



FACULTAD DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA MÉDICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR.  
UNIVERSIDAD DE SEVILLA

**“BASES MOLECULARES DE LA INFLAMACIÓN:  
REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LA ÓXIDO  
NÍTRICO SINTASA INDUCIBLE, LA  
CICLOOXIGENASA-2 Y DE LA ACTIVACIÓN DEL  
FACTOR NUCLEAR DE CÉLULAS T ACTIVADAS EN  
CÉLULAS FAGOCÍTICAS”**

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN PRESENTADO  
PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN BIOLOGÍA POR

ANTONIO VEGA RIOJA  
SEVILLA 2005





**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA MÉDICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR.  
FACULTAD DE MEDICINA  
UNIVERSIDAD DE SEVILLA**

D. **Francisco Sobrino Beneyto**, Catedrático del Departamento de Bioquímica Médica y Biología Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad de Sevilla y D. **Francisco J. Monteseirín Mateo**, Doctor en Medicina y Cirugía y médico adjunto del Servicio Regional de Inmunología y Alergia del Hospital Universitario Virgen Macarena de Sevilla.

Certifican que:

Antonio Vega Rioja, licenciado en Biología, ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado **“BASES MOLECULARES DE LA INFLAMACIÓN: REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LA ÓXIDO NÍTRICO SINTASA INDUCIBLE, LA CICLOOXIGENASA-2 Y DE LA ACTIVACIÓN DEL FACTOR NUCLEAR DE CÉLULAS T ACTIVADAS EN CÉLULAS FAGOCÍTICAS”**, que reúne los méritos suficientes para optar al grado de Doctor.

Sevilla, 4 de Abril de 2005.

**Dr. Francisco Sobrino Beneyto.**

**Dr. Francisco J. Monteseirín Mateo**



*Siempre agradecido a mis padres, por su apoyo incondicional y por contagiarme la inquietud que poseo ante lo que me rodea, a mi amiga y hermana, Clara, que siempre está ahí, y a mí abuela, por permitirme incorporar parte de lo suyo a mí vida diaria.*



# ÍNDICE





---

Agradecimientos .....	1
Abreviaturas .....	5
Relación de tablas y figuras .....	9
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>17</b>
<b>I. EL SISTEMA INMUNE. LAS CÉLULAS FAGOCÍTICAS EN EL SISTEMA INMUNITARIO .....</b>	<b>19</b>
I.1. Los monocitos y los macrófagos.....	19
I.2. Los neutrófilos.....	22
<b>II. LA REACCIÓN INFLAMATORIA.....</b>	<b>24</b>
II.1. El papel del macrófago en la respuesta inflamatoria .....	25
II.2. Los efectos de la Reacción inflamatoria .....	26
II.3. Los mediadores de los procesos inflamatorios.....	28
<b>III. LA RESPUESTA INFLAMATORIA ALÉRGICA .....</b>	<b>30</b>
III.1. Los procesos involucrados en la respuesta inflamatoria alérgica.....	30
III.2. La IgE como mediador de la respuesta inflamatoria alérgica .....	31
III.3. Etapas desde la sensibilización al alérgeno hasta la síntesis de IgE .....	32
III.4. Los receptores de IgE.....	33
III.5. La activación celular dependiente de IgE .....	35
III.6. El papel del neutrófilo en la alérgica .....	36
<b>IV. LA ÓXIDO NÍTRICO SINTASA INDUCIBLE. EL NO COMO MEDIADOR DE LA INFLAMACIÓN .....</b>	<b>37</b>
<b>V. CICLOOXIGENASAS: PROSTAGLANDINAS COMO MEDIADORES DE LA INFLAMACIÓN .....</b>	<b>39</b>
V.1. La ciclooxigenasa-1 (COX-1).....	40
V.2. La ciclooxigenasa-2 (COX-2).....	40
V.3. La ciclooxigenasa-3 (COX-3).....	41
V.4. La estructura de la COX-1 y COX-2 .....	42
V.5. La síntesis de prostaglandinas .....	44
V.6. La inhibición de las ciclooxigenasas.....	46
V.7. La regulación de la expresión de las ciclooxigenasas.....	48
V.8. El Papel fisiológico de las prostaglandinas .....	51
V.9. La COX-2 en la alergia y otras patologías.....	53
<b>VI. LA PRODUCCIÓN DE RADICALES LIBRES .....</b>	<b>55</b>
VI.1. Las especies reactivas de oxígeno.....	56
VI.2. Las especies reactivas de nitrógeno .....	57

VI.3. Las dianas moleculares de las especies reactivas de oxígeno .....	57
<b>VII. SISTEMAS GENERADORES DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO</b> .....	59
VII.1. Las monoaminas oxidasas .....	59
VII.2. La NADPH oxidasa .....	63
VII.3. La cadena de transporte de electrones mitocondrial .....	65
VII.4. La xantina oxidasa .....	66
VII.5. Otros sistemas productores .....	66
<b>VIII. LAS RUTAS DE SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR</b> .....	66
VIII.1. Las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs) .....	66
VIII.2. La calcineurina/calmodulina .....	69
VIII.3. El factor de transcripción NF- $\kappa$ B .....	71
VIII.4. El factor de transcripción NFAT .....	75
<b>OBJETIVOS</b> .....	81
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	85
<b>I. REACTIVOS Y MATERIALES</b> .....	87
<b>II. MÉTODOS</b> .....	89
<b>II.1. AISLAMIENTO DE CÉLULAS</b> .....	89
II.1.1. Obtención de macrófagos peritoneales de rata .....	89
II.1.2. Obtención de neutrófilos humanos de sangre periférica .....	90
II.1.3. Obtención de linfocitos humanos de sangre periférica .....	91
II.1.4. Obtención de eosinófilos humanos de sangre periférica .....	92
II.1.4. Purificación de neutrófilos y eosinófilos por el método de las esferas magnéticas. .....	93
<b>II.2. CUANTIFICACIÓN DEL NÚMERO DE CÉLULAS Y DE LA VIABILIDAD</b> .....	93
<b>II.3. PACIENTES Y CONTROLES</b> .....	94
<b>II.4. CULTIVO CELULAR</b> .....	97
II.4.1. Condiciones generales .....	97
II.4.2. Condiciones específicas .....	97
<b>II.5. EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS</b> .....	100
II.5.1. Lisis celular. Condiciones generales .....	100
II.5.2. Lisis celular. Condiciones específicas .....	100
II.5.3. Análisis de la concentración de proteínas .....	105
<b>II.6. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN Y FOSFORILACIÓN DE PROTEÍNAS POR “WESTERN BLOTTING”</b> .....	106
<b>II.7. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS POR CITOMETRÍA DE FLUJO</b> ..	110

<b>II.8. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS POR MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA</b> .....	111
<b>II.9. ANÁLISIS DE ARN MENSAJERO</b> .....	112
II.9.1. "RT-PCR" .....	113
II.9.2. "Northern blotting" .....	115
<b>II.10. ANÁLISIS DEL CAMBIO EN LA MOBILIDAD ELECTROFORÉTICA ("EMSA")</b> ..	117
<b>II.11. ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD CALCINEURINA</b> .....	119
<b>II.12. ANÁLISIS DE LA PRODUCCIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO</b> ....	121
<b>II.13. ANÁLISIS DE LA PRODUCCION DE NITRITOS</b> .....	123
<b>TRABAJO 1: "UNA NUEVA FUNCIÓN PARA LAS MONOAMINAS OXIDAS EN LA REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LA ÓXIDO NÍTRICO SINTASA INDUCIBLE".</b>	
<b>I. RESUMEN</b> .....	127
<b>II. RESULTADOS</b> .....	129
II.1. <i>El agua oxigenada y el vanadato actúan sinérgicamente en la inhibición de la expresión de la NOS2 inducida por LPS/INF-<math>\gamma</math> en macrófagos peritoneales de rata.</i> ..	129
II.2. <i>Efecto de los sustratos de monoaminas oxidasas sobre la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y sobre la expresión de la NOS2 en macrófagos</i> .....	131
II.3. <i>Efecto de los iones de Fe<sup>2+</sup>/Cu<sup>2+</sup> sobre la inhibición provocada por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y sustratos de monoaminas oxidasas en la expresión de la NOS2 en macrófagos</i> ... ..	138
II.4. <i>Los sustratos de monoaminas oxidasas y el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inhiben la expresión de ARN mensajero de la NOS2 en macrófagos</i> .....	142
<b>III. DISCUSIÓN</b> .....	143
<b>TRABAJO 2: "REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEPENDIENTE DE IgE DEL GEN DE LA COX-2 POR ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO EN NEUTRÓFILOS HUMANOS".</b>	
<b>I. RESUMEN</b> .....	151
<b>II. RESULTADOS</b> .....	153
II.1. <i>Inducción de la expresión de la COX-2 por alergenos específicos y anticuerpos anti-IgE en neutrófilos de pacientes alérgicos</i> .....	153
II.2. <i>Liberación de PGE<sub>2</sub> inducida por alergenos y anticuerpos anti-IgE por neutrófilos de pacientes alérgicos</i> .....	157
II.3. <i>Papel de la NADPH oxidasa en el control de la expresión de la COX-2 dependiente de IgE en neutrófilos de pacientes alérgicos</i> .....	158

II.4. El H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> y especies reactivas de oxígeno derivadas de la reacción de Fenton están implicados en la expresión de la COX-2 en neutrófilos humanos.....	160
II.5. Papel de las MAPKs en el control de la expresión de la COX-2 dependiente de IgE en neutrófilos de pacientes alérgicos.....	162
II.6. La vía de las MAPKs está asociada con la generación dependiente de IgE de especies reactivas de oxígeno en neutrófilos de pacientes alérgicos.....	166
II.7. Papel del factor de transcripción NF-κB sobre la regulación de la expresión de la COX-2 dependiente de IgE en neutrófilos de pacientes alérgicos.....	168
<b>III. DISCUSIÓN</b> .....	173
<b>TRABAJO 3: “EXPRESIÓN DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN NFAT2 EN NEUTRÓFILOS HUMANOS: ACTIVACIÓN ANTI-IgE/ALERGENO DEPENDIENTE, MEDIADA POR LA CALCINEURINA”.</b>	
<b>I. RESUMEN</b> .....	181
<b>II. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	183
II.1. Presencia de los ARN mensajeros que codifican NFAT1, NFAT2, NFAT4 y NFAT5 en neutrófilos humanos.....	183
II.2. La proteína NFAT2 se expresa en neutrófilos humanos.....	186
II.3. La expresión de NFAT2 no es inducida por anticuerpos anti-IgE en neutrófilos de pacientes alérgicos.....	188
II.4. Alérgenos específicos y anticuerpos anti-IgE inducen la translocación nuclear de NFAT2 en neutrófilos de pacientes alérgicos.....	190
II.5. Receptores de IgE implicados en la translocación nuclear de NFAT2 en neutrófilos humanos de pacientes alérgicos.....	194
II.6. La calcineurina regula la translocación nuclear de NFAT2 en neutrófilos de pacientes alérgicos.....	196
II.7. Los anticuerpos anti-IgE incrementan la actividad de unión al ADN de NFAT2 en neutrófilos humanos.....	199
<b>CONCLUSIONES</b> .....	201
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	207
<b>CURRICULUM VITAE</b> .....	247

# AGRADECIMIENTOS



A mi amigo y “jefe”, el Dr. Javier Monteseirín Mateo, por darme la oportunidad de conocer un mundo desconocido para mí, por permitir mi subsistencia independiente en el laboratorio, por tratarme y por contagiarme su entusiasmo continuo.

Al Profesor Francisco Sobrino Beneyto, por su gran ayuda en todo, un buen director, constante, inquieto, entregado a la ciencia y con una posición muy clara desde donde dirigir, sin llegar a entrometerse.

A mi único y verdadero “compañero” de laboratorio en el servicio Regional de Inmunología y Alérgia, Pedró Chacón Fernández, al que agradezco toda su ayuda, siempre incondicional, la árdua tarea de sobrellervarme en el día a día, y su comprensión y apoyo tanto en los buenos como en los malos momentos. Además, aprecio mucho su talante pues gracias a él algunas de mis características personales han mejorado, fundamentalmente en lo relacionado con la investigación.

A mis compañeros de Bioquímica, a Rajaa El Bekay agradezco su amistad, su gran ayuda y haberme acercado a la cultura magrebí, facisnante. A Victoria Eugenia Bonilla agradezco su amabilidad continua, esas buenas palabras siempre dirigidas hacia mí, cada mañana, y su ayuda en el laboratorio en tareas como la medición de la concentración de ARN, sin poner ni una “mala cara”. A Raquel también le agradezco su ayuda y su pertenencia al igual que Victoria Eugenia al club “hola guapo”. A Gonzalo Alba agradezco su amabilidad, su ayuda en el día a día y tantas otras cosas que implica su carácter afable.

A José Martín Nieto agradezco toda su ayuda, sin ella no hubiera sido posible la escritura de los artículos. Por su parte he tenido muchísimos buenos consejos que han ayudado al desarrollo de mi investigación. Gracias a él ha mejorado, el inglés y la calidad de los trabajos que he realizado.

A Juan Jiménez agradezco sus múltiples consejos en lo que respecta a temas informáticos y también su amabilidad continua. A Elizabeth Pintado, especialmente, su gran sonrisa cada mañana, y muchísimas horas de discusión acerca de “lo que hacer y no hacer” y acerca de “cómo de verídicos parecen los resultados”, así como mucho de lo que he aprendido de la técnica de RT-PCR. A Paco Bedoya y Remedios Ramírez, su buena cara cada mañana y las comidas y reuniones que pasamos juntos.

A Coral, Isabel y María, enfermeras del Hospital Policlínico Virgen Macarena, agradezco su generosidad pues las tres se han encargado de suministrarme ese bien tan preciado, la sangre, cada mañana y con un total desinterés, implicándose muchísimo tanto conmigo como con mis compañeros. Muy amables y generosas, en definitiva, magníficas personas.

A algunos de los residentes MIR del Servicio Regional de Inmunología y Alergia, en especial a Antonio Maraví, José Luis Pérez, Agustín Oroviz, Rafael Calderón, José María Duque, Lourdes Fernández, Paula Crespo y Rocio Medina. Y a Leticia especialmente, le agradezco su amistad y el haberme hecho comprender parte de la inquietud femenina, tan valorada por mí.

A María Jesús Camacho y a Inés Bonilla, les agradezco su amistad, su trato cordial, sus “piscolabis” de cada mañana y la oportunidad de continuar algún trabajo rezagado, para mí entender, muy interesante.

A Lorena Alcañiz le agradezco cada viaje...y las peleas que disfrutamos juntos, muy divertidas...

A Inma, la nueva, le agradezco toda su ayuda, está siempre dispuesta a ayudar en todo lo que puede.

A Carmen Naranjo le agradezco su buen humor, siempre ha sido muy buena conmigo. A Mercedes Unzeta, de la Universidad Autónoma de Barcelona agradezco su donación del anticuerpo anti-SSAO, y también agradezco su gran ayuda en cuanto a problemas técnicos en la detección de la SSAO, y, por supuesto, también agradezco su gran amabilidad.

A Francisco Prada le agradezco su tiempo, Muchas de las fotografías de microscopía de fluorescencia, las realizamos juntos.

A Alberto del Valle y a Rodrigo Fernández las incontables horas de desahogo que han servido para poder soportar algunos de los “baches” siempre presentes en la vida de cualquier investigador.

A Karim, Juan, Gladys, Pilar, Raquel, Marga, y Nabil, por todos los buenos momentos que compartimos.

A Jasmine Molina muchísimas cosas, entre ellas su comprensión, ayuda y mucho aguante.

A mis amigos, Cándido, Ana, Marcos, Abuelo, Gloria, Alberto, Rodrigo, Clara, Andrés, Jose María, Manu, Maria Luisa, les agradezco todo.

A todos aquellos que se sientan excluidos agradezco todo aquello que no recuerdo, no por ello menos importante.

Por último agradezco a todos los pacientes su voluntad y generosidad para con la ciencia, sin ellos nada sería posible.



# ABREVIATURAS



AEBSF	Fluoruro de 4-(2-aminoetil)-benzenosulfonil
AMT	Aminotriazol
BENZ	Benzilamina
CaN	Calcineurina
CaM	Calmodulina
CO	Monóxido de Carbono
CsA	Ciclosporina A
CUSO <sub>4</sub>	Sulfato de Cobre
DCFDA	Diclorofluoresceína diacetato
DMSO	Dimetil Sulfóxido
ECG	Enfermedad Granulomatosa Crónica
EGTA	Quelante del Ca <sup>2+</sup> extracelular
ERK1/2	Quinasa regulada por señal exterior 1 y 2
FeSO <sub>4</sub>	Sulfato de hierro
FMLP	N-formil-Met-Leu-Phe
GAPDH	Gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrógeno
HMAP	4-hidroxi-3-metoxiacetofenona
ICAM	Moléculas de adhesión intracelular
IFN- $\gamma$	Interferon gamma
IKK	Quinasa de la I $\kappa$ B
I $\kappa$ -B	Inhibidor del factor nuclear $\kappa$ B
JNK	c-Jun NH <sub>2</sub> - terminal quinasa
LPS	Lipopolisacárido
Luminol	5-amino-2,3-dihidroftalazina-1,4-diona
MAO	Monoamina oxidasa
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógeno
MBP	La proteína mielina básica
NF- $\kappa$ B	Factor nuclear de transcripción $\kappa$ B
NOS2	Óxido nítrico sintasa inducible
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Anión superóxido
PARG	Pargilina
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PD098059	2-(2'-amino-3'-methoxyphenyl)-oxanaph-thalen-4-one
PG	Prostaglandina
PI3-quinasa	Fosfatidilinositol 3-quinasa
PKC	Proteína quinasa C
PMA	$\beta$ -forbol-12-miristato-13-acetato
PMN	Polimorfonuclear
PMSF	Fluoruro de fenil metil sulfonilo
PVDF	Polifluoruro de vinilideno
SB203580	4-(4-fluorofenil)-2-(4-metilsulfinilfenil)-5-(4-piridil)1H-imidazol
SOD	Superóxido dismutasa
SSAO	Amino oxidasa sensible a semicarbazida
SZ	Semicarbazida
TAE	Tampón tris-acético-EDTA
TYR	Tiramina
VAN	Ortovanadato Sódico
MAO	Monoamina oxidasa
VAP-1	Proteína de adhesión vascular-1
AINEs	Antiinflamatorios no esteroideos



# RELACIÓN DE TABLAS Y FIGURAS



Figura 1. Fotografía de microscopía óptica de un macrófago .....	20
Tabla 1. Diferenciación y nomenclatura de los macrófagos .....	20
Tabla 2. Diferenciación, distribución y funciones de los macrófagos.....	21
Tabla 3. Sustancias secretadas por macrófagos .....	22
Figura 2. Fotografía de microscopía óptica de un neutrófilo .....	24
Tabla 4. Enfermedades con base inflamatoria.....	25
Figura 3. Etapas en la sensibilización alérgica .....	33
Tabla 5. Características de las diferentes isoformas de óxido nítrico sintasa .....	38
Figura 4. Estructura general de cada subunidad monómerica de las ciclooxigenasas	43
Figura 5. Síntesis de prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos a partir del ácido araquidónico .....	45
Figura 6. Reacción de catálisis ciclooxigenasa.....	46
Tabla 6. Clasificación de los Antiinflamatorios no esteroideos (AINEs).....	48
Tabla 7. Principales acciones fisiológicas de los productos de las ciclooxigenasas ....	52
Figura 7. Esquema de activación de la NADPH oxidasa .....	64
Figura 8. Activación de la vía de las MAPKs .....	69
Figura 9. Estructura y activación de la fosfatasa 2B/calcineurina.....	71
Figura 10. Activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B .....	74
Figura 11. Estructura del factor de transcripción NFAT .....	77
Figura 12. Esquema del ciclo de activación de NFAT .....	78
Figura 13. Obtención de neutrófilos humanos de sangre periférica .....	91
Figura 14. Obtención de linfocitos humanos de sangre periférica .....	92
Tabla 8. Escala de grados de positividad en los test cutáneos .....	95
Tabla 9. Escala de grados de positividad en la determinación de IgE específica .....	96
Tabla 10. Composición de los los geles de acrilamida .....	107
Tabla 11. Condiciones de incubación con los anticuerpos .....	108
Figura 15. Incremento de luminiscencia en presencia de iodofenol .....	109
Tabla 12. Cedores específico usados para PCR.....	115
Figura 16. El H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> inhibe la expresión de la NOS2 inducida por LPS/IFN- $\gamma$ en macrófagos .....	129
Figura 17. El vanadato potencia la inhibición de la expresión de la NOS2 producida por el H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en macrófagos.....	129
Figura 18. Análisis mediante citometría de flujo y microscopía de fluorescencia corroboran los datos obtenidos.....	130

Figura 19. El H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> añadido exógenamente inhibe la producción de NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> por macrófagos.....	130
Figura 20. La activación de las monoaminas oxidasas inhibe la expresión de la NOS2 inducida por LPS/IFN- $\gamma$ en macrófagos.....	131
Figura 21. La combinación de vanadato y aminotriazol potencia el efecto de los sustratos de monoaminas oxidasas sobre la expresión de la NOS2 en macrófagos .	132
Figura 22. Efecto de los sustratos de monoaminas oxidasas sobre la expresión de la NOS2 analizada por microscopía de fluorescencia y citometría de flujo en macrófagos .	133
Figura 23. Efecto de los Productos (Benzaldehído y cloruro amónico) de monoaminas oxidasas sobre la expresión de la NOS2 en macrófagos .....	133-134
Figura 24. Producción de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> por la MAO-A/B en macrófagos .....	134
Figura 25. Producción de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> por la SSAO en macrófagos .....	134
Figura 26. Presencia de la SSAO en macrófagos peritoneales de rata.....	135
Figura 27. La presencia de la SSAO/VAP-1 fue analizada además por microscopía de fluorescencia en macrófagos .....	135
Figura 28. Pruebas accesorias que confirman la presencia de la SSAO/VAP-1 en macrófagos.....	136-137
Figura 29. Ausencia de SSAO en el medio de cultivo y secreción de esta en respuesta a LPS/IFN- $\gamma$ por macrófagos .....	138
Figura 30. Los sustratos de monoaminas oxidasas inhiben la expresión de la NOS2 a través del incremento de especies reactivas de oxígeno derivadas de la reacción de Fenton en macrófagos .....	139
Figura 31. Controles del aminotriazol y el vanadato sobre la expresión de la NOS2 en macrófagos.....	140
Figura 32. La inhibición de las monoaminas oxidasas previene la inhibición de la expresión de la NOS2 ejercida por los sustratos de monoaminas oxidasas en macrófagos.....	141
Figura 33. H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> exógena o endógena, generada por monoaminas oxidasas, inhibe la expresión de la NOS2 a nivel de ARN mensajero en macrófagos.....	142
Figura 34. Inducción de la expresión de la COX-2 dependiente de dosis del alérgeno G <sub>3</sub> en neutrófilos de pacientes alérgicos a ese alérgeno .....	153
Figura 35. Cinética de Inducción de la expresión de la COX-2 dependiente del alérgeno G <sub>3</sub> en neutrófilos de pacientes alérgicos a ese alérgeno .....	153



Figura 36. Especificidad de la inducción de la COX-2 en respuesta a alergen	154
Figura 37. Especificidad de la inducción de la COX-2 en respuesta a alergen	154
Figura 38. Inducción de la expresión de la COX-2 por anticuerpos anti-IgE en	155
Figura 39. Anticuerpos anti-IgG no inducen la expresión de la COX-2 en neutrófilos de	155
Figura 40. Anticuerpos anti-IgE inducen la expresión de la COX-2 a nivel de ARN	156
Figura 41. Análisis de la expresión de la COX-2 dependiente de IgE por citometría de	156
Figura 42. Producción de PGE <sub>2</sub> dependiente de IgE por neutrófilos de pacientes	157
Figura 43. Activación dependiente de IgE de la NADPH oxidasa en neutrófilos de	158
Figura 44. Producción de O <sub>2</sub> <sup>-</sup> dependiente de IgE por neutrófilos de pacientes	159
Figura 45. Implicación de la NADPH oxidasa en la expresión de la COX-2 dependiente	159
Figura 46. Implicación de especies reactivas de oxígeno derivadas de la reacción de	160
Figura 47. El H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> induce la expresión de la COX-2 a nivel de proteína y de ARN	161
Figura 48. Especies reactivas de oxígeno derivadas de la reacción de Fenton están	162
Figura 49. Activación dependiente de IgE de las MAPKs en neutrófilos de pacientes	163
Figura 50. Especificidad de activación de las MAPKs en respuesta a alergen	164
Figura 51. Ausencia de activación dependiente de IgE de la JNK1/2 MAPK en	165

Figura 52. Implicación de la ruta de las MAPKs en la expresión de la COX-2 dependiente de IgE en neutrófilos de pacientes alérgicos.....	166
Figura 53. Implicación de la NADPH oxidasa en la activación de las MAPKs dependiente de IgE en neutrófilos de pacientes alérgicos.....	167
Figura 54. Implicación de especies reactivas de oxígeno derivadas de la reacción de Fenton en la activación de las MAPKs dependiente de IgE en neutrófilos de pacientes alérgicos .....	167
Figura 55. Incremento dependiente de IgE de la actividad de unión al ADN de NF-κB en neutrófilos de pacientes alérgicos .....	168
Figura 56. Activación dependiente de IgE de la degradación de I-κB en neutrófilos de pacientes alérgicos.....	169
Figura 57. Implicación de NF-κB en la expresión de la COX-2 dependiente de IgE en neutrófilos de pacientes alérgicos .....	169
Figura 58. Implicación de las MAPKs en la activación de NF-κB dependiente de IgE en neutrófilos de pacientes alérgicos .....	170
Figura 59. El H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> incrementa la actividad de unión al ADN de NF-κB en neutrófilos humanos.....	171
Figura 60. Implicación de la NADPH oxidasa y de especies reactivas de oxígeno derivadas de la reacción de Fenton en la activación dependiente de IgE de NF-κB en neutrófilos de pacientes alérgicos .....	171
Figura 61. Expresión de los ARN mensajeros que codifican las diferentes isoformas de NFAT en neutrófilos humanos.....	184
Figura 62. Control sobre el grado de purificación de los neutrófilos .....	185
Figura 63. Las muestras de ARN aislado de neutrófilos no presentan contaminación de ADN genómico .....	185
Figura 64. Expresión de la isoforma NFAT2 en neutrófilos humanos.....	187
Figura 65. NFAT2 se expresa de forma constitutiva en neutrófilos humanos.....	188
Figura 66. Ausencia de expresión de las isoformas NFAT1, NFAT4, NFAT5 en neutrófilos humanos... ..	189
Figura 67. Ausencia de expresión del ARN mensajero de la isoforma NFAT3 en neutrófilos humanos .....	189
Figura 68. Estimuladores clásicos de la translocación nuclear de NFAT fallan induciendo la translocación de NFAT2 en neutrófilos humanos .....	190
Figura 69. Estimuladores clásicos de funciones del neutrófilo fallan induciendo la translocación nuclear de NFAT2 en neutrófilos humanos.....	191

Figura 70. Anticuerpos anti-IgE inducen la translocación nuclear de NFAT2 en neutrófilos de pacientes alérgicos.....	192
Figura 71. Alérgenos específicos inducen la translocación nuclear de NFAT2 en neutrófilos de pacientes alérgicos a esos alérgenos .....	193
Figura 72. Ausencia de translocación nuclear de NFAT2 en neutrófilos de sujetos sanos en respuesta a alérgenos .....	194
Figura 73. Receptores de IgE implicados en la translocación nuclear de NFAT2 en neutrófilos de pacientes alérgicos.....	195
Figura 74. Activación dependiente de IgE de la fosforilación del Mac-2 en neutrófilos de pacientes alérgicos .....	196
Figura 75. Activación dependiente de IgE de la calcineurina en neutrófilos de pacientes alérgicos.....	197
Figura 76. Participación de la calcineurina en la translocación nuclear de NFAT2 dependiente de IgE en neutrófilos de pacientes alérgicos.....	197
Figura 77. Coinmunoprecipitación de NFAT2 con la calcineurina en neutrófilos humanos .....	198
Figura 78. Los anticuerpos anti-IgE incrementan la actividad de unión al ADN de NFAT2 en neutrófilos de pacientes alérgicos .....	199



# INTRODUCCIÓN



## **I. EL SISTEMA INMUNE. LAS CÉLULAS FAGOCÍTICAS EN EL SISTEMA INMUNITARIO.**

El sistema inmunitario de los vertebrados consiste en una serie de órganos y varios tipos diferentes de células que han evolucionado para reconocer de modo específico las sustancias que “le son extrañas” o antígenos, y así poder eliminarlas.

Las células del sistema inmunitario están presentes normalmente como células circulantes en la sangre o en la linfa, como grupos anatómicamente definidos en los órganos y tejidos linfoides, o como células dispersas residentes en los tejidos. La disposición anatómica de estas células, y su capacidad para intercambiarse entre la sangre o la linfa y los tejidos es de especial importancia para que la respuesta inmune se desempeñe de manera correcta. A groso modo, las células del sistema inmune se pueden dividir en tres grandes grupos: 1) Los linfocitos, que reconocen y responden de forma específica ante los antígenos extraños; 2) Las células accesorias, que no son específicas para los antígenos extraños, pero que contribuyen a que los linfocitos reconozcan éstos y se activen, entre las que se encuentran los macrófagos y las células presentadoras de antígeno; 3) Las células efectoras, que ayudan a los linfocitos activados a desempeñar su función. Se incluyen en estas los macrófagos y los granulocitos (neutrófilos, eosinófilos y basófilos). También los linfocitos estimulados por el antígeno pueden funcionar como células efectoras. (Jerne, 1973)

### **I.1. Los monocitos y los macrófagos.**

El sistema fagocítico mononuclear constituye una población celular importante en el sistema inmune. Estas células tienen como función básica la fagocitosis. A principios de este siglo, los investigadores observaron que ciertas células vivas captaban los pigmentos que se administraban por vía intravenosa. Éstas se denominan macrófagos en el tejido conectivo, células endoteliales en los sinusoides vasculares, microglía en el sistema nervioso central y células reticulares en los órganos linfoides (**Tabla 1**), considerando que este tipo de células actuaban en la defensa del huésped. Los monocitos y los macrófagos son miembros del sistema fagocítico mononuclear.

Los macrófagos son células en diferenciación terminal que se originan de una célula precursora ubicada en la médula ósea (**Tabla 2**). Todos los macrófagos pertenecen al linaje denominado sistema monocito-macrófago, que deriva de los

glóbulos blancos circulantes conocidos como monocitos. Los monocitos son células de 12 a 20  $\mu\text{m}$ , con núcleo arriñonado, sin cromatina, con un citoplasma abundante que los contiene orgánulos necesarios para sintetizar proteínas secretoras y de membrana (**Figura 1**). Una de los orgánulos más importante es el lisosoma, que contiene muchos de los componentes enzimáticos. Los monocitos constituyen entre el 1 y el 6% de las células nucleadas circulantes de la sangre. Circulan como monocitos aproximadamente durante 24 horas, pasando luego a formar parte permanente de un tejido determinado. Al entrar en estos tejidos sufren cambios en su morfología y sus funciones en respuesta a factores del micro ambiente local, adquiriendo diferentes nombres.



**Figura 1. Fotografía de microscopía óptica de un macrófago. (1. Citosol; 2. Núcleo multilobular)**

---

Sangre	→	Monocitos
Médula ósea	→	Monocitos y precursores
Tejidos sólidos	→	Histiocitos
Piel	→	Células de Lagerhans
Hígado	→	Células de Kupffer
Pulmón	→	Macrófagos alveolares
Hueso	→	Osteoclasto
S.N.C	→	Macrófagos peritoneales/pleurales
Granulomas	→	Células epitelioides

---

**Tabla 1. Diferenciación y nomenclatura de los macrófagos.**



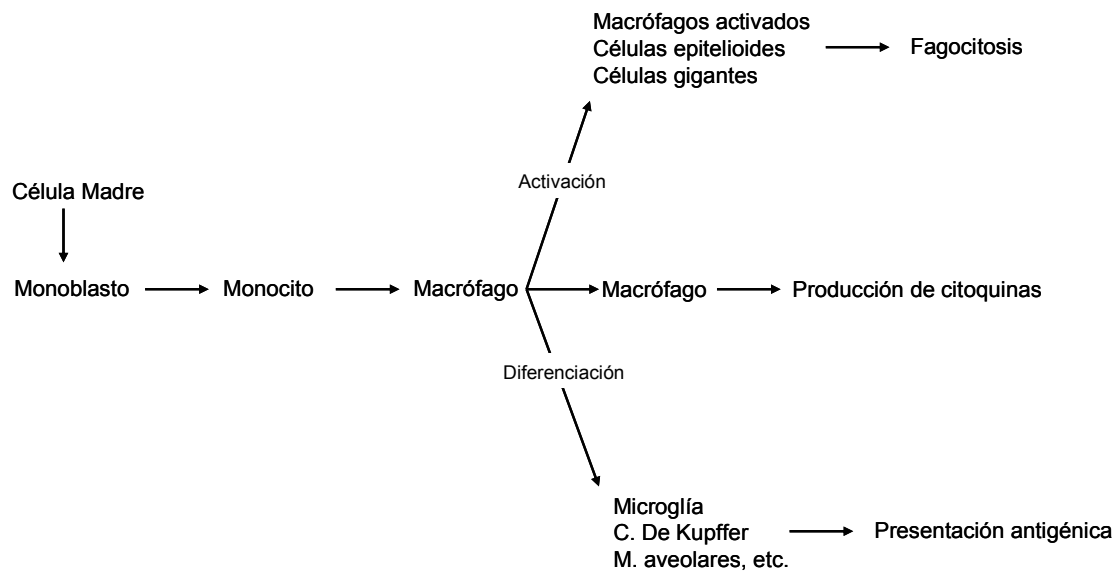


Tabla 2. Diferenciación, distribución y funciones de los macrófagos.

### **La activación del macrófago.**

Un macrófago tisular tiene una vida media aproximada de 2 a 4 meses. En los tejidos, existen estímulos variados (p.ej. opsoninas, factores quimiotácticos, citoquinas y hormonas) que inducen la activación del macrófago, incrementando rápidamente su metabolismo, motilidad y actividad fagocítica. Los macrófagos activados son ávidos fagocitos, que engloban todas las partículas extrañas o restos celulares que encuentran. Se mueven más lentamente que los neutrófilos, pero tienen la ventaja de tener una vida más prolongada. Los macrófagos reconocen de forma directa algunas partículas dianas “target” por las propiedades de su membrana celular. También expresan receptores para complemento (por ejemplo. C3-C4) e inmunoglobulinas, que son esenciales para fagocitar determinado tipo de partículas.

Los macrófagos no solo presentan actividad fagocítica, sino que también secretan una enorme variedad de sustancias activas biológicamente (**Tabla 3**).

---

**Enzimas:** Lisozimas, proteasas, colagenasas, elastasas.

**Hidrolasas ácidas:** proteasas, lipasas, ribonucleasas, fosfatasas, glicosidasas.

**Componentes del complemento:** C1, C2, C3, C4, C5, properdina, inactivador del C3B, factor B y D.

**Inhibidores de enzimas.**

**Proteínas de ligación:** transferrina, fibronectina, transcobalamina II.

**Metabolismo del oxígeno:**  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ , y radicales hidroxílicos.

**Metabolismo del nitrógeno:** La producción de NO por la iNOS que no es constitutiva, sino inducida (ej. LPS+IFN- $\gamma$ ).

**Lípidos bioactivos:** prostaglandina  $E_2$  tramboxano, leucotrienos, eicosanoides, PAF.

**Factores activadores de neutrófilos:** Interleuquinas, factor estimulador de fibroblastos.

---

Tabla 3. Sustancias secretadas por los macrófagos.

## **I.2. Los neutrófilos.**

Contituyen el 65-75% del total de leucocitos sanguíneos, representan más del 90% de los granulocitos circulantes. Derivan de la médula ósea y es allí donde se desarrollan, maduran y salen al torrente sanguíneo, en el que tienen una vida media de 8-20 horas (Zucker-Franklin et al., 1980). Circulantes en la sangre son capaces de migrar a los focos de inflamación en respuesta a factores atrayentes o quimiotácticos (tales como la interleuquina-8, el factor del complemento C5a o el leucotrieno  $B_4$ ) y allí llevan a cabo la fagocitosis de partículas extrañas (Lee et al., 2003).

Morfológicamente tienen un diámetro de 10–20  $\mu m$  y se caracterizan porque presentan un núcleo multilobulado (con 3-5 lóbulos normalmente, conectados con finos puentes), visible al microscopio óptico con tinción de Giemsa (**Figura 2**). Por esta razón, también se denominan leucocitos polimorfonucleares. Además muestran un citoplasma con un retículo endoplasmático muy pequeño, con pocas mitocondrias, inclusiones de glucógeno y gran cantidad de gránulos que ocupan la totalidad del citoplasma, excepto la periferia de la membrana, donde existe una banda de filamentos de actina, responsable de la capacidad quimiotáctica de estas células.

Estos gránulos no se tiñen prácticamente con técnicas histológicas comunes (eosina-hematoxilina) y presentan distintas funciones en la defensa del huésped. Los distintos gránulos que podemos encontrar en los neutrófilos son (Borregaard et al., 1997; Faurshou et al., 2003):

- Los gránulos primarios o azurófilos, que contienen una serie de enzimas tales como, la mieloperoxidasa (MPO), la muraminidasa (Lisozima), la elastasa, proteínas catiónicas e hidrolasas ácidas (eficaces a pH 5), todas ellas dirigidas a potenciar la digestión y la actividad microbicida de los macrófagos.
- Los gránulos secundarios (o específicos), que contienen entre otras enzimas, la lisozima, la lactoferrina, la colagenasa y una proteína transportadora de la vitamina B<sub>12</sub>, todas ellas reguladoras de la inflamación.
- Los gránulos terciarios, caracterizados por la presencia de la gelatinasa y emparentados con los lisosomas convencionales.

En su superficie no expresan un marcador específico de linaje, pero sí gran cantidad de moléculas, tales como receptores para la IgG (CD64, CD32 y CD16), receptores para la IgA (CD81), moléculas de adhesión (CD11a/ CD18 ó LFA-1, CD11c/ CD18) o receptores para el complemento, como el CD35. La función del neutrófilo es esencial en la primera línea de defensa del huésped contra gran variedad de patógenos, para lo cual desarrollan numerosos procesos citotóxicos. Muchos de estos procesos están mediados por interacciones específicas con otras células como macrófagos o células endoteliales (en los que intervienen las moléculas de adhesión), y/o por el reconocimiento específico de las partículas extrañas (en el que intervienen los receptores para la IgG y el complemento, que unen partículas opsonizadas).

Cuando los neutrófilos se activan, además del liberar el contenido de los gránulos, son capaces de producir, a través del llamado “estallido respiratorio”, especies reactivas de oxígeno. Estas especies reactivas de oxígeno, junto con las proteasas granulares, tienen como función eliminar los microorganismos invasores (Babior et al., 2002; Roos et al., 2003), y a veces, pueden incluso lesionar tejidos propios (Weiss, 1989). En lo que refiere a citoquinas, los neutrófilos secretan mayoritariamente la IL-8, aunque también son capaces de sintetizar otras, entre las que se encuentran la IL-1 $\beta$ , IL-12, VEGF, MIP- $\alpha/\beta$  e IP-10 (Scapini et al., 2000).



**Figura 2. Fotografía de microscopia óptica de un neutrófilo. (1. citosol. 2. núcleo multilobular)**

## **II. LA REACCION INFLAMATORIA.**

El sistema inmune es esencial para combatir las infecciones, pero también comporta el desarrollo de fenómenos inflamatorios, que además de frenar el crecimiento de microorganismos son causa de lesiones locales y/o generales, siendo a veces difícil discernir entre los aspectos beneficiosos y perjudiciales. La respuesta inflamatoria genera una gran acumulación de células inmunitarias en el foco infeccioso. Inicialmente, las células presentadoras de antígeno, tras procesar el agente patógeno, activan a los linfocitos. Estos proliferan y secretan al medio extracelular moléculas, como anticuerpos, IL-2, IL-4, IFN- $\gamma$  y diversos factores quimiotácticos, que inducen el reclutamiento y activación de neutrófilos en las fases tempranas, y monocitos-macrófagos y linfocitos en las fases tardías (Issekutz et al., 1980; Gallin et al., 1982; Ross et al., 1999; Gerrity et al., 1981). Las células endoteliales también participan en la respuesta inflamatoria mediante la expresión en su superficie de moléculas que son reconocidas por los leucocitos, que facilitan su extravasación del torrente sanguíneo a las zonas de inflamación (Fabbri et al., 1999; Cybulsky et al., 1991; Takahashi et al., 2001). En estas zonas, los neutrófilos y macrófagos, además de su función fagocítica, liberan al medio extracelular derivados de oxígeno altamente reactivos, enzimas almacenados en sus gránulos (lisozima), prostaglandinas, leucotrienos y varias citoquinas (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-12), que amplifican la respuesta inflamatoria, pero poseen un enorme potencial lesivo de los tejidos circundantes (Gallin et al., 1982).

Dado su potencial destructivo, el organismo ha desarrollado mecanismos para minimizar el riesgo de daños durante las reacciones inflamatorias, como, por ejemplo, el estrecho control de los sistemas productores de especies reactivas de oxígeno de las células fagocíticas. Sin embargo, la protección no es absoluta, y en ocasiones se

producen, bien por agentes infecciosos o bien por otros mecanismos, algunos fenómenos inflamatorios que son el origen de numerosas patologías (**Tabla 4**) (Berliner et al., 2000; Huang et al., 2001; Faurschou et al., 2003; Ross et al., 1999).

---

**Enfermedades cardiovasculares:**

Arteriosclerosis  
Tromboembolismo  
Enfermedad arterial coronaria, cerebral y periférica

**Enfermedades respiratorias:**

Asma  
Enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC)

**Enfermedades digestivas:**

Enfermedad de Crohn  
Colitis ulcerosa  
Peritonitis

**Otras enfermedades:**

Esclerosis múltiple  
Artritis reumatoide

---

**Tabla 4. Enfermedades con base inflamatoria.**

## **II.1. El papel del macrófago en la respuesta inflamatoria.**

Además de su capacidad de fagocitosis frente a patógenos, el macrófago presenta una gran actividad como célula secretora, pues libera una gran variedad de sustancias, participando en múltiples procesos biológicos entre los que se encuentran el crecimiento celular y la citotoxicidad. Debido a su abundancia, distribución, motilidad y capacidad de respuesta, los macrófagos pueden influir en cada aspecto de la respuesta inmune e inflamatoria (Nathan et al., 1987).

En un orden cronológico, la respuesta inmunitaria frente a una infección se basa, en los primeros momentos, en la activación de macrófagos. Para llevar a cabo su función, el macrófago expresa varios receptores de membrana que le permiten el reconocimiento de posibles patógenos, como las bacterias, y transmitir esa información a otras células efectoras mediante factores solubles (citoquinas proinflamatorias) e interacciones intercelulares (presentación de antígenos). La denominada primera barrera de inmunidad celular inespecífica, se basa en la gran capacidad fagocítica del macrófago junto con la liberación de mediadores químicos

muy citotóxicos como son las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, entre los que se encuentran el óxido nítrico (NO), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), anión superóxido ( $O_2^-$ ), y peroxinitrito ( $ONOO^-$ ). Los sustratos más afines para estas especies altamente reactivas son los grupos hemo, grupos tiólicos reducidos, o núcleos prostéticos de Fe-S. Además, tanto el NO como el  $O_2^-$  son potentes mutágenos del ADN, lo que supone un mecanismo adicional en su acción antimicrobiana.

## **II.2. Los efectos de la reacción inflamatoria.**

Cuando la infección persiste, o cuando los microorganismos patógenos consiguen escapar de esta primera barrera de defensa, se desencadena una amplificación de la señal, implicando a otras células del sistema inmune.

Uno de estos casos se produce cuando ciertos patógenos, como algunos grupos de bacterias, una vez fagocitadas, alteran las vesículas de endocitosis, de manera que ya no pueden fundirse a las membranas de los lisosomas y, por tanto, podrían escapar de ser degradados. Afortunadamente, los macrófagos pueden ser activados en un proceso conjunto con linfocitos T y otras células del sistema inmune. En esta segunda fase de la respuesta inflamatoria, se consigue la activación del complemento, que conduce a la formación del complejo de ataque a la pared, capaz de lisar las bacterias Gram-negativas y virus con envoltura. Además, tiene lugar la atracción a la zona afectada de una serie de células inflamatorias, fundamentalmente un mayor número de macrófagos, neutrófilos y otras células fagocitarias que desempeñan un papel clave en la respuesta antimicrobiana y tumoricida del sistema inmune, ya que son capaces de generar grandes cantidades de moléculas altamente tóxicas tales como las especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno. Existe también una mayor expresión de proteínas de histocompatibilidad de clase I y/o II. La interacción del macrófago con el patógeno se produce a través de receptores de membrana (p.ej. CD14 y TLRs). Esta interacción estimula la síntesis y secreción de factores reguladores de la inflamación como la IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 y el TNF- $\alpha$  (Stout, 1993).

Por otro lado, las células endoteliales regulan la extravasación de los leucocitos desde el torrente sanguíneo a las zonas de inflamación, mediante la expresión en su superficie de moléculas de adhesión. La infiltración de las células inflamatorias sigue una secuencia temporal: primero llegan neutrófilos y, posteriormente, células mononucleares. Es un proceso complejo, en el que se pueden distinguir varias etapas:

**a)** Mediadores de la inflamación como C5a, histamina y leucotrieno B activan las células endoteliales de los vasos que irrigan la zona inflamada, induciendo la expresión de la molécula de adhesión selectina P. Componentes bacterianos como el LPS, o citoquinas como el TNF- $\alpha$  (procedentes de macrófagos que ya han llegado al foco inflamatorio) también activan el endotelio induciendo la expresión de selectina E. En la superficie de los neutrófilos y monocitos hay glicoproteínas que se unen a estas selectinas, de modo que los leucocitos circulantes, al pasar por las zonas donde el endotelio se ha activado, se pegan a la pared del vaso y comienzan un proceso de movimiento "rolling" a lo largo de la misma sin separarse de ella. Entre los mediadores quimiotrópicos podemos distinguir los endógenos, como el C5a y el leucotrieno B, y los exógenos, que son componentes o productos microbianos, como los oligopéptidos iniciados con N-formil-metionina que las bacterias excretan como subproductos de la síntesis proteica.

**b)** En la superficie de las células endoteliales existen unas moléculas de adhesión denominadas ICAM ("InterCellular Adhesion Molecules"), que presentan dos ligandos en la superficie leucocitaria: CD11a/CD18 (también llamado LFA-1) y CD11b/CD18 (el receptor de C3bi conocido como Mac-1). En condiciones normales, la interacción entre ICAM-1 y los ligandos es débil, pero en estas circunstancias, los leucocitos que "ruedan" sobre el endotelio ya han sido afectados por las sustancias quimiotrópicas liberadas en el foco inflamatorio, y esto determina un cambio en la configuración de CD11a/CD18 y de CD11b/CD18 con la consecuencia de que su interacción con ICAM-1 se hace lo suficientemente fuerte como para detenerlos y fijarlos al endotelio.

**c)** Los leucocitos "atrapados" por el endotelio activado, poniendo en juego otras interacciones entre moléculas de superficie, se abren paso entre las células endoteliales y salen del vaso sanguíneo (principalmente de los capilares), completando un proceso clásicamente conocido como diapédesis.

**d)** Una vez fuera del vaso, los leucocitos se mueven a favor del gradiente de concentración de los mediadores quimiotácticos, dirigiéndose hacia el foco inflamatorio.

### **II.3. Los mediadores de los procesos inflamatorios.**

Existen fundamentalmente tres clases de mediadores implicados en el desarrollo de los procesos inflamatorios: (a) mediadores polipeptídicos o citoquinas (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6); (b) especies reactivas de oxígeno (NO, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, O<sub>2</sub><sup>-</sup>, ácido hipocloroso) y (c) mediadores lipídicos bioactivos derivados de los fosfolípidos de membrana (eicosanoides, PAF).

#### **a) Principales citoquinas proinflamatorias.**

Las células inflamatorias, especialmente los macrófagos, no se limitan a la depuración de sustancias extrañas por fagocitosis, sino que sintetizan y secretan diversas moléculas, biológicamente activas, que se conocen como citoquinas proinflamatorias. La generación de proteasas, citoquinas y eicosanoides por parte de estas células juega un papel importante en la respuesta inflamatoria. De hecho, las citoquinas per se pueden inducir la producción y liberación de nuevos mediadores inflamatorios a partir de células endoteliales, macrófagos y linfocitos activados. Las principales citoquinas proinflamatorias son:

- La IL-1, IL-6 y el TNF- $\alpha$  que son producidas por macrófagos activados (el TNF- $\alpha$  y la IL-6, también por linfocitos T). Estas tres citoquinas tienen en común su capacidad para estimular la producción de proteínas de fase aguda (APP), como son la proteína C-reactiva,  $\alpha$ -1-antitripsina, ceruloplasmina, haptoglobina, fibrinógeno, proteína amiloide sérica, etc., por los hepatocitos, que actúan sobre el hipotálamo induciendo la fiebre. Además la IL-1 y el TNF- $\alpha$ , activan las células endoteliales y suministran señales de coestimulación y mitogénesis a los linfocitos B y T. La IL-6 estimula la secreción de inmunoglobulinas y la proliferación de los linfocitos B.

- Los macrófagos activados también producen GM-CSF (“Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor”), que estimula el reclutamiento de progenitores de neutrófilos y monocitos en la médula ósea, en reposición de los que han acudido al lugar de la inflamación (donde la mayor parte morirá).

- Macrófagos, neutrófilos, las propias células endoteliales y otros tipos celulares producen, en respuesta a estímulos endógenos (IL-1 y TNF- $\alpha$ ) o exógenos (LPS, mitógenos, virus), una familia de citoquinas quimiotácticamente atractivas para diversos tipos de leucocitos; por esta actividad, se las conoce también como quimioquinas, siendo IL-8 uno de los ejemplos más representativos.



· Plaquetas, macrófagos, células endoteliales, fibroblastos y otras células son fuente del factor PDGF (Platelet Derived Growth Factor); esta molécula ejerce varias acciones relacionadas con la inflamación, ya que atrae quimiotácticamente a monocitos y neutrófilos (posiblemente sea un efecto indirecto, mediado por la liberación de quimioquinas), pero también promueve la regeneración de los tejidos dañados y la cicatrización (por su capacidad mitogénica para fibroblastos y su capacidad para estimular la producción de componentes de la matriz extracelular).

**b) Especies reactivas: NO, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, O<sub>2</sub><sup>-</sup>, ácido hipocloroso.**

Durante el proceso inflamatorio se produce la liberación de mediadores químicos muy citotóxicos como son las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, entre los que se encuentran el óxido nítrico; peróxido de hidrógeno, radical/anión superóxido y peroxinitrito. Algunas de estas moléculas, fundamentalmente radicales de oxígeno, presentan gran capacidad reactiva con grupos prostéticos esenciales para la actividad de enzimas implicadas en reacciones del metabolismo energético y mantenimiento de la viabilidad celular. Los sustratos más afines para estas sustancias reactivas son los grupos hemo, grupos tiólicos reducidos, o núcleos prostéticos de Fe-S, como es el caso de la enzima cis-aconitasa del ciclo de Krebs y los citocromos de los complejos I y II de la cadena transportadora de electrones (Nathan, 1992).

**c) Mediadores lipídicos bioactivos derivados de los fosfolípidos de membrana (eicosanoides, PAF).**

Los prostanooides son moléculas liposolubles implicadas en todas las fases del proceso inflamatorio, que se identificaron por primera vez en secreciones de la próstata. La biosíntesis de prostaglandinas está regulada por dos pasos metabólicos sucesivos, la liberación del ácido araquidónico de los fosfolípidos de la membrana y su conversión a prostanooides. Las fosfolipasas son las enzimas que catalizan el primero de estos pasos. En concreto, las dos principales vías de liberación del araquidónico son la fosfolipasa A<sub>2</sub> y la fosfolipasa C. La fosfolipasa A<sub>2</sub>, tras ser activada por una serie de estímulos que generan un aumento del Ca<sup>2+</sup> intracelular, cataliza la desacilación del ácido araquidónico desde la segunda posición de ciertos fosfolípidos de membrana, como la fosfatidilcolina. El ácido araquidónico también puede ser liberado a partir de una vía alternativa. En esta segunda vía, la fosfolipasa C cataliza la

formación de diacilglicerol e inositol trisfosfato a partir del fosfatidilinositol; la diacilglicerol lipasa cataliza posteriormente la liberación del ácido araquidónico a partir del diacilglicerol. Tras ser liberado de la membrana celular, el ácido araquidónico queda expuesto a la acción de numerosas enzimas. La vía de la epoxigenasa P-450, la vía de la lipooxigenasa y la vía de la ciclooxigenasa constituyen las tres principales secuencias metabólicas relacionadas con el ácido araquidónico.

### **III. LA RESPUESTA INFLAMATORIA ALÉRGICA**

#### **III.1. Los procesos involucrados en la respuesta inflamatoria alérgica.**

Aunque la alergia o atopia es una enfermedad descrita en el hombre a principios del siglo XX, sus causas y mecanismos aún están en estudio. Afecta al 20% de la población en los países industrializados y comprende un amplio abanico de afecciones tales como la rinitis, el asma, la dermatitis atópica y las alergias alimentarias. En el desarrollo del proceso alérgico intervienen factores genéticos y medioambientales, pero sus conexiones internas y su prevalencia aún no están del todo dilucidadas. Desde hace años se conoce que las reacciones alérgicas son causadas como consecuencia de una reacción de hipersensibilidad. Así se denomina la respuesta inmunitaria que se produce de forma exagerada o inapropiada, causando fenómenos inflamatorios y lesiones tisulares. Aunque se han descrito cuatro tipos de cuadros de hipersensibilidad, la hipersensibilidad de tipo I (que ocurre en los procesos alérgicos) es la que se ha estudiado durante más tiempo.

Los individuos que sufren hipersensibilidad de tipo I se denominan alérgicos o atópicos y se dice que sufren alergia. La hipersensibilidad de este tipo también se denomina "inmediata", ya que aparece a los pocos minutos del contacto con la sustancia extraña, que en este caso se denomina alérgeno. Fuentes típicas de alérgenos incluyen, entre otros, ácaros, pólenes, mohos, epitelios animales, parásitos y alimentos. Para la mayoría de los sujetos los alérgenos son inocuos, sólo causan enfermedad en los atópicos, debido a la respuesta que en ellos provocan. En ocasiones esta respuesta es exacerbada y descontrolada y se manifiesta a nivel sistémico. Se habla entonces de anafilaxia generalizada o shock anafiláctico, y puede causar la muerte del sujeto.

La expresión clínica de la alergia resulta de la culminación de una serie de eventos, incluidos en dos fases. La primera fase o fase precoz o inmediata engloba varias etapas:

- Exposición al alérgeno.
- Producción de anticuerpos específicos contra este alérgeno.
- Unión de las moléculas de IgE a la superficie de células efectoras.
- Reexposición al alérgeno.
- Unión del alérgeno a la IgE en la superficie de las células efectoras.
- Producción de mediadores por parte de las células efectoras primarias.

La segunda fase o fase retardada, más prolongada, se caracteriza por la infiltración al foco inflamatorio de células efectoras secundarias, que van a liberar a su vez otros mediadores inflamatorios secundarios, responsables de la respuesta tardía (Stanworth, 1973).

### **III.2. La IgE como mediador de la respuesta inflamatoria alérgica.**

Estudios iniciales demostraron que las “sustancias” séricas implicadas en el desencadenamiento de una respuesta alérgica, correspondían a un isotipo específico de inmunoglobulinas, a la que dieron el nombre de IgE. Ésta es una inmunoglobulina de peso molecular de 196 kDa, un coeficiente de sedimentación de 8S y un alto contenido de hidratos de carbono (12%). Está constituida por dos cadenas ligeras ( $\kappa$  o  $\lambda$ ) y dos pesadas  $\epsilon$ . Las cadenas pesadas se encuentran formadas por una región variable V y cuatro dominios (CH1-CH4) constantes. Es termolábil, no atraviesa la placenta y no fija complemento. En el suero circula como anticuerpo divalente, tiene vida media de 2 días y medio, y presenta niveles totales menores de 200 ng/ml (1000 veces menor a la cantidad de IgG). En condiciones patológicas, como la alergia, este valor puede aumentar hasta niveles de 300-600 ng/ml, e incluso superiores. Ya que un gran número de sujetos alérgicos muestran un nivel sérico de IgE elevado se podría pensar que la determinación del nivel sérico total de IgE se puede usar como marcador de la enfermedad alérgica. Sin embargo el valor predictivo de ello es limitado: por una parte hay enfermos con una IgE total en un rango normal; por otra, hay determinadas formas clínicas hiperreactivas (como la parasitosis por helmintos) que también se cursan con niveles elevados de IgE. Esto hace que

normalmente se estudie el nivel de IgE específica contra un determinado alérgeno, que sí es indicador de atopia (Ishizaka, 1988; Barranco-Sanz et al., 2004 ).

### **III.3. Etapas desde la sensibilización al alérgeno hasta la síntesis de IgE.**

Cuando un alérgeno entra en contacto con el organismo por vías aérea o cutánea, por ejemplo, éste es captado por las células presentadoras de antígeno, como son los macrófagos, las células de Langerhans y las células dendríticas foliculares (Semper et al., 1996).

El alérgeno pasa al citoplasma de la célula presentadora de antígeno por endocitosis y los lisosomas se encargan de escindir sus cadenas polipeptídicas en péptidos sencillos, actividad denominada procesamiento (Harding, 1996). Posteriormente, la célula presentadora de antígeno migra a los ganglios linfáticos periféricos para que el antígeno exocitado (el cual se encuentra anclado al complejo mayor de histocompatibilidad de clase II de la membrana de la célula presentadora de antígeno), sea presentado a los linfocitos T (drug et al., 1996). Estos linfocitos T reconocen a través de su TCR a este alérgeno y en respuesta a este estímulo producen interleuquinas. Estas interleuquinas contribuyen a que los linfocitos B maduren hasta células plasmáticas productoras de IgE específicas para ese alérgeno. De la población de linfocitos T, son los linfocitos CD4<sup>+</sup> (Th) los que más activamente participan en los procesos atópicos, aunque también se ha visto participación de los linfocitos CD8<sup>+</sup> (Tc). Los subtipos funcionales de linfocitos Th1 y Tc1, y los subtipos Th2 y Tc2, ejercen funciones mutuamente antagonistas en la respuesta alérgica: las citoquinas Th1 (IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  y linfotoxina), secretadas por los linfocitos Th1 y Tc1, movilizan la defensa celular y humoral contra patógenos intracelulares e inhiben la respuesta alérgica. Así, la IL-2 y el IFN- $\gamma$  suprimen la síntesis de IgE (Lack et al., 1994; Nakanishi et al., 1995). En contraste, las citoquinas Th2 (IL-4, IL-5, IL-6, IL-9 e IL-13), secretadas por los linfocitos Th2 y Tc2, coordinan la defensa contra patógenos extracelulares como helmintos y controlan estrechamente las características de la atopia y el asma, especialmente en lo que refiere a la síntesis de IgE (Robinson et al., 1992).

De todas las interleuquinas secretadas por los linfocitos Th2 y Tc2, la IL-4 es la más importante en la síntesis de IgE (Wills-Karp et al., 1996). Otra citoquina, íntimamente relacionada con la IL-4 y también necesaria para la producción de la IgE, es la IL-13 (Punnonen et al., 1997) (Esta última citoquina puede ser sintetizada,

además de por las células T, por las células NK (Hocino et al., 1999). El hecho de que tanto la IL-4 como la IL-13 sean requeridas para la producción de la IgE por las células B y que tengan efectos solapados, se debe a que realizan su función a través de receptores que comparten una estructura similar (Zurawski et al., 1993). Además de la IL-4 e IL-13, las citoquinas IL-3, IL-5 e IL-9 producidas por los linfocitos activados contribuyen a que la célula B madure a célula plasmática productora de IgE.

Junto a las citoquinas, la síntesis de IgE requiere de señales adicionales. Una de estas señales es el contacto CD40-CD40 Ligando. CD40 es un antígeno expresado en la superficie de los linfocitos B. Su unión con CD40 Ligando (ó CD154) en la superficie del linfocito T, potencia la síntesis de IgE y el crecimiento de la célula B (kawabe et al., 1994). Otra señal es el contacto de CD80 y CD86 (ó B7-1 y B7-2) en la superficie del linfocito B con la molécula CD28 en el linfocito T. Esta interacción es necesaria para la supervivencia del linfocito T y para la secreción de citoquinas (Schwartz et al., 1992; Yanagihara et al., 1998).

Una vez sintetizada por los linfocitos B diferenciados hasta células plasmáticas, la IgE difunde a los tejidos y al torrente sanguíneo, y ejerce sus funciones en la superficie de células efectoras (**Figura 3**).

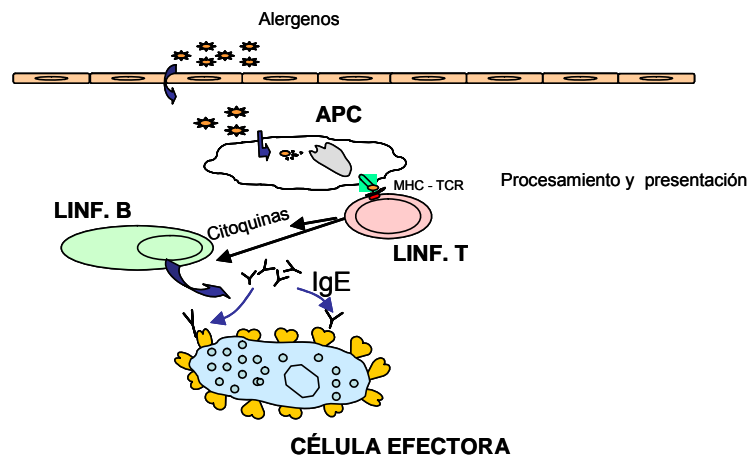


Figura 3. Etapas en la sensibilización alérgica.

#### III.4. Los receptores de IgE.

La IgE es capaz de unirse a la superficie celular por medio de receptores específicos. Se han descrito tres tipos de receptores específicos para la IgE:

### **1) Receptor de alta afinidad, tipo I ó FcεRI**

Aunque esencial en los procesos celulares mediados por la IgE, el papel del receptor de alta afinidad, FcεRI, en la regulación de los niveles séricos de la IgE parece mínimo. Además, su entrecruzamiento aumenta su propia síntesis, lo que indica un mecanismo de amplificación de los efectos biológicos de la IgE cuando el antígeno está presente. Estructuralmente, cada molécula de FcεRI está constituida por cuatro cadenas polipépticas, una α que une la IgE, otra β y dos γ, que transmite la señal. Aunque en un principio se pensaba que el receptor de alta afinidad aparecía exclusivamente en basófilos y mastocitos, actualmente se sabe que puede aparecer en la superficie de las células de Langerhans epidérmicas, algunos macrófagos dérmicos, algunos monocitos sanguíneos, eosinófilos activados y neutrófilos (Metzger<sup>b</sup> et al., 1986; Novak et al., 2001; Soussi-Gounni et al., 1998)

### **2) Receptor de baja afinidad, tipo II, CD23 ó FcεRII**

El segundo tipo de receptor para la IgE fue identificado por su capacidad de unión a células B humanas y a líneas derivadas de células B, y corresponde con un antígeno asociado con la diferenciación de estas células, denominado CD23. Funcionalmente regula la síntesis de IgE y puede intervenir en los procesos de activación celular.

Estructuralmente, el CD23 es una proteína perteneciente a la superfamilia de las lectinas tipo-C, que se puede expresar en células B, células T, células NK, monocitos, células de Langerhans epidérmicas, neutrófilos, eosinófilos y plaquetas. (Conrad et al., 1990; Novak et al., 2001; Yamaoka et al., 1996).

### **3) Receptor tipo III, MAC-2 o Galectina 3**

El último receptor conocido para la IgE constituye un polipéptido perteneciente a la familia de lectinas solubles o lectinas de tipo S. Presenta actividad intrínseca de unión a galactosa y se corresponde con otro antígenos conocido de la superficie celular denominado Mac-2 o proteína de unión a IgE (galectin-3/εbp).

A diferencia de CD23 parece no intervenir en la regulación de la síntesis de IgE, pero se cree que juega un papel importante en la activación celular. La galectina-3 se ha encontrado en la superficie de linfocitos T activados, neutrófilos, mastocitos,

monocitos/macrófagos, células de Langerhans y queratinocitos (Liu, 1993; Joo et al., 2001).

### **III.5. La activación celular dependiente de IgE: la liberación de mediadores e la inflamación.**

Cuando tras una segunda exposición antigénica, la IgE ligada a los receptores de la superficie celular “atrapa” a su correspondiente alérgeno, se produce la activación de estos receptores. Los receptores activados transmiten la señal necesaria para la liberación de determinados mediadores de la inflamación.

La reacción precoz alérgica está mediada por los mastocitos tisulares, que tras activación a través del Fc $\epsilon$ RI por IgE liberan una gran cantidad de mediadores. En el asma, por ejemplo, a los pocos minutos de una agresión antigénica se observa un aumento de más del doble de los mastocitos en el lavado broncoalveolar (BAL) con características morfológicas de degranulación (Metzger<sup>a</sup> et al., 1986).

En la reacción tardía, en el foco de la inflamación alérgica, se observa el reclutamiento de otros leucocitos como neutrófilos, seguido de eosinófilos, basófilos, linfocitos y monocitos. Este reclutamiento está iniciado por los efectos de los mediadores liberados por los mastocitos, sobre las células del epitelio vascular. La liberación de TNF- $\alpha$ , IL-4 e IL-13, por ejemplo, induce la producción de moléculas de adhesión intercelular (E-selectinas, ICAM-1, VCAM-1), que se unen a las integrinas de la membrana celular de los leucocitos como el MAC-1, posibilitando la migración transendotelial de dichas células (Springer, 1990). En esta migración también contribuyen factores quimiotácticos, como la IL-5, por ejemplo, que es quimiotáctica para los eosinófilos (O’Byrne et al., 1999). En el caso del asma, el infiltrado celular se produce en las vías aéreas, y a la producción de estas citoquinas quimiotácticas, junto con otros mediadores, también contribuyen las células epiteliales, endoteliales, musculares lisas y fibroblastos bronquiales. Las células epiteliales, por ejemplo, son capaces de generar endotelinas, bradiquinina, NO e interleuquinas (IL-6, IL-8, GM-CSF, TNF- $\alpha$ ) que intervienen en la migración de más leucocitos (Raeburn et al., 1994). Formando parte de la submucosa aérea existe además un entramado de fibras y receptores nerviosos que asimismo juegan un papel importante en el proceso inflamatorio. Las fibras aferentes suministran información al sistema nervioso central sobre la respiración y la broncotonicidad. Sus receptores de tipo sensorial amielínico son sensibles a los mediadores liberados (histamina, bradiquinina...) y al ser

estimulados por ellos liberan péptidos activos como la sustancia P y la neurocinina, mediadores que a su vez favorecen la broncoconstricción (Barnes, 1996). También los receptores muscarínicos son sensibles a estos mediadores, como por ejemplo a la proteína mayor básica del eosinófilo, y reaccionan produciéndose una broncoconstricción, aumento de la secreción de moco y vasodilatación. La destrucción del epitelio con la secreción de factores de crecimiento para las células epiteliales, fibras musculares lisas y fibroblastos, da como respuesta una remodelación y regeneración de la mucosa. La remodelación proteolítica de la membrana basal va seguida de una deposición característica de fibras de colágeno de tipo III y IV (Cho et al., 1996). Todo ello conduce a una alteración estructural de la vía aérea, que puede explicar una mayor hiperreactividad bronquial observada en los sujetos asmáticos.

### **III.6. El papel del neutrófilo en la alergia.**

A pesar de que se reconoce la patología atópica como un proceso en el cual se induce la liberación de mediadores y el acúmulo de células inflamatorias en el órgano de choque, y de que varias de estas células inflamatorias (macrófagos, linfocitos, mastocitos, basófilos, eosinófilos, neutrófilos y plaquetas) han demostrado estar implicadas en la reacción alérgica, el papel desempeñado por cada una de ellas no está del todo claro. Debido a la naturaleza crónica de los procesos alérgicos, los leucocitos que persisten en los tejidos, especialmente eosinófilos y linfocitos, han sido los más estudiados. Hasta hace poco tiempo se tenía una escasa noción del papel que podía ejercer el neutrófilo en la reacción alérgica, una célula con un potencial proinflamatorio y lesional importante, y que se encuentra presente en el foco inflamatorio alérgico. Sin embargo, existen fuertes evidencias experimentales de la participación de los neutrófilos en los procesos alérgicos. Así, en el asma inducida por alérgenos o por ejercicio, los neutrófilos aumentan su actividad quimiotáctica y expresan marcadores de activación (Lee et al., 1982; Nagy et al., 1982). En pacientes asmáticos polínicos, la exposición antigénica estacional se asocia con un aumento de neutrófilos en las biopsias bronquiales (Boulet et al., 1993); y en asmáticos atópicos la estimulación endobronquial con alérgenos produce un aumento de la infiltración de estas células en la mucosa respiratoria (Metzger<sup>a</sup> et al., 1986; Boschetto et al., 1989; Montefort et al., 1994). Por último, nuestro grupo ha demostrado un aumento en la producción de radicales libres de oxígeno y una liberación de  $Ca^{2+}$  (Monteseirín et al., 1996; Monteseirín et al., 2002), así como la liberación del contenido de los gránulos



(MPO y elastasa) en neutrófilos de sujetos alérgicos tras activación celular dependiente de IgE (Monteseirín et al., 2001; Monteseirín et al., 2003)

Muchas de las diversas formas mediante las cuales el neutrófilo pueden actuar en el foco inflamatorio alérgico permanecen aún por descubrir. Trabajos recientes han mostrado la capacidad del neutrófilo para sintetizar prostaglandinas (Maloney et al., 1998), las cuales son importantes mediadores de la respuesta inflamatoria alérgica.

#### **IV. LA ÓXIDO NÍTRICO SINTASA: EL NO COMO MEDIADOR DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA.**

El óxido nítrico (NO) es una molécula gaseosa que difunde fácilmente a través de las células. Es sintetizado por una enzima, la óxido nítrico sintasa (NOS), a partir del aminoácido L-arginina, dando lugar a la formación de NO y citrulina. Existen tres isoformas de NOS (**Tabla 5**): dos constitutivas, la NOS neural (NOS1) y la NOS endotelial (NOS3), y una inducible (NOS2) (Moncada et al., 1991; Lowenstein et al., 1992; Yui et al., 1991). La NOS3 y NOS1 liberan NO en pequeñas concentraciones, en el rango de picomolar y están reguladas a nivel post-traduccionales por acilaciones y a nivel funcional por los cambios en los niveles de  $Ca^{2+}$  y calmodulina. El NO liberado actúa como mensajero en el sistema nervioso central, inhibe la adhesión y agregación plaquetaria, e induce vaso dilatación. Por el contrario, la NOS2 está regulada a nivel transcripcional y es insensible a  $Ca^{2+}$ /calmodulina. Ésta, produce la liberación de grandes cantidades de NO, que constituyen un componente esencial de los mecanismos de defensa del organismo.

Además, el NO desempeña un papel importante como mediador fisiológico durante la inflamación. Ciertos mediadores lipídicos solubles, citoquinas y factores de crecimiento incrementan enormemente la síntesis de este radical, en respuesta a daño tisular o infección. Los tipos celulares implicados en la producción de NO durante el proceso inflamatorio son entre otros, macrófagos, células endoteliales, fibroblastos, queratinocitos, células del músculo liso y condrocitos, así como células epiteliales como el hepatocito. El NO producido por los polimorfonucleares (PMN) durante las primeras etapas de la inflamación, media fundamentalmente procesos de vaso dilatación e inhibición de la agregación plaquetaria. Los macrófagos, comparados con los PMN, producen mayores cantidades de NO en respuesta a productos bacterianos

y citoquinas proinflamatorias. Asimismo, los macrófagos secretan citoquinas (IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ ) que van a inducir la expresión de NOS2, tanto de forma autocrina como paracrina. La actividad de la NOS2, en un modelo de inflamación crónica en ratas, aumenta durante las primeras 24 horas, alcanza la máxima expresión entre los días 3 y 7, disminuye en el día 14 y vuelve a experimentar una subida a los 21 días de inflamación (Vane et al., 1994). Sin embargo, tanto en los procesos inflamatorios agudos, como crónicos, una producción excesiva de NO puede resultar tóxica y causar lesiones en diversos tejidos. El sistema endocrino protege al organismo del daño tisular causado por el NO mediante la producción de corticosteroides endógenos, factores de crecimiento (EGF, FGF, TGF- $\beta$ , PDGF) y citoquinas (IL-4, IL-8, IL-10) que son potentes inhibidores de la expresión de NOS-2 y de la producción de NO mediante mecanismos alternativos como la expresión de arginasa. Estos agentes desactivadores pueden actuar como un mecanismo de control durante la lesión tisular, limitando la amplitud o duración de la expresión de NOS y por tanto, regulando la síntesis de NO.

### ÓXIDO NÍTRICO SINTASA

Reacción	L-arginina	NO + L-citrulina	
<b>Isoformas</b>	Tipo 1	Tipo 2	Tipo 3
<b>Masa</b>	160 KDa	130 KDa	135 KDa
<b>Estado nativo</b>	Dímero	Dímero	Dímero
<b>Regulación</b>	$\uparrow \text{Ca}^{2+} \rightarrow$ Unión a CaM	Transcripcional	$\uparrow \text{Ca}^{2+} \rightarrow$ Unión a CaM
<b>Cofactores</b>	NADPH, FAD, FMN, BH <sub>4</sub>	NADPH, FAD, FMN, BH <sub>4</sub>	NADPH, FAD, FMN, BH <sub>4</sub>
<b>Tiempo de activación</b>	Segundos	Horas	Segundos

Tabla 5. Características de las diferentes isoformas de óxido nítrico sintasa.

## **V. LAS CICLOOXIGENASAS: LAS PROSTAGLANDINAS COMO MEDIADORES DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA.**

La familia de las ciclooxigenasas comprende tres miembros de enzimas de tipo oxidorreductasa, que catalizan la biosíntesis de eicosanoides (prostaglandinas, prostaciclina y tromboxano). Se denominan ciclooxigenasas -1, -2 y -3 (COX-1, COX-2 y COX-3).

La familia de las ciclooxigenasas (COXs) comprende un grupo de isoenzimas de tipo oxidorreductasa que catalizan la biosíntesis de eicosanoides (prostaglandinas, prostaciclina y tromboxano) por oxigenación del ácido araquidónico. Sus componentes, se denominan respectivamente ciclooxigenasas -1, y -2 (COX-1 y COX-2), aunque también se conocen como prostaglandina sintetasas-1 y -2 (PGHS-1 y PGHS-2) (Vane et al., 1998).

Se encuentran muy conservadas y están presentes en todos los vertebrados, encontrándose incluso en algunos invertebrados, como en los corales y esponjas. Este hecho hace suponer que aparecieron muy tempranamente en la evolución y se ha sugerido que ambas isoenzimas resultaron de una duplicación génica (Jarving et al., 2004). En organismos unicelulares, insectos y plantas no se han encontrado, pero en ellos se han identificado las llamadas oxigenasas inducibles por patógenos (PIOXs), que también son capaces de oxigenar ácidos grasos poliinsaturados, y que comparten un 30% de homología con las COXs (Sanz et al., 1998).

De los dos componentes de la familia COX, el primer enzima en identificarse fue la COX-1. Esta proteína se expresa normalmente de forma constitutiva y está presente en casi todos los tejidos en niveles constantes. Los metabolitos del ácido araquidónico derivados de la COX-1 son responsables del mantenimiento de las condiciones fisiológicas básicas del organismo, como es el caso de la citoprotección de la mucosa gástrica. El segundo isoenzima, la COX-2, en contraste con la COX-1, no se detecta en la mayoría de los tejidos; su expresión puede ser inducida por estímulos proinflamatorios, factores de crecimiento o agentes tumorigénicos. Este enzima está implicado en la producción de prostaglandinas que participan en procesos de estrés, patológicos e inflamatorios (Smith et al., 2000).

### **V.1. La ciclooxigenasa-1 (COX-1).**

La COX-1 es codificada por el gen *cox-1* que se encuentran localizado en los cromosoma 9 (q32-q33.3). *Cox-1* es un gen de mantenimiento (“housekeeping”), de aproximadamente 28 Kb de longitud, que contiene 11 exones y 10 intrones. El promotor no tiene caja TATA y presenta 2 sitios ricos en C-G para Sp1, que se cree están implicados en la transcripción de este gen. La expresión de *cox-1* es generalmente constitutiva y ubicua y por ello se conoce poco sobre los elementos del promotor que la controlan (Kraemer et al., 1992). Sin embargo también puede ser inducida, como por ejemplo durante la diferenciación de las células megacarioblásticas, pero los factores de transcripción que intervienen en esta regulación no han sido definidos (Tanabe et al., 2002).

La transcripción de *cox-1* resulta en 3 variantes de ARNm, uno de 2.8 Kb, otro de 4.5 y otro de 5.2 Kb. El que se produzca una u otra variante depende de cuál de los tres sitios de poliadenilación alternativos que posee sea usado. El transcrito de 2.8 Kb es generalmente el más abundante en todos los tejidos, el de 4.5 Kb está poco caracterizado y el de 5.2 Kb se expresa mayoritariamente (incluso a niveles superiores al de 2.8 Kb) en la vejiga y el colon (Hla et al., 1996).

El ARNm se transcribe hasta una proteína de 576 aminoácidos y aproximadamente 67 KDa de peso molecular. Esta proteína sufre un proceso de N-glicosilación en tres residuos de asparragina, que se piensa juega un papel importante en el plegamiento de la proteína. Se localiza mayoritariamente en el retículo endoplásmico, debido a una versión modificada de la secuencia KDEL que presenta en el extremo C-terminal, que actúa como señal de retención de proteínas en este compartimento celular (Morita et al., 1995).

### **V.2. La ciclooxigenasa-2 (COX-2).**

La COX-2 está codificada por el gen *cox-2* que se encuentra localizado en el cromosoma 1 (q25.2-25.3) (Kraemer et al., 1992). *Cox-2* es un gen más compacto que *cox-1*, de aproximadamente 8 Kb de longitud, que contiene 10 exones y 9 intrones, siendo los intrones más cortos que los de la COX-1. El promotor del gen muestra caja TATA canónica y sitios para varios factores de transcripción que incluyen un motivo NF-IL6, 2 sitios AP-2, tres sitios Sp1, 2 sitios NF-AT, 2 sitios NF-κB, un motivo CRE y

un sitio E-box (Appleby et al., 1994; Iñiguez et al., 2000). Consecuentemente, la expresión de *cox-2* puede ser regulada por un amplio rango de mediadores y agentes. El gen *cox-2* se transcribe hasta variantes de ARNm de 2.2 Kb, 3.8 y 4.2 Kb, por el uso de dos sitios de poliadenilación alternativos. El transcrito de 4.2 Kb es el que se encuentra mayoritariamente, ya que el sitio de poliadenilación situado más corriente abajo es el que se usa preferentemente. El ARNm que codifica la COX-2 también se caracteriza por presentar en la zona 3' UTR ("untranslated region") hasta un total de 23 (aproximadamente 2 Kb) de elementos ricos en adenosina-uridina (AUUUA), relacionados con la inestabilidad, eficiencia traduccional y recambio rápido. Esta es una diferencia básica con el ARNm que codifica la COX-1, que sólo presenta un elemento (aproximadamente de 0.7 kb) (Ristimaki et al., 1996).

El ARNm se transcribe hasta una proteína de 604aa y un tamaño de aproximadamente 69-72 KDa, que comparte una homología del 60% con la COX-1 (Garavito et al., 2003). Esta proteína puede sufrir un proceso de N-glicosilación hasta en cuatro residuos de asparragina, dando lugar a dos o tres formas glicosiladas (Nemeth et al., 2001). La función de estos estados de glicosilación es desconocida. Como la COX-1, presenta la versión modificada de la secuencia KDEL en el extremo C-terminal por lo que también se localiza mayoritariamente en el retículo endoplásmico. Además de esta secuencia dispone de otra de unos 18 aa, próxima a ella, cuya función se desconoce. Debido a su estructura (ver a continuación) también se puede encontrar en la membrana nuclear (Morita et al., 1995).

### **V.3. La ciclooxigenasa-3 (COX-3).**

En los últimos años, varios autores han identificado formas alternativas de COX-1, obtenidas todas ellas por maduración alternativa del ARNm transcrito desde el gen *cox-1*.

La primera variante de maduración descrita consiste en una forma de COX-1 mal plegada. Este mal plegamiento se debe a una delección de los últimos 111 bp del exón 9, que elimina la señal para la N-glicosilación. Su función se desconoce pero se ha observado que se expresa en bajos niveles en el miometrio (Moore et al., 1999). La segunda variante de la COX-1 carece del exón 1 y retiene parte del intrón 2. Ya que el exón 1 contiene el codón de iniciación, parece que este ARNm maduro daría lugar a una proteína "sin sentido". Es interesante, que este tipo de ARNm se ha encontrado en tumores colonrectales (Vogiaris et al., 2000).

Recientemente, se ha descrito una variante en tejidos cerebrales caninos que contiene el intrón 1. Esta variante, expresada en células de insectos, da lugar a una proteína que se ha denominado COX-3, que tiene una reducida actividad catalítica, sensible a drogas analgésicas y antipiréticas como la dipirona o el paracetamol. Hasta ahora, en el hombre no se ha identificado una proteína con las características de la COX-3, aunque se ha visto expresión de un ARNm de COX-1 que retiene parte del intrón 1 en córtex cerebral, corazón y músculo (Chandrasekharan et al., 2002). Junto con la COX-3, se detectaron otras variantes que también contienen el intrón 1, pero que carecen de los exones 5-8 y que se han denominado PCOX-1 (parcial COX-1). La delección de los exones, resulta en la pérdida de 219aa del dominio catalítico del enzima. Por tanto las PCOX-1 no pueden sintetizar prostaglandinas. Sin embargo, sí pueden actuar como oxidasas o isomerasas. Se han descrito dos formas de PCOX-1, PCOX-1a que contiene el intrón 1 y PCOX-1b, que carece de él.

#### **V.4. La estructura de la COX-1 y COX-2.**

La estructura general de los dos enzimas es muy similar, se presentan como homodímeros tanto estructural como funcionalmente. La estructura de cada monómero consiste en tres dominios: un dominio "factor de crecimiento epidérmico" (EGF) de 50 aminoácidos, un motivo de unión a membrana (MBD) de otros 50 aminoácidos y un dominio catalítico de unos 460 aminoácidos (Kurambail et al., 1996) (**Figura 4**). El dominio EGF constituye la zona de unión de cada uno de los monómeros, que se unen mediante puentes disulfuro e interacciones hidrofóbicas. Se sitúa en el extremo N-terminal, donde también se localiza el péptido señal, que dirige a las proteínas al lumen del retículo endoplásmico. Este péptido señal es de 22 a 26 aminoácidos en la COX-1, y de 17 en la COX-2, y es eliminado una vez que se sintetizan las proteínas. En la COX-3, la retención del intrón 1 hace que el péptido señal se retenga (Chandrasekharan et al., 2002). El dominio MDB está formado por cuatro hélices anfipáticas que crean una superficie hidrofóbica que le permite interactuar con la bicapa lipídica de las membranas microsomales del lumen del retículo. El dominio catalítico es globular y contiene dos lóbulos y los dos centros activos del enzima, el centro ciclooxigenasa y el centro peroxidasa. El centro peroxidasa se localiza en una hendidura localizada en la interfase de los dos lóbulos y en este lugar se sitúa también en grupo hemo. En cuanto a lo que el sitio activo ciclooxigenasa se refiere, éste se encuentra dispuesto al final de un estrecho canal hidrofóbico de 25 Å, cuya entrada

está enmarcada por las 4 hélices antipáticas del dominio DBD. Una diferencia importante entre los sitios activos ciclooxigenasa de la COX-1 y de la COX-2 es que el canal hidrofóbico de la COX-2 es un 25% mayor y tiene una forma ligeramente diferente que el de la COX-1. Esto se debe, básicamente, al cambio en un aminoácido en la secuencia de los 24 primeros residuos que constituyen el sitio activo: el aminoácido de la posición 523, que es isoleucina para la COX-2 cambia a valina en la COX-1. En el extremo del dominio catalítico se sitúa también la versión modificada de la secuencia KDEL. Las ciclooxigenasas también muestran varios canales para agua en su estructura, pero no está claro si sólo juegan un papel estructural o si están implicados en los procesos de catálisis.

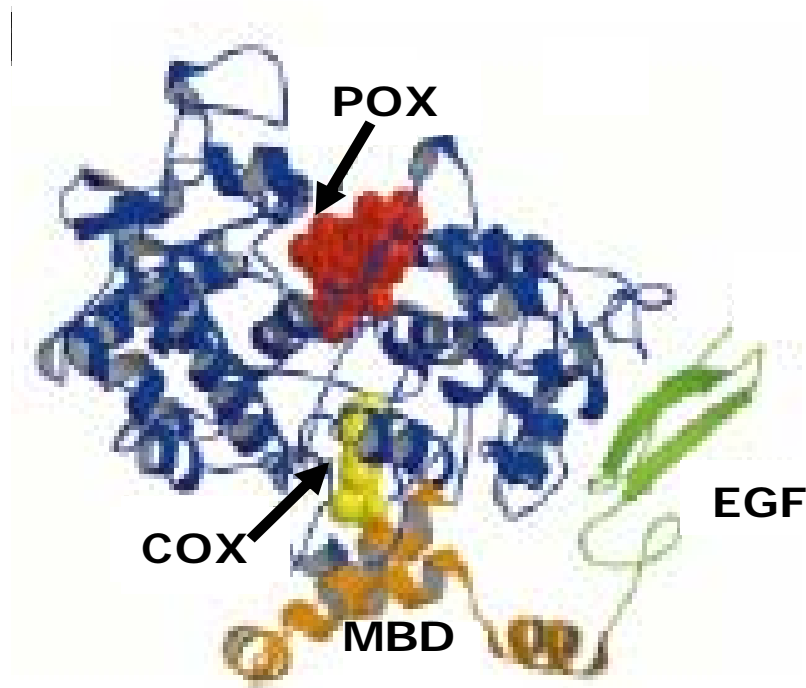


Figura 4. Estructura general de cada subunidad monomérica de las ciclooxigenasas.

### **V.5. La síntesis de prostaglandinas.**

Aunque los enzimas COX-1 y COX-2 poseen dos sitios activos con dos tipos de actividades enzimáticas (ciclooxigenasa y peroxidasa), generalmente se usa el término “ciclooxigenasa” para referirse a ambas actividades.

La COX-1 y la COX-2 catalizan la conversión del ácido araquidónico (AA) hasta prostaglandinas en una reacción en dos pasos (**Figura 5**) (Kulmacz et al., 2003). En el primer paso, por actividad ciclooxigenasa, dos moléculas de oxígeno son añadidas al AA generando prostaglandina  $G_2$  ( $PGG_2$ ). En el segundo paso, por actividad peroxidasa, la  $PGG_2$  es rápidamente reducida hasta prostaglandina  $H_2$  ( $PGH_2$ ). Finalmente, la  $PGH_2$  producida es convertida hasta las demás prostaglandinas (es decir, prostaglandinas  $D_2$ ,  $E_2$ ,  $F_{2\alpha}$ ), tromboxano  $A_2$  ( $TXA_2$ ) o prostaciclina ( $PGI_2$ ) por sintasas específicas de tejido y célula (Vane et al., 1998). En una ruta paralela a la de las ciclooxigenasas, el ácido araquidónico puede ser convertido hasta leucotrienos por la vía de la 5-lipooxigenasa o hasta los ácidos eicosatetraenoicos (HETE) por acción de las 11-, 12- ó 15-lipooxigenasa (**Figura 5**).

La reacción ciclooxigenasa es dependiente de peróxidos y requiere que el hierro del grupo hemo se reduzca, mientras que la reacción peroxidasa puede operar de forma independiente. La catálisis llevada a cabo por los enzimas COX-1 y COX-2, parece que ocurre de la siguiente forma (Marnett et al., 1999): Inicialmente un oxidante endógeno cuya naturaleza no se conoce, pero que puede ser por ejemplo el peroxinitrito, reacciona con el  $Fe^{3+}$  del grupo hemo situado en el sitio peroxidasa, reduciéndose este oxidante y originándose un radical ferril-oxoporfirina o intermediario I. El intermediario I sufre una reducción intramolecular por transferencia de un electrón desde el residuo Tyr385, un importante aminoácido que se dispone al final del canal hidrofóbico del sitio ciclooxigenasa, resultando en el intermediario II (ferril-oxo hemo) y un radical tirosilo. Mientras que el intermediario II es reducido por un reductor endógeno desconocido y puede continuar el ciclo, el radical tirosilo inicia la reacción ciclooxigenasa.



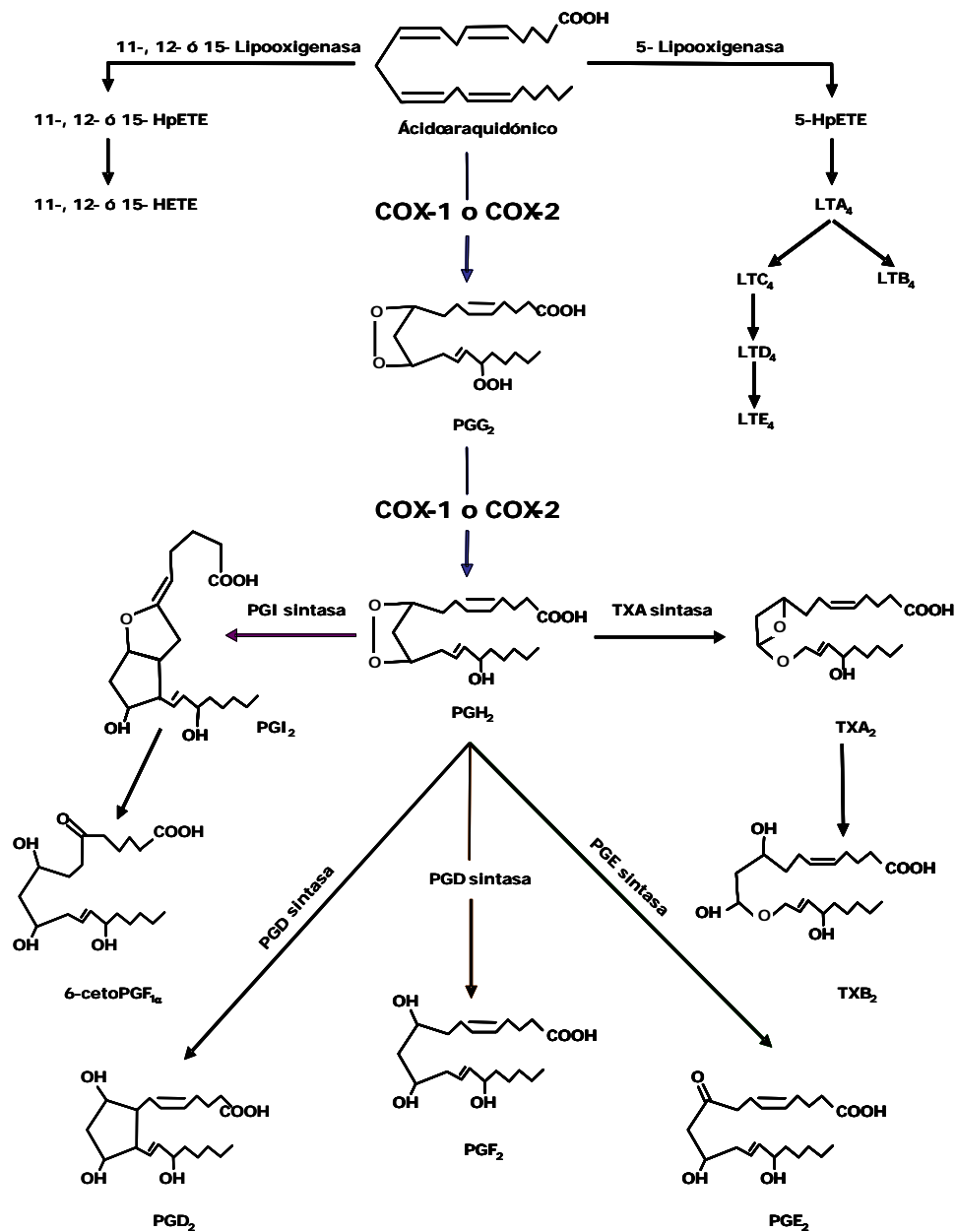


Figura 5. Síntesis de prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos a partir del ácido araquidónico.

Así cuando el sitio ciclooxigenasa es ocupado por un ácido graso apropiado, como el ácido araquidónico, el radical tirosilo sustrae un H al carbono 13, dando lugar a un radical araquidonato, el cual reacciona entonces con un oxígeno molecular para producir un radical 11-hidroperoxilo. Este radical a su vez forma un endoperoxido entre los carbonos 11 y 9, que se cicla, reaccionando con una segunda molécula de

oxígeno, produciendo PGG<sub>2</sub>. (Figura 6). La PGG<sub>2</sub> entonces es reducida por la actividad peroxidasa hasta PGH<sub>2</sub>.

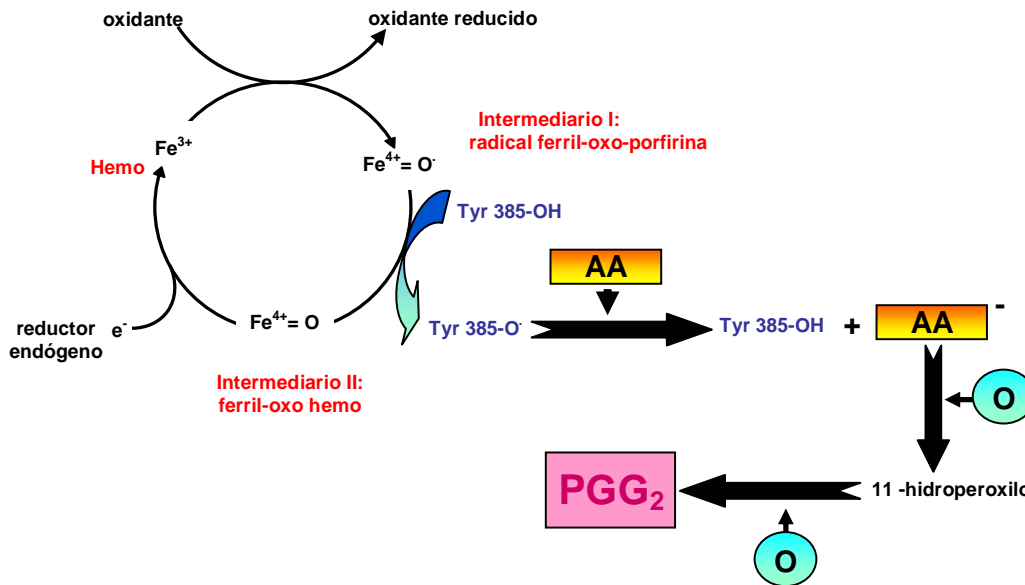


Figura 6. Reacción de catálisis ciclooxigenasa.

Este proceso de producción de PGH<sub>2</sub> por las prostaglandinas ocurre en un ciclo catalítico muy corto de aproximadamente 1 ó 2 minutos. Una posible explicación a esta observación sea que en un determinado momento los enzimas se inactiven. No se sabe qué fenómeno interviene en esta inactivación pero se sugiere que quizás ocurra por formación de un radical tirosilo en una posición diferente a la Tyr535, que provoque un cambio conformacional en las proteínas, impidiendo así su funcionamiento.

### V.6. La inhibición de las ciclooxigenasas.

Los inhibidores de las ciclooxigenasas, también llamados drogas anti-inflamatorias no esteroideas (AINEs) se han prescrito típicamente contra los procesos que cursan con inflamación y fiebre. Comparten características estructurales con el AA, lo que impide que éste interactúe con el canal hidrofóbico de los enzimas y explica por qué disminuyen la biosíntesis de prostaglandinas. Incluyen un gran número de compuestos, que se dividen en dos grandes grupos según su modo de comportamiento: (a) clásicos, no específicos de isoformas, que a su vez se dividen en varios grupos según su origen y estructura y (b) inhibidores selectivos para la COX-2

(**Tabla 6**). Los AINEs clásicos inhiben tanto la COX-1 y COX-2, aunque actúan más eficientemente sobre la COX-1 (Munroe et al., 1995). El uso continuado de los mismos provoca efectos no deseados, como úlceras gastroduodenales sangrantes (Brun et al., 2001), asociados con la inhibición de la COX-1. En contraste, los inhibidores selectivos para la COX-2 son mucho más selectivos para esta isoforma que para la COX-1 y no muestran efectos indeseados.

Por otra parte, aunque todos los AINEs compiten con el AA por el sitio activo, cada AINE presenta un modo de inhibición, que se puede incluir dentro de tres modos de inhibición generales (De Witt et al., 1999): (a) Unión rápida y de forma reversible (ej. Ibuprofeno, ácido mefenámico, ácido flufenámico, piroxicam, naproxeno); (b) unión reversible y rápida con baja afinidad seguida de unión, dependiente de tiempo, reversible y lenta (pseudoirreversible). Producen un cambio conformacional en la proteína (ej. flurbiprofeno, indometacina, diclofenaco, ácido meclofenámico) y (c) unión rápida y reversible seguida de modificación covalente (ej. unión de la aspirina por acetilación del residuo Ser530).

Los AINEs selectivos para la COX-2 “aprovechan” la estructura del sitio activo de esta isoforma para llevar a cabo su inhibición. Normalmente presentan en su estructura un grupo sulfonamida, metilsulfóxido o tioéter, que entra en el bolsillo hidrofóbico, más amplio que el de la COX-1, produciendo un cambio conformacional que inactiva al enzima. Inhiben, por tanto de forma dependiente de tiempo, pseudoirreversible, a la COX-2. Como ocurre con los AINEs clásicos el mecanismo de inhibición dependiente de tiempo no se conoce muy bien, pero parece que para los inhibidores selectivos de la COX-2 que contienen residuos sulfonamida o metilsulfóxido, implica interacción con el residuo Arg 513 (Kurambail et al., 1996). Sin embargo esto no es general, porque, por ejemplo, la inhibición del metilsulfóxido NS-398 no depende de interacción con Arg513 sino con Arg120, el mismo residuo al que se unen los AINES clásicos ácidos (Rieke et al., 1999).

<b>AINEs clásicos</b> (no selectivos)	<b>DERIVADOS ÁCIDO SALICÍLICO</b>	- Aspirina - Disalcid	- Diflunisal - Trilirate
	<b>DERIVADOS ÁCIDO ACÉTICO</b>	- Deriv. Ácido carbo- y herocíclico	{ - Etodolac - Indometacina - Sulindac - Oxaprocina
		- Deriv. Ácido fenilacético	{ - Diclofenaco - Acllofenaco - Tolmetin - Fencllofenaco
	<b>DERIVADOS ÁCIDO PROPIÓNICO</b>	- Flurbiprofeno - Suprofeno - Naproxeno - Carprofeno	- ketoprofeno - Ibuprofeno - Fenoprofeno
	<b>DERIVADOS ÁCIDO FENÁMICO</b>	- Ac. mefenámico - Ac. meclfenámico	- Ac. flufenámico
	<b>PIRAZOLONAS</b>	- Fenilbutazona	- Oxifenilbutazona
	<b>OXICAMS</b>	- Piroxicam - Isoxicam	- Tenoxicam - Meloxicam
<b>COMPUESTOS NO ACÍDICOS</b>	- Nabumetona		
<b>AINEs selectivos</b> (Inhiben COX-2)	- Celecoxib - Rofecoxib		- NS-398 - Valdecoxib

Tabla 6. Clasificación de los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs).

### V.7. La regulación de la expresión de las ciclooxigenasas.

Debido a que la COX-1 se expresa constitutivamente, no sufre apenas procesos de regulación. En cambio, ya que la COX-2 está relacionada con fenómenos patológicos, su expresión está muy regulada. Esta regulación está controlada a grandes rasgos, por sistemas de señalización dependientes de proteínas quinasas y por elementos reguladores a nivel transcripcional.

#### A) La regulación por sistemas de señalización dependientes de proteínas quinasas (MAPKs).

La cascada de las MAPKs es una de las rutas de señalización más importantes implicadas en la expresión del gen de la COX-2. Las ERK MAPKs, p38 MAPKs y JNK MAPKs, participan en la regulación de la expresión de la COX-2 en un amplio espectro de células como, por ejemplo, monocitos (Dean et al., 1999), células de neuroblastoma

(Fiebich et al., 2000), células epiteliales alveolares (Chen et al., 2001) o células epiteliales mamarias (Subbaramaiah et al., 1998). Las vías de las JNK y p38 MAPKs suelen ser compartidas en la inducción por activadores tales como citoquinas inflamatorias, endotoxinas bacterianas y situaciones de estrés ambiental tales como radiación ionizante, hiperosmolaridad, o estrés oxidativo. En cambio, la vía de las ERK MAPKs es importante en la expresión dependiente de oncogenes o mitógenos. La dependencia de estas quinasas se ha demostrado por el uso de mutantes constitutivamente activos, mutantes negativos o con el uso de inhibidores farmacológicos específicos (Tanabe et al., 2002; Smith et al., 2000). Junto a las MAPKs se ha descrito la participación de otras rutas de señalización dependientes de proteínas quinasas en la regulación de la COX-2, como es el caso de la proteína quinasa C (PKC), proteína quinasa A (PKA) ó fosfatidilinositol- 3 quinasa (PI-3K). Así, por ejemplo, se ha apuntado a la implicación de estas rutas en la expresión de la COX-2 en células de la granulosa (Wu et al., 2002), osteoblastos (Wadha et al., 2002), macrófagos (Misra et al., 2001) o células epiteliales de colon (Weaver et al., 2001) tras la luteinización, carga mecánica, ligación a través de la  $\alpha$ -2-macroglobulina ó estimulación con TNF- $\alpha$ , respectivamente.

### **B) La regulación a nivel transcripcional.**

Como se ha comentado, el promotor de la COX-2 contiene sitios de unión para un grupo de factores de transcripción (NFAT, NF- $\kappa$ B, NF-IL6, AP-2, Sp1, CRE y E-box) que actúan como elementos reguladores positivos para la transcripción del gen (Appleby et al., 1994). Entre ellos, se ha demostrado que NFAT regula la expresión de la COX-2 en linfocitos T tratados con ésteres de forbol o inhibidores de protein tirosin fosfatasas respectivamente (Iñiguez et al., 2000; Barat et al., 2003). Mutaciones puntuales o mutaciones completas (que delecionan) en los sitios de unión para NFAT disminuyen y cancelan, respectivamente, la expresión de la COX-2 inducida por estos agentes. El requerimiento de este factor de transcripción también se ha observado en células endoteliales estimuladas con factor de crecimiento vascular (VEGF) (Hernández et al., 2001) o agentes que movilizan  $Ca^{2+}$  (Robida et al., 2000), o en células mesangiales tratadas con endotelina-1 (Sugimoto et al., 2001). En todos estos casos el efecto de cada uno de los diferentes inductores es inhibido por el tratamiento con el inmunosupresor ciclosporina A, sugiriendo la implicación de la fosfatasa calcineurina en la inducción de la COX-2 dependiente de NFAT.

Por otra parte, NF- $\kappa$ B es el principal regulador de la expresión de la COX-2 inducida por TNF- $\alpha$ , hipoxia, endotelina, IL-1- $\beta$  y LPS en osteoblastos (Yamamoto et al., 1995), sinoviocitos (Crofford et al., 1997), células epiteliales (Chen et al., 2000; Chen et al., 2001, Jobin et al., 1998), células endoteliales (Schmedtje et al., 1997), hepatocitos (Gallois et al., 1998) o macrófagos (D'Acquisto et al., 1997). Evidencias de que la activación de NF- $\kappa$ B es requerida para la inducción por estos tratamientos, incluyen experimentos que muestran inhibición de la expresión de la COX-2 por oligonucleótidos antisentido para este factor de transcripción (Crofford et al., 1997), expresión de dominantes negativos para I- $\kappa$ B (Jobin y et al., 1998) y el uso de inhibidores del proteasoma (Jobin et al., 1998). Además mutaciones en los sitios de unión para NF- $\kappa$ B son capaces de atenuar la activación transcripcional de la expresión de la COX-2 inducida por estos agentes (Yamamoto et al., 1995).

La regulación de la expresión de la COX-2 por los restantes factores de transcripción está menos estudiada. En general se sabe que estos factores suelen actuar cooperativamente con otros. NF-IL6, por ejemplo, potencia la inducción dependiente de NF- $\kappa$ B de la COX-2 en macrófagos de ratón tratados con LPS (Wadleigh et al., 2000).

El elemento en respuesta a AMPc (CRE) regula, junto con NF-IL6, la inducción de la COX-2 promovida por TPA y LPS en células vasculares (Inoue et al., 1995).

El elemento "E-box" presente en el promotor de la COX-2 une la proteína USF-1. Este elemento parece ser esencial, junto con NF-IL6 para la activación de la expresión de la COX-2 en células granulosas de ratón (Morris et al., 1996).

### **C) La regulación a nivel posttranscripcional.**

Constituye el principal mecanismo de regulación de la expresión de la COX-2. Opera a través de los elementos AUUUA situados en la zona 3' UTR del ARNm que codifica la COX-2. En el transcrito corto (2.8 kb) se encuentran hasta 7 copias de elementos AUUUA, 6 de los cuales se agrupan en una región altamente conservada o CR1, que se sitúa justo a continuación del codón de terminación de la traducción. En el transcrito más largo (4.6 Kb) se encuentran 15 elementos AUUUA adicionales, tres de los cuales se agrupan en un segundo motivo conservado o CR2 (Sully et al., 2004). Estos elementos AUUUA o AREs (del inglés, "A-U elements") son muy importantes en la regulación de la estabilidad del ARNm que codifica la COX-2 en respuesta a estímulos externos. Así la función de la región CR1, que es la más potente

desestabilizadora de las dos, se ve bloqueada por activación de la ruta p38 MAPK, que actúa como un potente estabilizador del ARNm que codifica la COX-2 (Dean et al., 1999; Clark et al., 2003), posiblemente regulando la pérdida de adeninas.

Los AREs también regulan la estabilidad del ARNm interaccionando con proteínas de unión al ARN que regulan positiva o negativamente los procesos de pérdida de adenina y degradación 3'-5' (Guhaniyogi et al., 2001). Hasta la fecha se ha demostrado que un gran número de proteínas de unión a ARN son capaces de interaccionar con la zona CR1 3' UTR del ARNm que codifica la COX-2. Entre éstas se encuentran AUF-1 y AUF-2 (Dean et al., 2002), que son miembros de la familia de ribonucleoproteínas heterogéneas nucleares (hnRNP) de la familia D, que actúan tanto estabilizando como desestabilizando el ARNm, dependiendo del contexto e isoforma; la hnRNP<sub>A0</sub>, una proteína cuya fosforilación está regulada por la p38 MAPK (Rousseau et al., 2002); HuR, que es un factor estabilizante del ARNm (Dixon et al., 2001); los represores transcripcionales TIA-1 y TIAR (Dixon et al., 2003); la proteína desestabilizante tristetrapolina (TTP), también fosforilable por la p38 MAPK (Sawaoka et al., 2003), la proteína CUGBP2, que estabiliza el ARNm que codifica la COX-2 pero impide su traducción (Mukhopadhyay et al., 2003) o la proteína FBP1 de la familia hnRNPK que podría estimular la desestabilización por reclutamiento del exosoma, que degrada el ARN (Sully et al., 2004; Chen et al., 2001).

De todas estas proteínas la más estudiada es la HuR. Esta proteína se cree que estabiliza al mensajero, porque lo exporta al citoplasma. Así HuR es capaz de asociarse a las proteínas pp32 y APRIL que transporta a HuR fuera del núcleo a través del intercambiador nuclear CRM-1 (Cok et al., 2003).

### **V.8. El papel fisiológico de las prostaglandinas.**

Los productos de las ciclooxigenasas median gran cantidad de procesos fisiológicos y realizan sus funciones biológicas por la unión a receptores específicos acoplados a proteínas G, que se denominan con la letra "P" (de prostaglandinas) y el prefijo "D", "E", "F", "I, ó "T", dependiendo de si unen las prostaglandinas D, E, F, I o los tromboxanos. Otras prostaglandinas, como las ciclopentonas que incluyen a la PGJ<sub>2</sub>, 14-deoxi 12,14-PGJ<sub>2</sub> y la PGA<sub>2</sub> pueden activar receptores nucleares de tipo PPAR, pero no está claro si estas prostaglandinas se sintetizan bajo condiciones fisiológicas.

Entre los distintos procesos fisiológicos donde participan las prostaglandinas y tromboxanos se destacan la inflamación, el dolor, la fiebre, la regulación del tránsito intestinal, la regulación de la fisiología renal, la regulación del sistema cardiovascular, la regulación de la fisiología del pulmón, la regulación del sistema nervioso, la regulación del sistema inmune y la regulación de la reproducción (Morita et al., 2002; Simmons et al., 2004).

En la siguiente tabla (**Tabla 7**) se resumen las principales acciones fisiológicas de los productos de las ciclooxigenasas.

---

**PRINCIPALES ACCIONES FISIOLÓGICAS DE LOS PRODUCTOS DE LAS CICLOOXIGENASAS**

---

**PGE<sub>2</sub>**

Vasodilatación  
Aumento permeabilidad vascular  
Diuresis  
Natriuresis  
Eritema inflamatorio  
Fiebre  
Contracciones uterinas  
Hiperalgnesia  
Liberación de renina  
Reducción secreción ácidos gástricos  
Estimulación mucosa gástrica  
Estimulación secreción bicarbonato duodenal  
Insomnio  
Inhibición producción de citoquinas  
Inhibición producción O<sub>2</sub><sup>-</sup>  
Inhibición producción leucotrienos

**PGD<sub>2</sub>**

Vasodilatación  
Activación mastocitos  
Broncoconstricción  
Regulación ciclo del sueño

**PGI<sub>2</sub>**

Vasodilatación  
Inhibición agregación plaquetaria  
Fiebre  
Hiperalgnesia  
Liberación de renina  
Reducción secreción ácidos gástricos  
Estimulación mucosa gástrica  
Estimulación secreción bicarbonato duodenal

**PGF<sub>2</sub>**

Vasocostricción  
Diuresis  
Natriuresis  
Fiebre  
Contracciones uterinas  
Implantación embrión  
Parto

**PGF<sub>2</sub>**

Activación y agregación plaquetaria  
vasoconstricción

---

**Tabla 7. Principales acciones fisiológicas de los productos de las ciclooxigenasas.**



## **V.9. La COX-2 en la alergia y otras patologías.**

Cada vez hay más datos que apuntan a que la inducción y regulación de la ciclooxigenasa-2 puede ser un elemento clave en los procesos patofisiológicos de un gran número de enfermedades.

### **A) La COX-2 en la alergia.**

Estudios iniciales sugirieron que la expresión de la COX-2 puede ser inducida en las vías aéreas de sujetos asmáticos por citoquinas cuyos niveles se encuentran elevados en las mismas. Así se ha demostrado que la IL-1 $\beta$ , el TNF- $\alpha$  o la bradiquinina son capaces de inducir la COX-2 en varios tipos celulares de las vías aéreas como células epiteliales (Newton et al., 1997), células de músculo liso (Belvisi et al., 1997) y fibroblastos (Endo et al., 1995).

Se han realizado análisis de la expresión de la COX-2 en las vías aéreas de pacientes alérgicos, pero los datos son conflictivos. Por un lado hay estudios que indican que la expresión de la COX-2 en el epitelio respiratorio de pacientes alérgicos no se modifica (ni aumenta ni disminuye) en condiciones de asma estable (Demol et al., 1997) o asma estacional (Seymour et al., 2001). Por otro, un mayor marcaje inmunohistoquímico para la proteína COX-2 se ha encontrado en esputo inducido, infiltrado inflamatorio submucoso y epitelio aéreo de sujetos asmáticos, comparado con sujetos sanos (Sousa et al., 1997; Taha et al., 2000; Profita et al., 2003). También, una mayor expresión del ARNm que codifica la COX-2 se ha observado en el epitelio aéreo (Redington et al., 2001) o en células polimorfonucleares de sangre periférica (Kuitert et al., 1996) de sujetos asmáticos comparado con sanos.

Los resultados en animales de experimentación también son muy dispares. Estudios con cerdos sensibilizados a ovoalbúmina señalan un aumento del ARNm que codifica la COX-2 tras estimulación antigénica, manteniéndose el ARNm que codifica la COX-1 sin cambio alguno (Oguma et al., 2002). Experimentos con ratones deficientes para los genes de las ciclooxigenasas, presentan resultados diversos; ratones knockout para la COX-2 muestran mayor inflamación alérgica que ratones silvestres (Gavett et al., 1999). Otro estudio, en cambio, sostiene que son los ratones Knockout para la COX-1 los que manifiestan mayor inflamación alérgica que los silvestres, mientras que los ratones knockout para la COX-2 no muestran diferencias (Carey et al., 2003).

En cuanto a los productos de la COX-2, los efectos son muy diversos dependiendo de qué tipo de mediador se sintetice y de cómo actúe. Así, la PGE<sub>2</sub>, a bajas concentraciones se une a receptores EP y tiene un papel anti-inflamatorio y broncoprotector: previene la broncoconstricción inducida por alérgeno, atenúa las respuestas alérgicas temprana y tardía (Gauvreau et al., 1999), previene el asma inducida por ejercicio (Melillo et al., 1994), inhibe la síntesis de IgE, y reduce la respuesta celular de los mastocitos, eosinófilos, macrófagos y linfocitos T (Pavord et al., 1995). En cambio, a altas concentraciones la PGE<sub>2</sub> se une a receptores TP (de tromboxanos) y causa constricción de las células del músculo liso de las vías aéreas (Gardiner et al., 1980).

Al igual que la PGE<sub>2</sub>, la PGI<sub>2</sub> tiene un papel anti-inflamatorio y broncoprotector: ofrece protección contra la broncoconstricción inducida por ejercicio (Bianco et al., 1990) y regula la respuesta celular y la síntesis de citoquinas Th2 e IgE (Nagao et al., 2003). Sin embargo, las acciones de la PGI<sub>2</sub> no son muy duraderas, porque es muy inestable y de forma espontánea se degrada hasta 6-ceto-PGF<sub>1α</sub>, que carece de actividad biológica. La PGD<sub>2</sub> es el principal eicosanoide observado en las vías aéreas de sujetos alérgicos estimulados *in vivo* con alérgeno (Murray et al., 1986). Tiene un importante papel pro-inflamatorio y actúa como un potente broncoconstrictor en las vías aéreas humanas (Hardy et al., 1984). Fundamentalmente ejerce su actividad biológica a través de dos tipos de receptores, el clásico o receptor DP y un receptor alternativo o receptor CRTH<sub>2</sub>. A través de DP regula la producción de citoquinas Th2 (Matsuoka et al., 2000) y a través de CRTH<sub>2</sub> regula la migración de eosinófilos, basófilos y linfocitos (Iría et al., 2001).

La PGF<sub>2α</sub> es también sintetizado por las células de músculo liso de las vías aéreas y comparte las características pro-inflamatorias de la PGD<sub>2</sub>, pero su acción es menos potente (Thomson et al., 1981).

Por último, el tromboxano A es un potente agente broncoconstrictor que juega un importante papel en la hiperreactividad bronquial (O'Byrne et al., 1991) y activa la síntesis de leucotrienos (Noveral et al., 1992). Igual que ocurre con la prostaciclina, el TXA<sub>2</sub> es muy inestable y se degrada hasta TXB<sub>2</sub>, que carece de actividad biológica.

## **B) La COX-2 en otras patologías.**

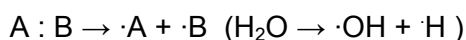
Además de en los procesos alérgicos, la COX-2 se ha relacionado con otras patologías que incluyen enfermedades inflamatorias crónicas como la artritis

reumatoide, osteoartritis o lupus eritematoso (Siegle et al., 1998; Xu et al., 2004). También se ha asociado con gastritis relacionadas con *Helicobacter pylori* (McCarthy et al., 1999), en glaucomas (Maihöfner et al., 2001) o en la enfermedad de Alzheimer (Pasinetti et al., 2001). En cuanto a la biología del cáncer, se ha encontrado una expresión anormal de la COX-2 en cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de estómago, y adenocarcinomas colorectales, pancreáticos o de próstata (Prescott et al., 2000; Thun et al., 2002).

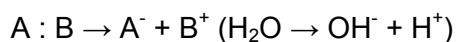
## **VI. LA PRODUCCIÓN DE RADICALES LIBRES DE OXÍGENO.**

El término “radical libre” se refiere a cualquier especie química capaz de tener existencia independiente y que contiene uno o más electrones desapareados. La presencia de estos electrones desapareados conlleva a que la especie en cuestión sea paramagnética, es decir, sea atraída en un campo magnético, y algunas veces la especie es altamente reactiva. Los radicales libres se forman cuando un enlace covalente entre los átomos se rompe permaneciendo cada electrón del enlace unido a cada átomo. Este proceso se llama “fisión homolítica”. Como ejemplo, se puede considerar la rotura de un enlace O-H en la molécula de H<sub>2</sub>O, produciéndose el radical hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ) y el radical hidronio ( $\cdot\text{H}$ ). Otra posibilidad es la “fisión heterolítica”, en la que un átomo recibe a ambos electrones. La rotura de H<sub>2</sub>O de forma heterolítica produce un ión hidrógeno (H<sup>+</sup>) y un ión hidróxido (OH<sup>-</sup>), que no son radicales libres (tienen carga eléctrica, pero sus orbitales electrónicos están completos).

### FISIÓN HOMOLÍTICA

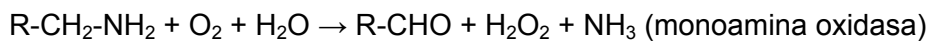
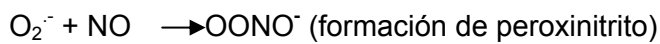
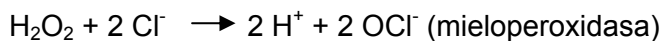
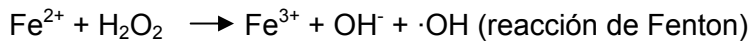
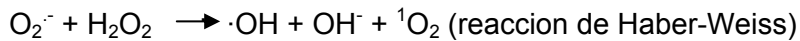
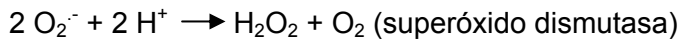
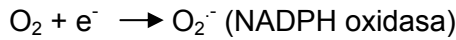


### FISIÓN HETEROLÍTICA



Los radicales libres de oxígeno sintetizados por el neutrófilo y el macrófago derivan de un precursor común, el O<sub>2</sub><sup>-</sup>. Este O<sub>2</sub><sup>-</sup> es generado durante la explosión respiratoria, mecanismo definido por Babior en 1978 como un proceso propio de las células fagocíticas. Éste tiene lugar en respuesta a un estímulo apropiado y conlleva la

producción de agentes microbicidas altamente reactivos, por la reducción parcial del oxígeno. Del  $O_2^-$  se pueden generar otros agentes reactivos. Así, por una reacción de dismutación, dos moléculas de  $O_2^-$  interaccionan formándose una molécula de  $H_2O_2$  y otra de  $O_2^-$ . Otra posibilidad, siguiendo la reacción de Haber-Weiss, es la reacción de una molécula de  $O_2^-$  con una de  $H_2O_2$  formándose el radical  $\cdot OH$ , el oxígeno singlete ( $^1O_2$ ) y otras especies reactivas de oxígeno.



### **VI.1. Las especies reactivas de oxígeno.**

Las especies reactivas de oxígeno son consideradas generalmente muy citotóxicas, porque pueden causar daños oxidativos a los componentes celulares. Sin embargo, a bajas concentraciones las especies reactivas de oxígeno pueden funcionar como mediadores fisiológicos de las respuestas celulares (Forman, et al., 2002), actuando como segundos mensajeros naturales en algunas vías de señalización. Recientemente, la producción de especies reactivas de oxígeno ha sido detectada en una variedad de células estimuladas con citoquinas tales como el factor de crecimiento transformante  $\beta 1$  (Herrera, et al., 2001; Thannickal, et al., 2000), interleuquina 1 (IL-1) (Bohler, et al., 2000; Dumont, et al., 2000) y el factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (Bohler, et al., 2000; Dumont, et al., 2000), con factores peptídicos de crecimiento tales como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) (Gorlach, et al., 2000), el

factor de crecimiento fibroblástico (Lo, et al., 1995; Krieger-Brauer, et al., 1995) y el factor de crecimiento epidérmico (EGF) (Bae, et al., 1997), con agonistas de receptores tales como el PMA (Li, et al., 2002), y con compuestos derivados del rutenio (Carballo, et al., 1997).

El término “especie reactiva de oxígeno” comprende muchas especies incluyendo el oxígeno singlete ( $^1\text{O}_2$ ), el radical anión superóxido ( $\text{O}_2^-$ ), los peróxidos de lípidos, el radical tiol peroxi (RSO $\cdot$ ), el radical ferrilo ( $\text{FeO}^{2+}$ ) y el radical hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ) (Moncada, et al., 1991; Huie, et al., 1993; Yim, et al., 1994; Stadtman, et al., 1991). Sin embargo, la naturaleza química de las especies reactivas de oxígeno generadas en respuesta a la activación de varios receptores, no ha sido bien caracterizada. El  $\text{H}_2\text{O}_2$  también fue detectado en células activadas (Konishi, et al., 1997). Es una molécula pequeña, difusible y omnipresente, que puede ser sintetizada, o destruida rápidamente en respuesta a estímulos externos. Por tanto cumple los requisitos fundamentales para funcionar como mensajero intracelular. Además, las especies reactivas de oxígeno tanto intra como extracelulares pueden ser rápidamente eliminadas por varios sistemas enzimáticos, tales como la superóxido dismutasa, la catalasa, y el sistema de la glutatión peroxidasa, permitiendo con ello, un control riguroso de la concentración de las especies reactivas de oxígeno y una rápida terminación de la señal.

## **VI.2. Las especies reactivas de nitrógeno.**

En células que producen tanto  $\text{O}_2^-$  como  $\cdot\text{NO}$ , se produce como resultado de la reacción de estos dos productos, el peroxinitrito ( $\text{OONO}\cdot$ ). Ambas especies tienen una vida media muy corta, por esa razón la reacción entre ambas especies solo puede ocurrir cerca de la fuente de ambas (Wink et al., 1998). El peroxinitrito es una molécula que de por sí no es altamente reactiva, sin embargo su forma ácida es muy inestable y reactiva, teniendo propiedades similares al  $\cdot\text{OH}$ . La formación de peroxinitrito constituye el mecanismo mediante el cual el  $\cdot\text{NO}$  adquiere muchísima toxicidad en mecanismos mediados por  $\text{O}_2^-$  cuando la reacción de Fenton no está involucrada.

## **VI.3. Las dianas moleculares de las especies reactivas de oxígeno.**

La generación de especies reactivas de oxígeno se ha relacionado con la activación de factores de transcripción tales como c-jun y c-fos del complejo Ap-1,

(Cheng, et al., 1999; Dhar, et al., 2002; Hsieh, et al., 1998; Janssen, et al., 1997), con NF- $\kappa$ B (Dhar, et al., 2002; Maziere, et al., 1999), con la ruta de las MAPKs (Chen et al., 1995; Stevenson, et al., 1994; Sundaresan, et al., 1995), con la fosfolipasa A2 (Zor, et al., 1993), con la transcripción del virus del sida (HIV) (Masutani, 2000) y con la inhibición de proteínas fosfatasa de tirosina (Fialkow, et al., 1994). El grado de fosforilación en tirosina es determinado por la actividad de dos familias de enzimas competidoras, las quinasas de tirosina y las fosfatasa de tirosina. Estudios *in vitro* (Hecht et al., 1992) e *in vivo* (Zor, et al., 1993) han sugerido que las especies reactivas de oxígeno pueden inhibir la actividad de ciertas fosfatasa de tirosina por la oxidación de un residuo conservado de cisteína presente en su dominio catalítico. El hecho de que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pueda inducir una rápida fosforilación en tirosina de múltiples proteínas celulares (Konishi, et al., 2001; Frank, et al., 2000; Pani, et al., 2000) sugiere que los oxidantes pueden regular proteínas quinasas y fosfatasa de tirosina. La p21 ras también es sensible a los cambios en el estado redox celular (Lander, et al., 1995). Las dianas localizadas “corriente abajo” “downstream” de las especies reactivas de oxígeno fueron desconocidas durante mucho tiempo. Se ha demostrado que la administración extracelular de concentraciones no letales de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> activa las MAPKs y también a la c-Jun amino terminal quinasa (JNK) (Sundaresan, et al., 1995; Stevenson, et al., 1994; Guyton, et al., 1996). También se ha descrito que la capacidad de los ligandos de activar las MAPKs puede ser inhibida por el tratamiento de las células con antioxidantes químicos o enzimáticos (Sundaresan, et al., 1995; Kamata, et al., 1996). Ésto fue también demostrado en la activación de la JNK. Se ha observado en varios tipos celulares, que la activación de la quinasa es inhibida por el tratamiento con el antioxidante N-acetil cisteína (NAC) (Lo, et al., 1996; Cui, et al., 1997). Como los antioxidantes afectan a los niveles del glutatión intracelular, se ha sugerido que algunos ligandos que activan a la JNK son sensibles al glutatión intracelular (Wilhelm, et al., 1997). La actividad de las quinasas reguladas por señal extracelular (ERKs) es sensible a cambios redox, y éstas pueden ser dianas directas de las especies reactivas de oxígeno (Guyton, et al., 1996). Una diana directa de las especies reactivas de oxígeno puede ser una fosfatasa de tirosina (Hecht et al., 1992). Todas estas moléculas contienen en el sitio activo, un residuo de cisteína que es esencial para su actividad biológica (Fischer, et al., 1991) y que puede ser regulado de manera dependiente del estado redox (Hecht, et al., 1992). Esta observación sugiere una relación directa entre la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y la fosforilación en tirosina. En condiciones basales, cuando los niveles de las especies reactivas de oxígeno están

disminuidos, la actividad de la fosforilación en tirosina sería baja, ya que la actividad específica de la fosfatasa es mucho más alta que su correspondiente quinasa de tirosina. La estimulación celular podría provocar un incremento de las especies reactivas de oxígeno, que podrían funcionar como inhibidores de la actividad fosfatasa de tirosina. Bajo tal escenario, la producción de especies reactivas de oxígeno estimulada por factores de crecimiento podría permitir temporalmente un aumento de la actividad quinasa a través de la inactivación de las fosfatasas. Evidencias recientes sugieren que tal mecanismo puede también ser común a otros activadores no clásicos de la actividad del receptor tirosina quinasa, tales como la radiación y los agentes alcalinos (Knebel, et al., 1996).

## **VII. SISTEMAS GENERADORES DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO.**

### **VII.1. LAS MONOAMINAS OXIDASAS.**

Las aminos oxidasas se dividen tradicionalmente en dos grupos en función de su cofactor. Por un lado están las que contienen FAD, entre las que se encuentran las monoamina oxidasa A (MAO-A), la MAO-B y las poliaminas oxidasas. Estas son enzimas intracelulares (Shih et al. 1999). El otro grupo de aminos oxidasas, contienen topaquinona como cofactor en la mayoría de los casos (Klinman et al., 1994; Klinman, 1996; Lyles, 1996). Entre estas se encuentran la lisil oxidasa, las diaminas oxidasas y las monoaminas oxidasas soluble y de membrana, las cuales se ha designado como SSAOs ("semicarbazide sensitive amine oxidases"), por su sensibilidad característica a semicarbazida. Ambos tipos de monoaminas oxidasas no solo se diferencian en sus cofactores, si no también en su distribución subcelular, sustratos, inhibidores específicos y funciones biológicas. Las MAO-A/B son enzimas mitocondriales que actúan en el metabolismo de neurotransmisores (noradrenalina) y otras aminos biogénicas (como la tiramina y la adrenalina) (Shih et al, 1999). La poliamina oxidasa presenta como sustratos preferidos la espermidina y la spermina, y posiblemente regulan el crecimiento celular (Séller et al., 1990). Por otro lado, la diamina oxidasa tiene preferencia por la putrescina y la cadavericina como sustratos (buffoni et al., 1966; Robinson-White et al., 1985; Barbry et al. 1990). Ésta es una enzima intracelular que se expresa fundamentalmente en la placenta, riñón e intestino. La diamina oxidasa también oxida histamina adquiriendo un importante papel en la regulación de la inflamación alérgica. Las otras SSAOs se presentan fundamentalmente solubles o

en la superficie celular, presentan diferentes sustratos, son insensibles a los inhibidores “clásicos” de monoaminas oxidasas (como la pargilina, la clorgilina y el deprenil) y median diferentes funciones biológicas (Lyles, 1996). Es interesante que varias drogas de uso clínico tengan la capacidad de inhibir las SSAOs. Entre ellas se encuentra el isoniazid (un antibiótico), la hidralazina (antihipertensivo) y la mexiletina (antiarrítmico) (Jalkanen et al., 2001).

#### **a) La estructura, nomenclatura y diversidad de las SSAOs.**

En el presente, la identidad molecular de este grupo de enzimas está comenzando a desentramarse. Hasta el momento, la actividad de las SSAOs se determina fundamentalmente por la actividad monoamina oxidasa presente en células, tejidos y fluidos corporales, pero dado su gran parecido con las “clásicas” monoaminas oxidasas, la complejidad de identificación de las diferentes SSAOs, así como la nomenclatura impuesta, ha creado un abanico algo confuso en cuanto a su identificación. En este sentido, la determinación del ADNc de las diferentes SSAOs ha comenzado a unificar la nomenclatura impuesta a este tipo de enzimas.

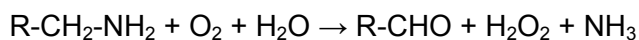
La mayoría de SSAOs son glicoproteínas dimericas con masas moleculares de entre 140-180 kDa (Klinman et al., 1994; Lyles, 1996). Contienen dos átomos de cobre por dímero. Su cofactor es la topaquinona (2,4,5-trihidroxifenilalanina) (Janes et al., 1990, Klinman, 1996).

La primera SSAO clonada fue la BSAO (presente en el suero bovino) (Mu et al., 1992). Después, dos grupos diferentes identificaron una misma proteína, designada como amina oxidasa de placenta (Zhang et al., 1996) ó proteína de adhesión vascular VAP-1 (Smith et al., 1998). Más tarde, se identificó la SSAO presente en la retina, denominada RAO, la cual se genera por “splicing” alternativo (Imamura et al., 1997, 1998), y por último se ha identificado una SSAO que aparentemente es un pseudogen (Cronin et al., 1998). Todas se encuentran presentes en el cromosoma 17. Los análisis iniciales de las secuencias muestran la presencia de una señal de secreción en todas las SSAOs. Hasta el momento se desconoce si la forma soluble de las SSAO es un producto de un gen diferente o si es producto del corte de la forma de membrana de la SSAO, pero parece que la forma soluble es producto del corte de la forma de membrana por que la secuencia N-terminal es idéntica en ambos tipos enzimáticos. Se ha encontrado que los niveles de SSAO soluble se encuentran aumentados en



enfermedades del hígado y en la diabetes (Garpenstrand et al., 1999; Kurkijärvi et al., 2000). En la diabetes la actividad SSAO puede generar lesiones aterogénicas por la liberación excesiva de aldehidos y especies reactivas de oxígeno (Yu et al., 1998).

Todas las SSAOs catalizan la deaminación oxidativa de aminas primarias de acuerdo a la siguiente reacción:



Está generalmente establecido que las SSAOs solo aceptan aminas primarias como sustratos, aunque existen excepciones (Yu et al., 1990). Sin embargo parece existir una gran variación en cuanto a los sustratos preferidos en las diferentes especies de mamíferos (Lyles, 1996). La bezilamina, es un sustrato sintético de estas monoaminas oxidasas, y es el preferido por la mayoría de ellas. En humanos, la metilamina y la alilamina son los sustratos más aceptados. Sin embargo, la mayoría de roedores tienen como sustratos preferidos la tiramina, triptamina, histamina y la  $\beta$ -fenil-etilamina.

#### **b) Funciones de las SSAOs.**

##### **- El catabolismo de aminas biogénicas.**

Todos los productos de la reacción de deaminación son activos biológicamente y mucho más tóxicos que los sustratos por si mismos, por lo tanto tienen la capacidad de generar lesiones ateroscleróticas. Probablemente el más interesante de los productos es el  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Esta especie reactiva es muy tóxica a altas concentraciones, sin embargo a bajas concentraciones se considera una molécula transdutora de señales implicada en múltiples procesos celulares (Finkel, 1998; Kunsch et al., 1999; Bogdan et al., 2000), entre los cuales se encuentra la regulación de factores de transcripción como  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  y la expresión de varios genes (incluyendo quimioquinas, citoquinas, moléculas de adhesión y metaloproteinasas). En la pared vascular, el  $\text{H}_2\text{O}_2$  regula la proliferación celular, y la adhesión a las células endoteliales y a las células de músculo liso.

- **El metabolismo de glucosa.**

La SSAO representa el 1% de las proteínas de la membrana del adipocito, y sus niveles de expresión están regulados de acuerdo al estadio de diferenciación de éste (Morris et al., 1997; Enrique-Tarancón et al., 1998; Moldes et al., 1999). En dichas células, la actividad SSAO se co-localiza con las vesículas GLUT4. Cuando los adipocitos son expuestos a benzilamina, el consumo de glucosa aumenta significativamente en un mecanismo dependiente de GLUT4 y aparentemente del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formado, el cual puede regular el tráfico intracelular del transportador de glucosa GLUT4 a la membrana plasmática. Los efectos de la actividad SSAO en el metabolismo de glucosa, en la fosforilación en tirosina del receptor de insulina, y en la actividad fosfatidil inositol-3-quinasa, parece ocurrir solo en presencia de vanadato (un potente inhibidor de fosfatasas) (Enrique-Tarancón et al., 1998, 2000). Aunque recientemente se ha demostrado que existe transporte de glucosa en ausencia de vanadato (Morin et al., 2001).

- **Una molécula de adhesión para leucocitos.**

Otra línea de investigación identifica una SSAO como una molécula de adhesión involucrada en el tráfico leucocitario. Este proceso consiste en una cascada de adhesión (Springer, 1994; Butcher et al., 1996; Salmi et al., 1997). Primero, los leucocitos del flujo sanguíneo se unen reversiblemente a las células endoteliales y “ruedan” a través de ellas durante el flujo sanguíneo. Cuando reciben señales de activación adecuadas se adhieren firmemente a la pared vascular y migran a los tejidos. Muchas moléculas de adhesión y las células endoteliales regulan la ejecución molecular de este proceso tan orquestado. Esta SSAO se identificó como VAP-1 (proteína de adhesión vascular-1) (Salmi et al., 1992). Se encuentra en gránulos intracelulares y bajo condiciones de inflamación se transloca a la membrana plasmática (Jaakkola et al., 2000). Esta molécula media una adhesión específica del subtipo leucocitario. Experimentos con VAP-1 recombinante revelan que esta proteína presenta actividad monoamina oxidasa, que tiene como sustrato preferido la benzilamina y que su reacción catalítica es importante para la adhesión leucocitaria (Salmi et al., 2001). Además el uso de inhibidores específicos contra la SSAO inhibe en más de un 50% la adhesión leucocitaria. Se ha postulado que además de las

aminas solubles, esta proteína pueda utilizar como sustratos aminas presentes en proteínas, aminoazúcares, etc.

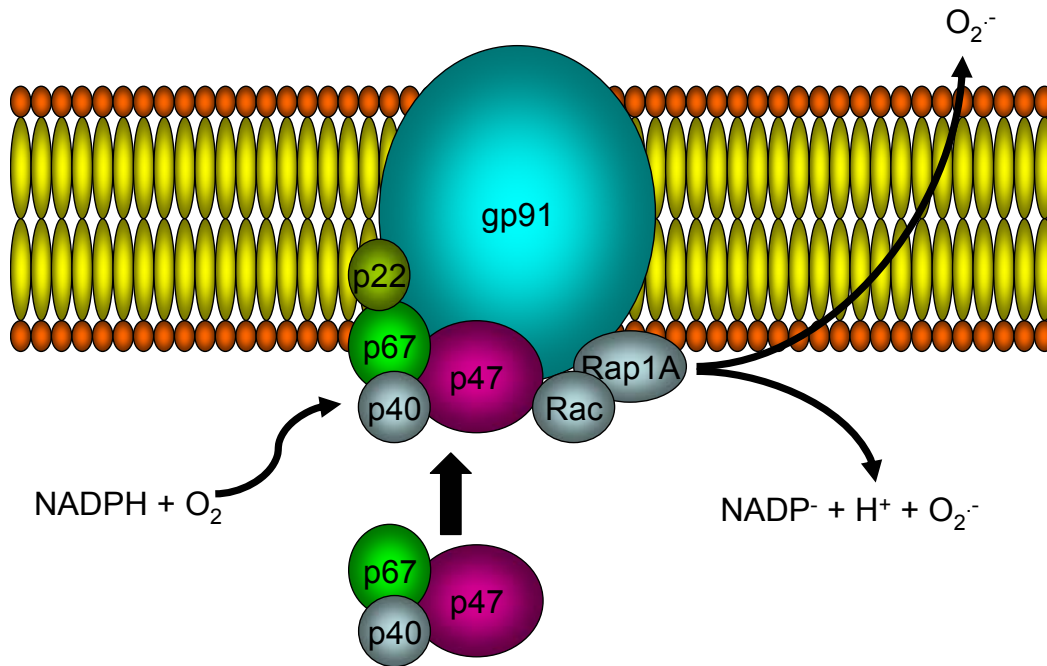
## VII.2. LA NADPH OXIDASA.

La mayor parte de la producción de especies reactivas de oxígeno está mediada por el complejo enzimático de la NADPH oxidasa, presente en la membrana de neutrófilos y macrófagos (Morel, et al., 1991). El grupo funcional de la oxidasa facilita la transferencia de un electrón del NADPH citosólico al oxígeno molecular, produciendo  $O_2^{\cdot-}$ . Éste es un precursor de oxidantes altamente reactivos que actúan como potentes agentes microbicidas (Chanock, et al., 1994; Morel, et al., 1991).



La importancia de la oxidasa en el organismo se demuestra por las infecciones graves y recurrentes que padecen los enfermos con granulomatosis crónica (ECG), que es consecuencia de una alteración hereditaria en la actividad de la NADPH oxidasa (Smith, et al., 1991; Curnutte, et al., 1992; Roos, et al., 1994). La NADPH oxidasa se presenta inactiva en células en reposo, pero se activa cuando la célula se expone a bacterias o a un estímulo soluble apropiado. La enzima posee tanto factores proteicos citosólicos como factores asociados a la membrana plasmática. Entre ellos se encuentra el citocromo  $b_{558}$ , que es una flavoproteína unida a la membrana (Nakamura, et al., 1988; Parkos, et al., 1988; Segal, 1987) que contiene sitios de unión para NADPH, FAD, y dos grupos hemo (Rotrosen, et al., 1992; Segal, al., 1992; Sumimoto, et al., 1992; Nisimoto, et al., 1995). Éste representa el componente enzimático de la NADPH oxidasa, y está compuesto por una glicoproteína de 91 kDa ( $gp91^{phox}$ ) y una proteína de 22 kDa ( $p22^{phox}$ ) (Nisimoto, et al., 1995; Rotrosen, et al., 1992; Segal, et al., 1992; Sumimoto, et al., 1992). Los componentes citosólicos de la NADPH oxidasa (la subunidad  $p47^{phox}$ , la  $p67^{phox}$  y una proteína unida a GTP denominada Rac) son considerados las subunidades reguladoras, dado que activan la producción de  $O_2^{\cdot-}$ . La tercera proteína citosólica, la  $p40^{phox}$ , se encontró unida a la  $p67^{phox}$  en el citosol de neutrófilos en reposo (Tsunawaki, et al., 1994; Wientjes, et al., 1993). Aunque la  $p40^{phox}$  no es requerida para la actividad NADPH oxidasa en sistema libre de células, podría jugar un papel estabilizando la  $p67^{phox}$  en las células intactas.

En células en reposo, los componentes de la NADPH oxidasa se presentan distribuidos entre el citosol y la membrana. Cuando se activan las células, los componentes citosólicos migran a la membrana donde se asocian con el citocromo  $b_{558}$  para formar la oxidasa activa catalíticamente (**Figura 7**) (Quinn et al., 1993; El Benna et al., 1994).



**Figura 7. Esquema de activación de la NADPH oxidasa.** En estado de reposo, las subunidades  $p47^{phox}$ ,  $p67^{phox}$  y  $p40^{phox}$  se encuentran en el citosol, mientras que la  $p22^{phox}$  y la  $gp91^{phox}$  se encuentran unidas a la membrana celular. Cuando la célula se activa, los componentes citosólicos migran a la membrana, donde se asocian a las demás subunidades para formar la NADPH oxidasa activa catalíticamente.

Los individuos con ECG tienen mutaciones en la  $p47^{phox}$ , la  $p67^{phox}$  o en una de las subunidades del citocromo  $b_{558}$ . La  $p47^{phox}$ , que no parece esencial para la actividad NADPH oxidasa, funciona como proteína adaptadora-reguladora y aumenta unas 100 veces la unión de la  $p67^{phox}$  a la oxidasa (Freeman et al., 1996). El mecanismo de la subunidad  $p47^{phox}$  consiste en acoplar la  $p67^{phox}$  a la subunidad de 22 kDa del flavocitocromo  $b_{558}$  (De Mendez, et al., 1994; Sumimoto, et al., 1994; De Leo, et al., 1996). La  $p47^{phox}$  y la  $p67^{phox}$  se encuentran en el citosol de células en reposo, formando un complejo con un tercer componente, la  $p40^{phox}$  (Someya, et al., 1993;

Wientjes, et al., 1993), el cual funciona como una proteína inhibidora. La p47<sup>phox</sup> y la p67<sup>phox</sup> pueden translocarse a la membrana plasmática (Heyworth, et al., 1991; Leto, et al., 1990; Tyagi, et al., 1992), y esto se correlaciona con la activación de la célula. En un sistema libre de células, la p47<sup>phox</sup> y la p67<sup>phox</sup> forman un complejo con el flavocitocromo b<sub>558</sub> en una proporción 1:1:1 (Uhlinger, et al., 1992). La activación de los neutrófilos por el péptido fMLP (formil-metionil-leucil-fenilalanine) o el PMA (forbol-12-miristato-13-acetato) conduce a un incremento en la fosforilación en los residuos de serina, treonina y tirosina de múltiples proteínas (Bechoua et al., 2001; Kuroki et al., 1999). El significado funcional de estas fosforilaciones y las proteínas quinasas implicadas se desconoce por el momento (Bockoch, 1995; Morel, et al., 1991). Una de estas proteínas es la p47<sup>phox</sup> que es fosforilada en varias serinas (El Benna, et al., 1994; El Benna, et al., 1996; Okamura, et al., 1988; Rotrosen et al., 1990). Esta fosforilación se requiere para su translocación a la membrana y para la activación de la NADPH oxidasa, ya que los pacientes con ECG deficientes en esta proteína no producen O<sub>2</sub><sup>-</sup>. La fosforilación de la p67<sup>phox</sup> en el estallido respiratorio participa en la regulación de la NADPH oxidasa por rutas tanto dependientes como independientes de la proteína quinasa C (Benna, 1997). Se ha propuesto que la p67<sup>phox</sup> regularía la transferencia de electrones del NADPH por reducción de la flavina, mientras que la p47<sup>phox</sup> controlaría el flujo de electrones desde la flavina a los grupos hemo (Freeman et al., 1996).

### **VII.3. La cadena de transporte de electrones mitocondrial.**

La cadena de transporte de electrones mitocondrial está formada por una serie de complejos: Complejo I o NADH-coenzima Q, Complejo II o succinato-coenzima Q, Complejo III o coenzima QH<sub>2</sub>-citocromo c reductasa. Este sistema reduce el oxígeno molecular generando O<sub>2</sub><sup>-</sup>, el cual es transformado por la superóxido dismutasa mitocondrial en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generado puede difundir al citoplasma a través de la membrana mitocondrial (Boveris et al., 1972; Turrens and Boveris, 1980; Chance et al., 1963; Kehrer, 2000; Freeman and Crapo, 1982). La producción de especies reactivas de oxígeno en la mitocondria representa aproximadamente un 1-2% del consumo total de oxígeno mitocondrial en condiciones normales. No obstante, la disfunción de alguno de los elementos que integran este sistema de transporte de electrones, bien por diversos estímulos (citoquinas) o bien por condiciones ambientales (hipoxia), induce un incremento de la producción de especies reactivas de

oxígeno mitocondrial (Chandel et al., 1998; Singh et al., 1998; Sies and de Groot, 1992).

#### **VII.4. La xantina oxidasa.**

La xantina oxidasa es un enzima soluble que a partir de la xantina produce ácido úrico,  $O_2^-$  y  $H_2O_2$ . El sistema xantina/xantina oxidasa es utilizado para la producción de especies reactivas *in vitro* en estudios sobre el efecto de estos radicales en las células. Sin embargo, los conocimientos sobre la participación de este sistema y las especies reactivas de oxígeno que genera en la fisiopatología celular son escasos (Freeman and Crapo, 1982; Thannickal and Fanburg, 2000). Es interesante, que la actividad enzimática de esta proteína tiene la capacidad de inhibir la actividad de la óxido nítrico sintasa (Rengasamy et al., 1993).

#### **VII.5. Otros sistemas productores.**

Recientemente se han descubierto otros sistemas productores de especies reactivas de oxígeno similares a la NADPH oxidasa en células no fagocíticas. Estos, son denominados genéricamente como Nox y parece que realizan otras funciones diferentes de la “clásica” actividad antimicrobiana en estas células (Lambeth et al., 2000).

### **VIII. LAS RUTAS DE SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR.**

#### **VIII.1. Las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs).**

En mamíferos, el término general MAPK (del inglés mitogen-activated protein kinase), comprende a una superfamilia de proteínas quinasas con actividad especificidad dual quinasa de serina/treonina, que pueden ser activadas por una gran variedad de estímulos. Su activación depende de la señal iniciada por receptores de factores de crecimiento fosforilados en tirosina, receptores de hormonas, receptores asociados a proteínas G o receptores de citoquinas inflamatorias. Además pueden ser activadas por condiciones de estrés del entorno, como choque osmótico, irradiación o lesiones en el ADN. La activación de las MAPKs en respuesta a estos estímulos

controla la expresión de genes, el metabolismo celular y funciones del citoesqueleto, contribuyendo a la regulación de procesos celulares tan complejos como la migración, mitogénesis, la diferenciación o la supervivencia celular. Estas MAPKs han sido divididas en tres grandes grupos en función de los estímulos que inducen su activación. Así por ejemplo, los factores de crecimiento o estímulos mitogénicos, promueven principalmente la activación de las quinasas ERKs (extracellular signal-regulated kinases); mientras que, estímulos que provocan el estrés celular inducen la activación de otras dos subfamilias, las p38 MAPKs y las JNK/SAPKs (c-jun NH2-terminal kinase o stress-activated MAP Kinases) (Robinson et al., 1997; Jonson et al., 2002; Kyosseva, 2004).

La activación de cada familia de MAPK se produce en forma de cascada (Dong et al., 2002; Garrington et al., 1999). Dicha cascada está formada por tres módulos con actividad quinasa, donde los miembros del módulo superior fosforilan y activan a los miembros del módulo inferior. La especificidad de la respuesta de la MAPK viene dada por la activación específica de determinados miembros de cada uno de estos módulos. Estos módulos se esquematizan como MAPKKK-MAPKK-MAPK. De esta manera, el tercer módulo, correspondiente a las familias ERK, p38MAPK y JNK serán fosforiladas y activadas por un segundo módulo de MAPK quinasas (MAPKKs). Estas MAPKKs son quinasas con especificidad dual y catalizan una doble fosforilación en tirosina y treonina sobre las MAPKs, necesaria para que éstas sean completamente activas. Por otro lado, las MAPKKs serán fosforiladas y activadas por quinasas de serina/treonina que funcionan como MAPKK quinasas (MAPKKKs), el primer módulo. La regulación de estas quinasas podría ser complicada por el gran número de combinaciones que existen, pero no es así. Primero, las MAPKKs representan un número menor de miembros que el de las MAPKs. Segundo, las MAPKKs presentan una alta de especificidad por sus sustratos MAPKs, conduciendo a un número mínimo de combinaciones en los módulos MAPKK-MAPK. Tercero, las MAPKKKs presentan diferentes motivos de regulación que los que presentan las MAPKKs o MAPKs. Por tanto, las MAPKKKs pueden ser reguladas por una variedad de proteínas específicas activadas en respuesta a los diferentes estímulos extracelulares. Por último la regulación de la cascada MAPKKK-MAPKK-MAPK dependerá de su interacción con unas proteínas adaptadoras denominadas "scaffolding". El papel de estas proteínas consiste en aumentar la concentración local de las proteínas quinasas y sus sustratos específicos (Morrison et al., 2003).

### **A) La activación de la ERK MAPK.**

La cascada de activación de las ERKs es la que ha sido más extensamente estudiada, ya que se activa bajo el estímulo de numerosos agentes mitogénicos. ERK1 y ERK2, conocidas también como p44-, p42- MAPKs, son los primeros miembros que se conocieron de esta subfamilia. Actualmente se sabe que existen al menos 6 miembros más (ERK3, ERK4, ERK5, ERK6, ERK7 Y ERK8) (Bogoyevitch et al., 2004). El segundo módulo de activación (MAPKK) está compuesto por los miembros de la familia MEK: MEK1 y MEK2. De todos los posibles estimuladores de MEK que se conocen, son quizás, las isoformas Raf, Rac y Mos las únicas capaces de fosforilar a este segundo módulo. Una vez activas, las ERK1/2 son capaces de fosforilar y regular numerosas proteínas, entre las que se encuentran las quinasas RSK, MNK1/2, MAPKAP-K2 y MAPKAP-K3, proteínas citosólicas como la PLA<sub>2</sub> (fosfolipasa A<sub>2</sub>), el coactivador SRC1 o los factores de transcripción C-Fos, C-Jun, ATF2 ó ELK1. (Roux et al., 2004; Rubinfeld et al., 2004) (**Figura 8**).

### **B) La activación de la p38 MAPK.**

Este subgrupo de las MAPKs comprende a cuatro miembros de quinasas de Ser/Thr de 38 KDa, de ahí su nombre. Estas isoformas son conocidas como p38 $\alpha$ , p38 $\beta$ , p38 $\gamma$  y p38 $\delta$ . Se activan fuertemente por condiciones de estrés en el entorno celular y/o citoquinas inflamatorias, aunque también se ha descrito su activación por insulina o factores de crecimiento. En este caso, el módulo MAPKKK lo comprenden miembros de la familia MEKK (MEKK1, MEKK2, MEKK3, MEKK4), de la familia ASK y de la familia TAK. Las isoformas MKK3 (también MEK3 ó SKK2) y MKK6 (MEK6 ó SKK3) de la familia MEKK, son mayoritariamente las componentes del módulo MAPKK y las responsables de la fosforilación de la p38. Por último, los principales sustratos de las p38 MAPKs son las quinasas MAPKAP-K2, MAPKAP-K3, PRAK, MNK1/2, MSK y los factores de transcripción ELK1, NFAT2 y ATF2 (Roux et al., 2004; Kyriakis et al., 2001) (**Figura 8**).

### **C) La activación de la JNK MAPK.**

Las quinasas JNKs también conocidas como SAPKs representan el tercer grupo de MAPKs que han sido identificadas en mamíferos. Existen unas diez isoformas



diferentes de JNK, de entre 46-54 KDa. La cascada de señalización de la vía JNK empieza con el primer módulo MAPKKK, que lo comprenden miembros de las familias MEKK, ASK y TAK, al igual que en la vía p38 MAPK y otros miembros de las familias MLK y TPL2. Al segundo módulo MAPKK pertenecen las isoformas MKK4 y MKK7. Entre los sustratos de las JNKs se encuentran proteínas que regulan procesos de apoptosis y muerte celular, como p53 y Bcl-2 y factores de transcripción como ATF2, ELK1 y C-Jun (Kyriakis et al., 2001) (**Figura 8**).

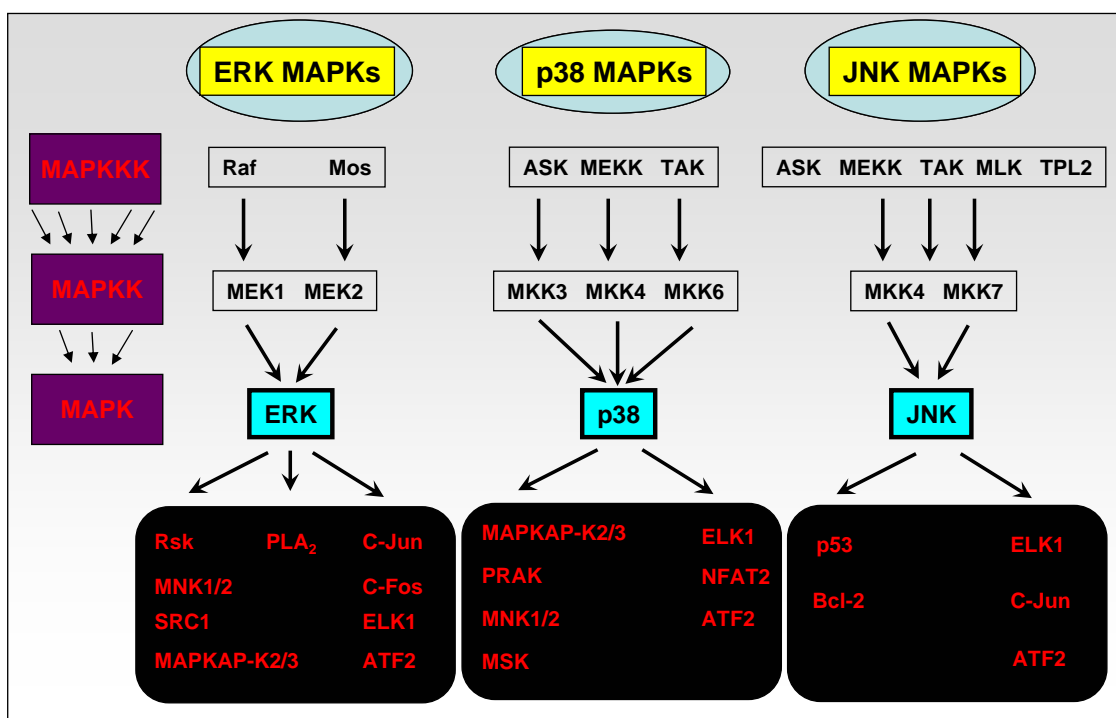


Figura 8. Activación de la vía de las MAPKs.

## VIII.2. La calcineurina/calmodulina.

La calmodulina (CaM) es una proteína de 17 KDa de expresión ubicua, que actúa como sensor de los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  en las células eucarióticas. Presenta una estructura globular, con dos subunidades, cada una de las cuales presenta dos dominios EF de unión a  $\text{Ca}^{2+}$ . La calmodulina tiene por tanto 4 sitios de unión al  $\text{Ca}^{2+}$ , y de éstos, al menos 3 deben estar ocupados por el ion para que el enzima sea activo catalíticamente. Ésta, una vez se activa, interviene en muchas rutas de señalización, activando a su vez la función de varias quinasas (las calmodulinas-quinasas I y II, la

quinasa de la cadena ligera de miosina), fosfatasa (calcineurina), canales iónicos, y otros enzimas citosólicos, tales como la fosfodiesterasa, la adenilato ciclase y la óxido nítrico sintasa (Crivici et al., 1995).

La calcineurina (CaN), también conocida como fosfatasa 2B (PP2B), es una fosfatasa de serina/treonina altamente conservada, dependiente del  $\text{Ca}^{2+}$  celular y del enzima calmodulina (Klee et al., 1998; Aramburu et al., 2000). Está ubicuamente expresada y se presenta en forma heterodimérica con dos subunidades: una de 59 kDa, denominada calcineurina A (CaN-A), con isoformas diferentes isoformas (CaN- $\text{A}\alpha$ , CaN- $\text{A}\beta$  y CaN- $\text{A}\gamma$ , respectivamente), y una de 19 kDa, denominada calcineurina B (CaN-B), con dos isoformas (CaN-B1, CaN-B2). La CaN-A, que es la subunidad catalítica, presenta un dominio catalítico, un dominio de unión a CaN-B, un dominio de unión a CaM y un dominio carboxilo terminal con actividad autoinhibitoria. La CaN-B, que es la subunidad reguladora, presenta cuatro dominios EF de unión al  $\text{Ca}^{2+}$ . Un esquema de la estructura y la activación del enzima, se muestra en la **Figura 9**. En condiciones basales, la subunidad CaN-A es inestable e inactiva, debido a la función de autoinhibición del dominio carboxilo terminal. La unión de la subunidad CaN-B (ligada a  $\text{Ca}^{2+}$ ) estabiliza a la subunidad catalítica, que sigue siendo inactiva. La llegada de la CaM (unida también al  $\text{Ca}^{2+}$ ) al sitio de unión en la subunidad catalítica, permite un cambio conformacional que conlleva a la activación del enzima.

La función de la CaN en las rutas de transmisión de señales celulares fue establecida estudiando cuál era la diana molecular de una serie de drogas, como la ciclosporina A (CsA) y el tacrolimo (FK506) (Liu et al., 1991; Ho et al., 1996; Ruhlmann et al., 1997). Estos productos microbianos cruzan la membrana celular y se unen a proteínas intracelulares denominadas inmunofilinas, que incluyen las ciclofilinas (Cyp) y la proteína de unión 12 (FKB12). La unión inmunosupresor-inmunofilina es de alta afinidad y da lugar a la formación de complejos nuevos, CsA-ciclofilina y FK506-FKBP12. Las inmunofilinas son proteínas abundantes, presentes en muchos tipos celulares, que se cree que participan en plegamientos proteicos y en el transporte intracelular, similares a las chaperoninas. Sólo una pequeña fracción del contenido celular de inmunofilinas queda ocupada con las drogas, sin embargo se consigue la inmunosupresión. Ésto es debido a que los complejos formados entre CsA-ciclofilina y FK506-FKBP12 adquieren nuevas propiedades, como es el poder de unirse e inhibir competitivamente la actividad fosfatasa de la CaN. Se ha demostrado que los sitios de

unión para estos complejos sobre la CaN no son idénticos pero están solapados (Cárdenas et al., 1995).

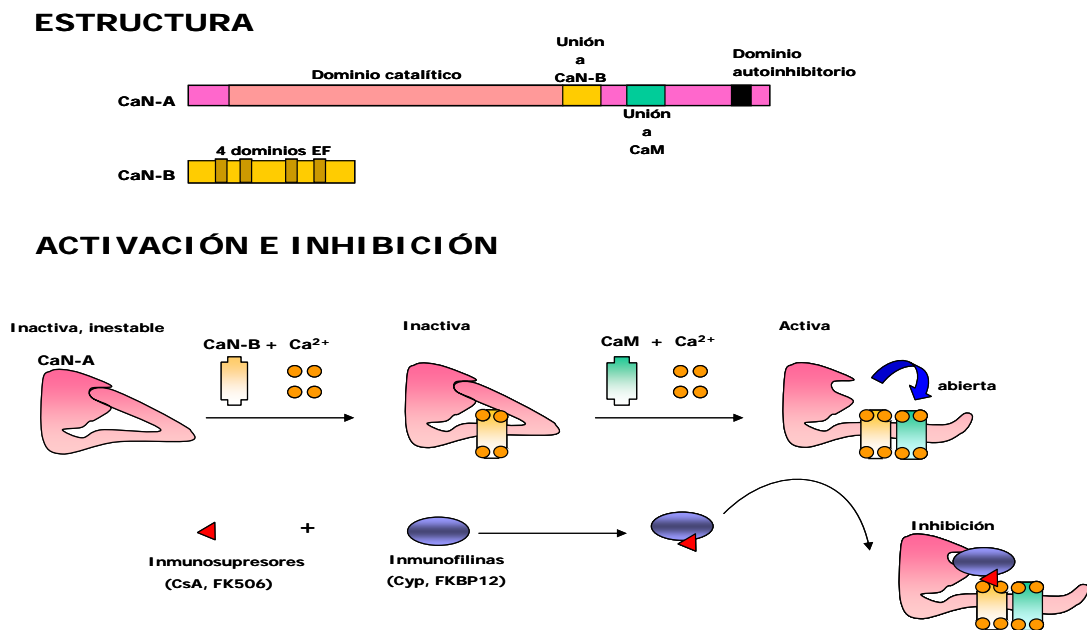


Figura 9. Estructura y activación de la fosfatasa 2B/calcineurina.

Hasta la fecha se han descrito 4 inhibidores naturales de la calcineurina, la proteína adaptadora “scaffolding” Akap79, que impide su acceso a los sustratos (Klauck et al., 1996), la proteína Cabin-1, que directamente bloquea la actividad calcineurina (Sun et al., 1998), la proteína CHP, que es homóloga a la subunidad B de la calcineurina y que se une a la subunidad A e impide que ésta se active (Lin et al., 1999) y la DSCR1 o calcipresina-1, que interacciona con la subunidad A (Genesca, 2003).

### VIII.3. El factor de transcripción NF- $\kappa$ B.

Fue identificado inicialmente como un factor nuclear implicado en la expresión del gen de la cadena ligera de las inmunoglobulinas, de ahí su nombre.

Estructuralmente, NF- $\kappa$ B es un complejo homo o heterodimérico, que puede estar compuesto por varias subunidades proteicas denominadas p50, p65, p52, c-Rel y RelB. Estas subunidades presentan la particularidad de compartir en el extremo N-terminal una región de unión al ADN altamente conservada denominada dominio de homología a la proteína viral *v-rel* (RHD), responsable de la unión al ADN y de la dimerización. También esta región permite su localización en el núcleo debido a que en ella se encuentra una secuencia NLS de localización nuclear (Ghosh et al., 1998; Hayden et al., 2004).

Mientras que las subunidades p65, c-Rel y RelB se sintetizan como tales, las subunidades p50 y p52 se originan como grandes proteínas precursoras (p105 y p100, respectivamente). La p50 se origina por procesamiento constitutivo a partir de la p105, y la p52 se forma a partir de la p100, en un proceso complejo que implica pasos de fosforilación y ubiquitinización (Amir et al., 2004). Las subunidades p65, c-Rel y RelB son activas transcripcionalmente, debido a que contienen un dominio de transactivación (TAD) en su extremo C-terminal, y de todas ellas, particularmente activa es la p65, que contiene dos dominios TADs. A diferencia de las anteriores, la p50 y la p52 son transcripcionalmente inactivas y los dímeros p50/p50 ó p52/p52 reprimen la transcripción génica (Ghosh et al., 2002). Sin embargo estas subunidades pueden inducir la transcripción génica formando dímeros con la p65, c-Rel y RelB. De todos los dímeros posibles, el conjunto p65/p50 suele ser el más abundante y el prototípico.

NF- $\kappa$ B es un factor de transcripción altamente regulado. Así sus subunidades aparecen retenidas en el citoplasma celular por proteínas de la familia I- $\kappa$ B (proteínas inhibitoras de  $\kappa$ -B), con 7 miembros denominados I- $\kappa$ B $\alpha$ , I- $\kappa$ B $\beta$ , I- $\kappa$ B $\epsilon$ , I- $\kappa$ B $\gamma$ , I- $\kappa$ BNS y los precursores p100 y p105 (Ghosh et al., 1998). Las proteínas I- $\kappa$ -B inhiben a NF- $\kappa$ B porque se unen al dominio RHD enmascarando la secuencia NLS. La proteína I- $\kappa$ B $\beta$  enmascara la secuencia NLS de la p65 y de la p50, mientras que I- $\kappa$ B $\alpha$  sólo es capaz de enmascarar la señal NLS de la p65, pero no de la p50. Además, I- $\kappa$ B- $\alpha$  contiene una secuencia de exportación desde el núcleo (NES). Esos hechos sugieren que mientras que I- $\kappa$ B $\beta$  sólo aparece en el citosol, I- $\kappa$ B- $\alpha$  pueda encontrarse en el núcleo formando complejos NF- $\kappa$ B/I- $\kappa$ B $\alpha$ .

Clásicamente, la “activación canónica” de NF- $\kappa$ B en respuesta a citoquinas proinflamatorias, mitógenos o proteínas virales, presenta un punto crítico: la activación del llamado complejo quinasa de I- $\kappa$ -B (IKK), que fosforila a I- $\kappa$ B en residuos de serina

(Ghosh et al., 2002). I- $\kappa$ B fosforilada es reconocida por la proteína  $\beta$ -TrCp, que la acopla a una ubiquitina ligasa específica perteneciente a la familia SCF, para que ésta lleve a cabo su poliubiquitinización en residuos de lisina (Ben-Neriah, 2002). Una vez ubiquitinado, I- $\kappa$ B es degradado por la subunidad 26S del proteasoma. De esta forma, NF- $\kappa$ B libre se puede translocar al núcleo, unirse a elementos específicos en el ADN, y activar la transcripción génica. El complejo IKK está constituido por tres subunidades asociadas íntimamente, dos de ellas catalíticas IKK- $\alpha$  e IKK- $\beta$ , y otra reguladora, NEMO. La activación de ambas IKK depende de su capacidad para dimerizar y de que sean fosforiladas en serina. De las tres subunidades, IKK- $\beta$  y NEMO parecen ser esenciales para el funcionamiento del complejo (Israel, 2000). La función de IKK $\alpha$  en este modelo canónico no está completamente aclarada; sólo se conoce que a diferencia de IKK $\beta$ , que es exclusivamente citosólica, IKK $\alpha$  puede ser reclutada hasta el núcleo en regiones promotoras de genes regulados por NF- $\kappa$ B, para fosforilar, junto a otras proteínas como RSK1, MSK1 o MSKL2, a la histona H3 y contribuir a la expresión génica (Yamamoto et al., 2003).

Con respecto a las quinasas que fosforilan “corriente arriba” a IKK, varios trabajos han señalado la importancia de la familia MAPKKK. En este sentido se ha descrito la posible participación de NIK, MEKK1, MEKK3 y Cot/TPL2. También se han implicado a las quinasas PKC $\xi$  y TAK1 (Schmitz et al., 2004).

Aparte de lo comentado hasta ahora, la actividad NF- $\kappa$ B se regula también a nivel transcripcional, por fosforilación de la p65 en la región RHD y en los dominios de transactivación. Así, la p65 puede ser fosforilado en residuos de serina por multitud de quinasas, entre las que se encuentran la PKA, la CKII, la GSK3, la PKC $\xi$ , la MSK1, la CaMKIV o el complejo TBK/KAK. Recientemente también se ha señalado que la p65 es fosforilada por una quinasa desconocida en un residuo de treonina. Esta fosforilación se supone que regula la estabilidad de la p65. Así la p65 fosforilada en treonina se asocia con el enzima peptidil propil isomerasa (Pin1), que isomeriza los residuos de serina y treonina fosforilados que preceden a una prolina. Pin1 estabiliza la p65 regulando negativamente a SOCS-1, una proteína capaz de ubiquitinar la p65 para que sea degradado en el proteasoma. Además, Pin-1 impide que se una con I- $\kappa$ -B $\alpha$  y potencia su localización nuclear (Schmitz et al., 2004).

La p65 una vez fosforilada es capaz de reclutar al coactivador CBP/p300, ser acetilada, y de esta forma potenciar la transcripción (Ghosh et al., 2004). También se

ha descrito que la p65 acetilada disminuye su afinidad por I- $\kappa$ B $\alpha$ . Un esquema general de activación de NF- $\kappa$ B es ilustrado en la **Figura 10**.

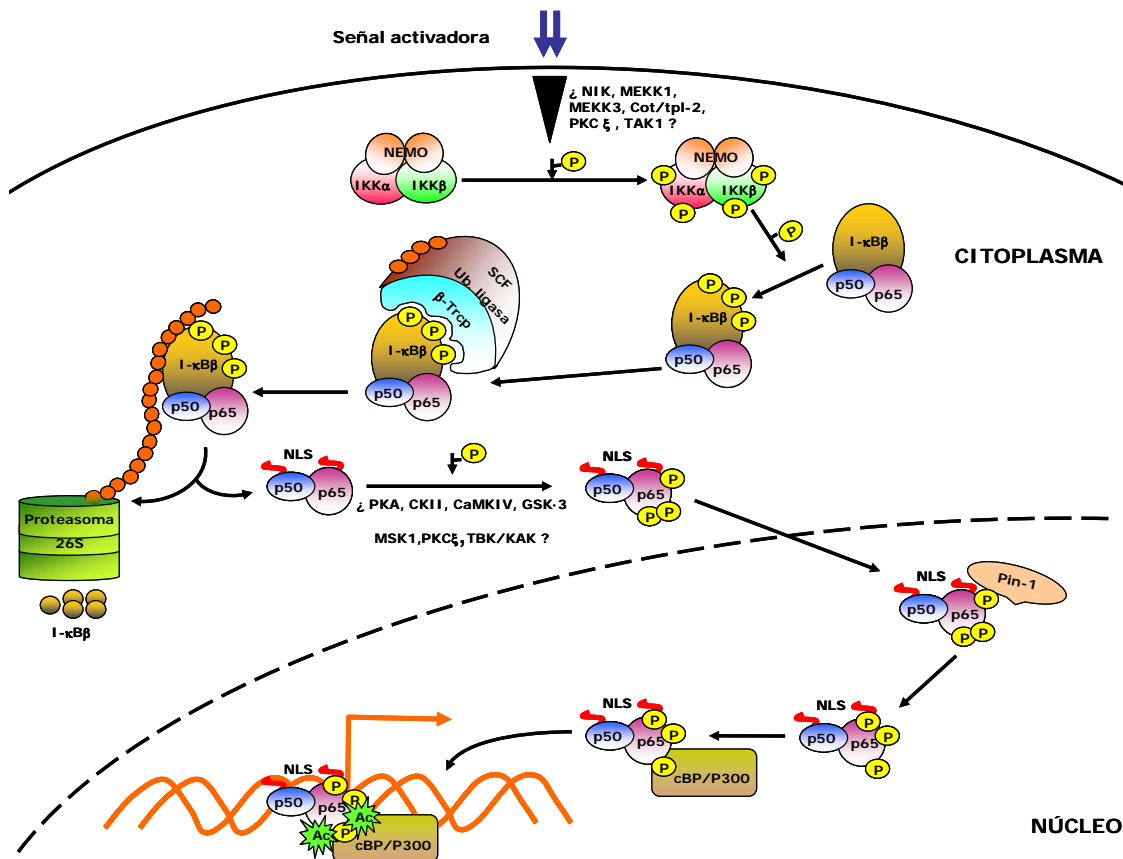


Figura 10. Activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B.

En lo que se refiere a la terminación de la activación de NF- $\kappa$ B, se ha descrito que I- $\kappa$ B $\alpha$  juega un papel importante. De esta forma, I- $\kappa$ B $\alpha$  se sintetiza tras la activación de NF- $\kappa$ B, en un proceso de retroalimentación negativa, ya que su gen está

regulado por el mismo factor de transcripción que lo reprime. Una vez que cesa la señal activadora, la p65 es desacetilado y desfosforilado. En esta forma puede ser capturado en el núcleo por el recién sintetizado I- $\kappa$ B $\alpha$ , y exportado de nuevo al citosol, gracias a una secuencia de exportación presente en I- $\kappa$ B $\alpha$  (Schmitz et al., 2004).

#### **VIII.4. El factor de transcripción NFAT.**

##### **- Las isoformas de NFAT y su distribución celular en el sistema inmune.**

Los factores de transcripción de la familia “Nuclear Factor of Activated T cells” (NFAT) juegan un papel importante en la respuesta inmune, regulando la expresión de una gran variedad de genes, entre los que se encuentran: Interleuquinas (IL)-2, IL-4, IL-5 y IL-13, el factor estimulador de colonia de granulocito-macrófago (GM-CSF), interferón  $\gamma$ , y el factor de necrosis tumoral, en un rango amplio de células del sistema inmune (Rao et al., 1997). Existen diferentes isoformas dentro de la familia de NFAT, las cuales presentan patrones específicos de expresión en función del tipo celular (Chuvpilo et al., 1999; Sherman et al., 1999). Hasta la fecha han sido identificadas 5 isoformas dentro de la familia, cuya actividad en la mayoría de los casos es regulada por una fosfatasa dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ , la calcineurina (CaN). De esta manera, cuatro de las isoformas de NFAT son factores sensibles a  $\text{Ca}^{2+}$ /CaN, incluyendo NFAT1 (también denominada NFATp), NFAT2 (también denominada NFATc), NFAT3 y NFAT4 (también denominada NFATx). Todos estos, comparten un dominio de unión al ADN similar, sin embargo, la isoforma NFAT5 (también denominada TonEBP/NFATz), es un factor independiente de  $\text{Ca}^{2+}$ /CaN, que fue identificado inicialmente como una proteína de respuesta a estrés osmótico (“tonicity-responsive enhancer-binding protein”) (Miyakawa et al., 1999). Éste difiere significativamente en su estructura del resto de la familia (Graef et al., 2001). Está bien aceptado, que la actividad de esta familia de factores de transcripción está controlada además de por sus patrones de expresión, por su localización subcelular y por su habilidad de unión al ADN.

Se conoce que los miembros de esta familia están presentes en una variedad de órganos, tejidos y tipos celulares (Ranger<sup>a</sup> et al., 1998; Chin et al., 1998; Molkentin et al., 1998; Musaro et al., 1999; Olson et al., 2000; Graef et al., 1999). Con respecto al sistema inmune, las diferentes isoformas de NFAT se expresan específicamente en función del tipo celular: NFAT2 se expresa en los basófilos (Schroeder et al., 2002);

NFAT1 y 2 en los mastocitos (Hock et al., 2003; Shaw et al., 1995), los linfocitos natural killer (Shaw et al., 1995; Aramburu et al., 1995), los monocitos (Shaw et al., 1995, Wang et al., 1995) y en los macrófagos (Shaw et al., 1995; Wang et al., 1995; Ishida et al., 2002); NFAT1 y 4 en los eosinófilos (Jinquan et al., 1999); NFAT1, 2 y 4 en los linfocitos B (Shaw et al., 1995; Timmerman et al., 1997); y NFAT1, 2, 4 y 5 en los linfocitos T (Shaw et al., 1995, Timmerman et al., 1997; Trama et al., 2002; Lyakh et al., 1997). Sin embargo, la presencia de estas proteínas o de sus transcritos codificantes no ha sido encontrada en neutrófilos (Wang et al., 1995; Carballo et al., 1999). Los niveles de ARNm de NFAT a menudo no muestran correspondencia directa con las cantidades intracelulares de sus productos proteicos (Schroeder et al., 2002; Trama et al., 2000), y la mayoría de estudios muestran un análisis separado a nivel de proteína y ARNm. La expresión constitutiva de NFAT1 a nivel de proteína y de ARNm ha sido descrita en muchos tipos celulares (Shaw et al., 1995; Aramburu et al., 1995; Wang et al., 1995; Lyakh et al., 1997; Jinquan et al., 1999). La expresión de NFAT2 se encuentra más restringida y en la mayoría de los casos su expresión es inducida solo bajo la estimulación celular con complejos inmunes o con ionomicina y ésteres de forbol (Lyakh et al., 1997; Amasaki et al., 2000). La proteína NFAT3 nunca ha sido detectada en células del sistema inmune, pero su transcrito se encuentra expresado en linfocitos de sangre periférica, aunque escasamente (Hoey et al., 1995). En lo que respecta a NFAT4, tanto su proteína como su ARNm se presentan constitutivamente expresados en varios órganos y células del sistema inmune (Lyakh et al., 1997; Hoey et al., 1995; Ho et al., 1995; Masuda et al., 1995; Amasaki et al., 2002). Finalmente, el ARNm que codifica la isoforma NFAT5 se expresa constitutivamente en el timo y en linfocitos de sangre periférica (Trama et al., 2000) y su proteína correspondiente ha sido detectada en esplenocitos y linfocitos T periféricos bajo tratamiento conjunto con ionomicina y ésteres de forbol (Trama et al., 2002).

#### **- La activación de NFAT.**

NFAT es activado por receptores de la superficie celular asociados con la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  via fosfolipasa C. La activación de NFAT comienza con la desfosforilación del dominio regulador, localizado en la region N-terminal del dominio de unión al ADN. En células en reposo este dominio es fuertemente fosforilado en residuos de serina distribuidos entre los 4 motivos ricos en serina (SRR-1, SPxx repetido, SRR-2 y KTS) (Beals et al., 1997<sup>a</sup>; okamura et al., 2000). La calcineurina



desfosforila 3 de los 4 motivos y esto dispara su acumulación nuclear e incrementa su actividad de unión al ADN (Shaw et al., 1995; Okamura et al., 2000; Porter et al., 2000; Neal et al., 2001). Para que se produzca una desfosforilación eficiente, se requiere la unión entre la calcineurina y NFAT (Aramburu et al., 1998; 1999; Chow et al., 1999; Líu et al., 2001). El principal sitio de unión de NFAT a la calcineurina se encuentra situado en el extremo N-terminal del dominio regulador de NFAT y contiene la secuencia PxlIT (SPRIEIT). Se conoce que la calcineurina se presenta en el núcleo de las células estimuladas, donde mantiene el estado de desfosforilación de NFAT y su localización nuclear. Cuando el  $\text{Ca}^{2+}$  penetra, la actividad calcineurina es inhibida, NFAT es refosforilado por quinasas, abandona el núcleo y la transcripción de genes dependiente de NFAT termina (Garrity et al., 1994; Loh et al., 1996; Timmerman et al., 1996). La actividad calcineurina puede ser controlada con independencia de  $\text{Ca}^{2+}$ , regulando la expresión de miembros de la familia de inhibidores endógenos de la calcineurina DSCR/MCIP. Éste es un proceso de retroalimentación negativa. La calcineurina/NFAT controla la expresión de DSCR1/MCIP1, los cuales inhiben la actividad calcineurina (Yang et al., 2000). Los 13 residuos de serina que controlan la localización nuclear de NFAT1 parecen ser reconocidos por una sola quinasa (**Figura 11**).

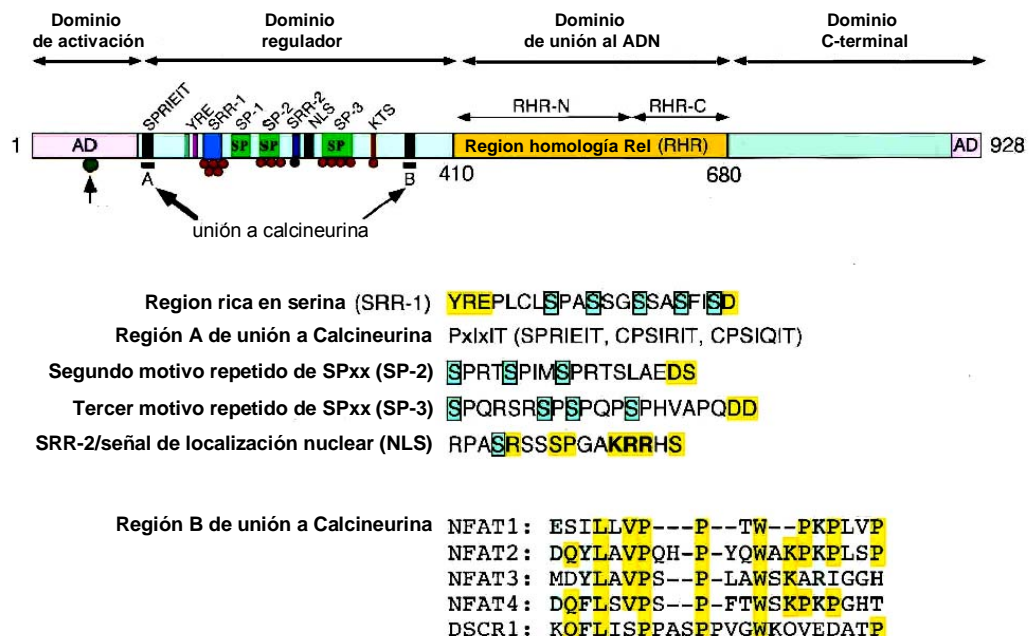
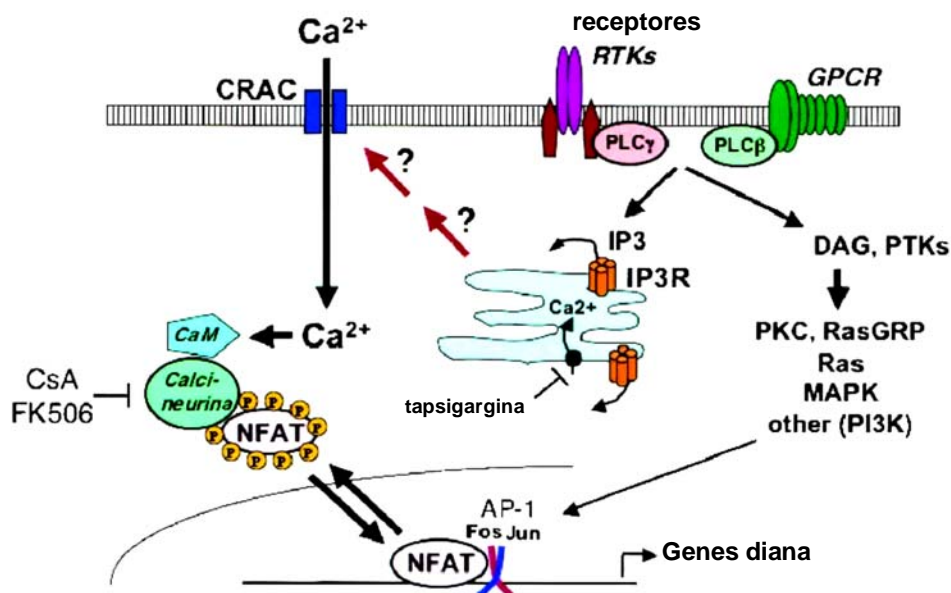


Figura 11. Estructura del factor de transcripción NFAT.

Una explicación podría ser que varias quinasas constitutivas cooperan para mantener inactivo NFAT en células en reposo y que tras la activación, varias quinasas inducibles podrían regenerar el estado de reposo mediante refosforiación. La region SRR-1 se presenta en las isoformas NFAT2-4, mientras que los motivos SP-2 y SP-3 no están presentes en NFAT3. Por lo tanto, a los mecanismo conocidos de activación de NFAT: las fosforilaciones específicas de los diferentes miembros de la familia, la distribución subcelular, la afinidad de unión al ADN y la actividad transcripcional, se añade que la existencia de multiples quinasas que regulan de forma continua los niveles de activación de NFAT (Shaw et al., 1995; Beals et al., 1997<sup>a</sup>; Okamura et al., 2000; Porter et al., 2000; Neal et al. 2001). Un esquema resepresentativo de la activación de NFAT es mostrado en la **Figura 12**.



**Figura 12. Esquema del ciclo de activación de NFAT.** Receptor tirosin quinasa (RTK); Fosfolipasa C- $\gamma$  (PLC- $\gamma$ ); Fosfolipasa C- $\beta$  (PLC- $\beta$ ); Receptor asociado a proteína G (GPCR); Inositol-1,4,5-trifosfato (IP3); Receptores de IP3 (IP3R); Canales de calcio (CRAC); Calmodulina (CaM); Ciclosporina (CsA); Diacilglicerol (DAG); Proteína quinasa de tirosina (PTK); Proteína quinasa C (PKC); MAP quinasas (MAPK); Fosfatidil inositol 3 quinasa (PI3K).

Aunque han sido identificadas varias quinasas de NFAT, el esquema integrado de fosforilación se desconoce. CK1 y CK3 son quinasas constitutivas que promueven el transporte nuclear de NFAT (Beals et al., 1997<sup>b</sup>; Zhu et al., 1998). La fosforilación por GSK3 requiere la anterior fosforilación de la PKA (Sheridan et al. 2002). GSK3 fosforila

los motivos SPxx de NFAT2 (Beals et al., 1997<sup>b</sup>). Las MAPKs, p38 y JNK, son quinasas inducibles que promueven el exporte nuclear de NFAT, fosforilando selectivamente NFAT en las secuencias Ser-pro (SP) presentes en el comienzo de sus regiones SRR-1. JNK1 fosforila NFAT2 y NFAT4, mientras que la p38 fosforila NFAT1 y NFAT3 (Chow et al., 1997; Gomez del Arco et al., Yang et al. 2002). Se ha propuesto un mecanismo para la JNK1, en el cual ésta fosforila el sitio de unión a la calcineurina de NFAT2 (SPRIEIT), bloqueando la interacción entre ambas (Chow et al., 2000). La activación selectiva de las diferentes quinasas de exportación nuclear puede explicar de que forma las diferentes isoformas pueden estar reguladas de forma diferente en función del tipo celular. AKT/PKB al fosforilar la GSK3 inhibe su activación, y por tanto prolonga la permanencia de NFAT en el núcleo (Diehn et al., 2002). El receptor de importe nuclear de NFAT aun no ha sido identificado, aunque un candidato potencial es Rch1 (Torgerson et al., 1998) y el receptor de exportación nuclear parece ser Crm1 (Okamura et al., 2000).

Como para otros factores de transcripción, la actividad de NFAT puede ser regulada por la modificación de sus dominios de transactivación. Este fenómeno no ha sido muy estudiado, aunque la fosforilación de este dominio en NFAT1 ha sido observada (Okamura et al., 2000). Las quinasas Cot1 y Pim-1 potencian la transactivación de NFAT1 y NFAT2 (de Gregorio et al., 2001; Rainio et al., 2002).

#### **- La autorregulación de NFAT2.**

La transcripción de la isoforma más corta de NFAT (NFAT2/NFATc/A) es llevada a cabo por NFAT de forma sensible a ciclosporina A, en un proceso considerado de retroalimentación positiva (Zhou et al., 2002). Esta proteína es generada a través de la utilización de un promotor distinto (Chuvpilo et al., 1999). Como resultado, esta isoforma carece del dominio C-terminal completo y presenta un dominio N-terminal alternativo que difiere del resto de las isoformas. El hecho de que esta proteína presente autorregulación positiva explica por qué es la principal isoforma identificada, participando en múltiples procesos biológicos (Glimcher et al., 2000; Takayanagi et al., 2002).

El factor de transcripción AP-1 es el principal compañero de NFAT (Marcián et al., 2001). Éste consiste en heterodímeros de Fos y Jun. Por lo tanto la actividad de NFAT es afectada por los siguientes factores:

- La magnitud y la cinética de  $\text{Ca}^{2+}$ .

- Los niveles de la actividad calcineurina.
- La actividad de las quinasas que regulan la exportación nuclear de NFAT.
- La actividad de unión al ADN.
- La actividad de la vía de transmisión de señales intracelulares de la PKC/MAPK.
- Otras señales intracelulares que regulan la síntesis y actividad de Fos-Jun.

**- NFAT y el balance Th1/Th2. Implicación en la respuesta mediada por IgE.**

Las citoquinas Th2 son reconocidas como piezas claves en la regulación de la alergia y el asma. Experimentos llevados a cabo en ratones que carecen de la expresión de alguna isoforma de NFAT sugieren que NFAT1 juega un papel fundamental en la regulación de las citoquinas Th1 generadas, mientras que NFAT2 parece más importante en la generación de citoquinas Th2. En este sentido, un ratón deficiente en NFAT1 presenta incrementada la respuesta alérgica en comparación con el ratón salvaje, manifestada por la acumulación de eosinófilos en el sitio de inflamación, por un aumento en la producción de IL-4, por el incremento de los niveles séricos de IgE y por la localización nuclear constitutiva de NFAT2 (Ranger<sup>b</sup> et al., 1998; Yoshida et al., 1998). Esta condición alérgica es incrementada cuando el ratón es deficiente en NFAT1 y NFAT4 (Ranger<sup>b</sup> et al., 1998). Por otro lado, los linfocitos T mutados de ratón, carentes de NFAT2 no generan IL-4 e IL-6, pero si generan IL-2 (Yoshida et al., 1998). Por lo tanto, a diferencia de NFAT2, NFAT1 se considera un regulador negativo de la respuesta Th2 *in vivo*.

En este sentido, trabajos recientes implican a NFAT en la expresión de genes mediada por IgE, tanto en basófilos (Schroeder et al., 2002), como en mastocitos (Hock et al., 2003).

O B J E T I V O S



De una manera genérica, nuestros **objetivos** están dirigidos a estudiar el efecto de las especies reactivas de oxígeno sobre diferentes procesos bioquímicos de células fagocíticas, tales como los macrófagos y los neutrófilos.

**Los objetivos** de la presente Tesis Doctoral son los siguientes:

**1) Estudiar el efecto del  $H_2O_2$  sobre la expresión de la NOS2 en macrófagos peritoneales de rata.** También se pretende estudiar el efecto de la activación de enzimas que producen  $H_2O_2$  de forma endógena, tales como las monoaminas oxidadas, sobre la expresión de la NOS2.

Estos objetivos iniciales fueron ampliados a partir de los resultados previos obtenidos para analizar si algunas especies reactivas de oxígeno específicas, derivadas de las reacciones de Fenton, están implicadas en estos procesos. Así como para verificar la presencia de la SSAO (un tipo de las isoenzimas de las monoaminas oxidadas) en macrófagos.

**2) Estudiar la relación entre la activación de la NADPH oxidasa, enzima productora de  $O_2^-$ , y la expresión de la COX-2 en neutrófilos de pacientes alérgicos.** Como estímulo se utilizarán alérgenos y anticuerpos anti-IgE.

De una manera más detallada, se tratará de estudiar:

- (a) Que tipo de prostaglandina se libera.
- (b) Las especies reactivas de oxígeno involucradas en el proceso.

(c) Las rutas de transmisión de señales intracelulares que están implicadas, tales como la MAP quinasa y el factor de transcripción NF- $\kappa$ B.

**3) Analizar la potencial presencia de NFAT en neutrófilos humanos, tanto a nivel de proteína como de ARNm.** Es de destacar que resultados previos de nuestro grupo han demostrado que la calcineurina es un enzima muy sensible a las especies reactivas de oxígeno.

A partir de resultados preliminares, estos objetivos quedaron definidos de manera mas precisa, de la siguiente manera:

(a) las isoformas que se encuentran expresadas predominantemente en neutrófilos, tanto a nivel de proteína, como de ARNm.

(b) Si su expresión es inducible o constitutiva, y si existen diferencias de expresión entre los neutrófilos de pacientes alérgicos y sujetos sanos.

(c) La posible relación entre NFAT y la calcineurina, su activador fisiológico.

(d) La búsqueda de posibles activadores de NFAT en neutrófilos humanos.



MATERIALES  
Y  
MÉTODOS



## **I. REACTIVOS Y MATERIALES.**

**Abcam (Cambridge, Reino Unido):** anticuerpo anti-Fc $\epsilon$ RI humano (cadena  $\alpha$ ).

**Affinity Bioreagents (Madrid, Spain):** anticuerpos anti-NFAT1 humano, anti-NFAT2 humano y anti-NFAT5 humano.

**Amersham-Pharmacia-Biotech (Barcelona, Spain):** dextrano T500, [ $\gamma$ - $^{32}$ P] ATP (actividad específica, 3000 Ci/mmol), sephadex G-50 y kit para la determinación de PGE $_2$ .

**Becton-Dickinson (BD) Vacutainer (Plymouth, Reino Unido):** tubos siliconizados SSTII y tubos con heparina LH, para la obtención de suero y sangre sin coagular respectivamente.

**Bial-Aristegui (Bilbao, España):** extractos antigénicos, entre los que se encuentran: D $_1$  (Dermatophagoides pteronyssinus), G $_3$  (Dactylis glomerata), T $_9$  (Olea europaea), E $_1$  (epitelio de gato), E $_2$  (epitelio de perro), M $_6$  (Alternaria alternata) y W $_6$  (Artemisia vulgaris).

**BIO-RAD (Ritchmond, USA):** membranas de Polivinilideno (PVDF), marcadores de peso molecular y equipos de electroforesis.

**Bio-Whittaker (Verviers, Bélgica):** Ficoll-Hypaque, tampón fosfato salino (PBS), RPMI 1640, RPMI 1640 sin rojo fenol, suero fetal bovino, suero fetal de ternera, penicilina, gentamicina, estreptomycin y anfotericina.

**Calbiochem (Madrid, Spain):** péptido VIVIT, PD098059 y SB203580.

**CAYMAN CHEMYCAL (Ann Arbor, MI, USA):** anticuerpos anti-COX-2 humano, anti-COX-2 humano-FITC y anti-VAP-1 (clone TK8).

**Dr. C. B. Klee (National Institutes of Health, Bethesda, MD):** anticuerpo anti-calcineurina humana.

**EBioscience (San Diego, California, USA):** anticuerpo anti-Mac-2 humana.

**Eppendorf Ibérica (Madrid, España):** termociclador Eppendorf Mastercycler personal.

**IZASA (Barcelona, Spain):** equipo HYTEC 288, kits para la determinación de IgE específica e IgG específica, anti-CD23, anti-CD9, anti-CD14, anti-CD16, anti-CD203 y controles isotópicos IgG-FITC. Anticuerpos GAM-esferas y GAM-FITC.

**Kodak-X-omat (Rochester, USA):** películas fotográficas y soluciones de revelado.

**Laboratorios Caltag (Burlingame, CA, USA):** anticuerpo anti-IgE humana, Kit de permeabilización celular ("FIX & PERM"), diacetato de 2,7-diclorohidrofluoresceína (DCFDA).

**Laboratorios Transduction (Lexington, KY):** anticuerpos anti-NOS2 humana y anti-NOS2 humana-FITC.

**Mercedes Unzeta (Universidad de Barcelona, España):** anticuerpo anti-SSAO humana.

**Merck (Dannstadt, Alemania):** metanol absoluto y azul de Coomassie brillante G-250.

**New England Biolabs (Beverly, MA, USA):** anticuerpos anti-p38 MAP quinasa humana fosforilada <sup>(Thr180/Tyr182)</sup>, anti-ERK1/2 humana fosforilada <sup>(Thr202/Tyr204)</sup> y, anti-ERK1/2 y p38 humanos totales.

**O. G. T. Jones (Departamento de Bioquímica, Universidad de Bristol, UK):** anticuerpos anti-p47<sup>phox</sup> y anti-p67<sup>phox</sup>.

**Promega (Madison, WI, USA):** retrotranscriptasa M-MLV, RNAsin, nucleótidos trifosfato (dNTPs), T4 polinucleótido quinasa, interleukinas, TNF- $\alpha$ , y GM-CSF. Oligonucleótido de doble cadena complementaria 5'-AGTGAGGGGACTTTCCAGGC-3', que contiene un sitio para NF- $\kappa$ B. Anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa contra la IgG de ratón y anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa contra IgG de conejo.

**Roche (Madrid, Spain):** cebadores aleatorios ("Random primers"), cebadores para PCR, High Pure RNA Isolation Kit, Taq polimerasa y oligonucleótido de doble cadena complementaria 5'-GGAGGAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGT-3', que engloba el sitio distal de unión de NFAT, del promotor del gen de la IL-2.

**Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA):** anticuerpos anti- $\beta$ -actina humana (sc-8432), anti-I- $\kappa$ B $\alpha$  humana (sc-371), anti-JNK1/2 humana fosforilado <sup>(Thr183/Tyr185)</sup> (sc-6254), anti-JNK1/2 humana total (tanto fosforilado como no fosforilado) (sc-7345) y anticuerpo anti-NFAT4 humano (sc-8405).

**Scion Corporation (Frederick, MD):** programa para cuantificar la densidad de las señales autoradiográficas.

**Sigma-Aldrich (Madrid, Spain):** solución de cloroformo: isoamilalcohol (49:1), Fenol, isopropanol, esferas de proteína G-Sefarosa, ciclosporina A, ionomicina, peróxido de hidrógeno, LPS de Escherichia coli, FeSO<sub>4</sub>, CuSO<sub>4</sub>, phorbol 12-miristato-13-acetato (PMA), anticuerpos no específicos IgG de cabra y de ratón, Z-Leu-Leu-Leu-al (MG-132), 4-hidroxi-3-metoxiaceto-fenona (HMAP), fluoruro de 4-(2-aminoetil) benzenosulfonil (AEBSF), 2-amino-1,2,4-triazol y 1,10-fenantrolina, semicarbazida, pargilina, benzilamina, tiramina, ortovanadato de sodio. Péptido RII (DLDVPIGRFDRRVSVAAE), ácido okadaico, proteína quinasa A (PKA), resina Dowex, y azul tripán.

**UVP (Upland, CA):** sistema de visualización de geles con bromuro de etidio BioDoc-It™.

## **II. MÉTODOS.**

### **II.1. AISLAMIENTO DE CÉLULAS.**

#### **II.1.1 Obtención de macrófagos peritoneales de rata.**

*Procedimiento:* Ratas Wistar de unos 3 meses de edad (200-230 g), se colocan en una campana, en la cual se añade una pequeña cantidad de éter dietílico. Transcurrido un periodo de aproximadamente 2 minutos, las ratas permanecen dormidas. Se sacrifican mediante decapitación y desangrado posterior. Se desinfecta cuidadosamente la zona ventral del animal y el material quirúrgico a utilizar con etanol. A continuación se elimina un anillo de pelos de aproximadamente 3 cm de radio en dicha zona mediante una tijera, con el fin de poder inyectar y recoger limpiamente el líquido inyectado, evitando posibles contaminaciones. A continuación se les inyecta en la parte peritoneal (con muchísimo cuidado de no atravesar las vísceras) 50 ml de PBS estéril.

La aguja debe presentar la zona del orificio hacia el animal, ya que si no lo hacemos así, ésta puede quedar obturada y de esta forma será muy difícil la inyección de los 50 ml. Se hace un suave masaje peritoneal durante un par de minutos. Con una pipeta pasteur de plástico se absorbe el líquido peritoneal enriquecido de macrófagos. Las células se recogen después por centrifugación a 400 x g durante 5 minutos a 4°C en tubos cónicos de 50 ml. Después de esto se realizan dos lavados en 10 ml de PBS estéril, centrifugando a la misma velocidad y el mismo tiempo.

A veces, según lo limpia que haya sido la extracción, puede ser necesario un choque hemolítico para eliminar la contaminación de glóbulos rojos. El choque hemolítico sustituirá el primer lavado de PBS y se realiza resuspendiendo las células en 5 ml de agua destilada estéril por un periodo inferior a 30 segundos, y posteriormente agregando 5 ml de NaCl al 1.8%.

A continuación se realiza un lavado como los anteriores y se resuspenden las células en el medio de cultivo a utilizar.

### **II.1.2. Obtención de neutrófilos humanos de sangre periférica.**

Este tipo celular fue aislado como se ha descrito previamente (Böyum et al., 1986), con algunas modificaciones.

Procedimiento: Los neutrófilos se separan de sangre humana suministrada por el Servicio de Extracciones del Hospital Universitario Virgen Macarena. El aislamiento de los diferentes tipos de células sanguíneas se realiza por gradiente de densidad en presencia de dextrano T500 y Ficoll-Hypaque. Cada tubo de Sangre heparinizada de 10 ml aproximadamente, se mezcla con 675  $\mu$ l de dextrano (10% en PBS) para que este quede a una concentración final aproximada de 0.7%. Se mezclan por inversión 10 veces aproximadamente, procurando formar poca espuma, y se deja sedimentar durante 45-60 minutos a temperatura ambiente. Quedaran dos fases, una inferior rica en glóbulos rojos (que no utilizamos) y una fase superior de color amarillento, rica en leucocitos. Ésta se recoge con muchísimo cuidado de no mezclarla con los glóbulos rojos, ya que, aunque es necesario realizar un choque hemolítico, cuanto mayor sea la contaminación eritrocitaria más largo deberá de ser el choque, o incluso tendría que ser repetido. Y este choque, aunque es suave, no deja de afectar a los neutrófilos, los cuales pueden derivar en una activación indeseada. A continuación, se coloca esta fase sobre Ficoll-Hypaque (d: 1.077) a una proporción de 1:2 (1 ml de Ficoll y 2 ml de la solución celular) con pipeta Pasteur, cuidando de que no se mezclen las dos fases. Se centrifuga a 1,200 x g durante 20 minutos a 4°C. Se obtienen diferentes fases: La fase intermedia, rica en linfocitos/monocitos se elimina con una pipeta "pasteur". Al precipitado, que contiene la fracción rica en neutrófilos (después de retirar todo el sobrenadante), se le da un choque hemolítico para lisar los glóbulos rojos contaminantes, con el siguiente procedimiento: los neutrófilos se resuspenden en 5 ml de agua destilada estéril (hiposmótico) durante 15-20 segundos, a continuación se agrega el mismo volumen de NaCl 1.8% (hiperosmótico). De esa forma restauramos la isosmolaridad (0.9% de NaCl). Se centrifugan a 400 x g durante 5 minutos a 4°C y se elimina el sobrenadante. Los neutrófilos se lavan 1 vez en solución PBS y finalmente se resuspenden en RPMI completo o sin completar dependiendo del estudio a realizar.

La cantidad de neutrófilos obtenidos oscila mucho dependiendo del paciente (**Figura 13**).

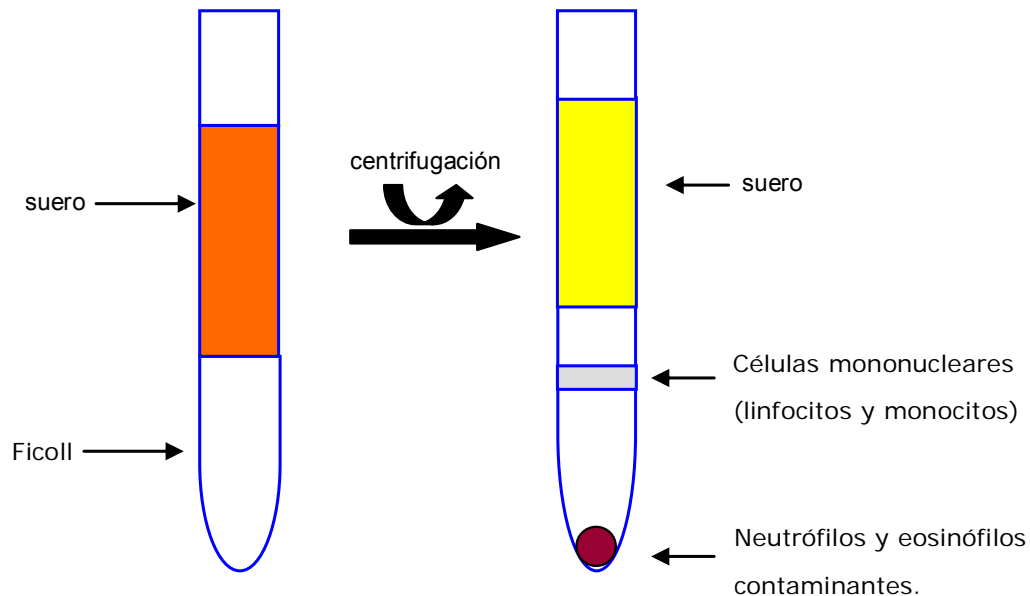


Figura 13. Obtención de neutrófilos humanos de sangre periférica.

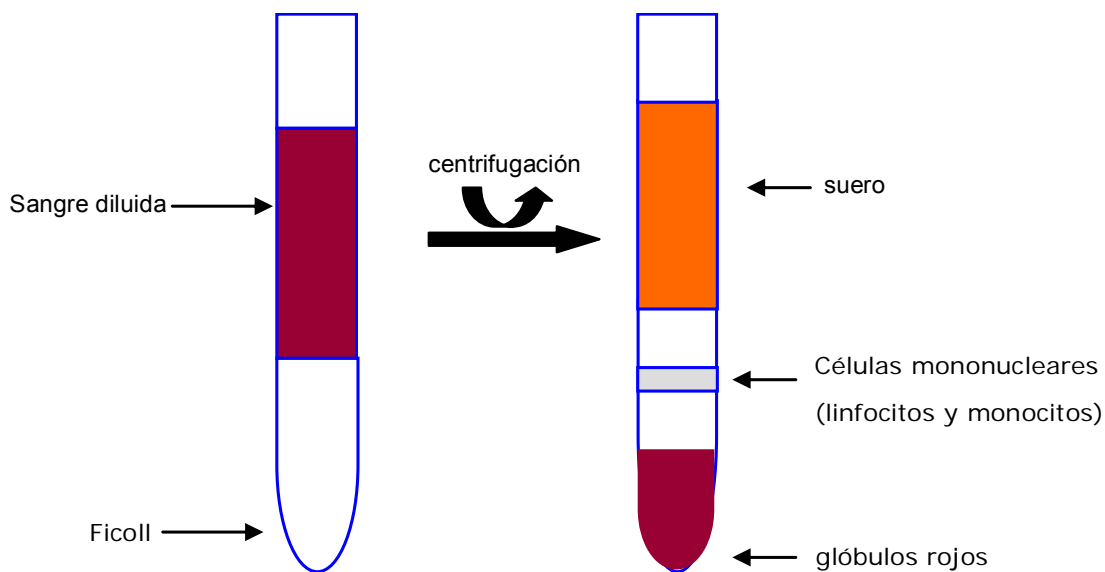
Debido a la diferente sensibilidad de los métodos utilizados, el grado de purificación necesaria en las preparaciones de neutrófilos debe ser mayor. Para ello se purificaron por el método de las esferas magnéticas. Esta técnica de purificación se utilizó en la extracción de neutrófilos para el análisis de ARN de las diferentes isoformas de NFAT.

### II.1.3. Obtención de linfocitos humanos de sangre periférica.

Este tipo celular fue aislado como se ha descrito previamente (Böyum et al., 1986), con algunas modificaciones.

**Procedimiento:** Primero, la sangre se diluye con PBS (dilución 1:1). Esta dilución se vierte en tubos que contienen una solución de Ficoll-Hypaque, a una proporción 1:2 de Ficoll:sangre. La dilución debe añadirse cuidadosamente para evitar que se mezcle con el Ficoll-Hypaque. Entonces, las muestras se centrifugan a 1,200 x g durante 20 minutos a 4 °C. El anillo formado en la interfase del gradiente, que

contiene linfocitos y monocitos, se extrae y coloca en tubos limpios, utilizando pipetas Pasteur de vidrio. Posteriormente se añaden 10 ml de PBS, y los tubos se centrifugan a 400 x g durante 10 minutos a 4°C. Los precipitados obtenidos se someten a un choque hipotónico para eliminar los eritrocitos contaminantes (ver Aislamiento de neutrófilos humanos), y el resultado se centrifuga a 400 x g durante 10 minutos a 4°C. Después, los precipitados se lavan dos veces por resuspensión en 10 ml de PBS y centrifugación a 400 x g durante 10 minutos a 4°C. Para asegurar la obtención de linfocitos puros, sin contaminación de monocitos, las muestras se resuspenden en medio RPMI 1640 y se incuban a 37°C durante 45 minutos en placas de petri de plástico. Tras este periodo, se aspira el medio de cultivo con los linfocitos, que se mantienen en suspensión, a diferencia de los monocitos que se adhieren en el fondo de la placa. Las suspensiones celulares así obtenidas se centrifugan a 400 x g durante 10 minutos a 4°C. Finalmente, los precipitados conseguidos, que corresponden a linfocitos humanos puros, se resuspenden en el medio de cultivo apropiado (**Figura 14**).



**Figura 14.** Obtención de linfocitos humanos de sangre periférica.

#### **II.1.4. Obtención de eosinófilos humanos de sangre periférica.**

Procedimiento: La extracción de eosinófilos se realizó exactamente igual que la de neutrófilos, y en el paso final se eliminan los neutrófilos con un anticuerpo anti-CD16, mediante el método de las esferas magnéticas.



### **II.1.5. Purificación de neutrófilos y eosinófilos por el método de las esferas magnéticas.**

Procedimiento: para conseguir una mayor purificación, la suspensión celular obtenida se incuba en 1 ml de PBS en presencia de 4 µg/ml de anticuerpos IgG de ratón dirigidos contra el CD9 humano (marcador de eosinófilos, aproximadamente un 2% contaminante en la extracción de neutrófilos) y CD203 (marcador de basófilos, aproximadamente un 1% contaminante en la extracción de neutrófilos) durante 30 minutos a 4°C. Posteriormente, las células se lavan con 1 ml de tampón PBS y se centrifugan a 400 x g durante 10 minutos a 4°C. El precipitado se resuspende en 1 ml de tampón PBS y se incuba durante 30 minutos a 4°C, con 100 µl de anticuerpos anti-IgG (GAM) acoplados a esferas magnéticas, dirigidos contra la IgG de ratón (presente en los anticuerpos anti-CD9 y anti-CD203), que están a una concentración de 1 mg/ml y diluidos 1:20 en tampón PBS con 0.2% de BSA. Tras un nuevo lavado con PBS, las células se resuspenden en 1 ml de medio de cultivo, en un tubo cónico, y se colocan durante 30 minutos en una gradilla con un imán acoplado. El imán fija a la pared del tubo cónico los eosinófilos y los basófilos. Recogiendo con cuidado la solución en suspensión obtendremos neutrófilos altamente purificados. Si en lugar de neutrófilos queremos purificar eosinófilos, el procedimiento es el mismo, salvo que en lugar de añadir anticuerpos anti-CD9 y anti-CD203, añadiremos anti-CD16 (marcador de neutrófilos frente a eosinófilos) y anti-CD203.

### **II.2. CUANTIFICACIÓN DEL NÚMERO DE CÉLULAS Y DE LA VIABILIDAD CELULAR.**

La viabilidad de las células obtenidas se determina mediante el test de exclusión con azul tripán. El azul tripán es un colorante que penetra en células con pérdida de la integridad de su membrana, apareciendo éstas teñidas de azul al microscopio. (Hathway y et al., 1964).

Procedimiento: la solución de azul tripán se prepara al 0.4% en NaCl al 0.9%. Para el contaje celular, se toma una alícuota de la suspensión celular, y se diluye 1:10 en tampón PBS. Después, en un tubo "ependorf" se mezclan 80 µl de PBS, 10 µl de solución de azul tripán y 10 µl de la dilución de células, y se incuba durante 1 minuto. A continuación, se toman 10 µl de esta mezcla y se depositan sobre una cámara de

Neubauer 0.00025 mm<sup>2</sup>. En el microscopio óptico a 40 aumentos se cuentan las células localizadas en las zonas de 4 x 4 cuadrículas. Para calcular el número de células y el porcentaje de viabilidad celular se aplican las siguientes fórmulas:

- nº células/ml = media de células contadas x 10<sup>4</sup> x dilución (10 en nuestro caso).

- % viabilidad = (células no teñidas/células totales) x 100.

En todos los experimentos de la presente tesis la viabilidad celular fue del 95-98%.

### **II.3. PACIENTES Y CONTROLES.**

El grupo experimental para nuestro trabajo está formado por individuos alérgicos diagnosticados por facultativos del Servicio Regional de Inmunología y Alergia del Hospital Universitario Virgen Macarena, de Sevilla, y por voluntarios sanos no atópicos.

En consulta médica, a cada uno de los enfermos alérgicos se les realizó una exhaustiva historia clínica, consistente en:

- Filiación (Nombre, edad, sexo).

- Anamnesis detallada (cuadro clínico, años de evolución del proceso).

- Exploración física.

Además se les realizaron *in vivo* (los tests cutáneos) y test *in vitro* (tests para la determinación de los niveles de IgE específicos). Un paciente fue considerado alérgico si presentaba historia clínica compatible, tests cutáneos positivos e IgE específica positiva. Por el contrario, se consideró no alérgico, o "sujeto sano", si no padecía patología asociada y los cutáneos y la IgE específica resultaban negativos.

#### **a) Test cutáneos.**

Para su realización se sigue la técnica de tests-cutáneos (skin-prick) (Pepys et al., 1975), utilizada habitualmente para el diagnóstico etiológico de procesos alérgicos. Al comenzar con los tests *in vivo*, los pacientes no deben de estar recibiendo ningún tipo de tratamiento con antihistamínicos ni corticoides.

Procedimiento: antes de realizar las pruebas cutáneas, se desinfecta la piel de la cara ventral de los antebrazos con alcohol etílico y se marcan, a una distancia de 3 cm, tantos puntos como extractos alérgicos a testar, más otros dos adicionales que se

usan como control positivo (histamina) y negativo (suero fisiológico). Al lado de cada marca, se deposita una gota del extracto correspondiente, y se practica una punción a través de cada gota con lancetas, guardando una inclinación de 90°. Tras un período de 15 minutos, se seca la superficie de los antebrazos con celulosa absorbente y se leen los resultados (pápulas formadas) tomando como referencia los controles positivos y negativos. Se considera resultado positivo aquella pápula cuyo diámetro sea superior o igual al de la histamina (normalmente mayor o igual a 3 mm), siempre que el control positivo muestre una reactividad adecuada. El grado de positividad se expresa, como se indica en la **Tabla 8**, por el método escandinavo (Aas et al., 1974).

GRADO DE POSITIVIDAD	PORCENTAJE DEL AREA DEL HABÓN PRODUCIDO POR LA HISTAMINA
-	MISMO TAMAÑO QUE CONTROL NEGATIVO
+	25
++	50
+++	100
++++	200

Tabla 8. Escala de grados de positividad en los test cutáneos.

Junto a los tests cutáneos, a cada paciente se le determinó los niveles séricos de IgE frente a los alérgenos a los cuales tuvieron resultados positivos en el test cutáneo.

#### b) Determinación de los niveles séricos de IgE específica.

Para realizar la determinación de la IgE específica se utiliza el sistema automatizado enzima-inmunoensayo (EIA) HYTEC 288 (HYCOR), que cuantifica en fase sólida la IgE presente en el suero humano. El fundamento de esta técnica se basa en la presencia de un extracto alérgico unido a una fase sólida (o disco) que

actúa como captador de las moléculas de IgE presentes en las muestras séricas, fijándolas a dicha fase. Después de un proceso de lavado, para eliminar los restos de muestra, el sistema añade un anticuerpo anti-IgE, esta vez conjugado con fosfatasa alcalina. Tras un nuevo lavado, la solución sustrato PNPP (que contiene p-nitrofenil-fosfato) es añadida e incubada. La reacción se detiene por adicción de una solución Stop (NaOH 1N) y el color amarillento que se desarrolla se mide espectrofotométricamente. La concentración de IgE total o específica, que es proporcional a la intensidad de color, viene dada por extrapolación a partir de una curva estándar.

Procedimiento: las muestras se obtienen de los pacientes por venipuntura al vacío usando un tubo con gel siliconizado SSTII. Se deja que la sangre coagule a temperatura ambiente (durante aproximadamente 20-30 minutos), hasta que el coágulo empiece a retraerse, y a continuación se centrifuga a 1,620 x g, durante 20 minutos a 4°C. El suero se recupera con pipeta y se almacena a 4°C.

Cuando se van a utilizar, los sueros se atemperan a temperatura ambiente durante 30 minutos. Tras la preparación de los reactivos necesarios (estándares, solución de lavado, solución STOP, solución sustrato) como indica el fabricante, las muestras se colocan en la gradilla del sistema HYTEC 288 y son analizadas automáticamente.

El sistema expresa los resultados en categorías, como sigue:

Negativo	< 0.35 UI/ml
Clase I	0.35-0.70 UI/ml
Clase II	0.70-3.50 UI/ml
Clase III	3.50-17.50 UI/ml
Clase IV	17.50-50 UI/ml
Clase V	50-100 UI/ml
Clase VI	> 100 UI/ml

1 UI/ml = 2.44 ng/ml

Tabla 9. Escala de grados de positividad en la determinación de IgE específica.

### c) Sujetos aptos para el estudio.

Las muestras que componen nuestro estudio pertenecen a una población que engloba individuos que siguen una distribución por edades comprendida entre los 18-60 años y con un ratio por sexos (hombre/mujer) de aproximadamente 1.

Los pacientes alérgicos sufren asma bronquial, que fue diagnosticada por facultativos según los criterios de la sociedad torácica americana (American Thoracic Society, 1962). Además, presentan las siguientes características: están altamente sensibilizados a un/os determinado/s alergeno/s (presentan test cutáneos de ++++ y clase 4-5 de IgE específica en el suero) y se encuentran fuera de la época estacional que desencadena el cuadro clínico (para eliminar activación celular basal inespecífica). Ninguno es fumador, recibe tratamiento de hiposensibilización (inmunoterapia), tiene tratamiento con medicamentos (anti-histamínicos, corticoides o  $\beta$ 2-agonistas), o ha experimentado episodios de asma durante los tres meses previos a la extracción de sangre. Además ninguno ha manifestado infecciones del tracto respiratorio cuatro semanas antes a la extracción.

Los pacientes sanos no atópicos no presentan sensibilización a los alergenos testados y no están recibiendo ningún tipo de tratamiento.

## **II.4. CULTIVO CELULAR.**

### **II.4.1. Condiciones generales.**

Este paso comprende aquellas condiciones utilizadas durante la incubación de las células para el análisis de algún parámetro determinado. Las condiciones generales utilizadas son: 37°C y atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>.

### **II.4.2. Condiciones específicas.**

- **Óxido nítrico sintasa inducible (NOS2):** el medio de cultivo que se utiliza es RPMI 1640 sin rojo fenol, con 10% de suero fetal de ternera, 2 mM de L-glutamina, 100 U/ml de penicilina, 100  $\mu$ g/ml de estreptomina, y 50  $\mu$ g/ml de gentamicina. La densidad de

cultivo es de  $5 \times 10^6$  macrófagos en un volumen de 1.5 ml, y el cultivo celular se realiza durante los tiempos indicados (ver pie de figura).

- **Ciclooxigenasa 2 (COX-2):** el medio de cultivo que se utiliza es RPMI 1640 con rojo fenol, 10% de suero fetal bovino, 2 mM de L-glutamina, 100 U/ml de penicilina, 100  $\mu$ g/ml de estreptomina, y 50  $\mu$ g/ml de gentamicina. La densidad de cultivo es de  $10^7$  neutrófilos en un volumen de 1.5 ml, y el cultivo celular se realiza durante los tiempos indicados (ver pie de figura).

- **Factor Nuclear de células T Activadas (NFAT):**

· **Análisis de los niveles totales de NFAT:** el medio de cultivo que se utiliza es RPMI 1640 con rojo fenol, 10% de suero fetal bovino, 2 mM de L-glutamina, 100 U/ml de penicilina, 100  $\mu$ g/ml de estreptomina, y 50  $\mu$ g/ml de gentamicina. La densidad de cultivo es de  $10^7$  neutrófilos en un volumen de 1.5 ml, y el cultivo celular se realiza durante los tiempos indicados (ver pie de figura). En los casos en los que se analizan los niveles basales totales de NFAT, las células se lisan inmediatamente después de su obtención.

· **Análisis de los niveles nucleares de NFAT:** el medio de cultivo que se utiliza es RPMI 1640 con rojo fenol, 10% de suero fetal bovino, 2 mM de L-glutamina, 100 U/ml de penicilina, 100  $\mu$ g/ml de estreptomina, y 50  $\mu$ g/ml de gentamicina. La densidad de cultivo es de  $10^7$  neutrófilos en un volumen de 1.5 ml. Tras un periodo de reposo de 18 horas (sin adiciones), las células se estimulan. Este periodo de reposo se realiza porque se encontraban niveles nucleares altos de NFAT2.

- **Factor inhibidor de NF- $\kappa$ B (I- $\kappa$ B):** el medio de cultivo que se utiliza es RPMI 1640 con rojo fenol, 10% de suero fetal bovino, 2 mM de L-glutamina, 100 U/ml de penicilina, 100  $\mu$ g/ml de estreptomina, y 50  $\mu$ g/ml de gentamicina. La densidad de cultivo es de  $10^7$  neutrófilos en un volumen de 1.5 ml. Tras un periodo de reposo de 18 horas (sin adiciones), las células se estimulan. Este periodo de reposo se realiza porque se encontraban niveles altos de activación de NF- $\kappa$ B (determinados por

EMSA), y como es de esperar, también se encontraban niveles altos de degradación de I- $\kappa$ B.

- **p38 MAP quinasa fosforilada (p38 MAPK)**: el medio de cultivo que se utiliza es RPMI 1640 con rojo fenol, 10% de suero fetal bovino, 2 mM de L-glutamina, 100 U/ml de penicilina, 100  $\mu$ g/ml de estreptomina, y 50  $\mu$ g/ml de gentamicina. La densidad de cultivo es de  $10^7$  neutrófilos en un volumen de 1.5 ml. Tras un periodo de reposo de 18 horas (sin adiciones), las células se estimulan. Este periodo de reposo se realiza porque se encontraban niveles altos de fosforilación de la p38 MAPK.

- **Quinasa regulada por señal exterior 1/2 (ERK1/2)**: el medio de cultivo que se utiliza es RPMI 1640 con rojo fenol, 10% de suero fetal bovino, 2 mM de L-glutamina, 100 U/ml penicilina, 100  $\mu$ g/ml de estreptomina, y 50  $\mu$ g/ml de gentamicina. La densidad de cultivo es de  $10^7$  neutrófilos en un volumen de 1.5 ml. Tras un periodo de reposo de 18 horas (sin adiciones), las células se estimulan. Este periodo de reposo se realiza porque se encontraban niveles altos de fosforilación de la ERK1/2.

- **c-Jun NH<sub>2</sub>-quinasa terminal (JNK1/2)**: El medio de cultivo que se utiliza es RPMI 1640 con rojo fenol, 10% de suero fetal bovino, 2 mM de L-glutamina, 100 U/ml de penicilina, 100  $\mu$ g/ml estreptomina, y 50  $\mu$ g/ml de gentamicina. La densidad de cultivo es de  $10^7$  neutrófilos en un volumen de 1.5 ml. Tras un periodo de reposo de 18 horas (sin adiciones), las células fueron estimuladas. Este periodo de reposo se realiza porque se encontraban niveles altos de fosforilación en la p38 y ERK1/2 MAPKs.

- **NADPH oxidasa (p47<sup>phox</sup> y p67<sup>phox</sup>)**: el medio de cultivo que se utiliza es PBS suplementado con 10 mM de glucosa y 500  $\mu$ M de cloruro de calcio. La densidad de cultivo es de  $10^7$  neutrófilos en un volumen de 1.5 ml, y el cultivo celular se realiza durante los tiempos indicados (ver pie de figura).

- **Mac-2 fosforilado (Mac-2-P)**: el medio de cultivo que se utiliza es RPMI 1640 con rojo fenol, 2 mM de L-glutamina, 100 U/ml de penicilina, 100  $\mu$ g/ml de estreptomina, y 50  $\mu$ g/ml de gentamicina. La densidad de cultivo es de  $10^7$  neutrófilos en un volumen

de 1.5 ml, y el cultivo celular se realiza durante los tiempos indicados (ver pie de figura).

## **II.5. EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS.**

### **II.5.1. Lisis celular. Condiciones generales.**

Esta etapa comprende la extracción de las proteínas celulares objetos de estudio. Todas las lisis celulares se realizan el hielo, y al tampón específico que se utiliza para lisis se le agrega un cóctel de inhibidores de proteasas con la siguiente composición: 10 µg/ml de aprotinina, 10 µg/ml de leupeptina, 10 µg/ml de inhibidor de tripsina, 10 µg/ml de N-tosil-L-fenilalanina clorometilcetona (TPCK), 10 µg/ml de captopril, 1 mM de PMSF, 1 mM de benzamidina, y 10 mM de iodoacetamida. En aquellas proteínas en las cuales su fosforilación puede ser necesaria para su detección, a este cóctel se le agrega inhibidores de fosfatasas con la siguiente composición: 100 µM de óxido de fenilarsina y 2 mM de ortovanadato sódico. Estos aditivos se preparan en el momento de la lisis celular.

### **II.5.2. Lisis celular. Condiciones específicas.**

#### **a) Extracción de proteínas totales.**

**- Extracción de proteínas totales para el análisis de expresión de la NOS2:** tras recoger las células, éstas se centrifugan un pulso a 12,000 x g a 4°C, se elimina el sobrenadante, se vuelven a centrifugar a la misma velocidad (para eliminar el medio de cultivo adherido a las paredes del Eppendorf), y se lisan en hielo, resuspendiendo el precipitado celular en 40 µl de una solución que contiene: 20 mM de HEPES pH 7.9, 5 mM de KCl, 0.1% de Nonidet P-40, 1 mM de EDTA, 1 mM de DTT y 10 mM de NaF, suplementado con el cóctel de inhibidores que se indica arriba. La rotura celular se



realiza mediante sonicación suave (5 segundos), seguido de agitación en el vortex (10 segundos) y posterior centrifugación a 12,000 x g durante 2 minutos a 4°C.

**- Extracción de proteínas totales para el análisis de expresión de la COX-2:** tras recoger las células, éstas se centrifugan un pulso a 12,000 x g a 4°C, se elimina el sobrenadante, se vuelven a centrifugar a la misma velocidad (para eliminar el medio de cultivo adherido a las paredes del Eppendorf), y se lisan en hielo, resuspendiendo el precipitado celular en 40 µl de una solución que contiene: 20 mM de HEPES pH 7.9, 5 mM de KCl, 0.1% de Nonidet P-40, 1 mM de EDTA, 1 mM de DTT y 10 mM de NaF, suplementado con la mezcla de inhibidores que se indica arriba. La rotura celular se realiza mediante sonicación suave (5 segundos) seguida de agitación en el vortex (10 segundos) y posterior centrifugación a 12,000 x g durante 2 minutos a 4°C.

**- Extracción de proteínas totales para el análisis de expresión de NFAT:** tras aislar las células, se centrifugan un pulso a 12,000 x g a 4°C, se elimina el sobrenadante y se vuelven a centrifugar a la misma velocidad (para eliminar el medio de cultivo adherido a las paredes del Eppendorf). La lisis se realiza en hielo, resuspendiendo el precipitado celular en 40 µl de una solución que contiene: 50 mM de Tris pH 7.4, 10 mM de EGTA, 50 mM de NaCl, 1% de Triton X-100, suplementado con la mezcla de inhibidores de proteasas y fosfatasa que se indica arriba. La rotura celular se realiza en hielo, mediante sonicación suave (5 segundos), seguida de agitación en el vortex (10 segundos) y posterior centrifugación a 12,000 x g durante 2 minutos a 4°C.

**- Extracción de proteínas totales para el análisis de fosforilación de la p38 MAPK:** tras la incubación con los estímulos, las células se centrifugan un pulso a 12,000 x g a 4°C, se elimina el sobrenadante y se resuspenden en una solución que contiene lo siguiente: 20 mM de Tris-HCl pH 7.4, 50 mM de β-mercaptoethanol, 2 mM de EDTA, 25 mM de NaF, 1% de Nonidet P-40, 1% de Triton X-100 y la mezcla de inhibidores de proteasas y fosfatasa que se indica anteriormente. Tras sonicación suave en hielo (5 segundos), las células se agitan fuertemente en el vortex (10 segundos) y se centrifugan 2 minutos a 12,000 x g a 4°C.

- **Extracción de proteínas totales para el análisis de fosforilación de la ERK1/2:** Tras el cultivo celular, se elimina el sobrenadante y las células se resuspenden en una solución que contiene lo siguiente: 20 mM de Tris-HCl pH 7.4, 50 mM de  $\beta$ -mercaptoethanol, 2 mM de EDTA, 25 mM de NaF, 1% de Nonidet P-40, 1% de Triton X-100 y la mezcla de inhibidores de proteasas y fosfatasas indicada anteriormente. Tras sonicación suave en hielo (10 segundos), las células se agitan fuertemente en el vortex (15 segundos). Este proceso se realiza 3 veces, periodo tras el cual se centrifuga 2 minutos a 12,000 x g a 4°C.

- **Extracción de proteínas totales para el análisis de fosforilación de la JNK1/2:** la lisis celular para el análisis de la JNK1/2 se realiza exactamente igual que para la ERK1/2.

- **Extracción de proteínas totales para el análisis de Mac-2 fosforilado por Inmunoprecipitación:** tras la incubación con el estímulo, las células se centrifugan un pulso a 12,000 x g a 4°C, se elimina el sobrenadante y se resuspenden en una solución que contiene lo siguiente: 20 mM de Tris-HCl pH 7.4, 50 mM de  $\beta$ -mercaptoethanol, 2 mM de EDTA, 25 mM de NaF, 1% de Nonidet P-40, 1% de Triton X-100, y la mezcla de inhibidores de proteasas y fosfatasas indicada anteriormente. Tras sonicación suave en hielo (10 segundos), las células se agitan fuertemente en el vortex (15 segundos) y se centrifugan 2 minutos a 12,000 x g a 4°C.

- **Extracción de proteínas totales para el análisis de coinmunoprecipitación de NFAT2 con la calcineurina:** Tras el aislamiento celular, las células se centrifugan un pulso a 12,000 x g a 4°C, se elimina el sobrenadante y se resuspenden en una solución que contiene lo siguiente: 50 mM de Tris pH 7.4, 10 mM de EGTA, 50 mM NaCl, 1% de Triton X-100, suplementada con la mezcla de inhibidores de proteasas y fosfatasas que se menciona anteriormente. Tras sonicación suave en hielo (10 segundos), las células se agitan fuertemente en el vortex (15 segundos) y se centrifugan 2 minutos a 12,000 x g a 4°C.

**b) Extracción de proteínas citosólicas, de membrana y nucleares.**

- **Extracción de las proteínas citosólicas y de membrana para el análisis de translocación de P47<sup>phox</sup> y p67<sup>phox</sup> a la membrana plasmática:** para el análisis de la activación de este complejo enzimático es necesario la separación rigurosa de la fracción citosólica y la fracción de membrana, ya que los componentes estudiados, pertenecientes a dicho sistema, se encuentran desigualmente distribuidos en ambas fracciones, y de su localización depende su estado de activación.

· **Obtención de la fracción citosólica:** Tras la estimulación, las células se recogen mediante centrifugación un pulso a 12,000 x g a 4°C. A continuación, las células se resuspenden y se lavan en tampón PBS frío. El precipitado celular se resuspende en una solución sin detergente que contiene: 100 mM de HEPES pH 7.3, 100 mM de KCl, 3 mM de NaCl, 3 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1.25 mM de EGTA, 1 mM de PMSF, 10 µg/ml de aprotinina, 156 µg/ml de bezamidina, 10 µg/ml de leupeptina y 10 µg/ml pepstatina. Se sonica 3 veces durante 30 segundos, y se mantienen en hielo durante 30 minutos, agitando en el vortex cada 5 minutos. Los homogenados se centrifugan a 100,000 x g durante 5 minutos a 4°C y el sobrenadante (que contiene la fracción citosólica) se recupera para analizar la desaparición de las subunidades de la NADPH oxidasa.

· **Obtención de la fracción de membrana:** el precipitado celular se resuspende en una solución que contiene lo siguiente: 120 mM de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7.4, 1 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1 mM de EGTA; 20% de glicerol, 1 mM de dithiofiteol, 40 mM de n-octilglucósido, 600 mM KCl<sub>2</sub>, y la mezcla de inhibidores de proteasas mencionada en el apartado anterior. Se sonica 3 veces durante 30 segundos, y se mantiene en hielo durante 30 minutos, agitando en el vortex cada 5 minutos. El homogenado se centrifuga a 20,000 x g durante 40 minutos a 4°C. El sobrenadante (que contiene la fracción de membranas) se recoge y se guarda a -80°C hasta su uso.

- **Extracción de proteínas citosólicas para el análisis de los niveles de degradación de I-κB:** los niveles de I-κB se analizan en la fracción citosólica obtenida como se explica con detalle en la extracción de núcleos (apartado siguiente).

- **Extracción de proteínas nucleares para el análisis de la translocación nuclear de NFAT2 o para el análisis por EMSA de la actividad de NF- $\kappa$ B:** tras el cultivo celular, los neutrófilos se resuspenden en 100  $\mu$ l de una solución que contiene: 20 mM de HEPES pH 7.9, 10 mM de KCl, 10% de glicerol, 1 mM de EDTA, 1 mM de EGTA, 1 mM de dithiothreitol y la mezcla de inhibidores de proteasas y fosfatasa que se menciona anteriormente. Se incuban durante 30 minutos en hielo, agitando fuertemente cada 5 minutos en el vortex. A continuación, se añade 0.5% de nonidet P-40 y se agita fuertemente en el vortex durante 15 segundos. Después, se centrifuga a 12,000 x g durante 10 minutos a 4°C y se guarda el sobrenadante a -80°C (proteínas citosólicas para el análisis de I- $\kappa$ B). Al precipitado se le añaden 100  $\mu$ l de la solución anterior y se centrifuga a 12,000 x g durante 10 minutos a 4°C (lavado de núcleos y rotura de células intactas). Los precipitados se resuspenden mediante sonicación suave (5 segundos) en una solución con alta concentración salina cuya composición es la misma que se menciona anteriormente suplementada con: 20% de glicerol y 420 mM de NaCl. Tras incubación en hielo durante 30 minutos, agitando fuertemente en el vortex cada 5 minutos, se sonica suavemente (5 segundos) y se centrifuga 10 minutos a 12,000 x g a 4°C. Los sobrenadantes que se obtienen son la fracción nuclear de los neutrófilos. Éstos se guardan a -80°C hasta su uso.

### **c) Inmunoprecipitación.**

- **Inmunoprecipitación de fosfotirosina total:** 1 mg de proteínas totales se sitúan en un tubo Eppendorf y se completa el volumen con tampón fosfato pH 6.5 hasta 1 ml (el tampón fosfato lleva la mezcla de inhibidores de proteasas y fosfatasa que se describe anteriormente). La mezcla se mantiene a 4°C durante toda la noche. A la mañana siguiente, se añaden 75  $\mu$ l de esferas de proteína G y la mezcla se mantiene agitación en la noria de inversión durante 4 horas. Transcurrido este tiempo, se centrifuga un pulso a 12,000 x g, y se elimina el sobrenadante. Se le añade 1 ml de tampón fosfato (el cual contiene los inhibidores que se mencionan anteriormente) y se centrifuga un pulso a 12,000 x g. Este proceso se realiza 3 veces. El lavado del precipitado de esferas debe hacerse con mucho cuidado, sin apurar, dejando siempre un margen de unos dos milímetros hasta las esferas.

- **Coinmunoprecipitación de NFAT2 con la calcineurina:** los extractos protéicos totales de neutrófilos (1 mg de proteína) se incuban por separado en dos tubos Eppendorf con 2 µg de anticuerpo anti-NFAT2 o anti-CaN, en 1 ml de solución de lisis durante 18 horas a 4°C, y entonces se añade 75 µl de esferas de proteína G sefarosa durante 4 horas a 4°C. Transcurrido este tiempo, se centrifuga un pulso a 12,000 x g y se elimina el sobrenadante. Se le añade 1 ml de tampón fosfato (el cual contiene todos los inhibidores mencionados anteriormente) y se centrifuga un pulso a 12,000 x g. Este proceso se realiza 3 veces.

### II.5.3. Análisis de la concentración de proteínas.

La concentración de proteínas de las muestras se determina utilizando el método descrito por Bradford (Bradford et al., 1976). Este método permite determinar cantidades de proteínas en un rango de 1 a 10 µg.

Procedimiento: la determinación se realiza por triplicado, en un volumen final de 1 ml. Primero, se preparan una serie de tubos con 200 µl de H<sub>2</sub>O destilada sola o suplementada con cantidades crecientes de suero fetal bovino (BSA). Éstos se utilizan para elaborar los blancos de reacción y la curva estándar de calibración, respectivamente. Otros tubos se preparan con las alícuotas de las muestras diluidas en 200 µl de H<sub>2</sub>O destilada (dilución 1:10 ó 1:20). Después, se añade a todos los tubos 800 µl de reactivo Bradford (10 mg de azul de Coomassie brillante G-250 disueltos en 5 ml de etanol al 95%, 10 ml de ácido ortofosfórico al 85% y H<sub>2</sub>O destilada hasta completar un volumen de 100 ml) y se incuban a temperatura ambiente durante 5 minutos. Tras este periodo, se determina la absorbancia (A) a una longitud de onda de 595 nanómetros.

#### Calculo del factor de calibración (ε):

$$\varepsilon = \frac{\sum(A_{595} \text{ curva estándar de calibración} - A_{595} \text{ blanco de reacción})}{\sum(\text{BSA curva estándar de calibración})}$$

El factor ε permite calcular la concentración de proteínas de las muestras aplicando la siguiente fórmula:

$$[\text{proteínas}] = (A_{595} \text{ muestra} - A_{595} \text{ blanco de reacción}) \times \varepsilon \times \text{dilución}$$

## **II.6. ANÁLISIS DE EXPRESION Y FOSFORILACIÓN DE PROTEÍNAS POR “WESTERN BLOTTING”.**

### **a) Preparación de las muestras.**

- **Preparación de muestras proteicas:** los extractos protéicos se mezclan con tampón de carga Laemmli en razón de 1 parte de muestra y 1/3 de tampón de carga Laemmli concentrado (x4). Después, la mezcla se incuba 4 minutos a 95°C y se centrifuga 5 minutos a 12,000 x g. Finalmente, las muestras (sobrenadante) esta listo para su uso ó se guardan a -80°C.

- **Preparación de muestras inmunoprecipitadas:** el procedimiento es similar que para los extractos protéicos. La diferencia es que no conocemos el volumen exacto de precipitado, ya que no es posible eliminar por completo el tampón fosfato de la muestra. Lo que hacemos es determinar el volumen de muestra utilizando una micropipeta, con la cual absorbemos el volumen y ajustamos con el micrométrico hasta calcular la porción aspirada. A esta porcion le añadimos 1/3 de su volumen de laemmli (x4). Es muy importante que el volumen en el que quedan disueltas las muestras sea suficiente como para que la muestra residual que queda en el Eppendorf sea de unos 20 µl, ya que si no, al intentar coger la muestra con la pipeta, la muestra queda contaminada con esferas de proteína G, la cual impide un correcto transcurso de la electroforesis.

### **b) Electroforesis en gel de poliacridamida con SDS (“SDS-PAGE”).**

El sistema empleado es una electroforesis discontinua, que utiliza dos tipos de geles: un gel apilador en la zona superior, y un gel separador en la zona inferior. La concentración de acrilamida del gel separador depende del peso molecular de la proteína a analizar. En los análisis de expresión de NOS2, COX-2, NFAT2, NFAT4 y NFAT5, se utiliza gel separador al 7.5% de acrilamida. En los análisis de translocación de las subunidades de la NADPH oxidasa (p47<sup>phox</sup> y p67<sup>phox</sup>), niveles de I-κB y en los análisis de fosforilación de p38, ERK1/2 y JNK1/2 MAPKs se utiliza el gel separador al 10% de acrilamida (**Tabla 10**).

	Acrilamida: bis-acrilamida (29.2:0.8)	H <sub>2</sub> O destilada	Tris-HCl 1.5 M a pH 8.8	SDS (10%)	Persulfato amónico (10%)	TEMED
Gel separador de acrilamida al 7.5%	2.5 ml	4.4 ml	2.5 ml	100 µl	50 µl	5 µl
Gel separador de acrilamida al 10%	3.3 ml	3.5 ml	2.5 ml	100 µl	50 µl	5 µl
Gel apilador de acrilamida 4%	430 µl	1.88 ml	2.5 ml	33 µl	16 µl	3.3 µl

Tabla 10. Composición de los geles de acrilamida.

### c) Transferencia de proteínas a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF).

Las transferencias se realizan por el método semi-seco. El voltaje y la duración de la transferencia depende del peso molecular de la proteína a analizar, aunque con una transferencia de 15 V durante 45 minutos nos aseguramos de que todas las proteínas analizadas estén presentes en la membrana en una cantidad suficiente como para ser detectadas.

En primer lugar, las membranas de PVDF se activan por incubación en metanol absoluto durante 20 segundos. Después, las membranas junto con los otros elementos necesarios para la transferencia (gel de electroforesis y papeles de filtro) se incuban en tampón de transferencia (25 mM de Tris base, 192 mM de glicina y metanol al 20%) durante 5 minutos. Los distintos elementos se ensamblan en el aparato de transferencia, evitando la formación de burbujas de aire. Hecho esto, la transferencia se inicia con la aplicación de una corriente eléctrica con voltaje constante. Una vez completada y siguiendo el protocolo rápido de detección sin bloqueo descrito por primera vez por Mansfield (Mansfield et al., 1995), las membranas se lavan dos veces en agua destilada durante 5 minutos para eliminar los restos de sales. A continuación, se incuban en metanol absoluto durante 20 segundos y se secan bien a temperatura ambiente durante 20 minutos en estufa a 37°C sin humidificar o toda la noche a temperatura ambiente.

**d) Incubación de las membranas con los anticuerpos.**

Una vez secas, las membranas se incuban con los anticuerpos específicos contra las proteínas a analizar. La solución de incubación contiene lo siguiente: PBS, 0.02% de tween 20 (no presente en la solución de anticuerpo secundario), 1% de albumina humana (para el anticuerpo primario), 0.5% de caseína (para el anticuerpo secundario) y el anticuerpo específico a las concentraciones indicadas (**Tabla 11**).

	Anticuerpo primario	Anticuerpo secundario	Tiempo de incubación y proteínas cargadas
<b>NOS2</b>	1:2000	1:5000	1 hora (40 µg)
<b>COX-2</b>	1:2000	1:5000	1 hora (80 µg)
<b>NFAT2 total</b>	1:1000	1:5000	1 hora (80 µg)
<b>NFAT2 nuclear</b>	1:1000	1:5000	2 hora (60 µg)
<b>NFAT2 (IP)</b>	1:1000	1:5000	2 horas (IP)
<b>NFAT1</b>	1:1000	1:5000	2 horas (80 µg)
<b>NFAT4</b>	1:1000	1:5000	2 horas (80 µg)
<b>NFAT5</b>	1:1000	1:5000	2 horas (80 µg)
<b>I-κB</b>	1:2000	1:10000	1 hora (30 µg)
<b>p47<sup>phox</sup></b>	1:2000	1:10000	1 hora (20 µg)
<b>p67<sup>phox</sup></b>	1:2000	1:5000	2 horas (20 µg)
<b>p38MAPK</b>	1:2000	1:5000	2 horas (80 µg)
<b>ERK1/2</b>	1:1000	1:3000	2 horas (100 µg)
<b>JNK1/2</b>	1:1000	1:3000	2 horas (80 µg)
<b>Calcineurina (IP)</b>	1:1000	1:5000	2 horas (IP)
<b>SSAO</b>	1:2000	1:5000	1 hora (80 µg)

**Tabla 11. Condiciones de incubación con los anticuerpos.** IP: inmunoprecipitación.



e) **Revelado de bandas inmunoreactivas mediante luminol.** Esta técnica es equivalente a la usada con el kit ECL de Amersham, basada en la emisión de quimioluminiscencia a partir de luminol en presencia de  $H_2O_2$  y el 4-iodofenol (4-IP) como amplificador de la luz emitida. Como muestra el esquema, en presencia de 4-IP y peroxidasa (HRP) las cpm aumentan del orden de 100.000 veces más que en ausencia de 4-IP (**Figura 15**)

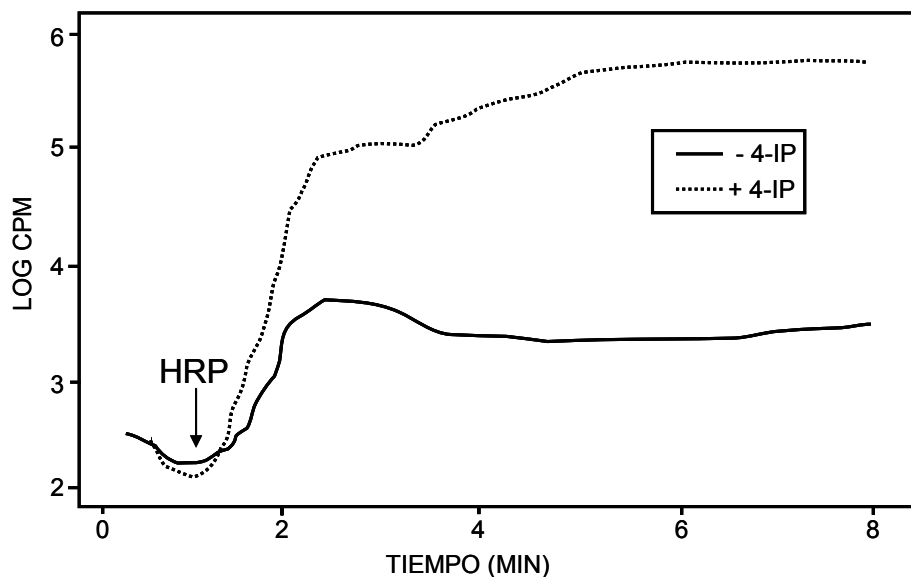


Figura 15. Incremento de luminiscencia en presencia de iodofenol (IP)

Tras el último lavado con PBS, después de incubar la membrana con la solución de anticuerpos, ésta se incuba durante 1 minuto en 10 ml de la solución de luminiscencia (10 mM Tris-HCl, pH 8.3; 0.45mM 4-iodofenol; 2.25mM luminol; 0.015%  $H_2O_2$ ) a temperatura ambiente. El 4-iodofenol se disuelve en 5 ml de 10 mM Tris-HCl, pH 8.3 (para ello hay que agitarlo de 15 a 30 minutos hasta la disolución completa). El luminol se disuelve en solución básica (disolver 4 mg en 50  $\mu$ l de NaOH 1N y luego completar hasta 5 ml con 10 mM Tris-HCl, pH 8.3). Como precaución hay que evitar la exposición del luminol a la luz. Se mezclan 5 ml del 4-IP, con 5 ml de luminol y 5  $\mu$ l de  $H_2O_2$  30%. La membrana se incuba en la solución preparada durante un minuto, se escurre la membrana del exceso de la solución, se coloca entre un papel filtro y plástico y se expone a una película de rayos X.

**f) Limpieza de anticuerpos de la membrana (“stripping”).**

En algunos casos es necesaria volver a incubar la membrana con anticuerpos para obtener la señal de otra proteína, como es el caso de la  $\beta$ -actina, utilizada como control interno para asegurar que hemos cargado la misma cantidad de proteínas por calle.

Procedimiento: la membrana se lava con PBS para quitar restos de la solución de quimioluminiscencia durante 5 minutos. Luego, se incuba durante 30 minutos a temperatura ambiente con la solución de limpieza (“stripping”) (62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8; 2 mM EDTA; 100 mM 2- $\beta$ -mercaptoetanol). A continuación la membrana se lava 3 veces durante 10 minutos con H<sub>2</sub>O destilada. Posteriormente, se sumerge en metanol puro durante 20 segundos, se seca durante 2 horas a temperatura ambiente y luego se incuba con el anticuerpo específico contra la proteína que se desea estudiar.

**II.7. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS POR CITOMETRÍA DE FLUJO.**

Procedimiento: los neutrófilos o los macrófagos ( $2 \times 10^6$ ) se recogen por centrifugación a 400 x g durante 5 minutos a 4°C. Los precipitados se lavan dos veces por resuspensión en 1 ml de PBS frío y centrifugación a 400 x g durante 5 minutos a 4°C. A continuación, se fijan con 100  $\mu$ l de reactivo de fijación (FIX & PERM A), durante otros 15 minutos, en las mismas condiciones, tras lo cual se lavan en 1 ml de PBS frío y se centrifugan a 400 x g durante 5 minutos a 4°C. El precipitado celular se resuspende en 100  $\mu$ l de reactivo de permeabilización (FIX & PERM B) y se marca con 10  $\mu$ l (1  $\mu$ g) de anti-COX-2-FITC o anti-NOS2-FITC ó 20  $\mu$ l de control isotópico IgG<sub>1</sub>-FITC, durante 15 minutos, a 4°C y en la oscuridad. Transcurrido el tiempo, las células se vuelven a lavar con 1 ml de PBS frío y se centrifugan a 400 x g durante 5 minutos a 4°C. Finalmente, el precipitado se resuspende en 500  $\mu$ l del mismo tampón (PBS) y se analiza por en un citómetro de flujo EPICS-ELITE (Beckman-Coulter-IZASA, Barcelona, España).

## **II.8. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA.**

### **Procedimiento:**

**a) Tratamiento de los cubres con Poli-D-Lisina:** los cubres se sumergen en su soporte en una solución de Poli-D-Lisina 100 µg/ml disuelta en agua destilada La incubación se realiza como mínimo 2 horas a 37°C. Tras la incubación, se secan los cubres en la estufa no humificada y volvemos a incubarlos en las mismas condiciones en una solución de albúmina al 1% durante 2 horas a 37°C. Tras la incubación los cubres se secan en la estufa no humificada.

**b) Adhesión de las células a los cubres:** tras el periodo de incubación con los estímulos, las células ( $10^7$ ) se lavan una vez con 1 ml de PBS, se resuspenden en 1 ml de PBS y se colocan sobre un cubre con una pipeta, durante 1 hora a 37°C en la estufa humificada.

**c) Lavados:** se sumerge el cubre (con unas pinzas) en un vaso de precipitado con 20 ml de PBS durante 5 segundos.

**d) Fijación en paraformaldeido:** se colocan los cubres en horizontal y se cubren con 500 µl de paraformaldeido (1% de paraformaldeido en PBS) durante 10 minutos a temperatura ambiente.

**e) Lavados:** se sumerge el cubre (con unas pinzas) en un vaso de precipitado con 20 ml de PBS durante 5 segundos.

**f) Incubación con el permeabilizador:** se colocan los cubres en horizontal, y se cubren con 500 µl de solución permeabilizadora (PBS, 0.1% triton X-100, 1% de albúmina) durante 10 minutos a temperatura ambiente.

**g) Lavados:** se sumerge el cubre (con unas pinzas) en un vaso de precipitado con 20 ml de PBS durante 5 segundos.

**h) Incubación con el anticuerpo primario:** se revisten los cubres con 300 µl de la solución de anticuerpos (PBS, 1% de albúmina y 2.5 µg/ml de anti-iNOS-FITC, o anti-COX-2-FITC o anti-SSAO) durante 1 hora a 37°C en la estufa humificada.

**i) Lavados:** se sumerge el cubre (con unas pinzas) en un vaso de precipitado con 20 ml de PBS durante 5 segundos.

**j) Incubación con el anticuerpo secundario:** en el caso de la detección de la SSAO en macrófagos de rata, es necesario un paso adicional, en el que se añade un

anticuerpo secundario GAM-FIC para la detección del anticuerpo primario que carece de fluorocromo, seguido de un lavado como los anteriores

**k) Adhesión de los cubres a los portas:** se coloca una pequeña cantidad de glicerol sobre el porta. Colocamos el cubre con cuidado de no formar burbujas. Para conservar las muestras es necesario sellar los cubres con laca de uñas transparente.

**l) Realización de las fotografías:** antes de comenzar a usar el microscopio es importante limpiar los objetivos y los filtros de fluorescencia con una solución de etanol-cloroformo (1:1). Debemos ajustar el ocular a nuestro tipo de visión, realizar el Kéller (alineamiento de la parte óptica del microscopio) y alinear la fluorescencia (para que incida sobre la muestra perpendicularmente). Las fotografías se realizan en un equipo NIKON-EFD-3 (NIKON-IZASA, Barcelona, España).

## **II.9. ANÁLISIS DE ARN MENSAJERO.**

### **a) Extracción de ARN total.**

Tanto para el “Northern blotting” como para la “RT-PCR”, el ARN total de las células se extrae utilizando un método que se describe anteriormente (Chomczynski et al., 1987) para los análisis del ARNm que codifica la COX-2, o mediante una variación de este método, usando el kit de extracción de Roche “High Pure RNA Isolation Kit”, el cual fue usado para el análisis del ARNm que codifica las diferentes isoformas de NFAT.

**Procedimiento:** las células se recogen y centrifugan un pulso a 12,000 x g a 4°C. Los precipitados se lavan dos veces por resuspensión en 1 ml de PBS frío y centrifugación un pulso a 12,000 x g a 4°C. Seguidamente, los precipitados celulares obtenidos se resuspenden en 500 µl de solución de extracción (4 M de isotiocianato de guanidinio pH 7.0, 25 mM de citrato sódico, 0.5% de N-lauril-sarcosil y 100 mM de 2-β-mercaptoetanol) y se añaden, consecutivamente, 50 µl de 2 M de acetato de sodio pH 4, 500 µl de fenol y 100 µl de solución de cloroformo:isoamilalcohol (dilución 49:1). Entonces, las muestras se agitan vigorosamente en el vortex durante 1 minuto y se mantienen a 4°C durante 20 minutos. Tras este periodo, las muestras se centrifugan a 12,000 x g durante 20 minutos a 4°C. Después, las fases superiores del gradiente

formado se extraen y se colocan en tubos Eppendorf limpios, donde se diluyen con isopropanol a  $-20^{\circ}\text{C}$  (dilución 1:1). A continuación, las muestras se incuban a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante de 1 hora y, tras este periodo, se centrifugan a  $12,000 \times g$  durante 20 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . Los precipitados obtenidos nuevamente se resuspenden en  $300 \mu\text{l}$  de solución de extracción, se diluyen con isopropanol a  $-20^{\circ}\text{C}$  (dilución 1:1), se incuban a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 1 hora, y después se centrifugan a  $12,000 \times g$  durante 20 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . Seguidamente, los precipitados se disuelven con  $500 \mu\text{l}$  de etanol al 75% a  $-20^{\circ}\text{C}$  y se centrifugan a  $12,000 \times g$  durante 10 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . Los precipitados resultantes se lavan dos veces por adición de  $500 \mu\text{l}$  de etanol al 75% a  $-20^{\circ}\text{C}$  y centrifugación a  $12,000 \times g$  durante 5 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, y tras descartar los sobrenadantes, las muestras se secan en un liofilizador durante 5-10 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$ , y después se disuelven en  $60 \mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada tratada con DEPC (autoclavaza) por calentamiento a  $68^{\circ}\text{C}$  durante 5 minutos. Las muestras obtenidas, que corresponden a ARN celular total, se dividen en dos fracciones: un alícuota se utiliza para determinar la concentración de ARN, y el resto se usa para el análisis de expresión del ARNm.

#### ***b) Cuantificación de la concentración de ARN por espectrofotometría.***

La concentración de ARN de las muestras se determina midiendo la absorbancia a la longitud de onda de 260 nm, y, después, empleando la siguiente fórmula:

$$[\text{ARN}] (\mu\text{g/ml}) = \text{Absorbancia}_{260} \cdot 44.19 \cdot \text{dilución}$$

La pureza de las muestras se estima utilizando la relación  $A_{260}/A_{280}$ , siendo correcto un valor entre 1.7 y 1.9.

#### **II.9.1. Análisis de ARN mensajero por “RT-PCR”.**

##### ***a) Transcripción inversa de ARN a ADN complementario (ADNc).***

Procedimiento: en un tubo Eppendorf se pipetea  $1 \mu\text{g}$  de ARN que se desnaturaliza calentando durante 5 minutos a  $65^{\circ}\text{C}$ . A lo anterior se añaden  $8 \mu\text{l}$  de

tampón (5x) del enzima transcriptasa inversa, 4  $\mu$ l de una mezcla de nucleótidos (dNTPs) 10 mM, 4  $\mu$ l de DTT 10 mM, 20 unidades de inhibidor de ARNasa (RNAsin), 0.3  $\mu$ M de cebadores aleatorios (“random primers”) y 200 unidades de transcriptasa inversa (M-MLV), en un volumen de 40  $\mu$ l. La reacción se incuba a 37°C durante 1 hora. Transcurrido este tiempo se para la reacción calentando a 95°C durante 5 minutos. En todo el proceso se usan tubos blancos de reacción en los que el volumen equivalente de ARN se sustituye por H<sub>2</sub>O destilada tratada con DEPC (autoclavaza).

***b) Amplificación del ADNc por reacción en cadena de la polimerasa (“PCR”).***

Procedimiento: primero, se preparan tubos con 8  $\mu$ l de mezcla de reacción y 2  $\mu$ l del resultado de la transcripción inversa (muestras y blanco de reacción). A continuación se introducen en un termociclador Eppendorf Mastercycler personal. Entonces, los tubos se someten a una desnaturalización inicial a 94.5°C durante 5 minutos, seguida de 40 ciclos con: 1 minuto de desnaturalización a 94.5°C, 2 minutos de alineamiento a la temperatura indicada para cada uno de los cebadores (**Tabla 12**) y 2 minutos de extensión a 72°C, y una extensión final a 72°C durante 10 minutos. Tras la amplificación, los tubos se mantienen a 4°C. Para verificar que la cantidad inicial de ADNc en las PCR es la misma, se amplifica el gen control de la GAPDH siguiendo el mismo protocolo pero utilizando unos cebadores específicos.

***c) Electroforesis de ADN.***

Procedimiento: los fragmentos de ADNc amplificado se visualizaban por electroforesis en geles de agarosa marcados con bromuro de etidio. Los resultados de la PCR se mezclan con 2  $\mu$ l de tampón de carga (10 mM de Tris-HCl pH 7.5, 50 mM de EDTA, Ficoll-400 al 15%, azul de bromofenol al 0.03%, xylene cyanole al 0.03% y orange G al 0.4%) y se depositan en los pocillos del gel de agarosa, sumergidos previamente en una cubeta de electroforesis llena de tampón tris-acético-EDTA (TAE) (40 mM de Tris-acético pH 8.0 y 1 mM de EDTA). También en uno de los pocillos se carga un marcador de peso molecular. A continuación, los geles se someten una

corriente eléctrica con voltaje constante de 80-100V durante 1 hora. La electroforesis se detiene cuando el frente de desplazamiento sitúa aproximadamente a 5 mm del límite del gel. Finalmente, las bandas de ADNc amplificado se visualizan usando el sistema BioDoc-It™.

Cebador	Secuencias	Número de acceso	Tª de alineamiento	Producto
NFAT1 (sentido) NFAT1 (antisentido)	5'-AAACTCGGCTCCAGAATCCA-3' 5'-TGGACTCTGGGATGTGAACT-3'	NM173091	55°C	577 pb
NFAT2 (sentido) NFAT2 (antisentido)	5'-GCTATGCATCCTCCAACGTC-3' 5'-AGTTGGACTCGTAGGAGGAG-3'	NM172390	55°C	449 pb
NFAT3 (sentido) NFAT3 (antisentido)	5'-ACACAGCCCTATCTTCAGGA-3' 5'-ATCTTGCCTGTGATACGGTG-3'	NM004554	55°C	293 pb
NFAT4 (sentido) NFAT4 (antisentido)	5'-ACCCTTTACCTGGAGCAAAC-3' 5'-CTTGCAGTAGCGACTGTCTT-3'	NM173165	55°C	338 pb
NFAT5 (sentido) NFAT5 (antisentido)	5'-CGTGTGTGTGGCTTCTATGT-3' 5'-TGCCTCTCAATCAGAGAGAG-3'	NM173214	55°C	328 pb
Charcot-Leyden (sentido) Charcot-Leyden (antisentido)	5'-AGGAGACAACAATGTCCCTG-3' 5'-TCACAGCCTCAGGCTTGATT-3'	NM001828	55°C	373 pb
Mieloperoxidasa (sentido) Mieloperoxidasa (antisentido)	5'-AACCTGCGCAACATGTCCAA-3' 5'-CCTCATGACCTGCTCAAACA-3'	NM000250	55°C	661 pb
COX-2 (sentido) COX-2 (antisentido)	5'-TTCAAATG AGATTGTGGAAAATTGCT-3' 5'-AGATCATCTCTGCCTGAGTATCTT-3'	M90100	60°C	300 pb
GAPDH (sentido) GAPDH (antisentido)	5'-CCACCCATGGCAAATTCATGGCA-3' 5'-TCTAGACGGCAGGTCCAGGTCCACC-3'	J04038	60°C	605 pb

Tabla 12. Cedores específicos usados para PCR.

## II.9.2. Análisis de ARN mensajero por “Northern blotting”.

### a) Electroforesis de ARN en gel de agarosa desnaturizante.

Procedimiento: se preparan 50 ml de un gel de azarosa al 1% en ácido 3 (N-morfolino) propanosulfónico 1x (MOPS) (0.2 M de MOPS, 0.05 M de acetato sódico, 0.01 M de EDTA, pH 5.5) y se añade formaldehído al 37%. Se deja reposar durante 15 minutos para minimizar los vapores de este producto.

Se vierte el gel en la cubeta y se deja solidificar. Se toman 10 µg de ARN, que se desecan en un aparato de vacío y se resuspenden en 10 µl de tampón de carga (1 µl de MOPS, 2 µl de formaldehído, 2 µl de H<sub>2</sub>O destilada y 5 µl de formamida). El ARN se desnatura calentando durante 5 minutos a 68°C, se mantiene en hielo 5 minutos, se le añade 2 µl de tampón de carga (50% de glicerol, 0.2% de azul de bromofenol y 0.2% de xileno). Se carga el gel y se deja correr durante 2 horas a 70 voltios, en MOPS 1x. Una vez acabada la electroforesis se tiñe el gel con bromuro de etidio (0.5 µg/ml), se fotografía sobre el transiluminador y se trata con agua DEPC a 65°C durante 15 minutos, para quitarle el formaldehído que puede influir en la transferencia. Transcurrido ese tiempo, se procede a la transferencia de ARN a una membrana de nylon por el método de capilaridad (gel-ventana-membrana-papel: 8 cm-peso 400 g). La transferencia se deja 16 horas y se fija el ARN a la membrana (“cross linking”) mediante luz ultravioleta, con una irradiación de 150 mJ/cm<sup>2</sup>.

***b) Hibridación con la sonda marcada.***

Procedimiento: la membrana se prehibrida con 5 ml de una solución de hibridación (50% de formamida, 5x de SSPE, 5x de solución de Denhart's, SDS al 0.5% y 100 µg/ml de ADN de esperma de salmón) a 42°C durante 3 horas, y después se hibrida con la misma solución, añadiendo 100 ng/ml (según el protocolo de rediprime) de sonda marcada, a 42°C durante 16 horas. Después de hibridar la membrana, se quita el tampón de hibridación y se lava dos veces durante 30 minutos con una solución de SSPE 2 x, SDS al 0.1% a temperatura ambiente y dos veces más con una solución de SSPE al 0.1% y SDS al 0.1% a 60°C durante 30 minutos. La membrana se coloca en un “casete” de radiografía expuesta a una placa radiográfica de alta sensibilidad y se guarda a -80°C hasta su posterior revelado.



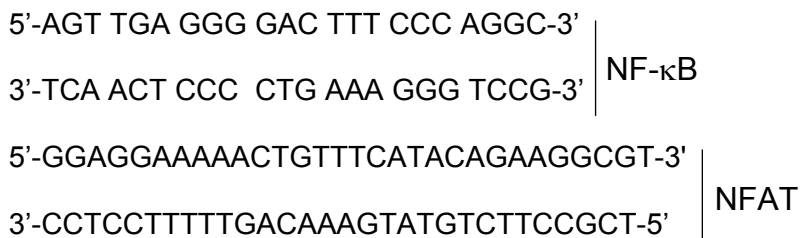
## **II.10. ANÁLISIS DEL CAMBIO EN LA MOVILIDAD ELECTROFORÉTICA (“EMSA”).**

### ***a) Preparación de extractos nucleares.***

Después del tratamiento, los neutrófilos ( $10^7$  células/ml) se lavan con 1 ml de PBS y se lisan mediante el mismo procedimiento descrito en el apartado de extracción de proteínas nucleares.

### ***b) Marcaje de la sonda de NF- $\kappa$ B y de NFAT con $^{32}$ P e incubación el con extracto nuclear.***

La secuencia del oligonucleótido usada fue la siguiente:



### ***c) Separación de doble cadena de ADN***

Procedimiento: las doble cadenas se separan llevando 50 ng del oligonucleótido, resuspendido en tampón Tris-EDTA (10 mM de Tris pH 8.0, 1 mM de EDTA) + 0.5  $\mu$ l de tampón de desnaturalización (200 mM Tris pH 9.5, 10 mM de spermidina, 1 mM de EDTA) (se completa hasta 5  $\mu$ l con H<sub>2</sub>O), a 70°C durante 5 minutos, después se deja en hielo para evitar que se forme de nuevo la doble cadena del ADN.

### ***d) Marcaje del oligonucleotido con el $\gamma$ [ $^{32}$ P]-ATP.***

El ADN desnaturalizado se centrifuga a 12,000 x g durante 5 minutos a 4°C y se le añade lo siguiente:

+ 5µl tampón quinasa (10x) (700 mM de Tris-HCl pH 7.6, 100 mM de MgCl<sub>2</sub>, 150 mM de DTT, 10 mM de spermidina (la spermidina estimula la incorporación de  $\gamma$ -[<sup>32</sup>P]-dATP a la muestra).

+ 2.5 µl [ $\gamma$ -ATP <sup>32</sup>P] i = 25 µci para conseguir una concentración final de 10 µci.

+ 1 µl BSA (2 mg/ml).

+ 4 µl (equivalente de 30 unidades) de T4 polinucleotido quinasa (cataliza la transferencia del  $\gamma$ -P del ATP al extremo 5' del oligonucleotido).

+ 37,5 µl H<sub>2</sub>O (para completar un volumen total de 50µl).

La incubación se realiza a 37°C durante 60 minutos.

#### **e) Preparación de las columnas de sephadex G-50.**

Procedimiento: en una columna (jeringa de 1 ml) se coloca 1 milímetro de lana de vidrio, y se depositan 150 µl de sephadex G-50 (que se prepara el día anterior en H<sub>2</sub>O destilada). La columna se centrifuga durante 15 minutos a 12,000 x g para eliminar el líquido de la resina. La mezcla del oligo marcado se pasa por la columna de Sephadex G-50 la cual se centrifuga durante 3 minutos a 12,000 x g. La sonda de ADN marcada se recupera en un tubo Eppendorf y se guarda a -20°C hasta su uso.

#### **f) Incubación con la sonda marcada.**

Procedimiento: en un tubo Eppendorf se mezcla:

+ 10 µl de tampón de incubación (10 mM de HEPES pH 7.9, 10% de Glicerol, 0.1 mM de EDTA, 8 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1 mM de DTT).

+ 1 µl de poly d I-C (0.25 µg/ml)

+ 1 µl DTT (0.1mM).

+ 5 µl de proteínas nucleares (4 µg)

+ 2 µl H<sub>2</sub>O.

+ 1 µl de sonda marcada (depende de las cuentas calculadas).

→ V total= 20 µl

El volumen de H<sub>2</sub>O destilada de la mezcla puede variar en función de la cantidad de sonda marcada y de la concentración de proteínas nucleares obtenidas. La mezcla se incuba durante 30 minutos en hielo. En caso de analizar superretraso

(“supershift”) a la mezcla de reacción se añade 1 µg de anticuerpo y el gel de acrilamida se realiza al 4%.

**g) Electroforesis en gel de poliacrilamida.**

Preparación del gel de acrilamida al 6%:

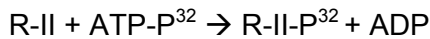
- + 3 ml de acrilamida-bisacrilamida al 40% (38:2).
- + 1 ml TBE 10x (890 mM de Tris, 890 mM de Borato, 20 mM de EDTA).
- + 16 ml H<sub>2</sub>O.
- + 200 µl persulfato amonio al 10%.
- +20 µl TEMED.

Las proteínas se separan por electroforesis en TBE 0.5x a 150 V. El gel se seca durante 1 hora a 80°C. Las bandas correspondientes al factor de transcripción unido al ADN se revelan por autoradiografía.

**II.11. ANÁLISIS DE ACTIVIDAD CALCINEURINA.**

La calcineurina, también llamada fosfatasa 2B, es una fosfatasa tipo serina/treonina dependiente del complejo Ca<sup>2+</sup>/calmodulina, que tiene dos subunidades principales, la subunidad catalítica de 59 kDa (que tiene el dominio de unión de la calmodulina y una región autoinhibidora) y la subunidad reguladora (de la unión al Ca<sup>2+</sup>). El importante papel de la calcineurina en las vías de señalización intracelular (en células T, por ejemplo) fue identificado usando inmunosupresores tales como la ciclosporina A y el FK506. Estas drogas inhiben a la fosfatasa 2B uniéndose con ciertas inmunofilinas; por ejemplo, la ciclosporina A se une a la ciclofilina y la FK506 se une a la proteína de unión 12 (FKB12). Esta fosfatasa se presenta expresada generalmente en células eucarióticas. En células de mamíferos, la CaN está presente en el cerebro (Price et al., 1999), en linfocitos T (Clipstone and Crabtree, 1992) y en neutrófilos (Carballo et al., 1999). La actividad de la fosfatasa calcineurina se mide usando como sustrato un fosfopéptido sintético correspondiente al sitio de fosforilación de la subunidad RII de la proteína quinasa dependiente de AMP cíclico.

**a) Marcaje del péptido.**



Procedimiento: la incubación del péptido a marcar (DLDVPIGRFDRRVSVAE) con ATP-P<sup>32</sup> se realiza mezclando en un tubo Eppendorf lo siguiente:

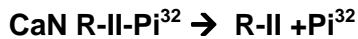
- + 40-100  $\mu\text{Ci}$  de ATP-P<sup>32</sup>
- + 60 nmoles de ATP frío
- + 23 nmoles de R-II
- + 5  $\mu\text{g}$  de proteína quinasa A (PKA) (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ )

Toda la mezcla se lleva a un volumen final de 200  $\mu\text{l}$  con el tampón de incubación (40 mM de HEPES pH 6.5, 0.4 mM de EGTA, 0.8 mM de EDTA, 4 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM de DTT, 0.1 mg/ml de BSA). La incubación se realiza durante 2 horas a 30°C y luego el péptido marcado se eluye por cromatografía usando una columna de tipo C18 (Sep-Pak). El ATP radioactivo se precipita con 0.1% de ácido trifluoroacético (TFA). El péptido se eluye mediante adiciones sucesivas de 0.5 ml de acetonitrilo al 30% en 0.1% de TFA. Para su uso, se hacen diluciones del R-II-P<sup>32</sup> en el tampón (20 mM de Tris-HCl pH 8.0, 0.1 mM de NaCl; 6 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.6 mM de CaCl<sub>2</sub>, 0.5 mM de DTT, 0.1 mg/ml de BSA) y se hacen alícuotas que se guardan a -80°C.

**b) Preparación de las muestras.**

Procedimiento: los neutrófilos (10<sup>7</sup> células/ml) se incuban con las diferentes drogas a 37°C y posteriormente, se precipitan por centrifugación, un pulso a 12,000 x g a 4°C. El precipitado se resuspende en 50  $\mu\text{l}$  de un tampón de lisis que contiene: 50 mM de Tris-HCl pH 7.5, 0.1 mM de EGTA, 1 mM de EDTA, 0.5 mM de DTT, 0.2% de Triton X-100, 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de aprotinina, 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de leupeptina, 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de inhibidor de tripsina y 1 mM de PMSF. A continuación, se sonica durante 30 segundos en hielo, y el lisado se centrifuga durante 10 minutos a 12,000 x g. El sobrenadante se guarda a -80°C hasta su uso.

**c) Incubación con el péptido marcado.**



Procedimiento: se incuban 40-80  $\mu\text{g}$  de proteínas con 20  $\mu\text{l}$  del fosfopéptido (2  $\mu\text{M}$ ), con 500  $\mu\text{M}$  del ácido okadaico y el volumen se lleva hasta 60  $\mu\text{l}$  con el tampón de incubación (20 mM de Tris-HCl pH 7.5, 100 mM de NaCl, 6 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 0.5 mM de DTT, 0.1 mM de  $\text{CaCl}_2$ , 0.1 mg/ml de BSA) durante 15 minutos a 30°C, y la reacción se para con 500  $\mu\text{l}$  de ácido tricloroacético al 5% en 100 mM de tampón fosfato pH 7 frío. La mezcla anterior se pasa por columnas de Dowex preparadas previamente y el fósforo liberado se eluye con 500  $\mu\text{l}$  de ácido tricloroacético.

La cantidad de fósforo liberado se cuantifica midiendo las cuentas por minuto de radioactividad en un contador  $\beta$ .

**d) Cálculo de la actividad específica.**

- Partimos de 23 nmoles de R-II, y suponemos que recuperamos 20 nmoles de RII- $\text{Pi}^{32}$ =20.000 pmoles.
- $[\text{RII-Pi}^{32}] = 20000 \text{ pmoles} / 3 \text{ ml} (3000 \mu\text{l}) = 6.66 \text{ pmoles} / \mu\text{l}$
- $6.66 \text{ pmoles} / \mu\text{l} = 53.28 \text{ cpm} / \mu\text{l}$  en cada muestra.
- Actividad total =  $1374 \text{ cpm} / \mu\text{l} = 10.992 \text{ cpm} / 8 \text{ ml} = 10.992 \text{ cpm} / 53.28 \text{ pmoles} = 206 \text{ cpm} / \text{pmoles}$ .
- Actividad específica = 206 cpm/pmoles de  $\text{Pi}^{32}$  liberado ó RII transformado.

**II.12. ANÁLISIS DE LA PRODUCCIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO.**

Los niveles de especies reactivas de oxígeno se han analizado usando dos métodos, cada uno con su especificidad particular para localizar y determinar el tipo de especie reactiva de oxígeno producida:

- La luminiscencia producida por la oxidación del luminol, que es específico para la cantidad total de especies reactivas de oxígeno (Nurcombe et al., 1989; Li et al., 1999). El luminol permeabiliza libremente a través de la membrana plasmática y sus modificaciones constituyen un indicador de la producción de las especies reactivas de oxígeno, tanto intra como extracelulares (Nurcombe et al., 1989; Li et al., 1999).

- La diclofluoresceína (DCFDA) se usa para medir la producción del peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) intracelular o intracelular/extracelular, dependiendo de si el indicador se ha eliminado del medio o no.

**a) Medida por luminiscencia en presencia de luminol.**

Las células ( $10^6$  células/ml), resuspendidas en el tampón de incubación PBS enriquecido con 10 mM glucosa, 500  $\mu$ M de  $CaCl_2$ , se incuban con el agente a 37°C durante el tiempo requerido. Después, se añade 15  $\mu$ M luminol y 2  $\mu$ g/ml peroxidasa, en la oscuridad. La reacción se dispara con el estímulo adecuado en la oscuridad y la luminiscencia se mide a 37°C.

**b) Medida de la producción de  $H_2O_2$  por citometría de flujo.**

Procedimiento: la carga de las células se lleva a cabo con 2,5  $\mu$ M de DCFDA y 2.5  $\mu$ M de probenecid (se disuelve añadiendo cantidades sucesivas de 1  $\mu$ l de 0.5 M NaOH hasta disolverlo, después se completa con  $H_2O$  hasta el volumen deseado) como inhibidor del transporte de aniones, que impide la salida al exterior de las células del DCFDA intracelular. La incubación se hace en la oscuridad. Las células se lavan 2 veces en PBS suplementado con 2.5  $\mu$ M de probenecid con el fin de eliminar el DCFDA que no se haya incorporado a las células. Se centrifuga a 400 x g durante 5 minutos y se desecha el sobrenadante. El precipitado celular se resuspende en PBS suplementado con 2.5  $\mu$ M probenecid. A continuación, las células se vuelven a contar para obtener aproximadamente el mismo número de células.

Para cada determinación se analizan 5 x  $10^6$  células/0.5 ml de PBS enriquecido con 10 mM glucosa, 500  $\mu$ M de  $CaCl_2$  y probenecid. El número de células varía en función de cómo se hayan cargado.

Antes de analizar las células, se verifica si las éstas se han cargado correctamente (calibrado). El calibrado se realiza en una cubeta de vidrio atemperada

a 37°C con agitación constante, mediante un fluorímetro (PERKIN-ELMER). Para medir las especies reactivas de oxígeno totales (extra e intracelulares) no se lavan las células. La reacción se pone en marcha con el estímulo y se registra la fluorescencia en verde mediante el citómetro de flujo. Los datos expresan el porcentaje de células positivas para la fluorescencia en verde.

### **II.13. ANÁLISIS DE LA PRODUCCIÓN DE NITRITOS.**

Se puede hacer una determinación de la cantidad de óxido nítrico producido por un cultivo mediante la determinación de nitrito acumulado en el sobrenadante. A pH fisiológico 2 moléculas de  $\cdot\text{NO}$  reaccionan con una de  $\text{O}_2$ , generando una molécula de nitrito y otra de nitrato. Ambos compuestos son químicamente estables, lo cual les hace buenos candidatos como factores de estimación del  $\cdot\text{NO}$  producido. Para cuantificar los nitritos acumulados se utiliza el método de Griess (Griess et al., 1982), en el cual estos metabolitos son transformados en compuestos diazo coloreados. El reactivo de Griess está compuesto por una dilución 1:1 de ácido sulfanílico al 1 % en 3M de HCl y N-(1)-Naftilendiamina al 0,02 % en en agua desionizada.

Procedimiento: se preparar una curva estándar con  $\text{NaNO}_2$ , de manera que las concentraciones finales sean: 0, 0.5, 1, 2, 5, 10, 20  $\mu\text{M}$ , teniendo en cuenta que cada 200  $\mu\text{l}$  de preparación debe llevar 100  $\mu\text{l}$  de reactivo de Griess. Añadir a cada muestra 100  $\mu\text{l}$  de reactivo de Griess y agua desionizada hasta 200  $\mu\text{l}$ . Resuspender y incubar durante 20 minutos a temperatura ambiente. Medir la densidad óptica a 540 nanómetros en el espectrofotómetro. Los datos se expresan como la media  $\pm$  la desviación estándar.





UN NUEVO PAPEL PARA LAS  
MONOAMINAS OXIDASAS EN LA  
REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN  
DE LA ÓXIDO NÍTRICO SINTASA  
INDUCIBLE



## **I. RESUMEN.**

En este trabajo de investigación se analiza el papel regulador del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> endógena sobre la expresión del gen de la óxido nítrico inducible (NOS2) inducida por LPS/IFN- $\gamma$  en macrófagos peritoneales de rata.

Inicialmente se encontró que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> añadida exógenamente inhibía la expresión de la NOS2, lo cual nos llevo a analizar los efectos de la actividad de las monoamina oxidasa-A/B (MAO-A/B) y la amina oxidasa sensible a semicarbazida (SSAO), como enzimas formadoras de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre la expresión de la NOS2.

En presencia de sus sustratos, tiramina para la MAO-A/B y benzilamina para la SSAO, tiene lugar la síntesis intracelular de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y la inhibición de la expresión de la NOS2, como detectamos por Western-blotting, citometría de flujo y microscopía de fluorescencia. La pargilina y semicarbazida, inhibidores específicos de la MAO-A/B y de la SSAO, respectivamente, cancelan estos efectos negativos sobre la expresión de la NOS2. En presencia de iones de Fe<sup>2+</sup> y Cu<sup>2+</sup> se potencia la inhibición de la expresión de la NOS2, sugiriendo que especies reactivas de oxígeno derivadas de la reacción de Fenton participan en este proceso. Además se encontró que el efecto del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generado por monoaminas oxidasas se produce a nivel de ARNm.

Estos resultados ofrecen un nuevo punto de control en la expresión de la NOS2 a través de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> u otras especies reactivas de oxígeno.

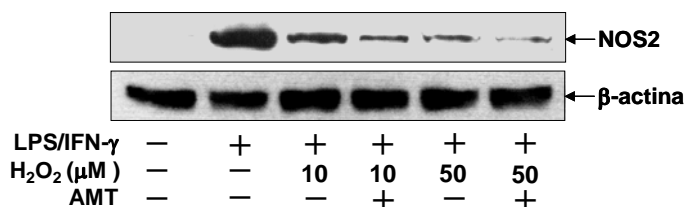
Una posible hipótesis podría ser que la inhibición de expresión de la NOS2 por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> constituye un mecanismo de protección celular contra los efectos citotóxicos producidos como consecuencia de la activación de enzimas generadores de especies reactivas de oxígeno, encontrando, por lo tanto, un papel nuevo y singular para la familia de proteínas de las monoaminas oxidasas.



## II. RESULTADOS.

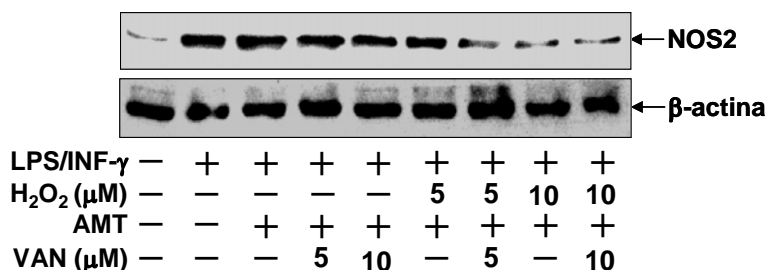
### II.1. El agua oxigenada y el vanadato actúan sinérgicamente en la inhibición de la expresión de la NOS2 inducida por LPS/INF- $\gamma$ en macrófagos peritoneales de rata.

Es bien conocido el efecto estimulador que lleva a cabo el LPS/INF- $\gamma$  sobre la expresión de la NOS2 (Xie et al., 1992). La **Figura 16** muestra como la expresión de la NOS2 inducida por LPS/INF- $\gamma$  fue inhibida de manera dosis-dependiente por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> añadido exógenamente y este efecto negativo fue potenciado por aminotriazol (inhibidor de la catalasa, la enzima detoxificante de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).



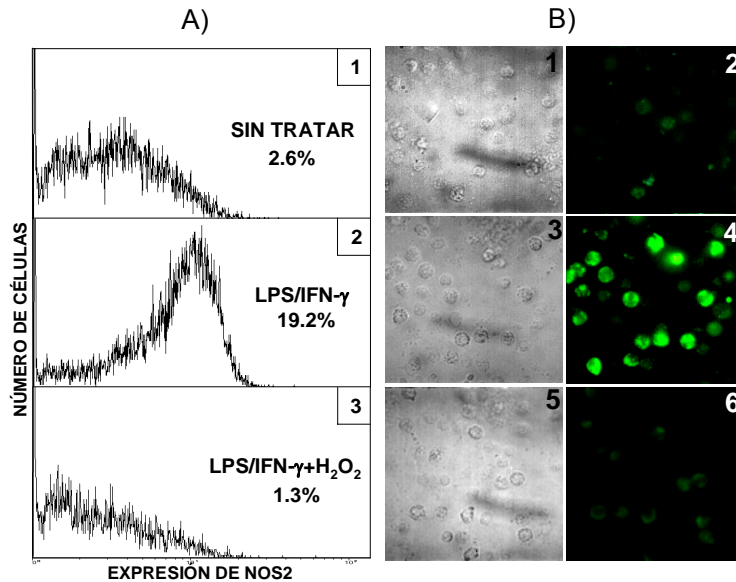
**Figura 16.** El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inhibe la expresión de la NOS2 inducida por LPS/INF- $\gamma$  en macrófagos. Los macrófagos fueron cultivados en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, con ó sin aminotriazol (AMT; 25 mM), 1 hora antes de la adición de LPS/INF- $\gamma$  (1  $\mu$ g/100 U por ml) durante 18 horas. La expresión de la NOS2 fue analizada por Western blotting.

La expresión de la NOS2 fue muy sensible al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ya que se detectó la inhibición de su expresión a una dosis de tan solo 10  $\mu$ M. Fue necesaria la combinación de vanadato y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para observar la inhibición prácticamente completa de la expresión de la NOS2 (**Figura 17**).



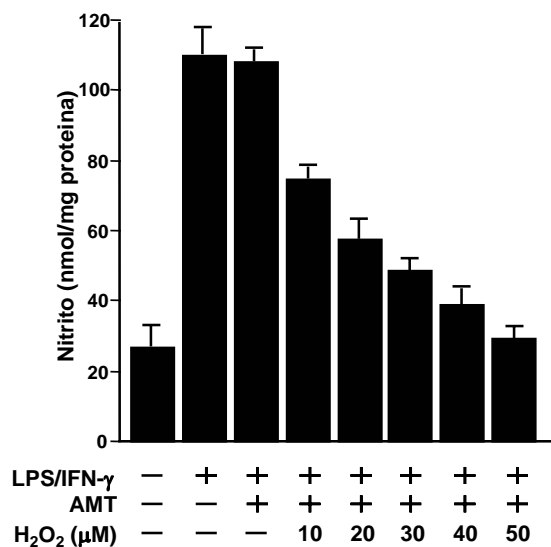
**Figura 17.** El vanadato potencia la inhibición de la expresión de la NOS2 producida por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en macrófagos. Los macrófagos fueron cultivados en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, con o sin aminotriazol (AMT; 25 mM) y éste a su vez en presencia ó ausencia de vanadato (VAN), 1 hora antes de la adición de LPS/INF- $\gamma$  (1  $\mu$ g/100 U por ml) durante 18 horas. La expresión de la NOS2 fue analizada por Western blotting.

Análisis adicionales llevados a cabo por citometría de flujo y microscopía de fluorescencia muestran resultados similares a los obtenidos en la **Figura 16** con respecto a la expresión de la NOS2 inducida por LPS/IFN- $\gamma$  (**Figura 18**).



**Figura 18.** Análisis mediante citometría de flujo y microscopía de fluorescencia corroboran los datos obtenidos. Los macrófagos fueron cultivados sin tratamiento (1), tratados con LPS/IFN- $\gamma$  (1  $\mu\text{g}/100$  U por ml) (2), o con LPS/IFN- $\gamma$  (1  $\mu\text{g}/100$  U por ml) y 50  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (3), durante 18 horas. Tras este periodo, la expresión de la NOS2 fue analizada por citometría de flujo (A) o microscopía de fluorescencia (B) bajo campo claro (1, 3, 5) o fluorescencia (2, 4, 6).

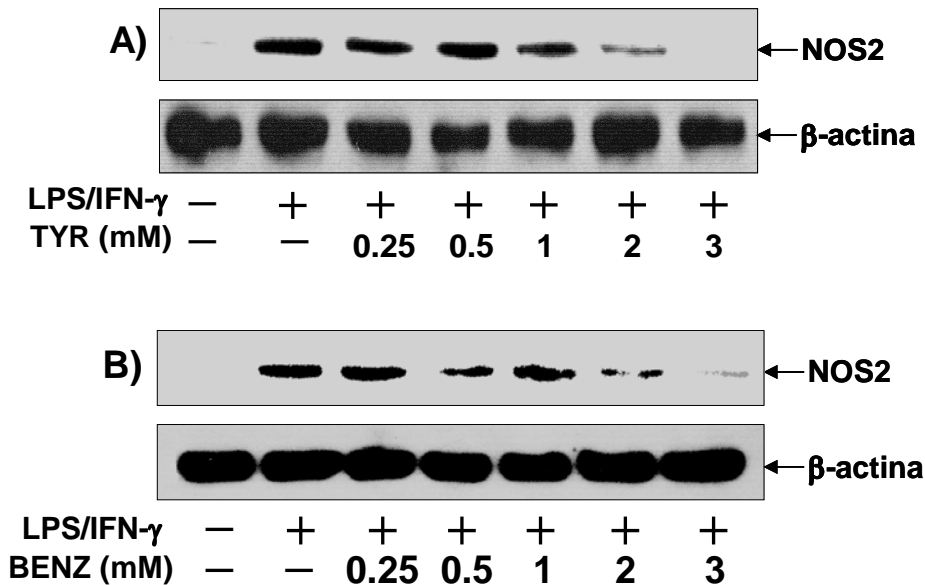
Por otro lado, en experimentos separados, se muestra que existe una correspondencia entre la inhibición de la expresión de la NOS2 por  $\text{H}_2\text{O}_2$  y su actividad (**Figura 19**).



**Figura 19.** El  $\text{H}_2\text{O}_2$  añadido exógenamente inhibe la producción de  $\text{NO}_2^-$  por macrófagos. Los macrófagos fueron cultivados en presencia ó ausencia de aminotriazol 25 mM (AMT) y/o  $\text{H}_2\text{O}_2$  a las dosis indicadas durante 1 hora antes de la adición de 1  $\mu\text{g}/100$  U por ml durante 18 horas. La concentración de nitrito fue medida en el medio de cultivo como se indica en materiales y métodos. Los datos son expresados como media  $\pm$  desviación estándar de tres experimentos separados.

## II.2. Efecto de los sustratos de monoaminas oxidasas sobre la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y sobre la expresión de la NOS2 en macrófagos.

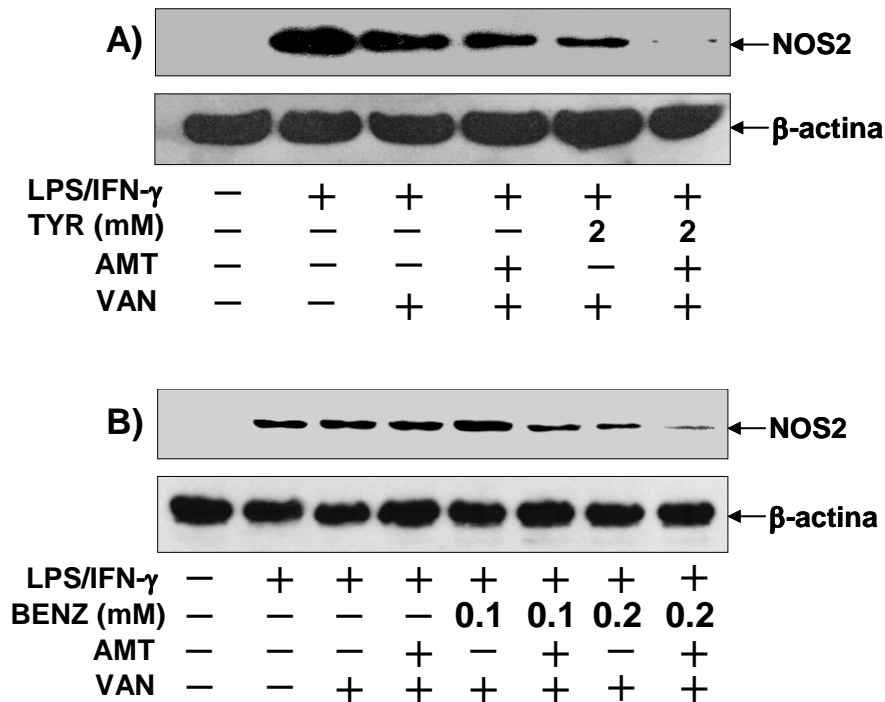
Las monoaminas oxidasa catalizan la conversión de monoaminas en aldehídos, amonio y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Wilmot et al., 1999). En primer lugar, analizamos la posibilidad de que la tiramina (sustrato endógeno de la MAO-A/B) y la benzilamina (sustrato sintético de la SSAO), pudieran influir sobre la expresión de la NOS2 inducida por LPS/IFN- $\gamma$ . Con este propósito, los macrófagos fueron cultivados con LPS/IFN- $\gamma$  en presencia de sustratos de monoaminas oxidasas durante 18 horas. Encontramos que 2 mM de tiramina y 500  $\mu$ M de benzilamina promueven una drástica inhibición de la expresión de la NOS2 inducida por LPS/IFN- $\gamma$  (**Figuras 20**).



**Figura 20.** La activación de las monoaminas oxidasas inhibe la expresión de la NOS2 inducida por LPS/IFN- $\gamma$  en macrófagos. Los macrófagos fueron preincubados durante 1 hora con sustratos de las monoaminas oxidasas, tiramina (TYR; sustrato endógeno de la MAO-A/B) (**A**) y benzilamina (BENZ; sustrato sintético de la SSAO) (**B**), a las dosis indicadas, entonces se adiciono al medio de cultivo 1  $\mu$ g/ 100 U de LPS/IFN- $\gamma$  por ml, durante 18 horas. La expresión de la NOS2 fue analizada por Western blotting.

Estos experimentos fueron llevados a cabo en presencia de aminotriazol (inhibidor de catalasa, enzima destoxicante de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y vanadato, ya que un estudio previo muestra que los efectos de sustratos de monoaminas oxidasas sobre transportadores de glucosa podían estar mediados por la formación de compuestos de peroxovanadato (Marti et al., 1998), y que estos efectos eran potenciados por la

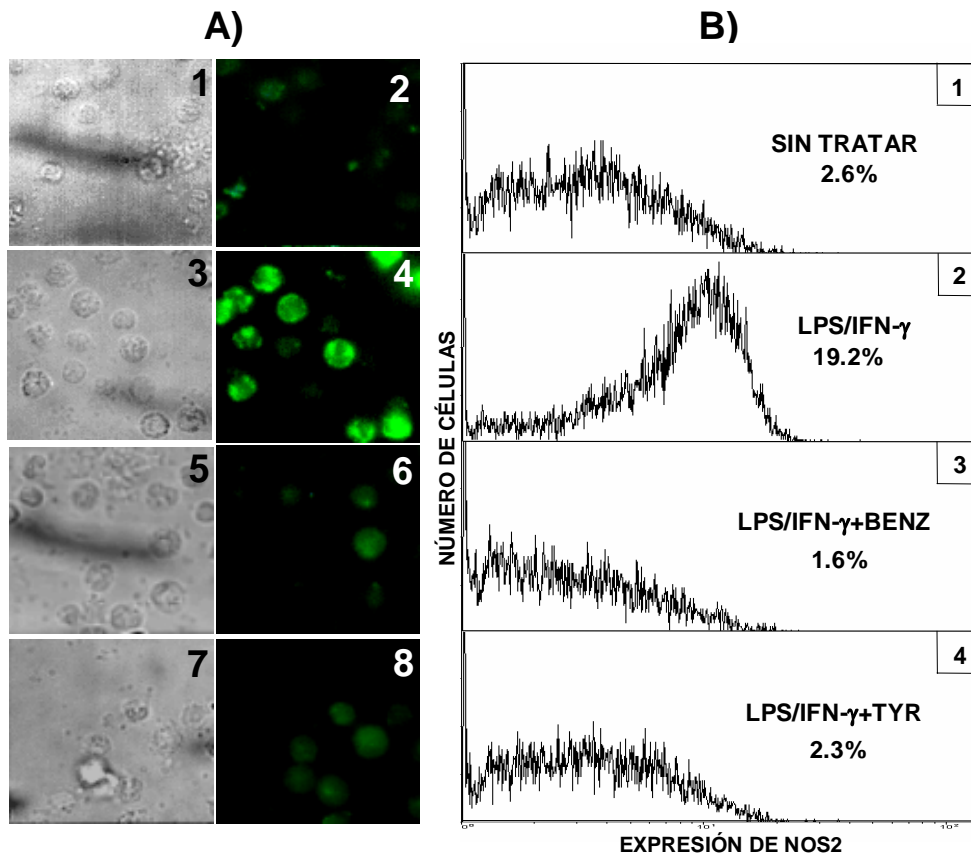
presencia del inhibidor de catalasa. Como se muestra en la **Figura 21**, se observó una gran capacidad de inhibición de ambos sustratos, tiramina y benzilamina sobre la expresión de la NOS2 en presencia de vanadato y aminotriazol, comparado con su ausencia.



**Figura 21.** La combinación de vanadato y aminotriazol potencia el efecto de los sustratos de monoaminas oxidasas sobre la expresión de la NOS2 en macrófagos. **(A)** Los macrófagos fueron cultivados con 2 mM tiramina (TYR), 10  $\mu$ M vanadato (VAN) y/o 25 mM aminotriazol (AMT), donde indicamos, 1 hora antes de la adición de 1  $\mu$ g/100 U por ml de LPS/IFN- $\gamma$ , durante 18 horas. **(B)** Los macrófagos fueron cultivados con las dosis indicadas de benzilamina (BENZ), 10  $\mu$ M vanadato (VAN) y/o 25 mM aminotriazol (AMT), 1 hora antes de la adición 1  $\mu$ g/100 U por ml de LPS/IFN- $\gamma$ , durante 18 horas. La expresión de la NOS2 fue analizada por Western blotting.

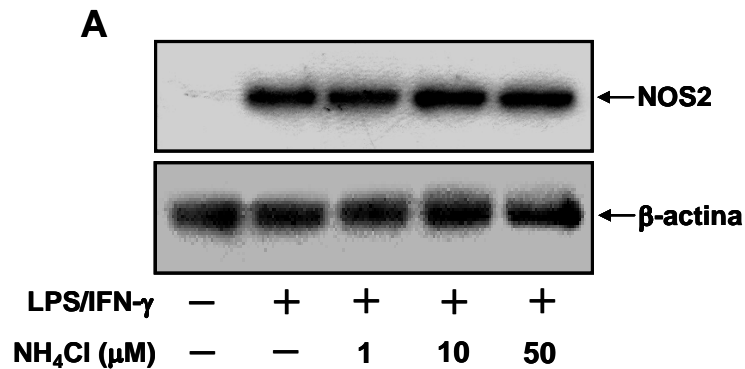
Estos resultados están en concordancia con un trabajo previo sobre el transportador de glucosa GLUT4 (Marti et al., 1998) y sugieren que el peroxovanadato, resultado de la reacción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y vanadato, puede ser una de las especies reactivas que regulan negativamente la expresión de la NOS2. En cualquier caso es de resaltar que ambos sustratos, promueven por si mismos la inhibición de la expresión de la NOS2 inducida LPS/IFN- $\gamma$ . Análisis adicionales mediante microscopía de fluorescencia y citometría de flujo muestran resultados similares sobre la expresión de la NOS2 (**Figura 22**) (ver página siguiente).

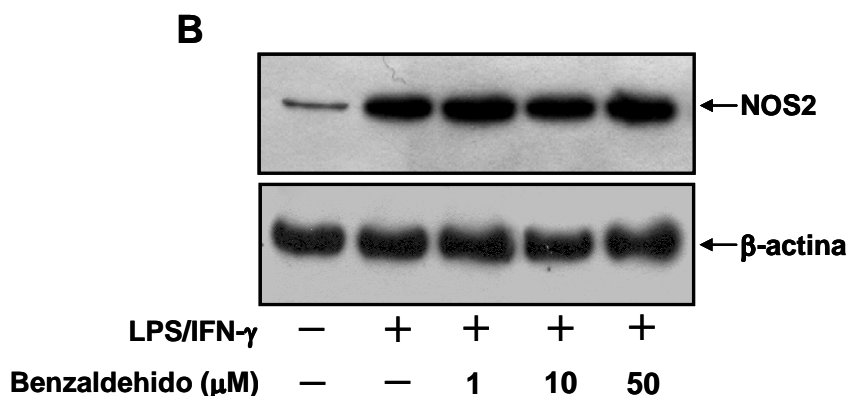




**Figura 22.** Efecto de los sustratos de monoaminas oxidasas sobre la expresión de la NOS2 analizada por microscopía de fluorescencia y citometría de flujo en macrófagos. (A) Los macrófagos se cultivaron sin tratamiento (1 y 2), o fueron cultivados durante 18 horas con 1  $\mu$ g/100 U por ml de LPS/IFN- $\gamma$ , en ausencia (3 y 4) o presencia de 3 mM de benzilamina (BENZ: 5 y 6) o de 3 mM tiramina (TYR: 7 y 8). Las mismas muestras fueron fotografías bajo fluorescencia (2, 4, 6 y 8) y bajo campo claro (1, 3, 5 y 7). (B) Las células fueron tratadas como en A y la expresión de la NOS2 fue analizada por citometría de flujo. Los resultados están expresados en porcentaje de células positivas para la NOS2.

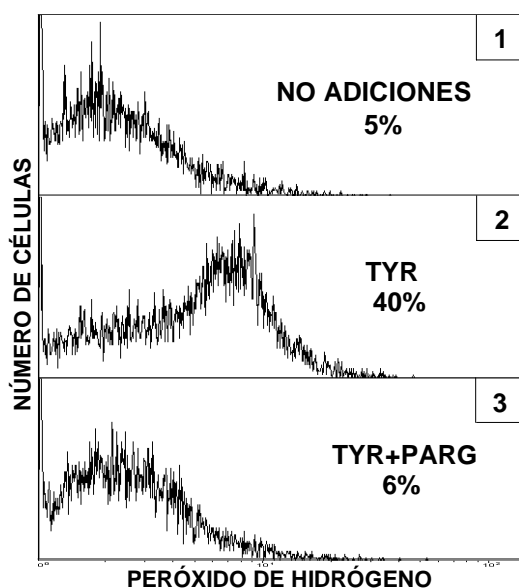
Por el contrario, ni el formaldehído ni el amonio tuvieron ningún efecto sobre la expresión de la NOS2 inducida por LPS/IFN- $\gamma$  como se comprobó mediante Western blotting (**Figura 23**) (véase también página siguiente).



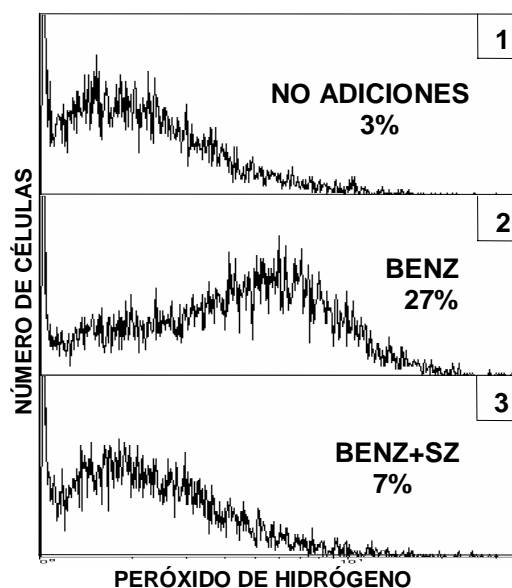


**Figura 23.** Efecto de los Productos (Benzaldehido y cloruro amónico) de monoaminas oxidasas sobre la expresión de la NOS2 en macrófagos. Tras su obtención, los macrófagos fueron tratados con cloruro amónico ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) (A) ó benzaldehido (B), a las dosis indicadas, 1 hora antes de la adición de LPS/IFN- $\gamma$  (1  $\mu\text{g}/100$  U por ml) durante 18 horas. La expresión de la NOS2 fue analizada mediante Western blotting.

Los siguientes experimentos fueron llevados a cabo para cuantificar por fluorescencia, usando DCFDA como indicador, los niveles de  $\text{H}_2\text{O}_2$  generados por la actividad catalítica de la MAO-A/B y de la SSAO. La **Figura 24** muestra la producción de  $\text{H}_2\text{O}_2$  por los macrófagos tras su tratamiento con tiramina, y que este proceso fue inhibido por pargilina, un inhibidor de la MAO-A/B (Taylor et al., 1960).



**Figura 24.** Producción de  $\text{H}_2\text{O}_2$  por la MAO-A/B en macrófagos. La producción de  $\text{H}_2\text{O}_2$  intracelular fue analizada por citometría de flujo, usando DCFDA como indicador, en macrófagos sin tratar (1), tratados con 2 mM de tiramina (TYR) durante 10 minutos, en ausencia (2) o presencia (3) de 500  $\mu\text{M}$  de Pargilina (PARG) (inhibidor específico de la MAO-A/B)

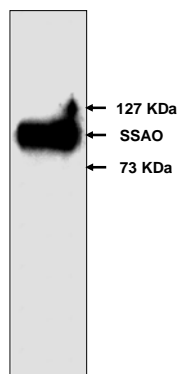


**Figura 25.** Producción de  $\text{H}_2\text{O}_2$  por la SSAO/VAP-1 en macrófagos. La producción de  $\text{H}_2\text{O}_2$  intracelular fue analizada por citometría de flujo, usando DCFDA como indicador, en macrófagos sin tratar (1), tratados con 3 mM de benzilamina (BENZ) durante 10 minutos, en ausencia (2) o presencia (3) de 500  $\mu\text{M}$  semicarbazida (SZ) (inhibidor específico de la

La **Figura 25** muestra la producción de  $H_2O_2$  por los macrófagos tras su tratamiento con benzilamina y que esta producción fue inhibida completamente por semicarbazida, un inhibidor específico de la SSAO (Tabor et al., 1954).

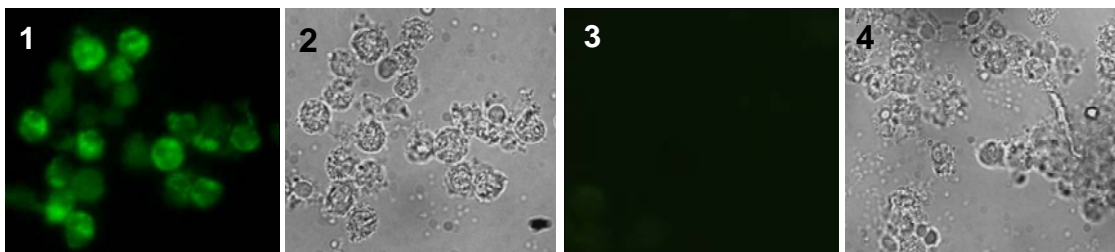
Estos resultados sugieren que el efecto de la tiramina y la benzilamina sobre la expresión de la NOS2 inducida por LPS/IFN- $\gamma$  es, al menos en parte, mediado por el  $H_2O_2$  generado por las monoaminas oxidasas. Por consiguiente, para aumentar la concentración intracelular de  $H_2O_2$  y potenciar su capacidad inhibitoria sobre la expresión de la NOS2, los experimentos siguientes fueron llevados a cabo en presencia de aminotriazol y vanadato.

Puesto que la presencia de la MAO-A/B ha sido anteriormente descrita en macrófagos (Fabian et al. 1978), hemos investigado si la SSAO se encuentra presente en estas células. Análisis mediante Western blotting usando un anticuerpo policlonal frente a la SSAO nos muestra la presencia de la proteína en lisados de macrófagos, como una banda que corresponde a un peso molecular de 100 kDa (**Figura 26**).



**Figura 26. Presencia de la SSAO en macrófagos peritoneales de rata.** La presencia de la SSAO fue analizada en macrófagos mediante Western blotting usando un anticuerpo policlonal contra dicha proteína.

Análisis de microscopía de fluorescencia usando un anticuerpo monoclonal adicional frente a la SSAO/VAP-1 confirman la presencia de esta proteína en macrófagos peritoneales de rata (**Figura 27**).



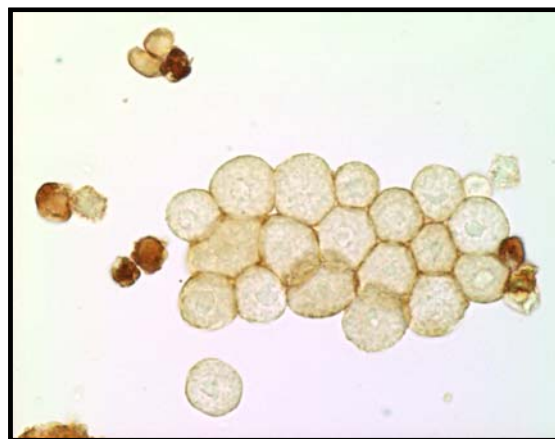
**Figura 27. La presencia de la SSAO/VAP-1 fue analizada además por microscopía de fluorescencia.** Los macrófagos fueron permeabilizados y la expresión de la SSAO/VAP-1 fue analizada mediante inmunofluorescencia, usando un anticuerpo monoclonal contra la VAP-1 (clone TK8) (**1, 2**). Como control de la especificidad del anticuerpo se usó un control isotópico GAM-FITC (**3, 4**). Las mismas muestras fueron analizadas bajo fluorescencia (**1, 3**) y bajo campo claro (**2, 4**).

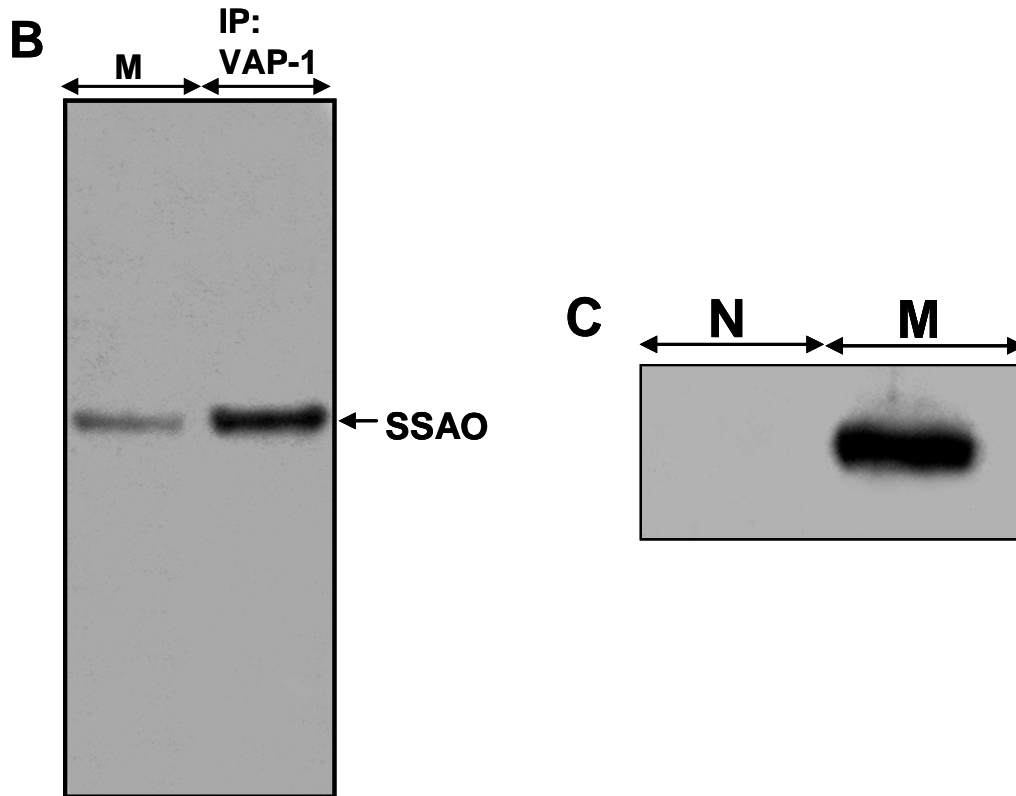
Cuando se realiza un lavado peritoneal de la rata, las células que principalmente se encuentran son macrófagos y mastocitos, en una proporción aproximada del 50%. Aunque tras su obtención las células fueron cultivadas en placas de petri de plástico, donde se pueden aislar los macrófagos por su adherencia al plástico, para asegurar qué células expresan la SSAO/VAP-1, las células del lavado peritoneal total fueron analizadas mediante inmunoensayo con peroxidasa y posterior fotografiado en el microscopio óptico. Como muestra la **Figura 28 A**, de los dos tipos celulares encontrados, solo los macrófagos presentan expresión de la SSAO/VAP-1, como demuestra su fuerte reactividad.

Además, para confirmar con mayor seguridad que los macrófagos expresan la SSAO/VAP-1, un lisado total de macrófago fue inmunoprecipitado con el anticuerpo anti-VAP-1 (Clone TK8-1014), el cual tiene la propiedad de que solo reconoce la VAP-1 en condiciones nativas. Con este inmunoprecipitado se realizó un Western blotting, en el cual la membrana fue incubada con el anticuerpo anti-SSAO donado por la profesora Mercedes Unzeta. Como se observa en la **Figura 28 B** (*ver la página siguiente*), el anticuerpo anti-SSAO reconoce una banda de aproximadamente 100 kDa. Esto refuerza el hallazgo de la presencia de la SSAO en macrófagos peritoneales de rata y además la identifica con la VAP-1.

Además se analizaron mediante Western blotting monocitos humanos para reafirmar el hallazgo de que estas células presentan expresión de VAP-1. Como se muestra en la **Figura 28 C**, los monocitos humanos expresan la VAP-1, al contrario que los neutrófilos, que carecen de esta (*ver la página siguiente*).

**A**





**Figura 28. Pruebas accesorias que confirman la presencia de la SSAO/VAP-1 en macrófagos.** (A) Los macrófagos fueron lisados inmediatamente después de su extracción. El lisado total fue inmunoprecipitado usando el anticuerpo monoclonal contra la VAP-1 (clone TK8) (IP: VAP-1) y el inmunoprecipitado fue analizado mediante Western blotting usando el anticuerpo policlonal donado por la Dr. Mercedes Unzeta. Este fue analizado en paralelo con un lisado total de macrófago sin inmunoprecipitar (M). (B) La expresión de la SSAO fue analizada en monocitos (M) y neutrófilos (N) de sangre periférica mediante Western blotting usando el anticuerpo policlonal anti-SSAO. (C) Las células del lavado peritoneal completo fueron marcadas usando el anticuerpo policlonal anti-SSAO, se marcaron con peroxidasa y se realizaron fotografías de microscopía óptica bajo campo claro.

Dada la existencia de artículos que muestran la presencia de la SSAO en el suero bovino (Conklin et al., 1998), analizamos la existencia de la SSAO en el suero fetal de ternera utilizado, ya que aunque inactivado por calor, hay que descartar un posible efecto aditivo derivado de su presencia en el medio de cultivo. Utilizamos como control positivo un lisado proteico de macrófagos y este lo comparamos con el suero de células estimuladas con LPS/IFN- $\gamma$  y de células no estimuladas. Sorprendentemente, como se muestra en la **Figura 29**, solo en las células estimuladas, se encuentra una proteína con fuerte reactividad contra el anticuerpo anti-SSAO. Es curioso que esta proteína tiene un peso molecular de unos 10 KDa menor que la banda reconocida en el lisado proteico de macrófago. Uno de los paradigmas de la SSAO, es si la forma de membrana es la misma que la SSAO

presente en el suero, o son proteínas distintas. Se postula que ambas son la misma proteína dada su alta homología, pero que la forma presente en el suero presenta una señal de secreción de 10 KDa que es cortada (Kurkijärvi et al., 2000), aunque aún no ha sido demostrado si son productos de genes distintos. Nuestros resultados no demuestran si ambas formas son productos de genes distintos, pero si nos aportan que la SSAO no se encuentra presente en el suero fetal de ternera utilizado.

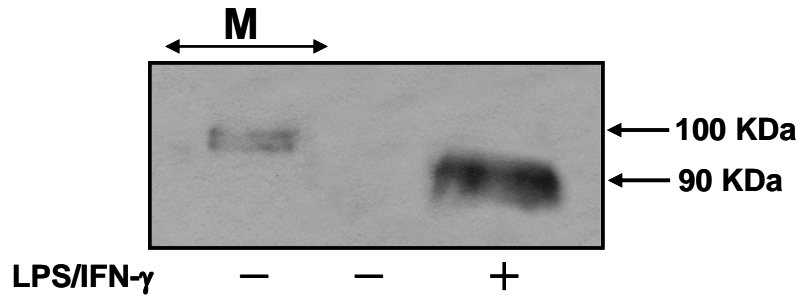
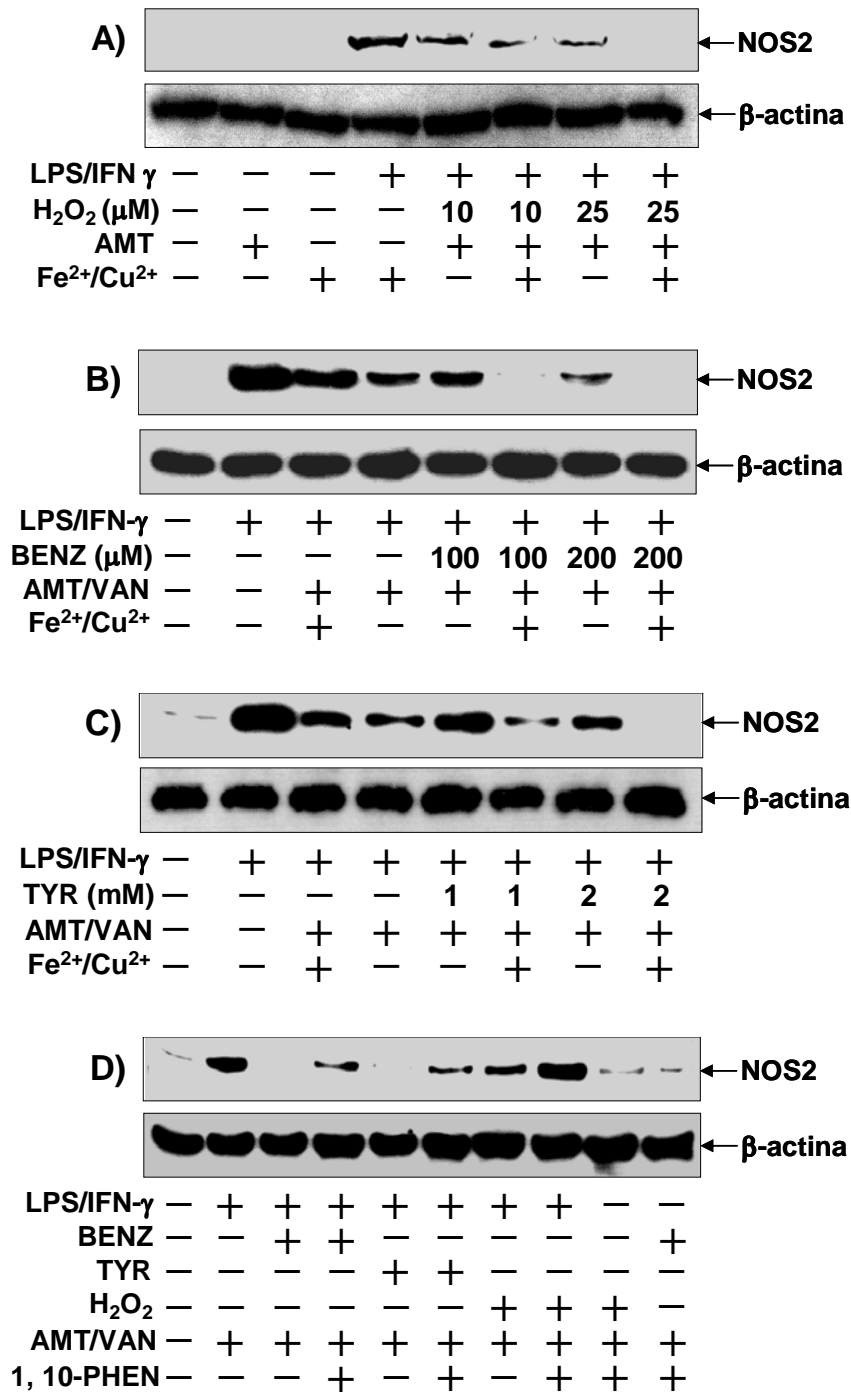


Figura 29. Ausencia de SSAO en el medio de cultivo y secreción de esta dependiente de LPS/IFN- $\gamma$  por macrófagos. Los macrófagos fueron cultivados en presencia o ausencia de LPS/IFN- $\gamma$  (1 $\mu$ g/100U por ml) durante 18 horas. Tras este periodo, el medio de cultivo fue concentrado mediante el uso de centricones y en el concentrado se analizó la presencia de la SSAO por Western blotting.

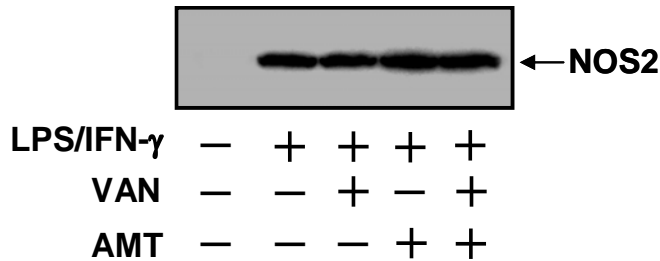
### II.3. Efecto de los iones de $Fe^{2+}/Cu^{2+}$ sobre la inhibición provocada por $H_2O_2$ y sustratos de monoaminas oxidasas en la expresión de la NOS2 en macrófagos.

Tras su difusión pasiva a través de la membrana plasmática, el  $H_2O_2$  puede ser convertida en otras especies reactivas de oxígeno, como son  $O_2^-$  y  $\cdot OH$ . La mayor contribución a la formación de radical  $\cdot OH$  intracelular se produce mediante las reacciones de Fenton, que engloban la reducción de  $H_2O_2$  por  $Fe^{2+}$  y  $Cu^{2+}$  (Halliwell et al., 1987). Por lo tanto, hemos analizado el posible papel de los iones  $\cdot OH$  en la inhibición de la NOS2 dependiente de  $H_2O_2$  y de sustratos de monoaminas oxidasas. La **Figura 30** muestra como la presencia de estos iones incrementa fuertemente la inhibición inducida por  $H_2O_2$  (**apartado A**), benzilamina (**apartado B**) y tiramina (**apartado C**). Por el contrario, el tratamiento de las células con 1,10-fenantrolina, un quelante de estos iones, cancela parcialmente el efecto inhibitor del  $H_2O_2$  y de los sustratos de monoaminas oxidasas (**apartado D**).



**Figura 30.** Los sustratos de monoaminas oxidasa inhiben la expresión de la NOS2 a través del incremento de especies reactivas de oxígeno derivadas de la reacción de Fenton en macrófagos. Los macrófagos fueron preincubados 1 hora con FeSO<sub>4</sub>/CuSO<sub>4</sub> (Fe<sup>2+</sup>/Cu<sup>2+</sup>; 10  $\mu$ M de cada uno; **A-C**) o 20 mM de 1,10-fenantrolina (1,10-PHEN; **D**). Durante esta preincubación las células fueron tratadas con la dosis indicadas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, en presencia o ausencia de 25 mM de aminotriazol (AMT; **A**), con las dosis indicadas de benzilamina (BENZ) o tiramina (TYR), con la adición de 25 mM de aminotriazol (AMT) y 10  $\mu$ M de vanadato (VAN), donde indicamos (**B** y **C**), y las células fueron tratados con 25 mM aminotriazol (AMT) y 10  $\mu$ M de vanadato (VAN), en presencia o ausencia de 200  $\mu$ M de benzilamina (BENZ) o 2 mM de tiramina (TYR) o 10  $\mu$ M de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (D). Después, las células fueron incubadas con 1  $\mu$ g/100 U de LPS/IFN- $\gamma$  por ml durante 18 horas. La expresión de la NOS2 en los lisados celulares fue analizada mediante Western blotting.

La adición de aminotriazol y vanadato no modifica la expresión de la NOS2 inducida por LPS/IFN- $\gamma$  (**Figura 31**).

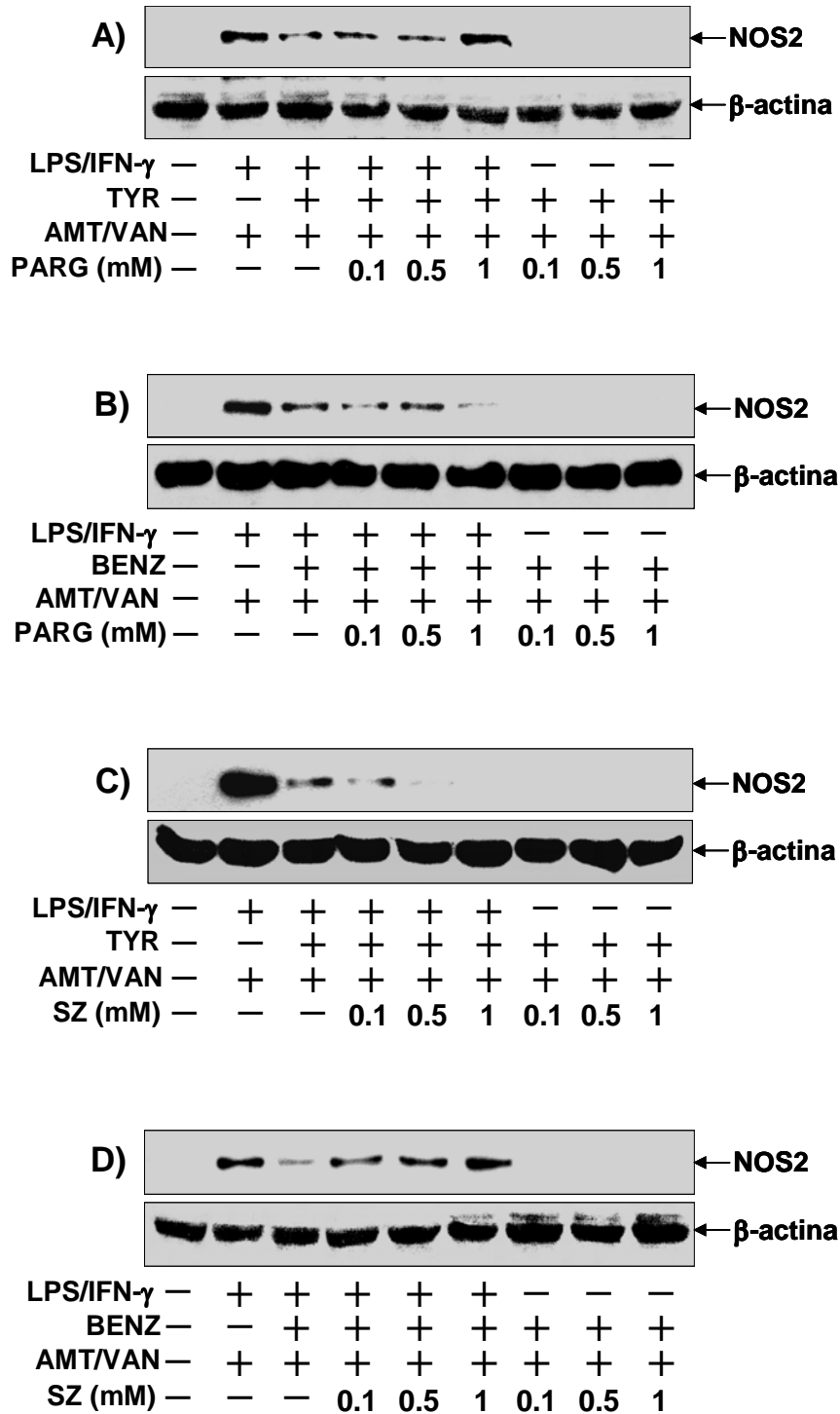


**Figura 31. Controles del aminotriazol y el vanadato sobre la expresión de la NOS2 en macrófagos.** Las células fueron preincubadas con 25 mM de aminotriazol (AMT), o/y 10  $\mu$ M de vanadato (VAN), 1 hora antes de la adición de LPS/IFN- $\gamma$ , donde indicamos, durante 18 horas. Entonces, las células fueron lisadas y la expresión de la NOS2 se analizó por Western blotting.

Estos resultados sugieren que la reducción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> intracelular a otras especies reactivas de oxígeno, como es el  $\cdot$ OH, constituye un mecanismo eficiente en el control de la expresión de la NOS2.

Para comprobar la especificidad del efecto negativo de los sustratos de monoaminas oxidasas sobre la expresión de la NOS2, se examinó el efecto de inhibidores específicos de la MAO-A/B y SSAO, pargilina y semicarbazida, respectivamente, sobre la expresión de la NOS2. Se encontró que la pargilina cancela completamente el efecto inhibitor de la MAO sobre la expresión de la NOS2, Tras la activación del enzima por tiramina (**Figura 32 A**) y recíprocamente, la semicarbazida previene el efecto negativo de la activación de la SSAO por benzilamina (**Figura 32 D**). El efecto de ambos inhibidores fue específico, dado que la pargilina no altera el efecto inhibitor provocado por la activación de la SSAO sobre la expresión de la NOS2 (**Figura 32 B**) y la semicarbazida no produce ningún efecto sobre la inhibición de la expresión de la NOS2 provocada por acción de la MAO-A/B (**Figura 32 C**).

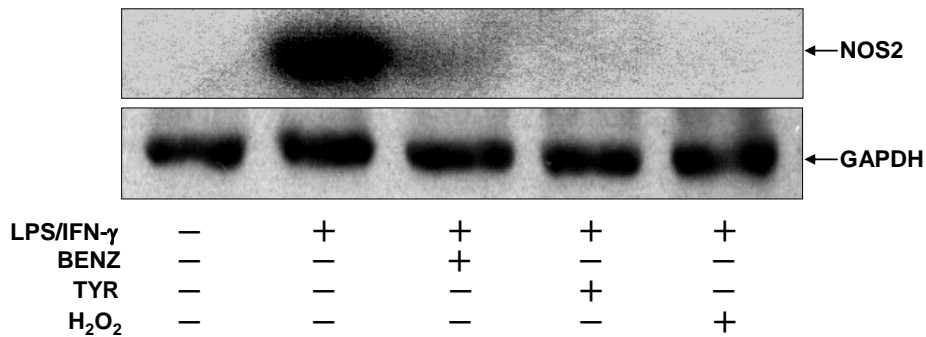




**Figura 32.** La inhibición de las monoaminas oxidasas previene la inhibición de la expresión de la NOS2 ejercida por los sustratos de monoaminas oxidasas en macrófagos. Los macrófagos fueron preincubados 1 hora con el inhibidor de la MAO-A/B, Pargilina (PARG; **A y B**) o de la SSAO, semicarbazida (SZ; **C y D**), en presencia de los respectivos sustratos, tiramina (TYR; 2 mM; **A y C**) o benzilamina (BENZ; 200 μM; **B y D**) y de 25 mM de aminotriazol (AMT) y 10 μM de vanadato (VAN). Entonces las células fueron incubadas con LPS/IFN-γ (1 μg/100 U por ml) durante 18 horas y la expresión de la NOS2 fue analizada mediante Western blotting.

**II.4. Los sustratos de monoaminas oxidasas y el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inhiben la expresión de ARN mensajero de la NOS2 en macrófagos.**

Para analizar si el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y los sustratos de monoaminas oxidasas actúan también negativamente sobre la expresión del ARNm que codifica la NOS2, se llevaron a cabo análisis de Northern blotting tras 5 horas de tratamiento con estos compuestos. La **Figura 33** muestra como tanto la incubación de las células con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como con sustratos de monoaminas oxidasas, benzilamina o tiramina, cancela completamente la expresión del ARNm de la NOS2 inducida por LPS/IFN- $\gamma$ .



**Figura 33. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exógena o endógena, generada por monoaminas oxidasas, inhibe la expresión de la NOS2 a nivel de ARN mensajero en macrófagos.** Los macrófagos fueron cultivados durante 1 hora en presencia o ausencia de 3 mM de tiramina (TYR), 3 mM de benzilamina (BENZ) o 50  $\mu$ M de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Entonces, las células fueron cultivadas en presencia de LPS/IFN- $\gamma$  (1  $\mu$ g/100 U por ml) durante 5 horas y los niveles de ARNm de la NOS2 fueron analizados mediante Northern blotting. Para verificar las cantidades de ARNm cargados, se rehibridó la membrana con una sonda para la GAPDH.

### **III. DISCUSIÓN.**

Los procesos intracelulares que son producidos por estrés oxidativo, son hoy en día un centro de atención de intenso estudio. El presente trabajo demuestra, por primera vez, que la expresión de la NOS2 inducida por LPS/IFN- $\gamma$ , en macrófagos peritoneales de rata es fuertemente inhibida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Es de señalar la alta sensibilidad de la expresión de la NOS2 al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, dado que la inhibición fue detectada claramente a dosis de tan solo 5-10  $\mu$ M. En la búsqueda de procesos biológicos implicados en la génesis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> intracelular, hemos mostrado aquí un papel singular para las monoaminas oxidasas MAO-A/B y SSAO, mediando la inhibición de la NOS2 en respuesta a aminas primarias.

Varias líneas de evidencias experimentales apoyan esta idea: (i) La tiramina y la benzilamina, sustratos de la MAO-A/B y SSAO respectivamente, producen un inhibición dosis-dependiente de la expresión de la NOS2 inducida por LPS/IFN- $\gamma$  (Figura 3 y Figura 4). (ii) Este efecto negativo de estos sustratos sobre la expresión de la NOS2 fue cancelado por pargilina y semicarbazida, inhibidores específicos de la MAO-A/B y SSAO respectivamente (Figura 7). (iii) Se presentan evidencias de que además de la MAO-A/B (37), la SSAO es expresada por los macrófagos (Figura 4D) y es una enzima funcionalmente activa, dado que en presencia de su sustrato específico, benzilamina, se produce H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> intracelular (Figura 4C). (iv) Finalmente el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, la tiramina y la benzilamina, fueron capaces, de forma separada, de cancelar la expresión de ARNm de la NOS2 inducida por LPS/IFN- $\gamma$  (Figura 8), que podría ser debida a inhibición de la transcripción o/a estabilidad del ARNm. Los resultados experimentales aquí expuestos refuerzan la hipótesis de que la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> media la inhibición de la expresión de la NOS2 dependiente de la MAO-A/B y de la SSAO, ya que ni el paraformaldehído, ni el amonio producen efectos negativos sobre este proceso. Dicha inhibición es potenciada por aminotriazol, el cual aumenta la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> intracelular mediante la inhibición de la catalasa. El hecho de que el efecto negativo del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sea potenciado por vanadato sugiere que la especie inhibidora que actúa sobre la expresión de la NOS2 es el peroxovanadato. También se presentan evidencias experimentales de que las especies reactivas de oxígeno responsables de la inhibición de la NOS2 son generadas a través de reacciones de Fenton.

Examinando los eventos que permiten la liberación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, está bien aceptado que la respuesta de los macrófagos a estimulación es fuertemente

potenciada por reacciones previas llamadas “priming” (primado o cebado). Dos agentes clásicos que producen el efecto de primado en macrófagos son el IFN- $\gamma$  y el LPS, aunque por diferentes mecanismos. En este ámbito, la inducción del estado de primado por linfoquinas es dependiente de la síntesis de proteínas (Cassatella et al., 1988). Sin embargo el primado inducido por LPS se correlaciona con la activación de respuestas dependientes de la proteína kinasa C, como es la liberación de ácido araquidónico (Aderem et al., 1988). No obstante, la complejidad de la interacción entre el LPS y el IFN- $\gamma$  se pone de manifiesto por el hecho de que la preexposición de macrófagos peritoneales de ratón durante 1 hora a trazas de LPS conduce a la incapacidad de respuesta de la células a IFN- $\gamma$ , como observamos por la liberación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tras la estimulación con PMA y que este estado de inhibición persiste al menos durante 4 días (Ding et al., 1987). Se ha sugerido, que una concentración elevada de AMPc en respuesta a la síntesis de prostaglandinas inducida por LPS podría ser la causa de ese estado inhibitorio. En esta línea de evidencias, también ha sido demostrado que la expresión de IL-8 inducida por LPS es regulada negativamente por el tratamiento de granulocitos por IFN- $\gamma$  (Cassatella et al, 1995).

La mayoría de los estudios han optado por analizar las condiciones bajo las cuales la liberación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al medio extracelular es llevada a cabo por macrófagos primados ó activados, y se conoce mucho acerca de los mecanismos mediante los cuales se lleva a cabo la liberación en células fagocíticas en respuesta a estímulos solubles (Halliwell et al., 1987). Sin embargo el conocimiento de sistemas endógenos generadores de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, otros distintos de la superóxido dismutasa, y de los mecanismos potenciales que regulan dichos sistemas, está limitado por la inaccesibilidad a los gránulos subcelulares o membranas a los detectores estándares de especies reactivas de oxígeno (Hampton et al. 1998). Usando citoplastos de neutrófilos, los cuales carecen de gránulos, pero contienen un mecanismo intacto de receptor-ligando, ha sido demostrado, que el fMLP, el cual actúa a través de receptores de membrana, promueve la liberación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Sin embargo la ionomicina, la cual no requiere de receptores de la superficie celular, estimula la generación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que es retenida dentro de las células (Dahlgren et al., 1989). Por lo tanto, puede deducirse la existencia de almacenes diferencialmente regulados de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Sin embargo es interesante para el trabajo presente, que la presencia simultanea de LPS y IFN- $\gamma$ , en contraposición con la liberación de especies reactivas de oxígeno, induce la síntesis de NOS2 en macrófagos, de forma sinérgica con la generación de altos niveles de NO (Ding et al., 1988; Xie et al., 1992). De estos estudios se concluye que las rutas que

llevan a la liberación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> extracelular y NO son independientes. En esta línea, las presentes observaciones son un argumento a favor de la hipótesis de que la regulación de la síntesis de NOS2 es fundamentalmente regulada por los almacenes intracelulares de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Sin embargo, hemos de reconocer que el papel de los oxidantes sobre la liberación de NO y la expresión de la NOS2 en macrófagos y otras células, sigue siendo un capítulo controvertido. Por un lado, algunos autores han descrito que diferentes antioxidantes cuando actúan sobre líneas celulares de ratón, tales como las RAW 264.7 (macrófagos) (Hecker et al., 1996) o las J 774.1 (también macrófagos) (Ippoushi et al., 2003), así como células neuronales (Floyd et al., 2000), inhiben fuertemente la expresión de la NOS2 inducida por LPS/IFN- $\gamma$ . También se ha descrito un efecto estimulador directo del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre la síntesis de NOS2 por las RAW 264.7 y por macrófagos peritoneales de ratón (Han et al., 2001). Hasta el momento, carecemos de una explicación clara para esos resultados, aparentemente opuestos a los nuestros usando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como reactivo prooxidante, aunque existen varias diferencias metodológicas con el trabajo de Han y colaboradores (Han et al., 2001). Primero, ellos trabajan principalmente con RAW 264.7, y en los experimentos llevados a cabo en macrófagos peritoneales, el ratón BALB/c fue primado previamente por inyección con tioglicolato. Sin embargo en nuestro caso solo se usaron macrófagos peritoneales residentes. En segundo lugar, estos autores no descartan las células contaminantes después del lavado peritoneal (mastocitos). Finalmente, los modelos animales utilizados (la rata en nuestros estudios y el ratón en los suyos) fueron diferentes. En oposición con estos datos y en línea con los datos que aportamos, ha sido descrito previamente que bajo condiciones prooxidantes, como son la depleción del glutatión reducido en macrófagos y hepatocitos (Buchmuller-Rouiller et al., 1995), usando L-DOPA como agente oxidante en células gliales (Soliman et al., 2001) ó con la adición directa de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a los macrófagos (McBride et al., 1999), se produce un fuerte descenso en la expresión de la NOS2 y en la producción de NO.

En conclusión, parece que el uso de diferentes condiciones experimentales y de diferentes líneas celulares da como resultado una amplia gama de respuestas al equilibrio redox, a menudo contradictorias en lo que se refiere a la expresión de la NOS2.

Aunque la presencia de la MAO-A/B en macrófagos ha sido descrita anteriormente, no existen datos disponibles sobre la expresión de la SSAO/VAP-1 en estas células, los cuales han sido aportados por este trabajo. Además de su función como enzima metabolizante de de aminas (Callingham et al., 1991), otras funciones

fisiológicas de la SSAO/VAP-1 se están empezando a conocer. Recientemente, se ha observado que la SSAO/VAP-1 trabaja en las fases iniciales de la cascada de adhesión celular, como freno molecular, y regulando la extravasación de los granulocitos durante la inflamación peritoneal (Tohka et al., 2001). Existen varios desórdenes inflamatorios en los cuales parecen tener un papel activo las monoaminas oxidasas. Por ejemplo, la SSAO/VAP-1 es expresada fuertemente en las vénulas del endotelio alto de membranas sinoviales inflamadas (Salmi et al., 1992). Es interesante que varias drogas de uso clínico (e.j. el antimicrobiano isoniacida, y el antihipertensivo hidralazina) son conocidos por inhibir la actividad de la SSAO (Jalkanen et al., 2001). Esto relacionaría de una forma indirecta dos de las propiedades del NO con la actividad de la SSAO. Sin embargo, en la mayoría de los casos se desconoce la contribución de la inhibición de la SSAO a esos procesos biológicos.

Ha sido descrito anteriormente, que se produce una síntesis de monoaminas en el cerebro durante la inflamación aguda de garra inducida por carragenato (Bhattacharya et al., 1988). Existen evidencias de que en la diabetes, la actividad de la SSAO soluble puede causar lesiones aterogénicas típicas de esta enfermedad, por la liberación continuada de aldehídos y especies reactivas de oxígeno derivados de sus sustratos (Yu et al., 1998). Se ha demostrado que en células intactas se produce  $H_2O_2$  en respuesta a incubación con tiramina y que la producción de  $H_2O_2$  se ve inhibida por inhibidores específicos de monoaminas oxidasas (Pizzinat et al., 1999).

Todos estos resultados nos llevan a concluir que los procesos inflamatorios están asociados con un incremento en la producción de aminas endógenas y con la consiguiente activación de monoaminas oxidasa.

El significado fisiológico potencial de la relación descrita entre el estrés oxidativo provocado por la MAO-A/B/SSAO y el NO es desconocido. Está muy establecido que en la respuesta inflamatoria, muchos de los tipos celulares que producen especies reactivas de oxígeno también expresan la NOS2, y que en muchos casos la interacción entre agentes nitrosantes y oxidantes, puede generar productos que son más tóxicos que los mismos por separado (Marshall et al., 2000). En este sentido, ha sido sugerido que el balance entre la generación de NO y  $O_2^-$  es un determinante crítico en el desarrollo de muchos desordenes inflamatorios (Darley-Usmar et al., 1995). En este contexto, se puede sugerir que la inhibición de la síntesis de NO por  $H_2O_2$  y/u otras especies reactivas de oxígeno puede constituir un mecanismo citoprotector contra las consecuencias negativas para la célula de la

activación de monoaminas oxidasas, lo cual proporciona un nuevo papel fisiológico a esta familia enzimática.





REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN  
DEPENDIENTE DE IgE DEL GEN  
DE LA COX-2 POR ESPECIES  
REACTIVAS DE OXÍGENO EN  
NEUTRÓFILOS HUMANOS



## **I. RESUMEN.**

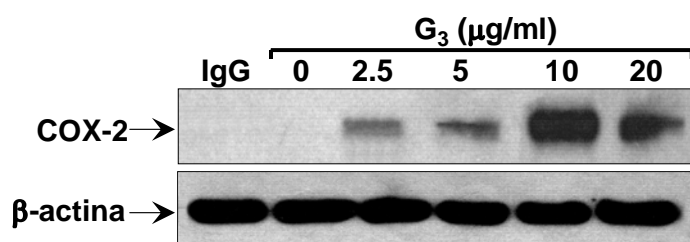
La ciclooxigenasa (COX) es una enzima clave en la síntesis de prostaglandinas. La regulación de la expresión de su isoforma COX-2 es responsable del incremento de prostaglandinas que tiene lugar durante condiciones inflamatorias, y también está involucrada en las enfermedades alérgicas. En el trabajo presente demostramos que la expresión de la COX-2 se induce fuertemente en neutrófilos de pacientes alérgicos cuando estos son expuestos a anticuerpos anti-IgE o a alérgenos a los cuales el paciente está sensibilizado. Esta inducción fue detectada tanto a nivel de ARNm como de proteína y fue acompañada por la liberación de prostaglandina E<sub>2</sub>. También mostramos evidencias de que inhibidores específicos de la NADPH oxidasa, como son el HMAP y AEBSF, inhiben completamente la expresión de la COX-2 dependiente IgE, sugiriendo que este proceso está mediado por especies reactivas de oxígeno derivadas de la actividad de la NADPH oxidasa. Además las MAP quinasas (MAPKs), p38 y ERK y el factor de transcripción NF-κB también están implicados en la regulación de la expresión de la COX-2, puesto que inhibidores específicos de esas dos quinasas, como son el SB03580 y el PD098059, y de la ruta de NF-κB, como el MG132, inhiben la expresión de la COX-2 dependiente de IgE. También se presentan evidencias de que el radical ·OH generado a través de reacciones de Fenton a partir del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, puede constituir un posible candidato capaz de regular la expresión de la COX-2 dependiente de IgE a través de MAPKs y NF-κB. Los resultados expuestos muestran un nuevo papel para las especies reactivas de oxígeno como segundos mensajeros en la regulación de la expresión de la COX-2 en neutrófilos humanos durante las reacciones alérgicas.



## II. RESULTADOS.

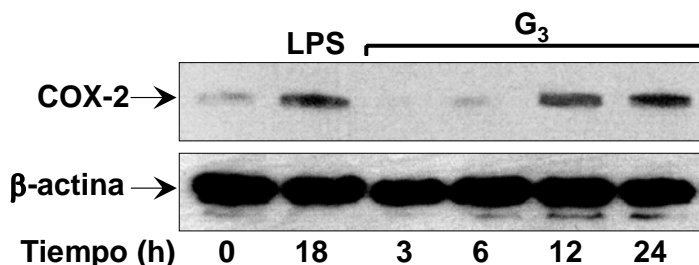
### II.1. Inducción de la expresión de la COX-2 por alergenios específicos y anticuerpos anti-IgE en neutrófilos de pacientes alérgicos.

Para evaluar el papel potencial de los alergenios como inductores de la expresión de la COX-2, neutrófilos aislados de pacientes alérgicos específicamente sensibilizados a G<sub>3</sub> fueron cultivados en presencia de este alergenio y la expresión de la COX-2 fue analizada por Western blotting. La **Figura 34** muestra que mientras que la expresión de la COX-2 fue indetectable en neutrófilos no estimulados, tras la estimulación de los neutrófilos con G<sub>3</sub>, esta proteína fue expresada de manera dependiente de dosis y de tiempo. La expresión máxima de la COX-2 se obtuvo a 10 µg/ml del alergenio G<sub>3</sub> (**Figura 34**).



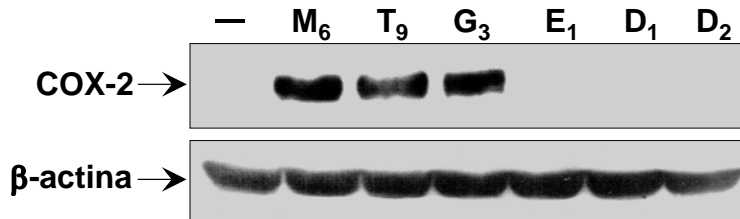
**Figura 34.** Inducción de la expresión de la COX-2 dependiente de dosis del alergenio G<sub>3</sub> en neutrófilos de pacientes alérgicos a ese antígeno. Los neutrófilos de un paciente alérgico sensible a G<sub>3</sub> fueron cultivados con este alergenio a las dosis indicadas, durante 24 horas. La expresión de la COX-2 fue analizada por Western blotting. La β-actina fue utilizada como control interno para asegurar que fue cargada la misma cantidad de proteínas por calle.

Dosis a la cual, la expresión de la COX-2 fue detectada claramente a las 6 horas de tratamiento, alcanzando su pico de expresión a las 24 horas (**Figura 35**).



**Figura 35.** Cinética de Inducción de la expresión de la COX-2 dependiente de alergenio G<sub>3</sub> en neutrófilos de pacientes alérgicos a ese antígeno. Los neutrófilos de un paciente alérgico sensibilizado a G<sub>3</sub> fueron cultivados durante los tiempos indicados (hasta 24 horas) con una concentración de 10 µg/ml de G<sub>3</sub>. Las células fueron lisadas y la expresión de la COX-2 fue analizada por Western blotting.

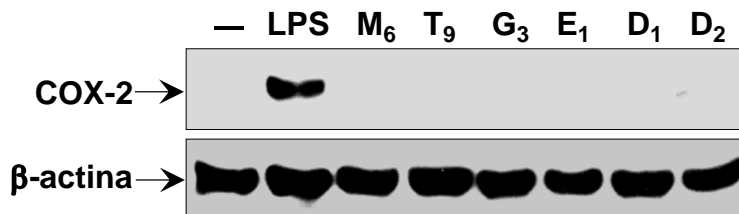
Este tipo de respuesta fue observada en todos los pacientes estudiados. El alérgeno al cual el paciente está sensibilizado, induce la expresión de la COX-2 en neutrófilos cuando estos son cultivados con dicho alérgeno. La **Figura 36** muestra que, en neutrófilos de un paciente con altos niveles séricos de IgE específica para M<sub>6</sub>, T<sub>9</sub> y G<sub>3</sub> y alta reactividad en los test cutáneos para esos alérgenos, la expresión de la COX-2 fue inducida cuando se cultivaron las células en presencia de estos alérgenos.



**Figura 36. Especificidad de la inducción de la COX-2 en respuesta a antígenos alérgicos en neutrófilos de pacientes alérgicos.** Los neutrófilos de un paciente alérgico sensibilizado a M<sub>6</sub>, T<sub>9</sub> y G<sub>3</sub> e insensible a E<sub>1</sub>, D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub>, fueron cultivados con todos estos antígenos a una concentración de 10 μg/ml durante 24 horas. La expresión de la COX-2 fue analizada mediante Western blotting.

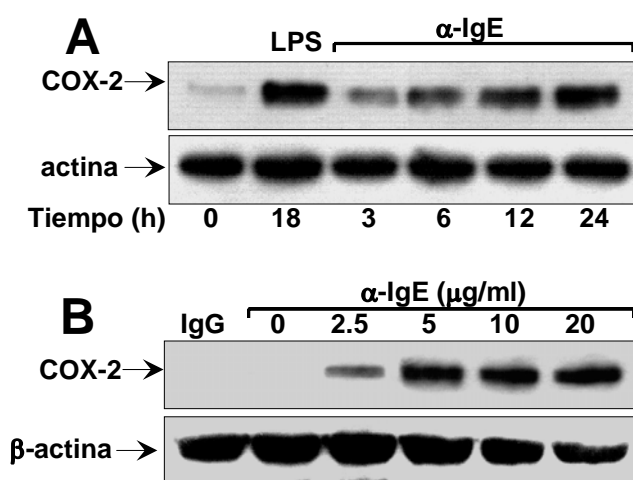
Sin embargo, cuando las células fueron cultivadas con alérgenos a los que el paciente no estaba sensibilizado (no presentan niveles séricos de IgE específica para esos alérgenos, ni reactividad en los test cutáneos), la expresión de la COX-2 no fue detectada (**Figura 36**).

La especificidad de esta respuesta fue comprobada en neutrófilos de sujetos sanos, en las cuales la expresión de la COX-2 no fue inducida por ninguno de estos alérgenos (**Figura 37**).



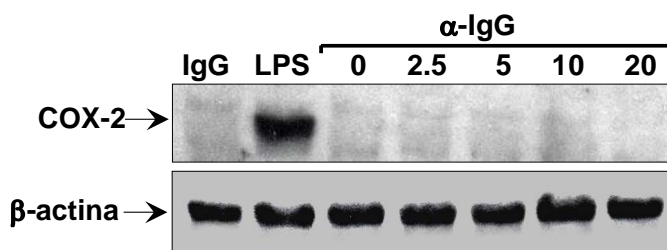
**Figura 37. Especificidad de la inducción de la COX-2 en respuesta a antígenos alérgicos en neutrófilos de sujetos sanos.** Los neutrófilos de un sujeto sano fueron cultivados con los siguientes antígenos: M<sub>6</sub>, T<sub>9</sub>, G<sub>3</sub>, E<sub>1</sub>, D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub>, a una concentración de 10 μg/ml durante 24 horas. La expresión de la COX-2 fue analizada por Western blotting. La β-actina se utilizó como control interno para comprobar que fue cargada la misma cantidad de proteínas por calle.

Sin embargo la expresión de la COX-2 fue inducida por LPS, un potente inductor de la expresión de la COX-2 en estas células (21). Se llevaron a cabo estudios adicionales para analizar si anticuerpos anti-IgE podrían inducir la expresión de la COX-2 en pacientes alérgicos. Se encontraron resultados similares a los obtenidos con alergenos cuando utilizamos anti-IgE como estímulo (**Figura 38**). La IgG inespecífica, la cual no tuvo ningún efecto, se utiliza como control negativo del fragmento Fc del anticuerpo anti-IgE, el cual es un anticuerpo IgG que tiene especificidad para la IgE.



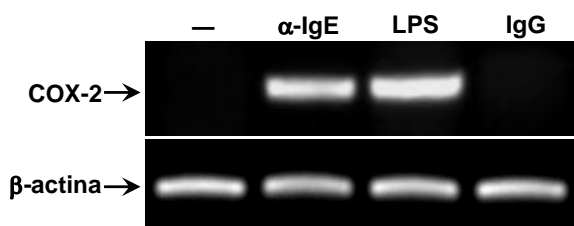
**Figura 38. Inducción de la expresión de la COX-2 por anticuerpos anti-IgE en neutrófilos de pacientes alérgicos.** (A) Los neutrófilos de un paciente alérgico fueron cultivados con 10 µg/ml de anti-IgE (α-IgE) durante los tiempos indicados y con 1 µg/ml de LPS durante 18 horas. (B) Los neutrófilos de un paciente alérgico fueron cultivados a las dosis indicadas con anti-IgE o IgG (10 µg/ml) durante 24 horas. La expresión de la COX-2 fue analizada por Western blotting. La β-actina se utilizó como control interno para comprobar que fue cargada la misma cantidad de proteínas por calle.

Además, en ningún caso la expresión de la COX-2 fue inducida cuando los neutrófilos de paciente alérgico fueron tratados con anti-IgG (**Figura 39**).



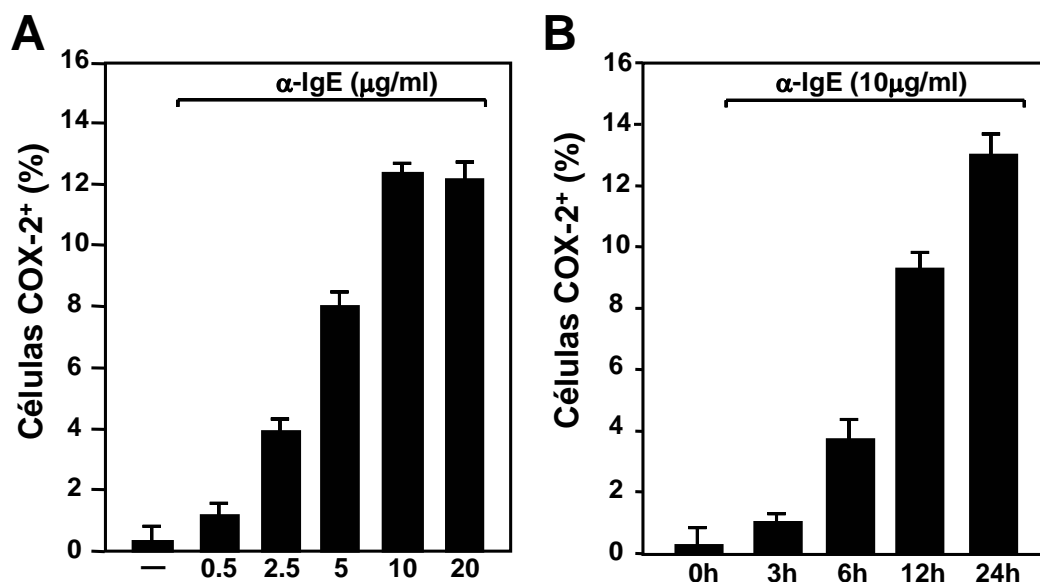
**Figura 39. Anticuerpos anti-IgG no inducen la expresión de la COX-2 en neutrófilos de pacientes alérgicos.** Los neutrófilos de un paciente alérgico fueron cultivados a las dosis indicadas con anti-IgG (α-IgG) durante 24 horas. La expresión de la COX-2 fue analizada por Western blotting. La β-actina se utilizó como control interno para comprobar que fue cargada la misma cantidad de proteínas por calle.

Análisis adicionales usando el método de RT-PCR muestran que la expresión del ARNm que codifica la COX-2 se induce en neutrófilos de pacientes alérgicos después de su tratamiento con anti-IgE y que sin embargo fue indetectable cuando las células fueron tratadas con anticuerpos IgG inespecíficos (**Figura 40**). La IgG inespecífica, se utiliza como control negativo del fragmento Fc del anticuerpo anti-IgE, el cual es un anticuerpo IgG que tiene especificidad para la IgE.



**Figura 40.** Anticuerpos anti-IgE inducen la expresión de la COX-2 a nivel de ARN mensajero en neutrófilos de pacientes alérgicos. Los neutrófilos de un paciente alérgico fueron cultivados con anti-IgE ( $\alpha$ -IgE; 10  $\mu$ g/ml), LPS (1  $\mu$ g/ml) o IgG (10  $\mu$ g/ml) donde indicamos, durante 5 horas y el ARNm que codifica la COX-2 fue analizado mediante RT-PCR.

Para asegurarnos de la existencia de este mecanismo dependiente de IgE en la expresión de la COX-2 en neutrófilos, analizamos por citometría de flujo neutrófilos de pacientes alérgicos tratados con anticuerpos anti-IgE. Se obtuvieron resultados similares a los obtenidos por Western Blotting (**comparar Figuras 41 y 38**).



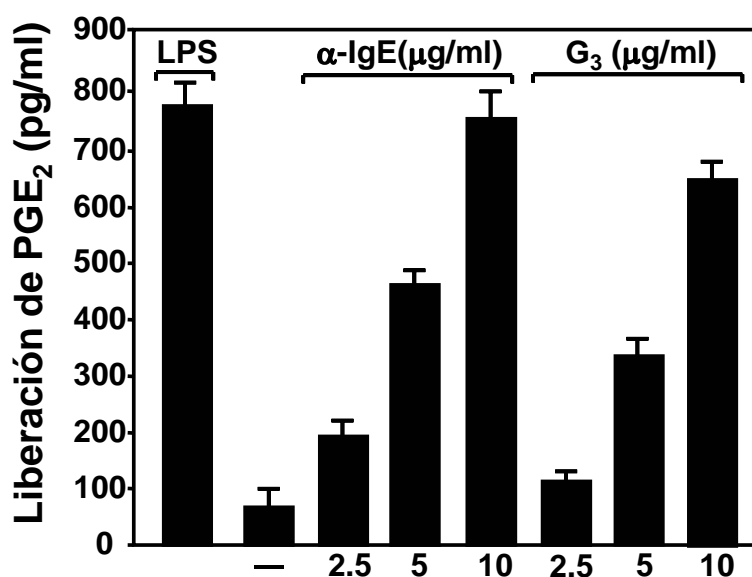
**Figura 41.** Análisis de la expresión de la COX-2 dependiente IgE por citometría de flujo en neutrófilos de pacientes alérgicos. (A) Los neutrófilos de un paciente alérgico fueron cultivados a las dosis indicadas de anti-IgE ( $\alpha$ -IgE) durante 24 horas. (B) Los neutrófilos de un paciente alérgico fueron cultivados los tiempos indicados con anti-IgE (10  $\mu$ g/ml). Tanto en A, como en B, la expresión de la COX-2 fue analizada por citometría de flujo.



## II.2. Liberación de PGE<sub>2</sub> inducida por alérgenos y anticuerpos anti-IgE por neutrófilos de pacientes alérgicos.

Para determinar si alérgenos específicos son capaces de inducir la liberación de PGE<sub>2</sub>, neutrófilos de un paciente sensibilizado a G<sub>3</sub> fueron cultivados con diferentes dosis de este alérgeno o anticuerpos anti-IgE durante 24 horas, y los niveles de PGE<sub>2</sub> fueron medidos en el sobrenadante del cultivo. Cuando las células fueron expuestas al alérgeno, los niveles de PGE<sub>2</sub> se incrementaron de 4 a 5 veces por encima de los niveles basales medidos en células sin estimular (**Figura 42**).

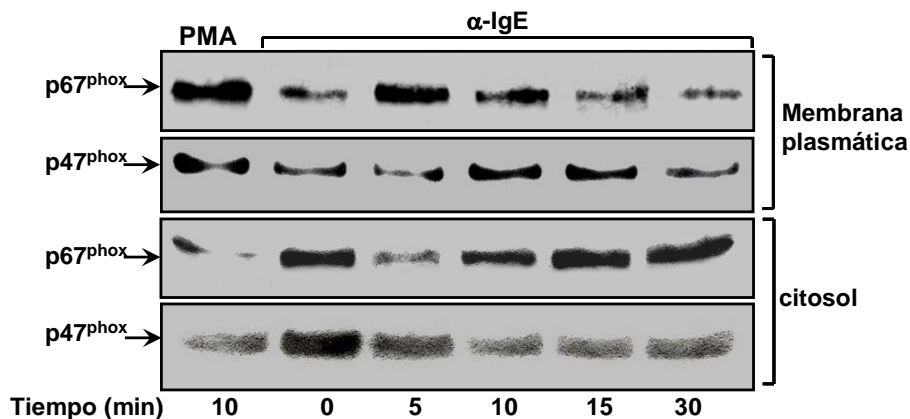
Este incremento fue dependiente de la dosis de G<sub>3</sub>, obteniendo un máximo en la liberación de PGE<sub>2</sub> a 10 µg/ml de G<sub>3</sub> o 10 µg/ml de anti-IgE durante 24 horas. El LPS, un potente inductor de la expresión de la COX-2 en neutrófilos humanos, produce una liberación de PGE<sub>2</sub> similar a la que produce los anticuerpos anti-IgE (**Figura 42**). Se obtuvieron respuestas similares en otros alérgenos testados, como son D<sub>1</sub> ó E<sub>1</sub>, en pacientes específicamente sensibilizados a estos alérgenos.



**Figura 42. Producción de PGE<sub>2</sub> dependiente de IgE por neutrófilos de pacientes alérgicos.** Los neutrófilos de un paciente alérgico fueron cultivados con un antígeno específico al cual estaba sensibilizado el paciente (G<sub>3</sub>) a las dosis indicadas, anti-IgE (α-IgE) a las dosis indicadas, o LPS (1 µg/ml) durante 24 horas y los niveles de PGE<sub>2</sub> fueron determinados en el sobrenadante de cultivo usando un ELISA específico para la PGE<sub>2</sub>. Los valores mostrados son la media ± S.E. de 3 ensayos independientes en los cuales cada medida fue llevada a cabo por triplicado. Se obtuvieron resultados similares en al menos 3 otros casos estudiados.

### II.3. Papel de la NADPH oxidasa en el control de la expresión de la COX-2 dependiente de IgE en neutrófilos de pacientes alérgicos.

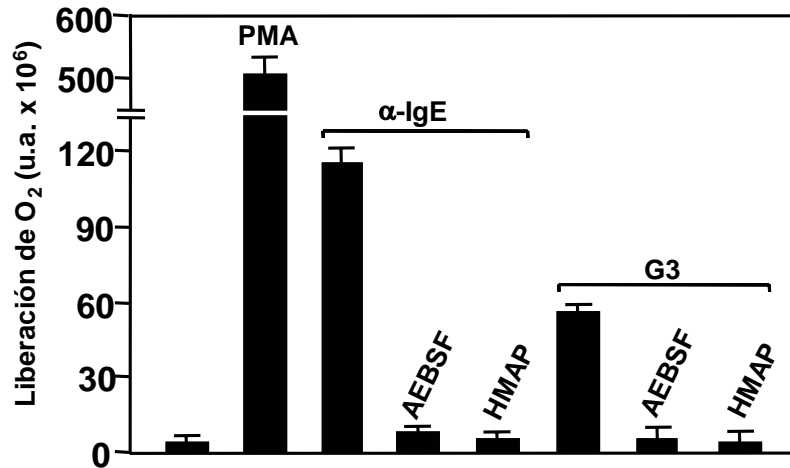
Los radicales libres de oxígeno son reconocidos como segundos mensajeros en la regulación de la expresión de genes en una gran variedad de células del sistema inmune (Barbieri et al., 2003, Monteseirín et al., 2004, Álvarez-Maqueda et al., 2004). Para evaluar la posible implicación de las especies reactivas de oxígeno derivadas de la NADPH oxidasa en la expresión de la COX-2 dependiente de IgE, primero comprobamos que existía una activación dependiente de IgE del complejo de la NADPH oxidasa, observando la translocación de sus subunidades citosólicas, p47<sup>phox</sup> y p67<sup>phox</sup>, a la membrana plasmática tras el tratamiento con anti-IgE. Como se muestra en la **Figura 43**, los anticuerpos anti-IgE inducen una clara translocación a la membrana plasmática de la p47<sup>phox</sup> y la p67<sup>phox</sup>, con la consecuente desaparición de estas subunidades de la fracción citosólica. El PMA se fue usado como control positivo de la activación del sistema NADPH oxidasa (El Bekay et al., 2002, El Bekay 2003).



**Figura 43. Activación dependiente de IgE de la NADPH oxidasa en neutrófilos de pacientes alérgicos.** Los neutrófilos de un paciente alérgico fueron cultivados con anti-IgE ( $\alpha$ -IgE; 10  $\mu$ g/ml) durante los tiempos indicados, o con 100 nM de PMA durante 10 minutos. La presencia de las subunidades de la NADPH oxidasa (p47<sup>phox</sup> y p67<sup>phox</sup>) fue analizada tanto en la fracción de membrana como en la citosólica por Western blotting.

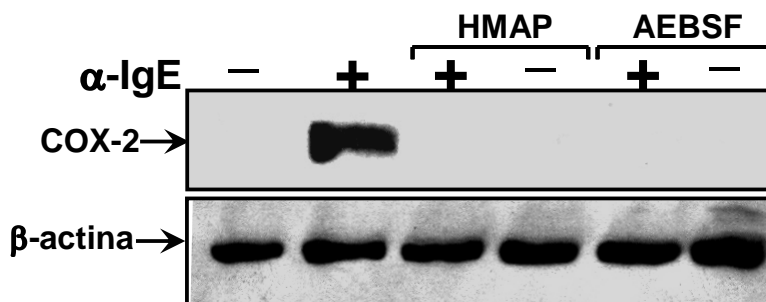
Segundo, como se muestra en la **Figura 44**, encontramos que tras el tratamiento con anticuerpos anti-IgE o alergenos específicos, el complejo fue funcionalmente activo en la producción de especies reactivas de oxígeno, y que esta activación fue cancelada por inhibidores específicos de la NADPH oxidasa, como son el HMAP, el cual compite con el NADPH por el sitio de unión a la oxidasa (Satriano et

al., 1994), y el AEBSF, el cual bloquea el anclaje de las subunidades de la NADPH oxidasa a la membrana plasmática (Diatchuk et al., 1997). El PMA se fue usado como control positivo de la activación del sistema NADPH oxidasa (El Bekay et al., 2002; El Bekay et al., 2003; Li et al., 2002).



**Figura 44. Producción de O<sub>2</sub><sup>-</sup> dependiente de IgE por neutrófilos de pacientes alérgicos. Implicación de la NADPH oxidasa.** Los neutrófilos de un paciente alérgico fueron preincubados, donde indicamos, con 500 μM de AEBSF o 500 μM de HMAP durante 30 minutos antes de la adición de anti-IgE (α-IgE; 10 μg/ml), G<sub>3</sub> (10 μg/ml) o 100 nM de PMA, todos ellos durante 10 minutos. Los resultados expresan el pico de producción de O<sub>2</sub><sup>-</sup> encontrado a los 10 minutos de exposición de tres experimentos separados.

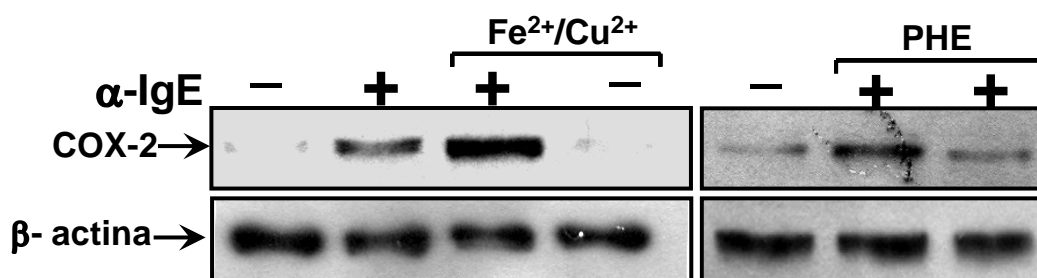
Para confirmar la implicación de las especies reactivas de oxígeno liberadas del sistema de la NADPH oxidasa en la expresión dependiente de IgE de la COX-2, analizamos el efecto de estos dos inhibidores (HMAP y AEBSF) sobre dicha expresión. Como muestra la **Figura 45**, el HMAP y AEBSF cancelan completamente la expresión de la COX-2 dependiente de IgE.



**Figura 45. Implicación de la NADPH oxidasa en la expresión de la COX-2 dependiente de IgE en neutrófilos de pacientes alérgicos.** Los neutrófilos de un paciente alérgico fueron preincubados con 500 μM de AEBSF o 500 μM de HMAP 30 minutos antes de la adición de anti-IgE (α-IgE; 10 μg/ml) donde indicamos, durante 24 horas. La expresión de la COX-2 fue analizada mediante Western blotting. La β-actina se utilizó como control interno para comprobar que fue cargada la misma cantidad de proteínas por calle.

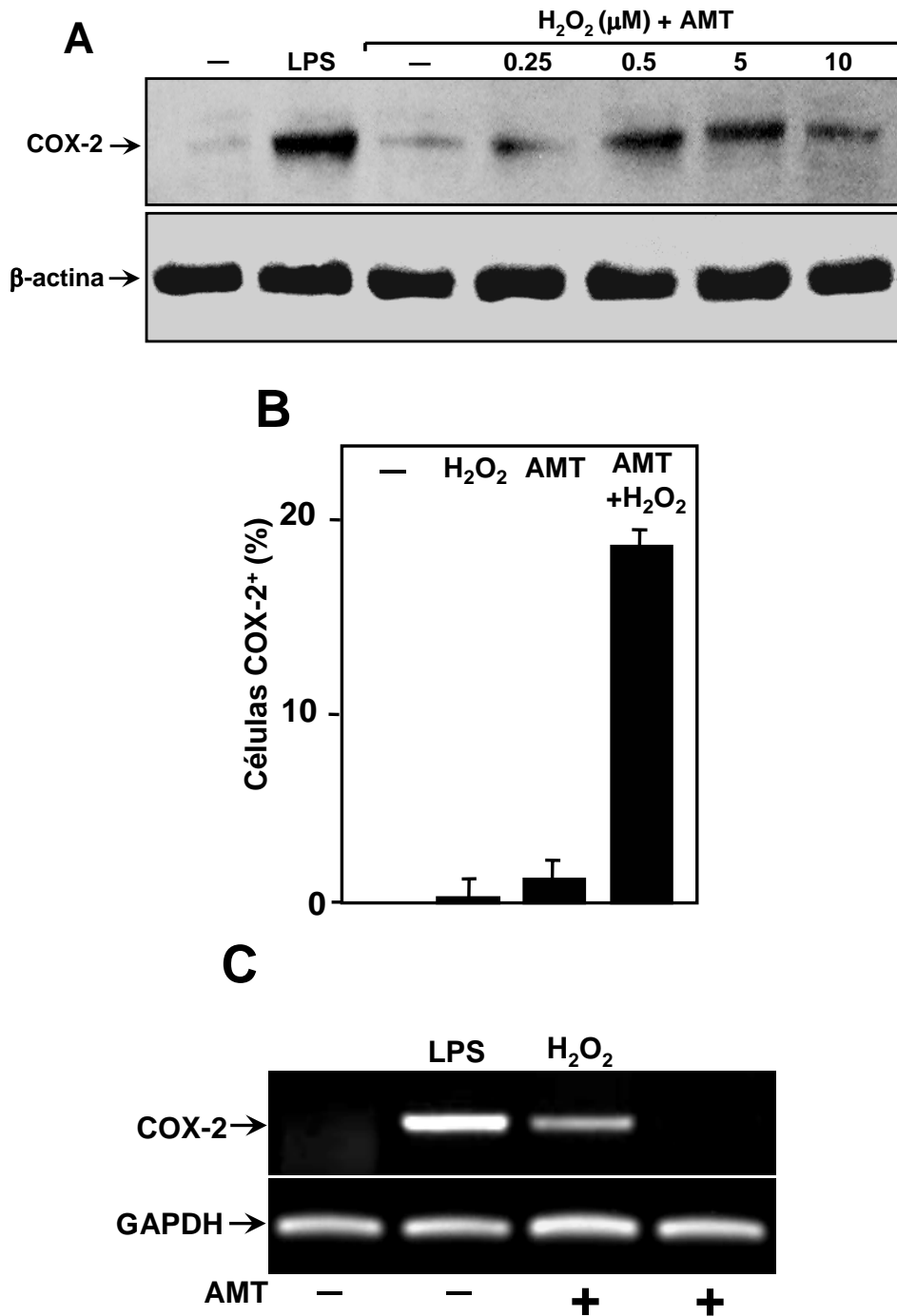
#### II.4. El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y especies reactivas de oxígeno derivados de la reacción de Fenton están implicados en la expresión de la COX-2 en neutrófilos.

Tras su difusión a través de la membrana plasmática, el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> puede ser convertida en otras especies reactivas de oxígeno, como son los radicales libres de oxígenos, O<sub>2</sub><sup>-</sup> y ·OH. La mayor fuente intracelular de producción de radicales ·OH, es a través de la reacción de Fenton, en la cual se produce la reducción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por iones Fe<sup>2+</sup> (Halliwell et al., 1992) y Cu<sup>2+</sup> (Gunther et al., 1995), de acuerdo con la siguiente reacción: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + Fe<sup>2+</sup>/Cu<sup>2+</sup> → ·OH + OH<sup>-</sup> + Fe<sup>3+</sup>/Cu<sup>3+</sup>. La **Figura 46** muestra como la adición exógena de FeSO<sub>4</sub>/CuSO<sub>4</sub> produce un fuerte incremento de la expresión de la COX-2 dependiente de IgE, aunque sin efectos por si mismos, y que el quelante de Fe<sup>2+</sup>/Cu<sup>2+</sup>, 1,10-fenantrolina, inhibe la expresión de la COX-2 inducida por anti-IgE.



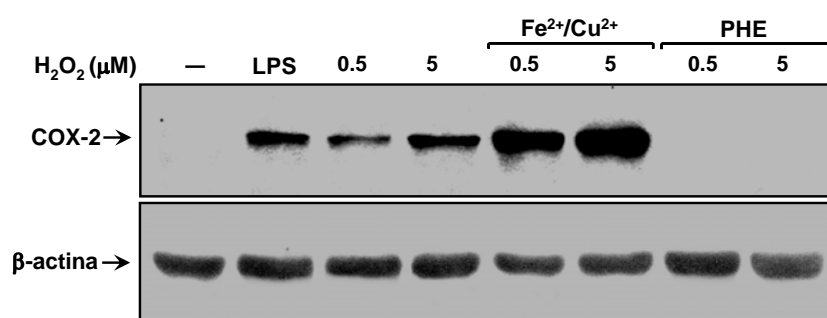
**Figura 46. Implicación de especies reactivas de oxígeno derivadas de la reacción de Fenton en la expresión de la COX-2 dependiente de IgE en neutrófilos de pacientes alérgicos.** Los neutrófilos de un paciente alérgico fueron cultivados con 10 µg/ml de anti-IgE (α-IgE) durante 24 horas, previa incubación de estos con FeSO<sub>4</sub>/CuSO<sub>4</sub> (Fe<sup>2+</sup>/Cu<sup>2+</sup>; 20 µM de cada uno) o 1,10-fenantrolina (PHE, 20 µM) durante 30 minutos. La expresión de la COX-2 fue analizada por Western blotting. La β-actina se utilizó como control interno para comprobar que fue cargada la misma cantidad de proteínas por calle.

Todos estos datos muestran que especies reactivas de oxígeno derivadas de la NADPH oxidasa, posiblemente con ·OH como mediador, están involucrados en la expresión de la COX-2 dependiente de IgE. Para confirmación el papel de las especies reactivas de oxígeno en la expresión de la COX-2, analizamos el efecto del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> añadido exógenamente, en este proceso. Se encontró que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por si misma induce la expresión de la COX-2 de forma dependiente dosis y que esta inducción fue a nivel de proteína y ARNm (**Figura 47**).



**Figura 47.** El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induce la expresión de la COX-2 a nivel de proteína y de ARN mensajero en neutrófilos humanos. **(A)** Los neutrófilos fueron cultivados con o sin aminotriazol (AMT; 25 mM) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a las dosis indicadas, durante 24 horas y la expresión de la COX-2 fue analizada mediante Western blotting. **(B)** Los neutrófilos fueron cultivados con aminotriazol (AMT; 25 mM) y/o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 24 horas y la expresión de la COX-2 fue analizada por citometría de flujo. **(C)** Los neutrófilos fueron cultivadas con aminotriazol (AMT; 25 mM) o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (5 μM) con aminotriazole (25 mM) durante 5 horas y los niveles del ARNm que codifica la COX-2 fueron analizados mediante RT-PCR. La β-actina

Para la detección del efecto estimulador del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fue necesaria la adición simultánea de aminotriazol al medio de cultivo (**Figura 47**), inhibidor de la catalasa, enzima destoxicante de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Prasad et al., 1997). Después, analizamos qué especies químicas derivadas del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a través de la reacción de Fenton, podrían actuar como reguladoras de la expresión de la COX-2. Como se muestra en la **Figura 48**, la presencia de iones Fe<sup>2+</sup>/Cu<sup>2+</sup>, incrementan notablemente la expresión de la COX-2 inducida por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Sin embargo el quelante de Fe<sup>2+</sup>/Cu<sup>2+</sup>, 1,10-fenantrolina, cancela completamente la expresión de la COX-2 inducida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

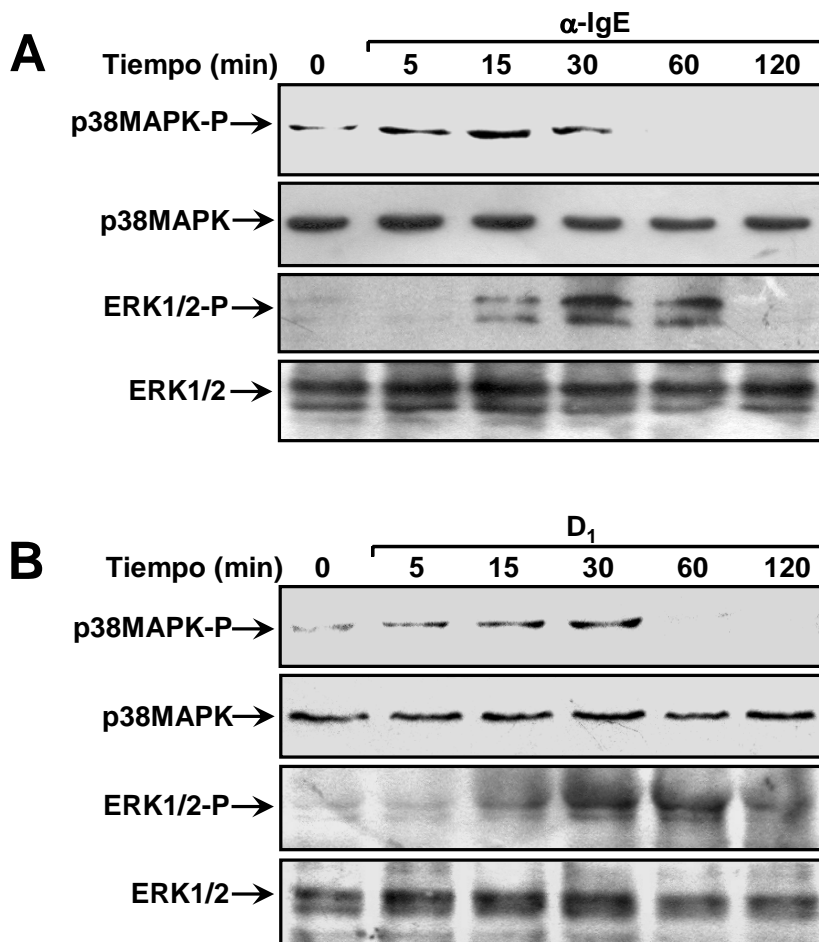


**Figura 48.** Especies reactivas de oxígeno derivadas de la reacción de Fenton están implicadas en la inducción de la expresión de la COX-2 por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en neutrófilos humanos. Los neutrófilos fueron preincubados con aminotriazol durante 30 minutos. Entonces, se añadió al medio de cultivo FeSO<sub>4</sub>/CuSO<sub>4</sub> (Fe<sup>2+</sup>/Cu<sup>2+</sup>; 20 μM de cada uno) o 1,10-fenantrolina (PHE; 20 μM) 30 minutos antes de la adición de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a las dosis indicadas. Entonces, las células fueron lisadas y la expresión de la COX-2 fue analizada mediante Western blotting. La β-actina se utilizó como control interno para comprobar que fue cargada la misma cantidad de proteínas por calle.

### **II.5. Papel de las MAPKs en el control de la expresión de la COX-2 dependiente de IgE en neutrófilos de pacientes alérgicos.**

La familia de proteínas MAP quinasas (MAPKs), entre las que se encuentran la p38, la ERK1/2 y la JNK1/2, han sido recientemente implicadas en la regulación de la expresión de la COX-2 en un amplio rango de células (Chen et al., 2001; Capuano et al., 2000; Dean Subbaramaiah et al., 1998). Como se muestra en la **Figura 49**, neutrófilos de un paciente alérgico sensibilizado a D<sub>1</sub> muestran una clara fosforilación, y la consiguiente activación de la p38 y ERK1/2 de manera dependiente de tiempo,

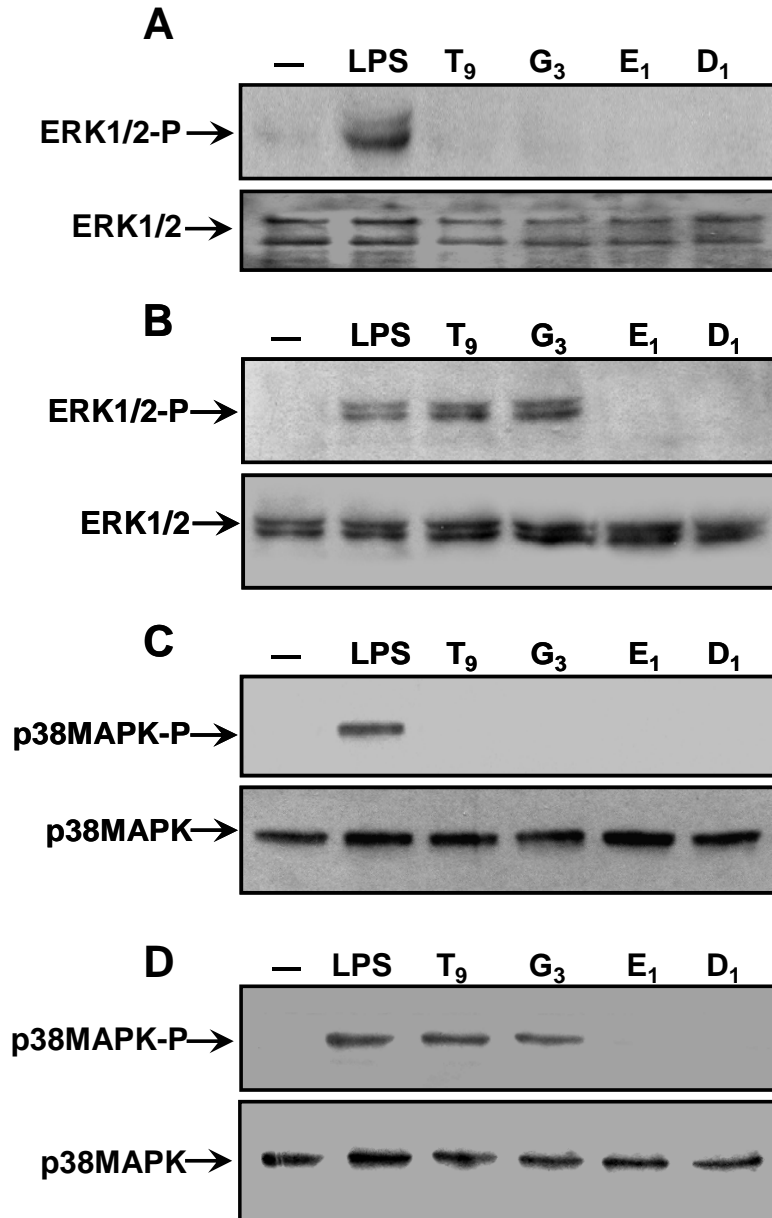
cuando las células fueron cultivadas con anticuerpos anti-IgE (**Figura 49A**) o con el alérgeno D<sub>1</sub> (**Figura 49B**).



**Figura 49. Activación dependiente de IgE de las MAPKs en neutrófilos de pacientes alérgicos.** Las proteínas totales de células control o de células estimuladas con antígeno/anti-IgE (10  $\mu$ g/ml) fueron analizadas por Western blotting usando anticuerpos específicos contra las formas fosforiladas o totales de la ERK1/2 o de la p38 MAPKs. (**A**) Los neutrófilos de un paciente alérgico fueron incubados con anti-IgE ( $\alpha$ -IgE; 10  $\mu$ g/ml) los tiempos indicados, y se analizó la ERK1/2 MAPK fosforilada (ERK1/2-P) y la p38 MAPK fosforilada (p38MAPK-P). (**B**) Los neutrófilos de un paciente alérgico sensibilizado a D<sub>1</sub>, fueron cultivados con ese antígeno los tiempos indicados y se analizó la fosforilación de la ERK1/2 MAPK (ERK1/2-P) y la p38 MAPK (p38MAPK-P). Tanto en **A** como en **B** las membranas fueron lavadas de anticuerpos y se analizaron las formas totales tanto de la ERK1/2 MAPK (ERK1/2), como de la p38 MAPK (p38MAPK), para verifica la misma cantidad de proteínas cargadas por calle.

Sin embargo, no sé observó activación de esas proteínas en neutrófilos de sujetos sanos cuando los neutrófilos fueron cultivadas con una batería de alérgenos alérgicos (**Figura 50**), o en neutrófilos de pacientes alérgicos cultivados con

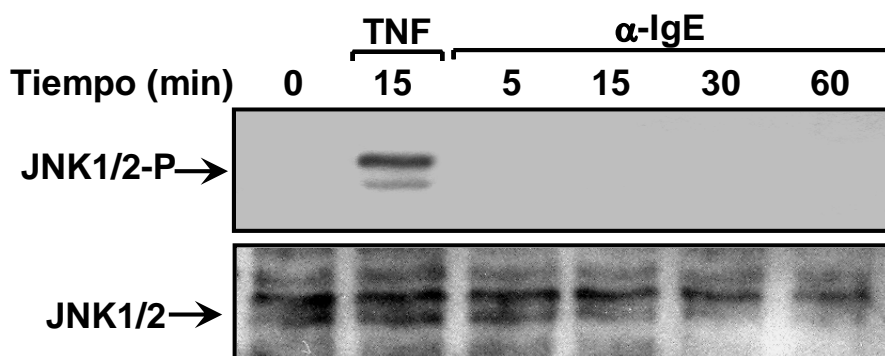
alergenos a los cuales el paciente no estaba sensibilizado (**Figura 50**). Sin embargo el LPS un potente inductor de la actividad de la p38 MAPK (Yan et al., 2002) y de la ERK (Bonner et al., 2001) si tuvo efecto.



**Figura 50. Especificidad de activación de las MAPKs en respuesta a alérgenos en neutrófilos de pacientes alérgicos y sujetos sanos.** (A) y (C) Los neutrófilos de un sujeto sano fueron incubados con una serie de alérgenos (T<sub>9</sub>, G<sub>3</sub>, E<sub>1</sub>, D<sub>1</sub>) (10 µg/ml) o LPS (1 µg/ml) durante 30 minutos, y se analizó la ERK1/2 MAPK fosforilada (ERK1/2-P) (A) y la p38 MAPK fosforilada (p38MAPK-P) (C). (B) y (D) Los neutrófilos de un paciente alérgico sensibilizado a T<sub>9</sub>, G<sub>3</sub> e insensible a E<sub>1</sub> y D<sub>1</sub> fueron cultivados con esos alérgenos a una concentración de 10 µg/ml durante 30 minutos y se analizó la fosforilación de la ERK1/2 MAPK (ERK1/2-P) (B) y de la p38 MAPK (p38MAPK-P) (D). Tanto en A como en B las membranas fueron lavadas de anticuerpos y se analizaron las formas totales tanto de la ERK1/2 MAPK, como de la p38 MAPK, para verificar la misma cantidad de proteínas cargadas por calle.

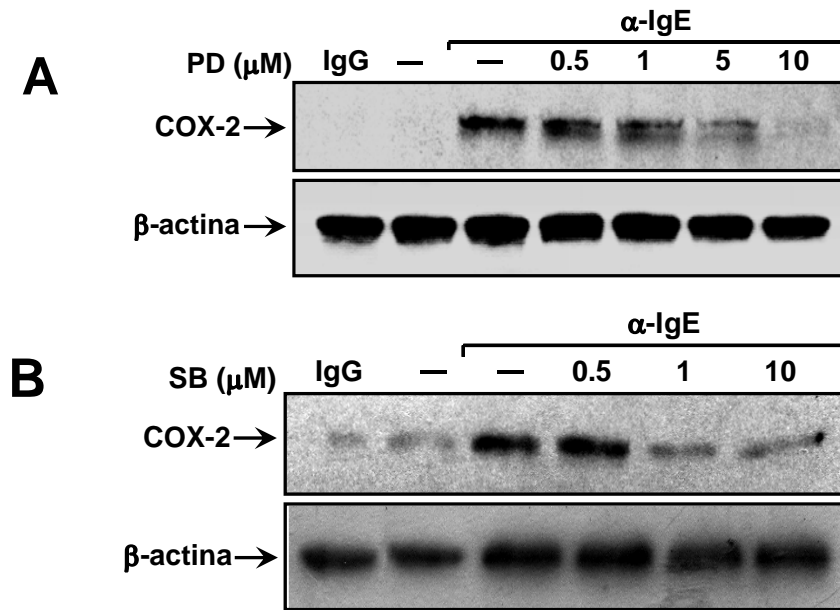


En contraste a los resultados encontrados para la p38 y la ERK1/2 MAPKs, el estado de activación de la JNK1/2 no se modifica tras el tratamiento de los neutrófilos con anticuerpos anti-IgE (**Figura 51**). Sin embargo el TNF- $\alpha$ , un potente inductor de la actividad de las JNK1/2 (Avdi et al., 2002), sí tuvo efecto.



**Figura 51. Ausencia de activación dependiente de IgE de la JNK1/2 MAPK en neutrófilos de pacientes alérgicos.** Los neutrófilos fueron incubados con 10 ng/ml de TNF- $\alpha$  durante 15 minutos ó 10  $\mu$ g/ml de anti-IgE los tiempos indicados. Entonces, las células fueron lisadas y se analizaron los niveles de fosforilación de la JNK1/2 MAPK. Después, las membranas fueron lavadas de anticuerpos y se analizaron los niveles totales de estas proteínas para asegurar que se cargo la misma cantidad de proteínas por calle.

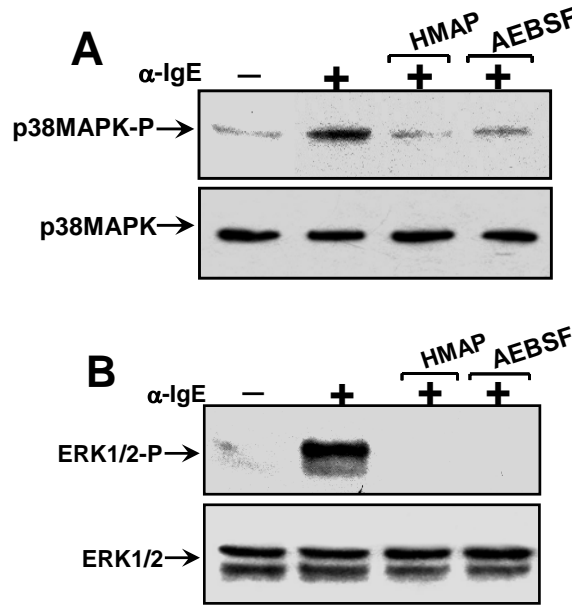
Para estudiar la implicación de la familia de las MAPKs en la expresión de la COX-2 dependiente de IgE, comprobamos el efecto en ese proceso de inhibidores específicos, el PD098059, inhibidor de la ERK1/2 MAPK (Alessi et al., 1995) y el SB203580, inhibidor de la p38 MAPK (Cuenda et al., 1995). Se encontró que ambos compuestos inhibieron la expresión de la COX-2 dependiente de IgE en neutrófilos de pacientes alérgicos (**Figura 52**). La IgG inespecífica, la cual no tuvo ningún efecto, se utiliza como control negativo del fragmento Fc del anticuerpo anti-IgE, el cual es un anticuerpo IgG que tiene especificidad para la IgE (**Figura 52**).



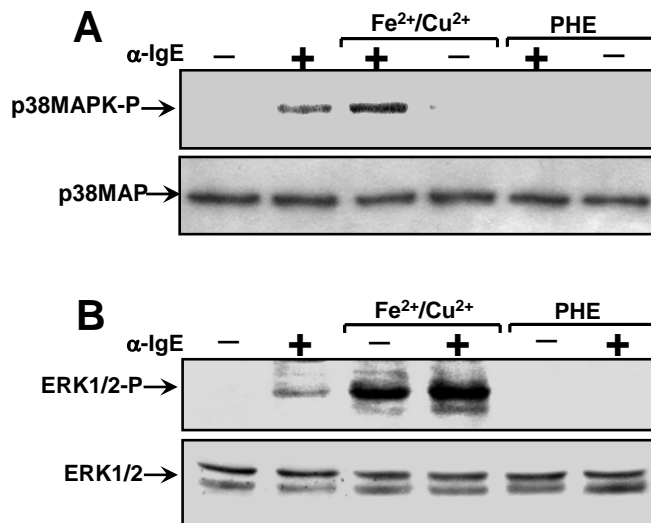
**Figura 52. Implicación de la ruta de las MAPKs en la expresión de la COX-2 dependiente de IgE en neutrófilos de pacientes alérgicos.** (A) Los neutrófilos de un paciente alérgico fueron preincubados durante 45 minutos con PD098059 (PD) a las dosis indicadas, y entonces fueron tratadas con anti-IgE ( $\alpha$ -IgE; 10  $\mu$ g/ml) durante 24 horas. (B) Los neutrófilos de un paciente alérgico fueron preincubados durante 45 minutos con SB203580 (SB) y entonces fueron tratados con anti-IgE ( $\alpha$ -IgE; 10  $\mu$ g/ml) durante 24 horas. La expresión de la COX-2 fue analizada mediante Western blotting. Los resultados son representativos de un total de 3 experimentos separados. La  $\beta$ -actina se utilizó como control interno para comprobar que fue cargada la misma cantidad de proteínas por calle.

### **II.6. La vía de las MAPKs está asociada con la generación dependiente de IgE de especies reactivas de oxígeno en neutrófilos de pacientes alérgicos.**

Dada la conocida relación entre el estado redox y la activación de las MAPKs (El Bekay et al., 2003; Detmers et al., 1998; El Benna et al., 1996; Fialkow et al., 1994; McLeish et al., 1998), investigamos si esa interconexión era operativa en la regulación de la expresión de la COX-2 dependiente de IgE. Inhibidores específicos de la NADPH oxidasa, HMAP y AEBSF, cancelaron completamente la fosforilación dependiente de IgE de la p38 y de la ERK1/2 MAPKs (**Figura 53**) (ver página siguiente). Dado que, especies reactivas de oxígeno derivadas de la reacción de Fenton parecen estar involucrados en la expresión de la COX-2 dependiente de IgE, estudiamos si dichas especies podrían contribuir a la activación de la p38 y de la ERK1/2 MAPKs. Como se muestra, la adición de iones  $Fe^{2+}/Cu^{2+}$  incrementa fuertemente la fosforilación dependiente de IgE de la p38 y de la ERK1/2 MAPKs (**Figura 54**) (ver página siguiente). Sin embargo, el quelante de  $Fe^{2+}/Cu^{2+}$ , 1,10-fenantrolina, canceló completamente el efecto positivo promovido por anticuerpos anti-IgE sobre estas dos MAPKs (**Figura 54**).



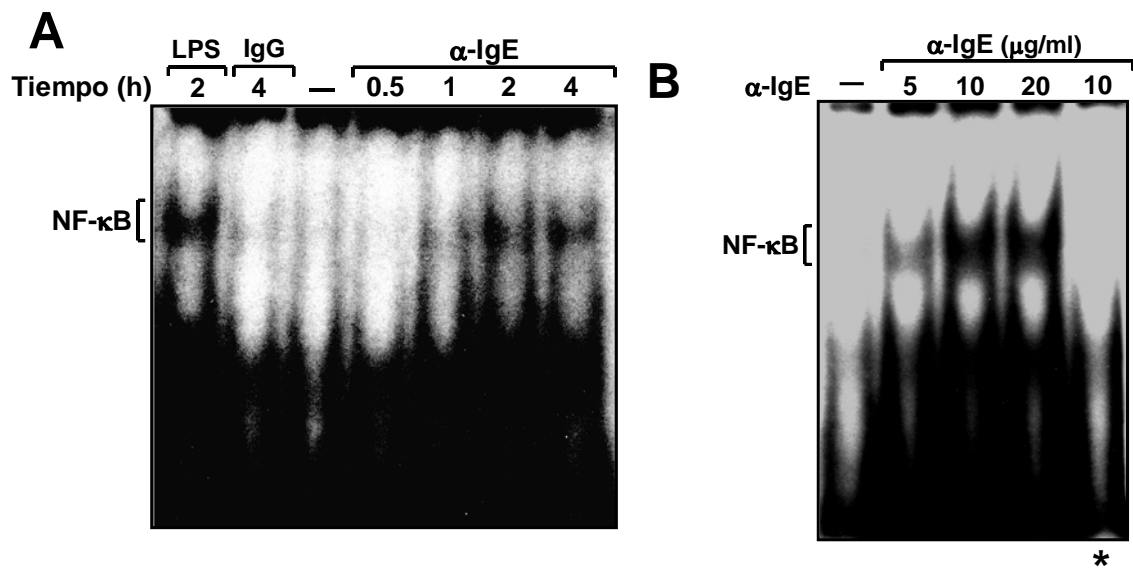
**Figura 53. Implicación de la NADPH oxidasa en la activación de las MAPKs dependiente de IgE en neutrófilos de pacientes alérgicos.** (A y B) Los neutrófilos de un paciente alérgico fueron cultivados con dos inhibidores específicos de la NADPH oxidasa, HMAP (500  $\mu$ M) o AEBSF (500  $\mu$ M) 30 minutos antes de la adición de anti-IgE ( $\alpha$ -IgE; 10  $\mu$ g/ml) durante 30 minutos. Las proteínas totales se analizaron mediante Western blotting usando anticuerpos específicos contra las formas fosforiladas de la p38 MAPK (p38MAPK-P), ERK1/2 MAPK (ERK1/2-P) o las formas totales de esas proteínas para asegurar la misma cantidad de proteínas cargadas por calle.



**Figura 54. Implicación de especies reactivas de oxígeno derivadas de la reacción de Fenton en la activación de las MAPKs dependiente de IgE en neutrófilos de pacientes alérgicos.** Los neutrófilos de un paciente alérgico fueron preincubados durante 30 minutos con FeSO<sub>4</sub>/CuSO<sub>4</sub> (Fe<sup>2+</sup>/Cu<sup>2+</sup>; 20  $\mu$ M de cada uno) o con 1,10-fenantrolina (PHE; 20  $\mu$ M) antes de la adición de anti-IgE ( $\alpha$ -IgE; 5  $\mu$ g/ml) durante 30 minutos. Después las células fueron lisadas y las proteínas totales se analizaron mediante Western blotting usando anticuerpos específicos contra las formas fosforiladas de la p38 MAPK (p38MAPK-P) (A), ERK1/2 (ERK1/2-P) (B) o las formas totales de esas proteínas (p38MAPK y ERK1/2) para asegurar la misma carga de proteínas por calle (A y B).

### II.7. Papel del factor de transcripción NF- $\kappa$ B sobre la regulación de la expresión de la COX-2 dependiente de IgE en neutrófilos de pacientes alérgicos.

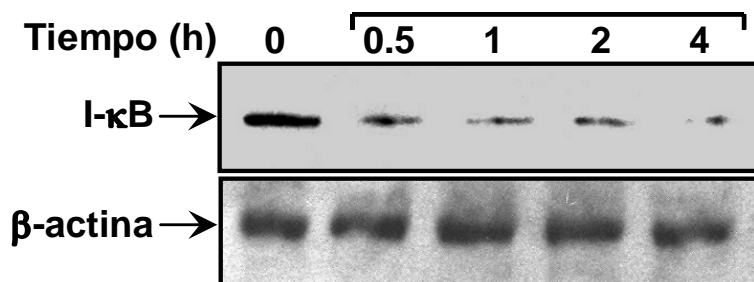
Es conocido el papel de NF- $\kappa$ B en la expresión del gen de la COX-2 (Appleby et al., 1994) y en la alergia (Barnes et al., 1997). Por lo tanto, estudiamos la implicación de este factor de transcripción en la expresión de la COX-2 inducida por anticuerpos anti-IgE. Para ello utilizamos extractos nucleares de neutrófilos de pacientes alérgicos cultivados con anticuerpos anti-IgE. Observamos, que la estimulación de estos neutrófilos con anticuerpos anti-IgE resulta en un incremento de la actividad de unión al ADN de NF- $\kappa$ B de manera tanto dependiente de dosis, como de tiempo (**Figura 55**).



**Figura 55. Incremento dependiente de IgE de la actividad de unión al ADN de NF- $\kappa$ B en neutrófilos de pacientes alérgicos.** Los neutrófilos de un paciente alérgico fueron tratados con LPS (1  $\mu$ g/ml), IgG (10  $\mu$ g/ml) o anti-IgE ( $\alpha$ -IgE; 10  $\mu$ g/ml) durante los tiempos indicados (**A**) o con anti-IgE a las dosis indicadas durante 4 horas (**B**). Entonces se aislaron los extractos nucleares y la actividad de unión al ADN de NF- $\kappa$ B fue determinada por EMSA. El corchete muestra el retraso formado.

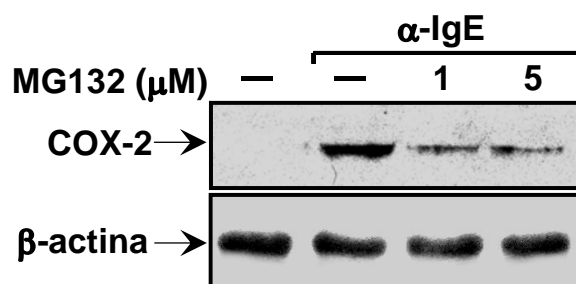
La especificidad de unión al ADN se puso de manifiesto cuando incubamos los extractos nucleares con una cantidad 100 veces superior de sonda sin marcar. Dado que en células sin estimular, NF- $\kappa$ B se encuentra anclado en el citosol a proteínas inhibitoras de la familia de I- $\kappa$ B, las cuales se degradan en el proteosoma tras

estimulación celular, con la consecuente translocación al núcleo de NF- $\kappa$ B (Ghosh et al., 1998; Palombella et al., 1994), analizamos los niveles citosólicos de I- $\kappa$ B, antes y después del tratamiento de las células con anticuerpos anti-IgE. Estos, promueven en cuestión de unas pocas horas, una casi completa degradación de I- $\kappa$ B en neutrófilos humanos (**Figura 56**), lo cual se correlaciona con la actividad de unión al ADN.



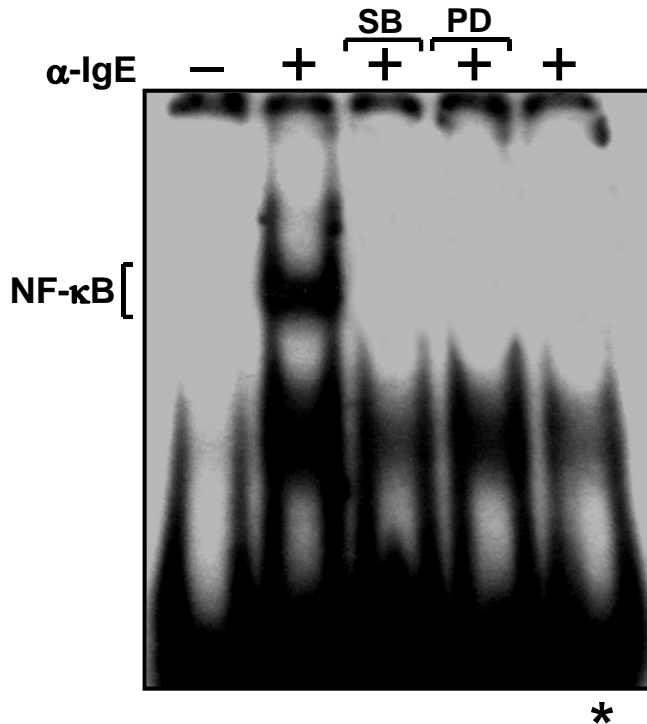
**Figura 56. Activación dependiente de IgE de la degradación de I- $\kappa$ B en neutrófilos de pacientes alérgicos.** Los neutrófilos de un paciente alérgico fueron tratados con anti-IgE ( $\alpha$ -IgE; 10  $\mu$ g/ml) los tiempos indicados. Los niveles de I- $\kappa$ B fueron analizados por Western blotting. La  $\beta$ -actina se utilizó como control interno para comprobar que fue cargada la misma cantidad de proteínas por calle.

Además, la presencia del MG132, un inhibidor específico del proteosoma (Palombella et al., 1994), atenúa fuertemente la expresión de la COX-2 inducida por anticuerpos anti-IgE (**Figura 57**).



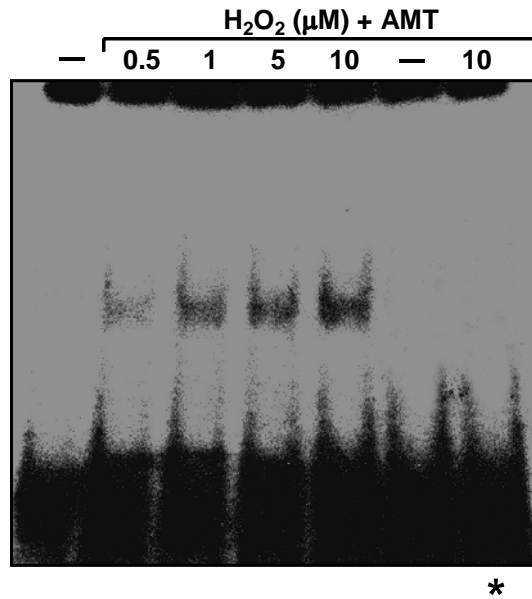
**Figura 57. Implicación de NF- $\kappa$ B en la expresión de la COX-2 dependiente de IgE en neutrófilos de pacientes alérgicos.** Los neutrófilos de un paciente alérgico fueron preincubados 1 hora con MG132 a las dosis indicadas y después cultivados con anti-IgE ( $\alpha$ -IgE; 10  $\mu$ g/ml) durante 24 horas. La expresión de la COX-2 fue analizada mediante Western blotting. La  $\beta$ -actina se utilizó como control interno para comprobar que fue cargada la misma cantidad de proteínas por calle.

Dado que ha sido demostrado anteriormente que la activación de la p38 y ERK1/2 MAPKs son rutas de señalización intracelular necesarias para la activación de NF- $\kappa$ B en algunos tipos celulares (Chen et al. 2001). En este contexto, la presencia de SB203580 (inhibidor de la p38 MAPK) o PD098059 (inhibidor de la ERK1/2 MAPK), cancelan completamente la activación dependiente de IgE de NF- $\kappa$ B en neutrófilos humanos (**Figura 58**).



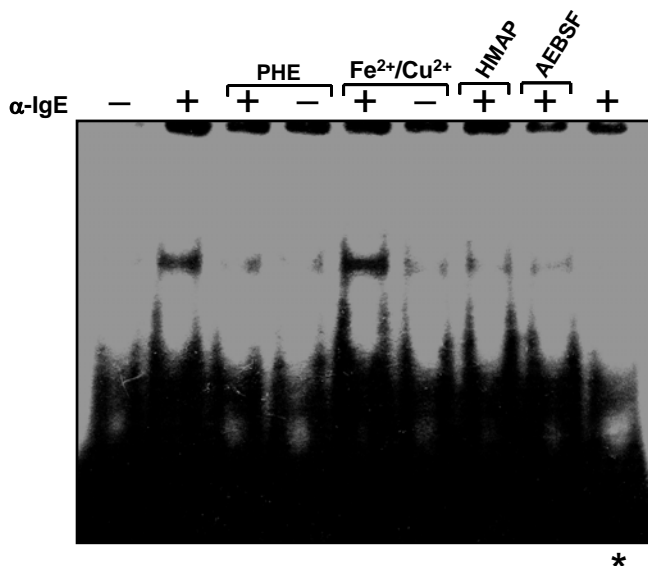
**Figura 58. Implicación de las MAPKs en la activación de NF- $\kappa$ B dependiente de IgE en neutrófilos de pacientes alérgicos.** Los neutrófilos de un paciente alérgico fueron preincubados 1 hora con 1  $\mu$ M de SB203580 (SB) o 10  $\mu$ M de PD098059 (PD) antes de la adición de anti-IgE ( $\alpha$ -IgE; 10  $\mu$ g/ml) durante 4 horas, y entonces los extractos nucleares fueron analizados por EMSA. El asterisco indica la adición a la mezcla de reacción de extractos nucleares de neutrófilos tratados con 10  $\mu$ g/ml de anti-IgE durante 4 horas, una cantidad 100 veces superior de sonda sin marcar.

También, existen trabajos anteriores que han demostrado que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> incrementa la actividad de unión al ADN de NF- $\kappa$ B en otros tipos celulares (Schreck et al., 1991; Takada et al 2003) y que existe una correlación positiva entre la activación de NF- $\kappa$ B y la expresión de la COX-2 (Adderley et al., 1999). Nosotros observamos en este trabajo que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> añadido exógenamente, en presencia aminotriazol, inhibidor de la catalasa (enzima destoxicante de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), incrementa la actividad de unión al ADN de NF- $\kappa$ B en neutrófilos humanos (**Figura 59**) (ver página siguiente).



**Figura 59.** El  $H_2O_2$  incrementa la actividad de unión al ADN de NF- $\kappa$ B en neutrófilos humanos. Los neutrófilos humanos fueron tratados con o sin aminotriazol (AMT; 25 mM) durante 30 minutos antes de la adición de  $H_2O_2$  a las dosis indicadas durante 4 horas. Entonces, se prepararon los extractos nucleares y fueron analizados por EMSA. El asterisco indica la adición a la mezcla de reacción de extractos nucleares de neutrófilos tratados con 10  $\mu$ M de  $H_2O_2$  durante 4 horas, una cantidad 100 veces superior de sonda sin marcar.

Finalmente se estudió la participación potencial de la NADPH oxidasa en la activación dependiente IgE de NF- $\kappa$ B. Encontramos que los dos inhibidores específicos de la NADPH oxidasa, HMAP y AEBSF, cancelaban prácticamente por completo, la activación de NF- $\kappa$ B dependiente IgE (**Figura 60**). Reforzando estas observaciones, la presencia de  $Fe^{2+}$  y  $Cu^{2+}$  incrementa la actividad de unión al ADN de NF- $\kappa$ B, un proceso que fue completamente cancelado por el quelante 1,10-fenantrolina.



**Figura 60.** Implicación de la NADPH oxidasa y de especies reactivas de oxígeno derivadas de la reacción de Fenton en la activación dependiente de IgE de NF- $\kappa$ B en neutrófilos de pacientes alérgicos. Los neutrófilos de un paciente alérgico fueron preincubados durante 30 minutos con  $FeSO_4/CUSO_4$  ( $Fe^{2+}/Cu^{2+}$ ; 20  $\mu$ M de cada uno) o con 1,10-fenantrolina (PHE; 20  $\mu$ M) antes de la adición de anti-IgE ( $\alpha$ -IgE; 5  $\mu$ g/ml) durante 4 horas. El asterisco indica la adición a la mezcla de reacción de extractos nucleares de neutrófilos tratados con 5  $\mu$ g/ml de anti-IgE durante 4 horas, una cantidad 100 veces superior de sonda sin marcar.





### **III. DISCUSIÓN.**

Aunque la capacidad de los neutrófilos humanos para expresar la COX-2 ha sido demostrada (Maloney et al., 1998), Aún no se han llevado a cabo estudios sobre la regulación su expresión por un mecanismo dependiente de IgE en estas células, ni sobre los mecanismos moleculares implicados en dicha expresión. En el estudio presente se revela que la expresión de la COX-2 se induce por alergenitos específicos o anticuerpos anti-IgE en neutrófilos humanos, a nivel de ARNm y proteína, con la consiguiente liberación de PGE<sub>2</sub>. Este fenómeno plantea nuevas cuestiones sobre la contribución de estas células a procesos inflamatorios, entre los que se encuentra la alergia. Es importante resaltar que los neutrófilos expresan las tres formas conocidas de receptores de IgE, FcεRI (Gounni et al., 2001), FcεRII/CD23 (Yamaoka et al., 1996) y galectin-2/Mac-2 (Truong et al., 1993), lo cual apoya la participación potencial de estas células en los procesos alérgicos (Lee et al., 1982; Nagy et al., 1982; Boulet et al., 1993; Montefort et al., 1994). En este sentido, hemos demostrado previamente que alergenitos específicos son capaces de activar varias respuestas funcionales en neutrófilos de pacientes alérgicos. También hemos demostrado la existencia de moléculas de IgE específicas para unos determinados alergenitos en la superficie de neutrófilos de un paciente sensibilizado a estos alergenitos (Monteseirín et al., 2004; Monteseirín et al., 1996; Monteseirín et al., 2003; Monteseirín et al., 2001) y la ausencia de moléculas de IgG específicas para estos alergenitos. Por lo tanto, proponemos que los mecanismos mediante los cuales los alergenitos promueven la activación del neutrófilo, pueden comenzar con la unión de los alergenitos a las moléculas de IgE asociadas a sus respectivos receptores en la membrana plasmática del neutrófilo. Este mecanismo puede explicar el motivo por el cual las respuestas funcionales inducidas por alergenitos, tales como la expresión de la COX-2, no se observan en neutrófilos de sujetos sanos, ni en neutrófilos de pacientes alérgicos cuando estos son cultivados en presencia de alergenitos a los cuales el paciente no se encuentra sensibilizado. En estos casos, los alergenitos no se podrían unir al complejo IgE/receptor preexistente, y la inducción de la COX-2 no tendría lugar.

Se conoce que la estimulación de células fagocíticas induce un conjunto de fenómenos, al cual se ha denominado estallido respiratorio, caracterizado por un incremento en la producción de anión O<sub>2</sub><sup>-</sup> (Monteseirín et al., 1996; Thelen et al.,

1993; Edwards et al., 1995). Aunque los mediadores inflamatorios generados son críticos en el papel de defensa que ejercen los neutrófilos en el organismo, pueden causar un daño severo en el tejido cuando son producidos en exceso o inadecuadamente (Te Velde et al., 1994). El principal enzima generador de  $O_2^-$  en neutrófilos es la NADPH oxidasa. Tras su reducción el  $O_2$  puede generar sucesivamente  $O_2^-$ , el cual es rápidamente convertido en  $H_2O_2$  por la acción de la superóxido dismutasa y por dismutación espontánea (Halliwell B et al., 1987), y  $\cdot OH$  en presencia de cationes de  $Fe^{2+}/Cu^{2+}$ , en la llamada reacción de Fenton.

Hemos demostrado previamente que la estimulación *in vitro* de neutrófilos humanos con alergenitos a los cuales el paciente estaba sensibilizado o con anticuerpos anti-IgE, produce una liberación de especies reactivas de oxígeno mayor que en sujetos sanos (Monteseirín et al., 1996). Estudios muy recientes ponen de manifiesto una conexión entre expresión de la COX-2 y la generación de especies reactivas de oxígeno durante la diferenciación de monocito a macrófago (Barbieri et al., 2003). Es interesante, que los neutrófilos de pacientes alérgicos asmáticos generan mayores niveles de  $O_2^-$  que los de sujetos sanos (Teramoto et al., 1996), y que el  $H_2O_2$  que se encuentra en el condensado de aire espirado se correlaciona positivamente con las primeras fases de activación de neutrófilos de paciente asmáticos (Antczak et al., 1999). El mecanismo molecular que media la inducción del gen de la COX-2 en una amplia variedad de células, incluidos los neutrófilos, es desconocido hasta el momento.

En concordancia con un trabajo anterior de nuestro grupo (Monteseirín et al., 1996), en el presente estudio mostramos que alergenitos específicos y anticuerpos anti-IgE inducen una clara activación del complejo de la NADPH oxidasa en neutrófilos, como se observa por la translocación a la membrana plasmática de sus subunidades citosólicas  $p47^{phox}$  y  $p67^{phox}$ , y la consecuente liberación de especies reactivas de oxígeno. La producción de especies reactivas de oxígeno fue fuertemente inhibida por HMAP y AEBSF, dos inhibidores específicos de la NADPH oxidasa que también cancelaron la inducción de la expresión dependiente de IgE de la COX-2. Por lo tanto, puede ser postulado un papel positivo de las especies reactivas de oxígeno derivadas de la actividad de la NADPH oxidasa en la regulación de la expresión del gen de la COX-2. Además, puesto que la adición de cationes de  $Fe^{2+}/Cu^{2+}$  ó 1,10-fenantrolina, un quelante de dichos cationes, potencia o inhibe respectivamente la expresión dependiente de IgE de la COX-2, especies

reactivas de oxígeno derivadas de la reacción de Fenton podrían ser las responsables de inducir la expresión de la COX-2. Estos resultados son reforzados por el hecho de que la adición exógena de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induce la expresión de la COX-2 tanto a nivel de proteína como de ARNm, un proceso que también fue potenciado por la adición de Fe<sup>2+</sup>/Cu<sup>2+</sup> y que fue cancelado por 1,10-fenantrolina. Sin embargo, la especie activa que es responsable directa de la expresión de la COX-2 se desconoce. El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> añadido es rápidamente convertido en otras especies químicas en presencia de iones de Fe<sup>2+</sup>/Cu<sup>2+</sup>, tales como el ·OH, lo cual apunta a los radicales hidroxilo, al menos en parte, como especies efectoras.

Todos los datos presentados sugieren que la inducción de la expresión de la COX-2 causada por anticuerpos anti-IgE y alergenos específicos es regulada por especies reactivas de oxígeno, posiblemente actuando a través de la vía de las MAPKs y del factor de transcripción NF-κB. En este contexto, la generación de especies reactivas de oxígeno derivadas de la activación de la NADPH oxidasa y la activación de la vía de las MAPK han sido asociadas con determinados procesos de la inflamación alérgica (Escott et al., 2000; Naureckas et al., 1999; Monteseirín et al. 1996, Fahy et al., 2000). Además, la relación entre la vía de las MAPKs, la activación de NF-κB y las especies reactivas de oxígeno, es muy conocida en neutrófilos (El Bekay et al., 2003; Detmers et al., 1998; El Benna et al., 1996; Fialkow et al., 1994; McLeish et al., 1998; Schreck et al., 1991; Takada et al., 2003)

Además, El hipotético papel positivo de las especies reactivas de oxígeno fue evidenciado directamente por el hecho de que los referidos inhibidores también cancelaron la inducción de la expresión de la COX-2. Además, la adición de cationes de Fe<sup>2+</sup>/Cu<sup>2+</sup> o de 1,10-fenantrolina, un quelante de Fe<sup>2+</sup>/Cu<sup>2+</sup>, aumentó o inhibió respectivamente, la inducción de la expresión de la COX-2. Además, también mostramos que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> añadida exógenamente induce la expresión de la COX-2 tanto a nivel de proteína como de ARNm, un proceso que también se incremento por la adición de Fe<sup>2+</sup>/Cu<sup>2+</sup> y que fue cancelado por 1,10-fenantrolina. Sin embargo las especies activas responsables directas de la inducción de la COX-2 siguen siendo desconocidas. El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> añadida exógenamente es rápidamente convertido, en presencia de cationes de Fe<sup>2+</sup>/Cu<sup>2+</sup>, en otras especies químicas, como es el ·OH. Puesto que hemos observado que esos iones metálicos aumentan la expresión de la COX-2 dependiente de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, el ·OH generado podría cumplir dicho papel. En este sentido, la ERK1/2 y la p38 MAPKs han sido implicadas en la inducción de la

COX-2 en células epiteliales alveolares y en células de músculo liso (Chen et al., 2001; Naureckas et al., 1999). La existencia de interacciones complejas entre esas vías de señalización fue evidenciada por los siguientes hechos: (i) La activación dependiente de IgE de la inducción de la COX-2 fue cancelada por inhibidores específicos de la NADPH oxidasa, mientras que fue potenciada por iones de  $\text{Fe}^{2+}/\text{Cu}^{2+}$  y suprimida por 1,10-fenantrolina. (ii) Esos inhibidores específicos de la NADPH oxidasa también cancelaron la activación dependiente de IgE de la p38 y ERK1/2 MAPKs, mientras que fue potenciada por iones de  $\text{Fe}^{2+}/\text{Cu}^{2+}$  e inhibida por 1,10-fenantrolina. (iii) El SB203580 y el PD098059, dos inhibidores específicos de esas MAPKs, provocan una fuerte inhibición de la expresión dependiente de IgE de la COX-2. En concordancia con estas observaciones, ha sido demostrado que concentraciones no letales de  $\text{H}_2\text{O}_2$  activan la p38 y ERK MAPKs (Guyton et al., 1996). Los datos presentados revelan que la acción positiva que ejerce la producción de especies reactivas de oxígeno sobre la expresión dependiente de IgE de la COX-2, es llevada a cabo vía activación de la p38 y ERK1/2 MAPKs.

Por otro lado, se conoce la relevancia de los sitios de unión para NF- $\kappa$ B en el promotor de la COX-2 (Iniguez et al., 2000) y su papel en el desarrollo de la enfermedad alérgica (Barnes et al., 1997). En el trabajo presentado, mostramos evidencias de que el tratamiento con anticuerpos anti-IgE induce la degradación del I- $\kappa$ B citosólico, con la consiguiente activación de NF- $\kappa$ B. El presunto papel de este factor de transcripción en la inducción de la expresión de la COX-2 dependiente de IgE, fue apoyado por el hecho de que el MG-132, un inhibidor específico del proteosoma, con la habilidad de inhibir la degradación de I- $\kappa$ B, canceló dicha expresión. Las relaciones entre la activación de NF- $\kappa$ B y las vías de señalización intracelular mencionadas, fueron fuertemente evidenciadas por el hecho de que inhibidores específicos de las MAPKs y de la NADPH oxidasa, también afectan negativamente a la activación de NF- $\kappa$ B. La implicación de las especies reactivas de oxígeno en la activación de NF- $\kappa$ B fue evidenciada por el hecho de que especies químicas derivadas de la reacción de Fenton potencian la activación dependiente de IgE de NF- $\kappa$ B, y por el hecho de que el  $\text{H}_2\text{O}_2$  ejerce una acción positiva sobre la activación de este factor de transcripción.

Estos datos aportan una buena base a nuestra hipótesis de que especies reactivas de oxígeno específicas, originadas de la actividad de la NADPH oxidasa,

tras la estimulación con alérgeno o anticuerpos anti-IgE, disparan la activación dependiente de IgE de la p38 y la ERK1/2 MAPKs, lo cual es necesario para la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B y el consiguiente efecto positivo sobre la expresión del gen de la COX-2.

Las observaciones presentadas aportan un nuevo papel para los oxidantes intracelulares, en un nuevo mecanismo, llevado a cabo por alérgenos o anticuerpos anti-IgE, implicado en la inducción de la expresión de la COX-2 en neutrófilos humanos. Nuestros datos destacan la posible función de los neutrófilos como fuente de mediadores inflamatorios (como es la PGE<sub>2</sub>) durante la inflamación alérgica, y establece que en la vía de transducción de señales intracelular que conduce a la inducción de la expresión de la COX-2 está implicada la liberación de O<sub>2</sub><sup>-</sup>, la activación de MAPKs y de NF- $\kappa$ B.



EXPRESIÓN DEL FACTOR DE  
TRANSCRIPCIÓN NFAT2 EN  
NEUTRÓFILOS HUMANOS:  
ACTIVACIÓN DEPENDIENTE DE  
ANTI-IgE/ALERGENO, MEDIADA  
POR LA CALCINEURINA





## **I. RESUMEN.**

“Nuclear factors of activated T cells” (NFATs) constituye una familia de factores de transcripción que juegan un papel fundamental en la transcripción de genes de citoquinas claves en un amplia variedad de células.

La presencia de isoformas de NFAT ha sido descrita prácticamente en todos los tipos celulares del sistema inmune, con la excepción de neutrófilos.

En el trabajo presentado, hemos descrito por primera vez, la expresión en neutrófilos humanos de los ARN mensajeros que codifican las isoformas NFAT1, NFAT2, NFAT4 y NFAT5, pero no de la isoforma NFAT3. Sin embargo, solo la proteína NFAT2 fue expresada por estas células. También hemos descrito que alérgenos a los cuales un paciente se encuentra sensibilizado, son capaces de promover la translocación de NFAT2 al núcleo, en neutrófilos de dichos pacientes, un efecto que fue mimetizado por el tratamiento de los neutrófilos con anticuerpos anti-IgE. Estos anticuerpos también incrementaron la actividad de la calcineurina y la actividad de unión al ADN de NFAT2. Por último encontramos que la calcineurina fue capaz de interaccionar físicamente con NFAT2.

Nuestros resultados proporcionan evidencias claras de que NFAT2 se encuentra constitutivamente expresado en neutrófilos humanos y se activa bajo la acción de alérgenos y anticuerpos anti-IgE, en un mecanismo dependiente de la calcineurina.

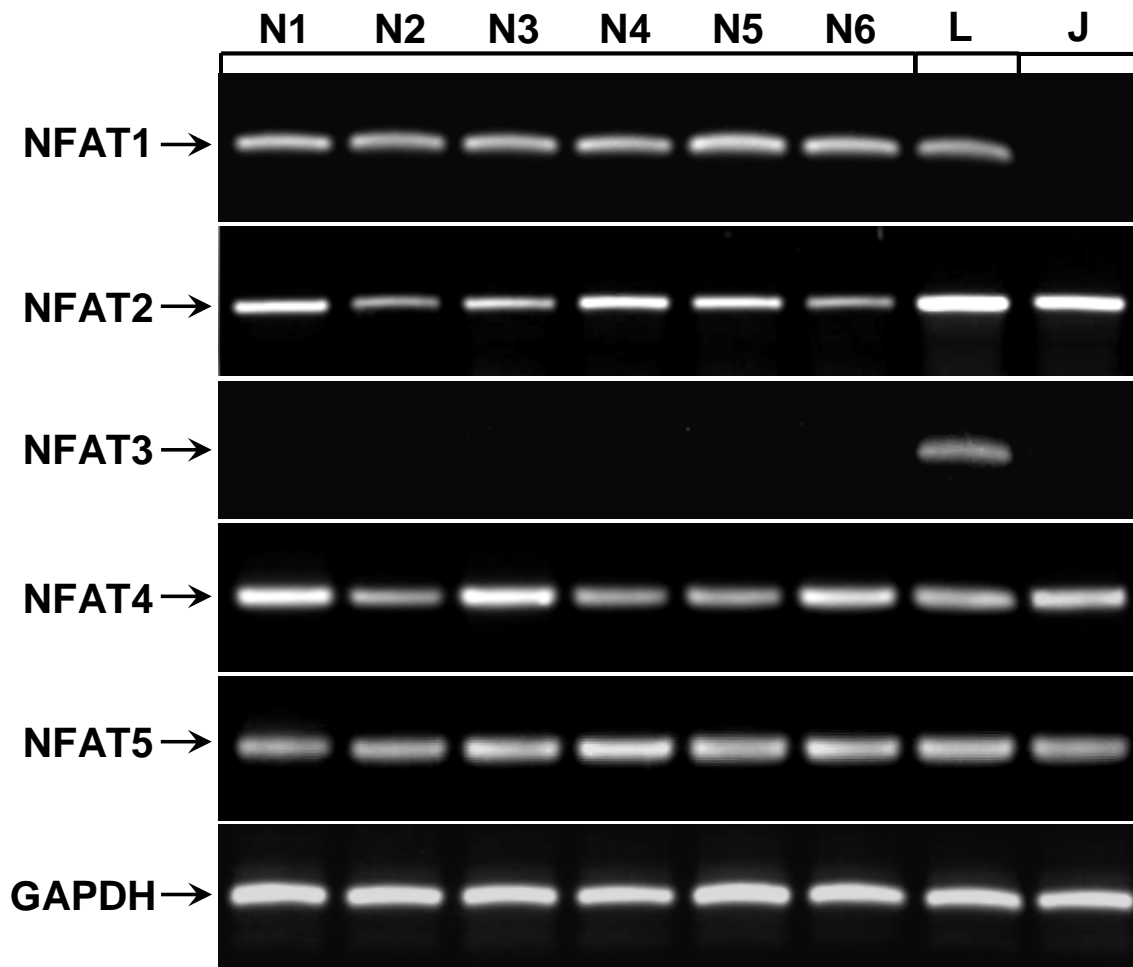


## II. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

### II.1. *Presencia de los ARN mensajeros que codifican NFAT1, NFAT2, NFAT4 y NFAT5 en neutrófilos humanos.*

Para analizar la expresión a nivel de ARNm de las cinco isoformas conocidas de NFAT en neutrófilos humanos, hemos llevado a cabo análisis mediante RT-PCR, usando cebadores específicos para dichas isoformas. Dado que la RT-PCR es un método muy sensible, era fundamental aislar el ARN de preparaciones celulares extremadamente puras. Nuestra población de neutrófilos, obtenida mediante el método de Bystrom (Bystrom et al., 2002), la proporción de neutrófilos fue cercana al 100%, que está en concordancia con los datos obtenidos por estos autores.

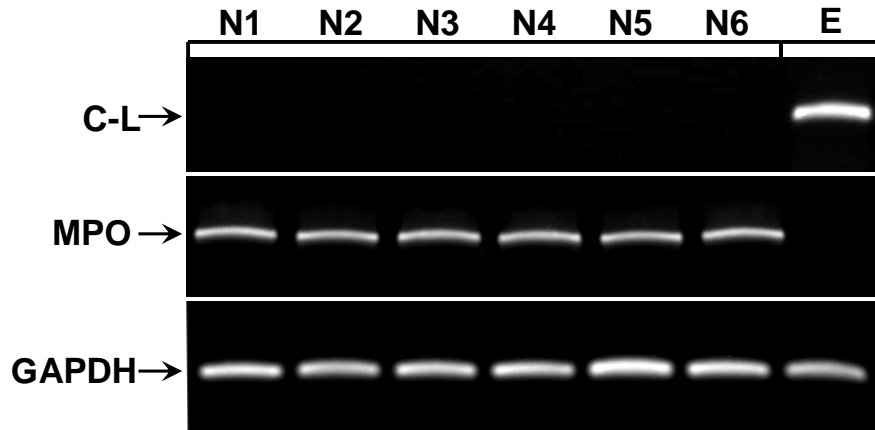
El ARN extraído de neutrófilos de sujetos sanos y paciente alérgicos fue analizado junto con el ARN de células Jurkat activadas y linfocitos periféricos para poder comparar las diferentes isoformas de NFAT expresadas por estos tipos celulares. Como muestra la **Figura 61** (ver página siguiente), fue detectada en neutrófilos, una expresión constitutiva de las isoformas NFAT1, NFAT2, NFAT4 y NFAT5 (condiciones basales), y no se observaron diferencias entre neutrófilos de sujetos sanos y pacientes alérgicos. Los transcritos que codifican NFAT2 y NFAT4 también fueron detectados en células Jurkat T, como ha sido descrito anteriormente (Lyakh et al., 1997), sin embargo el transcrito de NFAT1 fue detectado en linfocitos periféricos, pero no en células Jurkat T (**Figura 61**) (ver página siguiente). El ARNm que codifica NFAT5 fue expresado también en células Jurkat T y en linfocitos periféricos, lo cual esta de acuerdo con datos previos (Trama et al., 2000; Trama et al., 2002). Por otro lado, el ARNm que codifica NFAT3 no fue detectado en neutrófilos, ni de sujetos, sanos ni de pacientes alérgicos, sin embargo encontramos este transcrito presente en linfocitos periféricos (**Figura 61**) (ver página siguiente), como ha sido descrito anteriormente (Hoey et al., 1995).



**Figura 61. Expresión de los ARN mensajeros que codifican las diferentes isoformas de NFAT en neutrófilos humanos.** El ARN total fue extraído de neutrófilos humanos altamente puros, inmediatamente después de su obtención, tanto de sujetos sanos (N1-N3) como de pacientes alérgicos (N3-N6), así como de linfocitos de sangre periférica (L), y células jurkat T (J) estimuladas con 100 nM de PMA y 500 nM de ionomycin, durante 5 horas, usados como controles positivos y controles negativos de expresión de las diferentes isoformas de NFAT. Las muestras de ARN fueron analizadas por RT-PCR usando cebadores específicos que amplifican los transcritos de las isoformas indicadas de NFAT. Los resultados de la amplificación del gen de la GAPDH fueron mostrados como control interno. Los resultados son representativos de al menos 3 experimentos realizados con resultados similares.

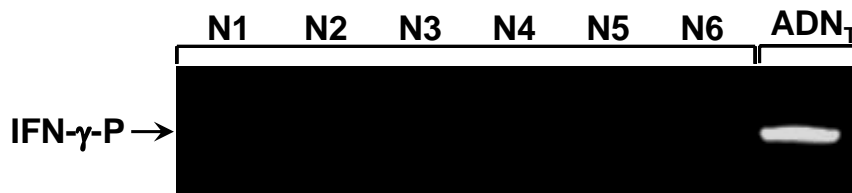
Para excluir la posibilidad de contaminación por ARNm procedente de eosinófilos, se realizó una RT-PCR con cebadores específicos para el ARNm que codifica la proteína Charcot-Leyden, que únicamente se encuentra expresada en eosinófilos, con resultados negativos en todas las preparaciones de ARN de neutrófilos examinadas, en cambio esta fue detectada en eosinófilos (**Figura 62**) (ver página siguiente). Al contrario, no se obtuvo la amplificación del transcrito que codifica la mieloperoxidasa en el ARN de eosinófilos, la cual se encuentra selectivamente

expresada por neutrófilos. Sin embargo esta fue detectada en las seis preparaciones de ARN de neutrófilos examinadas (**Figura 62**).



**Figura 62. Control sobre el grado de purificación de los neutrófilos.** El ARN total fue extraído inmediatamente después de la obtención de neutrófilos humanos altamente puros, tanto de sujetos sanos (N1-N3) como de pacientes alérgicos (N3-N6), así como de eosinófilos humanos (E) usados como controles positivos y controles negativos. Las muestras de ARN fueron analizadas por RT-PCR usando cebadores específicos para el ARNm que codifica la proteína de Charcot-Leyden protein (C-L), la mieloperoxidasa (MPO) y para la GAPDH como control interno.

Otra prueba directa de la falta de contaminación de ADN genómico en nuestras preparaciones de ARN, fue la amplificación mediante PCR del ADNc de nuestras muestras de neutrófilos con los cebadores específicos para el promotor del IFN- $\gamma$ , el cual no fue detectado en ninguno de las preparaciones de neutrófilos examinadas y si en ADN total humano (**Figura 63**).



**Figura 63. Las muestras de ARN aislado de neutrófilos no presentan contaminación de ADN genómico.** Las muestras de ARN aisladas analizadas en la figura 1 y 2 fueron analizadas mediante PCR usando cebadores específicos para el promotor del IFN- $\gamma$ . Como control positivo fue utilizada una muestra de ADN genómico humano. (ADN)

Por lo tanto, Podemos confiar en nuestros resultados, los cuales muestran una clara expresión de los transcritos que codifican NFAT1, NFAT2, NFAT4 y NFAT5 en neutrófilos humanos, y la carencia de expresión del transcrito de NFAT3 en este tipo celular (**Figura 61**).

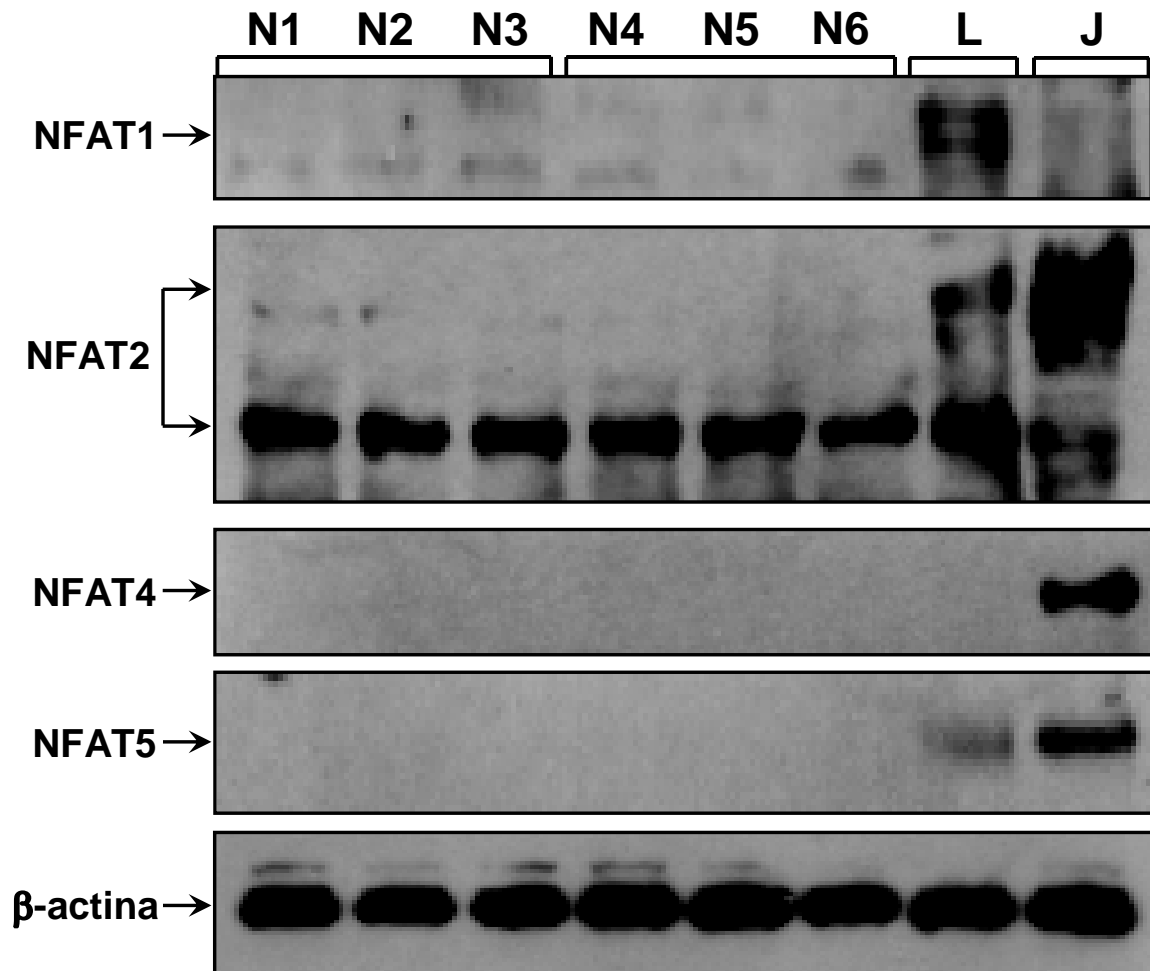
## **II.2. La proteína NFAT2 se expresa en neutrófilos humanos.**

La expresión de las diferentes isoformas de NFAT fue caracterizada mediante Western blotting usando anticuerpos específicos contra NFAT1, NFAT2, NFAT4 y NFAT5, los cuales no presentan reactividad cruzada. En estos experimentos, extractos totales de neutrófilos, en condiciones basales, fueron analizados junto con células Jurkat T y linfocitos de sangre periférica. La **Figura 64** (*ver página siguiente*) muestra que los linfocitos de sangre periférica expresan principalmente una isoforma que migra con un peso molecular aproximado de 130 kDa, como ha sido descrito anteriormente (Lyakh et al., 1997). Sin embargo solo fue detectada una banda débil inmunoreactiva de NFAT1 en células Jurkat T, lo que no está del todo de acuerdo con lo que ha sido descrito anteriormente (Lyakh et al., 1997). En contraste, la proteína NFAT1 no fue detectada en ningún lisado de neutrófilos examinado, lo cual también está de acuerdo con lo que ha sido descrito anteriormente (Wang et al., 1995). Sin embargo, fue detectada una fuerte expresión de la isoforma NFAT2 en todas las preparaciones de neutrófilos examinadas, apareciendo como una banda simple de aproximadamente 85 kDa. A diferencia de los neutrófilos, los linfocitos de sangre periférica y las células Jurkat T presentan una isoforma adicional con un peso molecular de aproximadamente 140 kDa, lo cual ha sido descrito anteriormente (Lyakh et al., 1997).

Como también muestra la **Figura 64**, no se observaron diferencias en los niveles de expresión de NFAT2 (banda de 85 kDa) entre sujetos sanos y pacientes alérgicos.

En lo que respecta a la expresión de la isoforma NFAT4, esta proteína no fue detectada en ninguno de los lisados de neutrófilos examinados, sin embargo se encontró dicha isoforma en células Jurkat T, manifestándose como una banda de aproximadamente 155 kDa (**Figura 64**), como se ha descrito anteriormente (Lyakh et al., 1997). La expresión de NFAT4 no fue detectada en linfocitos de sangre periférica, aunque en un trabajo previo fueron detectados niveles débiles de expresión de esta isoforma en linfocitos de sangre periférica, mediante el uso de Western blotting

radiactivo (Lyakh et al., 1997). Finalmente, una banda de 170 kDa que corresponde a la isoforma NFAT5, fue detectada en linfocitos de sangre periférica y en células Jurkat T activadas, que esta en concordancia con lo descrito anteriormente (Trama et al., 2000; Trama et al., 2002). Sin embargo, esta proteína no fue detectada en ninguno de los lisados de neutrófilos examinados (**Figura 64**).



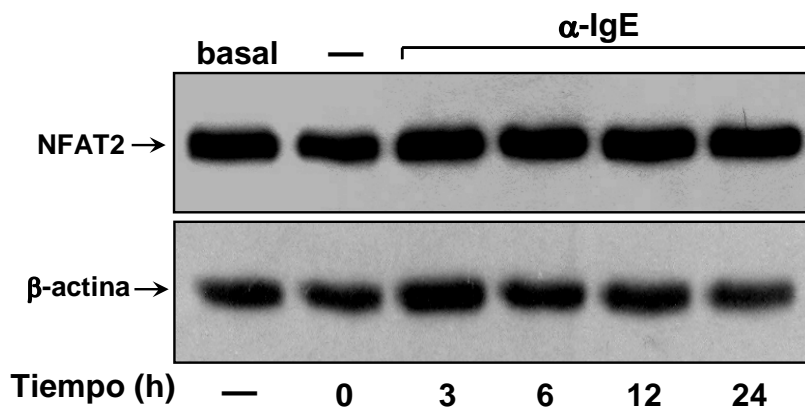
**Figura 64. Expresión de la isoforma NFAT2 en neutrófilos humanos.** La presencia de las 5 isoformas conocidas de NFAT fue analizada mediante Western blotting de extractos proteicos totales de neutrófilos en condiciones basales, tanto de sujetos sanos (N1-N3), como de pacientes alérgicos (N4-N6), así como de linfocitos de sangre periférica (L) y células Jurkat T (J) estimuladas con 100 nM de PMA y 500 nM de ionomicina, durante 5 horas, usados como controles positivos y negativos de la expresión de las diferentes isoformas de NFAT. La  $\beta$ -actina fue usada como control interno para verificar que fueron cargada la misma cantidad de proteínas por calle. Los resultados son representativos de 3 experimentos separados con resultados similares.

Comparando la **Figura 61** y la **Figura 64**, se hace evidente una ausencia de correlación entre la expresión a nivel de ARNm y proteína en lo que respecta a los genes de NFAT1, NFAT4 y NFAT5 en neutrófilos humanos. Esta ausencia de correlación entre los niveles de ARNm y proteína para estos genes ha sido encontrada anteriormente en basófilos (Schroeder et al., 2002), cerebro, médula espinal, corazón, estómago, hígado, pulmón y nódulo linfoide (Trama et al., 2000); sin embargo no se fueron dadas explicaciones acerca de este fenómeno.

Puede ser postulada la existencia en neutrófilos, de mecanismos de regulación postranscripcional que regulan la vida media del ARNm y/o su capacidad para ser traducido, los cuales pueden llevar a la ausencia de las proteínas NFAT1, NFAT4 y NFAT5 o a la presencia de unos niveles demasiado bajos de estas para ser detectados.

### II.3. La expresión de NFAT2 no es inducida por anticuerpos anti-IgE en neutrófilos de pacientes alérgicos.

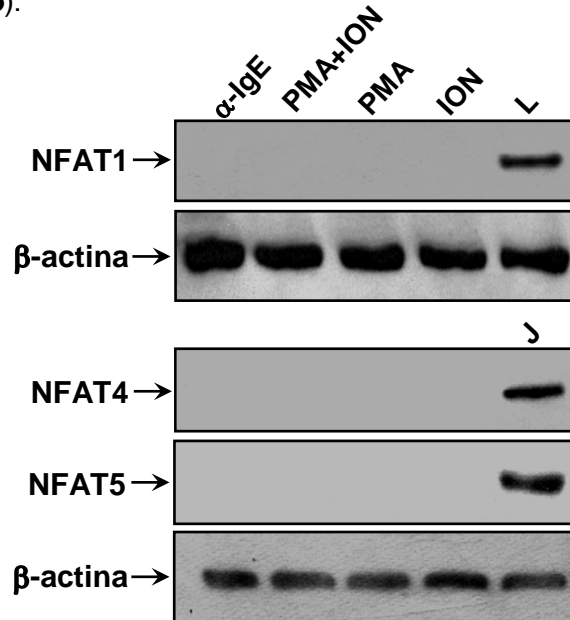
Dado que la mayoría de tipos celulares del sistema inmune presentan una expresión inducible de NFAT2, analizamos la expresión en el tiempo de NFAT2 en neutrófilos estimulados con anticuerpos anti-IgE. La **Figura 65** muestra que esta isoforma de NFAT se expresa constitutivamente en neutrófilos, y que sus niveles no varían con respecto al tiempo, ni con el tratamiento de las células con anticuerpos anti-IgE.



**Figura 65. NFAT2 se expresa de forma constitutiva en neutrófilos humanos.** Los extractos proteicos totales de neutrófilos fueron obtenidos inmediatamente después de su obtención (basal), o después del cultivo de los neutrófilos en ausencia o presencia de anti-IgE 10 µg/ml (α-IgE) los tiempos indicados. Los niveles de NFAT2 fueron analizados por Western blotting usando anticuerpos específicos contra a NFAT2 humano. La β-actina fue usada como control interno para verificar que fue cargada la misma cantidad de proteínas por calle. El resultado mostrado es representativo de al menos 3 experimentos independientes con resultados similares.

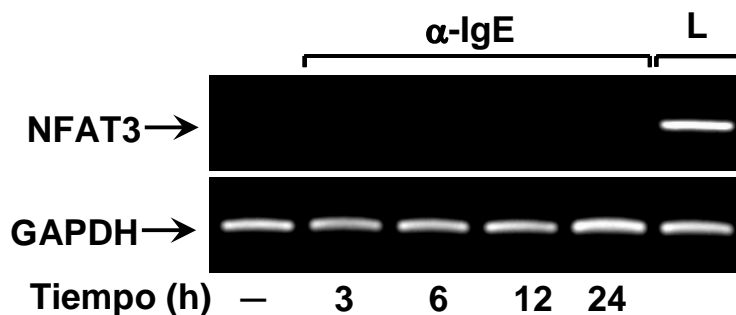


En cuanto al resto de isoformas de NFAT, no se observó expresión de NFAT1, NFAT4 o NFAT5 tras el tratamiento de las células con anticuerpos anti-IgE, o con inductores clásicos de la expresión de NFAT como son la ionomicina y/o el ester de forbol (**Figura 66**).



**Figura 66. Ausencia de expresión de las isoformas NFAT1, NFAT4, NFAT5 en neutrófilos humanos.** Los neutrófilos de un paciente alérgico fueron cultivados 5 horas en presencia o ausencia de anti-IgE ( $\alpha$ -IgE; 10  $\mu$ g/ml), ionomicina (ION; 100 nM) y/o ester de forbol (PMA; 100 nM). Las células fueron lisadas y la expresión de NFAT1, NFAT4 y NFAT5 fue analizada por Western blotting usando anticuerpos específicos contra esas isoformas.

Dado que el ARNm de NFAT3 no fue detectado en neutrófilos en condiciones basales (**Figura 61**), analizamos la posibilidad de que su expresión fuera inducida por anti-IgE con resultados negativos (**Figura 67**).

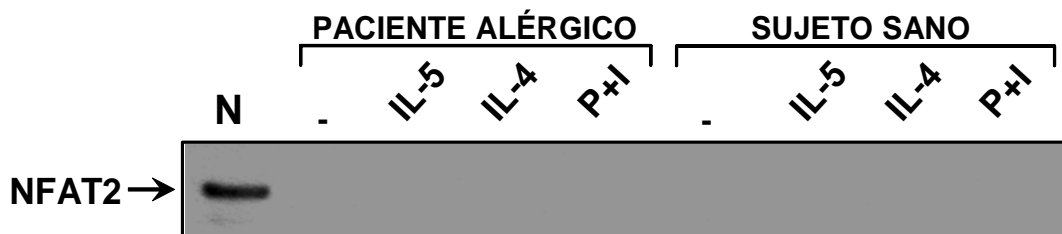


**Figura 67. Ausencia de expresión del ARN mensajero de la isoforma NFAT3 en neutrófilos humanos.** Los neutrófilos de un paciente alérgico fueron cultivados 5 horas en presencia o ausencia de anti-IgE ( $\alpha$ -IgE; 10  $\mu$ g/ml) los tiempos indicados. La presencia del ARNm que codifica NFAT3 fue analizada por RT-PCR usando cebadores específicos para esa isoforma. Como control positivo fue usado ARN de linfocitos sin tratar (L). La GAPDH fue utilizada

Todos los datos encontrados indican que NFAT2 es la única isoforma de esta familia de factores de transcripción expresada por neutrófilos humanos y que su expresión es constitutiva, a pesar de su comportamiento inducible en la mayoría de tipos leucocitarios (Lyakh et al., 1997; Amasaki et al., 2000), con la excepción de basófilos (Schroeder et al., 2002). Al contrario que NFAT2, NFAT1, la cual no fue detectada en neutrófilos, ha sido mostrada como la isoforma más común de NFAT y que presenta una expresión constitutiva en un amplio rango de tipos leucocitarios (Wang et al., 1995; Shaw et al., 1996; Aramburu et al., 1995; Jinquan et al., 1999; Lyakh et al., 1997).

#### **II.4. Alergenos específicos y anticuerpos anti-IgE inducen la translocación nuclear de NFAT2 en neutrófilos de pacientes alérgicos.**

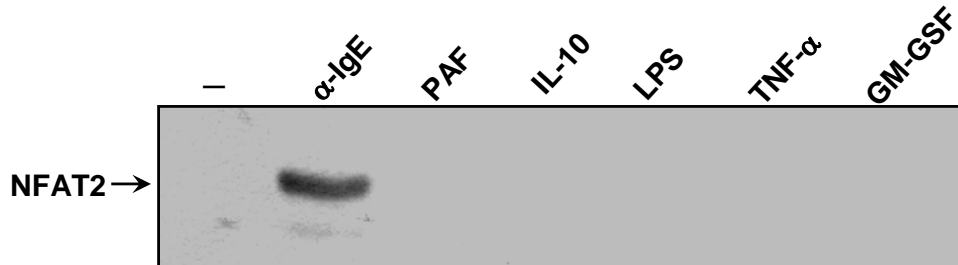
A continuación investigamos el efecto del tratamiento con activadores clásicos de NFAT, tales como la ionomicina, ester de forbol, IL-4 e IL-5, los cuales promueven su translocación nuclear. No obstante, no fue encontrada activación de NFAT2 en ningún caso, ni en sujetos sanos, ni en pacientes alérgicos, como se deduce de su ausencia en los extractos nucleares (**Figura 68**).



**Figura 68. Estimuladores clásicos de la translocación nuclear de NFAT fallan induciendo la translocación de NFAT2 en neutrófilos humanos.** Los neutrófilos tanto de un paciente alérgico, como de un sujeto sano fueron cultivados 4 horas en presencia o ausencia de anti-IgE ( $\alpha$ -IgE; 10  $\mu$ g/ml), IL-5 (50 ng/ml), IL-4 (50 ng/ml), o PMA y ionomicina (P+I; 100 nM de cada uno). Los niveles nucleares de NFAT2 fueron analizados por Western blotting. Como control positivo se utilizó un extracto proteico total de neutrófilos (N).

Resultados similares fueron obtenidos al analizar los efectos de varios agonistas de diversas funciones del neutrófilo, tales como son IL-10, lipopolisacárido

de *E. coli*, TNF- $\alpha$ , GM-CSF y el factor activador de plaquetas. Como se muestra en la **Figura 69**, ninguno de estos agentes tuvo efecto sobre la translocación nuclear de NFAT2.



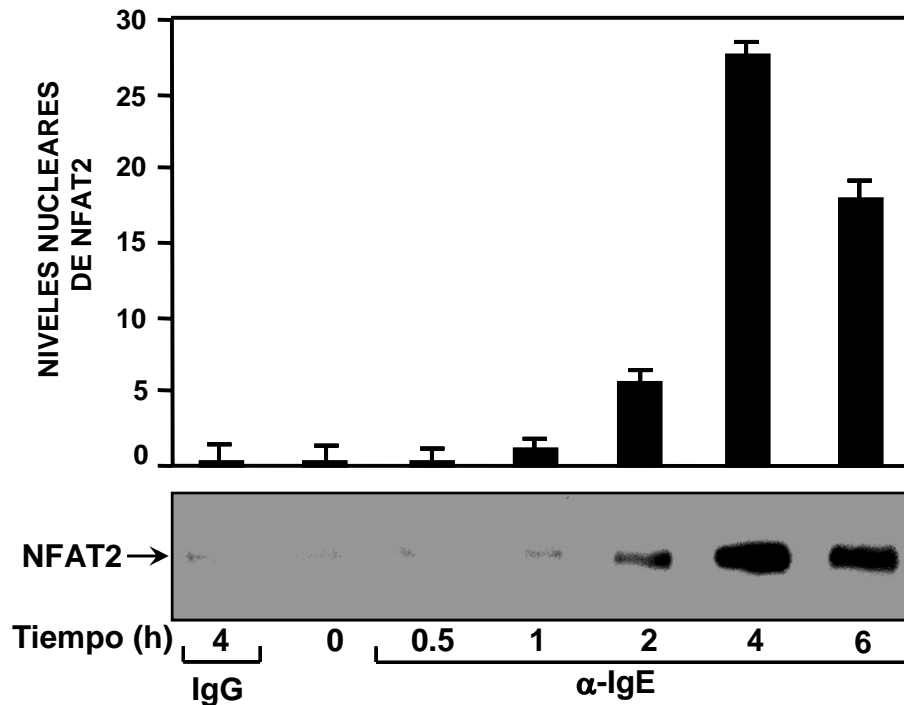
**Figura 69. Estimuladores clásicos de funciones del neutrófilo fallan induciendo la translocación nuclear de NFAT2 en neutrófilos humanos.** Los neutrófilos de pacientes alérgicos fueron cultivados 4 horas en presencia o ausencia de anti-IgE ( $\alpha$ -IgE; 10  $\mu$ g/ml), PAF (5  $\mu$ g/ml), IL-10 (50 ng/ml), LPS (1  $\mu$ g/ml), TNF- $\alpha$  (10 ng/ml) o GM-CSF (50 ng/ml). Se aislaron las proteínas nucleares y los niveles de NFAT2 fueron analizados por Western blotting.

Existen muchas evidencias de la participación del neutrófilo en procesos alérgicos (Lee et al., 1982; Nagy et al., 1982; Boulet et al., 2004; Montefort et al., 1994). En este sentido, ciertos estudios han demostrado la presencia en neutrófilos humanos de los tres tipos de receptor para IgE, es decir, Fc $\epsilon$ RI (Gounni et al., 2001), Fc $\epsilon$ RII/CD23 (Yamaoka et al., 1996) y galectin-3 (Truong et al., 1993).

Nuestro grupo ha demostrado anteriormente que alérgenos fueron capaces de activar respuestas funcionales en neutrófilos de pacientes sensibilizados a esos mismos alérgenos (Monteseirín et al., 1996; Monteseirín et al., 2001; Monteseirín et al., 2003). Además, hemos demostrado la presencia en la superficie del neutrófilo, de moléculas de IgE específicas contra los alérgenos a los cuales estaban sensibilizados los pacientes, así como la unión de esos alérgenos a la superficie del neutrófilo (Monteseirín et al., 2001; Monteseirín et al., 2003).

Dado que existen artículos anteriores que muestran la intervención de un mecanismo dependiente IgE en la translocación al núcleo de NFAT2 en basófilos y mastocitos (Schroeder et al., 2002; Hock et al., 2003), analizamos si la presencia de anticuerpos anti-IgE o alérgenos específicos, podría inducir la translocación nuclear de NFAT2 en neutrófilos humanos.

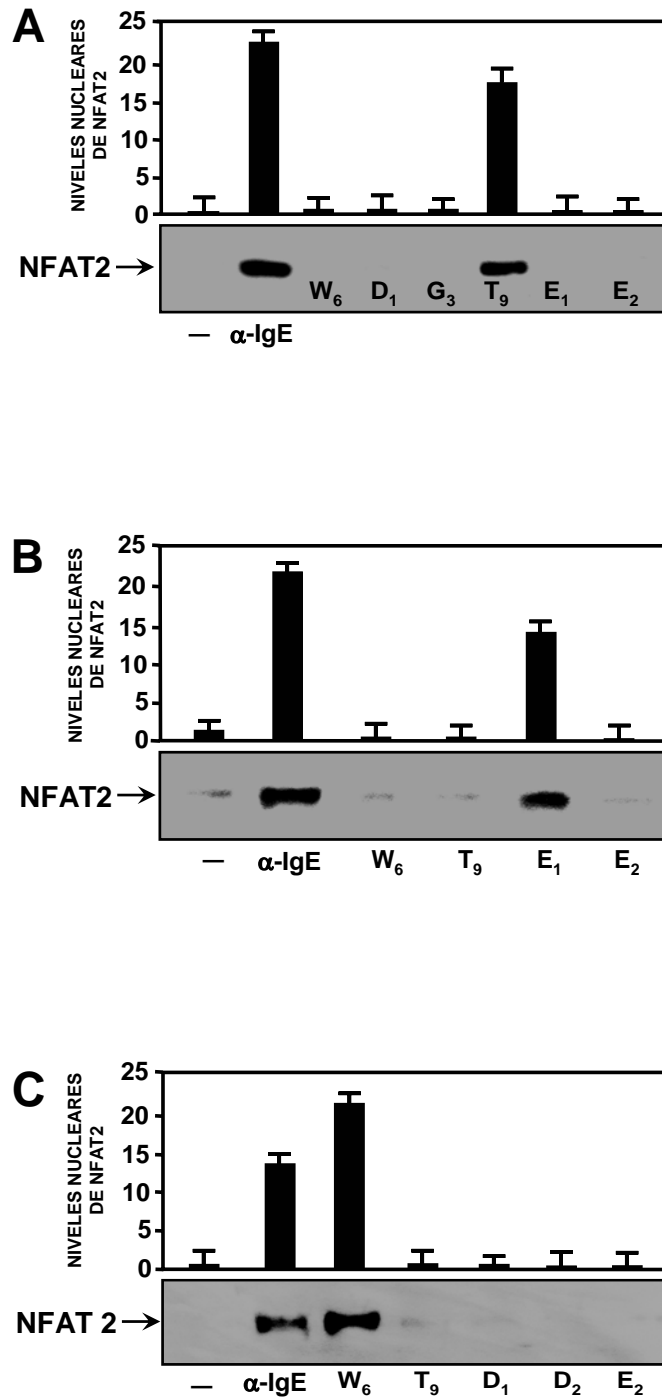
La **Figura 70** muestra que en neutrófilos de pacientes alérgicos se produce una acumulación nuclear de NFAT2 tras el tratamiento con anticuerpos anti-IgE.



**Figura 70.** Anticuerpos anti-IgE inducen la translocación nuclear de NFAT2 en neutrófilos de pacientes alérgicos. Los neutrófilos aislados de un paciente alérgico fueron estimulados con de 10  $\mu\text{g/ml}$  de anti-IgE ( $\alpha\text{-IgE}$ ) durante los tiempos indicados, o incubados con 10  $\mu\text{g/ml}$  de IgG durante 4 horas. Se obtuvieron los extractos nucleares y los niveles de NFAT2 fueron analizados por Western blotting usando anticuerpos específicos anti-NFAT2 humano. Los histogramas mostrados encima de cada calle representan la media  $\pm$  error estándar de la cuantificación de al menos 3 experimentos separados.

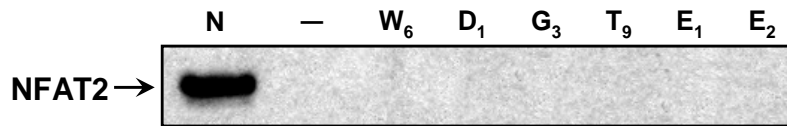
Sin embargo no fue observado efecto alguno cuando los neutrófilos se trataron con IgG inespecífica, un control del fragmento Fc del anticuerpo anti-IgE, el cual al ser una IgG, presenta receptores en la superficie del neutrófilo.

La **Figura 71** (ver página siguiente) muestra la gran especificidad en la respuesta a alérgenos. Como se muestra en la figura, los neutrófilos de tres pacientes alérgicos, los cuales estaban sensibilizados específicamente a  $T_9$ ,  $E_1$ , o  $W_6$ , presentaron una acumulación nuclear de NFAT2 cuando estos se trataron con alérgenos a los cuales estaba sensibilizado cada paciente ( $T_9$  en el apartado A,  $E_1$  en el B y  $W_6$  en el C). Sin embargo, cuando los neutrófilos fueron tratados con alérgenos a los cuales el paciente no se encuentra sensibilizado, no se observó translocación nuclear de NFAT2 (**Figura 71**).



**Figura 71. Alérgenos específicos inducen la translocación nuclear de NFAT2 en neutrófilos de pacientes alérgicos a esos alérgenos.** Los neutrófilos de 3 pacientes alérgicos sensibilizados el primero a T<sub>9</sub> (A), el segundo a E<sub>1</sub> (B) y el tercero a W<sub>6</sub> (C), se trataron durante 4 horas con 10  $\mu$ g/ml de anti-IgE ( $\alpha$ -IgE) o con los alérgenos especificados (W<sub>6</sub>, D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub>, G<sub>3</sub>, T<sub>9</sub>, E<sub>1</sub> o E<sub>2</sub>) a una concentración de 10  $\mu$ g/ml. Se obtuvieron los extractos nucleares y los niveles de NFAT2 fueron analizados por Western blotting usando anticuerpos específicos para NFAT2 humano. Los histogramas encima de cada calle representan la media  $\pm$  error estandar de los valores de la cuantificación de al menos 3 experimentos separados.

La especificidad de la respuesta a alérgenos fue analizada en neutrófilos de sujetos sin ningún tipo de patología alérgica. En este caso, ninguno de los alérgenos que se probaron provocó la translocación nuclear de NFAT2 (**Figura 72**).



**Figura 72. Ausencia de translocación nuclear de NFAT2 en neutrófilos de sujetos sanos en respuesta a alérgenos.** Los neutrófilos de un sujeto sano fueron cultivados en ausencia o presencia de serie de alérgenos (W<sub>6</sub>, D<sub>1</sub>, G<sub>3</sub>, T<sub>9</sub>, E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub>) o anti-IgE ( $\alpha$ -IgE) a una concentración de 10  $\mu$ g/ml durante 4 horas. Entonces, se aislaron las proteínas nucleares y los niveles nucleares de NFAT2 fueron analizados mediante Western blotting. Como control positivo fue usado un extracto total de neutrófilo (N).

Dado que artículos anteriores muestran la presencia en la superficie del neutrófilo de moléculas de IgE reactivas contra alérgenos a los cuales los pacientes se encontraban sensibilizados, y la ausencia de moléculas IgG específicas para estos alérgenos (Monteseirín et al., 2003), se puede plantear la hipótesis de que los alérgenos se podrían unir a las moléculas de IgE específica contra estos, que están asociadas previamente a sus receptores en la membrana celular.

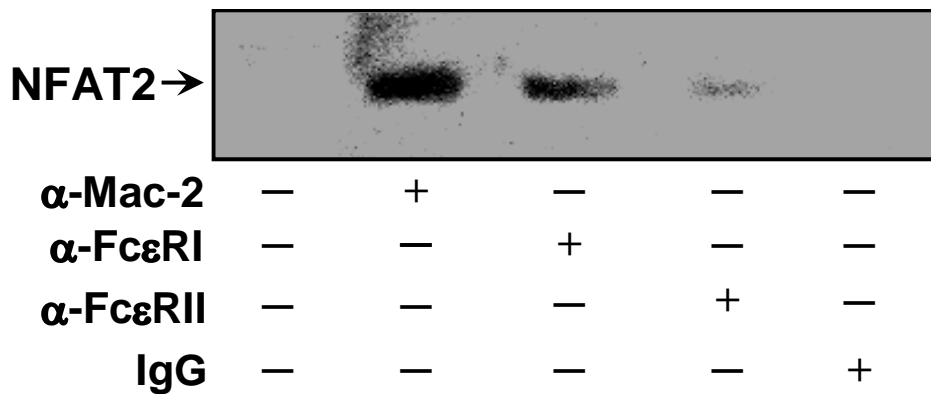
Este mecanismo, basado en la especificidad de unión entre los alérgenos y las moléculas de IgE, podría explicar por que ni los neutrófilos de sujetos sanos, ni los de pacientes alérgicos muestran translocación nuclear de NFAT2 cuando son tratados con alérgenos a los cuales no están sensibilizados.

En estos casos, los alérgenos no podrían unirse específicamente a la IgE que está unida a su receptor localizado en la superficie celular, con lo cual la transmisión de señales intracelulares que conducen a la translocación nuclear de NFAT2 no podría ser iniciada.

### **II.5. Receptores de IgE implicados en la translocación nuclear de NFAT2 en neutrófilos de pacientes alérgicos.**

Una vez encontrada la existencia de un mecanismo dependiente IgE implicado en la translocación nuclear de NFAT2, nos propusimos averiguar qué tipo de receptor de IgE media la transmisión de señales intracelulares que conduce a la translocación

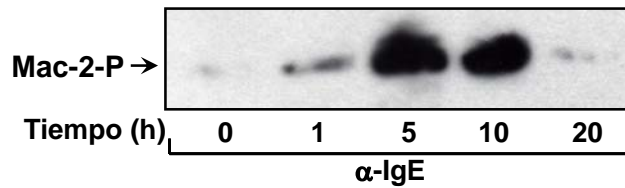
nuclear de NFAT2. Para ello cultivamos los neutrófilos 4 horas con anticuerpos específicos contra cada uno de los receptores conocidos de IgE. Si bien estos anticuerpos podrían no tener efecto sobre la activación del neutrófilo, hay que mencionar que estos mismos anticuerpos han tenido efectos estimuladores sobre otros procesos celulares, entre los que se encuentran la liberación de proteína catiónica del eosinófilo por neutrófilos (manuscrito en preparación) y la expresión dependiente de IgE de la COX-2 en linfocitos humanos (manuscrito en preparación). Como se muestra en la **Figura 73**, el anticuerpo anti-Mac-2/galectina-3 tuvo un fuerte efecto sobre la translocación nuclear de NFAT2, el anticuerpo anti-FcεRI tuvo un efecto algo menor y el anti-FcεRII prácticamente no tuvo efecto.



**Figura 73. Receptores de IgE implicados en la translocación nuclear de NFAT2 en neutrófilos de pacientes alérgicos.** Los neutrófilos de un paciente alérgico fueron cultivados en presencia o ausencia de 5 µg/ml de anti-Mac-2 (α-Mac-2), 5 µg/ml de anti-FcεRII (α-FcεRII), 5 µg/ml de anti-FcεRI (α-FcεRI) o 5 µg/ml de IgG durante 4 horas y los niveles nucleares de NFAT2 se analizaron por Western blotting.

Una vez averiguado qué receptores están implicados en la translocación nuclear de NFAT2 y con antecedentes sobre la transmisión de señales a través del FcεRI y del FcεRII/CD23 (Sada et al., 2001), en los cuales su activación deriva en la fosforilación del tallo citoplásmico de ambos receptores, nos propusimos investigar si el Mac-2, el cual presenta varios residuos de tirosina susceptibles de ser fosforilados, se fosforila por un mecanismo dependiente de IgE. Como muestra la **Figura 74** (ver página siguiente), el tratamiento de los neutrófilos con anticuerpos anti-IgE incrementó

el nivel de fosforilación del Mac-2, adquiriendo su máximo nivel de fosforilación a los 5 minutos.

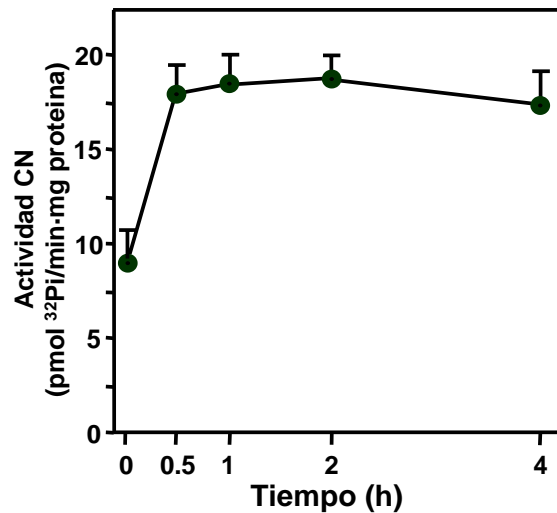


**Figura 74. Activación dependiente de IgE de la fosforilación del Mac-2 en neutrófilos de pacientes alérgicos.** Los neutrófilos de un paciente alérgico fueron cultivados en presencia o ausencia de 10  $\mu\text{g/ml}$  de anti-IgE ( $\alpha\text{-IgE}$ ) los tiempos indicados. Tras la incubación, las células fueron lisadas y el extracto proteico total fue inmunoprecipitado con anti-fosfotirosina. Este inmunoprecipitado fue analizado por Western blotting usando un anticuerpo monoclonal anti-Mac-2 humano.

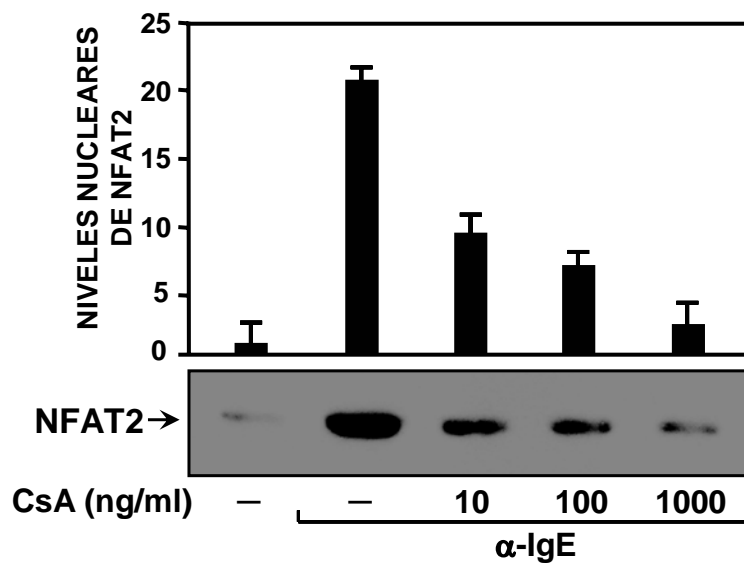
## **II.6. La calcineurina regula la translocación nuclear de NFAT2 en neutrófilos de pacientes alérgicos.**

La calcineurina juega un papel muy importante en la señalización a través de  $\text{Ca}^{2+}$  en células T, mediando la activación de factores de transcripción tales como NFAT y NF- $\kappa\text{B}$  (Frantz et al., 1991; Liu et al., 1991; Fruman et al., 1992; O'Keefe et al., 1992; Clipstone et al., 1992; Schmidt et al., 1990; Crabtree et al., 1999). Determinadas drogas inmunosupresoras como la ciclosporina A y el FK506 inhiben la activación de estos factores de transcripción actuando a través de la calcineurina (O'Keefe et al., 1992; Clipstone et al., 1992; Crabtree et al., 1999). Nuestro grupo ha demostrado que los neutrófilos expresan constitutivamente la calcineurina (Carballo et al., 1999), y que en estas células se produce una liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de un mecanismo dependiente de IgE (Monteseirín et al., 1996). Con estas bases de conocimiento, planteamos la hipótesis de que los anticuerpos anti-IgE podrían ejercer sus efectos a través de la regulación de la actividad de la calcineurina. Para estudiar esta posibilidad, analizamos la actividad de la calcineurina en neutrófilos humanos cultivados en presencia de anticuerpos anti-IgE. Encontramos que el tratamiento de los neutrófilos con anticuerpos anti-IgE produce un fuerte incremento de la actividad CaN, alcanzando esta sus niveles máximos tras 30 minutos de tratamiento y manteniéndose durante 4 horas (**Figura 75**) (ver página siguiente).





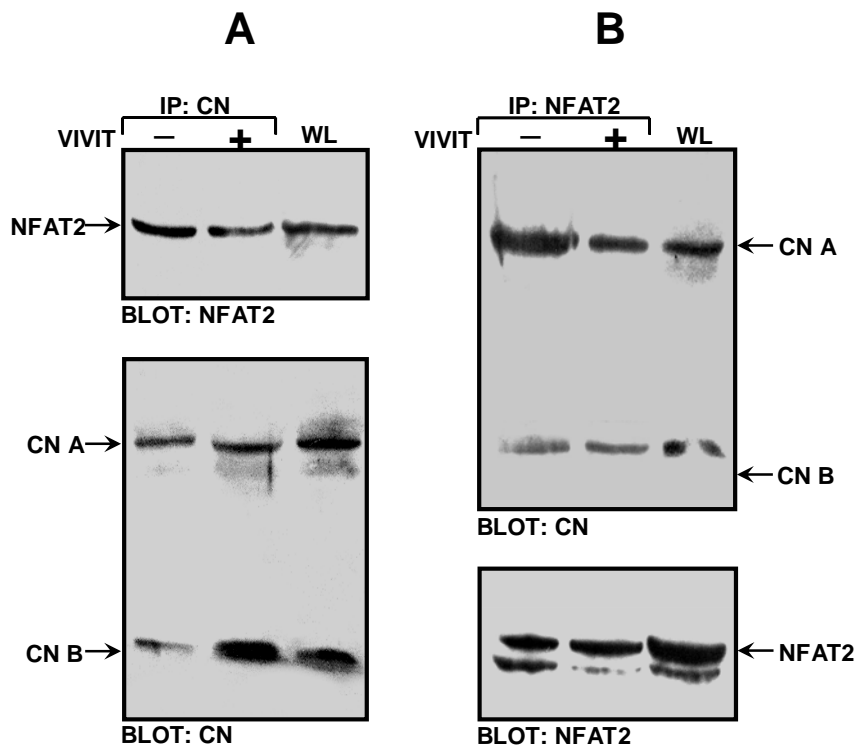
**Figura 75. Activación dependiente de IgE de la calcineurina en neutrófilos de pacientes alérgicos.** Los neutrófilos de un paciente alérgico fueron cultivados con 10  $\mu$ g/ml de anti-IgE, los tiempos indicados. Las células fueron lisadas y la actividad calcineurina se examinó en el extracto proteico. La grafica representa los valores de la media  $\pm$  error estandard de 4 experimentos separados, analizados por tipicado.



**Figura 76. Participación de la calcineurina en la translocación nuclear de NFAT2 dependiente de IgE en neutrófilos de pacientes alérgicos.** Los neutrófilos de un paciente alérgico fueron cultivados con ciclosporina A (CsA) a las dosis indicadas, 1 hora antes de la adición de 10  $\mu$ g/ml de anti-IgE ( $\alpha$ -IgE) durante 4 horas. Los niveles nucleares de NFAT2 fueron analizados por Western blotting usando anticuerpos específicos contra NFAT2 humano. Los histogramas encima de cada calle representan la media  $\pm$  error estandard de los valores de la cuantificación de al menos 3 experimentos separados.

Ésto nos impulsó a analizar si la translocación nuclear en respuesta a anticuerpos anti-IgE era dependiente de la CaN. Como muestra la **Figura 76**, un inhibidor específico de la CaN, la ciclosporina A, previene la translocación nuclear de

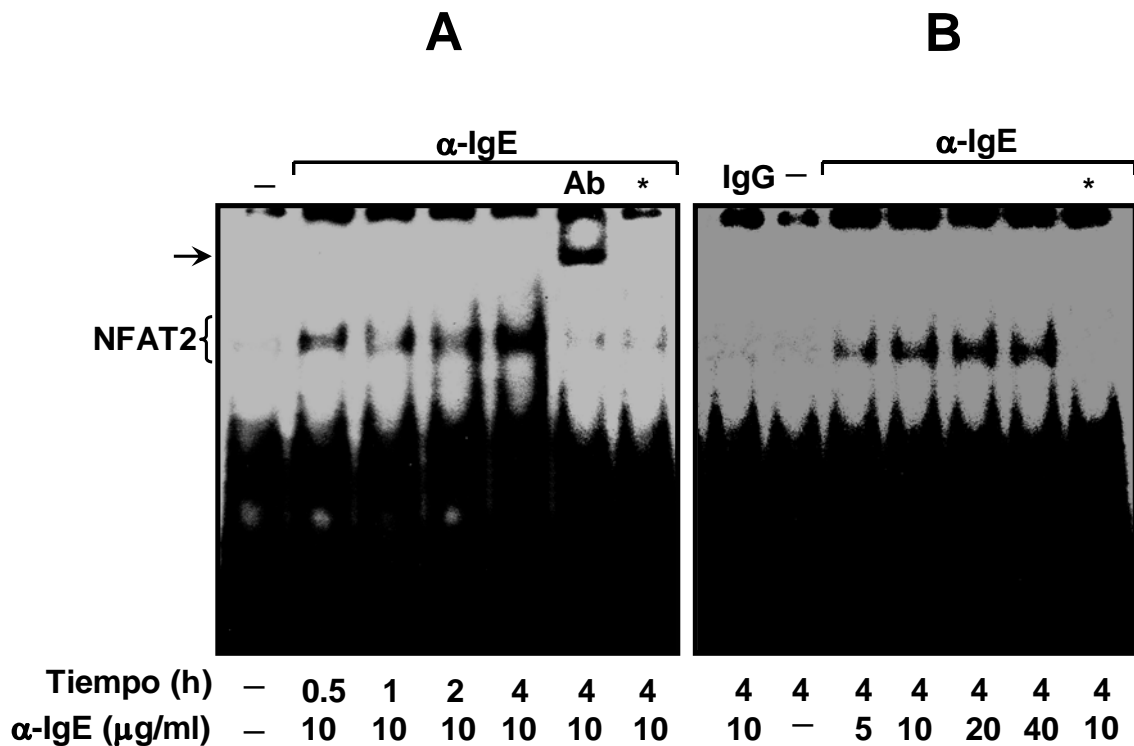
NFAT2 en neutrófilos de pacientes alérgicos activados con anticuerpos anti-IgE de manera dependiente de dosis. Una vez observado el efecto inhibitor de la ciclosporina A sobre la translocación nuclear dependiente de IgE de NFAT2 y el incremento de la actividad CaN tras el tratamiento con anticuerpos anti-IgE, nos propusimos analizar si existía interacción física entre la CaN y NFAT2. Los resultados de coimmunoprecipitación mostrados en la **Figura 77** ilustran que estas moléculas interaccionan físicamente, dado que, tanto NFAT2, como las dos subunidades de la calcineurina, A y B, pueden ser precipitadas conjuntamente, usando tanto anticuerpos anti-CaN, como anti-NFAT2. Además, el péptido VIVIT, el cual compite con NFAT por su unión con la CaN (Aramburu et al., 1999), inhibe parcialmente la interacción entre estas dos moléculas (**Figura 77**).



**Figura 77. Coimmunoprecipitación de NFAT2 con la calcineurina en neutrófilos humanos.** **A**, los lisados celulares totales (1 mg de proteína) de neutrófilos humanos lisados tras su obtención, fueron cultivados a 4 ° C durante 18 horas con anticuerpos anti-CaN en ausencia o presencia de 50 µg/ml de péptido VIVIT. Tras inmunoprecipitar (IP), los pellet fueron analizados por Western blotting usando anti-NFAT2 (panel de arriba). La membrana se lavó de anticuerpos y se incubó con anti-CaN (panel de abajo). **B**, la inmunoprecipitación se llevó a cabo como en el panel A, excepto porque se usó anticuerpos anti-NFAT2, y el consiguiente análisis por Western blotting se llevó a cabo usando anticuerpos anti-CaN (panel de arriba). Después del lavado de anticuerpos, la membrana se analizó usando anticuerpos anti-NFAT2 (panel de abajo). Como control positivo de la presencia de NFAT2, el inmunoprecipitado fue analizado junto a 80 µg de un lisado total de neutrófilos (WL).

**II.7. Los anticuerpos anti-IgE incrementan la actividad de unión al ADN de NFAT2.**

Para comprobar que, además de la mera presencia de NFAT en neutrófilos humanos, esta proteína era funcionalmente activa y capaz de formar complejos de unión al ADN, usamos un oligonucleótico específico para NFAT, como sonda en análisis de retardo en gel, llevados a cabo con extractos nucleares de neutrófilos tratados con anticuerpos anti-IgE. Como se muestra en la **Figura 78**, la formación de complejos ADN-proteína inducida por anticuerpos anti-IgE ocurría tanto de forma dependiente de tiempo (siendo detectado después de 30 minutos de tratamiento y persistiendo por al menos 4 horas) (**Figura 78A**), como dependiente de dosis (**Figura 78B**).



**Figura 78. Los anticuerpos anti-IgE incrementan la actividad de unión al ADN de NFAT2 en neutrófilos de pacientes alérgicos.** Los neutrófilos de un paciente alérgico fueron tratados con 10 µg/ml anti-IgE (α-IgE) durante los tiempos indicados (**A**), o las dosis indicadas de anti-IgE durante 4 horas (**B**). Entonces, los extractos nucleares fueron obtenidos y la actividad de unión a la sonda de NFAT marcada con <sup>32</sup>P fue analizada mediante análisis del cambio en la movilidad electroforética. Como control negativo se usaron neutrófilos tratados con 10 µg/ml de IgG no específica durante 4 horas (IgG). Los ensayos llevados a cabo en presencia de 1 µl de anti-NFAT2 (Ab) o en presencia de 100 veces más de exceso de sonda sin marcar (\*) fueron realizados en extractos nucleares de neutrófilos tratados con 10 µg/ml de anti-IgE durante 4 horas.

La formación del complejo fue inhibida específicamente por la adición de 100 veces más de sonda sin marcar de NFAT al extracto nuclear. Dado que NFAT2 es la única isoforma expresada constitutivamente por los neutrófilos, su pertenencia al complejo de ADN-proteína formado fue verificada usando un anticuerpo monoclonal anti-NFAT2. Como también muestra la **Figura 78A**, este anticuerpo superretrasa el complejo de ADN-proteína formado.

La **Figura 78B** muestra, que los niveles máximos de unión de NFAT al ADN fueron alcanzados a una dosis de 10 µg/ml de anticuerpos anti-IgE a las 4 horas de tratamiento, y que el mismo tratamiento con IgG inespecífica no tuvo ningún efecto. Los resultados presentados indican por lo tanto, que el tratamiento con anticuerpos anti-IgE incrementa la actividad de unión al ADN de NFAT, y que la proteína NFAT2 es parte del complejo ADN-proteína formado bajo esas condiciones.

Colectivamente, nuestros resultados muestran que NFAT2 es el único miembro de la familia de factores de transcripción de NFAT expresado en los neutrófilos humanos, y muestran evidencias de que la calcineurina juega un papel en su translocación nuclear mediada por IgE.

Hasta la fecha, únicamente NF-κB ha sido implicado en procesos mediados por la calcineurina en los neutrófilos, siendo sus efectos mediados a través de la activación de la quinasa de I-κB (Frantz et al., 1994). Recientemente, una nueva proteína, expresada fundamentalmente en neutrófilos, denominada “CaN/NFAT-activating and immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM)-containing protein” o CNAIP, ha sido sugerida como molécula intermediaria entre la calcineurina y la activación de NFAT2 (Yang et al., 2003). Nuestros datos sugieren un papel para NFAT2 en la patogenia del estado alérgico y provee fuertes evidencias de que la transcripción de genes involucrados en la respuesta alérgica mediada por NFAT2 es regulada a través de la activación de la calcineurina en neutrófilos humanos.

# CONCLUSIONES



Los resultados de este trabajo permiten establecer las siguientes **conclusiones**:

**Con relación al objetivo nº 1:**

1. La expresión de la NOS2 inducida por LPS/IFN- $\gamma$  en macrófagos se encuentra fuertemente inhibida por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a concentraciones tan bajas de tan solo 10  $\mu$ M. La activación de las monoaminas oxidasas con diferentes sustratos inhibe la expresión de la NOS2. En esta inhibición está involucrado el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como molécula efectora. La combinación de vanadato y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/ó sustratos de monoaminas oxidasas potencia el efecto inhibitor del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre la NOS2, sugiriendo que la especie reactiva es un derivado del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/vanadato.
2. Describimos asimismo, que especies reactivas de oxígeno derivadas de la reacción de Fenton están implicadas tanto en la inhibición de la expresión de la NOS2 por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exógena, como por la producida por monoaminas oxidasas.
3. La presencia de inhibidores específicos de las monoaminas oxidasas, cancela la inhibición ejercida por sus sustratos sobre la expresión de la NOS2, indicando que el efecto de las monoaminas oxidasas es específico.
4. Una posible implicación fisiológica de la inhibición sobre la NOS2 ejercida por las monoaminas oxidasas, vía H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, podría ser la disminución en la producción de peroxinitrito, actuando como un mecanismo citoprotector frente la síntesis de radicales tóxicos de oxígeno.

**Con relación al objetivo nº 2:**

1. Los alérgenos y los anticuerpos anti-IgE inducen la expresión de la COX-2, tanto a nivel de proteína, como de ARNm en neutrófilos de pacientes alérgicos a dichos alérgenos. Esta expresión se traduce en la síntesis de prostaglandina E<sub>2</sub>. El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> añadido exógenamente induce la expresión de la COX-2 tanto a nivel de proteína como de ARNm.

2. Los anticuerpos anti-IgE activan la NADPH oxidasa, como se observa por la translocación de sus subunidades citosólicas (p47<sup>phox</sup>/p67<sup>phox</sup>) a la membrana plasmática y por la producción de O<sub>2</sub><sup>-</sup>. Esta activación es necesaria para la inducción de la expresión de la COX-2 dependiente de IgE. Tanto los anticuerpos anti-IgE, como los alérgenos activan la p38/ERK1/2 MAP quinasas, y NF-κB, y en esta activación está implicada la NADPH oxidasa.

3. En la señalización intracelular implicada en la expresión de la COX-2 observamos la participación de la vía de las MAP quinasas y NF-κB.

4. Las especies reactivas de oxígeno derivadas de la reacción de Fenton están implicada tanto en la inducción dependiente de IgE de la COX-2, como en la activación dependiente IgE de la ruta de las MAP quinasas y NF-κB.



**Con relación al objetivo nº 3:**

**1.** Los datos presentados en este trabajo, muestran de manera original, que los neutrófilos humanos expresan la isoforma NFAT2, a nivel de proteína, y las isoformas NFAT1, NFAT2, NFAT4 y NFAT5 a nivel de ARNm. No encontramos diferencias de expresión de la proteína y de los transcritos en las células procedentes de pacientes alérgicos o sujetos sanos.

**2.** La isoforma NFAT2 se transloca del citosol al núcleo tras estimulación con anticuerpos anti-IgE o alérgeno específica, y no tras estimulación con activadores clásicos de NFAT como la IL-5, IL-4, el PMA y/o ionomicina. Los anticuerpos anti-IgE incrementan la actividad de unión al ADN de NFAT2.

**3.** La activación dependiente de IgE de NFAT2 es dependiente de la calcineurina, ya que la ciclosporina A la inhibe. Además, se produce una activación de la calcineurina tras estimulación con anticuerpos anti-IgE y existe interacción física entre la calcineurina y NFAT2.



# BIBLIOGRAFÍA



- Aas, K., Belin, L.** (1974) Suggestions for biological quantitative testing and standadization of allergen extracts. *Acta allergol.* **29**, 238-244.
- Adderley, S. R., Fitzgerald, D. J.** (1999) Oxidative damage of cardiomyocytes is limited by extracellular regulated kinases 1/2-mediated induction of cyclooxygenase-2. *J. Biol. Chem.* **274**, 5038-5046.
- Aderem, A. A, Albert K. A, Keum M. M., Wang J. K., Greengard, P., Cohn, Z. A.** (1988) Stimulus-dependent myristoylation of a major substrate for protein kinase C. *Nature* **332**, 362-364.
- Alessi, D. R., Cuenda, A., Cohen, P., Dudley, T., Saltiel, A. R.** (1995) PD 098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase kinase *in vitro* and *in vivo*. *J. Biol. Chem.* **270**, 27489-27494.
- Alvarez-Maqueda, M., El Bekay, R., Alba, G., Monteseirin, J., Chacon, P., Vega, A., Martin-Nieto, J., Bedoya, F. J., Pintado, E., Sobrino, F.** (2004) 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J<sub>2</sub> induces heme oxygenase-1 gene expression in a reactive oxygen species-dependent manner in human lymphocytes. *J. Biol. Chem.* **279**, 21929-21937.
- Amasaki, Y., Adachi, S., Ishida, Y., Iwata, M., Arai, N., Arai, K., Miyatake, S. A.** (2002) A constitutively nuclear form of NFAT $\kappa$  shows efficient transactivation activity and induces differentiation of CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T cells. *J. Biol. Chem.* **277**, 25640-25648.
- Amasaki, Y., Miyatake, S., Arai, N., Arai, K.** (2000) Regulation of nuclear factor of activated T-cell family transcription factors during T-cell development in the thymus. *J. Allergy Clin. Immunol.* **106**, S1-S9.
- American Thoracic Society.** (1962) Definitions and classifications of chronic bronchitis, asthma and emphysema. *Am. Rev. Respir. Dis.* **85**, 762-768.
- Amir, R.E., Haecker, H., Karin, M., and Cicchanover, A.** Mechanism of processing of the NF- $\kappa$ B2 p100 precursor: identification of the specific polyubiquitin chain-anchoring lysine residue and analysis of the role of NEDD8-modification on the SCF ( $\beta$ -TrCP) ubiquitin ligase. *Oncogene.* **2004**, 23: 2540-2547.
- Antczak, A., Nowak, D., Bialasiewicz, P., Kasielski, M.** (1999) Hydrogen peroxide in expired air condensate correlates positively with early steps of peripheral neutrophil activation in asthmatic patients. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* **47**, 119-126.
- Appleby, S. B., Ristimäki, A., Nelson, K., Narko, K., Hla, T.** (1994) Structure of the human cyclooxygenase-2 gene. *Biochem. J.* **302**, 723-727.

**Aramburu, J., Azzoni, L., Rao, A., Perussia, B.** (1995) Activation and expression of the nuclear factors of activated T cells, NFATp and NFATc, in human natural killer cells: regulation upon CD16 ligand binding. *J. Exp. Med.* **182**, 801-810.

**Aramburu, J., Garcia-Cózar, F., Raghavan, A., Okamura, H., Rao, A., Hogan, P. G.** (1998) Selective inhibition of NFAT activation by a peptide spanning the calcineurin targeting site of NFAT. *Mol. Cell* **1**, 627-637.

**Aramburu, J., Rao, A., Klee, C. B.** (2000) Calcineurin: from structure to function. *Curr. Top. Cell. Regul.* **36**, 237-295.

**Aramburu, J., Yaffe, M. B., Lopez-Rodriguez, C., Cantley, L.C., Hogan, P. G., Rao, A.** (1999) Affinity-driven peptide selection of an NFAT inhibitor more selective than cyclosporin A. *Science* **285**, 2129-2133.

**Aydi, N. J., Malcolm, K. C., Nick, J. A., Worthen, G. S.** (2002) A role for protein phosphatase-2A in p38 mitogen-activated protein kinase-mediated regulation of the c-Jun NH(2)-terminal kinase pathway in human neutrophils. *J. Biol. Chem.* **277**, 40687-40696.

**Babior, B. M., Kipnes, R. S., Curnutte, J. T.** (1973) Biological defense mechanisms. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. *J. Clin. Invest.* **52**, 741-744.

**Bae, Y. S., Kang, S. W., Seo, M. S., Baines, I. C., Tekle, E., Chok, P. B., Rhee, S. G.** (1997) Epidermal growth factor (EGF)-induced generation of hydrogen peroxide. Role in EGF receptor-mediated tyrosine phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **272**, 217-221.

**Barat, C., Tremblay, M. J.** (2003) Treatment of human T cells with bisperoxovanadium phosphotyrosyl phosphate inhibitors leads to activation of cyclooxygenase-2 gene. *J. Biol. Chem.* **278**, 6992-7000.

**Barbieri, S. S., Eligini, S., Brambilla, M., Tremoli, E., Colli, S.** (2003) Reactive oxygen species mediate cyclooxygenase-2 induction during monocyte to macrophage differentiation: critical role of NADPH oxidase. *Cardiovasc. Res.* **60**, 187-197.

**Barbry, P., Champe, M., Chassande, O., Munemitsu, S., Champigny, G., Lingueglia, E., Maes, P., Frelin, C., Tartar, A., Ullrich, A.** (1990) Human kidney amiloride-binding protein: cDNA structure and functional expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 7347-7351.

**Barnes, J. P.** (1996) What is the role of nerves in chronic asthma and symptoms? *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **156**, S5-S8.

**Barnes, P. J., Adcock, I. M.** (1997) NF- $\kappa$ B: A pivotal role in asthma and new target for therapy. *Trends Biochem. Sci.* **18**, 46-50.

- Barranco-sanz, P., Cabañes-Higuero, N.** (2004) *Alergia mediada por IgE*. En: ASMA. Mra Ed. Barcelona.
- Beals<sup>a</sup>, C. R., Clipstone, N. A., Ho, S. N., Crabtree, G. R.** (1997) Nuclear localization of NF-ATc by a calcineurin-dependent, cyclosporin-sensitive intramolecular interaction. *Genes & Dev.* **11**, 824-834.
- Beals<sup>b</sup>, C. R., Sheridan, C. M., Turck, C. W., Gardner, P., Crabtree, G. R.** (1997) Nuclear export of NF-ATc enhanced by glycogen synthase kinase-3. *Science* **275**, 1930-1934.
- Bechoua, S., Daniel, L. W.** (2001) Phospholipase D is required in the signaling pathway leading to p38 MAPK activation in neutrophil-like HL-60 cells, stimulated by N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine. *J. Biol. Chem.* **276**, 31752-31759.
- Belvisi, M. G., Saunders M. A., Haddad B., Hirst S. J., Yacoub M. H., Barnes P. J., Mitchell, J. A.** (1997) Induction of cyclooxygenase-2 by cytokines in human cultured airway smooth muscle cells: novel inflammatory role of this cell type. *Br. J. Pharmacol.* **120**, 910-916.
- Benna, J. E., Dang, P. M., Gaudry, M., Fay, M., Morel, F., Hakim, J., Gougerot-Pocidallo, M. A.** (1997) Phosphorylation of the respiratory burst oxidase subunit p67<sup>phox</sup> during human neutrophil activation. Regulation by protein kinase C-dependent and independent pathways. *J. Biol. Chem.* **272**, 17204-17208.
- Ben-Neriah, Y.** (2002) Regulatory functions of ubiquitination in the immune system. *Nat. Immunol.* **3**, 20-26.
- Berliner, S., Rogowski, O., Rotstein, R., Fusman, R., Shapira, I., Bornstein, N. M., Prochorov, V., Roth, A., Keren, G., Eldor, A., Zeltser, D.** (2000) Activated polymorphonuclear leukocytes and monocytes in the peripheral blood of patients with ischemic heart and brain conditions correspond to the presence of multiple risk factors for atherothrombosis. *Cardiology* **94**, 19-25.
- Bhattacharya, S. K., Das, N., Rao, P. J.** (1988) Brain monoamines during carrageenan-induced acute paw inflammation in rats. *J. Pharm. Pharmacol.* **40**, 518-520.
- Bianco, S., Robuschi, M., Ceserani, R., Gandolfi, C.** (1990) Effects of prostacyclin on aspecifically and specifically induced bronchoconstriction in asthmatic subjects. *Eur. J. Respir. Dis.* **106**, 81-87.
- Bockoch, G. M.** (1995) Chemoattractant signaling and leukocyte activation. *Blood* **86**, 1649-1660.
- Bogdan, C., Röllinghoff, M., Diefenbach, A.** (2000) Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. *Curr. Opin. Immunol.* **12**, 64-76.
- Bogoyevitch, M. A., and Court, N. W.** (2004) Counting on mitogen-activated protein kinases-ERKs 3, 4, 5, 6, 7 and 8. *Cell Signal* **16**, 1345-1354.

- Bohler, T., Waiser, J., Hepburn, H., Gaedeke, J., Lehmann, C., Hambach, P., Budde, K., Neumayer, H. H.** (2000) TNF- $\alpha$  and IL-1 $\alpha$  induce apoptosis in subconfluent rat mesangial cells. Evidence for the involvement of hydrogen peroxide and lipid peroxidation as second messengers. *Cytokine* **12**, 986-991.
- Bonner, S., Yan, S. R., Byers, D. M., Bortolussi, R.** (2001) Activation of extracellular signal-related protein kinases 1 and 2 of the mitogen-activated protein kinase family by lipopolysaccharide requires plasma in neutrophils from adults and newborns. *Infect. Immun.* **69**, 3143-3149.
- Borregaard, N., Cowland, J. B.** (1997) Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood* **89**, 3503-3521.
- Boschetto, P., Mapp, C. E., Picotti, G., Fabbri, L. M.** (1989) Neutrophils and asthma. *Eur Respir J.* **2**, 456s-459s.
- Boulet, L. P., Turcotte, H., Boutet, M., Montminy, L., Laviolette, M.** (1993) Influence of natural antigenic exposure on expiratory flows, methacholine responsiveness, and airway inflammation in mild allergic asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* **91**, 883-993.
- Boveris, A., Oshino, N., Chance, B.** (1972) The cellular production of hydrogen peroxide. *Biochem. J.* **128**, 617-630.
- Böyum, A.** (1986) Isolation of mononuclear cells and granulocytes from blood. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **97**, 77-89.
- Brun, J., Jones, R.** (2001) Nonsteroidal anti-inflammatory drug-associated dyspepsia: The scale of the problem. *Am. J. Med.* **110**, 12S-13S.
- Buchmuller-Rouiller, Y., Corrandin, S. B., Smith, J., Schneider, P., Ransijn, A., Jongeneel, C. V., Mael, J.** (1995) Role of glutathione in macrophage activation: effect of cellular glutathione depletion on nitrite production and leishmanicidal activity. *Cell Immunol.* **164**, 73-80.
- Buffoni, F.** (1966) Histaminase and related amine oxidases. *Pharmacol. Rev.* **18**, 1163-1199.
- Butcher, E. C., Picker, L. J.** (1996) Lymphocyte homing and homeostasis. *Science*, **272**, 60-66.
- Bystrom, J., Garcia, R. C., Hakansson, L., Karawajczyk, M., Moberg, L., Soukka, J., Venge, P.** (2002) Eosinophil cationic protein is stored in, but not produced by, peripheral blood neutrophils. *Clin. Exp. Allergy* **32**, 1082-1091.
- Caiwano, M., Cohen, P.** (2000) Role of mitogen-activated protein kinase cascades in mediating lipopolysaccharide-stimulated induction of cyclooxygenase-2 and IL-1 $\beta$  in RAW 264 macrophages. *J. Immunol.* **164**, 3018-3025.



- Callingham, B. A., Holt, A., Elliott, J.** (1991) Properties and functions of the semicarbazide-sensitive amine oxidase. *Biochem. Soc. Trans.* **19**, 228-233.
- Carballo, M., Márquez, G., Conde, M., Martín-Nieto, J., Monteseirín, J., Conde, J., Pintado, E., and Sobrino, F.** (1999) Characterization of calcineurin in human neutrophils. Inhibitory effect of hydrogen peroxide on its enzyme activity and on NF- $\kappa$ B DNA binding. *J. Biol. Chem.* **274**, 93-100.
- Carballo, M., Vilaplana, R., Márquez, G., Conde, M., Bedoya, F. J., Gonzalez-Vílchez, F., Sobrino, F.** (1997) A newly synthesized molecule derived from ruthenium cation, with antitumour activity, activates NADPH oxidase in human neutrophils. *Biochem. J.* **328**, 559-564.
- Cárdenas, M. E., Muir, R. S., Breuder, T., Heitman, J.** (1995) Targets of immunophilin-immunosuppressant complexes are distinct highly conserved regions of calcineurin A. *EMBO J.* **14**, 2772-2783.
- Carey, M. A., Germolec, D. R., Bradbury, J. A., Gooch, R. A., Moorman, M. P., Flake, G. P., Langerbach, R., Zeldin, D. C.** (2003) Accentuated T helper type 2 airway response after allergen challenge in cyclooxygenase-1 *-/-* but not cyclooxygenase-2 *-/-* mice. *Am. Crit. Care. Med.* **167**, 1509-1515.
- Cassatella, M. A., Cappelli R., Della Bianca, V., Grzeskowiak M., Dusi S., Berton, G.** (1988) Interferon- $\gamma$  activates human neutrophil oxygen metabolism and exocytosis. *Immunology* **63**, 499-506.
- Cassatella, M. A., Gasperini, S., Calzetti, F., McDonald, P. P., Trinchieri, G.** (1995) Lipopolysaccharide-induced interleukin-8 gene expression in human granulocytes: transcriptional inhibition by interferon- $\gamma$ . *Biochem. J.* **310**, 751-755.
- Chance, B., willinams, G. R., Hollunger, G.** (1963) Inhibition of electron and energy transfer in mitochondria. 1. Effects of Amytal, thiopental, rotenone, progesterone, and methylene glycol. *J. Biol. Chem.* **238**, 418-431.
- Chandel, N. S., Maltepe, E., Goldwasser, E., Mathieu, C. E., Simon, M. C., Schumacker, P. T.** (1998) Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **95**, 11715-11720.
- Chandrasekharan, N. V., Drai, H., Roos, K. L. T., Evanson, N. K., Tomsik, J. Elton, T. S., Simmons, D. L.** (2002) COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **99**, 13926-13931.
- Chanock, S. J., El Benna, J., Smith, R. M., Babior, B. M.** (1994) The respiratory burst oxidase. *J. Biol. Chem.* **269**, 24519-22.

**Chen, C. C., Sun, Y. T., Chen, J. J., Chang, Y. J.** (2001) Tumour necrosis factor- $\alpha$ -induced cyclooxygenase-2 expression via sequential activation of ceramide-dependent mitogen-activated protein kinases, and I $\kappa$ B kinase 1/2 in human alveolar epithelial cells. *Mol. Pharmacol.* **59**, 493-500.

**Chen, C. C., Sun, Y. T., Chen, J. J., Chiu, K. T.** (2000) TNF- $\alpha$ -induced cyclooxygenase-2 in human lung epithelial cells: Involvement of the phospholipase C- $\gamma$ 2, protein kinase C- $\alpha$ , tyrosine kinase, NF- $\kappa$ B-inducing kinase, and I- $\kappa$ B kinase pathway. *J. Immunol.* **165**, 2719-2728.

**Chen, C. Y., Gharzi, R., Ony, S. E., Chan, E. L., Raijmakers, R., Pruijn, G. J., Stoaeklin, G., Moroni, C., Mann, M., Karin, M.** (2001) AU binding proteins recruit the exosome to degrade ARE-containing mRNAs. *Cell* **107**, 451-464.

**Chen, Q., Olashaw, N., Wu, J.** (1995) Participation of reactive oxygen species in the lysophosphatidic acid-stimulated mitogen-activated protein kinase activation pathway. *J. Biol. Chem.* **270**, 28499-28502.

**Cheng, T. H., Shih, N. L., Chen, S. Y., Wang, D. L., Chen, J. J.** (1999) Reactive oxygen species modulate endothelin-I-induced c-fos gene expression in cardiomyocytes. *Cardiovasc. Res.* **41**, 654-662.

**Chin, E. R., Olson, E. N., Richardson, J. A., Yang, Q., Humphries, C., Shelton, J. M., Wu, H., Zhu, W., Bassel-Duby, R., Williams, R. S.** (1998) A calcineurin-dependent transcriptional pathway controls skeletal muscle fiber type. *Genes Dev.* **12**, 2499-2509.

**Cho, S.H., Seo, J.Y., Choi, D.C., Yoon, H.J., Cho, Y.J., Min, K.U., Lee, G.K., Seo, J.W., Kim, Y.Y.** (1996) Pathological changes according to the severity of asthma. *Clin. Exp. Allergy* **26**, 1210-1219.

**Chow, C. W., Rincón, M., Cavanagh, J., Dickens, M., Davis, R. J.** (1997). Nuclear accumulation of NFAT4 opposed by the TNK signal transduction pathway. *Science* **278**, 1638-1641.

**Chow, C. W., Rincón, M., Davis, R. J.** (1999). Requirement for transcription factor NFAT in interleukin-2 expression. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 2300-2307.

**Chow, C. W., Davis, R. T.** (2000) Integration of calcium and cyclic AMP signaling pathways by 14-3-3. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 702-712.

**Chuang, T. H., Bohl, B. P., Bokoch, G. M.** (1993) Biologically active lipids are regulators of Rac. GDI complexation. *J. Biol. Chem.* **268**, 26206-26211.

**Chuvpilo, S., Avots, A., Berberich-Siebelt, F., Glockner, J., Fischer, C., Kerstan, A., Escher, C., Inashkina, I., Hlubek, F., Jankevics, E., Brabletz, T., Serfling, E.** (1999) Multiple NF-ATc isoforms with individual transcriptional properties are synthesized in T lymphocytes. *J. Immunol.* **162**, 7294-7301.

- Clark, A. R., Dean, J. L., Saklivala, J.** (2003) Post-transcriptional regulation of gene expression by mitogen-activated protein kinase p38. *FEBS Lett.* **546**, 37-44.
- Clipstone, N. A., Crabtree, G. R.** (1992) Identification of calcineurin as a key signalling enzyme in T-lymphocyte activation. *Nature* **357**, 695-697.
- Cock, S. J., Acton, S. J., Morrinson, A. R.** (2003) The proximal region of the 3'-untranslated region of cyclooxygenase-2 is recognized by a multimeric protein complex containing HuR, TIA-1, TIAR, and the heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein U. *J. Biol. Chem.* **278**, 36157-36162.
- Conklin, D. J., Langford, S. D., Boor, P. J.** (1998) Contribution of serum and cellular semicarbazide-sensitive amine oxidase to amine metabolism and cardiovascular toxicity. *Toxicol. Sci.* **46**, 386-392
- Conrad, D. H.** (1990) FcεRII/CD23: the low affinity receptor for IgE. *Annu. Rev. Immunol.* **8**, 623-645.
- Crabtree, G. R.** (1999) Generic signals and specific outcomes: signaling through Ca<sup>2+</sup>, calcineurin, and NF-AT. *Cell* **96**, 611-614.
- Crivici, A., Ikura, M.** (1995) Molecular and structural basis of target recognition by calmodulin. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **24**, 85-116.
- Crofford, L. J., Tan, B., McCarthy, C. J., Hla, T.** (1997) Involvement of nuclear factor kappa B in the regulation of cyclooxygenase-2 expression by interleukin-1 in rheumatoid synoviocytes. *Arthritis Rheum.* **40**, 226-236.
- Cronin, C. N., Zhang, X., Thompson, D. A., McIntire, W. S.** (1998) cDNA cloning of two splice variants of a human copper-containing monoamine oxidase pseudogene containing a dimeric Alu repeat sequence. *Gene* **220**, 71-76.
- Cuenda, A., Rouse, J., Doza, Y. N., Meier, R., Cohen, P., Gallagher, T. F., Young, P. R., Lee, J. C.** (1995) SB 203580 is a specific inhibitor of a MAP kinase homologue which is stimulated by cellular stresses and interleukin-1. *FEBS Lett.* **364**, 229-333.
- Cui, X. L., Douglas, J. G.** (1997) Arachidonic acid activates c-jun N-terminal kinase through NADPH oxidase in rabbit proximal tubular epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **94**, 3771-3776.
- Curnutte, J. T.** (1992) Molecular basis of the autosomal recessive forms of chronic granulomatous disease. *Immunodef. Rev.* **3**, 149-172.
- Cybulsky, M. I., Gimbrone, M. A. Jr.** (1991) Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science* **251**, 788-791.

**D'Acquisto, F., Luvone, T., Rombolá, L., Sautebin, L., Di Rosa, M., Carnuccio, R.** (1997) Involvement of NF- $\kappa$ B in the regulation of cyclooxygenase-2 protein expression in LPS-stimulated J774 macrophages. *FEBS Lett.* **418**, 175-178.

**Dahlgren, C., Johansson, A., Orselius, K.** (1989) Difference in hydrogen peroxide release between human neutrophils and neutrophil cytoplasts following calcium ionophore activation. A role of the subcellular granule in activation of the NADPH-oxidase in human neutrophils?. *Biochim. Biophys. Acta.* **1010**, 41-48.

**Darley-Usmar, V., Wiseman, H., Halliwell, B.** (1995) Nitric oxide and oxygen radicals: a question of balance. *FEBS Lett.* **369**, 131-135.

**De Gregorio, R., Iñiguez, M. A, Fresno, M., Alemany, S.** (2001) Cot kinase induces cyclooxygenase-2 expression in T cells through activation of the nuclear factor of activated T cells. *J. Biol. Chem.* **276**, 27003-27009.

**De Leo, F., Ulman, K., Davis, A., Julita, K. Quinn, M.** (1996) Assembly of the human neutrophil NADPH oxidase involves binding of p67<sup>phox</sup> and flavocytochrome b to a common functional domain in p47<sup>phox</sup>. *J. Biol. Chem.* **271**,17013-17020.

**De Mendez, I., Garrett, M. C., Adams, A. G. Leo, T.** (1994) Role of p67<sup>phox</sup> SH3 domains in assembly of the NADPH oxidase system. *J. Biol. Chem.* **269**, 16326-16332.

**De Witt, D. L.** (1999) COX-2-selective inhibitors: the new super aspirins. *Mol. Pharmacol.* **55**, 625-631.

**Dean, J. J. E., Brook, M., Clack, A. R., Saklatvala, J.** (1999) p38 Mitogen-activated protein kinase regulates cyclooxygenase-2 mRNA stability and transcription in lipopolysaccharide-treated human monocytes. *J. Biol. Chem.* **274**, 264-269.

**Dean, J. L., Sully, G., Wail, R., Rawlinson, L., Clark, A. R., Saklatvala, J.** (2002) Identification of a novel AU-rich-element-binding protein which is related to AUF-1. *Biochem. J.* **366**, 709-719.

**Demoly, P., Jaffuel, D., Lequeux, N., Weksler, B., Creminon, C., Michel, F. B, Godard, P., Bousquet, J.** (1997) Prostaglandin H synthase -1 and -2 immunoreactivities in the bronchial mucosa of asthmatic. *Am. J. Crit. Care. Med.* **155**, 670-675.

**Detmers, P. A., Zhou, D., Polizzi, E., Thieringer, R., Hanlon, W. A., Vaidya, S., Bansal, V.** (1998) Role of stress-activated mitogen-activated protein kinase (p38) in  $\beta$ 2-integrin-dependent neutrophil adhesion and the adhesion-dependent oxidative burst. *J. Immunol.* **161**, 1921-1929.

- Dhar, A., Young, M. R., Colburn, N. H.** (2002) The role of AP-1, NF- $\kappa$ B and ROS/NOS in skin carcinogenesis: the JB6 model is predictive. *Mol. Cell Biochem.* **234-235**, 185-193.
- Diatchuk, V., Lotan, O., Koshkin, V., Wikstroem, P., Pick, E.** (1997) Inhibition of NADPH oxidase activation by 4-(2-aminoethyl)-benzenesulfonyl fluoride and related compounds. *J. Biol. Chem.* **272**, 13292-13301.
- Diehn, M., Alizadeh, A. A., Rando, O. J., Liu, C. L., Stankunas, K., Botstein, D., Crabtree, G. R., Brown, P. O.** (2002) Genomic expression programs and the integration of the CD28 costimulatory signal in T cell activation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**, 11796-11801.
- Ding, A. H., Nathan, C. F.** (1987) Trace levels of bacterial lipopolysaccharide prevent interferon- $\gamma$  or tumor necrosis factor- $\alpha$  from enhancing mouse peritoneal macrophage respiratory burst capacity. *J. Immunol.* **139**, 1971-1977.
- Ding, A. H., Nathan, C. F., Stuehr, D. J.** (1988) Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *J. Immunol.* **141**, 2407-2412.
- Dixon, C. A., Batch, G. C., kaderska, N., Anderson, P., Zimmerman, G.A., Beauchamp, R. D., Prescott, S.M.** (2003) Regulation of cyclooxygenase-2 expression by the transcriptional silencer TIA-1. *J. Exp. Med.* **198**, 475-481.
- Dixon, D. A., Tolley, N. D., King, P. H., Nabors, L. B., Metntyrs, T. M., Zimmermman, G. A., Prescott, S.M.** (2001) Altered expression of the mRNA stability factor HuR promotes cyclooxygenase-2 expression in colon cancer cells. *J. Clin. Invest.* **108**, 1657-1665.
- Dong, C., Davis, R. J., Flavell, R. A.** (2002) MAP kinases in the immune response. *Annu. Rev. Immunol.* **20**, 55-72.
- Dumont, P., Balbeur, L., Remacle, J., Toussaint, O.** (2000) Appearance of biomarkers of *in vitro* ageing after successive stimulation of WI-38 fibroblasts with IL-1 $\alpha$  and TNF- $\alpha$ : senescence associated  $\beta$ -galactosidase activity and morphotype transition. *J. Anat.* **197**, 529-537.
- Edwards, S. W.** (1995) Cell Signalling by integrins and immunoglobulin receptors in primed neutrophils. *Trends Biochem. Sci.* **20**, 362-367.
- El Bekay, R., Alvarez, M., Carballo, M., Martin-Nieto, J., Monteseirin, J., Pintado, E., Bedoya, F. J., Sobrino, F.** (2002) Activation of phagocytic cell NADPH oxidase by norfloxacin: a potential mechanism to explain its bactericidal action. *J. Leukoc. Biol.* **71**, 255-61.

**El Bekay, R., Alvarez, M., Monteseirin, J., Alba, G., Chacon, P., Vega, A., Martin-Nieto, J., Jimenez, J., Pintado, E., Bedoya, F. J., Sobrino, F.** (2003) Oxidative stress is a critical mediator of the angiotensin II signal in human neutrophils: involvement of mitogen-activated protein kinase, calcineurin, and the transcription factor NF- $\kappa$ B. *Blood* **102**, 662-671.

**El Benna, J., Faust, L. P. Babior, B. M.** (1994) The phosphorylation of the respiratory burst oxidase component p47<sup>phox</sup> during neutrophil activation. Phosphorylation of sites recognized by protein kinase C and by proline-directed kinases. *J. Biol. Chem.* **269**, 23431-23436.

**El Benna, J., Han, J., Park, J. W., Schmid, E., Ulevitch, R. J., Babior, B. M.** (1996) Activation of p38 in stimulated human neutrophils: phosphorylation of the oxidase component p47<sup>phox</sup> by p38 and ERK but not by JNK. *Arch. Biochem. Biophys.* **334**, 395-400.

**Endo, T., Ogushi, F., Kawano, T., Sone, S.** (1995) Induction of cyclooxygenase-2 is responsible for interleukin 1 $\beta$  dependent prostaglandin E<sub>2</sub> synthesis by human lung fibroblasts. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* **12**, 358-365.

**Enrique-Tarancon, G., Castan, I., Morin, N., Marti, L., Abella, A., Camps, M., Casamitjana, R., Palacin, M., Testar, X., Degerman, E., Carpena, C., Zorzano, A.** (2000) Substrates of semicarbazide-sensitive amine oxidase co-operate with vanadate to stimulate tyrosine phosphorylation of insulin-receptor-substrate proteins, phosphoinositide 3-kinase activity and GLUT4 translocation in adipose cells. *Biochem. J.* **350**, 171-180.

**Enrique-Tarancon, G., Marti, L., Morin, N., Lizcano, J. M., Unzeta, M., Sevilla, L., Camps, M., Palacin, M., Testar, X., Carpena, C., Zorzano, A.** (1998) Role of semicarbazide-sensitive amine oxidase on glucose transport and GLUT4 recruitment to the cell surface in adipose cells. *J. Biol. Chem.* **273**, 8025-8032.

**Escott, K. J., Belvisi, M. G., Birrell, M. A., Webber, S. E., Forter, M. L., Sargent, C. A.** (2000) Effect of p38 kinase inhibitor, SB 203580, on allergic airway inflammation in the rat. *Br. J. Pharmacol.* **131**, 173-176.

**Fabbri, M., Bianchi, E., Fumagalli, L., Pardi, R.** (1999) Regulation of lymphocyte traffic by adhesion molecules. *Inflamm. Res.* **48**, 239-246

**Fabian, I., Aronson, M.** (1978) MAO activity of macrophages at rest and during phagocytosis. *Biochem. Pharmacol.* **27**, 1909-1911.

**Fahy, O., Hammad, H., Senechal, S., Pestel, J., Tonnel, A. B., Wallaert, B., Tsicopoulos, A.** (2000) Synergistic effect of diesel organic extracts and allergen Derp1 on the release of chemokines by

peripheral blood mononuclear cells from allergic subjects: Involvement of the MAP kinase pathway. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **23**, 247-254.

**Faurshou, M., Borregaard, N.** (2003) Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes. Infect.* **5**, 1317-1327.

**Fialkow, L., Chan, C. K., Rotin, D., Grinstein, S., Downey, G. P.** (1994) Activation of the mitogen-activated protein kinase signaling pathway in neutrophils. Role of oxidants. *J. Biol. Chem.* **269**, 31234-31242.

**Fiebich, B.L., Muecksh B., Boehringer M., Hüll M.** (2000) Interleukin-1 $\beta$  induces cyclooxygenase-2 and prostaglandin E<sub>2</sub> synthesis in human neuroblastoma cells: Involvement of p38 mitogen-activated protein kinase and nuclear factor  $\kappa$ B. *J. Neurochem.* **75**, 3018-3025.

**Finkel, T.** (1998) Oxygen radicals and signaling. *Curr. Opin. Cell Biol.* **10**, 248-253.

**Fischer, E. H., Charbonneau, H. and Tonks, N. K.** (1991) Protein tyrosine phosphatases: a diverse family of intracellular and transmembrane enzymes. *Science* **253**, 401-406.

**Floyd, R. A., Hensley, K.** (2000) Nitron inhibition of age-associated oxidative damage. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **899**, 222-237.

**Forman, H. J., Torres, M., Fukuto, J.** (2002) Redox signaling. *Mol. Cell. Biochem.* **234-235**, 49-62.

**Frank, G. D., Eguchi, S., Yamakawa, T., Tanaka, S., Inagami, T. Motley, E. D.** (2000) Involvement of reactive oxygen species in the activation of tyrosine kinase and extracellular signal-regulated kinase by angiotensin II. *Endocrinology.* **141**, 3120-3126.

**Frantz, B., Nordby, E. C., Bren, G., Steffan, N., Paya, C. V., Kincaid, R. L., Tocci, M. J., O'Keefe, S. J., O'Neill, E. A.** (1994) Calcineurin acts in synergy with PMA to inactivate I  $\kappa$ B/MAD3, an inhibitor of NF- $\kappa$ B. *EMBO J.* **13**, 861-870.

**Freeman, B. A., Crapo, J. D.** (1982) Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab. Invest.* **47**, 412-426.

**Freeman, J. L., Lambeth, J. D.** (1996) NADPH oxidase activity is independent of p47phox *in vitro*. *J. Biol. Chem.* **271**, 22578-22582.

**Fruman, D. A., Klee, C. B., Bierer, B. E., Burakoff, S. J.** (1992) Calcineurin phosphatase activity in T lymphocytes is inhibited by FK 506 and cyclosporin A. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **89**, 3686-3690.

**Gallin, J. I., Fletcher, M. P., Seligmann, B. E., Hoffstein, S., Cehrs, K., Mounessa, N.** (1982) Human neutrophil-specific granule deficiency: a model to assess the role of neutrophil-specific granules in the evolution of the inflammatory response. *Blood* **59**, 1317-1329.

**Gallois, C., Habib, A., Tao, J., Moulin, S., Maclouf, J., Mallat, A., Lotersztajn, S.** (1998) Role of NF- $\kappa$ B in the antiproliferative effect of endothelin-1 and tumour necrosis factor- $\alpha$  in human hepatic stellate cells. Involvement of cyclooxygenase-2. *J. Biol. Chem.* **273**, 23183-23190.

**Garavito, R. M., Mulichak, A. M.** (2003) The structure of mammalian cyclooxygenases. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **32**, 183-206.

**Gardiner, P. J., Collier H. O. J.** (1980) Specific receptors for prostaglandins in airways. *Prostaglandins*. **19**, 819-841.

**Garpenstrand, H., Ekblom, J., Backlund, L. B., Oreland, L., Rosenqvist, U.** (1999) Elevated plasma semicarbazide-sensitive amine oxidase (SSAO) activity in Type 2 diabetes mellitus complicated by retinopathy. *Diabet. Med.* **16**, 514-521.

**Garrington, T.P. and Jhonson, G.L.** (1999) Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signalling pathways. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **11**, 211-218.

**Garrity, P. A., Chen, D., Rothenberg, E. V., Wold, B. J.** (1994) Interleukin-2 transcription is regulated *in vivo* at the level of coordinated binding of both constitutive and regulated factor. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 2159-2169.

**Gauvreau, G. M., Watson, R. M., O'Byrne, P. M.** (1999) Protective effects of inhaled PGE<sub>2</sub> on allergen-induced airway responses and airway inflammation. *Am. J. Crit. Care. Med.* **159**, 31-36.

**Gavett, S. H., Madison, S. L., Chulada, P. C., Scarborough, P. E., Qu, W., Boyle, J. E., Tiano, H. F., Lee, C. A., Langenbach, R., Roggli, V.L., Zeldin, D. C.** (1999) Allergic lung responses are increased in prostaglandin H synthase-deficient mice. *J. Clin. Invest.* **104**, 721-732.

**Genesca, L., Aubareda, A., Fuentes, J.J., Estivill, X., De La Luna, S., and Perez-Riba, M.** (2003) Phosphorylation of calcipressin 1 increases its ability to inhibit calcineurin and decreases calcipressin half-life. *Biochem J.* **374**, 567-575.

**Gerrity, R. G.** (1981) The role of the monocyte in atherogenesis: II. Migration of foam cells from atherosclerotic lesions. *Am. J. Pathol.* **103**, 191-200.

**Ghosh S., Karin M.** (2002) Missing pieces in the NF- $\kappa$ B puzzle. *Cell* **109**, S81-S96.



- Ghosh, S., May, M. J., Kopp, E. B.** (1998) NF- $\kappa$ B and Rel proteins: Evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* **16**, 225-260.
- Glimcher, L. H., Murphy, K. M.** (2000) Lineage commitment in the immune system: The T helper lymphocyte grows up. *Genes & Dev.* **14**, 1693-1711.
- Gómez del Arco, P., Martínez-Martínez, S., Maldonado, J. L., Ortega-Pérez, L., Redondo, J. M.** (2000) A role for the p38 MAP kinase pathway in the nuclear shuttling of NFATp. *J. Biol. Chem.* **275**, 13872-13878.
- Gorlach, A., Brandes, R. P., Bassus, S., Kronemann, N., Kirchmaier, C. M., Busse, R., Schini-Kerth, V. B.** (2000) Oxidative stress and expression of p22<sup>phox</sup> are involved in the up-regulation of tissue factor in vascular smooth muscle cells in response to activated platelets. *FASEB J.* **14**, 1518-1528.
- Gounni, A. S., Lamkhied, B., Koussih, L., Ra, C., Renzi, P. M., Hamid, Q.** (2001) Human neutrophils express the high-affinity receptor for immunoglobulin E (Fc $\epsilon$ RI): role in asthma. *FASEB J.* **15**, 940-949.
- Graef, I. A., Mermelstein, P. G., Stankunas, K., Neilson, J. R., Deisseroth, K., Tsien, R. W., Crabtree, G. R.** (1999) L-type calcium channels and GSK-3 regulate the activity of NF-ATc4 in hippocampal neurons. *Nature* **401**, 703-708.
- Green, L. C., Wagner, D. A., Glogowski, J., Skipper, P. L., Wishnok, J. S., Tannenbaum, S. R.** (1982) Analysis of nitrate, nitrite, and [<sup>15</sup>N]nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.* **126**, 131-138.
- Guhaniyogi, J., Brewer, G.** (2001) Regulation of mRNA stability in mammalian cells. *Gene* **265**, 11-23.
- Gunther, M. R., Hanna, P. M., Mason, R. P., Cohen MS.** (1995) Hydroxyl radical formation from cuprous ion and hydrogen peroxide: a spin-trapping study. *Arch. Biochem. Biophys.* **316**, 515-522.
- Guyton, K. Z., Liu, Y., Gorospe, M., Xu, Q., Holbrook, N. J.** (1996) Activation of mitogen-activated protein kinase by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Role in cell survival following oxidant injury. *J. Biol. Chem.* **271**, 4138-4142.
- Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C.** (1987) Free Radicals in Biology and Medicine. *Clarendon Press, Oxford*. 18-19.
- Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C.** (1992) Biologically relevant metal ion-dependent hydroxyl radical generation. An update. *FEBS Lett.* **307**, 108-112.

**Hampton, M. B., Kettle, A. J., Winterbourn, C. C.** (1998) Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood* **92**, 3007-3017.

**Han, Y. J., Kwon, Y. G., Chung, H. T., Lee, S. K., Simmons, R. L., Billiar, T. R., Kim, Y.** (2001) Antioxidant enzymes suppress nitric oxide production through the inhibition of NF- $\kappa$ B activation: role of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and nitric oxide in inducible nitric oxide synthase expression in macrophages. *Nitric Oxide* **5**, 504-513.

**Harding, P. V.** (1996) Antigen processing approaches for dissecting subcellular mechanisms that form the basis for T-cell responses modulating allergic reactions. *Eur. Respir. J.* **22**, 79-84.

**Hardy, C. C., Robinson, C., Tattersfield, A. E., Holgate, S. T.** (1984) The bronchoconstrictor effect of inhaled prostaglandin D<sub>2</sub> in normal and asthmatic men. *N. Engl. J. Med.* **311**, 209-213.

**Hayden, M. S., Ghosh, S.** (2004) Signalling to NF- $\kappa$ B. *Genes Dev.* **18**, 2195-2224.

**Hecht, D., Zick, Y.** (1992) Selective inhibition of protein tyrosine phosphatase activities by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and vanadate *in vitro*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **188**, 773-779.

**Hecker, M., Preiss, C., Klemm, P., Busse, R.** (1996) Inhibition by antioxidants of nitric oxide synthase expression in murine macrophages: role of NF- $\kappa$ B and interferon regulatory factor 1. *Br. J. Pharmacol.* **118**, 2178-2184.

**Hennigan, S. M., Wang, J. H., Redmond, H. P., Bouchier-Hayes, D.** (1999) Neutrophil heat shock protein expression and activation correlate with increased apoptosis following transmigration through the endothelial barrier. *Shock* **12**, 32-38.

**Hernández, G. L., Volpert, O. V., Íñiguez, M. A., Lorenzo, E., Martínez-Martínez, S., Grau, R., Fresno, M., Redondo, J. M.** (2001) Selective inhibition of vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis by cyclosporin A: roles of the nuclear factor of activated T cells and cyclooxygenase 2. *J. Exp. Med.* **193**, 207-620.

**Herrera, B., Fernandez, M., Roncero, C., Ventura, J. J., Porras, A., Valladares, A., Benito, M., Fabregat, I.** (2001) Activation of p38MAPK by TGF- $\beta$  in fetal rat hepatocytes requires radical oxygen production, but is dispensable for cell death. *FEBS. Lett.* **499**, 225-229.

**Herschman, H. R.** (1996) Prostaglandin synthase 2. *Biochim. Biophys. Acta.* **1299**, 125-40.

**Heyworth, P. G., Curnutte, J. T., Nauseef, W. M., Volpp, B. D., Pearson, D. W., Rosen, H. Clark, R. A.** (1991) Neutrophil nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase assembly. Translocation of p47<sup>phox</sup> and p67<sup>phox</sup> requires interaction between p47<sup>phox</sup> and cytochrome b558. *J. Clin. Invest.* **87**, 352-356.

- Hirai, H., Tanaka, K., Yoshie, O., Ogawa, K., Kenmotsu, K., Takamori, Y., Ichimasa, M., Sagamura, K., Nakamura, M., Takano, S. Nagata, K. (2001) Prostaglandin D<sub>2</sub> selectively induces chemotaxis in T helper type 2 cells, eosinophils, and basophils via seven-transmembrane receptor CRTH2. *J. Exp. Med.* **193**, 255-261.
- Hla, T. (1996) Molecular characterization of the 5.2 Kb isoform of the human cyclooxygenase-1 transcript. *Prostaglandins*. **51**, 81-85.
- Ho, S. N., Thomas, D. J., Timmerman, L. A., Li, X., Francke, U., Crabtree, G. R. (1995) NFATc3, a lymphoid-specific NFATc family member that is calcium-regulated and exhibits distinct DNA binding specificity. *J. Biol. Chem.* **270**, 19898-198907.
- Ho, S., Clipstone, N., Timmermann, L., Northrop, J., Graef, I., Fiorentino, D., Nourse, J., and Crabtree, G. R. (1996) The mechanism of action of cyclosporin A and FK506. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **80**, S40-45.
- Hock, M. B., Brown, M. A. (2003) Nuclear factor of activated T cells 2 transactivation in mast cells: a novel isoform-specific transactivation domain confers unique FcεRI responsiveness. *J. Biol. Chem.* **278**, 26695-26703.
- Hoey, T., Sun, Y. L., Williamson, K., Xu, X. (1995) Isolation of two new members of the NF-AT gene family and functional characterization of the NF-AT proteins. *Immunity* **2**, 461-472.
- Holgate, S. T., Burns, G. B., Robinson, C., Church, M. K. (1984) Anaphilactic and calcium dependent generation of prostaglandin D<sub>2</sub>, tromboxane B<sub>2</sub> and other cyclo-oxygenase products of arachidonic acid by dispersed human lung mast cells. *J. Immunol.* **133**, 2138-2144.
- Hoshino, T., Winkler-Pickett R. T., Masson A. T., Ortaldo, J. R., Young, H. A. (1999) IL-13 production by NK cells: IL-13 producing NK and T cells are present *in vivo* in the absence of IFN-γ. *J. Immunol.* **162**, 51-59.
- Hsieh, H. J., Cheng, C. C., Wu, S. T., Chiu, J. J., Wung, B. S., Wang, D. L. (1998) Increase of reactive oxygen species (ROS) in endothelial cells by shear flow and involvement of ROS in shear-induced c-fos expression. *J. Cell Physiol.* **175**, 156-162.
- Huang, Z. S., Jeng, J. S., Wang, C. H., Yip, P. K., Wu, T. H., Lee, T. K. (2001) Correlations between peripheral differential leukocyte counts and carotid atherosclerosis in non-smokers. *Atherosclerosis* **158**, 431-436.
- Huie, R. E., Padmaja, S. (1993) The reaction of NO with superoxide. *Free Radic. Res. Commun.* **18**, 195-199.

**Imamura, Y., Kubota, R., Wang, Y., Asakawa, S., Kudoh, J., Mashima, Y., Oguchi, Y., Shimizu, N.** (1997) Human retina-specific amine oxidase (RAO): cDNA cloning, tissue expression and chromosomal mapping. *Genomics* **40**, 277-283.

**Imamura, Y., Noda, S., Mashima, Y., Kudoh, J., Oguchi, Y., Shimizu, N.** (1998) Human retina-specific amine oxidase: genomic structure of the gene (AOC2), alternatively spliced variant and mRNA expression in retina. *Genomics* **51**, 293-298.

**Iñiguez, M. A., Martínez-Martínez, S., Punzón, C., Redondo, J. M., Fresno, M.** (2000) An essential role of the nuclear factor of activated T cells in the regulation of the expression of cyclooxygenase-2 gene in human T lymphocytes. *J. Biol. Chem.* **275**, 23627-26635.

**Inoue, H., Yokoyama, C., Hara, S., Tone, Y., Tanabe, T.** (1995) Transcriptional regulation of human prostaglandin-endoperoxide synthase-2 gene by lipopolysaccharide and phorbol ester in vascular endothelial cells. Involvement of both nuclear factor for interleukin-6 expression site and cAMP response element. *J. Biol. Chem.* **270**, 24965-24971.

**Ippoushi, K., Azuma, K., Ito, H., Horie, H., Higashio, H.** (2003) [6]-Gingerol inhibits nitric oxide synthesis in activated J774.1 mouse macrophages and prevents peroxynitrite-induced oxidation and nitration reactions. *Life Sci.* **73**, 3427-3437.

**Ishida, N., Hayashi, K., Hoshijima, M., Ogawa, T., Koga, S., Miyatake, Y., Kumegawa, M., Kimura, T., Takeya, T.** (2002). Large scale gene expression analysis of osteoclastogenesis *in vitro* and elucidation of NFAT2 as a key regulator. *J. Biol. Chem.* **277**, 41147-41156.

**Ishizaka, T.** (1988) *Mechanisms of the IgE mediated hypersensitivity*. In: allergy principle and practice. The CV Mosby Company. Sant Louis.

**Israel, A.** (2000) The IKK complex: an integrator of all signals that activate NF- $\kappa$ B? *Trends. Cell. Biol.* **10**, 129-133.

**Issekutz, A. C., Movat, H. Z.** (1980) The *in vivo* quantitation and kinetics of rabbit neutrophil leukocyte accumulation in the skin in response to chemotactic agents and *Escherichia coli*. *Lab. Invest.* **42**, 310-317.

**Jaakkola, K., Kaunismaki, K., Tohka, S., Yegutkin, G., Vanttinen, E., Havia, T., Pelliniemi, L. J., Virolainen, M., Jalkanen, S., Salmi, M.** (1999) Human vascular adhesion protein-1 in smooth muscle cells. *Am. J. Pathol.* **155**, 1953-1965.

**Jaakkola, K., Nikula, T., Holopainen, R., Vahasilta, T., Matikainen, M. T., Laukkanen M. L., Huupponen, R., Halkola, L., Nieminen, L., Hiltunen, J., Parviainen, S., Clark, M. R., Knuuti, J., Savunen, T., Kaapa, P., Voipio-Pulkki, L. M., Jalkanen, S.** (2000) *In vivo* detection of vascular adhesion protein-1 in experimental inflammation. *Am. J. Pathol.* **157**, 463-471.

- Jalkanen, S., Salmi, M.** (2001). Cell surface monoamine oxidases: enzymes in search of a function. *EMBO J.* **20**, 3893-3901.
- Janes, S. M., Mu, D., Wemmer, D., Smith, A. J., Kaur, S., Maltby, D., Burlingame, A. L., Klinman, J. P.** (1990) A new redox cofactor in eukaryotic enzymes: 6-hydroxydopa at the active site of bovine serum amine oxidase. *Science* **248**, 981-987.
- Janssen, Y. M., Matalon, S., Mossman, B. T.** (1997) Differential induction of c-fos, c-jun, and apoptosis in lung epithelial cells exposed to ROS or RNS. *Am. J. Physiol.* **273**, L789-796.
- Jarving, R., Jarving, I., Kurg, R., Brash, A. R., Samel, N.** (2004) On the evolutionary origin of cyclooxygenase (COX) isoenzymes: characterization of marine invertebrate COX genes points to independent duplication events in vertebrate and invertebrate lineages. *J. Biol. Chem.* **279**, 13624-13633.
- Jerne, N. K.** (1973) *The immune system.* *Sci. Am.* **229**, 52-60.
- Jinquan, T., Quan, S., Jacobi, H. H., Reimert, C.M., Millner, A., Hansen, J. B., Thygesen, C., Ryder, L. P., Madsen, H. O., Malling, H. J., Poulsen, L. K.** (1999) Cutting edge: expression of the NF of activated T cells in eosinophils: regulation by IL-4 and IL-5. *J. Immunol.* **163**, 21-24.
- Jobin, C., Morteau, O., Han, D. S., Balfour-Sartor, R.** (1998) Specific NF- $\kappa$ B blockade selectively inhibits tumour necrosis factor-alpha-induced COX-2 but not constitutive COX-1 gene expression in HT-29 cells. *Immunology* **95**, 537-543.
- Johnson, G. L., Lapadat, R.** (2002) Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* **298**, 1911-1912.
- Joo, H. G., Goedegebuure, P. S., Sadanaga, N., Nagoshi, M., Von Bernstorff, W., Eberlein, T.** (2001) Expression and function of galectin-3, a beta galactoside-binding protein in activated T lymphocytes. *J. Leukoc. Biol.* **69**, 555-564.
- Kamata, H., Tanaka, C., Yagisawa, H., Matsuda, S., Gotoh, Y., Nishida, E., Hirata, H.** (1996) Suppression of nerve growth factor-induced neuronal differentiation of PC12 cells. N-acetylcysteine uncouples the signal transduction from ras to the mitogen-activated protein kinase cascade. *J. Biol. Chem.* **271**, 33018-33025
- Kawabe, T., Naka, T., Yoshida, K., Tanaka, T., Fujiwara, H., Suematsu, S., Yoshida, N., Kishimoto, T., Kikutani, H.** (1994) The immune responses in CD40-deficient mice: impaired immunoglobulin class switching and germinal center formation. *Immunity* **1**, 167-178.
- Klauck, T. M., Faux, M. C., Labudda, K., Langerberg, L. K., Jaken, S., Scott, J. D.** (1996) Coordination of three signalling enzymes by AKAP79, a mammalian scaffold protein. *Science.* **271**, 1589-1592.

**Klee, C. B., Ren, H., Wang, X.** (1998) Regulation of the calmodulin-stimulated protein phosphatase, calcineurin. *J. Biol. Chem.* **273**, 13367-13370.

**Klinman, J. P.** (1996) New quinocofactors in eukaryotes. *J. Biol. Chem.* **271**, 27189-27192.

**Klinman, J. P., MU, D.** (1994) Quinoenzymes in biology. *Annu. Rev. Biochem.* **63**, 299-344.

**Knebel, A., Rahmsdorf, H. J., Ullrich, A., Herrlich, P.** (1996) Dephosphorylation of receptor tyrosine kinases as target of regulation by radiation, oxidants or alkylating agents. *EMBO J.* **15**, 5314-5325.

**Konishi, H., Tanaka, M., Takemura, Y., Matsuzaki, H., Ono, Y., Kikkawa, U., Nishizuka, Y.** (1997) Activation of protein kinase C by tyrosine phosphorylation in response to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **94**, 11233-11237.

**Konishi, H., Yamauchi, E., Taniguchi, H., Yamamoto, T., Matsuzaki, H., Takemura, Y., Ohmae, K., Kikkawa, U., Nishizuka, Y.** (2001) Phosphorylation sites of protein kinase C  $\delta$  in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated cells and its activation by tyrosine kinase *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **98**, 6587-6592.

**Kraemer, S. A. Meade, E. A., DeWitt, D. L.** (1992) Prostaglandin endoperoxide synthase gene structure: identification of the transcriptional start and 5'-flanking regulatory sequences. *Arch. Biochem. Biophys.* **293**, 391-400.

**Krieger-Brauer, H. L., Kather, H.** (1995) Antagonistic effects of different members of the fibroblast and platelet-derived growth factor families and adipose conversion and NADPH-dependent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation in 3T3 L1- cells. *Biochem. J.* **307**, 549-556.

**Krug, N., Madden, J., Redington, A. E., Lackie, P., Djukanovic, R., Schauer, U., Holgate, S. T., Frew, A. J., Howarth, P. H.** (1996) T-cell cytokine profile evaluated at the single cell level in BAL and blood in allergic asthma. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* **14**, 319-326.

**Kuitert, L. M., Newton, R., Barnes N. C., Adcock, I. M. Barnes, P. J.** (1996) Eicosanoid mediator expression in mononuclear and polymorphonuclear cells in normal subjects and patients with atopic asthma and cystic fibrosis. *Thorax* **51**, 1223-1228.

**Kulmacz, R. J., Van der Donk, W. A., Tsai, A. L.** (2003) Comparison of the properties of prostaglandin H synthase-1 and -2. *Prog. Lipid. Res.* **42**, 377-404.

**Kunsch, C., Medford, R. M.** (1999) Oxidative stress as a regulator of gene expression in the vasculature. *Circ. Res.* **85**, 753-766.

**Kurambail, R. G., Stevens, A. M., Gierse, J. K., McDonald, J. J., Stegeman, R. A., Pak, J. Y., Gildehaus, D., Miyashiro, J. M., Penning, T. D., Seibert, K., Isakson, P. C., Stallings, W. C.** (1996)

Structural basis for selective inhibition of cyclooxygenase-2 by anti-inflammatory agents. *Nature* **384**, 644-648.

**Kurambail, R. G., Stevens, A. M., Gierse, J. K., McDonald, J. J., Stegeman, R. A., Pak, J. Y., Gildehaus, D., Miyashiro, J. M., Penning, T. D., Seibert, K., Isakson, P. C., Stallings, W. C.** (1996) Structural basis for selective inhibition of cyclooxygenase-2 by anti-inflammatory agents. *Nature* **384**, 644-648.

**Kurkijärvi, R., Adams, D. H., Leino, R., Mottonen, T., Jalkanen, S., Salmi, M.** (1998) Circulating form of human vascular adhesion protein-1 (VAP-1): increased serum levels in inflammatory liver diseases. *J. Immunol.* **161**, 1549-1557.

**Kurkijärvi, R., Yegutkin, G. G., Gunson, B. K., Jalkanen, S., Adams, D. H.** (2000) Circulating soluble vascular adhesion protein 1 accounts for the increases serum monoamine oxidase activity in chronic liver disease. *Gastroenterology* **119**, 1096-1103.

**Kuroki, M., O'Flaherty, J. T.** (1999) Extracellular signal-regulated protein kinase (ERK)-dependent and ERK-independent pathways target STAT3 on serine-727 in human neutrophils stimulated by chemotactic factors and cytokines. *Biochem. J.* **341**, 691-696.

**Kyosseva, S. V.** (2004) Mitogen-activated protein kinase signaling. *Int Rev Neurobiol.* **59**, 201-220.

**Kyriakis, J. M. Avruch, J.** (2001) Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol. Rev.* **81**, 807-869.

**Lack, G., Renz, H., Saloga, J., Bradley, K. L., Loader, J., Leung, D. Y., Larsen, G., Gelfand, E. W.** (1994) Nebulized but not parenteral IFN-gamma decreases IgE production and normalizes airways functions in murine model of allergen sensitization. *J. Immunol.* **152**, 2546-2554.

**Lambeth, J. D., Cheng, G., Arnold, R. S., Edens, W. A.** (2000) Novel homologs of gp91<sup>phox</sup>. *Trends Biochem. Sci.* **25**, 459-461.

**Lander, H. M. Ogiste, J. S., Teng, K. K., Novogrodsky, A.** (1995) p21Ras as a common signalling target of reactive free radicals and cellular redox stress. *J. Biol. Chem.* **270**, 21195-21198.

**Lee, T. H., Nagakura, T., Wallpor, M. J., Kay, A. B.** (1982) Identification and partial characterization of an exercise-induced neutrophil chemotactic factor in bronchial asthma. *J. Clin. Invest.* **69**, 889-899.

**Leto, T. L., Garrett, M. C. Fujii, H. Nuno, H.** (1991) Characterization of neutrophil NADPH oxidase factors p47<sup>phox</sup> and p67<sup>phox</sup> from recombinant baculoviruses. *J. Biol. Chem.* **266**, 19812-19818.

**Li, Y., Zhu, H., Trush, M. A.** (1999) Detection of mitochondria-derived reactive oxygen species production by the chemiluminescent probes lucigenin and luminol. *Biochim. Biophys. Acta.* **1428**, 1-12.

**Li, J. M., Mullen, A. M., Yun, S., Wientjes, F., Brouns, G. Y., Thrasher, A. J., Shah, A. M.** (2002) Essential role of the NADPH oxidase subunit p47<sup>phox</sup> in endothelial cell superoxide production in response to phorbol ester and tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Circ. Res.* **90**, 143-50.

**Lin, X. Sikkink, R. A. Rusnak, F. Barber, D. L.** (1999) Inhibition of calcineurin phosphatase activity by a calcineurin B homologous protein. *J. Biol. Chem.* **274**, 36125-36131.

**Liu, F-T.** (1993) S-Type mammalian lectins in allergic inflammation. *Immunol. Today* **14**, 486-490.

**Liu, J., Arai, K., Arai, N.** (2001) Inhibition of NFATx activation by an oligopeptide: Disrupting the interaction of NFATx with calcineurin. *J. Immunol.* **167**, 2677-2687.

**Liu, J., Farmer, J. D. J., Lane, W. S., Friedman, J., Weissman, I., Schreiber, S. L.** (1991) Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell* **66**, 807-815.

**Liu, J., Farmer, J. D., Lane Jr., W. S., Friedman, J., Weissman, I., Schreiber, S. L.** Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell.* **1991**. 66: 807-815.

**Lo, Y. Y. C., Cruz, T. F.** (1995) Involvement of reactive oxygen species in cytokines and growth factor induction of c-fos expresión in chondrocytes. *J. Biol. Chem.* **270**, 11727-11730.

**Loh, C., Carew, J. A., Kim, J., Hogan, P. G., Rao, A.** (1996). T-cell receptor stimulation elicits an early phase of activation and a later phase of deactivation of the transcription factor NFAT1. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 3945-3954.

**Lowenstein, C. J., Snyder, S. H.** (1992). Nitric oxide, a novel biologic messenger. *Cell* **70**, 705-707.

**Lyakh, L., Ghosh, P., Rice, N. R.** (1997) Expression of NFAT-family proteins in normal human T cells. *Mol. Cell Biol.* **17**, 2475-2484.

**Lyles, G. A.** (1996) Mammalian plasma and tissue-bound semicarbazide-sensitive amine oxidases: biochemical, pharmacological and toxicological aspects. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **28**, 259-274.

**Macián, F., López-Rodríguez, C., Rao, A.** (2001) Partners in transcription: NFAT and AP-1. *Oncogene* **20**, 2476-2489.

**Maihöfner, C., Schlotzer-Schrehardt, U., guhring, H., Zeilhofer, H. U., Naumann, G. O. H., Pahl, A., Mardin, C., Tamm, E. R., Brune, K.** (2001) Expression of cyclooxygenase-1 and -2 in normal and glaucomatous human eyes. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **42**, 2616-2624.



- Maloney, C. G., Kutchera, W. A., Albertine, K. H., McIntyre, T. M., Prescott, S. M., Zimmerman, G. A.** (1998) Inflammatory agonists induce cyclooxygenase type 2 expression by human neutrophils. *J. Immunol.* **160**, 1402-1410.
- Marnett, L. J., Rowlinson, S. W., Goodwin, D. C., Kalgutkar, A. S., Lanzo, C. A.** (1999) Arachidonic acid oxygenation by COX-1 and COX-2. Mechanisms of catalysis and inhibition. *J. Biol. Chem.* **274**, 22903-22906.
- Marshall, H. E., Merchant, K., Stamler, J. S.** (2000) Nitrosation and oxidation in the regulation of gene expression. *FASEB J.* **14**, 1889-1900.
- Marti, L., Morin, N., Enrique-Tarancon, G., Prevot, D., Lafontan, M., Testar, X., Zorzano, A., Carpena, C.** (1998) Tyramine and vanadate synergistically stimulate glucose transport in rat adipocytes by amine oxidase-dependent generation of hydrogen peroxide. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **285**, 342-349.
- Masuda, E. S., Naito, Y., Tokumitsu, H., Campbell, D., Saito, F., Hannum, C., Arai, K., Arai, N.** (1995) NFATx, a novel member of the nuclear factor of activated T cells family that is expressed predominantly in the thymus. *Mol. Cell Biol.* **15**, 2697-2706.
- Masutani, H.** (2000) Oxidative stress response and signaling in hematological malignancies and HIV infection. *Int. J. Hematol.* **71**, 25-32.
- Matsuoka, T., Hirata, M., Tanaka, H., Takashashi, Y., Murata, T., Kabashima, K., Sugimoto Y., Kobayashi, T., Ushikubi, F., Aze, Y., Eguchi, N., Urade, Y., Yoshida, N., Kimura, K., Mizoguchi, A., Honda, Y., Nagai H., Naramiya, S.** (2000) Prostaglandin D<sub>2</sub> as mediator of allergic asthma. *Science* **287**, 2013-2017.
- McBride, A. G., Borutaite, V., Brown, G. C.** (1999) Superoxide dismutase and hydrogen peroxide cause rapid nitric oxide breakdown, peroxynitrite production and subsequent cell death. *Biochim. Biophys. Acta.* **1454**, 275-288.
- McCarthy, C. J., Crofford, L. J., Greenson, J., Sheiman, J. M.** (1999) Cyclooxygenase-2 expression in gastric antral mucosa before and after eradication of *Helicobacter pylori* infection. *Am. J. Gastroenterol.* **94**, 1218-1223.
- McLeish, K. R., Klein, J. B., Coxon, P. Y., Head, K. Z., Ward, R. A.** (1998) Bacterial phagocytosis activates extracellular signal-regulated kinase and p38 mitogen-activated protein kinase cascades in human neutrophils. *J. Leukoc. Biol.* **64**, 835-844.
- Melillo, E., Woolley, K. L., Manning, P. J., Watson, R. M., O'Byrne, P. M.** (1994) Effect of inhaled PGE<sub>2</sub> on exercise-induced bronchoconstriction in asthmatic subjects. *Am. J. Crit. Care. Med.* **149**, 1138-1141.

**Metzger<sup>a</sup>, W. J., Richerson, H. B., Worden, K., Monick, M., Hunninghake, G. W.** (1986) Bronchoalveolar lavage of allergic asthmatic patients following allergen provocation. *Chest* **89**, 477-483

**Metzger<sup>b</sup>, H., Alcaraz, G., Holman, R., Kinet, J. P., Pribluda V., Quarto, R.** (1986) The receptor with high affinity for immunoglobulin E. *Annu. Rev. Immunol.* **4**, 419-470.

**Misra, U. K. Pizzo, S. V.** Induction of cyclooxygenase-2 synthesis by ligation of the macrophage alpha(2)-macroglobulin signalling receptor. *Cell Signal.* **2001**. 13:801-808.

**Miyakawa, H., Woo, S. K., Dahl, S. C., Handler, J. S., Kwon, H. M.** (1999) Tonicity-responsive enhancer binding protein, a rel-like protein that stimulates transcription in response to hypertonicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **96**, 2538-2542.

**Moldes, M., Fève, B., Pairault, J.** (1999) Molecular cloning of a major mRNA species in murine 3T3 adipocyte lineage. Differentiation-dependent expression, regulation and identification as semicarbazidesensitive amine oxidase. *J. Biol. Chem.* **274**, 9515-9523.

**Molkentin, J. D., Lu, J. R., Antos, C. L., Markham, B., Richardson, J., Robbins, J., Grant, S. R., Olson, E. N.** (1998) A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell* **93**, 215-228.

**Moncada, S., Palmer, R. M., Higgs, E. A.** (1991). Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* **43**, 109-142.

**Montefort, S., Gratziau, C., Goulding, D., Polosa, R., Haskard, D. O.** (1994) Bronchial biopsy evidence for leukocyte infiltration and upregulation of leukocyte-endothelial cell adhesion molecules 6 hours after local allergen challenge of sensitized asthmatic airways. *J. Clin. Invest.* **93**, 1411-1421.

**Monteseirín, J., Camacho, M. J., Bonilla, I., De la Calle A, A., Guardia, P., Conde, J., Sobrino, F.** (2002) Respiratory burst in neutrophils from asthmatic patients. *J. Asthma.* **39**, 619-624.

**Monteseirín, J., Bonilla, I., Camacho, M. J., Chacón, P., Vega, A., Chaparro, A., Conde, J., Sobrino, F.** (2003) Specific allergens enhance elastase release in stimulated neutrophils from asthmatic patients. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **131**, 174-181.

**Monteseirín, J., Bonilla, I., Camacho, M. J., Conde, J., Sobrino, F.** (2001) IgE-dependent release of myeloperoxidase by neutrophils from allergic patients. *Clin. Exp. Allergy* **31**, 889-892.

**Monteseirín, J., Camacho, M. J., Montaña, R., Llamas, E., Conde, M., Carballo, M., Guardia, P., Conde, J., Sobrino, F** (1996) Enhancement of Antigen-specific functional responses by neutrophils from allergic patients. *J. Exp. Med.* **183**, 2571-2579.

- Monteseirin, J., Chacon, P., Vega, A., El Bekay, R., Alvarez, M., Alba, G., Conde, M., Jiménez, J., Asturias, J. A., Martinez, A., Conde, J., Pintado, E., Bedoya, F. J., Sobrino, F.** (2004) Human neutrophils synthesize IL-8 in an IgE-mediated activation. *J. Leukoc. Biol.* **76**, 692-700.
- Moore, S. D., Brodt-Eppley, J., Cornelison, L. M., Burk, S. E., Slater, D. M., Myatt, L.** (1999) Expression of prostaglandin H synthase isoforms in human myometrium at parturition. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **180**, 103-109.
- Morel, F., Doussiere, J. Vignais, P. V.** (1991) The superoxide-generating oxidase of phagocytic cells. Physiological, molecular and pathological aspects. *Eur. J. Biochem.* **201**, 523-546.
- Morel, Y., Barouki, R.** (1999) Repression of gene expression by oxidative stress. *Biochem. J.* **342**, 481-496.
- Morin, N., Lizcano, J. M., Fontana, E., Marti, L., Smih, F., Rouet, P., Prevot, D., Zorzano, A., Unzeta, M., Carpena, C.** (2001) Semicarbazide-sensitive amine oxidase substrates stimulate glucose transport and inhibit lipolysis in human adipocytes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **297**, 563-572.
- Morita, I.** (2002) Distinct functions of COX-1 and COX-2. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* **68-69**, 165-175.
- Morita, I., Schindle, R. M., Reige, R. M. K., Otto, J. C., Hori, T., DeWitt, D. L., Smith, W. L.** (1995) Different intracellular locations for prostaglandin endoperoxide H synthase-1 and -2. *J. Biol. Chem.* **270**, 10902-10908.
- Morris, J. K., Richards, J. S.** (1996) An E-box region within the prostaglandin endoperoxide synthase-2 (PGS-2) promoter is required for transcription in rat ovarian granulosa cells. *J. Biol. Chem.* **271**, 16633-16643.
- Morris, N. J., Ducret, A., Aebersold, R., Ross, S. A., Keller, S. R., Lienhard, G. E.** (1997) Membrane amine oxidase cloning and identification as a major protein in the adipocyte plasma membrane. *J. Biol. Chem.* **272**, 9388-9392.
- Morrison, D.K., Davis, R. J.** (2003) Regulation of MAP kinase signaling modules by scaffold proteins in mammals. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* **19**, 91-118.
- Mu, D., Janes, S. M., Smith, A. J., Brown, D. E., Dooley, D. M., Klinman, J. P.** (1992) Tyrosine codon corresponds to topa quinone at the active site of copper amine oxidases. *J. Biol. Chem.* **267**, 7979-7982.
- Mukhopadhyay, D., Houchen, C. W., Kennedy, S., Dieckgraefe, B. K. Anant, S.** (2003) Coupled mRNA stabilization and translational silencing of cyclooxygenase-2 by a novel RNA binding protein, CUGBP2. *Mol. Cell* **11**, 113-126.

**Munroe, D., Lau, C.** (1995) Turning down the heat: new routes to inhibition of inflammatory signalling by prostaglandin H<sub>2</sub> synthases. *Chem. Biol.* **2**, 343-350.

**Murray, J. J., Tonnel, A. B., Brash, A. R., Roberts, L. J., Gosset, P., Workman, R., Capron, A., Oates, J.A.** (1986) Release of prostaglandin D<sub>2</sub> into human airways during antigen challenge. *N. Engl. J. Med.* **315**, 800-804.

**Musaro, A., McCullagh, K. J., Naya, F. J., Olson, E. N., Rosenthal, N.** (1999) IGF-1 induces skeletal myocyte hypertrophy through calcineurin in association with GATA-2 and NF-ATc1. *Nature* **400**, 581-585.

**Nagao, K., Tanaka, H., Komai, M., Masuda, T., Narumiya, S., Nagai, H.** (2003) Role of prostaglandin I<sub>2</sub> in airway remodeling by repeated allergen challenge in mice. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* **29**, 314-320.

**Nagy, L., Lee, T. H., Kay, A. B.** (1982) Neutrophil chemotactic activity in antigen-induced late asthmatic reactions. *New Engl. J. Med.* **306**, 497-501.

**Nakamura, M., Sendo, S., Van-Zwieten, R., Koga, T., Roos, D. Kanegasaki, S.** (1988) Immunocytochemical discovery of the 22- to 23-Kd subunit of cytochrome b558 at the surface of human peripheral phagocytes. *Blood* **72**, 1550-1552.

**Nakanishi, K., Yoshimoto, T., Chu, C. C., Matsumoto, H., Hase, K., Nagai, N., Tanaka, T., Miyasaka, M., Paul, W. E., Shinka, S.** (1995) IL-2 inhibits IL-4-dependent IgE and IgG<sub>1</sub> productions *in vitro* and *in vivo*. *Int. Immunol.* **161**, 1483-1492.

**Nathan, C.** (1992) Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J.* **6**, 3051-3064.

**Nathan, C. F.** (1987) Secretory products of macrophages. *J. Clin. Invest.* **79**, 319-326.

**Naureckas, E. T., Ndukwu, J. M., Halayko, A. J., Maxwell, C., Herheson, M. B., Solway, J.** (1999) Bronchoalveolar lavage fluid from asthmatic subjects is mitogenic for human airway smooth muscle. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **160**, 2062-2066.

**Neal, J. W., Clipstone, N. A.** (2001) Glycogen synthase kinase-3 inhibits the DNA binding activity of NFATc. *J. Biol. Chem.* **276**, 3666-3673.

**Nemeth, J. F., Hochesang, P., Marnett, L. J., Caprioli, R. M.** (2001) Characterization of the glycosylation sites in cyclooxygenase-2 using mass spectrometry. *Biochemistry.* **40**, 3109-3116.

**Newton, R., Kuitert, L. M., Slater, S. M., Adcock, I. M., Barnes, P. J.** (1997) Cytokine induction of cytosolic phospholipase A2 and cyclooxygenase-2 mRNA is suppressed by glucocorticoids in human epithelial cells. *Life Sci.* **60**, 67-78.

- Nisimoto, Y., Otsuka-Murakami, H. Lambeth, D. J.** (1995) Reconstitution of flavin-depleted neutrophil flavocytochrome b558 with 8-mercapto-FAD and characterization of the flavin-reconstituted enzyme. *J. Biol. Chem.* **270**, 16428-16434.
- Novak, N., Kraft S., Bieber T.** (2001) Ig-E receptors. *Curr. Opin. Immunol.* **13**, 721-726.
- Noveral, P. J., Grunstein, M. M.** (1992) Role and mechanism of thromboxane-induced proliferation of cultured airway smooth muscle cells. *Am. J. Physiol.* **263**, L555-L561.
- Nurcombe, H. L., Edwards, S. W.** (1989) Role of myeloperoxidase in intracellular and extracellular chemiluminescence of neutrophils. *Ann. Rheum. Dis.* **48**, 56-62.
- O'Byrne, P. M., Fuller, R. W.** (1991) The role of tromboxane A<sub>2</sub> in the pathogenesis of airway hyperresponsiveness. *Eur. Respir. J.* **4**, 667-672.
- Oguma, T., Asano, K., Shiomi, T., Fukunaga, K., Suzuki, Y., Nakamura, M., Matsubara, H., Sheldon, H. K., Haley, K. J., Lilly, C. M., Drazen, J. M., Yamaguchi, K.** (2002) Cyclooxygenase-2 expression during allergic inflammation in guinea-pig lungs. *Am. J. Crit. Care. Med.* **165**, 382-386.
- Okamura, H., Aramburu, J., García-Rodríguez, C., Viola, J. P., Raghavan, A., Tahiliani, M., Zhang, X., Qin, J., Hogan, P. G., Rao, A.** (2000). Concerted dephosphorylation of the transcription factor NFAT1 induces a conformational switch that regulates transcriptional activity. *Mol. Cell* **6**, 539-550.
- Okamura, N., Curnutte, J. T., Roberts, R. L., Babior, B. M.** (1988) Relationship of protein phosphorylation to the activation of the respiratory burst in human neutrophils. Defects in the phosphorylation of a group of closely related 48-kDa proteins in two forms of chronic granulomatous disease. *J. Biol. Chem.* **263**, 6777-6782.
- O'Keefe, S. J., Tamura, J., Kincaid, R. L., Tocci, M. J., O'Neill, E.** (1992) FK-506- and CsA-sensitive activation of the interleukin-2 promoter by calcineurin. *Nature* **357**, 692-694.
- Olson, E. N., Williams, R. S.** (2000) Calcineurin signaling and muscle remodeling. *Cell* **101**, 689-692.
- Palombella, V. J., Rando, O. J., Goldberg, A. L., Maniatis, T.** (1994) The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF- $\kappa$ B<sub>1</sub> precursor protein and the activation of NF- $\kappa$ B. *Cell.* **78**, 113-785.
- Pani, G., Colavitti, R., Borrello, S., Galeotti, T.** (2000) Endogenous oxygen radicals modulate protein tyrosine phosphorylation and JNK-1 activation in lectin-stimulated thymocytes. *Biochem. J.* **347**, 173-181.

**Parkos, C. A., Dinauer, M. C., Walker, L. E., Allen, R. A., Jesaitis, A. J. Orkin, S. H.** (1988) Primary structure and unique expression of the 22-kDa light chain of human neutrophil cytochrome b. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S A.* **85**, 3319-3323.

**Pasinetti, G. M.** (2001) Cyclooxygenase and Alzheimer's disease: implications for preventive initiatives to slow the progression of clinical dementia. *Arch. Gerontol. Geriatr.* **33**, 13-28.

**Pavord, D., Tattersfield, A. E.** (1995) Bronchoprotective role of endogenous prostaglandin E<sub>2</sub>. *Lancet* **345**, 436-438.

**Pepys, J.** (1975) Skin testing. *Br.J. Hosp. Med.* **14**, 412-418.

**Pizzinat, N., Copin, N., Vindis, C., Parini, A., Cambon, C.** (1999) Reactive oxygen species production by monoamine oxidases in intact cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **359**, 428-431.

**Porter, C. M., Havens, M. A., Clipstone, N. A.** (2000). Identification of amino acid residues and protein kinases involved in the regulation of NFATc subcellular localization. *J. Biol. Chem.* **275**, 3543-3551.

**Prasad, T. K.** (1997) Role of catalase in inducing chilling tolerance in pre-emergent maize seedlings. *Plant Physiol.* **114**, 1369-1376.

**Prescott, S. M., Fitzpatrick, F. A.** (2000) Cyclooxygenase-2 and carcinogenesis. *Biochim. Biophys. Acta.* **1470**, M69-M78.

**Profita, M., Sala, A., Bonnano, A., Riccobono, L., Siena, L., Melis, M. R., Di Giorgi, R., Mirabella, F., Gjomarkaj, M., Bonsignore, G., Vignola, A. M.** (2003) Increased prostaglandin E<sub>2</sub> concentrations and cyclooxygenase-2 expression in asthmatic subjects with sputum eosinophilia. *J. Allergy. Clin. Immunol.* **112**, 709-716.

**Punnonen, J., Yssel, H., de Vries, J. E.** (1997) The relative contribution of IL-4 and IL-13 to human IgE synthesis by activated CD4<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup> T cells. *J. Allergy Clin. Immunol.* **100**, 792-801.

**Quinn, M. T., Evans, T., Loetterle, L. R., Jesaitis, A. J., Bokoch, G. M.** (1993) Translocation of Rac correlates with NADPH oxidase activation. Evidence for equimolar translocation of oxidase components. *J. Biol. Chem.* **268**, 20983-20987.

**Raeburn, D. Webber, S. E.** (1994) Proinflammatory potential of the airway epithelium in bronchial asthma. *Eur. Respir. J.* **7**, 226-233.

**Rainio, E. M., Sandholm, J., Koskinen, P. J.** (2002) Cutting edge: Transcriptional activity of NFATc1 is enhanced by the Pim-I kinase. *J. Immunol.* **168**, 1524-1527.

- Ranger<sup>a</sup>, A. M., Grusby, M. J., Hodge, M. R., Gravalles, E. M., de la Brousse, F. C., Hoey, T., Mickanin, C., Baldwin, H. S., Glimcher, L. H.** (1998) The transcription factor NF-ATc is essential for cardiac valve formation. *Nature* **392**, 186-190.
- Ranger<sup>b</sup>, A. M., Oukka, M., Rengarajan, J., Glimcher, L. H.** (1998) Inhibitory function of two NFAT family members in lymphoid homeostasis and Th2 development. *Immunity* **9**, 627-635.
- Rao, A., Luo, C., Hogan, P. G.** (1997) Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annu. Rev. Immunol.* **15**, 707-747.
- Redington, A. E., Meng, Q. H., Springall, D. R., Evans T. J., Créminon C., Maclouf, J., Holgate, S. T., Howarth, P. H., Polak, J. M.** (2001) Increased expression of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in the airway epithelium of asthmatic subjects and regulation by corticosteroid treatment. *Thorax* **56**, 351-357.
- Rengasamy, A., Johns, R. A.** (1993) Inhibition of nitric oxide synthase by a superoxide generating system. *J. Pharmacol Exp. Ther.* **267**, 1024-1027.
- Rieke, C. J., Mulichak, A. M., Garavito, R. M., Smith, W. L.** (1999) The role of arginine 120 of human prostaglandin endoperoxide H synthase-2 in the interaction with fatty acid substrates and inhibitors. *J. Biol. Chem.* **274**, 17109-17114.
- Ristimaki A., Narko, K., Hla, T.** (1996) Down-regulation of cytokine-induced cyclooxygenase-2 transcript isoforms by dexamethasone: evidence for post-transcriptional regulation. *Biochem. J.* **318**, 325-332.
- Robida, A. M., Xu, K., Ellington, M. L., Murphy, T. J.** (2000) Cyclosporin A selectively inhibits mitogen-induced cyclooxygenase-2 gene transcription in vascular smooth muscle cells. *Mol. Pharmacol.* **58**, 701-708.
- Robinson, D. S., Hamid, Q., Ying, S., Tscopoulos, A., Barkans, J., Bentley, A. M., Corrigan, C., Durham, S. R., Kay, A. B.** (1992) Predominant Th2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma. *N. Engl. J. Med.* **326**, 298-304.
- Robinson, M. J, Cobb, M. H.** (1997) Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **9**, 180-186.
- Robinson-White, A., Baylin, S. B., Olivecrona, T., Beaven, M. A.** (1985) Binding of diamine oxidase activity 10 rat and guinea pig microvascular endothelial cells. Comparisons with lipoprotein lipase binding. *J. Clin. Invest.* **76**, 93-100.
- Roos, D.** (1994) The genetic basis of chronic granulomatous disease. *Immunol. Rev.* **138**, 121-157.

**Roos, D., Van Bruggen, R., Meischl, C.** (2003) Oxidative killing of microbes by neutrophils. *Microbes Infect.* **5**, 1307-1315.

**Ross, R.** (1999) Atherosclerosis: an inflammatory disease. *N. Engl. J. Med.* **340**, 115-126.

**Rotrosen, D., 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.

**Rotrosen, D., Yeung, C. L., Leto, T. L., Malech, H. L. Kwong, C. H.** (1992) Cytochrome b558: the flavin-binding component of the phagocyte NADPH oxidase. *Science* **256**, 1459-1462.

**Rousseau, S., Morrice, N., Peggie, M., Caripball, D. G., Gaeslet, M., Cohen P.** (2002) Inhibition of SAPK2/p38 prevents hnRNP A0 phosphorylation by MAPKAP-K2 and its interaction with cytokines mRNAs. *EMBO. J.* **21**, 6505-6514.

**Roux, P.P., Blenis, J.** (2004) ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *J. Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **68**, 320-344.

**Rubinfeld, H., Seger, R.** (2004) The ERK cascade as a prototype of MAPK signaling pathways. *Methods Mol Biol.* **250**, 1-28.

**Ruhmann, A., Nordheim, A.** (1997) Effects of the immunosuppressive drugs CsA and FK506 on intracellular signalling and gene regulation. *Immunobiology* **198**, 192-206.

**Sada, K., Zhang, J., Siraganian, R. P.** (2001) SH2 domain-mediated targeting, but not localization, of Syk in the plasma membrane is critical for FcεRI signaling. *Blood* **97**, 1352-1359.

**Salmi, M., Jalkanen, S.** (1992) A 90-kilodalton endothelial cell molecule mediating lymphocyte binding in humans. *Science* **257**, 1407-1409.

**Salmi, M., Jalkanen, S.** (1997) How do lymphocytes know where to go: current concepts and enigmas of lymphocyte homing. *Adv. Immunol.* **64**, 139-218.

**Salmi, M., Yegutkin, G., Lehtonen, R., Koskinen, K., Salminen, T., Jalkanen, S.** (2001) A cell surface amine oxidase directly controls lymphocyte migration. *Immunity* **14**, 265-276.

**Sanz, A., Moreno J. I., Caestrana, C.** (1998) PIOX, a new pathogen-induced oxygenase with homology to animal cyclooxygenase. *Plant. Cell.* **10**, 1523-1537.

**Satriano, J., Schlondorff, D.** (1994) Activation and attenuation of transcription factor NF-κB in mouse glomerular mesangial cells in response to tumor necrosis factor-α, immunoglobulin G, and adenosine



- 3':5'-cyclic monophosphate. Evidence for involvement of reactive oxygen species. *J. Clin. Invest.* **94**, 1629-1636.
- Sawaoka, H., Dixon, D., Oates, J., Boutaud, O.** (2003) Tristetrapolin binds to the 3'-untranslated region of cyclooxygenase-2 mRNA: a polyadenylation variant in a cancer cell line lacks the binding site. *J. Biol. Chem.* **278**, 13928-13935.
- Scapini, P., Lapinet-Vera, J. A., Gasperini, S., Bazzoni F., Cassatella, M. A.** (2000) The neutrophil as a cellular source of chemokines. *Immunol. Rev.* **177**, 195-203.
- Schedtje, J. F., Ji, Y. S., Liu, M. L., DuBois, R. N., Runge, M. S.** (1997) Hypoxia induces cyclooxygenase-2 via the NF- $\kappa$ B p65 transcription factor in human vascular endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **272**, 601-608.
- Schmidt, A., Hennighausen, L., Siebenlist, U.** (1990) Inducible nuclear factor binding to the kappa B elements of the human immunodeficiency virus enhancer in T cells can be blocked by cyclosporin A in a signal-dependent manner. *J. Virol.* **64**, 4037-4041.
- Schmitz, M. L., Mattioli, I., Buss H., Kracht, M.** (2004) NF- $\kappa$ B: A multifaceted transcription factor regulated at several levels. *ChemBioChem.* **5**, 1348-138.
- Scholl, P. R., Geha, R. S.** (1993) Physical association between the high-affinity IgG receptor (Fc $\gamma$ RI) and the  $\gamma$  subunit of the high-affinity IgE receptor (Fc $\epsilon$ RI $\gamma$ ). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**, 8847-8850
- Schreck, R., Rieber, P., Baeuerle, P. A.** (1991) Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF- $\kappa$ B transcription factor and HIV-1. *EMBO J.* **10**, 2247-2258.
- Schroeder, J. T., Miura, K., Kim, H. H., Sin, A., Cianferoni, A., Casolaro, V.** (2002) Selective expression of nuclear factor of activated T cells 2/c1 in human basophils: evidence for involvement in IgE-mediated IL-4 generation. *J. Allergy Clin. Immunol.* **109**, 507-513.
- Schwartz, R. H.** (1992) Costimulation of T lymphocyte: the role of CD28, CTL-4 and B7/BB1 in interleukin-2 production and immunotherapy. *Cell* **1**, 1061-1078.
- Segal, A. W.** (1987) Absence of both cytochrome b-245 subunits from neutrophils in X-linked chronic granulomatous disease. *Nature* **326**, 88-91.
- Segal, A. W., West, I., Wientjes, F., Nugent, J. H., Chavan, A. J., Haley, B., Garcia, R. C., Rosen, H. Scrace, G.** (1992) Cytochrome b-245 is a flavocytochrome containing FAD and the NADPH-binding site of the microbicidal oxidase of phagocytes. *Biochem. J.* **284**, 781-788.
- Seiler, N.** (1990) Polyamine metabolism. *Digestion* **46**, 319-330.

**Semper, A. E., Hartley, J. A.** (1996) Dendritic cell sing the luna: what is their relevante to asthma? *Clin. Exp. Allergy.* **26**, 485-490.

**Seymour, M. L., Rak, S., Aberg, D., Riise G. C., Penrose, J. F., Kanaoka, Y., Austen, K. F., Holgate, S. T., y Samson, A. P.** (2001) Leukotriene and prostanoid pathway enzymes in bronchial biopsies of seasonal allergic asthmatics. *Am. J. Crit. Care. Med.* **164**, 2051-2056.

**Shaw, K. T., Ho, A. M., Raghavan, A., Kim, J., Jain, J., Park, J., Sharma, S., Rao, A., Hogan, P. G.** (1995) Immunosuppressive drugs prevent a rapid dephosphorylation of transcription factor NFAT1 in stimulated immune cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**, 11205-11209.

**Sheridan, C. M., Heist, E. K., Beals, C. R., Crabtree, G. R., Gardner, P.** (2002) Protein kinase A negatively modulates the nuclear accumulation of NF-ATc1 by priming for subsequent phosphorylation by glycogen synthase kinase-3. *J. Biol. Chem.* **277**, 48664-48676.

**Sherman, M. A., Powell, D. R., Weiss, D. L., Brown, M. A.** (1999) NF-ATc isoforms are differentially expressed and regulated in murine T and mast cells. *J. Immunol.* **162**, 2820-2828.

**Shi, X., Leonard, S. S., Wang, S., Ding, M.** (2000) Antioxidant properties of pyrrolidine dithiocarbamate and its protection against Cr (VI)-induced DNA strand breakage. *Ann. Clin. Lab. Sci.* **30**, 209-216.

**Shih, J. C., Chen, K., Ridd, M. J.** (1999) Monoamine oxidase: from genes to behavior. *Annu. Rev. Neurosci.* **22**, 197-217.

**Siegle, L., Klein, T., Backman, J. T., Saal, J. G., Nusing, R. M. Fritz, P.** (1998) Expression of cyclooxygenase 1 and cyclooxygenase 2 in human synovial tissue: differential elevation of cyclooxygenase 2 in inflammatory joint diseases. *Arthritis Rheum.* **41**, 122-129.

**Sies, H., De Groot, H.** (1992) Role of reactive oxygen species in cell toxicity. *Toxicol. Lett.* **64-65**, 547-551.

**Simmons, D.L., Botting, R.M., Hla, T.** (2004) Cyclooxygenases Isoenzymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. *Pharmacol. Rev.* **56**, 387-437.

**Singh, I., Pahan, K., Khan, M., Singh, A. K.** (1998) Cytokine-mediated induction of ceramide production is redox-sensitive. Implications to proinflammatory cytokine-mediated apoptosis in demyelinating diseases. *J. Biol. Chem.* **273**, 20354-20362.

**Smith, D. J., Salmi, M., Bono, P., Hellman, J., Leu, T., Jalkanen, S.** (1998) Cloning of vascular adhesion protein-I reveals a novel multifunctional adhesion molecule. *J. Exp. Med.* **188**, 17-27.

**Smith, R. M. Curnutte, J. T.** (1991) Molecular basis of chronic granulomatous disease. *Blood* **77**, 673-686.

- Smith, W. L., Dewitt, D. L., Garavito, R. M.** (2000) Cyclooxygenases: Structural, Cellular and Molecular Biology. *Annu. Rev. Biochem.* **69**, 145-181.
- Soliman, M. K., Mazzio, E., Soliman, K. F.** (2002) Levodopa modulating effects of inducible nitric oxide synthase and reactive oxygen species in glioma cells. *Life Sci.* **72**, 185-198.
- Someya, A., Nagaoka, I., Yamashita, T.** (1993) Purification of the 260 kDa cytosolic complex involved in the superoxide production of guinea pig neutrophils. *FEBS Lett.* **330**, 215-218.
- Sousa, A. R., Pfister, R., Christie, P. E., Lane, S. J., Nasser, S. M., Schmitz-Schumann, M., Lee, T. H.** (1997) Enhanced expression of cyclo-oxygenase-2 (COX-2) in asthmatic airways and its distribution in aspirin sensitive asthma. *Thorax* **52**, 940-945.
- Soussi-Gounni, A., Lamkhioued, B., Christodououlos P., Nutku, E., Hamid, Q.** (1998) Human neutrophils express the high affinity receptor for IgE (FcεRI). *J. Allergy. Clin. Immunol.* **101**, S173.
- Springer, T. A.** (1994) Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte migration: the multistep paradigm. *Cell* **76**, 301-314.
- Springer, T. S.** (1990) Adhesion receptors of the immune system. *Nature* **346**, 425-434.
- Stadtman, E. R., Oliver, C. N.** (1991) Metal-catalyzed oxidation of proteins. Physiological consequences. *J. Biol. Chem.* **266**, 2005-2008.
- Stanworth, D. R.** (1973) Immediate hypersensitivity. Amsterdam. North Holland Publications.
- Stevenson, M. A., Pollock, S. S., Coleman, C. N., Calderwood, S. K.** (1994) X-irradiation, phorbol esters, and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stimulate mitogen-activated protein kinase activity in NIH-3T3 cells through the formation of reactive oxygen intermediates. *Cancer. Res.* **54**, 12-15.
- Stout, R. D.** (1993) Macrophage activation by T cells: cognate and non-cognate signals. *Curr. Opin. Immunol.* **5**, 398-403.
- Subbaramaiah, K., Chung, W. J., Dannenberg, A. J.** (1998) Ceramide regulates the transcription of cyclooxygenase-2. Evidence for the involvement of extracellular signal-regulated kinase/c-Jun N-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinase pathways. *J. Biol. Chem.* **273**, 32943-32949.
- Subbaramaiah, K., Chung, W. J., Dannenberg, A. J.** (1998) Ceramide regulates the transcription of cyclooxygenase-2. Evidence for the involvement of extracellular signal-regulated kinase/c-Jun N-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinase pathways. *J. Biol. Chem.* **273**, 32943-32949.

**Sugimoto, T., Haneda, M., Sawano, H., Isshiki, K., Maeda, S., Koya, D., Inoki, K., Yasuda, H., Kashiv, A., Kikkawa, R.** (2001) Endothelin-1 induces cyclooxygenase-2 expression via nuclear factor of activated T cells transcription factor in glomerular mesangial cells. *J. Am. Soc. Nephrol.* **12**, 1359-1368.

**Sully, G., Dean, J. L. E., Wait, R., Rawlinson, L., SantaLucia, T., Saklatvala, J., Clark, A. R.** (2004) Structural and functional dissection of a conserved destabilizing element of cyclo-oxygenase-2 mRNA: evidence against the involvement of AUF-1 [AU-rich element/poly (U)-binding/degradation factor-1], AUF-2, tristetrapolin, HuR (Hu antigenR) or FBP1 (far-upstream-sequence-element-binding protein 1). *Biochem. J.* **377**, 529-539.

**Sumimoto, H., Kage, Y., Nunoi, H., Sasaki, H., Nose, T., Fukumaki, Y., Ohno, M., Minakami, S., Takeshige, K.** (1994) Role of Src homology 3 domains in assembly and activation of the phagocyte NADPH oxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**, 5345-5349.

**Sumimoto, H., Sakamoto, N., Nozaki, M., Sakaki, Y., Takeshige, K., Minakami, S.** (1992) Cytochrome b558, a component of the phagocyte NADPH oxidase, is a flavoprotein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **186**, 1368-1375.

**Sundaresan, M., Yu, Z. X., Ferrans, V. J., Irani, K., Finkel, T.** (1995) Requirement for generation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for platelet-derived growth factor signal transduction. *Science* **270**, 296-299.

**Tabor, C. W., Tabor, H., Rosenthal, S. M.** (1954) Purification of amine oxidase from beef plasma. *J. Biol. Chem.* **208**, 645-661.

**Taha, R., Olivenstein, R., Utsumi, T., Ernst, P., Barnes, P. J., Rodger, I. W., Giaid, A.** (2000) Prostaglandin H synthase 2 expression in airway cells from patients with asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Crit. Care Med.* **161**, 636-640.

**Takada, Y., Mukhopadhyay, A., Kundu, G. C., Mahabeleshwar, G. H., Singh, S., Aggarwal, B. B.** (2003) Hydrogen peroxide activates NF- $\kappa$ B through tyrosine phosphorylation of I- $\kappa$ B $\alpha$  and serine phosphorylation of p65: evidence for the involvement of I- $\kappa$ B $\alpha$  kinase and Syk protein-tyrosine kinase. *J. Biol. Chem.* **278**, 24233-24241.

**Takahashi, T., Hato, F., Yamane, T., Fukumasu, H., Suzuki, K., Ogita, S., Nishizawa, Y., Kitagawa, S.** (2001) Activation of human neutrophil by cytokine-activated endothelial cells. *Circ. Res.* **88**, 422-429.

**Takayanagi, H., Kim, S., Koga, T., Nishina, H., Isshiki, M., Yoshida, H., Saiura, A., Isobe, M., Yokochi, T., Inoue, J.** (2002) Induction and activation of the transcription factor NFATc1 (NFAT2) integrate RANKL signaling in terminal differentiation of osteoclasts. *Dev. Cell* **3**, 889-901.

**Tanabe, T., Thonai, N.** (2002) Cyclooxygenase isoenzymes and their gene structures and expression. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* **68-69**, 95-114.

- Taylor, J. D., Wykes, A. A., Gladish, Y. C., Martin, W. B.** (1960) New inhibitor of monoamine oxidase. *Nature* **187**, 941-942.
- Te Velde, A. A.** (1994) Interaction between cytokines and monocytes/macrophages. *In: Immunopharmacology of macrophages and other antigen-presenting cells.* C.A.F.M. Bruijnzeel-Kromen and E.C.M. Hoetsmit, eds. *Academic Press, London.* 7-34.
- Teramoto, S., Shu, C. Y., Ouchi, Y., Fukuchi, Y.** (1996) Increased spontaneous production and generation of superoxide anion by blood neutrophils in patients with asthma. *J. Asthma.* **33**, 149-155.
- Thannickal, V. J. Fanburg, B. L.** (2000) Reactive oxygen species in cell signaling. *Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol.* **279**, L1005-L1028.
- Thannickal, V. J., Day, R. M., Klinz, S. G., Bastien, M. C., Larios, J. M., Fanburg, B. L.** (2000) Ras-dependent and -independent regulation of reactive oxygen species by mitogenic growth factors and TGF- $\beta$ 1. *FASEB J.* **14**, 1741-1748.
- Thelen, M., Dewald, B., Baggolini, M.** (1993) Neutrophil signal transduction and activation of the respiratory burst. *Physiol. Rev.* **73**, 797-821.
- Thomson, N. C., Roberts, R., Bandourakis, J., Newball H., Hargreave, F. E.** (1981) Comparison of bronchial responses to prostaglandin F $2\alpha$  and methacholine. *J. Allergy. Clin. Immunol.* **68**, 392-398.
- Thun, M. J., Henley, S. J., Patrono, C.** (2002) Nonsteroidal anti-inflammatory drugs as anticancer agents: mechanistic, pharmacologic, and clinical issues. *J. Natl. cancer. Inst.* **94**, 252-266.
- Timmerman, L. A., Clipstone, N. A, Ho, S. N., Northrop, J. P., Crabtree, G. R.** (1996) Rapid shuttling of NF-AT in discrimination of Ca $^{2+}$  signals and immunosuppression. *Nature* **383**, 837-840.
- Timmerman, L. A., Healy, J. I., Ho, S. N., Chen, L., Goodnow, C. C., Crabtree, G. R.** (1997) Redundant expression but selective utilization of nuclear factor of activated T cells family members. *J. Immunol.* **159**, 2735-2740.
- Tohka, S., Laukkanen, M., Jalkanen, S., Salmi, M.** (2001) Vascular adhesion protein 1 (VAP-1) functions as a molecular brake during granulocyte rolling and mediates their recruitment *in vivo.* *FASEB J.* **15**, 373-382.

**Torgerson, T. R., Colosia, A. D., Donahue, J. P., Lin, Y. Z., Hawiger, J.** (1998). Regulation of NF- $\kappa$ B, AP-1, NFAT, and STAT1 nuclear import in T lymphocytes by noninvasive delivery of peptide carrying the nuclear localization sequence of NF- $\kappa$ B p50. *J. Immunol.* **161**, 6084-6092.

**Trama, J., Go, W. Y., Ho, S. N.** (2002) The osmoprotective function of the NFAT5 transcription factor in T cell development and activation. *J. Immunol.* **169**, 5477-5488.

**Trama, J., Lu, Q., Hawley, R. G., Ho, S. N.** (2000) The NFAT-related protein NFATL1 (TonEBP/NFAT5) is induced upon T cell activation in a calcineurin-dependent manner. *J. Immunol.* **165**, 4884-4894.

**Truong, M. J., Gruart, V., Kusnierz, J. P., Papin, J. P., Loiseau, S., Capron, A., Capron, M.** (1993) Human neutrophils express immunoglobulin E (IgE)-binding proteins (Mac-2/eBP) of the S-type lectin family: role in IgE-dependent activation. *J. Exp. Med.* **177**, 243-248.

**Tsunawaki, S., Mizunari, H., Nagata, M., Tatsuzawa, O., Kuratsuji, T.** (1994) A novel cytosolic component, p40<sup>phox</sup>, of respiratory burst oxidase associates with p67<sup>phox</sup> and is absent in patients with chronic granulomatous disease who lack p67<sup>phox</sup>. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **199**, 1378-1387.

**Turrens, J. F., Boveris, A.** (1980) Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. *Biochem. J.* **191**, 421-427.

**Tyagi, S. R., Neckelmann, N., Uhlinger, D. J., Burnham, D. N., Lambeth, J. D.** (1992) Cell-free translocation of recombinant p47<sup>phox</sup>, a component of the neutrophil NADPH oxidase: effects of guanosine 5'-O-(3-thiotriphosphate), diacylglycerol, and an anionic amphiphile. *Biochemistry* **31**, 2765-2774.

**Uhlinger, D. J., Inge, K. L., Kreck, M. L., Tyagi, S. R., Neckelmann, N., Lambeth, J. D.** (1992) Reconstitution and characterization of the human neutrophil respiratory burst oxidase using recombinant p47<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup> and plasma membrane. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **186**, 509-516.

**Vane, J. R., Bakhle, Y. S., Botting, R. M.** (1998). Cyclooxygenases 1 and 2. *Annu.Rev.Pharmacol Toxicol.* **38**, 97-120.

**Vogiaris, D., Glare, E. M., Misajon, A., Brown, W., O'Brien, P. E.** (2000) Cyclooxygenase-1 and an alternatively spliced mRNA in the rat stomach: effects of aging and ulcers. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.* **278**, G820-G827.

**Wadha, S., Choudhary, S., Voznesensky, M Epstein, M., Raisz, L., Pilbeam, C.** (2002) Fluid flow induces COX-2 expression in MC3T3-E1 osteoblasts via a PKA signaling pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **297**, 46-51.

**Wadleigh, D. J., Reddy, S. T., Kopp, E., Ghosh, S., Herschman, H. R.** (2000) Transcriptional activation of the cyclooxygenase-2 gene in endotoxin-treated RAW 264.7 macrophages. *J. Biol. Chem.* **275**, 6259-6266.

- Wang, D. Z., McCaffrey, P. G., Rao, A.** (1995) The cyclosporin-sensitive transcription factor NFATp is expressed in several classes of cells in the immune system. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **766**, 182-194.
- Weaver, S. A., Russo, M. P., Wright, K. L., Kolios, G., Jobin, C., Robertson, D. A., Ward, S.G.** (2001) Regulatory role of phosphatidylinositol 3-kinase on TNF-alpha-induced cyclooxygenase 2 expression in colonic epithelial cells. *Gastroenterology* **120**, 1117-1127.
- Weiss, S. J.** (1989) Tissue destruction by neutrophils. *N. Engl. J. Med.* **320**, 365-376.
- Wientjes, F. B., Hsuan, J. J., Totty, N. F. Segal, A. W.** (1993) p40<sup>phox</sup>, a third cytosolic component of the activation complex of the NADPH oxidase to contain src homology 3 domains. *Biochem. J.* **296**, 557-561.
- Wilhelm, D., Bender, K., Knebel, A., Angel, P.** (1997) The level of intracellular glutathione is a key regulator for the induction of stress-activated signal transduction pathways including Jun N-terminal protein kinases and p38 kinase by alkylating agents. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 4792-4800.
- Wills-Karp, M., Gavett, S. H., Schofield, B., Finkelman, F.** (1996) Role of interleukin-4 in the development of allergic airway inflammation and airway hyperresponsiveness. *Adv. Exp. Med. Biol.* **409**, 343-347.
- Wilmot, C. M., Hajdu, J., Macpherson, M. J., Knowles, P. F., Phillips, S. E.** (1999) Visualization of dioxygen bound to copper during enzyme catalysis. *Science* **286**, 1724-1728.
- Wink, D. A., Mitchell, J. B.** (1998) Chemical biology of nitric oxide: Insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanism of nitric oxide. *Free Radic. Biol. Med.* **25**, 434-456.
- Wu, Y. L., Wiltbank, M. C.** (2002) Transcriptional regulation of the cyclooxygenase-2 gene changes from protein kinase PKA- to PKC-dependence after luteinization of granulosa cells. *Biol. Reprod.* **66**, 1505-1514.
- Xanthoudakis, S., Viola, J. P., Shaw, K. T., Luo, C., Wallace, J. D., Bozza, P. T., Luk D. C., Curran, T., Rao, A.** (1996) An enhanced immune response in mice lacking the transcription factor NFAT1. *Science* **272**, 892-895.
- Xie, Q-W., Cho, H., Calaycay, J., Muford, R. A., Swiderek, K. M., Lee, T. D., Ding, A., Troso, T., Nathan, C.** (1992) Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. *Science* **256**, 225-228.
- Xu, L., Zhang, L., Yi, Y., Kang, H. K., Datta, S. K.** (2004) Human lupus T cells resist inactivation and escape death by upregulating COX-2. *Nat. Med.* **10**, 411-415.

**Yamamoto, K., Arakawa, T., Ueda, N., Yamamoto, S.** (1995) Transcriptional roles of nuclear factor kappa B and nuclear factor-interleukin-6 in the tumour necrosis factor alpha-dependent induction of cyclooxygenase-2 in MC3T3-E1 cells. *J. Biol. Chem.* **270**, 31315-31320.

**Yamamoto, Y., Verma, U. N., Prajapati, S., Kwak, Y. T., Gaynor, R. B.** (2003) Histone H3 phosphorylation by IKK- $\alpha$  is critical for cytokine-induced gene expression. *Nature* **423**, 655-659.

**Yamaoka, K. A., Arock, M., Issaly, F., Dugas, N., Le Goff, L., Kolb, J. P.** (1996) Granulocyte macrophage colony stimulating factor induces Fc $\epsilon$ RII/CD23 expression on normal human polymorphonuclear neutrophils. *Int. Immunol.* **8**, 479-490.

**Yan, S. R., Al-Hertani, W., Byers, D., Bortolussi, R.** (2002) Lipopolysaccharide-binding protein- and CD14-dependent activation of mitogen-activated protein kinase p38 by lipopolysaccharide in human neutrophils is associated with priming of respiratory burst. *Infect. Immun.* **70**, 4068-4074.

**Yanagihara, Y.** (1998) Mechanism and regulation of human IgE synthesis. *Allergy & Clinical immunology International* **10**, 193-197.

**Yang, J., Hu, G., Wang, S. W., Li, Y., Martin, R., Li, K., Yao, Z.** (2003) Calcineurin/nuclear factors of activated T cells (NFAT)-activating and immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM)-containing protein (CNAIP), a novel ITAM-containing protein that activates the calcineurin/NFAT-signaling pathway. *J. Biol. Chem.* **278**, 16797-16801.

**Yang, J., Rotbermel, B., Vega, R. B., Frey, N., McKinsey, T. A., Olson, E. N., Bassel-Duby, R., Williams, R. S.** (2000) Independent signals control expression of the calcineurin inhibitory proteins MCIP1 and MCIP2 in striated muscles. *Circ. Res.* **87**, E61-E68.

**Yang, T. T., Xiong, Q., Enslin, H., Davis, R. J., Chow, C. W.** (2002) Phosphorylation of NFATc4 by p38 mitogen-activated protein kinases. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 3892-3904.

**Yim, M. B., Chae, H. Z., Rhee, S. G., Chock, P. B., Stadtman, E. R.** (1994) On the protective mechanism of the thiol-specific antioxidant enzyme against the oxidative damage of biomacromolecules. *J. Biol. Chem.* **269**, 1621-1626.

**Yoshida, H., Nishina, H., Takimoto, H., Marengere, L. E., Wakeham, A. C., Bouchard, D., Kong, Y. Y., Ohteki, T., Shahinian, A., Bachmann, M., Ohashi, P.S., Penninger, J. M., Crabtree, G. R., Mak, T. W.** (1998). The transcription factor NF-ATc1 regulates lymphocyte proliferation and Th2 cytokine production. *Immunity* **8**, 115-124.

**Yu, P. H., Davis, B. A.** (1990) Some pharmacological implications of MAO-mediated deamination of branched aliphatic amines: 2-propyl-aminopentane and N-(2-propylpentyl) glycinamide as valproic acid precursors. *J. Neural Transm.* **32**, 89-92.



- Yu, P. H., Deng, Y. L.** (1998) Endogenous formaldehyde as a potential factor of vulnerability of atherosclerosis: involvement of semicarbazide-sensitive amine oxidase-mediated methylamine turnover. *Atherosclerosis* **140**, 357-363.
- Yui, Y., Hattori, R., Kosuga, K., Eizawa, H., Hiki, K., Kawai, C.** (1991). Purification of nitric oxide synthase from rat macrophages. *J. Biol.Chem.* **266**, 12544-12547.
- Zhang, X., McIntire, W. S.** (1996) Cloning and sequencing of a copper containing, topa quinone-containing monoamine oxidase from human placenta. *Gene* **179**, 279-286.
- Zhou, B., Cron, R. Q., Wu, B., Genin, A., Wang, Z., Liu, S., Robson, P., Baldwin, H. S.** (2002) Regulation of the murine NFATc1 gene by NFATc2. *J. Biol. Chem.* **277**, 10704-10711.
- Zhu, J., Shibasaki, F., Price, R., Guillemot, J. C., Yano, T., Dötsch, V., Wagner, G., Ferrara, P., McKeon, F.** (1998) Intramolecular masking of nuclear import signal on NF-AT4 by casein kinase 1 and MEKK1. *Cell* **93**, 851-861.
- Zor, U., Ferber, E., Gergely, P., Szucs, K., Dombradi, V., Goldman, R.** (1993) Reactive oxygen species mediate phorbol ester-regulated tyrosine phosphorylation and phospholipase A<sub>2</sub> activation: potentiation by vanadate. *Biochem. J.* **295**, 879-888.
- Zucker-Franklin, D., Greaves M. F., Grossi, C. E., Marmont, A. M.** (1980) *Atlas of Blood Cells: function and Pathology*. Milán. Ermes and Philadelphia.
- Zurawski, S. M., Vega, F. Jr., Huyghe, B., Zurawski, G.** (1993) Receptors for interleukin-13 and interleukin-4 are complex and share a novel component that functions in signal transduction. *EMBO. J.* **12**, 2663-2670.



C U R R Í C U L U M  
V I T A E



## I. DATOS PERSONALES

---

**D.N.I.:** 52.696.644-X

**Fecha y lugar de nacimiento:** 07/06/1976. Sevilla.

**Domicilio:** c/ Asunción 27 Ático. 41011. Sevilla.

**Estado civil:** Soltero.

**Teléfonos:** 954083334/ 615151662

**E-mail:** macrofago@us.es

## II. FORMACIÓN

---

### Formación académica

**Titulación superior:** Licenciatura en Biología.

**Centro:** Facultad de Biología. Universidad de Sevilla.

**Fecha:** 1994-1999.

**Estudios de Doctorado en Biología Molecular y Celular** (periodo docente e investigador).

**Centro:** Vicerrectorado de Enseñanzas propias y Tercer Ciclo. Universidad de Sevilla.

**Fecha:** 2000-2001.

**Diploma de estudios avanzados (D.E.A) y suficiencia investigadora.**

**Centro:** Vicerrectorado de Enseñanzas propias y Tercer Ciclo. Universidad de Sevilla.

**Fecha:** 2002.

### Formación complementaria

**Curso de auxiliares y técnicos de laboratorio de investigaciones biológicas y aplicaciones clínicas.**

**Centro:** Dpto. de Biología del Desarrollo. Facultad de Medicina. Universidad de Sevilla.

**Fecha:** 2004.

**Duración:** 298 horas.

### **Curso de Citometría de Flujo**

**Centro:** Servicio Regional de inmunología y Alérgia. Hospital Universitario Virgen Macarena. Sevilla.

**Fecha:** 2004.

**Duración:** 4 días.

### **Informática e Idiomas**

**Nivel de usuario:** Windows XP, Microsoft Word, Microsoft Excel, Microsoft Power-Point, Adobe Photoshop, CorelDraw, Internet y Correo electrónico.

**Programas relacionados con Biología Molecular:** Blast (Pubmed/medline), Sigma-Plot, Sigma-Stat, Scion-Image.

**Inglés:** medio-alto. (Habla, lee y escribe)

## **III. ACTIVIDADES DE CARÁCTER CIENTÍFICO PROFESIONAL**

---

### **Personal Investigador**

**Centro:** Dpto. de Medicina. Facultad de Medicina. Universidad de Sevilla.

**Fecha:** 01/04/2002-31/03/2003.

01/12/2003-31/05/2004.

### **Becario predoctoral**

**Centros:** Dpto. de Bioquímica Médica y Biología Molecular & Servicio Regional de Inmunología y Alergia. Dpto. de Medicina. Facultad de Medicina. Universidad de Sevilla.

**Fecha:** 1999-2005.

### **Colaborador honorario**

**Centro:** Dpto. de Bioquímica Médica y Biología Molecular. Facultad de Medicina. Universidad de Sevilla.

**Fecha:** 1999-2005.

### **Técnicas o especialidades que domina**

(i) *Técnicas de Biología celular:* Líneas celulares, cultivos primarios, subcultivos, cromosomas, confección de cariotipos.

(ii) *Métodos Inmunológicos:* aislamiento de células sanguíneas (linfocitos, neutrófilos, macrófagos, timocitos), determinación de inmunoglobulinas, determinación de factores del complemento, técnicas de inmunodifusión radial, técnicas ELISA.

(iii) *Análisis enzimáticos:* Determinación de radicales libres ( $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ ), determinación de NO, análisis de actividad calcineurina, análisis de lípidos.

(iv) *Métodos Inmunofluorométricos:* Inmunocitoquímica, técnicas de citometría de flujo, determinación de calcio intracelular.

(v) *Métodos de Biología Molecular:* Western-blot, Northern-blot, ADN, cADN, PCR convencional, PCR cuantitativa, cultivos bacterianos, clonación, restricción, transfección, análisis de expresión.

## **IV. PUBLICACIONES CIENTÍFICAS**

---

### **REVISTAS**

1. "A new role for monoamine oxidases in the modulation of macrophage-inducibile nitric oxide synthase gene expression".

**Antonio Vega**, Pedro Chacón, Javier Monteseirín, Rajaa El Bekay, Moisés Álvarez, Gonzalo Alba, José Martín-Nieto, Francisco Javier Bedoya, Elizabeth Pintado, Francisco Sobrino.

*J. Leukoc. Biol.* 2004; 75: 1093-1101.

2. "Expresión of the transcription factor NFAT2 in human neutrophils: Allergen/anti-IgE-dependent, calcineurin-mediate NFAT2 activation".

**Antonio Vega**, Pedro Chacón, Javier Monteseirín, Rajaa El Bekay, Gonzalo Alba, Alberto Martínez, Juan Asturias, José Conde, José Martín-Nieto, Elizabeth Pintado, Francisco Javier Bedoya, Francisco Sobrino.

(Enviado a publicación)

3. Modulation by reactive oxygen species of IgE-dependent COX-2 gene expression in human neutrophils".

**Antonio Vega**, Pedro Chacón, Javier Monteseirín, Rajaa El Bekay, Gonzalo Alba, Francisco Sobrino.

(Enviado a publicación)

4. "Induction of cyclooxygenase-2 expression by antigens and anti-IgE antibodies in human B, T and Natural Killer lymphocytes".

Pedro Chacón, **Antonio Vega (como coautor)**, Javier Monteseirín, Rajaa El Bekay, Moisés Álvarez, Gonzalo Alba, Antonio Martínez, Juan Asturias, José Luis Pérez, José Conde, Francisco Sobrino.

(Tercera revisión en el *European Journal of Immunology*).

5. "Síntesis and release of eosinophil cationic protein from human neutrophils"

Javier Monteseirín, **Antonio Vega (como coautor)**, Pedro Chacón, María Jesús Camacho, Pedro Guardia, Juan Asturias, Alberto Martínez, Ramón Pérez, José Conde, Francisco Sobrino.

(Enviado a publicación).



6. "Human neutrophils synthesize IL-8 in an IgE-mediated activation".

Javier Monteseirín, Pedro Chacón, **Antonio Vega**, Rajaa El Bekay, Moisés Álvarez, Gonzalo Alba, Manuel Conde, Juan Jiménez, Juan Asturias, Antonio Martínez, José Conde, Elizabeth Pintado, Francisco Javier Bedoya, Francisco Sobrino.

*J. Leukoc. Biol.* 2004; 76: 692-700.

7. "Myeloperoxidase release after allergen-specific conjunctival challenge".

Javier Monteseirín, Inés Fernández, Pedro Chacón, **Antonio Vega**, Inés Bonilla, María Jesús Camacho, Lourdes Fernández, José Conde, Francisco Sobrino.

*J. Asthma.* 2004; 6: 639643.

8. "Stimulators of AMP-activated protein kinase inhibit the respiratory burst in human neutrophils".

Gonzalo Alba, Rajaa El Bekay, Moisés Álvarez, Pedro Chacón, **Antonio Vega**, Javier Monteseirín, Cosuelo Santa María, Elizabeth Pintado, Francisco Javier Bedoya, Francisco Sobrino.

*FEBS Lett.* 2004. 573: 219-225.

9. "15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J2 induces heme-oxygenase-1 gene expression in a reactive oxygen species-dependent manner in human lymphocytes".

Moisés Álvarez, Rajaa El Bekay, Javier Monteseirín, Gonzalo Alba, Pedro Chacón, **Antonio Vega**, José Martín-Nieto, Francisco Javier Bedoya, Elizabeth Pintado, Francisco Sobrino.

*J. Biol. Chem.* 2004; 279: 21929-21937.

10. "¿Es el neutrófilo una célula reguladora del eosinófilo en los procesos mediados por IgE?".

Javier Monteseirín, Pedro Chacón, **Antonio Vega**, María Jesús Camacho, Inés Bonilla, Pedro Guardia, Francisco Sobrino, José Conde.

*Allergol Immunol Clin.* 2004; 19: 7-12.

11. "Homocysteine enhances superoxide anion release and NADPH oxidase assembly by human neutrophils. Effects on MAPK activation and neutrophil migration".

Pedro Chacón, **Antonio Vega**, Consuelo Santa María, Juan Tejedo, José Martín-Nieto, Francisco Javier Bedoya, Elizabeth Pintado, Francisco Sobrino.

*Atherosclerosis*, 2004; 172: 220-238.

12. "Specific allergens enhance elastase release in stimulated neutrophils from allergic patients".

Javier Monteseirín, Inés Bonilla, María Jesús Camacho, Pedro Chacón, **Antonio Vega**, Antonio Chaparro, José Conde, Francisco Sobrino.

*Int Arch Allergy*, 2003; 131: 174 -181.

13. "Allergen-dependent CD14 modulation and apoptosis in monocytes from allergic patients".

Javier Monteseirín, Inés Bonilla, Pedro Chacón, **Antonio Vega**, María Jesús Camacho, Pedro Guardia, José Conde, Francisco Sobrino.

*Allergy*, 2003; 58: 1027-1032.

14. "Oxidative stress is a critical mediator of the angiotensin II signal in human neutrophils: involvement of mitogen-activated protein kinase, calcineurin, and the transcription factor NF- $\kappa$ B".

Rajaa El Bekay, Moisés Álvarez, Javier Monteseirín, Gonzalo Alba, Pedro Chacón, **Antonio Vega**, José Martín-Nieto, Juan Jiménez, Elizabeth Pintado, Francisco Javier Bedoya, Francisco Sobrino.

*Blood*, 2003; 102: 662-671.

15. "Angiotensin II promotes Rac2 activation in human neutrophils. Crosstalk with MAPK kinase pathways, calcium signalling and calcineurin".

Rajaa El Bekay, Gonzalo Alba, Pedro Chacón, **Antonio Vega**, Javier Monteseirín, Elizabeth Pintado, Francisco Javier Bedoya, Francisco Sobrino.

(Enviado a publicación)

16. "L-Selectin expression on neutrophils from allergic patients".

Javier Monteseirín, Lourdes Fernández, Pedro Chacón, **Antonio Vega**, José Pérez, Alberto Martínez, Juan Asturias, Ramón Pérez y José Conde.

(Aceptado en el *Clinical and Experimental Allergy*)

17. "Allergen-induced release of lactoferrin by neutrophils from asthmatic individuals".

Javier Monteseirín, Lourdes Fernández, Pedro Chacón, **Antonio Vega**, José Pérez, Alberto Martínez, Juan Asturias, Ramón Pérez, José Conde, y Francisco Sobrino.

(Enviado a publicación)

18. "The inhibitory effect of angiotensin II on HO-1 gene expression is mediated by the reduction of iNOS transcription by human neutrophils."

Gonzalo alba, Rajaa El Bekay, Moisés Álvarez, Pedro Chacón, **Antonio Vega**, Eladio Ramos, Juan Jiménez, Francisco Javier Bedoya, Elizabeth Pintado, Francisco Sobrino.

## **CAPÍTULOS DE LIBROS**

1. "Test de Inmunología y Alergia". Volumen X.

Javier Monteseirín, **Antonio Vega**, José Conde, Francisco Sobrino.

Fundación Alergol. (Dep. Leg. SE-4116-02 (X)). Sevilla, 2002.

2. "Test de Inmunología y Alergia". Volumen VII.

Javier Monteseirín, **Antonio Vega**, José Conde, Francisco Sobrino.

Fundación Alergol. (Dep. Leg. SE-4116-02 (VII)). Sevilla, 2002.

## **V. PARTICIPACIÓN EN PROYECTOS Y GRUPOS DE INVESTIGACIÓN**

---

1. “Inflamación y estrés oxidativo: activación de factores de transcripción de linfocitos y macrófagos”.

**Entidad financiadora:** Ministerio de ciencia y Tecnología (SAF2000-0117).

**Investigador responsable:** Francisco Sobrino Beneyto.

2. “Análisis de las funciones de los neutrófilos en la respuesta alérgica”.

**Entidad financiadora:** Consejería de Salud. Junta de Andalucía.

**Investigador responsable:** Francisco Javier Monteseirín Mateo.

3. “Inmunología de la respuesta alérgica”.

**Entidad financiadora:** Plan Andaluz de Investigación (Grupos PAI/CTS511). Junta de Andalucía.

**Investigador responsable:** Francisco Javier Monteseirín Mateo.

## **VI. CONTRIBUCIONES A CONGRESOS**

---

1. “Los neutrófilos humanos producen IL-8 por activación IgE-mediada”.

Pedro Chacón, **Antonio Vega**, Javier Monteseirín, Moisés Álvarez, Gonzalo Alba, Juan Jiménez, José Conde, Elizabeth Pintado, Francisco Javier Bedoya, Francisco Sobrino.

**Tipo de presentación:** Comunicación oral.

**Congreso:** II Jornadas de Investigación área hospitalaria Virgen Macarena.

**Lugar:** Sevilla, España.

**Fecha:** 2004.

2. "Inducción IgE-dependiente de la síntesis y actividad de la Cyclooxygenasa-2 en linfocitos humanos".

Pedro Chacón, **Antonio Vega**, Javier Monteseirín, Rajaa El Bekay, Maria Jesús Camacho, Inés Bonilla, Moisés Álvarez, Gonzalo Alba, José Conde, Francisco Sobrino.

***Tipo de presentación:*** Comunicación oral.

***Congreso:*** XXVII Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular.

***Lugar:*** Lleida, España.

***Fecha:*** 2004

3. "Specific Expresión of NFAT family members in human neutrophils: allergens and anti-IgE promoted its nuclear translocation and activation".

**Antonio Vega**, Pedro Chacón, Javier Monteseirín, Moisés Álvarez, Gonzalo Alba, Juan Jiménez, José Conde, Elizabeth Pintado, Francisco Javier Bedoya, Francisco Sobrino.

***Tipo de presentación:*** póster.

***Congreso:*** II Jornadas de Investigación área hospitalaria Virgen Macarena.

***Lugar:*** Sevilla, España.

***Fecha:*** 2004

4. " A new role for monoamine oxidases in the modulation of macrophage inducible nitric oxide synthase gene expression".

**Antonio Vega**, Pedro Chacón, Javier Monteseirín, Moisés Álvarez, Gonzalo Alba, Juan Jiménez, José Conde, Elizabeth Pintado, Francisco Javier Bedoya, Francisco Sobrino.

***Tipo de presentación:*** póster.

***Congreso:*** II Jornadas de Investigación área hospitalaria Virgen Macarena.

***Lugar:*** Sevilla, España.

**Fecha:** 2004

5. “La 15-deoxy-delta (12,14)-prostaglandina J2 induce la expresión genética de la Hemo-oxigenasa-1 por un mecanismo que depende de intermediarios reactivos de oxígeno en linfocitos humanos”.

Moisés Álvarez, Rajaa el Bekay, Gonzalo Alba, Javier Monteseirín, Pedro Chacón, **Antonio Vega**, José Martín-Nieto, Francisco Javier Bedoya, Elizabeth Pintado, Francisco Sobrino.

**Tipo de presentación:** póster.

**Congreso:** XXVII Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular.

**Lugar:** Lleida, España.

**Fecha:** 2004

6. “La activación de la 5'-AMP quinasa inhibe la producción de ROS en neutrófilos.

Pedro Chacón, **Antonio Vega**, Daniela Mena, Javier Monteseirín, Consuelo Santa María, Ramón Bartrons, Elizabeth Pintado, Francisco Javier Bedoya, Francisco Sobrino.

**Tipo de presentación:** póster.

**Congreso:** XXVII Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular.

**Lugar:** Lleida, España.

**Fecha:** 2004

7. “Alergia alimentaria a proteínas de sangre y huevo de pollo”.

Lourdes Valverde, Pedro Guardia, Pedro Chacón, **Antonio Vega**, Mercedes Cabanillas, Paula Crespo, Agustín Orovitg, Lourdes Gómez, Antonio Maraví, José María Duque, José Conde.

**Tipo de presentación:** póster.

**Congreso:** Symposium Internacional de aerobiología y polinosis.

**Lugar:** Zaragoza, España.

**Fecha:** 2003.

8. "Sensitization to different kinds of live fish bait".

José Luis Pérez, Yolanda Puente, Antonio Maraví, Juan Carlos Daza, **Antonio Vega**, Pedro Chacón, Javier Monteseirín, José Conde.

**Tipo de presentación:** póster.

**Congreso:** XXII congreso de la Academia Europea de Alergología e Inmunología Clínica.

**Lugar:** París, Francia.

**Fecha:** 2003.

9. "Structural changes in Egraulis encrasicholus proteins modified by vinegar".

Antonio Maraví, José Luis Pérez, Pedro Chacón, **Antonio Vega**, Yolanda Puente, Javier Monteseirín, José Conde.

**Tipo de presentación:** póster.

**Congreso:** XXII congreso de la Academia Europea de Alergología e Inmunología Clínica

**Lugar:** París, Francia.

**Fecha:** 2003

10. "Cytosolic calcium levels in neutrophils from asthmatic patients"

Javier Monteseirín, María Jesús Camacho, Inés Bonilla, **Antonio Vega**, Julio Delgado, Pedro Chacón, José Conde, Francisco Sobrino.

**Tipo de presentación:** póster

**Congreso:** XX congreso de la Academia Europea de Alergología e Inmunología Clínica.

**Lugar:** Berlín, Alemania.

**Fecha:** 2001.

**11.** "Respiratory burst in neutrophils from asthmatic patients".

Javier Monteseirín, María Jesús Camacho, Inés Bonilla, Pedro Chacón, Pedro Guardia, **Antonio Vega**, José Conde, Francisco Sobrino.

**Tipo de presentación:** póster.

**Congreso:** XX congreso de la Academia Europea de Alergología e Inmunología Clínica.

**Lugar:** Berlín, Alemania.

**Fecha:** 2001.

**12.** "Myeloperoxidase release after allergen-specific conjunctival challenge".

Javier Monteseirín, Inés Fernández, Inés Bonilla, María Jesús Camacho, **Antonio Vega**, Pedro Chacón, Cesar Sánchez, María Hernández, José Conde.

**Tipo de presentación:** póster.

**Congreso:** XX congreso de la Academia Europea de Alergología e Inmunología Clínica

**Lugar:** Berlín, Alemania.

**Fecha:** 2001.

**13.** "IgE-dependent CD14 modulation and apoptosis in monocytes from allergic patients".

Javier Monteseirín, Inés Bonilla, Pedro Chacón, María Jesús Camacho, **Antonio Vega**, José Conde, Francisco Sobrino.

**Tipo de presentación:** póster.

**Congreso:** XX congreso de la Academia Europea de Alergología e Inmunología Clínica.

**Lugar:** Berlín, Alemania.



**Fecha:** 2001.

**14.**-“Honeymoon rhinitis in patients with allergic rhinoconjunctivitis”.

Javier Monteseirín, Maria Jesús Camacho, Inés Bonilla, Consuelo Sánchez, María Hernández, Ana De la Calle, **Antonio Vega**, Pedro Chacón, José Conde.

**Tipo de presentación:** póster.

**Congreso:** XX congreso de la Academia Europea de Alergología e Inmunología Clínica

**Lugar:** Berlín, Alemania.

**Fecha:** 2001.

## **VII. OTROS**

1. En posesión del carnet de conducir tipo **B**.
2. Disponibilidad geográfica.

Sevilla, 4 de Abril de 2004.

