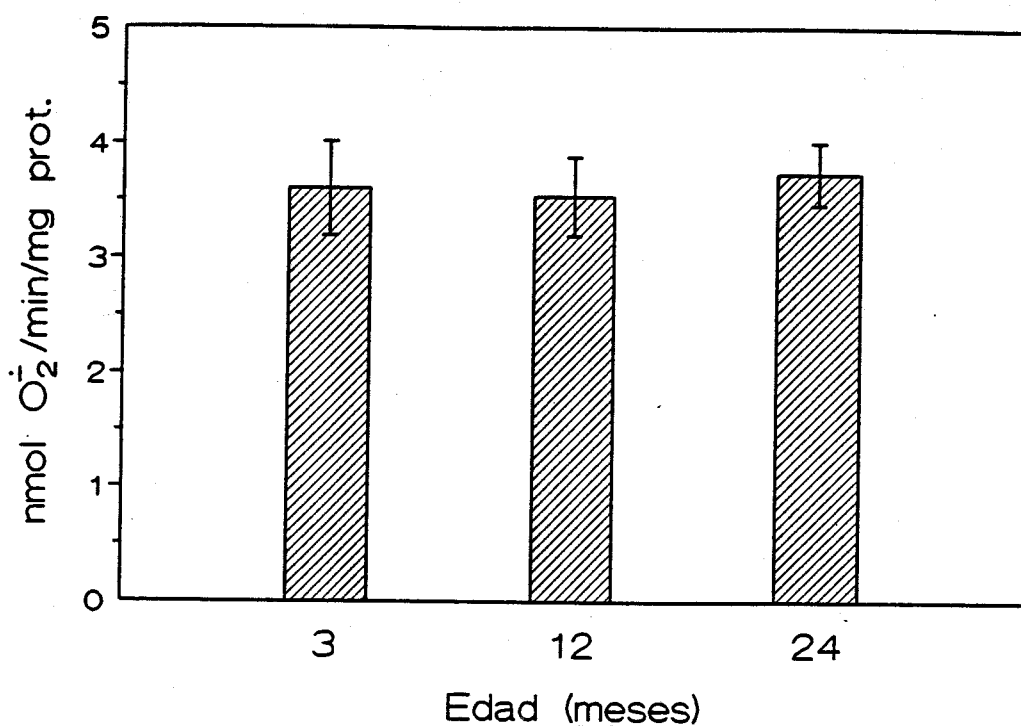


Figura 8: Actividad específica de NADPH oxidasa en macrófagos peritoneales inducida por PMA 100 nM, en ratas de diferentes edades. Los resultados son la media \pm D.E. de al menos cinco experimentos realizados por separado. macrófagos residentes de ratas de 3 meses. Como muestra la Figura 9, existe una diferencia

En los tres tipos de macrófagos, se encontró una progresiva disminución con la edad en la capacidad de producción de NO_2^- . Para las tres edades estudiadas los niveles más altos de formación de nitrito se obtuvieron para macrófagos activados y los más bajos en macrófagos residentes, así por ejemplo, en macrófagos activados de ratas de 3 meses los valores obtenidos fueron de 638.86 ± 52.98 nmol NO_2^-/mg prot. frente a 485.36 ± 23.11 nmol NO_2^-/mg prot. en macrófagos residentes de ratas de 3 meses. Como muestra la Figura 9 existe una diferencia altamente significativa entre los valores obtenidos para 3 y 24 meses en todos los tipos celulares, también es significativa en todos los casos las diferencias entre 3 y 12 meses y existían diferencias, aunque no significativas, entre 12 y 24 meses.

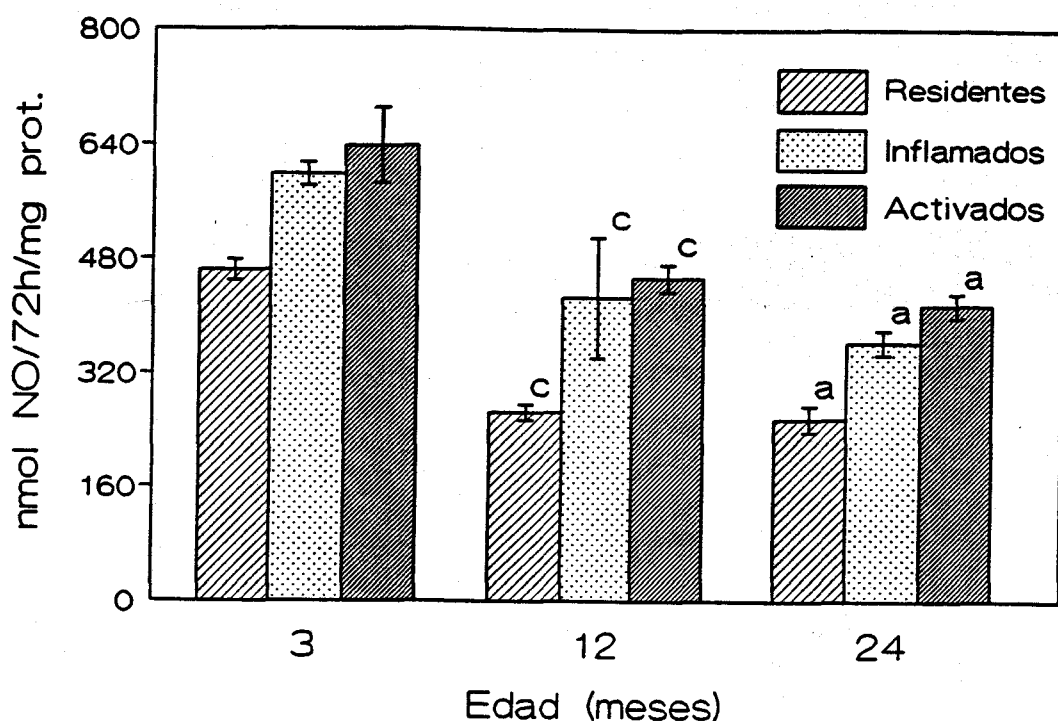


Figura 9: Niveles de producción de NO_2^- por macrófagos peritoneales de ratas de diferentes edades. Los resultados representan la media de al menos tres experimentos realizados por separado.

Significación estadística: a (diferencia entre 24 y 3 meses), b (diferencia entre 24 y 12 meses), c (diferencia entre 12 y 3 meses). Para R (macrófagos residentes): a, $p < 0.003$; b, $p < 0.001$; c, $p < 0.001$. Para E (macrófagos elicited): a, $p < 0.001$; c, $p < 0.01$. Para A (macrófagos activados): a, $p < 0.002$; c, $p < 0.005$.

11. Ruta de las pentosas fosfato en macrófagos peritoneales de rata:

11.1 Cuantificación de la actividades enzimáticas de la G6P-DH y 6PG-DH:

El NADPH necesario para la formación de radicales libres de nitrógeno o de oxígeno, es suministrado por la vía de las pentosas fosfato. Los macrófagos presentan una importante actividad de esta vía (Newsholme y col., 1987).

Se cuantificaron las actividades de las dos enzimas más importantes del ciclo de las pentosas fosfato: la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6P-DH) y la 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PG-DH), las cuales suministran el NADPH requerido para la actividad oxidasa.

La actividad de la *glucosa 6-fosfato deshidrogenasa* fue investigada en relación con la edad y como muestra la Figura 10 su actividad en ratas de 24 meses era aproximadamente un 70% más baja que la obtenida en animales de 3 meses. El valor obtenido para 12 meses era significativamente diferente al de 3 meses (había una disminución del 56%) y entre 12 y 24 meses también existían diferencias significativas aunque no tan pronunciadas, aproximadamente del 30%.

La actividad de la *6-fosfogluconato deshidrogenasa* presentaba un comportamiento similar (Figura 11). Los valores eran: 95.36 ± 4.12 ; 49.96 ± 1.07 ; 36.3 ± 6.75 nmol/min/mg prot. en ratas de 3, 12 y 24 meses respectivamente. Estos resultados muestran que se produce sobre un 60% de pérdida en la actividad de esta enzima con el envejecimiento.

11.2 Flujo de las pentosas fosfato:

Los macrófagos eran incubados a 37°C durante 3 horas en presencia de glucosa a una concentración inicial de 10 mM. Una progresiva y significativa disminución en la capacidad de utilización de la glucosa por los macrófagos fue detectada en función de la edad: desde 4.01 ± 0.736 nmol $^{14}\text{C}\text{O}_2$ /mg prot. en

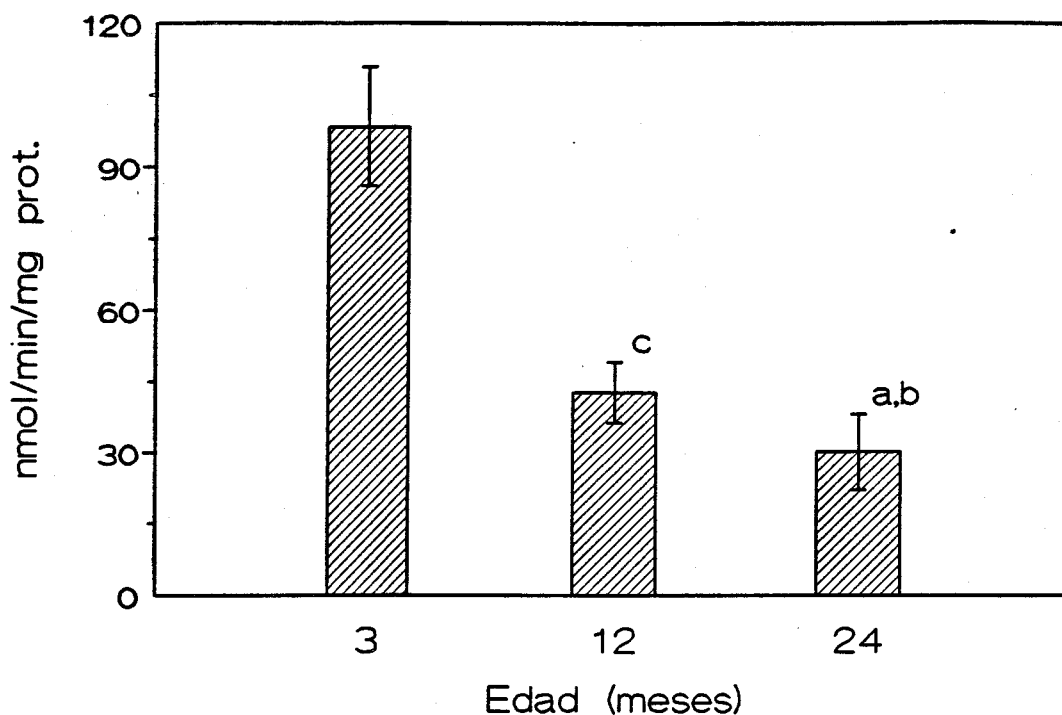


Figura 10: Actividad específica de Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa en macrófagos peritoneales de ratas de diferentes edades. Los resultados son la media \pm D.E. de al menos cinco experimentos realizados por separado.

Significación estadística: a (diferencia entre 24 y 3 meses) $p < 0.001$, b (diferencia entre 24 y 12 meses) $p < 0.05$, c (diferencia entre 12 y 3 meses) $p < 0.001$. para B: a ($p < 0.001$), b ($p < 0.003$), c ($p < 0.01$).

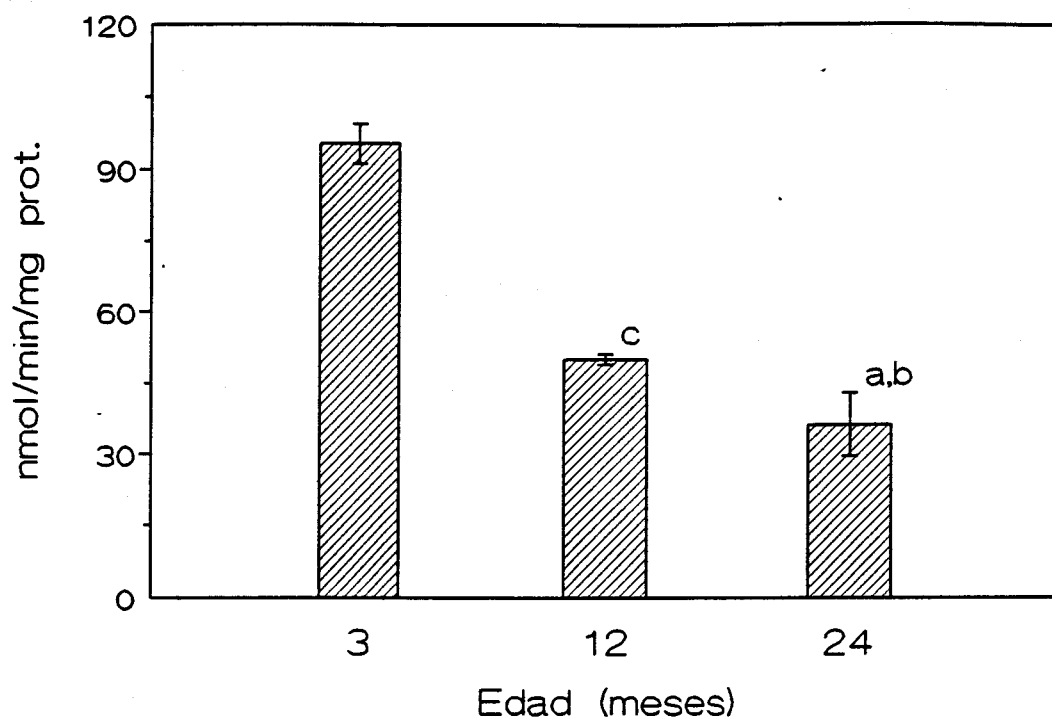


Figura 11: Actividad específica de 6-fosfogluconato deshidrogenasa en macrófagos peritoneales de ratas de diferentes edades. Los resultados son la media \pm D.E. de al menos cinco experimentos realizados por separado.

Significación estadística: a (diferencia entre 24 y 3 meses) $p < 0.001$, b (diferencia entre 24 y 12 meses) $p < 0.003$, c (diferencia entre 12 y 3 meses) $p < 0.01$.

ratas de 3 meses a 1.447 ± 0.217 en ratas de 24 meses. Estos valores se veían considerablemente aumentados cuando los macrófagos eran incubados con PMA a una concentración final de $1 \mu\text{g/ml}$. Por ejemplo, en animales de 3 meses se pasaba de $4.01 \pm 0.736 \text{ nmol } ^{14}\text{CO}_2/\text{mg prot.}$ a $10.550 \pm 1.882 \text{ nmol } ^{14}\text{CO}_2/\text{mg prot.}$ cuando los macrófagos eran estimulados (Figura 12).

Para llevar a cabo este experimento se hizo uso de ^{14}C marcado en el C1 y el C6. El C1 nos da idea de la glucosa que se metaboliza a través de la glucólisis, del ciclo de las pentosas fosfato y el ciclo de Krebs. El C6 nos indica la cantidad de glucosa que se metaboliza por la glucólisis y el ciclo de Krebs.

11.3 Medida de los niveles de NADP y NADPH:

La formación de O_2^- al igual que la de NO requiere la presencia de NADPH como poder reductor. Estudiamos las posibles variaciones con la edad en la concentraciones de ambos nucleótidos en macrófagos controles y macrófagos estimulados con PMA.

En macrófagos peritoneales no estimulados, los niveles de NADPH disminuían con la edad. Una significativa disminución fue detectada entre animales de 3 y 12 meses y sin embargo las diferencias detectadas entre 12 y 24 meses no eran significativas. En cuanto a los niveles de NADP, estos eran más altos en animales viejos que en adultos y jóvenes. La razón NADPH/NADP disminuía de $1.6 \pm 0.05 \text{ nmol/mg prot.}$ en 3 meses a, $1.22 \pm 0.05 \text{ nmol/mg prot.}$ en animales de 24 meses.

En macrófagos estimulados con PMA, la razón NADPH/NADP era más baja en todas las edades que en los controles. Este hecho es debido a que el NADPH es consumido en el ER. Luego los niveles de NADPH disminuyen con la edad, los niveles de NADP aumentan y consecuentemente se obtenía un significativa disminución de la razón NADPH/NADP con la edad en las tres grupos estudiados (Tabla IV).

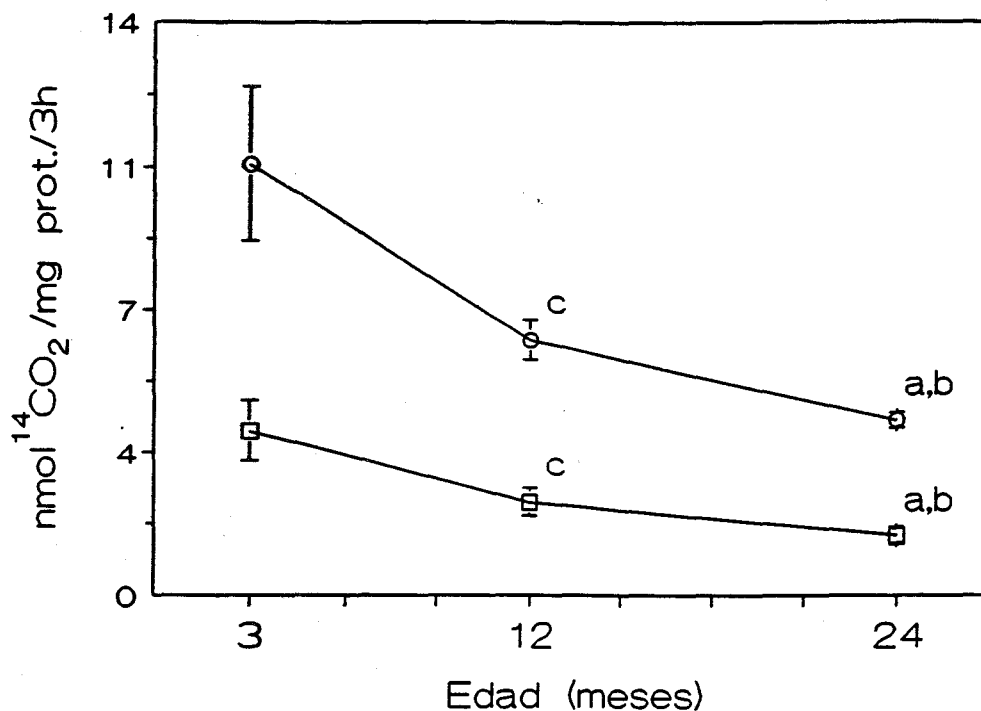


Figura 12: Niveles de utilización de glucosa por macrófagos peritoneales, controles (□) y estimulados por PMA (○), de diferentes edades. Los macrófagos fueron incubados a 37°C durante 3 horas. Los resultados representan la media ± D.E. de al menos cinco experimentos realizados por separado.

Significación estadística: a (diferencia entre 24 y 3 meses), $p < 0.001$; b (diferencia entre 24 y 12 meses) $p < 0.02$; c (diferencia entre 12 y 3 meses), $p < 0.01$.

TABLA IV

CONCENTRACIONES DE NADPH Y NADP EN MACROFAGOS PERITONEALES CONTROLES Y EN ESTIMULADOS POR PMA

Adición a las células		3 meses	12 meses	24 meses
Nada	NADPH	2.50 ± 0.07	2.18 ± 0.17 c	2.09 ± 0.09 a
	NADP	1.56 ± 0.05	1.69 ± 0.06 c	1.71 ± 0.01 a
	NADPH/NADP	1.60 ± 0.05	1.29 ± 0.09 c	1.22 ± 0.05 a
PMA 100 nM	NADPH	1.65 ± 0.12	1.44 ± 0.05 c	1.34 ± 0.06 a
	NADP	2.22 ± 0.11	2.52 ± 0.15 c	2.69 ± 0.09 a
	NADPH/NADP	0.74 ± 0.09	0.57 ± 0.02 c	0.49 ± 0.03 a,b

Los valores representan la media ± D.E. de al menos cinco experimentos realizados por separado.

Significación estadística: a (diferencia entre 24 y 3 meses) $p < 0.025$, b (diferencia entre 24 y 12 meses) $p < 0.025$, c (diferencia entre 12 y 3 meses) $p < 0.05$.

11.4 Cuantificación de la actividad de la enzima málica:

Otra posible fuente de formación del NADPH requerido para la formación de radicales de oxígeno y nitrógeno, es a través de la actividad de la enzima málica (Rushe y col., 1992).

En la Figura 13, se muestra la actividad de la enzima málica en función de la edad. Los resultados obtenidos ponen de manifiesto una progresiva disminución en la actividad de dicha enzima con la edad, así: la actividad en animales de 24 meses era aproximadamente un 60% más baja que en ratas de 3 meses, los valores obtenidos en 12 meses fueron también significativamente diferentes de los de 3 meses existiendo un descenso del 27% y entre 12 y 24 meses también existía una fuerte disminución del 46%.

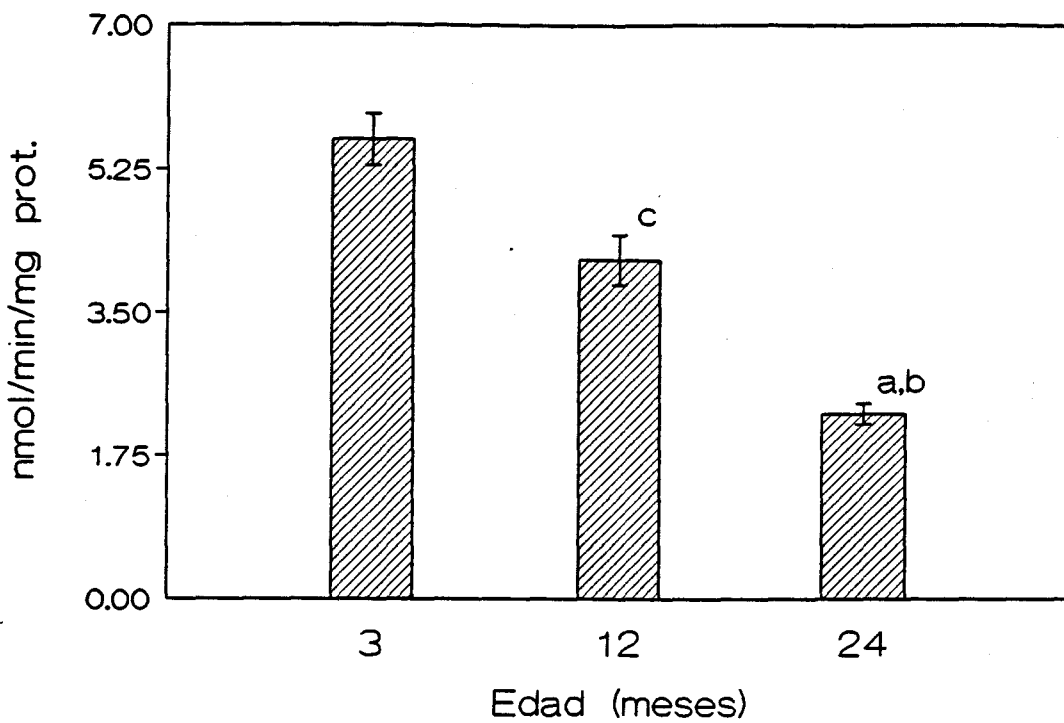


Figura 13: Actividad específica de la enzima Málica en macrófagos peritoneales de ratas de diferentes edades. Los resultados representan la media \pm D.E. de al menos cinco experimentos realizados por separado.

Significación estadística: a (diferencia entre 24 y 3 meses) $p < 0.001$; b (diferencia entre 24 y 12 meses) $p < 0.001$; c (diferencia entre 12 y 3 meses) $p < 0.001$.

12. Estudio del transporte de glucosa y efecto de diferentes concentraciones de glucosa sobre la producción de anión superóxido

12.1 Transporte y acumulación de glucosa en macrófagos peritoneales de rata:

El ciclo de las pentosas fosfato está íntimamente relacionado con el transporte de glucosa. La formación de NADPH a través de este ciclo depende directamente del suplemento de glucosa al mismo.

En el estudio de transporte y acumulación de glucosa en macrófagos peritoneales de rata, se obtenía una progresiva acumulación de glucosa que era lineal sobre los primeros 60 minutos (Figura 14) y difería según la edad de los animales, siendo similar la cinética de acumulación de dicho sustrato en animales de 12 y 24 meses y superior en animales de 3 meses.

Así al cabo de las 3 horas, la cantidad de glucosa acumulada en los macrófagos disminuía de forma significativa en los animales viejos con respecto a los jóvenes: de 9.543 ± 0.646 nmol $^{14}\text{CO}_2/\text{mg prot.}$ en ratas de 3 meses a 6.263 ± 1.668 nmol $^{14}\text{CO}_2/\text{mg prot.}$ en ratas de 24 meses (Figura 15).

12.2 Efecto de la concentración de glucosa en los niveles de producción de O_2^- por macrófagos peritoneales de rata:

Como hemos señalado anteriormente, la formación de NADPH a través de la vía de las pentosas fosfato depende directamente de la aportación de glucosa a dicha vía.

En la Figura 16, se muestra que la formación de O_2^- es dependiente de la concentración de glucosa existente en el medio. Si las células se incubaban en ausencia de glucosa se producía una inhibición total de la liberación de O_2^- .

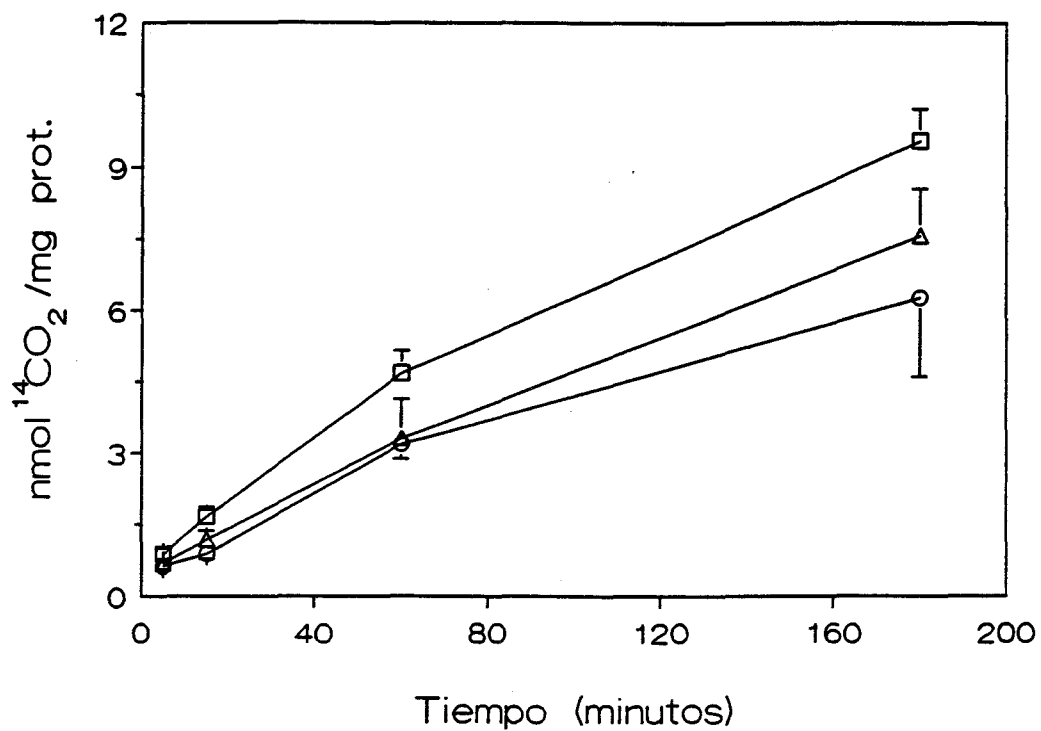


Figura 14: Transporte y acumulación de glucosa en macrófagos peritoneales de ratas, en función del tiempo. Los resultados representan la media \pm D.E. de al menos tres experimentos realizados por separado.

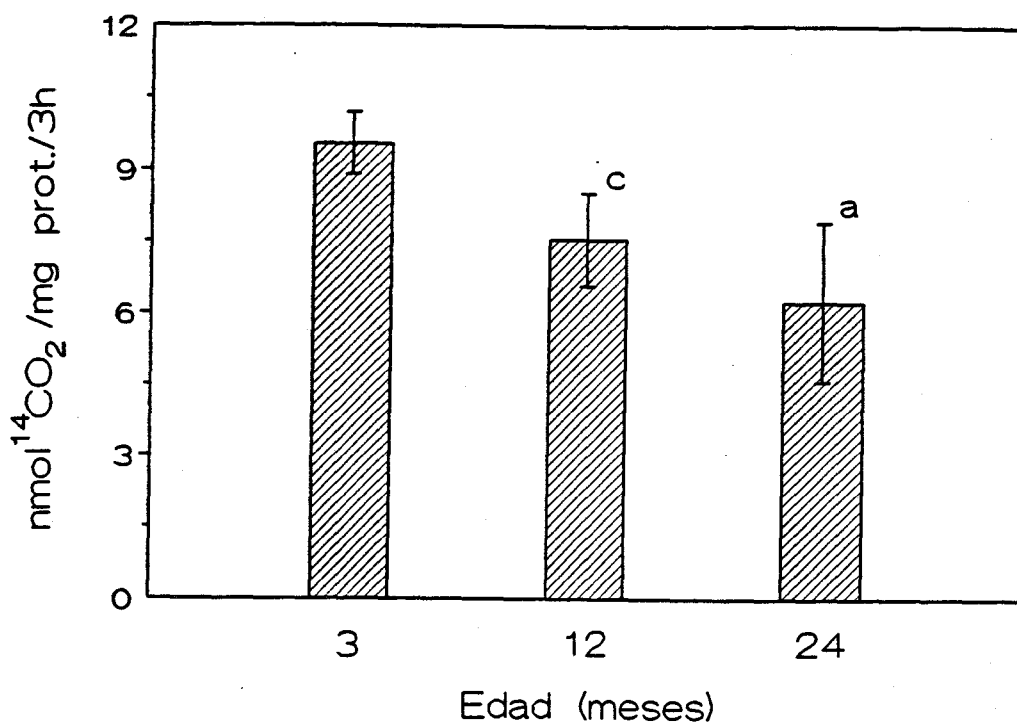


Figura 15: Transporte y acumulación de glucosa en macrófagos peritoneales de ratas, al cabo de 3 horas. Los resultados representan la media \pm D.E. de al menos tres experimentos realizados por separado.

Significación estadística: a (diferencia entre 24 y 3 meses), $p < 0.002$; c (diferencia entre 12 y 3 meses), $p < 0.003$.

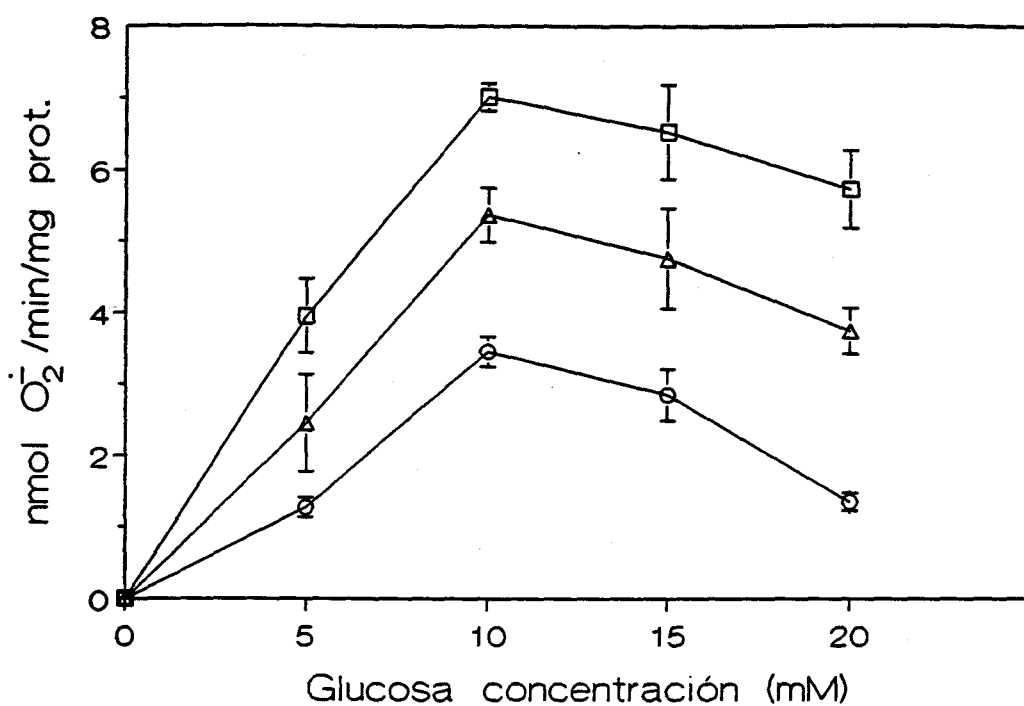


Figura 16: Producción de O_2^- por macrófagos peritoneales de ratas inducida por PMA 100 nM e incubados con distintas concentraciones de glucosa. Los resultados representan la media \pm D.E. de tres experimentos realizados por separado.

Atendiendo a los resultados obtenidos en las distintas edades, se deduce que existe una progresiva disminución en la capacidad de los macrófagos para producir dicho anión en función de la edad (como se indicó anteriormente).

El comportamiento en la producción de anión superóxido en relación a la concentración de glucosa existente en el medio, es análogo para las tres edades obteniéndose los mayores niveles de O_2^- cuando se empleaba glucosa 10 mM. El uso de concentraciones de glucosa superiores a ésta, originaba un descenso significativo en la producción de dicho anión.

Por otro lado, estos resultados ponen de manifiesto que el aumento de los niveles de glucosa no mejoraba la disminución detectada en el ER en animales de 12 y 24 meses.

13. Estudio de la actividades de enzimas destoxificantes en macrófagos peritoneales de rata:

Con el nombre de enzimas destoxificantes hacemos referencia a aquellas enzimas encargadas de la eliminación de los intermediarios de la reducción del oxígeno. Las enzimas estudiadas fueron: el sistema glutatión reductasa-glutatión peroxidasa, superóxido dismutasa y catalasa.

Los efectos detectados en la actividad de la enzima *glutatión reductasa* en función de la edad, se muestran en la Figura 17. Esta enzima está implicada en el mantenimiento del glutatión en su estado reducido y posiblemente controla el estado redox del NADP en los tejidos, si el GSSG está disponible. Su actividad decrece aproximadamente un 40% entre 3 y 12 meses y sólo una ligera, pero no significativa, disminución se detectó entre 12 y 24 meses.

Las actividades específicas de la *glutatión peroxidasa* (Figura 18) y *CuZn superóxido dismutasa* (Figura 19), también se analizaron en función de la edad no encontrándose variaciones significativas en dichas actividades.

La actividad de la *catalasa* enzima que cataliza la descomposición del peróxido de hidrógeno, mostraba una disminución significativa en función de la edad. Los valores obtenidos fueron: 76.14 ± 4.63 ; 57.81 ± 7.32 ; 51.81 ± 2.23 nmol/min/mg prot. en 3, 12 y 24 meses respectivamente (Figura 20).

14. Flujo glucolítico en macrófagos peritoneales de rata:

14.1 Actividades de enzimas glucolíticas:

Los macrófagos son células con altas tasas de utilización de glucosa convirtiéndola mayoritariamente en lactato, a través de la vía glucolítica. Por ello analizamos la actividad de varias enzimas implicadas en dicha vía, en relación con la edad.

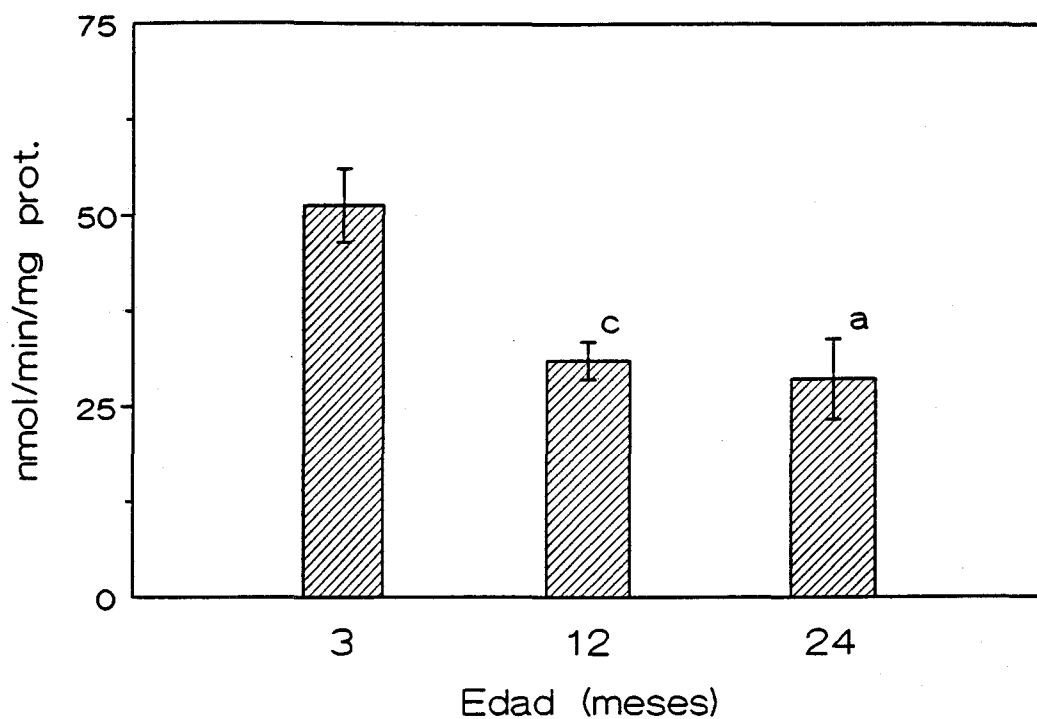


Figura 17: Actividad específica de Glutathione reductasa en macrófagos peritoneales de ratas de diferentes edades. Los resultados son la media \pm D.E. de al menos cinco experimentos realizados por separado.

Significación estadística : a (diferencia entre 24 y 3 meses) $p < 0.001$, c (diferencia entre 12 y 3 meses) $p < 0.001$.

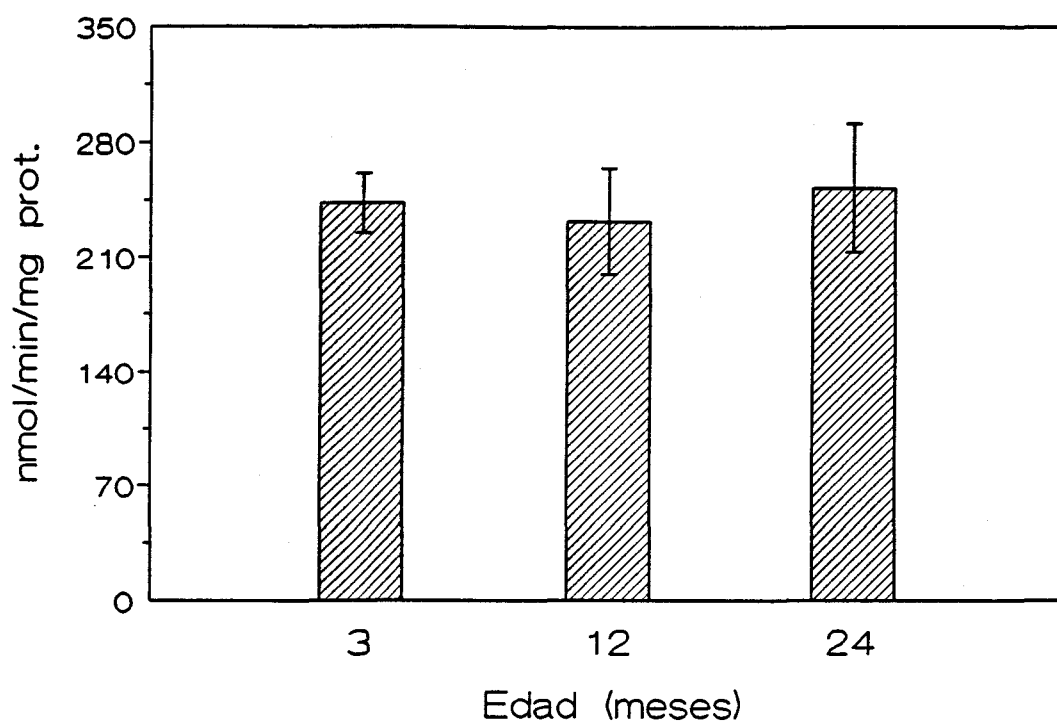


Figura 18: Actividad específica de Glutathione peroxidasa en macrófagos peritoneales de ratas de diferentes edades. Los resultados son la media \pm D.E. de al menos cinco experimentos realizados por separado.

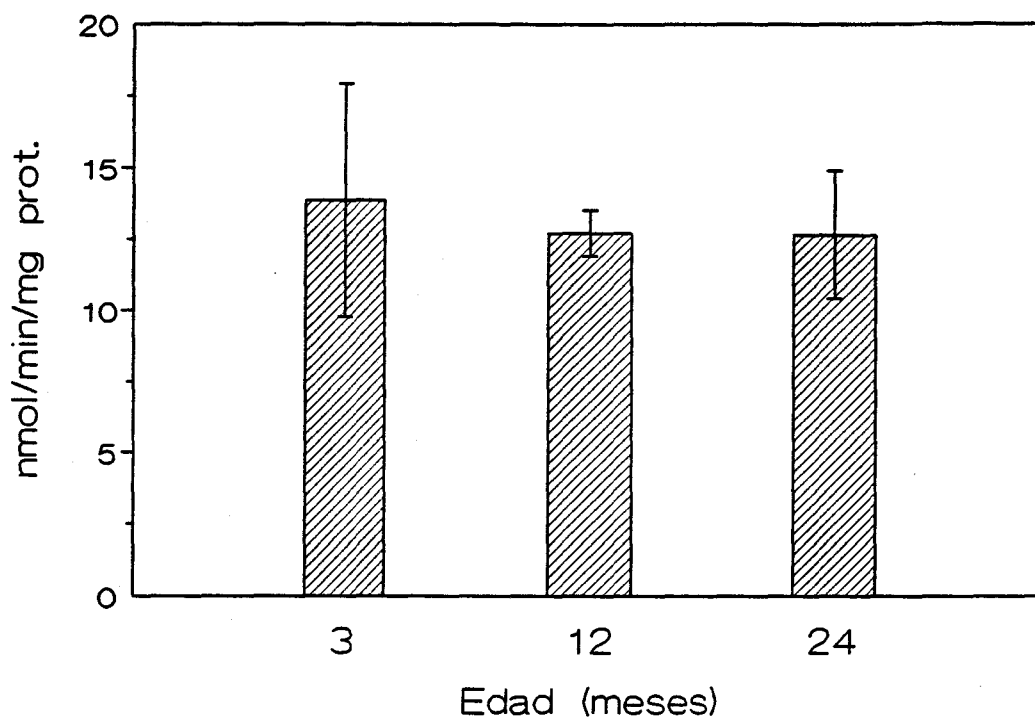


Figura 19: Actividad específica de Cu/Zn Superóxido dismutasa en macrófagos peritoneales de ratas de diferentes edades. Los resultados son la media \pm D.E. de al menos cinco experimentos realizados por separado.

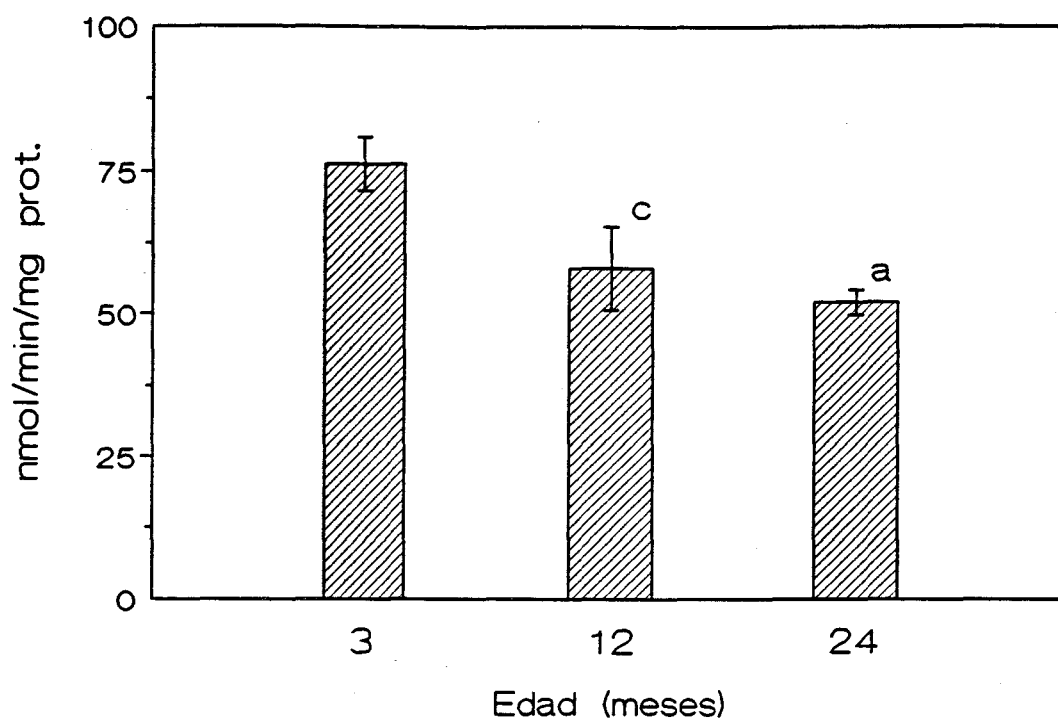


Figura 20: Actividad específica de Catalasa en macrófagos peritoneales de ratas de diferentes edades. Los resultados son la media \pm D.E. de al menos cinco experimentos realizados por separado.

Significación estadística : a (diferencia entre 24 y 3 meses) $p < 0.001$, c (diferencia entre 12 y 3 meses) $p < 0.002$.

En el análisis de tres enzimas implicadas en la vía glucolítica: hexoquinasa, piruvato quinasa y láctico deshidrogenasa, en todos los casos se observaba un fuerte descenso de la actividad con la edad.

En el caso de la *hexoquinasa* (Figura 21), había una disminución de un 60% entre los valores obtenidos en 3 y 12 meses y un ligero incremento aunque no significativo se detectó entre 12 y 24 meses.

La actividad de la *piruvato quinasa* presentaba un comportamiento análogo (Figura 22), existía un descenso de un 40% entre 3 y 12 meses y sin embargo no se observaron diferencias significativas en macrófagos de ratas maduras y viejas (32.28 ± 4.07 nmol/min/mg prot. y 30.62 ± 5.05 nmol/min/mg prot. en ratas de 12 y 24 meses respectivamente).

La actividad de la enzima *láctico deshidrogenasa* mostraba un perfil en función de la edad, similar al de hexoquinasa y al de piruvato quinasa. Como puede verse en la Figura 23, la actividad en animales de 12 meses era un 42% menor que en animales jóvenes, sin embargo no se detectaron diferencias significativas entre 12 y 24 meses.

14.2 Actividades de enzimas del ciclo de Krebs:

De las enzimas que participan en el ciclo Krebs, la enzima estudiada fue la *citrato sintasa*. El estudio de la actividad de dicha enzima en macrófagos peritoneales de rata presentaba una progresiva disminución de su actividad con la edad. Los valores eran: 41.86 ± 1.41 nmol/min/mg prot. en animales de 3 meses, 32.22 ± 1.83 nmol/min/mg prot. en 12 meses y 22.84 ± 2.80 nmol/min/mg prot. en ratas de 24 meses. Estos resultados muestran que existe una pérdida de actividad citrato sintasa del 46% con el proceso de envejecimiento (Figura 24).

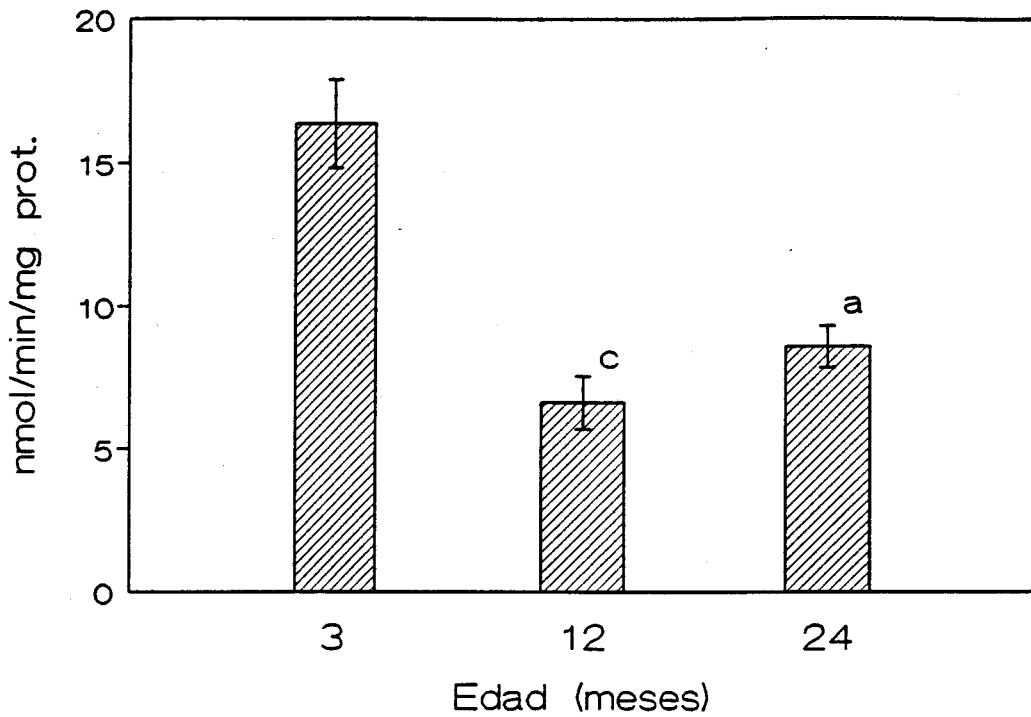


Figura 21: Actividad específica de hexoquinasa en macrófagos peritoneales de rata de diferentes edades. Los resultados son la media \pm D.E de al menos cinco experimentos realizados por separado.

Significación estadística: a (diferencia entre 24 y 3 meses) $p < 0.001$; c (diferencia entre 12 y 3 meses) $p < 0.001$.

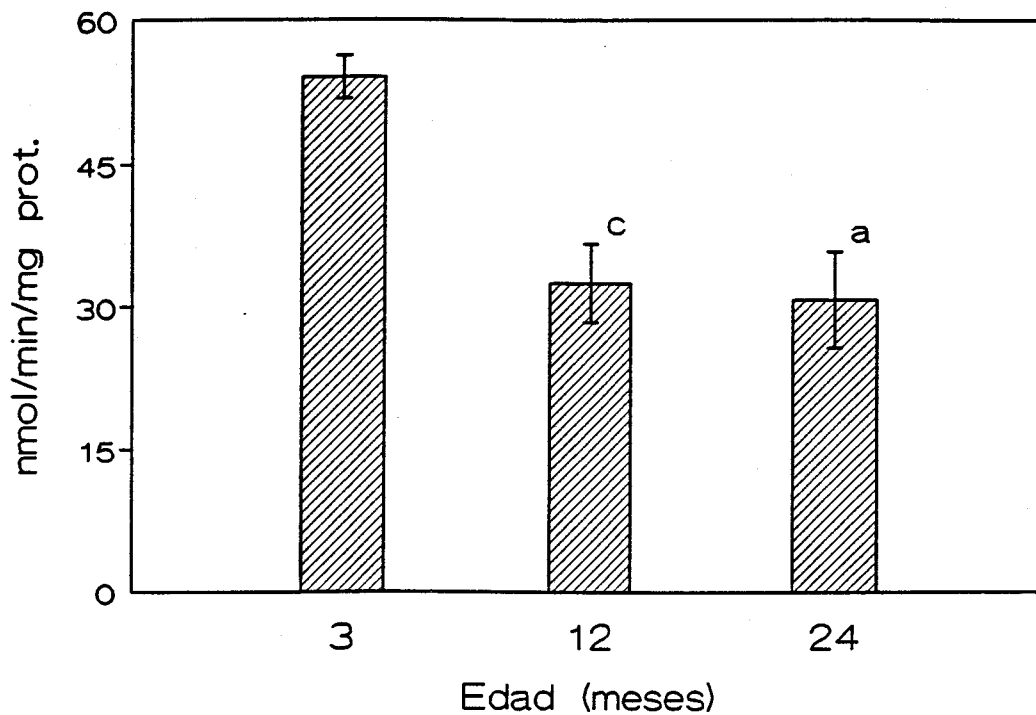


Figura 22: Actividad específica de Piruvato quinasa en macrófagos peritoneales de ratas de diferentes edades. Los resultados representan la media \pm D.E. de al menos cinco experimentos realizados por separado.

Significación estadística: a (diferencia entre 24 y 3 meses) $p < 0.001$; c (diferencia entre 12 y 3 meses) $p < 0.001$.

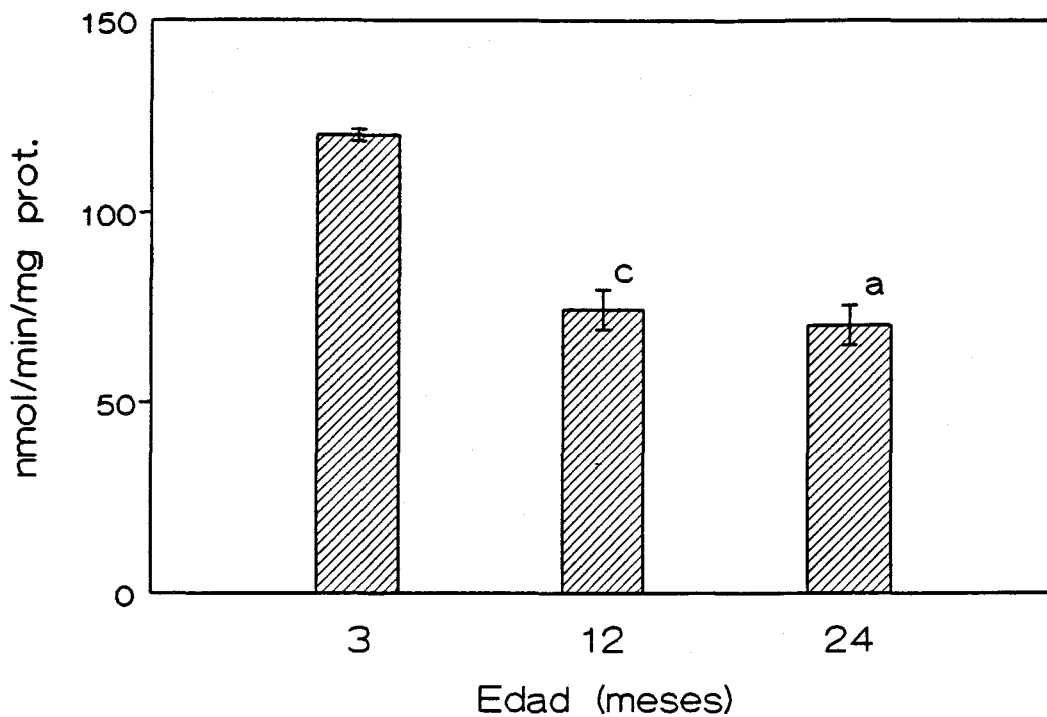


Figura 23: Actividad específica de la enzima Láctico deshidrogenasa en macrófagos peritoneales de ratas de diferentes edades. Los resultados representan la media \pm D.E. de al menos cinco experimentos realizados por separado.

Significación estadística: a (diferencia entre 24 y 3 meses) $p < 0.001$; c (diferencia entre 12 y 3 meses) $p < 0.001$.

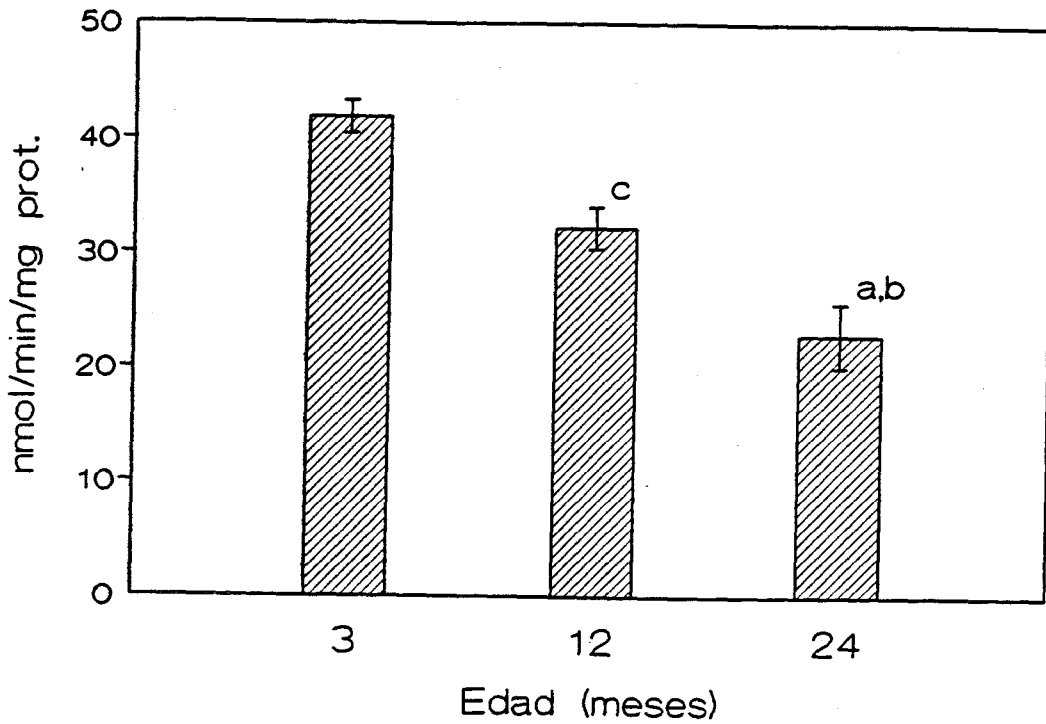


Figura 24: Actividad específica de Citrato sintasa en macrófagos peritoneales de ratas de diferentes edades. Los resultados representan la media \pm D.E. de al menos cinco experimentos realizados por separado.

Significación estadística: a (diferencia entre 24 y 3 meses) $p < 0.001$; b (diferencia entre 24 y 12 meses) $p < 0.001$; c (diferencia entre 12 y 3 meses) $p < 0.001$.

14.3 Cuantificación de los niveles de lactato:

Los macrófagos degradan activamente la glucosa convirtiéndola en lactato y sólo una pequeña parte de la misma es oxidada. Por otro lado, el piruvato derivado de la glucosa o de la glutamina, es oxidado en baja proporción debido en parte a la competencia por dicho sustrato llevada a cabo por la enzima láctico deshidrogenasa cuya actividad es muy superior a la de la piruvato deshidrogenasa.

La Figura 25 muestra los niveles de lactato secretados por macrófagos de ratas de diferentes edades. Según estos resultados se produce una disminución en la capacidad de los macrófagos para secretar lactato con la edad, produciéndose un descenso de aproximadamente de un 20% entre animales de 3 y 12 meses y sin embargo no se observaban diferencias significativas en los valores obtenidos para 12 y 24 meses.

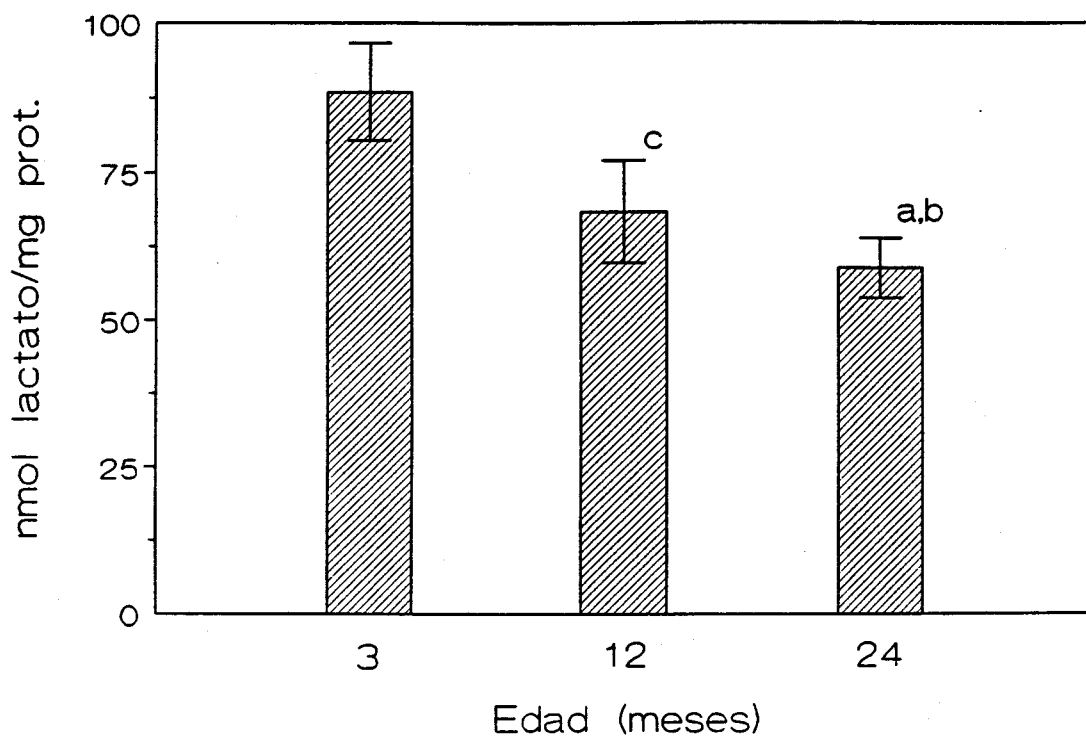


Figura 25: Niveles de secreción de lactato por macrófagos peritoneales de ratas de diferentes edades. Los resultados son la media \pm D.E. de al menos cinco experimentos realizados por separado.

Significación estadística : a (diferencia entre 24 y 3 meses) $p < 0.02$, c (diferencia entre 12 y 3 meses) $p < 0.05$.

15. **Fluidez de membrana de macrófagos peritoneales de rata:**

La fluidez de membrana viene determinada por la composición lipídica: tipo o clase de lípidos, longitud de las cadenas de ácidos grasos y grado de saturación de dichos ácidos grasos. Luego, modificaciones del contenido lipídico de la membrana, afectarán a la fluidez de la misma.

Existía un incremento altamente significativo en los valores de polarización de fluorescencia (p) entre las edades estudiadas a 25°C y 37°C (Tabla V). Los valores de anisotropía de fluorescencia obtenidos en preparaciones de ratas de 24 meses también muestran un incremento significativo en relación a los obtenidos en ratas de 3 meses. Los niveles obtenidos para animales de 12 meses fueron intermedios, y estadísticamente significativos, entre 3 y 24 meses.

Pottel y col. (1983) establecieron una relación empírica entre la anisotropía de fluorescencia (r_s) y la anisotropía de fluorescencia límite (r_{∞}). A partir de esta relación deducían el parámetro de orden lipídico (SDPH), inverso de la fluidez. Los valores de este parámetro también presentan un incremento significativo con la edad, poniendo de manifiesto la existencia de una disminución de la fluidez de membrana en ratas de 12 y 24 meses.

Varios criterios fueron usados para evaluar si el envejecimiento afectaba al marcaje de las membranas de los macrófagos peritoneales con DPH. Estos incluyen:

- El efecto de la edad del animal en el espectro de emisión y excitación de las membranas marcadas con DPH (Figura 26). No se observaron diferencias significativas entre los espectros de emisión obtenidos a partir de membranas procedentes de animales de las tres edades estudiadas, observándose en todos los casos un pico máximo de emisión a 430 nm.
- La razón de incorporación del DPH a las membranas: tras un periodo de incubación de unos cuarenta y cinco minutos, en todos los casos observamos una total incorporación del DPH a las membranas, sin embargo, se detectaron diferencias en el ritmo de incorporación del mismo (Figura 27).

TABLE V

POLARIZACION DE FLUORESCENCIA EN ESTADO ESTACIONARIO
ANISOTROPIA DE FLUORESCENCIA Y PARAMETRO DE ORDEN
LIPIDICO DE MACROFAGOS PERITONEALES DE RATAS.

		EDAD		
		3 meses	12 meses	24 meses
P_{DPH}^1	(25°C)	0.282 ± 0.003	0.290 ± 0.005 ^c	0.299 ± 0.008 ^{a,b}
	(37°C)	0.220 ± 0.006	0.230 ± 0.002 ^c	0.234 ± 0.003 ^{a,b}
r_s^2	(25°C)	0.207 ± 0.003	0.213 ± 0.005 ^c	0.222 ± 0.006 ^{a,b}
	(37°C)	0.158 ± 0.004	0.166 ± 0.002 ^c	0.169 ± 0.002 ^{a,b}
r_∞^3	(25°C)	0.165 ± 0.004	0.174 ± 0.006 ^c	0.185 ± 0.007 ^{a,b}
	(37°C)	0.102 ± 0.006	0.111 ± 0.003 ^c	0.115 ± 0.003 ^{a,b}
S_{DPH}^4	(25°C)	0.638 ± 0.007	0.656 ± 0.012 ^c	0.676 ± 0.014 ^{a,b}
	(37°C)	0.495 ± 0.015	0.522 ± 0.007 ^c	0.531 ± 0.008 ^{a,b}

Los valores representan la media ± D.E. de, al menos, cinco experimentos realizados por separado.

¹ Polarización de fluorescencia (P_{DPH}) = $(I_{VV} - I_{VHG}) / (I_{VV} + I_{VHG})$.

² Anisotropía de fluorescencia (r_s) = $2P / (3 - P)$.nb

³ Anisotropía de fluorescencia límite (r_∞) = $4/3 r_s - 0.10$
(donde $0.13 < r_s < 0.28$).

⁴ Parámetro de orden lipídico (S_{DPH}) = $(r_\infty/r_0)^{1/2}$ (donde $r_0 = 0.4$).

Significación estadística: a (diferencia entre 24 y 3 meses) $p < 0.001$; b (diferencia entre 24 y 12 meses) $p < 0.05$; c (diferencia entre 12 y 3 meses) $p < 0.005$.

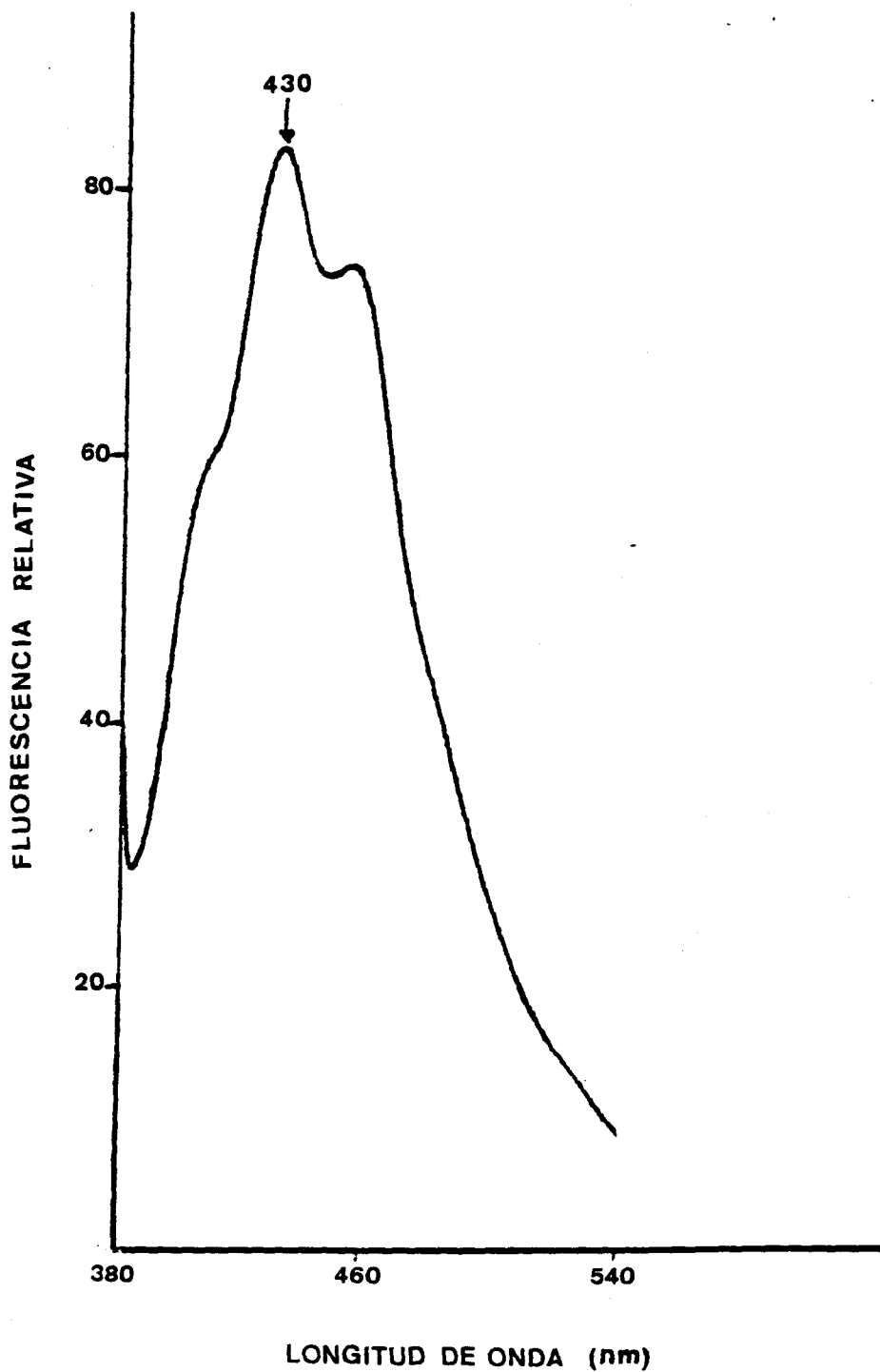


Figura 26: Típico espectro de emisión de fluorescencia de membranas de macrófagos peritoneales marcadas con DPH. La excitación era llevada a cabo a 365 nm y la apertura de rendija de excitación y emisión era de 12 y 8 nm respectivamente. La intensidad de emisión está dada en unidades relativas.

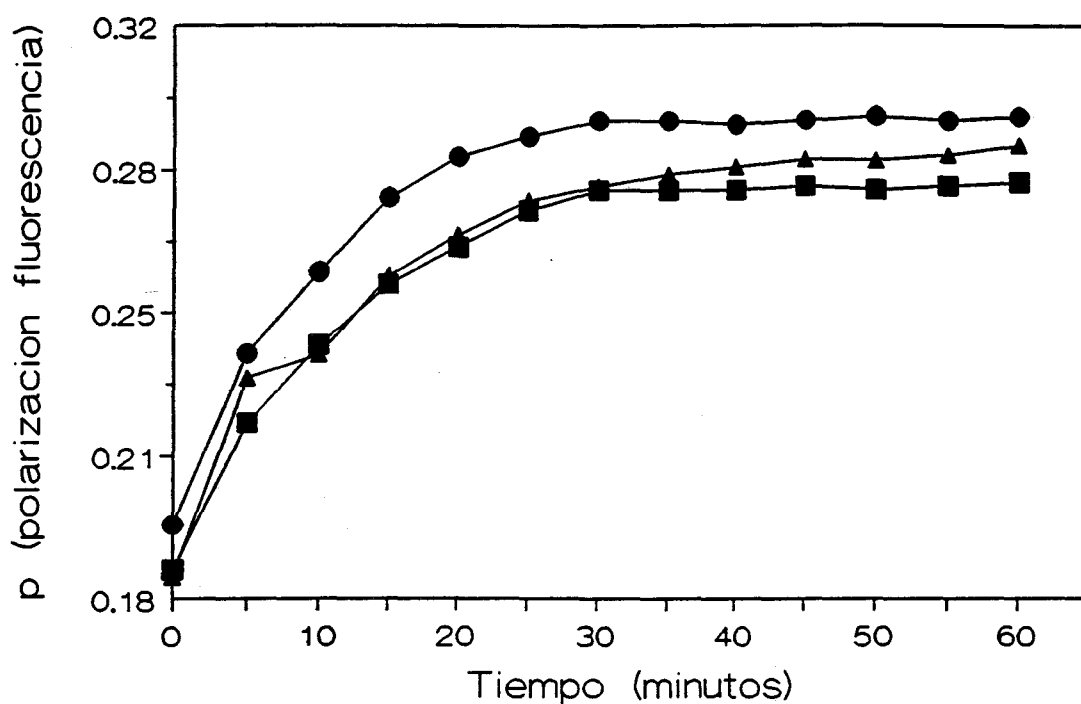


Figura 27: Efecto del tiempo de incubación sobre la polarización de fluorescencia de membranas de macrófagos peritoneales marcadas con DPH. Las membranas de macrófagos se aislaron a partir de animales jóvenes de 3 meses (□), maduros (Δ) y viejos de 24 meses (○). Las medidas se realizaron a 25°C.

16. Composición lipídica de membranas de macrófagos peritoneales de rata:

El efecto de la edad en el contenido en fosfolípidos y colesterol libre se muestra en la Tabla VI. Aunque el colesterol libre muestra un incremento significativo con la edad, también se produce una disminución significativa de los niveles fosfolipídicos. Los niveles de colesterol aumentaban de un porcentaje del 1.45% en animales de 3 meses a 2.15% en animales de 24 meses. Por el contrario, el contenido en fosfolípidos descendía de un 98.62% en animales jóvenes a un 97.84% en animales viejos. Estos resultados conducían a un incremento de la razón molar colesterol/fosfolípidos con la edad. En animales de 12 meses se obtuvieron valores intermedios no encontrándose diferencias significativas con respecto a 3 meses, pero sin embargo tanto el contenido fosfolipídico como los niveles de colesterol fueron significativamente distintos a los detectados en 24 meses.

Para determinar si la composición fosfolipídica se veía modificada con la edad, se cuantificaron los niveles de los fosfolípidos mayoritarios en las distintas edades (Tabla VII). Algunos fosfolípidos aumentaban con la edad: el cambio más significativo fue un aumento de lisofosfatidilcolina en ratas de 24 meses (aproximadamente un 190%), fosfatidilserina y cardiopina aumentaban un 102% en animales de 12 y 24 meses, un progresivo aumento con la edad era observado en el contenido de esfingomielina. Por el contrario, un significativo descenso fue encontrado en los niveles de fosfatidilcolina y fosfatidilinositol en 12 y 24 meses. Aunque los niveles de fosfatiletanolamina (otro de los fosfolípidos mayoritarios) también disminuyen, las diferencias observadas no eran significativas.

17. Contenido en ácidos grasos de las membranas de macrófagos peritoneales de rata:

El análisis comparativo de los niveles de ácidos grasos en ratas de 3, 12 y 24 meses se muestra en la Tabla VIII. En las tres edades estudiadas el ácido graso mayoritario fue el palmítico (16:0) (representaba entre un 22 y 24% del total).

Con el envejecimiento se observó una progresiva disminución de ácido araquidónico (20:4) (aproximadamente se pasaba de un 12% en 3 meses, 9% en 12 meses y 6% en 24 meses). Una disminución en los niveles de docosapentanoico

TABLA VI

EFFECTO DE LA EDAD EN LA COMPOSICION LIPIDICA DE MEMBRANAS DE MACROFAGOS PERITONEALES.

EDAD (meses)	% (p/p)		Razón Colesterol/ Fosfolípidos
	Colesterol libre	Fosfolípidos	
3	1.45 ± 0.127	98.62 ± 0.262	0.015
12	1.73 ± 0.042	98.01 ± 0.013	0.018
24	2.15 ± 0.021 ^{a,b}	97.84 ± 0.014 ^{a,b}	0.022

Los valores representan la media ± D.E. de, al menos, cinco experimentos realizados por separado.

Significación estadística: a (diferencia entre 24 y 3 meses) $p < 0.05$; b (diferencia entre 24 y 12 meses) $p < 0.01$.

TABLA VII

EFFECTO DE LA EDAD EN EL CONTENIDO FOSFOLIPIDICO DE MEMBRANAS DE MACROFAGOS PERITONEALES.

Fosfolípidos	% (p/p)		
	3 meses	12 meses	24 meses
FS + CL	12.54 ± 3.11	25.76 ± 2.98 ^c	25.37 ± 2.72 ^a
FI	6.16 ± 0.19	4.29 ± 0.09 ^c	3.82 ± 0.11 ^a
FEA	27.47 ± 3.21	26.63 ± 4.05	22.17 ± 4.73
FC	48.15 ± 8.14	37.14 ± 2.25 ^c	33.39 ± 3.72 ^a
EM	3.48 ± 1.14	5.05 ± 0.52 ^c	7.86 ± 0.38 ^{a,b}
LFC	2.13 ± 0.21	2.15 ± 1.44	6.77 ± 2.32 ^{a,b}

Los valores representan la media ± D.E. de, al menos, cinco experimentos realizados por separado.

Abreviaturas: FS, fosfatidilserina; CL, cardiolipina; FI, fosfatidilinositol; FEA, fosfatidiletanolamina; FC, fosfatidilcolina; EM, esfingomielina; LFC, lisofosfatidilcolina.

Significación estadística: a (diferencia entre 24 y 3 meses) $p < 0.01$; b (diferencia entre 24 y 12 meses) $p < 0.01$; c (diferencia entre 12 y 3 meses) $p < 0.01$.

TABLA VIII

EFFECTO DE LA EDAD EN LA COMPOSICION DE ACIDOS GRASOS DE MEMBRANAS DE MACROFAGOS PERITONEALES.

Acidos grasos	% (p/p)		
	3 meses	12 meses	24 meses
C _{12:0}	0.315 ± 0.035	0.392 ± 0.039	0.410 ± 0.057
C _{14:0}	2.570 ± 0.269	3.125 ± 0.150	2.995 ± 0.016
C _{14:1, n-7}	1.460 ± 0.014	1.430 ± 0.315	1.420 ± 0.350
C _{16:0}	22.600 ± 0.948	23.902 ± 0.824	22.435 ± 1.082
C _{16:1, n-7}	6.220 ± 0.042	6.767 ± 0.450	6.815 ± 0.926
C _{16:4, n-3}	3.500 ± 0.290	3.076 ± 0.178	2.760 ± 0.010
C _{18:0}	13.415 ± 0.587	12.836 ± 0.405	12.515 ± 0.04
C _{18:1, n-9}	13.950 ± 0.580	14.265 ± 0.460	17.420 ± 0.550 a,b
C _{18:1, n-7}	2.505 ± 0.007	3.065 ± 0.245	3.165 ± 0.658
C _{18:2, n-6}	4.975 ± 0.247	5.840 ± 0.825	5.970 ± 1.245
C _{18:3, n-3}	3.075 ± 0.304	2.935 ± 0.276	6.060 ± 0.085 a,b
C _{20:4, n-6}	12.200 ± 0.255	9.420 ± 0.141 c	6.290 ± 0.495 a,b
C _{22:4, n-6}	0.700 ± 0.028	0.575 ± 0.014 c	0.570 ± 0.028 a
C _{22:5, n-6}	3.915 ± 0.120	3.935 ± 0.148	2.075 ± 0.092 a,b
C _{22:6, n-3}	5.670 ± 0.382	5.810 ± 0.141	8.620 ± 0.962 a,b
C _{24:0}	1.590 ± 0.580	2.020 ± 0.245	1.340 ± 0.042
C _{24:1}	1.290 ± 0.099	0.515 ± 0.021 c	0.510 ± 0.010 a
Sat.	40.490 ± 2.419	42.275 ± 2.013	39.690 ± 1.237
Mono.	25.420 ± 0.742	26.042 ± 1.425	29.330 ± 2.485
Polí.	34.030 ± 1.626	31.591 ± 2.592	32.340 ± 4.152
Total n-6	21.790 ± 0.650	19.770 ± 0.521	14.900 ± 2.072 a,b
Total n-3	12.240 ± 0.979	11.821 ± 1.051	17.440 ± 2.080 a,b
n-6/ n-3	1.780	1.672	0.850
Razón	0.627	0.616	0.748
Mono/Sat.			
C _{20:4} /C _{18:2}	2.450	1.613	1.053

Los valores representan la media ± D.E. de, al menos, cinco experimentos realizados por separado. Significación estadística: a p<0.05; b p<0.05; c p<0.05.

(22:5), docosatetranoico (22:4) y tetracosenoico (24:1) fue también apreciable con la edad. En contraposición, observamos un aumento en los niveles de oleico (18:1), linoleico (18:3) y docosahexanoico (22:6). Los niveles de otros ácidos cambiaban relativamente poco entre las edades estudiadas.

Otro cambio importante encontrado en este estudio fue el marcado incremento del total de ácidos grasos (n-3) (principalmente 22:6) acompañado por una disminución del total de ácidos grasos (n-6) (principalmente 20:4), con la edad. Como consecuencia de esto, se obtenía una reducción significativa de la razón (n-6)/(n-3) en ratas de 24 meses.

V . DISCUSSION

Se ha puesto claramente de manifiesto el incremento en la vulnerabilidad a ciertas infecciones y enfermedades neoplásicas, que tiene lugar con el paso de los años (Emmerling y col., 1979; Ershler, 1993).

Se han llevado a cabo muchos estudios a cerca del efecto del envejecimiento en las actividades de los linfocitos T y B, existiendo opiniones concluyentes al respecto (Hirokawa, 1992; Fülöp, 1994). Sin embargo, aún no está claro cómo las modificaciones producidas durante el proceso de envejecimiento a nivel de monocitos y macrófagos, pueden contribuir a la disminución de la actividad del sistema inmune asociada con la edad. Existen resultados contradictorios: hay autores que hablan de una disminución en la actividad de estas células, por ejemplo un descenso en la capacidad presentadora de antígenos (Vetvicka y col., 1985) o reducción en la producción de interleuquinas (Inamizu y col., 1985; Bradley y col., 1989); otros autores indican que no hay diferencias en la capacidad para destruir microorganismos o para generar citoquinas (Nielsen y col., 1984; Rudd y Benerjee, 1989) e incluso otros informan de un incremento en la actividad de estas células con la edad (Finger y col., 1982).

Los macrófagos juegan un importante papel en el sistema inmune ya que están implicados en la presentación del antígeno; en la destrucción de: microorganismos, células tumorales, células dañadas o muertas y restos de tejidos a través de la producción de radicales libres de oxígeno y de nitrógeno; son células secretoras extraordinariamente activas: secretan enzimas hidrolíticas, sustancias implicadas en el mantenimiento del proceso inflamatorio, así como sustancias que regulan o estimulan las funciones de otras células tales como la de los linfocitos.

Los macrófagos pueden ser utilizados como herramientas para el estudio del envejecimiento a nivel celular: permiten el análisis de procesos tales como síntesis y degradación de proteínas, regulación y expresión de genes, interacciones ligando-receptor a nivel de membrana y procesos de internalización de la misma por endocitosis y fagocitosis, mecanismos de transducción y producción de segundos mensajeros (Gordon y col., 1992), síntesis de ADN y replicación celular (Mefcalf, 1991). Por otro lado, pueden obtenerse fácilmente y mantenerse en cultivo con la posibilidad de múltiples manipulaciones de los mismos mediante el uso de agentes estimulantes o determinados tratamientos. Otra ventaja del estudio

del envejecimiento en estas células, es el hecho de que pueden obtenerse directamente de animales viejos.

Centrándonos en el estudio de los macrófagos, una de las vías para cuantificar el ER es la medida de los niveles de producción de anión superóxido. Como agentes estimulantes de dicho proceso empleamos agentes que actúan por diferentes vías:

- El éster de forbol PMA, ha sido descrito como el más potente agente estimulante del ER. Se une y activa a fosfolípidos dependientes de proteína quinasa C la cual sufre posteriormente un proceso de translocación a la membrana donde activa a la NADPH oxidasa. En dicho proceso no hay hidrólisis de fosfoinositol ni aumento de Ca^{2+} intracelular.

Un estudio dosis-respuesta (concentración de PMA-niveles de producción de O_2^-) permitió determinar la concentración de PMA 100 nM como aquella que daba lugar a una respuesta óptima, lo cual coincide con la concentración más usada en la literatura para la estimulación del ER en estas células.

Comprobamos que en ausencia del estímulo no había producción de O_2^- . Cuando se añadía el PMA existía un corto periodo de tiempo en el cual no se detectaba respuesta de las células a dicho agente: periodo de latencia, el cual presentaba una dependencia de la concentración de PMA usada. Así al aumentar la concentración del PMA se disminuía el tiempo de latencia. Resultados similares fueron publicados por Witz y col. (1987). Por otro lado, a medida que se aumentaba la concentración de PMA se incrementaba la producción de anión superóxido hasta alcanzar la concentración 100 nM, la cual daba origen a un número máximo de nanomoles de anión superóxido liberados por unidad de tiempo. Un comportamiento análogo fue descrito por Chiara y col., (1989).

- El péptido quimiotáctico N-FMLP, se une a su receptor específico lo que conduce a un cambio conformacional del mismo que se transmite a la fosfolipasa C vía una proteína G que hidroliza GTP. La fosfolipasa C activada cataliza la hidrólisis de fosfatidilinositol 4,5 bifosfato a inositol 1,4,5 trifosfato y diacilglicerol. El inositol 1,4,5 trifosfato estimula la liberación de Ca^{2+} de almacenes intracelulares y, el diacilglicerol puede estimular una proteína quinasa dependiente de fosfolípidos y de Ca^{2+} (Ross, 1986).

- De manera similar al péptido quimiotáctico, la Con-A también activa la hidrólisis de fosfatidilinositol 4,5 bifosfato, pero difiere del N-FMLP en que evita el paso de unión GTP-proteína G, su activación no se ve afectada por la exotoxina de Bordetella pertussis y no produce translocación de proteína quinasa C (Ross, 1986).

Nuestros resultados usando estos tres diferentes estímulos parecen indicar que, en general, la capacidad de los macrófagos para producir O_2^- disminuye con la edad. La disminución en la respuesta era de un 48.46% con el PMA, un 35.5% con el N-FMLP y un 27.2% con la Con-A. Haciendo un estudio comparativo, podemos sugerir que el proceso más afectado con el envejecimiento es la respuesta de translocación y activación de la proteína quinasa C al PMA. La acción del péptido y Con-A por activación de la fosfolipasa C y la consiguiente hidrólisis de fosfatidilinositoles estaría menos afectada, y comenzaría a alterarse más tarde a lo largo de la vida de la rata (la disminución observada en función de la edad usando PMA es significativa a los 12 meses, mientras que no se obtienen diferencias significativas entre ratas de 3 y 12 meses cuando usamos N-FMLP o Con-A como estímulos).

Lavie (1992) describía un descenso similar en la producción de O_2^- por macrófagos peritoneales de rata tratados con PMA (sobre un 40%). Dávila y col., (1990) han demostrado que macrófagos de ratas viejas presentan una menor capacidad de respuesta a otros estímulos tales como IFN- δ recombinante y zimosán opsonizado (describen una disminución del 75% en la producción de O_2^- por ratas de 23 meses con respecto a animales de 3 meses). De la Fuente y Muñoz (1992) mostraron una disminución en función de la edad, en la generación de dicho anión por macrófagos de ratón incubados con *Candida albicans*.

Existen también evidencias en neutrófilos humanos que indican la menor producción de O_2^- por estas células extraídas de donadores viejos (sobre 68 años) en relación a jóvenes (sobre 34 años) siendo ambas estimuladas por partículas de latex (Nagel y col., 1982) o por el péptido quimiotáctico (Lipschitz y col., 1988). Ambos estímulos actúan uniéndose y activando receptores de la membrana plasmática provocando liberación de DG e IP_3 y consecuentemente una elevación de los niveles de Ca^{2+} intracelular. Lipschitz y col. señalaban que las concentraciones de Ca^{2+} citosólicas en neutrófilos de viejos estimulados con distintas concentraciones de N-FMLP permanecían en todos los casos

significativamente más bajas que en jóvenes y que un pretratamiento de dichas células con el ionóforo iomicina mejoraba la función de estos neutrófilos. En 1991, Lipschitz y col. indican que el envejecimiento está asociado con una disminución de la concentración de los fosfoinositoles requeridos para la generación de DG e IP₃ y como consecuencia de ello existía una disminuída capacidad para la producción de segundos mensajeros, hecho sugerido con anterioridad por Fülöp y col. (1989). Estos autores indican además que la disminución de los niveles de DG e IP₃ no estaba acompañada de un descenso tan pronunciado en la generación O₂⁻ por neutrófilos de viejos debido a que no se detectaban diferencias significativas en la producción de ácido fosfatídico, el cual se ha sugerido se un importante activador de la NADPH oxidasa (Rossi, 1990).

Lipschitz y col. no encontraron diferencias entre neutrófilos de individuos jóvenes y viejos cuando éstos eran estimuladas por PMA. Resultados similares fueron descritos por Scott y col. (1990), sugiriendo que las modificaciones detectadas con la edad habría que buscarlas en los primeros pasos de la señal de transducción a nivel de la interacción de estímulos, tales como N-FMLP o partículas de latex, con sus receptores de membrana.

Dada la dependencia del ER de la disponibilidad de glucosa (suministra el NADPH requerido para la formación de O₂⁻ a través del ciclo de las pentosas fosfato) estudiamos si un incremento en la concentración de glucosa podía mejorar o aumentar dicho proceso. Los máximos valores de producción de O₂⁻ se obtuvieron a una concentración de glucosa 10 mM y, con concentraciones superiores se obtenía una producción de O₂⁻ disminuída. Chiara y col. (1989) describían una respuesta máxima con concentraciones 5 y 10 mM. Otros autores han demostrado que a altas concentraciones de glucosa se produce una disminución de los niveles de producción de anión superóxido debido probablemente a procesos de glicosilación (Nielson y Hindson, 1989).

La disminución en la producción de anión superóxido con la edad podía deberse, en principio, a un mayor proceso de dismutación. Por ello también investigamos el efecto en la producción de H₂O₂ por macrófagos peritoneales de ratas de diferentes edades, estimulados con PMA. Nuestros resultados parecen indicar una progresiva disminución de la capacidad de los macrófagos para producir H₂O₂ con la edad (observamos una disminución de un 30% en animales de 12 meses y de un 50% en ratas de 24 meses). Una disminución del 35% en la producción de H₂O₂ por macrófagos de rata ha sido descrito por Costa Rosa y

col. (1993). Por lo tanto, estos resultados parecen indicar que la disminución de los niveles de O_2^- que habíamos observado en ratas viejas no pueden atribuirse a mayores índices de dismutación en dichos animales.

Un porcentaje de disminución similar al descrito por nosotros fue publicado por Ding y col. (1994). Estos autores plantearon que esta disminuída capacidad de las células peritoneales de animales viejos para liberar H_2O_2 podía ser debido a un defecto en la capacidad de los macrófagos para ser activados y/o un defecto en la capacidad de los linfocitos para generar citoquinas que a se vez estimulan a los macrófagos. Midieron los niveles de distintas citoquinas :IFN- δ , TNF- α y factores estimulantes de colonias, no detectando diferencias en la capacidad de producción de las mismas por los esplenocitos de ratones viejos, pero si observaron una significativa disminución en la respuesta de los macrófagos al IFN- δ .

El complejo enzimático implicado en la formación de las especies reactivas del oxígeno es el de una NADPH oxidasa ligada a membrana. Está constituida por factores citosólicos y otros situados a nivel de membrana. El proceso de ensamblaje y activación de los mismos no está totalmente dilucidado.

Ya que la actividad de numerosas enzimas se encuentran disminuídas con la edad (Santa María y col., 1986; Santa María y col., 1988), estudiamos si las alteraciones detectadas en la producción de radicales libres de oxígeno en función de la edad podrían deberse a una disminución en la actividad de la NADPH oxidasa. Sin embargo, no encontramos diferencias significativas en la actividad de dicha enzima entre las tres edades estudiadas. Por lo tanto, no pueden atribuirse las diferencias encontradas en la producción de O_2^- y H_2O_2 a disfunciones a nivel de algún componente del complejo oxidasa y habría que buscarlas a nivel de los mecanismos de transducción o del sustrato de la enzima: el NADPH.

Una posibilidad es que la disminución en la producción de estos radicales en función de la edad se deba a alteraciones en la vía de las pentosas fosfato encargada de suministrar el NADPH necesario para la actividad oxidasa. Las dos enzimas más importantes de dicha vía son la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6P-DH) y la 6-fosfogluconato deshidrogenasa (6PG-DH). En el estudio de las actividades enzimáticas de la G6P-DH y 6PG-DH encontramos disminuciones del 69% y del 62% respectivamente, con la edad.

Una disminución en la actividad de la 6PG-DH ha sido descrita en hígado de rata y en eritrocitos humanos (Gordillo y col., 1989; Gordillo y col., 1991), sugiriendo estos autores que durante el proceso de envejecimiento se producen modificaciones en residuos de lisina (encontraban menor número de restos de lisina en el estudio de dicha enzima en viejos) probablemente debido a procesos de oxidación. Costa Rosa y col. (1993) encontraron una disminución en la actividad de la G6P-DH con la edad en linfocitos y macrófagos peritoneales de rata, indicando que dicha disminución podría constituir una posible explicación de las alteraciones que habían detectado a nivel de la producción de H_2O_2 en viejos.

A continuación, hemos estudiado la degradación de la glucosa por la ruta de las pentosas fosfato en macrófagos de ratas de diferentes edades, midiendo la radiactividad liberada en forma de $^{14}CO_2$ cuando se incuban los macrófagos en presencia de glucosa marcada en el carbono 1 y en el carbono 6 con ^{14}C . Nuestros resultados indican una progresiva disminución de la cantidad de glucosa degradada o metabolizada por los macrófagos en función de la edad (disminución aproximadamente de un 45% en 12 meses y de un 64% en ratas de 24 meses). Las diferencias encontradas entre las tres edades estudiadas, fueron en todos los casos estadísticamente significativas. Anteriormente señalamos resultados análogos a estos en relación a las actividades de dos enzimas de dicho ciclo, la G6P-DH y 6PG-DH.

Una disminuída capacidad por parte de linfocitos y de macrófagos peritoneales para la utilización de glucosa en ratas viejas ha sido descrita por Costa Rosa y col. (1993).

El PMA es capaz de estimular diversas funciones de los macrófagos tales como quimiotaxis, fagocitosis, citotoxicidad y producción de O_2^- (Laskin y col., 1987). Asimismo, se ha descrito su efecto sobre la síntesis de ADN, el transporte de glucosa y la glucólisis (Hamilton y col., 1988; Rist y col., 1990; Tejwani y col., 1985). No obstante, las bases moleculares de la estimulación de estas células por el PMA aún no están bien establecidas. Por lo tanto, es interesante investigar el efecto de este estimulador sobre el metabolismo de los macrófagos.

Dado los efectos estimulantes atribuídos al PMA y señalados anteriormente, quisimos determinar su efecto potenciador a nivel del flujo de las pentosas fosfato en orden a incrementar los niveles de NADPH. Comprobamos que el tratamiento con dicho estímulo aumentaba de 2-3 veces la actividad del

ciclo pero, al igual que sucedía con los macrófagos controles, las disminuciones entre los valores obtenidos para animales jóvenes, maduros y viejos fueron en todos los casos estadísticamente significativas.

La activación de la vía de las pentosas fosfato ocurre por un incremento de producción de NADP⁺ durante el ER. Hay dos posibles fuentes de generación de este NADP⁺. Una es la reacción de formación del O₂⁻ en la cual el NADPH es la especie donadora del electrón y la otra es el sistema glutatión peroxidasa-glutatión reductasa responsable de la eliminación del H₂O₂ que se origina durante el ER. Este sistema utiliza el H₂O₂ para oxidar al glutatión reducido mediante una reacción catalizada por la glutatión peroxidasa (GP). El glutatión oxidado es luego reconvertido a glutatión reducido por la glutatión reductasa (GR) en una reacción en la cual hay producción de NADP⁺.

Investigamos el efecto de la edad en la actividad de la GP y GR. Si bien no encontramos diferencias en la actividad de la GP, sí se observó una disminución de un 45% en la actividad de la GR. Este hecho puede producir un incremento del glutatión oxidado intracelular y disminuir los niveles de NADP⁺ necesarios para activar la vía de las pentosas fosfato.

Con anterioridad se describió en nuestro laboratorio un porcentaje de disminución similar en la actividad de la GR en hígado (Santa María y Machado, 1988). Una marcada reducción en la actividad de esta enzima en hígado fue también descrita por Hazelton y Lang (1985). En otros tejidos, tales como pulmón, intestino y riñón, se han descrito valores similares de la actividad de dicha enzima en animales de 3 y 24 meses e incluso un cierto incremento de la actividad de la enzima con la edad (Stohs y col. 1982; Santa María y Machado, 1986).

Por el contrario, el comportamiento de la enzima GP con la edad es diferente y un incremento en su actividad ha sido descrito en muchos tejidos, interpretándose dicho aumento como un mecanismo compensatorio que contrarestaría la producción y efecto de los radicales libres (Vitorica y col., 1984; Santa María y Machado, 1988).

Además del sistema glutatión peroxidasa-glutatión reductasa, existen otras enzimas encargadas de la eliminación del O₂⁻ y H₂O₂ producido durante el ER,

evitando así que la membrana y las estructuras citoplasmáticas del fagocito se vean afectadas, son la catalasa y la SOD.

Analizamos el efecto de la edad en la actividad de estas dos enzimas, no encontrando diferencias significativas en la actividad de la enzima Cu/Zn SOD y sólo en el caso de la catalasa observamos una disminución aproximadamente de un 33% en animales de 24 meses. Esta negativa correlación encontrada en macrófagos en relación a los niveles de catalasa puede sugerir que ya que la producción de anión superóxido en estas células se encuentra disminuída con la edad, el requerimiento de catalasa también pueda ser menor.

Análogos resultados a los descritos por nosotros fueron mostrados por Recasens y Green (1992) en relación a las modificaciones que se producían a nivel de la actividad de la catalasa y SOD con la edad. Describen una marcada reducción en la actividad de la catalasa en animales viejos acompañada de una incapacidad en estos animales para inducir la actividad de la enzima SOD ante un estímulo inflamatorio. Establecen que estos hechos podrían explicar el incremento de daños por oxidación que suele observarse en los tejidos de animales viejos.

Otro hecho que nos planteamos fue estudiar la posibilidad de que los niveles de NADPH estuviesen disminuídos con edad, dadas las disminuciones observadas en la ruta de las pentosas fosfato y en la actividad de enzimas de dicha ruta.

Determinamos los niveles de dicho coenzima tanto en su forma reducida como oxidada en macrófagos controles y estimulados con PMA. En ambos casos encontramos que los niveles de NADPH disminuían con la edad mientras que los niveles de NADP eran más altos en animales viejos que en adultos y jóvenes. Esta disminución de NADPH y el aumento de NADP conducen a una significativa disminución de la razón NADPH/NADP con la edad, disminución observada en los tres grupos estudiados. En los macrófagos tratados con PMA, se obtuvieron valores de NADPH inferiores para las tres edades analizadas en relación a los obtenidos en macrófagos controles, debido a que dicho coenzima es consumido durante el ER desencadenado por este agente estimulante.

Otra posible vía de síntesis del NADPH necesario para la formación de los radicales libres de oxígeno y nitrógeno, es la enzima málica.

Nuestros resultados ponen de manifiesto una progresiva disminución en la actividad de dicha enzima con la edad. Por lo tanto este hecho se sumaría a las observaciones anteriores relativas al ciclo de las pentosas fosfato y a las enzimas implicadas en el mismo, las cuales estarían en concordancia con la disminución detectada en los niveles de NADPH en animales adultos y viejos.

Una pérdida de actividad de la enzima málica en función de la edad, fue puesta de manifiesto en nuestro laboratorio trabajando con hígado de rata (Gordillo y col., 1988). Estos autores atribuyen dicha pérdida a modificaciones de residuos de histidina debidas posiblemente a procesos oxidativos. Demostraron mediante estudios de inmunoprecipitación que existían mayores cantidades de esta proteína en animales viejos y sin embargo la actividad que presentaba la enzima en estos animales era más baja que en animales jóvenes, indicando que estos niveles incrementados de proteínas son debidos a la acumulación de la forma oxidada e inactiva de dicha enzima que se va produciendo a lo largo del proceso de envejecimiento. Estos resultados serían concordantes con lo establecido por Stadtman y col. (1993). Otros estudios llevados a cabo en nuestro laboratorio en corazón de rata, también pusieron de manifiesto que la actividad de la enzima málica en viejos era aproximadamente tres veces más baja que la observada en adultos (Vitorica y col., 1981).

La producción de NADPH a través del ciclo de las pentosas fosfato depende directamente del suministro de glucosa a dicho ciclo y se ha demostrado que los macrófagos son incapaces de producir anión superóxido en ausencia de un aporte de glucosa externa. (Rist y col., 1990).

Nosotros comprobamos que efectivamente en ausencia de glucosa externa se inhibía completamente la producción de anión superóxido. Observamos un comportamiento análogo en cuanto a la producción de dicho anión, y en relación a la concentración de glucosa existente en el medio, en los macrófagos de ratas de las tres edades estudiadas. En todos los casos los niveles máximos de O_2^- se obtuvieron para concentraciones de glucosa 10 mM. Chiara y col. (1989) describieron una respuesta óptima de producción de radical superóxido con el uso de concentraciones de glucosa 5 y 10 mM, trabajando con macrófagos de ratas jóvenes.

Los resultados obtenidos indican además, que el aumento de la disponibilidad de glucosa por el macrófagos no mejoraba las alteraciones

detectadas en el ER de estas células en animales de 12 y 24 meses. Incluso, el uso de concentraciones de glucosa superiores a las habitualmente empleadas en los distintos experimentos (10 mM) traía como consecuencia una disminución en los niveles de generación del radical superóxido, resultados concordantes con lo previamente establecido por Nielson y Hindson (1989).

Arthur y col. (1986) establecían una relación directa entre la producción de radicales libres de oxígeno y el ciclo de las pentosas fosfato y posteriormente, Rest y col. (1988) sugirieron que alguna relación podía existir entre el transporte de glucosa o su metabolismo y la producción de radicales libres ya que el aumento de la concentración de manosa inhibía la producción de estos radicales libres y el ciclo de las pentosas fosfato. Rist y col. (1990) pusieron de manifiesto que dicho ciclo estaba íntimamente relacionado con el transporte de glucosa en macrófagos, indicando que la actividad de la vía de las pentosas fosfato y consiguientemente la producción de radicales libres podía ser controlada por agentes que inhiben el transporte de glucosa y/o la actividad de la enzima hexoquinasa.

Analizamos el transporte de 2-deoxi-glucosa en macrófagos peritoneales de ratas de 3, 12 y 24 meses en función del tiempo. En todos los casos se observaba un activo proceso de acumulación que era lineal durante los primeros sesenta minutos aproximadamente. La cinética del transporte era similar en animales de 12 y 24 meses y difería considerablemente en animales de 3 meses. Los resultados obtenidos al cabo de las tres horas, ponían de manifiesto una significativa disminución del transporte de glucosa con la edad.

Una disminución en el transporte de glucosa con la edad fue descrita por Oka y col. (1992) en músculo esquelético y tejido adiposo, indicando que probablemente dicho descenso se debiese a una disminución en la síntesis de transportadores de glucosa más que a alteraciones de la estabilidad de dichas proteínas implicadas en el transporte. Resultados concordantes con estos fueron mostrados por Ferraris y col. (1993) a nivel de intestino delgado de rata, y en corazón por Cartee (1993). Fink y col. (1986) describieron un descenso del transporte de D-glucosa en función de la edad en adipocitos humanos y de rata.

Si tenemos en cuenta lo señalado anteriormente: dependencia de la vía de las pentosas fosfato del suministro de glucosa para poder generar NADPH, relación entre dicha vía y el transporte de glucosa y que el transporte de dicho sustrato se encuentra disminuído con la edad, estas observaciones también serían

concordantes con la disminución que hemos detectado en los niveles de NADPH en animales de 12 y 24 meses.

Dado que la glucosa constituye el principal sustrato energético para los macrófagos presentando una alta razón de utilización de la misma a través de la glucólisis, nos pareció interesante el estudio de enzimas claves en el proceso de metabolización de dicho sustrato.

Las enzimas estudiadas fueron: hexoquinasa, piruvato quinasa, láctico deshidrogenasa y citrato sintasa.

Se considera que la enzima hexoquinasa controla el flujo de sustratos a través de la glucólisis (De Almeida y col., 1989). Encontramos una disminución del 60% en la actividad de esta enzima entre animales de 3 y 12 meses y sin embargo no encontramos diferencias significativas entre animales de 12 y 24 meses.

Costa Rosa y col. (1993) describieron una actividad hexoquinasa reducida en linfocitos y en macrófago, residentes y tratados con tioglicolato, procedentes de animales de 15 meses en relación a 3 meses. Thorburn y Beutler (1989) publicaron una pronunciada disminución de la actividad de esta enzima a lo largo del proceso de maduración de los eritrocitos circulantes. Señalan procesos oxidativos como la posible causa de inactivación y degradación de dicha enzima por proteasas.

La piruvato quinasa es otra enzima importante de la vía glucolítica. Dicha enzima mostraba un comportamiento similar, con la edad, al observado para la hexoquinasa. Se obtenía una marcada disminución de su actividad entre animales de 3 y 12 meses, no detectándose diferencias significativas entre 12 y 24 meses. El descenso en la actividad de esta enzima junto con el encontrado para la hexoquinasa, sugiere una menor capacidad de los macrófagos para la utilización de la glucosa por la vía glucolítica como consecuencia del proceso de envejecimiento.

Vitorica y col. (1981) describían un descenso en la actividad de la piruvato quinasa en corazón de rata de 16-21 meses tras observar en los primeros meses de vida del animal un incremento de dicha actividad y durante la etapa adulta dicha actividad se mantenía prácticamente constante.

Los macrófagos presentan una baja tasa de oxidación del piruvato debido a las bajas concentraciones existentes del mismo, causadas por la competencia por dicho sustrato llevada a cabo por la enzima láctico deshidrogenasa cuya actividad es muy superior a la de la piruvato deshidrogenasa (Newsholme y col., 1986).

Estudiamos el comportamiento de la enzima láctico deshidrogenasa (LDH) en macrófagos de ratas de diferentes edades, encontrando un significativo descenso en dicha actividad en animales viejos. Este hecho es indicativo de una gradual disminución del metabolismo anaeróbico del piruvato.

Lupa y col. (1994) han descrito un descenso del 28% en la actividad de la enzima LDH hepática, con la edad.

La enzima citrato sintasa puede usarse como índice del flujo de sustratos a través del ciclo de Krebs (De Almeida y col., 1989). Esta enzima presenta una progresiva pérdida de actividad con la edad, así su actividad en animales de 24 meses era un 46% más baja que en 3 meses. Esta enzima presentaba menor actividad en linfocitos y en macrófagos de ratas de 15 meses (Costa Rosa y col., 1993). Este hecho puede ser indicativo de que una menor capacidad en el flujo de sustratos a través del ciclo de Krebs puede existir en los macrófagos debido al proceso de envejecimiento.

Como hemos indicado con anterioridad, los macrófagos son células que utilizan la glucosa como sustrato mayoritario convirtiéndola en su mayor parte en lactato y sólo una pequeña cantidad de glucosa es oxidada (Newsholme y col., 1987).

Investigamos los niveles de secreción de lactato en macrófagos observando un progresivo y significativo descenso en la cantidad de lactato secretado en función de la edad. Este hecho sería concordante con la disminución detectada en la actividad de la enzima LDH y por otro lado con la disminuída capacidad de transporte y metabolización de la glucosa por la ruta glucolítica, puesta de manifiesto en animales maduros y viejos.

Otro de los mecanismos a través del cual los macrófagos llevan a cabo su función inmunológica, es la producción de óxido nítrico a partir de la oxidación de L-arginina en una reacción catalizada por la nitrito sintasa. La cuantificación

de dicho radical suele llevarse a cabo por determinación de los niveles de nitrito acumulados en el medio de cultivo, hecho comúnmente aceptado.

Investigamos el efecto de la edad en la producción de NO_2^- por macrófagos residentes, inflamados y activados, observándose en todos los casos una disminución en los niveles de formación de NO_2^- en función de la edad. Se obtuvieron los valores más altos de producción de nitrito para las tres edades estudiadas, en el caso de los macrófagos activados.

Un descenso en la producción de NO en función de la edad, ha sido descrito en varias regiones del cerebro y se ha relacionado con una disminución significativa de los niveles de arginina y citrulina en dichas regiones (Strolin Benedetti y col., 1993).

Una disminución en la excreción urinaria de los metabolitos del óxido nítrico (lo cual es indicativo de la actividad del sistema NO/NOS; Schultz y Tolins, 1993) así como de su precursor L-arginina, fue descrita por Reckekhoff y col. (1994) con la edad. Estos autores encontraban una disminución más pronunciada de los niveles de nitrito y nitrato excretados en orina en relación con el descenso observado en los niveles endógenos del sustrato enzimático, lo cual sugería que tenían que existir otros mecanismos que contribuyesen a la disminución en la producción de NO. Postulan que puede existir una disminución en la actividad de la NOS quizás debido a cambios en la síntesis de dicha enzima con la edad o disminuciones en la concentración de los cofactores, tales como tetrahidrobiopterina, requeridos para su actividad.

La disminución que hemos observado en la producción de NO puede estar relacionada con varios procesos:

Shimizu y col. (1994) mostraron que el H_2O_2 incrementa la formación de L-citrulina a partir de L-arginina acoplada con la síntesis de NO, en cultivos de células endoteliales. Comprobaron que el H_2O_2 producía un incremento del Ca^{2+} intracelular y se ha descrito que la actividad de la NOS es dependiente de la concentración de Ca^{2+} (Schmidt y col., 1992). Nosotros describimos una progresiva disminución de los niveles de producción de H_2O_2 con la edad, lo cual y según lo anterior podría repercutir en el descenso en los niveles de NO observados en función de la edad.

La inducción de la producción de NO en macrófagos activados parece estar regulada por productos de la vía lipooxigenasa del ácido araquidónico (Imai y col., 1993), y nosotros hemos encontrado una reducción de aproximadamente un 50% en el contenido de dicho ácido en membranas de macrófagos de ratas viejas (Alvarez y col., 1993a).

La enzima NOS requiere NADPH para su actividad y dado que una parte importante de este coenzima es generada por la vía de las pentosas fosfato y que una enzima fundamental en la regulación de dicha vía es la glucosa 6-fosfato deshidrogena, Corraliza y col. (1993) estudiaron una posible correlación entre la inducción de la G6P-DH y la producción de NO. Indicaron la posible implicación de la G6P-DH en la producción del NADPH necesario para asegurar la adecuada actividad de la NOS y su posible papel en los mecanismos citotóxicos producidos por la liberación de NO por macrófagos activados. Nosotros hemos descrito una reducción de la actividad de la G6P-DH en macrófagos de ratas de 12 y 24 meses.

Uno de los coenzimas requeridos para la actividad de la enzima nitrato sintasa es el NADPH. Nosotros hemos descrito una disminución en los niveles de dicho nucleótido con la edad, lo cual puede repercutir en la actividad de dicha enzima y consecuentemente en la producción de NO.

Además, la generación de NO en macrófagos activados se ha demostrado que puede ser estimulada por glutatión reducido (Stuehr y col., 1990), ya que indicamos que la actividad glutatión reductasa se encuentra disminuida, los niveles de GSH pueden ser más bajos.

Muchas investigaciones han sugerido que las alteraciones observadas en las funciones celulares con la edad, pueden estar relacionadas con cambios moleculares y/o funcionales a nivel de las membranas biológicas (Zs-Nagy, 1979; Schroeder, 1984). Teniendo en cuenta la importancia de la integridad de la membrana en la función fagocítica de los macrófagos, analizamos el efecto del envejecimiento en la fluidez y en la composición lipídica de membrana de macrófagos peritoneales de ratas de diferentes edades.

Estudiamos la fluidez de membrana a partir de la cuantificación de los parámetros establecidos por Vorbeck y col. (1982) usando DPH como sustancia fluorescente. Observamos un significativo incremento en los valores de los parámetros denominados grado de polarización de fluorescencia (p) y anisotropía

de fluorescencia (r_s) en animales de 12 y 24 meses a las dos temperaturas estudiadas. El parámetro de orden lipídico (S_{DPH}) presentaba un significativo aumento en membranas de macrófagos extraídas de animales adultos y viejos. Estos resultados ponen de manifiesto un progresivo aumento de la viscosidad (ó un progresivo descenso de la fluidez) en las membranas de macrófagos de ratas de 12 y 24 meses en relación a las de 3 meses.

Numerosas investigaciones han sugerido que el envejecimiento puede estar acompañado por una disminución en la fluidez de membrana. Así un incremento de la microviscosidad de membrana como resultado del envejecimiento ha sido descrita en linfocitos de ratón (Rivnay y col., 1979), en plaquetas humanas (Cohen y Zubenko, 1985), en microvellosidades intestinales de rata (Wahnon y col., 1989), en eritrocitos humanos (Tozzi-Ciancarelli y col., 1989) y en hígado de rata (Yu y col., 1992).

En cuanto a las consecuencias fisiológicas del incremento observado en el parámetro de orden lipídico con la edad, puede relacionarse en primer lugar con cambios en la dinámica de las proteínas de membrana, así por ejemplo en membranas de eritrocitos, cambios en el contenido de colesterol y en la fluidez de membrana se ha demostrado que altera la disponibilidad de los grupos sulfhidrilos de las proteínas a nivel de la superficie de membrana (Borochoy y Shinitzky, 1976; Borochoy y col., 1979). En mitocondrias hepáticas, manipulaciones llevadas a cabo *in vitro* o *in vivo* en el contenido de colesterol han sido relacionadas con cambios en la función de la membrana (Brenner, 1990). En macrófagos se ha descrito que modificaciones del contenido fosfolipídico de la membrana, tienen influencia en los procesos de fagocitosis y pinocitosis (Mahoney y col., 1977).

Son varios los mecanismos propuestos para explicar estos cambios en la fluidez de membrana. Estos incluyen: una disminución en el grado de insaturación de los ácidos grasos y/o un aumento en el contenido de colesterol (Venkatraman y Fernandes, 1992; Yeagle, 1985), procesos de peroxidación lipídica de membrana (Curtis y col. 1984, Chen y Yu, 1994).

Analizamos la composición de las membranas de macrófagos de ratas de diferentes edades, con el propósito de ver si se producían modificaciones con la edad que contribuyesen al descenso de la fluidez observado en membranas de ratas de 12 y 24 meses.

Encontramos un aumento de los niveles de colesterol libre y una disminución en el contenido fosfolipídico. Estos cambios conducían a un incremento de la razón molar colesterol/fosfolípidos. Dicha razón es considerada como el principal determinante de la fluidez lipídica tanto en membranas biológica como artificiales (Shinitzky y Barenholz, 1978). Por lo tanto, el aumento de la razón colesterol/fosfolípidos observado en membranas de macrófagos de animales de 12 y 24 meses, es concordante con el aumento del parámetro de orden lipídico detectado en dichos animales.

Para determinar si la composición fosfolipídica cambiaba con la edad, cuantificamos los fosfolípidos mayoritarios. En todos los casos, los fosfolípidos mayoritarios eran la fosfatidiletanolamina y fosfatidilcolina. Los niveles de fosfatidilcolina y fosfatidilinositol disminuían con la edad mientras que la esfingomielina, lisofosfatidilcolina, fosfatidilserina y cardiolipina aumentaban con la edad (excepto en el caso de la lisofosfatidilcolina, todos los cambios eran significativos en animales de 12 meses).

El aumento de los niveles de esfingomielina es junto con el incremento de la razón colesterol/fosfolípidos, otra causa importante del aumento de la microviscosidad de la membrana (Borochoy y col. 1977; Barenholz, 1982). Resultados similares fueron publicados en eritrocitos de oveja (Marin y col., 1990). Al mismo tiempo, la disminución de fosfatidilinositol es particularmente relevante porque muchos estímulos actúan a través de la hidrólisis de fosfoinositol para activar la enzima NADPH oxidasa, enzima responsable del ER.

Se ha demostrado que el envejecimiento puede alterar la composición en ácidos grasos de las células del sistema inmune y que este cambio puede alterar la fluidez de la membrana plasmática (Laganier y Fernandes, 1991).

Según nuestros estudios, los ácidos grasos mayoritarios en membranas de macrófagos peritoneales de ratas jóvenes eran: ácido palmítico, esteárico, oleico y araquidónico.

Durante el envejecimiento se observó un significativo y progresivo descenso en los niveles de ácido araquidónico (aproximadamente de un 50% en ratas de 24 meses). Este ácido ha sido descrito como un potente estimulante de la producción de anión superóxido (Steinbeck y col., 1991) y por lo tanto la disminución en el contenido de este ácido que hemos observado con la edad, puede

estar relacionado con el descenso en la producción de O_2^- que describimos en animales viejos. Por otro lado, la disminución de ácido araquidónico puede estar relacionada con una mayor peroxidación de lípidos poliinsaturados (van Kuijk y col., 1987), la cual se ha puesto de manifiesto que aumenta con la edad (Cutler, 1984). Este hecho podría estar relacionado con la mayor incidencia de aterosclerosis con la edad. Los macrófagos son capaces de acumular lípidos en su citoplasma, la mayoría de los cuales son lipoproteínas de baja densidad (LDL). Estas lipoproteínas deben ser previamente modificadas para poder acumular ésteres de colesterol. Dichas modificaciones suelen llevarse a cabo por reacción con malondialdehído o mediante reacciones de acetilación (Fogelman y col., 1980; Rohrer, 1991).

La disminución en el ácido araquidónico (20:4) no está acompañada de una similar disminución en el ácido linoleico (18:2) en animales adultos o viejos, luego hay una reducción en la razón 20:4/18:2 con la edad. En otros tejidos esta reducción ha sido atribuida a una disminución en la desaturación de ácidos grasos esenciales originada como consecuencia de una inhibición de la enzima Δ^6 desaturasa (Vazquez y col., 1993). En muchos tejidos, 18:2 (n-6) es convertido a 20:4 (n-6) por una serie alternativa de actuación de la Δ^6 desaturasa, elongación de la cadena y Δ^5 desaturación. Se ha demostrado que macrófagos peritoneales de ratón carecen de Δ^6 desaturasa, poseen una considerable actividad elongasa y cierta actividad Δ^5 desaturasa (Chapkin y col., 1988). La ausencia de Δ^6 desaturasa en los macrófagos sugiere que la disponibilidad de ácido araquidónico por dicha células no pueden ser modulada a partir de los niveles de ácido linoleico (su mayor ácido graso esencial antecedente).

Otro hecho importante es el marcado aumento del total de ácidos (n-3) (principalmente ácido docosahexanoico) acompañado por una disminución del total de ácidos (n-6) (principalmente ácido araquidónico) en animales de 12 y 24 meses. Como consecuencia existía una significativa reducción de la razón (n-6)/(n-3) en dichos animales. Se ha demostrado que los ácidos (n-3) inhiben el metabolismo de los ácidos (n-6). Luego la reducción de la razón (n-6)/(n-3) en animales adultos y viejos puede ser debido a una inhibición del metabolismo de los ácidos (n-6) producido por los ácidos grasos (n-3). El balance entre ácidos grasos (n-6) y (n-3) juega un papel importante en la regulación de la naturaleza fisico-química de la matriz de la membrana lipídica, lo cual puede repercutir en la función de una alta variedad de enzimas intrínsecas o extrínsecas unidas a

membrana (Cook y Spence, 1987). Esto puede también contribuir a alterar la actividad de los macrófagos con la edad.

VI. CONCLUSIONES

Las conclusiones generales derivadas de este trabajo son:

Primera: Los niveles de producción de O_2^- por macrófagos peritoneales estimulados con PMA 100 nM disminuyen progresivamente con la edad, encontrándose una disminución de un 50% en animales de 24 meses. Esta disminución con la edad es independiente del estado funcional del macrófago.

Segunda: La estimulación de estas células con el péptido quimiotáctico o con Con-A, da origen a razones de producción de O_2^- muy inferiores a las obtenidas usando PMA como agente estimulante pero en ambos casos también se observaba una disminución significativa en los niveles de producción de dicho radical en función de la edad.

Tercera: De manera análoga a lo encontrado en macrófagos peritoneales de rata, los niveles de síntesis de O_2^- por monocitos humanos estimulados con PMA disminuyen progresivamente con la edad mostrando además una sexo-dependencia.

Cuarta: La disminución detectada en los niveles de producción de O_2^- con la edad no es debido a la existencia de un mayor porcentaje de dismutación en animales de 12 y 24 meses tal y como lo demuestra el hecho de que los niveles de formación de H_2O_2 desencadenados por PMA también se encuentran disminuidos en dichos animales con respecto a jóvenes.

Quinta: Las diferencias encontradas en la producción de O_2^- y H_2O_2 no pueden atribuirse a disfunciones a nivel de alguno de los componentes del complejo enzimático NADPH oxidasa, ya que no se observan diferencias significativas en su actividad entre animales de las distintas edades estudiadas.

Sexta: El ciclo de las pentosas fosfato está claramente alterado con la edad. Se observa una pérdida de actividad de las enzimas G6P-DH y 6PG-DH de un 60% a los 24 meses y un 40% a los 12 meses. Por otro lado, hay una disminución en el aporte de sustrato al ciclo como consecuencia de un descenso en el transporte de glucosa.

Existe disminución en la actividad de la enzima málica, otra fuente generadora de NADPH.

La cuantificación de los niveles de NADPH y NADP en las distintas edades confirman el descenso con la edad de la forma reducida del coenzima.

Séptima: La capacidad de metabolización de glucosa por los macrófagos se ve disminuída con la edad, hecho deducible a partir del estudio de enzimas de la vía glucolítica y del ciclo de Krebs. Además, existe un disminución en la cantidad de lactato secretado (producto mayoritario del metabolismo de la glucosa) en animales viejos.

Octava: La actividad de las enzimas GR y catalasa se encuentra disminuída con la edad, no detectándose diferencias en la actividad de otras enzimas responsables de la eliminación de las especies reactivas del oxígeno.

Novena: La producción de NO por macrófagos peritoneales de rata es dependiente de la edad del animal y del estado funcional del macrófago. Los valores máximos se obtienen en macrófagos activados e independientemente del estado funcional del macrófago, los niveles de síntesis de NO disminúan de forma progresiva con la edad.

Décima: Con el envejecimiento se produce una disminución de la fluidez de membrana así como un aumento en el contenido en colesterol, modificaciones en la composición fosfolipídica y en el contenido en ácidos grasos de los lípidos de dicha estructura.

VII . BIBLIOGRAFIA

- Abo, A., Pick, E., Hall, A., Totty, N., Teehan, C.C. y Segal, A.W. (1991) Activation of the NADPH oxidase involves the small GTP-binding proteina p21-Rac1. *Nature* **353**, 668-670.
- Abu-Soud, H.M. y Stuehr, D.J. (1993) Nitric oxide synthases reveal a role for calmodulin in controlling electron transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 10769-10772.
- Adams, D.O. y Hamilton, T.A. (1984) The cell biology of macrophage activation. *Ann. Rev. Immunol.* **2**, 283-318.
- Agwu, D.E., McPhail, L.C., Chabot, M.C., Daniel, L.W., Wykle, R.L. y McCall, C.E. (1989) Choline-linked phosphoglycerides. A source of phosphatidic acid and diglycerides in stimulated neutrophils. *J. Biol. Chem.* **264**, 1405-1413.
- Albina, J.E., Abate, J.A. y Henry, W.L. (1991) *J. Immunol.* **147**, 1134-1138.
- Allen, R.C. (1975) Halide dependence of the myeloperoxidase-mediated antimicrobial system of the polymorphonuclear leukocytes in the phenomenon of electronic excitation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **63**, 675-683.
- Allen, R.C., Stjernholm, R.L. y Steele, R.H. (1972) Evidence for the generation of an electronic excitation state(s) in human polymorphonuclear leukocytes and its participation in bactericidal activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **47**, 679-684.
- Alvarez, E., Conde, M., Sobrino, F. y Santa María, C. (1995) Free radicals (O_2^- , $NO\cdot$) production decreases with age in rat peritoneal macrophages. *Biochem. J.* (in press).
- Alvarez, E., Ruiz-Gutiérrez, V., Santa María, C. y Machado, A. (1993) Age-dependent modification of lipid composition and lipid structural order parameter of rat peritoneal macrophage membranes. *Mech. Ageing. Dev.* **71**, 1-12.
- Alvarez, E., Santa María, C. y Machado, A. (1993) Respiratory burst reaction changes with age in rat peritoneal macrophages. *Biochim. Biophys. Acta* **1179**, 247-252.

- Ames, B.N. (1989) Endogenous oxidative DNA damage, aging and cancer. *Free Res. Commun.* 7, 121-128.
- Antonini, E., Brunori, M., Greenwood, C. y Malmstrom, B.G. (1970) *Nature (London)* 228, 936.
- Arthur, M.J.P., Kowalski-Saunders, P. y Wright, R. (1986) Corynebacterium parvum-elicited hepatic macrophages demonstrate enhanced respiratory burst activity compared with resident Kupffer cells. *Gastroenterol.* 91, 174-181.
- Arthur, M.J.P., Kowalski-Saunders, P. y Wright, R. (1988) Effect of endotoxin on the release of reactive oxygen intermediates by rat hepatic macrophages. *Gastroenterol.* 95, 1588-1594.
- Aruoma, O.I., Halliwell, B., Gajewski, E. y Dizdaroglu, M. (1991) Copper ion-dependent damage to the bases in DNA in the presence of hydrogen peroxide. *Biochem. J.* 273, 601-604.
- Asaoka, Y., Nakamura, S., Yoshida, K. y Nishizuka, Y. (1992) Protein kinase C, calcium and phospholipid degradation. *Trends Biochem. Sci.* 17, 414-417.
- Assreuy, J., Cunha, F.Q., Liew, F.Y. y Moncada, S. (1993) Feedback inhibition of nitric oxide synthase activity by nitric oxide. *Br. J. Pharmacol.* 108, 833-837.
- Babior, B.M. (1978) Oxygen-dependent microbial killing by phagocytes. *N. Engl. J. Med.* 298, 659-668.
- Babior, B.M. (1991) The respiratory burst oxidase and the molecular basis of chronic granulomatous disease. *Am. J. Hematol.* 37, 263-266.
- Babior, B.M., Kipnes, R.S. y Curnette, J.T. (1973) Biological defense mechanisms. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. *J. Clin. Invest.* 52, 741-744.
- Babior, B.M., Kipnes, R.S. y Curnutte, J.T. (1973) Biological defence mechanism. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. *J. Clin. Invest.* 52, 741-744.

- Badwey, J.A., y Karnovsky, M.L. (1980) Active oxygen species and the functions of phagocytic leukocytes. *Ann. Rev. Biochem.* **49**, 695-726.
- Badwey, J.A., Curnutte, J.T. y Karnovsky, M.L. (1981) cis-Polyunsaturated fatty acids induce high levels of superoxide production by human neutrophils. *J. Biol. Chem.* **256**, 12640-12643.
- Badwey, J.A., Curnutte, J.T., Robinson, J.M., Lazdins, J.K., Briggs, R.T., Karnovsky, M.J. y Karnovsky, M.L. (1980) Comparative aspects of oxidative metabolism of neutrophils from human blood and guinea pig peritoneal : magnitude of the respiratory burst, dependence upon stimulating agents and localization of the oxidases. *J. Cell Physiol.* **105**, 541-551.
- Baehner, R.L. y Nathan, C.D. (1967) *Science* **155**, 835-836.
- Baek, K.J, Thiel, B.A., Lucas, S. y Stuehr, D.J. (1993) Macrophage nitric oxide synthase subunits. Purification, characterization and role of prosthetic groups. *J. Biol. Chem.* **268**, 21120-21129.
- Baggiolini, M., Walz, A. y Kunkel, S.L. (1989) Neutrophil-activating peptide-1/interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils. *J. Clin. Invest.* **84**, 1045-1049.
- Bailey, A.J., Ranta, M.H., Nicholls, A.C., Partridge, S.M. y Elsdon, D.F. (1977) Isolation of α -amino adipic acid from mature dermal collagen and elastin: evidence for an oxidative pathway in the maturation of collagen and elastin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **78**, 1403-1410.
- Baldrige, C.W. y Gerard, R.W. (1933) The extra respiration of phagocytosis. *Am. J. Physiol.* **103**, 235-236.
- Barenholz, Y. y Gatt, S. (1982) Sphingomyelin: metabolism, chemical synthesis, chemical and physical properties. In: *New Comprehensive Biochemistry. Phospholipids* (Hawthorne, J.N., Ansell, G.B., eds), Elsevier Biochemical Press, Amsterdam, **4**, 129.

- Bastian, N.R. y Hibbs, J.R. Jr. (1994) Assembly and regulation of NADPH oxidase and nitric oxide synthase. *Curr. Opin. Immunol.* **6**, 131-139.
- Bauldry, S.A., Eley, K.L. y Bass, D.A. (1992) Activation of NADPH oxidase and phospholipase D in permeabilized neutrophils. Correlation between oxidase activation and phosphatidic acid production. *J. Biol. Chem.* **267**, 25141-25152.
- Beauchamp, C. y Fridovich, I. (1970) A mechanism for the production of ethylene from methional. The generation of the hydroxyl radical by xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.* **245**, 4641-4646
- Becker, H., Munder, G. y Fisher, H. (1958) *Z. Physiol. Chem.* **313**, 266-275.
- Beckmann, J.S., Beckmann, T.W., Chen, J., Marshall, P.A. y Freeman, B.A. (1990) Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 1620-1624.
- Beers, R.F. y Sizer, I.V. (1952) *J. Biol. Chem.* **195**, 133-140.
- Ben-Yehuda, A. y Weksler, M.E. (1992) Host resistance and immune system. *Clin. Ger. Med.* **8**, 701-711.
- Bjorksten, J. (1968) The crosslinkage theory of aging. *J. Am. Ger. Soc.* **16**, 408-427.
- Board, M., Humm, S. y Newsholme, E.A. (1990) Maximum activities of key enzymes of glycolysis, glutaminolysis, pentose phosphate shunt and tricarboxylic acid cycle in normal, neoplastic and suppressed cells. *Biochem. J.* **265**, 503-509.
- Bokoch, G.M., Quilliam, L.A., Bohl, B.P., Jesaitis, A.J. y Quinn, M.T. (1991) Inhibition of Rap1A binding to cytochrome b558 of NADPH oxidase by phosphorylation of Rap1. *Science* **254**, 1794-1796.
- Borochoy, H. y Shinitzky, M. (1976) Vertical displacement of membrane proteins mediated by changes in microviscosity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73**, 4526-4530.

- Borochoy, H., Abbott, R.E., Schachter, D. y Shinitzky, M. (1979) Modulation of erythrocyte membrane proteins by membrane cholesterol and lipid fluidity. *Biochem* **18**, 251-255.
- Borochoy, H., Zahler, P., Walther, W. y Shinitzky, M. (1977) The effect of phosphatidylcholine to sphingomyelin mole ratio on the dynamic properties of sheep erythrocyte membrane. *Biochim. Biophys. Acta* **470**, 382-388.
- Borregaard, N. (1988) In: The respiratory burst and its physiological significance (Ibarra, A.J. and Strauss, R.R., eds.) pp. 1-31. Plenum Press, New York.
- Bradley, S.F., Vibhagool, A., Kunkel, S.L. y Kauffman, C.A. (1989) Monokine secretion in aging and protein malnutrition. *J. Leukoc. Biol.* **45**, 510-514.
- Bredt, D.S. y Snyder, S.H. (1992) Nitric oxide, a novel neuronal messenger. *Neuron* **8**, 3-11.
- Brenner, R.R. (1990) Role of cholesterol in the microsomal membrane. *Lipids* **25**, 581-585.
- Briggs, R.T., Drath, D.B., Karnovsky, M.L. y Karnovsky, M.J. (1975) Localization of NADH oxidase on the surface of human polymorphonuclear leukocytes by a new cytochemical method. *J. Cell. Biol.* **67**, 566-586.
- Bromberg, Y. y Pick, E. (1985) Activation of NADP-dependent superoxide production in a cell-free system by sodium dodecyl sulphate. *J. Biol. Chem.* **260**, 13539-13545.
- Bromberg, Y., Shani, E., Joseph, G., Gorzalczany, Y., Sperling, O. y Pick, E. (1994) The GDP-bound form of the small G protein Rac1 p21 is a potent activator of the superoxide-forming NADPH oxidase of macrophages. *J. Biol. Chem.* **269**, 7055-7058.
- Brouard, C. y Pascaud, M. (1990) Effects of moderate dietary supplementations with n-3 fatty on macrophage and lymphocyte phospholipids and macrophage eicosanoid synthesis in the rat. *Biochim. Biophys. Acta* **1047**, 19-28.

- Bryszewska, M. y Szosland, K. (1988) Association between the glycation of erythrocyte membrane proteins and membrane fluidity. *Clin Biochem* **21**, 49-51.
- Bustos, R. y Sobrino, F. (1989) Control of fructose 2,6-biphosphate levels in rat peritoneal macrophages by glucose an phorbol ester. *FEES Lett* **251**, 143-146.
- Calder, P.C., Yaqoob, P., Harvey, D.J., Watts, A. y Newsholme, E.A. (1994) Incorporation of fatty acids by concanavalin A-stimulated lymphocytes and the effect on fatty acid composition and membrane fluidity. *Biochem. J* **300**, 509-518.
- Candeias, L.P., Patel, K.B., Stratford, M.R.L. y Wardman, P. (1993) Free hydroxyl radicals are formed on reaction between the neutrophil-derived species superoxide anion and hypochlorous acid. *FEES Lett* **333**, 151-153.
- Carmena, M.J., Hueso, C., Guijarro, L.G. y Prieto, J.C. (1991) Cholesterol modulation of membrane fluidity and VIP receptor/effector system in rat prostatic epithelial cells. *Regulatory Peptides(?)* **33**, 287-297.
- Cartee, G.D. (1993) Myocardial GLUT-4 glucose transporter protein levels of rats decline with advancing age. *J Gerontol* **48**, 168-170.
- Chao, CC., Hu, S., Molitor, T.W., Shaskan, E.G. y Peterson, P.K. (1992) Activated microglia mediate neuronal cell injury via nitric oxide mechanism. *J Immunol* **149**, 2736-2741.
- Chapkin, R.S., Miller, C.C., Somers, S.D. y Erickson, K.L. (1988) Utilization of dihomo- δ -linolenic acid (8,11,14-eicosatrienoic acid) by murine peritoneal macrophages. *Biochem Biophys. Acta* **959**, 322-331.
- Chen, J.J. y Yu, B.P. (1994) Alterations in nmtochondrial membrane fluidity by lipid peroxidation products. *Free Radic. Biol. Med.* **17**, 411-418.
- Chiara, M.D., Bedoya, F. y Sobrino, F. (1989) Cyclosporin A inhibits phorbol ester-induce activation of superoxide production in resident mouse peritoneal macrophages. *Biochem. J* **264**, 21-26.

- Christiansen, N.O. (1988) A time-course study on superoxide generation and protein kinase C activation in human neutrophils. *FEBS Lett* **239**, 195-198.
- Cockcroft, S., Nielson, C.P. y Stuchfield, J. (1991) Is phospholipase A₂ activation regulated by G-proteins? *Biochem. Soc. Trans.* **19**, 333-336.
- Cohen, B.M. y Zubenko, G.S. (1985) Aging and biophysical properties of cell membranes. *Life Sci* **37**, 1403-1409.
- Cohn, Z.A. (1978) The activation of mononuclear phagocytes: fact, fancy and future. *J. Immunol.* **121**, 813-816.
- Cook, H.W. y Spence, M.W. (1987) Interaction of (n-3) and (n-6) fatty acids in desaturation and chain elongation of essential fatty acids in cultured glioma cells. *Lipids* **22**, 613-619.
- Corey, E.J., Chuan, S. y Cashman, J.R. (1983) Docosahexanoic acid is a strong inhibitor of prostaglandin but not leukotrienes biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 3581-3584.
- Corraliza, I.M., Campo, M.L., Fuentes, J.M., Campos-Portuguez, S. y Soler, G. (1993) Parallel induction of nitric oxide and glucose-6-phosphate dehydrogenase in activated bone marrow derived macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **196**, 342-347.
- Costa Rosa, L.F.B.P., De Almeida, A.F., Safi, D.A. y Curi, R. (1993) Metabolic and functional changes in lymphocytes and macrophages as induced by ageing. *Physiology Behavior* **53**, 651-656.
- Cross, A.R. y Jones, O.T.G. (1986) The effect of the inhibitor diphenylene iodonium on the superoxide-generating system of neutrophils. Specific labelling of a component polypeptide of the oxidase. *Biochem. J* **237**, 111-116.
- Curi, R., Newsholme, P. y Newsholme, E.A. (1988) Metabolism of pyruvate by isolated rat mesenteric lymphocytes, lymphocyte mitochondria and isolated mouse macrophages. *Biochem. J* **250**, 383-388.

- Curnutte, J.T. (1993) Chronic granulomatous disease: The solving of a clinical riddle at the molecular level. *Clin Immunol Immunopathol* **67**, S2-S15.
- Curnutte, J.T., Badwey, J.A., Robinson, J.M., Karnovsky, M.J. y Karnovsky, M.L. (1984) Studies on the mechanism of superoxide release from human neutrophils stimulated with arachidonate. *J Biol Chem* **259**, 11851-11857.
- Curtis, M.T., Gilfor, D. y Farber, J.L. (1984) Lipid peroxidation increases the molecular order of microsomal membranes. *Arch Biochem Biophys* **235**, 644-649.
- Cutler, R.G. Antioxidants, against and longevity. In W.A. Prior (ed.), *Free Radicals in Biology*, 6, Academic Press, New York, (1984) 371-428.
- Danen, W.C. y Arudi, R.L. (1978) *J. Am. Chem. Soc.* **100**, 3944-3945.
- Davila, d.R., Edwards III, C.K., Arkins, S., Simon, J. y Kelley, K.W. (1990) Interferon- β -induced priming for secretion of superoxide anion and tumor necrosis factor- α declines in macrophages from aged rats. *FASEB J* **4**, 2906-2911.
- De la Fuente, M. y Muñoz, M.L. (1992) Impairment of phagocytic process in macrophages from young and old mice by protein malnutrition. *Ann Nutr Metab* **36**, 41-47.
- De Schrijver, R. y Vermeulen, D. (1991) Separation and quantification of phospholipids in animal tissues by Iastrocan TCL/FID. *Lipids* **26**, 74-75.
- Dean, R.T. y Simpson, J.A. (1991) Free radical damage to proteins and its role in the immune response. *Mol Aspects Med* **12**, 121-128.
- DeChatelet, L.R., Shirley, P.S., McPhail, L.C., Huntley, C.C., Muss, H.B. y Bass, D.A. (1977) Oxidative metabolism of human neutrophil. *Blood* **50**, 525-535.
- Deng, W.D., Thiel, B.A., Tannenbaum, C.S., Hamilton, T.A. y Stuehr, D.J. (1993) Synergistic cooperation between T cell lymphokines for induction of the

nitric oxide synthase gene in murine peritoneal macrophages. *J. Immunol.* **151**, 322-329.

- Dewald, B., Baggiolini, M., Curnette, J.T. y Babior, B.M. (1979) Subcellular localization of the superoxide-forming enzyme in human neutrophils. *J. Clin. Invest.* **63**, 21-29.

- di Giovine, F.S. y Duff, G.W. (1990) Interleukin-1: The first interleukin. *Immunol. Today* **11**, 13-20.

- Diekmann, D., Abo, A., Johnston, C., Segal, A.W. y Hall, A. (1994) Interaction of Rac with p67phox and regulation of phagocytic NADPH oxidase activity. *Science* **265**, 531-533.

- Ding, A., Hwang, S. y Schwab, R. (1994) Effect of aging on murine macrophage. Diminished response to IFN- δ for enhanced oxidative metabolism. *J. Immunol.* **153**, 2146-2152.

- Dorseuil, O., Vázquez, A., Lang, P., Bertoglio, J., Gacon, G. y Leca, G. (1992) Inhibition of superoxide production in B lymphocytes by rac antisense oligonucleotides. *J. Biol. Chem.* **267**, 20540-20542.

- Drath, D.B. y Karnovsky, M.L. (1974) Bactericidal activity of metal-mediated peroxide-ascorbate systems. *Infect. Immunol.* **10**, 1077-1083.

- Dror, Y., Sason, H.F., Watson, J.J. y Johnson B.C. (1970) *Clin. Chem. Acta* **28**, 291-298.

- Dunn, J.A., McChance, D.R., Thrope, S.R., Lyons, T.J. y Baynes, J.W. (1991) Age-dependent accumulation of N-(Carboxymethyl)lysine and N-(Carboxymethyl)hydroxylysine in human skin collagen. *Biochemistry* **30**, 1205-1210.

- Dusi, S., Della Bianca, V., Grzeskowiak, M. y Rossi, F. (1993) Relationship between phosphorylation and translocation to the plasma membrane of p47phox and activation of the NADPH oxidase in normal and Ca²⁺-depleted human neutrophils. *Biochem. J.* **290**, 173-178.

- Emmerling, P., Hof, H. y Finger, H. (1979) Age-related defense against infection with intracellular pathogens. *Gerontology* 25, 327-?
- Ershler, W.B . (1993) The influence of an aging immune system on cancer incidence and progression. *J. Gerontol.* 48, 3-7.
- Esterbauer, H., Eckl, P. y Ortner, A. (1990) Possible mutagens derived from lipids and lipid precursors. *Mutat. Res.* 238, 223-233.
- Feliu, J.E. (1975) Interconvertible forms of class a pyruvate kinasa from Ehrlich Ascites tumor cells. *FEBS Lett* 50, 334-338.
- Ferraris, R.P., Hsiao, H., Hernandez, R. y Hirayama, B. (1993) Site density of mouse intestinal glucose transporters declines with age. *Am. J. Physiol.* 264, 285-295.
- Finger, H., Heymer, B., Wirsing von Köning, C.-H. y Emmerling, P. (1982) Macrophage function in senescence. *Gerontology* 28, 223-232.
- Fink, R.I., Huecksteadt, T. y Karaoghlanian, Z. (1986) The effects of aging on glucose metabolism in adipocytes from Fischer rats. *Endocrinology* 118, 1139-1147.
- Fink, R.I., Wallace, P. y Olefsky, J.M. (1986) Effects of aging on glucose-mediated glucose disposal and glucose transport. *J. Clin. Invest* 77, 2034-2041.
- Fiorini, R., Curatola, G., Bertoli, E., Giorgi, P.L. y Kantar, A. (1990) Changes of fluorescence anisotropy in plasma membrane of human polymorphonuclear leukocytes during the respiratory burst phenomenon. *FEBS Lett* 273, 122-126.
- Fogelman, A.M., Shechter, I., Seager, J., Hokom, M., Child, J.S. y Edwards, P. (1980) Malondialdehyde alteration of low density lipoproteins leads to cholesteryl ester accumulation in human monocyte-macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 2214-2218.
- Folch, J., Lees, M. y Sloan-Stanley, G.H. (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem* 26, 497-509.

- Fridovich, I. (1975) Superoxide dismutases. *Ann Rev. Biochem* **44**, 147-159.
- Fridovich, I. (1989) Superoxide dismutases. An adaptation to a paramagnetic gas. *J. Biol. Chem.* **264**, 7761-7764.
- Fukumoto, Y., Kaibuchi, K., Hori, Y., Fujioka, H., Araki, S., Ueda, T., Kikuchi, A. y Takai, Y. (1990) Molecular cloning and characterization of a novel type of regulatory protein (GDI) for the rho proteins, ras p21-like small GTP-binding proteins. *Oncogene* **5**, 1321-1328.
- Fülöp, T. (1994) Signal transduction changes in granulocytes and lymphocytes with ageing. *Immunol Lett.* **40**, 259-268.
- Fülöp, T., Varga, Z., Csongor, J., Fóris, G. y Leövy, A. (1989) Age related impairment in phosphatidylinositol breakdown of polymorphonuclear granulocytes. *FEBS Lett.* **245**, 249-252.
- Fülöp, T.Jr., Foris, G., Worum, I. y Leovey, A. (1985) Age-dependent alterations of Fc gamma receptor-mediated effector functions of human polymorphonuclear leucocytes. *Clin. Exp. Immunol.* **61**, 425-432.
- Gabig, T.G., Eklund, E.A., Potter, G.B. y Dykes, J.R. (1990) A neutrophil GTP-binding protein that regulates cell free NADPH oxidase activation is located in the cytosolic fraction. *J. Immunol.* **145**, 945-951.
- Gabig, T.G., English, D., Akard, L.P. y Schell, M.J. (1987) Regulation of neutrophil NADPH oxidase activation in a cell-free system by guanine nucleotides and fluoride. *J. Biol. Chem* **262**, 1685.
- Gafni, A. (1990) Altered protein metabolism in aging. *Annu. Rev. Gerontol. Geriatr.* **10**, 117-131.
- Galdiero, F., Carratelli, C.R., Bentivoglio, C., Capasso, C., Cioffi, S., Folgore, A., Gorga, F., Ianniello, R., Mattera, S., Nuzzo, I., Rizzo, A. y Tufano, M.A. (1991) Correlation between modification of membrane phospholipids and some biological activity of lymphocytes, neutrophils and macrophages. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* **13**, 623-642.

- Gardner, P.R. y Fridovich, I. (1991a) Superoxide sensitivity of the Escherichia coli 6-phosphogluconate dehydratase. *J. Biol. Chem.* **266**, 1478-1483.
- Gardner, P.R. y Fridovich, I. (1991b) Superoxide sensitivity of the Escherichia coli aconitase. *J. Biol. Chem.* **266**, 19328-19333.
- Garthwaite, J. (1991) Glutamate, nitric oxide and cell-cell signalling in the nervous system. *Trends Neurosci.* **14**, 60-67.
- Gavino, G.R., Levy, E. y Gavino, V.C. (1992) Essential fatty acid deficiency lowers the activity of the acetylated low density lipoprotein receptor of rat peritoneal macrophages. *Biochem. Cell. Biol.* **70**, 224-227.
- Gazzinelli, R.T., Oswald, I.P., Heiny, S., James, S.L. y Sher, A. (1992) The microbicidal activity of interferon treated macrophages against Trypanosoma cruzi involves an L-arginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitable by interleukin-10 and transforming growth factor- β . *Eur. J. Immunol.* **22**, 2501-2506.
- Goldstein, J.L., Ho, Y.K., Basu, S.K. y Brown, M.S. (1979) Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 333-337.
- Gordillo, E. y Machado, A. (1991) Implication of lysine residues in the loss of 6-phosphogluconate dehydrogenase activity in aging human erythrocytes. *Mech. Ageing Dev.* **59**, 291-297.
- Gordillo, E., Ayala, A., Bautista, J. y Machado, A. (1989) Implication of lysine residues in the loss of enzymatic activity in rat liver 6-phosphogluconate dehydrogenase found in aging. *J. Biol. Chem.* **264**, 17024-1728.
- Gordillo, E., Ayala, A., Lobato, M.F., Bautista, J. y Machado, A. (1988) Possible involvement of histidine residues in the loss of enzymatic activity of rat liver malic enzyme during aging. *J. Biol. Chem.* **263**, 8053-8057.

- Gordon, S., Fraser, I., Nath, D., Hughes, D. y Clarke, S. (1992) Macrophages in tissues and in vitro. *Curr. Opin. Immunol.* **4**, 25-32.
- Green, L.C., Wagner, D.A., Glogowski, J., Skipper, P.L., Wisnok, J.S. y Tannenbaum, S.R. (1982) Analysis of nitrate, nitrite and (15N) nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.* **126**, 131-138.
- Green, S.J., Crawford, R.M., Hockmeyer, J.T., Meltzer, M.S. y Nacy, C.A. (1990) *Leishmania major* amastigotes initiate the L-arginine-dependent mechanism in IFN- γ -stimulated macrophages by induction of tumor necrosis factor- α . *J. Immunol.* **145**, 4290-4297.
- Green, T.R. y Shangguan, X. (1993) Stoichiometry of O₂ metabolism and NADPH oxidation of the cell-free latent oxidase reconstituted from cytosol and solubilized membrane from resting human neutrophils. *J. Biol. Chem.* **268**, 857-861.
- Greenbaum, A.L., Clark, J.B. y McLean, P. (1965) *Biochem. J.* **95**, 161-166.
- Grinstein, S., Furuya, W. y Biggar, W.D. (1986) Cytoplasmic pH regulation in normal and abnormal neutrophils. Role of superoxide generation and Na⁺/H⁺ exchange. *J. Biol. Chem.* **261**, 512-514.
- Gryglewski, R.J., Palmer, R.M.J. y Moncada, S. (1986) Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium vascular relaxing factor. *Nature (Lond.)* **320**, 454-456.
- Halliwell, B. (1992) Reactive oxygen species and the central nervous system. *J. Neurochem.* **59**, 1609-1623.
- Halliwell, B. y Aruoma, O.I. (1991) DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Lett.* **281**, 9-19.
- Halliwell, B. y Gutteridge, J.M.C. (1990a) Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol.* **186**, 1-85.
- Halliwell, B. y Gutteridge, J.M.C. (1990b) The antioxidants of human extracellular fluids. *Arch. Biochem. Biophys.* **280**, 1-8.

- Hamilton J.A., Vairo, G. y Lingelbach, S.R. (1988) Activation and proliferation signals in murine macrophages: stimulation of glucose uptake by hemopoietic growth factors and other agents. *J. Cell. Physiol.* **134**, 405-412.
- Hannan, S.E., Harris, J.O., Sheridan, N.P. y Patel, J.M. (1989) Cigarette smoke alters plasma membrane fluidity of rat alveolar macrophages. *Am. Rev. Respir. Dis.* **140**, 1668-1673.
- Harman, D. (1994) Free-radical theory of aging. *Ann. New York Acad. Sci.* **717**, 1-15.
- Harman, D. Free radical theory of aging: role of free radicals in the origination and evolution of life, aging, and disease processes. In Johnson et al. (Eds) Free radicasls, aging, and degenerative diseases, pp. 3-49, Alan R. Liss. New York. 1986
- Harman, D. Lipofuscin and ceroid formation: the cellular recycling system. In Porta (Ed) Lipofuscin and ceroid pigments, pp. 3-15, Plenum Press, New York. 1990
- Hathway, W.E., Newby, L.A. y Githens, J.H. (1964) *Blood* **23**, 517.
- Hauschildt, S., Scheipers, P. y Bessler, W.G. (1991) Inhibitors of poly (ADP-ribose) polymerase suppress lipopolisaccharide-induced nitrite formation in macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **179**, 865-871.
- Hayashi, Y., Utsuyama, M., Kurashima, C. y Hirokawa, K. (1989) Spontaneous development of organ-specific autoimmune lesions in aged C57BL/6 mice. *Clin. Exp. Immunol.* **78**, 120-126.
- Hayflick, L. Origins of longevity. In Warner MR et al (Eds) Modern biological theories of aging, pp. 21-34, Raven Press. New York. 1987
- Hazelton, G.A. y Lang, C.A. (1985) Glutathione peroxidase and reductase activities in the ageing mouse. *Mech. Ageing Dev.* **29**, 71-78.

- Henderson, L.M., Chappell, J.B. y Jones, O.T.G. (1988) Superoxide generation by the electrogenic NADPH oxidase on human neutrophils is limited by the movement of a compensating charge. *Biochem. J.* **255**, 285-290.
- Henderson, L.M., Moule, S.K. y Chappell, J.B. (1993) The immediate activator of the NADPH oxidase is arachidonate not phosphorylation. *Eur. J. Biochem.* **211**, 157-162.
- Heyneman, R.A. y Vercauteren, R.E. (1984) Activation of a NADPH-dependent oxidase from horse polymorphonuclear leukocytes in a cell-free system. *J. Leuk. Biol.* **36**, 751-759.
- Heyworth, P.G. y Badway, J.A. (1990) Protein phosphorylation associated with the stimulation of neutrophils. Modulation of superoxide production by protein kinase C and calcium. *J. Bioenerg. Biomembr.* **22**, 1-26.
- Heyworth, P.G. y Segal, A.W. (1986) Further evidence for the involvement of a phosphoprotein in the respiratory burst oxidase of human neutrophils. *Biochem. J.* **239**, 723-731.
- Hibbs, J. B. Jr., Vavrin, Z. y Taintor, R.R. (1987) L-arginine is required for expression of the activated macrophage effector mechanism causing selective metabolic inhibition in target cells. *J. Immunol.* **138**, 550-565.
- Hibbs, J.B.Jr., Taintor, R.R., Vavrin, Z., Granger, D.L., Drapier, J.C., Amber, L.J. y Lancaster, J.R.Jr. In Nitric Oxide from L-Arginine: A Bioregulatory System, ed. by S. Moncada y E.A Higgs, pp. 189-223, Elsevier, Amsterdam. 1990
- Hirokawa, K. (1992) Understanding the mechanism of the age-related decline in immune function. *Nutr. Rev.* **50**, 361-366.
- Hirokawa, K. Aging and the immune system. In Kligman A.M. and Takase Y. (Eds.) Cutaneous Aging, 61-78, University of Tokyo Press. 1988
- Hirokawa, K., Utsuyama, M., Goto, H. y Kuramoto, K. (1984) Differential rate of age-related decline in immune functions in genetically defined mice with different tumor incidence and life span. *Gerontology* **30**, 223.

- Hirokawa, K., Utsuyama, M., Kasai, M. y Kurashima, C. (1992) Aging and Immunity. *Acta Phat. Jap.* **42**, 537-548.
- Holmes, B, Page, A.R. y Good, R.A. (1967) *J. Clin. Invest.* **46**, 1422-1432.
- Hsu, R.Y. y Lardy, H.A. (1966) Pigeon liver malic enzyme. *J. Biol. Chem.* **242**, 520-526.
- Imai, Y., Kolb, H. y Burkart, V. (1993) Nitric oxide production from macrophages is regulated by arachidonic acid metabolites. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **197**, 105-109.
- Imajoh-Ohmi, S., Tokita, H., Ochiai, M., Nakamura, M. y Kanegasaki, J. (1992) Topology of cytochrome b558 in neutrophil membrane analyzed by anti-peptide antibodies and proteolysis. *J. Biol. Chem.* **267**, 180-184.
- Inamizu, T., Chang, M.P. y Makinodan, T. (1985) Influence of age on the production and regulation of interleukin-1 in mice. *Immunology* **55**, 447-455.
- Ischiropoulos, H., Zhu, L. y Beckman, J.S. (1992) Peroxynitrite formation from macrophage-derived nitric oxide. *Arch. Biochem. Biophys.* **298**, 446-451.
- Iyer, G.Y.N., Islam, D.M.F. y Quastel, H.J. (1961) Biochemical aspects of phagocytosis. *Nature* **192**, 535-541.
- Jessup, W., Mohr, D., Gieseg, S.P., Dean, R.T. y Stocker, R. (1992) The participation of nitric oxide in cell free-and its restriction of macrophage-mediated oxidation of low-density lipoprotein. *Biochem. Biophys. Acta* **1180**, 73-82.
- Johnston, R.B.Jr., Godzik, C.A. y Cohn, Z.A. (1978) Increased superoxide anion production by immunologically activated and chemically elicited macrophages. *J. Exp. Med.* **148**, 115-127.
- Karnousky, M.J. (1994) Cytochemistry and reactive oxygen species: a retrospective. *Histochem.* **102**, 15-27.

- Khan, A.U. (1981) Direct spectral evidence of the generation of singlet molecular oxygen in the reaction of potassium superoxide with water. *J. Am. Chem. Soc.* **103**, 6516-6517.
- Kim, Y.T., Siskind, G.W. y Weksler, M.E. Cellular basis of the impaired immune response of elderly humans. In Fauci, B., Human B cell functions: activation and immuno-regulation, Raven Press, New York. 1981
- Klatt, P., Schmidt, K., Uray, G. y Mayer, B. (1993) Multiple catalytic functions of brain nitric oxide synthase. Biochemical characterization, cofactor-requirement, and the role of N-omega hydroxy-L-arginine as an intermediate. *J. Biol. Chem.* **268**, 14781-14787.
- Klebanoff, S.J. (1970) Myeloperoxidase contribution to the microbicidal activity of intact leukocytes. *Science* **169**, 1095-1097.
- Klebanoff, S.J. y Clark, R.A. (1978) The neutrophil: function and clinical disorder. North Holland Publishing Co., Amsterdam.
- Klebanoff, S.J., Vadas, M.A., Harlan, J.M., Sparks, L.H., Gamble, J.R., Agosti, J.M. y Waltersdorff, A.M. (1986) Stimulation of neutrophils by tumor necrosis factor. *J. Immunol.* **136**, 4220-4225.
- Kleinberg, M.E., Rotrosen, D. y Malech, H.L. (1989) Asparagine-linked glycosylation of cytochrome b558 large subunit varies in different human phagocytic cells. *J. Immunol.* **143**, 4152-4157.
- Knaus, U.G., Heyworth, P.G., Evans, T., Curnutte, J.T. y Bokoch, G.M. (1991) Regulation of phagocyte oxygen radical production by the GTP-binding protein Rac 2. *Science* **254**, 1512-1515.
- Kohn, R.R. Aging and age-related diseases: normal processes. In Johnson (Ed.) Relation between normal aging and disease, pp. 1-44, Raven Press. New York. 1985
- Koster, J.F., Slee, R.G., Nontfoort, A., Lang, J. y Esterbauer, H. (1986) Comparison of the inactivation of microsomal glucose-6-phosphatase by in situ

lipid peroxidation-derived 4-hydroxynonenal and exogenous 4-hydroxynonenal. *Free Rad. Res. Comm.* **1**, 273-287.

- Kramer, I.M., Van der Bend, R.L., Tool, A.T.J., Van Blitterswijk, W.J., Roos, D. y Verhoeven, A.J. (1989) 1-O-hexadecyl-2-O-methylglycerol, a novel inhibitor of protein kinase C, inhibits the respiratory burst in human neutrophils. *J. Biol. Chem.* **264**, 5876-5884.

- Kuo, P., Weinfeld, M., Rudd, M.A. y col. (1990) Plasma membrane enrichment with cis-unsaturated fatty acids enhances LDL metabolism in U937-monocytes. *Arteriosclerosis(Dallas)* **10**, 111-118.

- Kwon, N.S., Stuehr, D.J. y Nathan, C.F. (1991) Inhibition of tumor cell ribonucleotide reductase by macrophage-derived nitric oxide. *J. Exp. Med.* **174**, 761-767.

- Laganiere, S. y Fernandes, G. (1991) Study on the lipid composition of aging Fischer 344 rat lymphoid cells: Effect of long-term calorie restriction. *Lipids* **26**, 472-478.

- Lamas, S., Marsden, P.A., Li, G.K., Tempst, P. y Michel, T. (1992) Endothelial nitric oxide synthase: molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 6348-6352.

- Lampert, M.B. y Weiss, S.J. (1983) The chlorinating potential of the human monocyte. *Blood* **63**, 645-651.

- Lancaster, J.R.Jr. y Hibbs, J.B.Jr. (1990) EPR Demonstration of iron-nitrosyl complex formation by cytotoxic activated macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 1223-1227.

- Landon, B.R. y Wood, H.G. (1983) *Trends Biochem. Sci.* **8**, 292-296.

- Largermans, J.A.M., Van der Hulst, M.E.B., Nibbering, P.H., Hiemstra, P.S., Fransen, L. y Van Furth, R. (1992) IFN- γ induced L-arginine-dependent toxoplasmastatic activity in murine peritoneal macrophages is mediated by endogenous tumor necrosis factor- α . *J. Immunol.* **148**, 568-574.

- Laskin, D.L., Gardner, C.R. y Laskin, J.D. (1987) Induction of chemotaxis in mouse peritoneal macrophages by activators of protein Kinase C. *J. Leukoc. Biol.* **41**, 474-480.
- Lavie, L. (1992) Age-related alterations in respiratory burst activation induced by various stimuli in mouse peritoneal macrophages treated with thermal stress. *Arch. Gerontol. Geriatr.* **3**, 203-218.
- Lavie, L. (1994) The macrophage in cell biology of aging. *Arch. Gerontol. Geriatr.* **4**, 129-138.
- Lawrence, R.A. y Burk, R.F. (1976) Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **71**, 952-958.
- Le, J y Vilcek, J. (1987) Tumor necrosis factor and interleukin 1: Cytokines with multiple overlapping biological activities. *Lab. Invest.* **56**, 234-248.
- Levy, H.R., Raineri, R.R. y Nevaldine, B.H. (1966) *J. Biol. Chem.* **241**, 2181-2187.
- Lippman, R. In: Miquel, J., Quintanilha, A.T. y Weber, H. Edes. *Handbook of Free Radicals and Antioxidants in Biomedicine*, Boca Raton, FL: CRC Press, Vol. I: pp 187-197. 1989
- Lipschitz, D.A, Udupa, K.B. y Boxer, L.A. (1988) The role of calcium en the age-related decline of neutrophil function. *Blood* **71**, 659-665.
- Lipschitz, D.A., Udupa, K.B., Indelicato, S.R. y Das, M. (1991) Effect of age on second messenger generation in neutrophils. *Blood* **78**, 1347-1354.
- Lopeztorres, M., Shindo, Y y Packer, L. (1994) Effect of age on antioxidants and molecular markers of oxidative damage in murine epidermis and dermis. *J. Invest. Dermatol.* **102**, 476-480.
- Lowenstein, C.J. y Snyder, S.H. (1992) Nitric oxide, a novel bilolgic messenger. *Cell* **70**, 705-707.

- Lupa, V.A., Podolin, D.A., Roth, D.A. and Mazzeo, R.S. (1994) Influence of aging and endurance training on lactate dehydrogenase in liver and skeletal muscle. *Mech. Ageing Dev.* **75**, 191-204.
- Luscher, T.F. (1990) Imbalance of endothelium-derived relaxing and contracting factors. A new concept in hypertension?. *Am. J. Hypertens.* **3**, 317-330.
- Mahoney, E.M., Hamill, A.I., Scott, W.A. y Cohn, Z.A. (1977) Response of endocytosis to altered fatty acyl composition of macrophage phospholipids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 4895-4899.
- Mahoney, E.M., Scott, W.A., Landsberger, F.R., Hamill, A.L. y Cohn, Z.A. (1980) Influence of fatty acyl substitution on the composition and function of macrophage membranes. *J. Biol. Chem.* **255**, 4910-4917.
- Majumdar, S., Rossi, M.W., Fujiki, T., Phillips, W.A., Din, S., Queen, C.F., Johnston, R.B., Rosen, O.M., Corkey, B.E. y Korchak, H.M. (1991) Cisotypes and signaling in neutrophils. Differential substrate specificities of a translocatable calcium- and phospholipid-dependent protein kinase which is inhibited by long chain fatty acyl coenzyme A. *J. Biol. Chem.* **266**, 9285-9294.
- Makinodan, T. y Kay, M.M.B. (1980) Age influence on the immune system. *Adv. Immunol.* **29**, 287-330.
- Maly, F.E., Nakamura, M., Gauchat, J.F., Urwyler, A., Walker, C., Dahinden, C.A., Cross, A.R., Jones, O.T.G. y de Weck, A.L. (1989) Superoxide-dependent nitroblue tetrazolium reduction and expression of cytochrome b-245 components by human tonsillar B lymphocytes and B cell lines. *J. Immunol.* **142**, 1260-1267.
- Marin, M.S., Fernandez, A., Sanchez-Yague, J., Cabezas, J.A. y Lanillo, M. (1990) Changes in the phospholipid and fatty acid composition in normal erythrocytes from sheep of different ages. Aminophospholipid organization in the membrane bilayer. *Biochimie* **72**, 745-750.
- Markwell, M.A.K., Haas, S.M. Bieber, L.L., y Tolbert, N.E. (1978) Modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal. Biochem.* **87**, 206-210.

- Martin, J.H.J. y Edwards, S.W. (1994) Interferon- δ enhances monocyte cytotoxicity via enhanced reactive oxygen intermediate production. Absence of an effect on macrophage cytotoxicity is due to failure to enhance reactive nitrogen intermediate production. *Immunol.* **81**, 592-597.
- Masuda, M., Komiyama, Y., Murakami, T., Murata, K., Hasui, M., Hirabayashi, Y. y Kobayashi, Y. (1990) Difference in changes of membrane fluidity of polymorphonuclear leukocytes stimulated with phorbol myristate acetate and formil-methionyl-leucyl-phenylalanine: role of excited oxygen species. *J. Leukocyte Biol.* **47**, 105-110.
- Matsubara, T. y Ziff, M. (1986) Increased superoxide anion release from human endothelial cells in response to cytokines. *J. Immunol.* **137**, 3295-3298.
- McCord, J.M. (1993) Human disease, free radicals, and the oxidant/antioxidant balance. *Clin. Biochem.* **26**, 351-357.
- McCord, J.M. y Fridovich, I. (1969) Superoxide dismutase: An enzymic function for erythrocyte protein (hemocyanin). *J. Biol. Chem.* **244**, 6049-6055.
- McPhail, L.C., Qualliotine-Mann, D., Agwu, D.E. y McCall, C.E. (1993) Phospholipases and activation of the NADPH oxidase. *Eur. J. Haematol.* **51**, 294-300.
- McPhail, L.C., Strum, S.L., Leone, P.A. y Sozzani, S. In: Coffey, R.G., ed. Granulocyte Responses to Cytokines. Basic and Clinical Research, Immunol Ser, vol. 57, NY, Marcel Dekker, Inc., 57:47-76. 1992
- Meier, B., Radecke, H.H., Selle, S., Younes, M., Sies, H., Resch, K. y Habermehl, G.G. (1989) Human fibroblasts release reactive oxygen species in response to interleukin-1 or tumor necrosis factor-alpha. *Biochem. J.* **263**, 539-545.
- Metcalf, D. (1991) Control of granulocytes and macrophages: molecular, cellular, and clinical aspects. *Science* **254**, 529-533.

- Metchnikoff, E. (1905) Immunity to infectious diseases. Cambridge/London/NY: Cambridge Univ. Press.
- Miller, R.A. Aging and the immune response. In E.L. Scheider and J.W. Rowe (Eds.), Handbook of the biology of aging (third edition), 157-180, Academic Press, New York. 1990
- Mills, C.D. (1991) Molecular basis of "supressor" macrophages: arginine metabolism via the NO synthase pathway. *J. Immunol.* **146**, 2719-2723.
- Miyahara, M., Okimasu, E., Uchida, H., Eisuke, S.F., Sato, F., Yamamoto, M. y Utsumi, K. (1988) Charge-dependent regulation of NADPH-oxidase activities in intact and subcellular systems of polymorphonuclear leukocytes. *Biochem. Biophys. Acta* **971**, 46-54.
- Molina, M.T., Vazquez, C.M. y Ruiz-Gutierrez, V. (1989) Changes in both acyl-CoA:cholesterol acyl-transferase activity and microsomal lipid composition in rat liver induced by distal-small-bowel resection. *Biochem. J.* **260**, 115-119.
- Molina, M.T., Vazquez, C.M. y Ruiz-Gutierrez, V. (1990) Changes in fatty acid composition of rat liver and serum induced by distal small bowel resection. *J. Nutr. Biochem.* **1**, 299-304.
- Moncada, S. (1992) The L-arginine nitric oxide pathway. *Acta Physiol. Scand.* **145**, 201-227.
- Moncada, S., Palmer, R.M.J. y Higgs, E.A. (1991) Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* **43**, 109-142.
- Morel, F., Doussiere, J. y Vignais, P.V. (1991) The superoxide-generating oxidase of phagocytic cells. *Eur. J. Biochem.* **201**, 523-546.
- Mosier, D.E. (1984) Separation of macrophages on plastic and glass surfaces *Method Enzymol.* **108**, 294-297.
- Mulligan, M.S., Hevel, J.M., Marletta, M.A. y Ward, P.A. (1991) Tissue injury caused by deposition of immune complexes is L-arginine dependent. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 6338-6342.

- Mulsch, A., Hauschildt, S., Bessler, W.G., Bassenge, E. y Busse, R. In Nitric Oxide from L-Aginine: A Bioregulatory System, ed. by S. Moncada y E.S. Higgs, pp. 235-242, Elsevier, Amsterdam. 1990
- Murakami, K., Blei, F., Tilton, W., Seaman, C. y Piomelli, S. (1989) An isoenzyme of hexoquinase specific for the human red blood cell (HK_R). *Blood* **75**, 770-775.
- Muriana, F.J.G., Ruiz-Gutiérrez, V., Blaya, J.A. y Bolufer, J. (1993) Lipid and fatty acid composition of hepatopancreatic brush-border membrane vesicles from the prawn *Penaeus japonicus*. *J. Biochem* **113**, 625-629.
- Nacy, C.A. y Meltzer, M.S. (1991) T-cell-mediated activation of macrophages. *Curr. Opin. Immunol.* **3**, 330-335.
- Nacy, C.A., Fortier, A.H., Meltzer, M.S., Buchmeier, N.A. y Schreiber, R.D. (1985) Macrophage activation to kill *Leishmania major*: activation of macrophages for intracellular destruction of amastigotes can be induced by both recombinant interferon-gamma and non-interferon lymphokines. *J. Immunol.* **135**, 3505-3511.
- Nagel, J.E., Pyle, R.S., Chrest, F.J. y Adler, W.H. (1982) Oxidative metabolism and bactericidal capacity of polymorphonuclear leukocytes from normal young and aged adults. *J. Gerontol.* **37**, 529-534.
- Nathan, C. y Xie, Q-W. (1994) Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *J. Biol. Chem.* **269**, 13725-13728. ?La borre por error. Ver
- Nathan, C.F. (1986) In: Mechanism of Host Resistance to Infectious Agents, Tumor, and Allografts, R.M. Steinman and R. J. North, (Eds.) Rockefeller University Press, New York, pp. 165-184.
- Nathan, C.F. (1992) Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J.* **6**, 3051-3064.
- Nathan, C.F. y Hibbs, J.B.Jr. (1991) Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Curr. Opin. Immunol.* **3**, 65-70.

- Nauseef, W.M., Volpp, B.D. y Clark, R.A. (1990) Immunochemical and electrophoretic analyses of phosphorylated native and recombinant neutrophil oxidase component p47-phox. *Blood* **76**, 2622-2629.
- Nauseef, W.M., Volpp, B.D., McCormick, S., Leidal, K.G. y Clark, R.A. (1991) Assembly of the neutrophil respiratory burst oxidase. Protein kinase C promotes cytoskeletal and membrane association of cytosolic oxidase components. *J. Biol. Chem.* **266**, 5911-5917.
- Newsholme, P., Gordon, S. y Newsholme, E.A. (1987) Rates of utilization and fates of glucose, glutamine, pyruvate, fatty acids and ketone bodies by mouse macrophages. *Biochem. J.* **242**, 631-636.
- Newsholme, P., R., Curi, R., Gordon, S. y Newsholme, E.A. (1986) Metabolism of glucose, glutamine, long-chain fatty acids and ketone bodies by murine macrophages. *Biochem. J.* **239**, 121-125.
- Nielsen, H., Blom, J. y Larsen, S.O. (1984) Human blood monocyte function in relation to age. *Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand* **92**, 5-10.
- Nielson, C.P. y Hindson, D.A. (1989) Inhibition of polymorphonuclear leukocyte respiratory burst by elevated glucose concentrations in vitro. *Diabetes* **38**, 1031-1035.
- Nielson, C.P., Bayer, C., Hodson, S. y Hadjokas, N. (1992) Regulation of the respiratory burst by cyclic 3',5'-AMP, an association with inhibition of arachidonic acid release. *J. Immunol.* **149**, 4036-4040.
- Niwa, Y., Kasama, T., Miachi, Y. y Kanoh, T. (1989) Neutrophil chemotaxis, phagocytosis and parameters of reactive oxygen species in human aging. *Life Sci.* **44**, 1655-1664.
- Nohl, N. (1993) Involvement of free radicals in ageing: a consequence or cause of senescence. *Fr. Med. Bull.* **49**, 653-667.

- Nowak, D., Piasecka, G., Pietras, T. y Antczak, A. (1991) Effect of ascorbic acid on killing of lymphocytes and macrophages by hydrogen peroxide. *Biomed. Biochem. Acta* **50**, No 9, 1079-1086.
- Ohta, H., Okajima, F. y Ui, M. (1985) Inhibition by islet-activating protein of a chemotactic peptide-induced early breakdown of inositol phospholipids and Ca²⁺ mobilization in guinea pig neutrophils. *J. Biol. Chem.* **260**, 15771-15780.
- Oka, Y., Asano, T., Lin, J-L., Tsukuda, K., Katagiri, H., Ishihara, H., Inukai, K. y Yazaki, Y. (1992) Expression of glucose transporter isoforms with aging. *Gerontology* **38**, 3-9.
- Oswald, I.P., Eltoun, I., Wynn, T.A., Schartz, B., Paulin, D., Sher, A. y James, S.L. (1994) Endothelial cells are activated by cytokine to kill an intravascular parasite, *Schistosoma mansoni*, through the production of nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 999-1003.
- Oswald, I.P., Wynn, T.A., Sher, A. y James, S.L. (1994) NO as an effector molecule of parasite killing: modulation of its synthesis by cytokines. *Comp. Biochem. Physiol.* **108**, 11-18.
- Park, J-W., Ma, M., Ruedi, J.M., Smith, R.M. y Babior, B.M. (1992) The cytosolic components of the respiratory burst oxidase exist as a M(r) approximately 240,000 complex that acquires a membrane-binding site during activation of the oxidase in a cell-free system. *J. Biol. Chem.* **267**, 17327-17332.
- Pellat-Deceunynck, C., Wietzerbin, J. y Drapier, J-C. (1994) Nicotinamide inhibits nitric oxide synthase mRNA induction in activated macrophages. *Biochem. J.* **297**, 53-58.
- Pellmar, T.C., Hollinden, G.E. y Sarvey, J.M. (1991) Free radicals accelerate the decay of long-term potentiation in field CA1 of guinea-pig hippocampus. *Neuroscience* **44**, 353-359.
- Perez-Campo, R., López-Torres, M., Paton, D., Sequeros, E. y Barja de Quiroga, G. (1990) Lung antioxidant enzymes, peroxidation, glutathione system and oxygen consumption in catalase inactivated young and old Rana Perezi frogs. *Mech. Ageing Dev.* **56**, 281-292.

- Pérez-Mera, M.L., Carnero, D.G. y Rey-Méndez, M. (1991) Effect of age on the proportion of mouse bone marrow cells migrating in response to newborn thymus supernatant. *Thymus* **18**, 237-241.
- Pick, E., Gorzalczany, Y. y Engel, S. (1993) Role of the rac1 p21-GDP-dissociation inhibitor for rho heterodimer in the activation of the superoxide-forming NADPH oxidase of macrophage. *Eur. J. Biochem.* **217**, 441-455.
- Pottel, H., Van de Meer, W. y Herreman, W. (1983) Correlation between the order parameter and the steady-state fluorescence anisotropy of 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene and an evaluation of membrane fluidity. *Biochim. Biophys. Acta*, **730**, 181-186.
- Quie, P.G., White, J.G., Holmes, B. y Goold R.A. (1967) *J. Clin. Invest.* **46**, 668-679.
- Quinn, M.T., Mullen, M.L. y Jesaitis, A.J. (1992a) Human neutrophil cytochrome b contains multiple hemes. Evidence for heme associated with both subunits. *J. Biol. Chem.* **267**, 7303-7309.
- Quinn, M.T., Mullen, M.L., Jesaitis, A.J. y Linner, J.G. (1992b) Subcellular distribution of the Rap1A protein human neutrophils: colocalization and cotranslocation with cytochrome b559. *Blood* **79**, 1563-1573.
- Rao, G., Xia. E. y Richardson, A. (1990) Effect of age on the expression of antioxidant enzymes in male Fischer F344 rats. *Mech. Ageing Dev.* **53**, 49-60.
- Recasens, J.F y Green, K. (1992) The effects of age and inflammation on antioxidant enzyme activity in the eye. *Age* **15**, 114-117.
- Reckelhoff, J.F., Kellum, J.A., Blanchard, E.J., Bacon, E.E., Wesley, A.J. y Kruckeberg, W.C. (1994) Changes in nitric oxide precursor, L-arginine, and metabolites, nitrate and nitrite, with aging. *Life Sci.* **55**, 1985-1902.
- Ref. monocitos

- Rest, R.F., Farrell, C.F. y Naidu, F.L. (1988) Mannose inhibits the human neutrophil oxidative burst. *J. Leukoc. Biol.* **43**, 158-164.
- Revilla, E., Fabregat, I., Santa María, C. y Machado, A. (1987) The NADPH-producing pathways (pentose phosphate and malic enzyme) are regulated by the NADPH consumption in rat mammary gland. *Biochem. Int.* **14**, 957-962.
- Riley, J.C.M. y Behrman, H.R. (1991) Oxygen radicals and reactive oxygen species in reproduction. *P. S.E.B.M. (?)* **198**, 781-791.
- Rist, R.J., Jones, G.E. y Naftalin, R.J. (1990) Synergistic activation of 2-deoxy-D-glucose uptake in rat and murine peritoneal macrophages by human macrophage colony-stimulating factor-stimulated coupling between transport and hexokinase activity and phorbol-dependent stimulation of pentose phosphate-shunt activity. *Biochem. J.* **265**, 243-249.
- Rivnay, B., Globerson, A. y Shinitzky, M. (1979) Viscosity of lymphocyte plasma membrane in aging mice and its possible relation to serum cholesterol. *Mech. Ageing Dev.* **10**, 71-77.
- Roberts-Thomson, I.C., Whittingham, S., Youngchaiyud, U. y Mackay, I.R. (1974) Ageing, immune response and mortality. *Lancet* **2**, 368-370.
- Rogers, N.E. y Ignarro, L.J. (1992) Constitutive nitric oxide synthase from cerebellum is reversibly inhibited by nitric oxide formed from L-arginine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **189**, 242-249.
- Rohrer, L. The acetylated low-density lipoprotein receptor or macrophage scavenger receptor. In P.C. Weber and A. Leaf (eds.), *Atherosclerosis Reviews*, 23, Raven, New York, 1991.
- Root, R.K. y Metcalf, J.A. (1977) H₂O₂ release from human granulocytes during phagocytosis. Relationship to superoxide anion formation and cellular catabolism of H₂O₂: studies with normal and cytochalasin B-treated cells. *J. Clin. Invest.* **60**, 1266-1279.

- Root, R.K., Metcalf, J.A., Oshino, N, y Chance, B. (1975) H₂O₂ release from human granulocytes during phagocytosis. Documentation, quantification, and some regulating factors. *J. Clin. Invest.* **55**, 945-955.
- Ross, D., Voetman, A.A. y Meerhof, L.J. (1983) Functional activity of enucleated human polymorphonuclear leukocytes. *J. Cell. Biol.* **97**, 368-377.
- Ross, P. (1986) *Biochim. Biophys. Acta* **853**, 65-89. BUSCAR
- Rossi, F. (1986) The O₂⁻-forming NADPH oxidase of the phagocytes: nature, mechanisms of activation and function. *Biochim. Biophys. Acta* **853**, 65-89.
- Rossi, F. y Zatti, M. (1964) *Br. J. Exp. Path.* **45**, 548-559.
- Rotrosen, D., Kleinberg, M.E., Nunoi, H., Leto, T., Gallin, J.I. y Malech, H.L. (1990) Evidence for a functional cytoplasmic domain of phagocyte oxidase cytochrome b₅₅₈. *J. Biol. Chem.* **265**, 8745-8750.
- Rotrosen, D. y Leto, T.L. (1990) Phosphorylation of neutrophil 47-kDa cytosolic oxidase factor. Translocation to membrane is associated with distinct phosphorylation events. *J. Biol. Chem.* **265**, 19910-19915.
- Rubinek, T. y Levy, R. (1993) Arachidonic acid increases the activity of the assembled NADPH oxidase in cytoplasmic membranes and endosomes. *Biochem. Biophys. Acta* **1176**, 51-58.
- Rudd, A.G. y Banerjee, D.K. (1989) Interleukin-1 production by human monocytes in ageing and disease. *Age Ageing* **18**, 43-46.
- Ruiz-Gutierrez, V., Cert, A. y Rios, J.J. (1989) Determination of phospholipid and triacylglycerol composition of rat caecal mucosa. *J. Chromatogr.* **575**, 1-6.
- Salin, M.L. y McCord, J.M. (1974) Superoxide dismutases in polymorphonuclear leukocytes. *J. Clin. Invest.* **54**, 1005-1009.
- Santa María, C. y Machado, A. (1986) Age and sex related differences in some rat renal NADPH-consuming detoxification enzymes. *Arch. Gerontol. Geriatr.* **5**, 235-247.

- Santa María, C. y Machado, A. (1988) Changes in some hepatic enzyme activities related to phase II drug metabolism in male and female rats as a function of age. *Mech. Ageing Dev.* **44**, 115-125.
- Sbarra, A.J. y Karnovsky, M.L. (1959) The biochemical basis of phagocytosis. Metabolic changes during the ingestion of particles by polymorphonuclear leukocytes. *J. Biol. Chem.* **234**, 1355-1362.
- Schmidt, H.H.H.W., Pollack, J.S., Nakane, M., Forstermann, U., Murad, M. (1992) Ca²⁺/calmodulin-regulated nitric oxide synthases. *Cell Calcium* **13**, 427-434.
- Schneider, C., Zanetti, M. y Romeo, D. (1981) Surface-reactive stimuli selectively increase protein phosphorylation in human neutrophils. *FEBS Lett.* **127**, 4-8.
- Schroeder, F. (1984) Role of membrane lipid asymetry in aging. *Neurobiol. Ageing* **4**, 323-333.
- Schultz, P.J. y Tolins, J.P. (1993) Adaptation to increased dietary salt intake in the rat. Role of endogenous nitric oxide. *J. Clin. Invest.* **91**, 642-650.
- Schwacha, M.G., Gudewicz, P.W., Snyder, J.A. y Loegering, D.J. (1993) Depression of macrophage respiratory burst capacity and arachidonic acid release after Fc receptor-mediated phagocytosis. *J. Immunol.* **150**, 236-245.
- Scott, P., James, S.L. y Sher, A. (1985) The respiratory burst is not required for killing of intracellular and extracellular parasite killing. *Eur. J. Immunol.* **15**, 553-558.
- Scott, R.B., Wood, H.E., Matin, S., Kukreja, R.C. y Hess, M.L. (1990) Superoxide radical production after phorbol ester stimulation in neutrophils of aged donors. *Exp. Gerontol.* **25**, 523-532.
- Sebaldt, R.J., Prpic, V., Hollenbach, P.W., Adams, D.O. y Uhing, R.J. (1991) IFN-gamma potentiates the accumulation of diacylglycerol in murine macrophages. *J. Immunol.* **145**, 684-689.

- Segal, A. y Abo, A. (1993) The biochemical basis of the NADPH oxidase of phagocytes. *Trends Biochem. Sci.* **18**, 43-47. (Ref Esquemas)
- Segal, A.W. (1987) Absence of both cytochrome b₂₄₅ subunits from neutrophils in X-linked chronic granulomatous disease. *Nature* **326**, 88-91.
- Segal, A.W. y Jones, O.T.G. (1978) Novel cytochrome b system in phagocytic vacuoles from human granulocytes. *Nature* **276**, 515-517.
- Segal, A.W., West, I., Wientjes, F., Nugent, J.H.A., Chavan, A.J., Haley, B., Rosen, R.C. y Scrace, G. (1992) Cytochrome b₂₄₅ is a flavocytochrome containing FAD and the NADPH-binding site of the microbicidal oxidase of phagocytes. *Biochem. J.* **284**, 781-788.
- Serven, A., Wakelam, M.J.O. y Liew, F.Y. (1992) The role of protein kinase C in the induction of nitric oxide synthesis by murine macrophage. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **188**, 997-1002.
- Shantha, N.C. y Ackman, R.G. (1990) *Lipids* **25**, 570-574.
- Shimizu, S., Saitoh, Y., Yamamoto, T. y Momose, K. (1994) Stimulation by hydrogen peroxide of L-arginine metabolism to L-citrulline coupled with nitric oxide synthesis in cultured endothelial cell. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* **84**, 315-329.
- Shinitzky, M. y Barenholz, Y. (1978) Fluidity parameters of lipid regions determined by fluorescence polarization. *Biochem. Biophys. Acta* **515**, 367-394.
- Simchowicz, L., Metha, J. y Spilberg, I. (1979) *Arthritis and Rheumatism* **22**, 755-763.
- Smith, R.M. y Curnutte, J.T. (1991) Molecular basis of chronic granulomatous disease. *Blood* **77**, 673-686.
- Snow (1987) *Buscar*.

- Snow, E.C. (1988) An evaluation of antigen-driven expansion and differentiation of hapten-specific B lymphocytes purified from aged mice. *J. Immunol.* **139**, 1758-1762.
- Snyderman, R. y Uhing, J. In *Inflammation: basic principles and clinical correlates* (Gallin, J.I., Goldstein, I.M. y Snyderman, R., eds) vol. 19, pp. 311-323, Raven Press, New York. 1988
- Sohal, R.S., Arnold, L.H. y Orr, W.C. (1990a) Effect of age on superoxide dismutase, catalase, glutathione reductase, inorganic peroxides, TBA-reactive material, GSH/GSSG, NADPH/NADP⁺ in *Drosophila Melanogaster*. *Mech. Ageing Dev.* **56**, 233-235.
- Sohal, R.S., Arnold, L.A. y Sohal, B.H. (1990b) Age-related changes in antioxidant enzymes and peroxidant generation in tissues of the rat with special references to parameters in two insect species. *Free Rad. Biol. Med.* **10**, 495-500.
- Somers, S.D., Weiel, J.E., Hamilton, T.A. y Adams, D.O. (1986) Phorbol esters and calcium ionophore can prime murine peritoneal macrophages for tumor cell destruction. *J. Immunol.* **136**, 4199-4203.
- Sporn, P.H.S., Marshall, T.M. y Peters-Golden, M. (1992) Hydrogen peroxide increases the availability of arachidonic acid for oxidative metabolism by inhibiting acylation into phospholipids in the alveolar macrophages. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* **7**, 307-316.
- Srere, P.A. (1969) Citrate synthase. *Meth. Enzymol.* **13**, 3-11.
- Stadtman, E.R. (1988) Minireview. Protein modification with aging. *J. Gerontol.* **43**, 112-120.
- Stadtman, E.R. (1990) Metal iron-catalysed oxidation of proteins: biochemical mechanism and biological consequences. *Free Radic. Biol. Med.* **9**, 315-325.
- Staehelin, H., Karnovsky, M.L., Farnham, A.E. y Suter, E. (1957) *J. Exp. Med.* **105**, 265-267.

- Stasek, J.E. Jr., Natarajan, V. y Garcia, J.G.N. (1993) Phosphatidic acid directly activates endothelial cell protein kinase C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **191**, 134-141.
- Steinbeck, M.J., Hegg, G.G. y Karnovsky, M.J. (1991) Arachidonate activation of neutrophil NADPH-oxidase. Sinergistic effects of protein phosphatase inhibitors compared with protein kinase activators. *J. Biol. Chem.* **266**, 16336-16342.
- Steinbeck, M.J., Khan, A.U. y Karnovsky, M.J. (1992) Intracellular singlet oxygen generation by phagocytosing neutrophils in response to particles coated with a chemical trap. *J. Biol. Chem.* **267**, 13425-13433.
- Steinbeck, M.J., Khan, A.U. y Karnovsky, M.J. (1993) Extracellular production of singlet oxygen by stimulated macrophages quantified using 9,10-diphenyl-anthracene and perlene in a polystyrene film. *J. Biol. Chem.* **268**, 15649-15654.
- Stohs, S.J., Al-Turk, W.A. y Angle, C.R. (1982) Glutathione s-transferase and glutathione reductase activities in hepatic and extrahepatic tissues of female mice as a function of age. *Biochem. Pharmacol.* **31**, 2113-2116.
- Strolin Benedetti, M., Dostert, P., Marrari, P. y Cini, M. (1993) Effect of ageing on tissue levels of amino acids involved in the nitric oxide pathway in rat brain. *J. Neural. Transm.* **94**, 21-30.
- Stuehr, D.J. y Marletta, M.A. (1987) Synthesis of nitrite and nitrate in murine macrophage cell lines. *Cancer Res.* **47**, 5590-5594.
- Stuehr, D.J., Kwon, N.S. y Nathan, C.F. (1990) FAD and GSH participate in macrophage synthesis of nitric oxide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **168**, 558-565.
- Stuehr, D.J., Kwon, N.S., Nathan, C.F., Griffith, O.W., Feldman, P.L. y Wiseman, J. (1991) N omega-hydroxy-L-arginine is a intermediate in the biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. *J. Biol. Chem.* **266**, 6259-6263.

- Stutchfield, J. y Cockcroft, S. (1991) Characterization of fMet-Leu-Phe-stimulated phospholipase C in streptolysin-O-permeabilise cells. *Eur. J. Biochem.* **197**, 119-125.
- Sumimoto, H., Sakamoto, N., Nozaki, M., Sakaki, Y., Takeshige, K. y Minakami, S. (1992) Cytochrome b₅₅₈, a component of the phagocyte NADPH oxidase, is a flavoprotein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **186**, 1368-1375.
- Suzuki, H., Pabst, M.J. y Johnston, R.B. (1985) Enhancement by Ca²⁺ or Mg²⁺ of catalytic activity of the superoxide-producing NADPH oxidase in membrane fractions of human neutrophils and monocytes. *J. Biol. Chem.* **260**, 3635-3639.
- Takahashi, R., Edashige, K., Sato, E.F., Inoue, T.M. y Utsumi, K. (1991) Luminol chemiluminescence and active oxygen generation by activated neutrophils. *Arch. Biochem. Biophys.* **285**, 325-330.
- Tejwani, G.A., Chauhan, S., Duruibe, V. y Vaswani, K.K. (1985) Enhancement in the activities of mouse epidermal glucose-6-phosphate dehydrogenase, hexokinase, phosphofructokinase, and pyruvate kinase by 12-*O*-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate. *Arch. Biochem. Biophys.* **239**, 462-466.
- Thorburn, D.R. and Beutler, E. (1989) Decay of hexokinase during reticulocyte maturation: is oxidative damage a signal for destruction?. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **162**, 612-618.
- Tozzi-Ciancarelli, M.G., Dalfonso, A., Tozzi, E., Troiani-Sevi, E. y De Matteis, G. (1989) Fluorescence studies of the aged erythrocyte membrane. *Cell. Mol. Biol.* **35**, 113-118.
- Tsunawski, S. y Nathan, C.F. (1984) Enzymatic basis of macrophage activation. *J. Biol. Chem.* **259**, 4305-4312.
- Tuengler, T. y Pfleiderer, G. (1977) Enhanced heat, alkaline and tryptic stability of acetamidinated pig heart lactate dehydrogenase. *Biochim. Biophys. Acta* **484**, 1-8.
- Twomey, B., Muird, R.E., Nixon, J.S., Sedgwick, A.D., Wilkinson, S.E. y Dale, M.M. (1990) The effect of new potent selective inhibitors of protein kinase

C on the neutrophil respiratory burst. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **171**, 1087-1092.

- Uhlinger, D.J., Tyagi, S.R., Inge, K.L. y Lambeth, J.D. (1993) The respiratory burst oxidase of human neutrophils: guanine nucleotides and arachidonate regulate the assembly of a complex in a semirecombinant cell-free system. *J. Biol. Chem.* **268**, 8624- 8631.

- Umeki, S. (1994) Activation factors of neutrophil NADPH oxidase complex. *Life Sci.* **55**, 1-13.

- Unanue, E.R. y Allen, P.M. (1987) The basis for the immunoregulatory role of macrophages and other cells. *Science* **236**, 551-557.

- Upton, A.C. Pathobiology. In Finch y Hayflick (Eds) *The biology of aging*, pp. 513-535. Von Nostrand Reinhold, New York. 1977

- van Furth, R., Diesselhoff-den Dulk, M.M.C., Sluiter, W. y col. In: van Furth, R. (ed): *Mononuclear Phagocytes: Characteristics, Physiology and Function*. Dordrecht, The Netherlands, Martinus Nijhoff. 1985

- van Kuijk, F.J.G.M., Sevanian, A., Handelman, G.J. y Dratz, E.A. (1987) A new role for phospholipase A2: protection of membranes from lipid peroxidation damage. *Trends Biochem. Sci.* **12**, 31-34.

- Vázquez, C.M., Muriana, F.J.G. y Ruiz-Gutiérrez, V. (1993) Changes in fatty acid desaturation in the hepatic and intestinal tissues induce by intestinal resection. *Lipids* **28**, 471-473.

- Venkatraman, J. y Fernandes, G. (1992) Modulation of age-related alterations in membrane composition and receptor-associated immune functions by food restriction in Fischer 344 rats. *Mech. Ageing Dev.* **63**, 27-44.

- Verhoeven, A.J., Bolscher, B.G.J.M., Meerhof, L.J., Ban Zwieten, R., Keijer, J., Weening, R.S. y Roos, D. (1989) Characterization of two monoclonal antibodies against cytochrome b558 of human neutrophils. *Blood* **73**, 1686-1694.

- Vetricka, V., Tlaskalova-Hogenova, H. y Pospisil, M. (1985) Impaired antigen presenting function of macrophages from aged mice. *Immunol. Invest.* **14**, 105-114.
- Vitorica, J., Cano, J., Satrustegui, J y Machado, A. (1981) Comparison between developmental and senescent changes in enzyme activities linked to energy metabolism in rat heart. *Mech. Ageing Dev.* **16**, 105-116.
- Vitorica, J., Machado, A y Satrustegui, J. (1984) Age-dependent variations in peroxide utilizing enzymes from rat brain in mitochondria and cytoplasm. *J. Neurochem.* **42**, 351-356.
- Vodovotz, Y., Kwon, N.S., Pospichil, M., Manning, J., Paik, J. y Nathan, C. (1994) Inactivation of nitric oxide synthase after prolonged incubation of mouse macrophage with IFN-gamma and bactericidal lipopolysaccharide. *J. Immunol.* **152**, 4110-4118.
- Volkman, D.J., Buescher, E.S., Gallin, J.I. y Fauci, A. S. (1984) B cell lines as models for inherited phagocytic diseases: abnormal superoxide generation in chronic granulomatous disease and giant granules in Chediak-Higashi syndrome. *J. Immunol.* **133**, 3006-3009.
- Vorbeck, M.L., Martin, A.P., Long, J.W., Smith, J.M. y Orr, R.R. (1982) Aging dependent modification of the lipid composition and lipid structural order parameter of hepatic mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* **217**, 351-361.
- Wahl, S.M., Wahl, L.M. y McCarthy, J.B., Chedid, L. y Mergenhagen, S.E. (1979) *J. Immunol.* **122**, 2226-2231.
- Wahnou, R., Mokady, S. y Cogan, U. (1989) Age and membrane fluidity. *Mech. Ageing Dev.* **50**, 249-253.
- Walford, R.L. The immunologic theory of aging. Munksgaard, Copenhagen. 1969
- Walker, B.A.M., Hagenlocker, B.E. y Ward, P.A. (1991) Superoxide responses to formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine in primed neutrophils. Role of intracellular and extracellular calcium. *J. Immunol.* **146**, 3124-3131.

- Walker, D.G. y Holland, G. (1965) The development of hepatic glucokinase in the neonatal rat. *Biochem. J.* **97**, 845-854.
- Waltz, A., Dewald, B., Von Tscherner, V. y Baggiolini, M. (1989) Effects of the neutrophil-activating peptide NAP-2, platelet basic protein, connective tissue-activating peptide III and platelet factor 4 on human neutrophils. *J. Exp. Med.* **170**, 1745-1750.
- Wang, J.F., Komarov, P., Sies, H. y Groot, H. (1991) Contribution of nitric oxide synthase to luminol-dependent chemiluminescence generated by phorbol-ester Kupffer cells. *Biochem. J.* **279**, 311-314.
- Warren, J.S., Kunkel, S.L., Cunningham, T.W., Johnson, K.J. y Ward, P.A. (1988) Macrophage-derived cytokines amplify immune complex-triggered O₂⁻ responses by rat alveolar macrophages. *Am. J. Pathol.* **130**, 489-495.
- Watson, F., Robinson, J. y Edwards, S.W. (1991) Protein kinase C-dependent and independent activation of the NADPH oxidase of human neutrophils. *J. Biol. Chem.* **266**, 7432-7439.
- Weaver, C.T. y Unanue, E.R. (1986) T cell induction of membrane IL-1 on macrophages. *J. Immunol.* **136**, 3868-3873.
- Weaver, C.T., Duncan, L.M. y Unanue, E.R. (1989) T cell induction of macrophage IL-1 during antigen presentation. Characterization of a lymphokine mediator and comparison of TH1 and TH2 subsets. *J. Immunol.* **142**, 3469-3476.
- Weiss, S.J., Klein, R., Slivka, A. y col. (1982) Chlorination of taurine by human neutrophils: Evidence for hypochlorous acid generation. *J. Clin. Invest.* **70**, 598-607.
- Weksler, M.E. y Siskind, G.W. The cellular basis of immune senescence (Monogr. Fev. Biol.) 17, 110-121, Karger Basel. 1984.
- Winocour, P., Watala, C. y Kinglough-Rathbone, R.L. (1992) Membrane fluidity is related to the extent of glycation of proteins, but not alterations in the

cholesterol to phospholipid molar ratio in isolated platelet membranes from diabetic and control subjects. *Thromb. Hemostas(?)* **67**, 567-571.

- Witz, G., Lawrie, N.J., Amoruso, M.A. y Goldstein, B.D. (1987) Inhibition by reactive anion radical production from stimulated polymorphonuclear leukocytes and pulmonary alveolar macrophages. Effects on cellular sulfhydryl groups and NADPH oxidase activity. *Biochem. Pharmacol.* **36**, 721-726.

- Worthington, D.J. y Rosemeyer, M.A. (1974) Human glutathione reductase. Purification of the crystalline enzyme from erythrocytes. *Eur. J. Biochem.* **48**, 166-177.

- Wu, G. y Brosnan, J.T. (1992) Macrophages can convert citrulline into arginine. *Biochem. J.* **281**, 45-48.

- Xie, Q.W., Cho, H.J., Calaycay, J., Mumford, R.A., Swiderek, K.M., Lee, T.D., Ding, A., Troso, T. y Nathan, C. (1992) Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. *Science* **256**, 225-228.

- Yea, C.M., Cross, A.R. y Jones O.T.G. (1990) Purification and some properties of the 45 kDa diphenylene iodonium-binding flavoprotein of neutrophil NADPH oxidase. *Biochem. J.* **265**, 95-100.

- Yeagle, P.L. (1985) Cholesterol and the cell membrane. *Biochim. Biophys. Acta* **822**, 267-287.

- Yu, B.P., Suescun, E.A. y Yang, S.Y. (1992) Effect of age-related lipid peroxidation on membrane fluidity and phospholipase A2: modulation by dietary restriction. *Mech. Ageing Dev.* **65**, 17-33.

- Zhang, Y., Marcillat, O., Giulivi, C., Ernster, L. y Davies, K.J.A. (1990) The oxidative inactivation of mitochondrial electron transport chain components and ATPase. *J. Biol. Chem.* **265**, 16330-16336.

- Zharhary, D. y Klinman, N.R. (1984) B cell repertoire diversity to PR8 influenza virus does not decrease with age. *J. Immunol.* **133**, 2285-2287.

- Zharhary, D. y Klinman, N.R. (1986) A selective increase in the generation of phosphorylcholine-specific B cells associated with aging. *J. Immunol.* **136**, 368-370.

- Zs-Nagy, I. (1979) The role of membrane structure and function in cellular aging: a review. *Mech. Ageing Dev.* **9**, 237-239.

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Reunido el Tribunal integrado por los abajo firmantes en el día de la fecha, para juzgar la Tesis Doctoral de D. ELISA ALVAREZ SANCHEZ titulada Estudio de la variación inmunológica de Macrófagos durante el envejecimiento acordó otorgarle la calificación de "Apto cum laude" por unanimidad (5 votos)

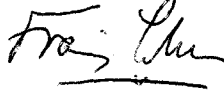
Sevilla, 14 de Julio 1995

El Vocál,

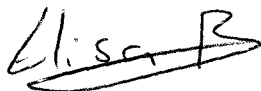


El Presidente

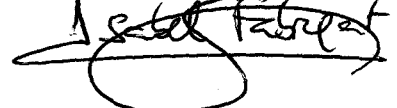
El Vocal,



El Secretario,



El Vocal



El Doctorado,

