
Cinética de la modulación por citoquinas de FcR en monocitos de pacientes con lupus eritematoso sistémico (LES)

Kinetics of modulation by FR cytokines in the monocytes of patients with systemic lupus erythematosus (SLE)

J. Cid¹, J. Merino¹, S. Inogés¹, E. Bandrés¹, T. Tinturés², M.L. Subirá¹, A. Sánchez-Ibarrola²

INTRODUCCIÓN

Los receptores para la fracción Fc de las inmunoglobulinas (FcR) juegan un papel esencial en el proceso de la fagocitosis inmune¹. Es bien conocido el déficit de fagocitosis observado en cuadros de patología inmunológica, como el caso del lupus eritematoso sistémico (LES). En pacientes con esta patología se ha evidenciado una expresión normal de estos receptores, lo que sugiere un déficit funcional de los mismos. Algunas citoquinas implicadas en el proceso de la respuesta inmune (como el IFN γ) muestran efecto sobre la regulación de estos receptores^{2,3}. En este trabajo hemos estudiado la regulación de la expresión de CD64 (Fc γ RI) por IFN γ en pacientes con LES, comparándolos con un grupo de controles sanos, para tratar de explicar el déficit funcional de fagocitosis de este cuadro clínico^{4,5}. Por otra parte se ha estudiado la capacidad de producción de peróxido de hidrógeno en monocitos de pacientes con LES, comparándolos con monocitos de controles sanos, en respuesta a dos tipos de estímulo: un estímulo inespecífico (PMA, phorbol

12-myristate,13-acetate), para valorar la capacidad neta de producción de peróxido^{6,7}, y un estímulo específico (entrecruzamiento del receptor de alta afinidad para IgG-CD64, Fc γ RI-), para estudiar la posible alteración en la generación de señales intracelulares que disparan el estallido respiratorio.

MATERIAL Y MÉTODOS

Aislamiento de monocitos

Se obtuvo sangre heparinizada de 14 donantes sanos (grupo control) y de 11 pacientes de LES. La sangre fue diluida 1:1 con PBS-EDTA 5mM, y se aislaron las células mononucleares mediante centrifugación en gradiente de densidad (Lymphoprep, densidad=1,077, 800 g, 20 minutos, 22 °C). El halo de células mononucleares fue recuperado, lavado dos veces con PBS-EDTA y por último centrifugado sobre suero de ternera fetal (175 g, 10 minutos, 22 °C) para eliminar las plaquetas. Después de otro lavado con PBS, las células fueron resuspendidas en medio de elutriación sin endotoxina (HBSS 0,4% BSA, EDTA 0,3 mM).

ANALES Sis San Navarra 1998, 21 (Supl. 3): 57-62.

1. Servicio de Inmunología. Clínica Universitaria de Navarra.
2. Servicio de Reumatología. Hospital de Navarra.

Correspondencia:

A. Sánchez-Ibarrola
Servicio de Inmunología
Clínica Universitaria de Navarra
Av. Pío XII 36
31008 Pamplona

La separación de monocitos de los linfocitos se llevó a cabo mediante centrifugación de contracorriente, utilizando el sistema de elutriación JE-6B (Beckman Instruments, Palo Alto, CA, USA), como ha sido descrito previamente^{8,9}. Entre 80 y 120•10⁶ células fueron introducidas en una cámara de elutriación estándar mediante una bomba peristáltica, a una velocidad de flujo constante (18 ml/min). La velocidad del rotor se disminuyó paulatinamente desde las 2500 RPM iniciales, en pasos de 20 RPM. La población obtenida se monitorizaba mediante citometría de flujo cada 12,5 ml de medio eluido. La temperatura del medio de elutriación y de la cámara de centrifugación se mantuvo constantemente a 4 °C. El rotor fue detenido cuando la velocidad de salida de las células caía por debajo de 100 células/segundo, y los monocitos se recogieron en la fracción final de 50 ml. La pureza y viabilidad de la muestra obtenida fue determinada mediante citometría de flujo.

Los monocitos aislados fueron lavados dos veces en PBS sin EDTA, y repartidos en tres alícuotas: una para análisis inmediato y dos para ser incubadas (24 h, 37 °C, 5% CO₂) en frascos de cultivo de poliestireno (Costar, Cambridge, MA, USA). Se utilizó RPMI-1640 suplementado con suero autólogo (10%) como medio de cultivo. El medio de incubación de una de las alícuotas contenía 100 U/ml de rIFN- γ (Promega, Madison, WI, USA).

Después del tiempo de incubación se recogieron las células; para despegar las células adherentes se añadió PBS 5mM EDTA frío al frasco de cultivo, y tras una incubación de 10 minutos a 4 °C y pipeteo vigoroso, la suspensión celular fue recuperada y lavada con PBS sin EDTA. La recuperación fue excelente en términos de viabilidad y pureza.

Fenotipo

Las células (10⁶ en 100 μ l PBS) fueron marcadas con anticuerpos monoclonales anti-CD16 FITC (Leu-11a, Becton-Dickinson, San José, CA, USA), -CD64 PE (32.2, Caltag, San Francisco, CA, USA) y -CD14 TriColor (MEM-18, Caltag), siguiendo las

instrucciones del fabricante, así como controles isotipo apropiados. Después de una incubación de 30 minutos a 4 °C con los anticuerpos, las células fueron lavadas dos veces en PBS y fijadas con 0,5 ml de paraformaldehído al 1%. El análisis se realizó en un EPICS Profile II (Coulter, Hialeah, FL, USA). Se recogieron los datos en formato listmode de 10,000 células, para ser analizadas con el software EPICS Elite Workstation (Coulter).

Producción de IRO

Para la valoración de producción de IRO (intermediarios reactivos del oxígeno), decidimos medir la producción de H₂O₂ utilizando la sonda diclorofluoresceína-diacetato (DCFH-DA). Esta sonda difunde en el interior celular y es desacetilada en el citoplasma por esterasas inespecíficas, quedando como producto diclorofluoresceína (DCFH), que no puede difundir al exterior de la célula. En presencia de H₂O₂, el DCFH es oxidado a diclorofluoresceína (DCF), compuesto que emite fluorescencia en el rango del FITC cuando es excitado a 488 nm¹⁰.

Los monocitos fueron cargados con DCFH-DA de la forma descrita previamente. Después de dos lavados en PBS, las células fueron resuspendidas en RPMI-1640 y divididas en cuatro alícuotas, para el estudio de producción de H₂O₂ tras estímulo específico o inespecífico.

Estímulo inespecífico: respuesta al PMA

A una de las alícuotas se añadió PMA (100 ng/ml) como estímulo del estallido respiratorio¹¹; la otra alícuota fue utilizada como control. Ambas alícuotas fueron incubadas durante 30 minutos a 37°C con agitación, y posteriormente lavadas en PBS antes de ser marcadas con anticuerpos monoclonales (incubación 30 minutos a 4 °C): anti-CD16 PE (Becton-Dickinson) y anti-CD14 TriColor. Después de un lavado final, se analizaron 10.000 células, y sus datos fueron recogidos en formato listmode para un análisis posterior.

Estímulo específico: entrecruzamiento de Fc γ RI

El estímulo específico consistió en el entrecruzamiento de receptores Fc γ RI. A una de las alícuotas separadas a este fin se añadieron 10 μ l de monoclonal 10.1 (Cymbus Biosciences), que reconoce un epitopo en el sitio de unión del CD64 (Fc γ RI) con la fracción Fc de la IgG. La alícuota control no recibió este anticuerpo. Después de una incubación de 30 minutos a temperatura ambiente, las células fueron lavadas con PBS, y se añadió a ambas alícuotas una IgG de cabra anti-ratón, marcada con PE. La función de este anticuerpo es entrecruzar los Fc γ RI del monocito, marcados con el monoclonal 10.1. Después de otra incubación de 30 minutos a temperatura ambiente, se lavaron las células con PBS y se analizaron 10.000 células por citometría de flujo. Los datos fueron recogidos en formato listmode para un análisis posterior.

Citometría de flujo

Los estudios de citometría de flujo fueron realizados en un citómetro EPICS Profile II equipado con el sistema PowerPak que permite la medición simultánea de 3 fluorescencias en una escala de 4 logaritmos. La dispersión frontal se midió con amplificación lineal, mientras que la dispersión lateral y las tres fluorescencias en estudio se sometieron a amplificación logarítmica. Los voltajes de los tubos fotomultiplicadores se mantuvieron constantes entre diferentes muestras, y los valores obtenidos para CD64 y fluorescencia de DCF fueron linealizados antes del análisis de los datos. Los monocitos fueron seleccionados mediante acotamiento electrónico en un histograma de dispersión frontal y dispersión lateral; las subpoblaciones de interés dentro de los monocitos fueron seleccionadas posteriormente mediante selección electrónica en un histograma de dos parámetros (expresión de CD14 frente a expresión de CD16).

Análisis estadístico

Los datos fueron analizados mediante el test de la U de Mann-Whitney, utilizando

el software estadístico CSS Statistica for Windows.

RESULTADOS

Expresión de CD64. Modulación por IFN γ

Los datos de nivel de expresión de CD64 (canal lineal de fluorescencia) se muestran en la tabla 1. Se observa que el nivel de expresión es superior en las muestras de pacientes con LES, sea en situación basal, sea tras incubación en presencia o ausencia de IFN γ . La diferencia entre los valores de los dos grupos (control y pacientes) es estadísticamente significativa para las tres alícuotas de células ($p=0,02$, $0,018$ y $0,005$, para células recién aisladas, células incubadas sin IFN y células incubadas con IFN, respectivamente).

Como índice de incremento de expresión de CD64 se calculó para cada muestra el cociente entre canal lineal de fluorescencia para CD64 de células incubadas con IFN y el mismo parámetro en células incubadas sin IFN (Tabla 1). Como media, el nivel de CD64 aumentó 3,28 veces en el grupo de controles sanos, frente a 4,81 veces en el grupo de pacientes con LES. La diferencia mostró significación estadística, con una $p=0,018$.

Producción basal de peróxido de hidrógeno

La fluorescencia por DCF en células no estimuladas (alícuota control) se tomó como índice de producción basal de H₂O₂. Tanto las células recién aisladas como las incubadas sin o con IFN, pertenecientes a pacientes de LES, mostraron niveles basales de producción de H₂O₂ superiores a los de las células de donantes sanos ($p<0,001$, $p=0,002$ y $p=0,001$ para células en situación basal, incubadas sin IFN e incubadas con IFN, respectivamente; datos en tabla 2). En ambos grupos, controles y pacientes, se observó una disminución en la fluorescencia basal de DCF al comparar células incubadas sin o con IFN con células recién aisladas (Tabla 2).

Tabla 1. Expresión de CD64 (canal lineal de fluorescencia). Los valores en las celdas indican la mediana y los percentiles 5 y 95 (entre paréntesis). La última fila refleja el valor p de comparación entre muestras de ambos grupos.

	Células recién aisladas	Células incubadas sin IFN	Células incubadas con IFN
Controles sanos	88 (25; 248)	71 (26; 172)	296 (60; 425)
Pacientes LES	159 (67; 397)	138 (41; 426)	676 (164; 1710)
p	0,02	0,018	0,005

Tabla 2. Producción basal de H₂O₂ (canal lineal de fluorescencia de DCF). Los valores en las celdas indican la mediana y los percentiles 5 y 95 (entre paréntesis). La última fila refleja el valor p de comparación entre muestras de ambos grupos.

	Células recién aisladas	Células incubadas sin IFN	Células incubadas con IFN
Controles sanos	942 (278; 2496)	680 (278; 2194)	466 (143; 1678)
Pacientes LES	2845 (1754; 4459)	1739 (474; 2799)	1049 (354; 2195)
p	< 0,001	0,003	0,001

Producción de H₂O₂ por estímulo inespecífico

La producción de H₂O₂ tras estímulo inespecífico con PMA se valoró para cada muestra tomando como referencia el valor de fluorescencia basal de DCF (alícuota control, sin PMA). Se calculó el cociente entre fluorescencia de DCF de células estimuladas y el mismo parámetro en células no estimuladas y se compararon los valores. Los resultados se observan en la tabla 3. En ambos grupos de individuos, controles y pacientes de LES, los valores resultaron

similares para muestras de células con el mismo tratamiento (células recién aisladas, incubadas sin IFN o incubadas con IFN). No se observaron diferencias estadísticamente significativas, lo que indica que la capacidad de producción de H₂O₂ en cualquiera de las tres situaciones experimentales es similar para ambos grupos (Tabla 3).

Producción de H₂O₂ por estímulo específico

De forma similar al apartado anterior, se calculó el cociente entre fluorescencia

Tabla 3. Producción de H₂O₂ en respuesta a PMA (cociente entre canal lineal de fluorescencia de DCF en células estimuladas y células control). Los valores en las celdas indican la mediana y los percentiles 5 y 95 (entre paréntesis). La última fila refleja el valor p de comparación entre muestras de ambos grupos.

	Células recién aisladas	Células incubadas sin IFN	Células incubadas con IFN
Controles sanos	942 (278; 2496)	680 (278; 2194)	466 (143; 1678)
Pacientes LES	2845 (1754; 4459)	1739 (474; 2799)	1049 (354; 2195)
p	< 0,001	0,003	0,001

de DCF en células que se habían sometido a entrecruzamiento del Fc γ RI y en células control (células sin anticuerpo anti-CD64). Los valores se recogen en la tabla 4. También como en el apartado anterior, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre células con el mismo

tratamiento. En ambos grupos, el patrón de respuesta era similar: ligero decremento de la producción de peróxido de hidrógeno en células incubadas sin IFN, y ligero incremento si las células habían sido incubadas en presencia de IFN (Tabla 4).

Tabla 4. Producción de H₂O₂ por entrecruzamiento de Fc γ RI (cociente entre canal lineal de fluorescencia de DCF en células estimuladas y células control). Los valores en las celdas indican la mediana y los percentiles 5 y 95 (entre paréntesis). La última fila refleja el valor p de comparación entre muestras de ambos grupos.

	Células recién aisladas	Células incubadas sin IFN	Células incubadas con IFN
Controles sanos	1,00 (0,90; 1,49)	0,92 (0,81; 1,08)	1,14 (0,77; 1,55)
Pacientes LES	1,06 (0,87; 1,24)	0,93 (0,62; 1,28)	1,15 (0,85; 1,80)
p	0,75 (N.S.)	0,59 (N.S.)	0,92 (N.S.)

DISCUSIÓN

En coincidencia con los datos publicados, los monocitos de pacientes con LES no mostraron defecto de expresión de CD64; por el contrario, el nivel de expresión de este receptor fue superior en los monocitos de pacientes con LES cuando se compararon con monocitos de pacientes sanos. Por otra parte, el efecto modulador del IFN γ sobre esta molécula fue más notable en los pacientes de LES, que respondieron con incrementos de CD64 superiores a los observados en controles sanos^{4,5}.

En lo concerniente a la función de las moléculas Fc γ RI, no se observó defecto de funcionalidad en cuanto a inducción de estallido respiratorio por estímulo de estos receptores (entrecruzamiento): los monocitos de pacientes con LES respondieron de forma similar a los de pacientes sanos, tanto en situación basal como tras incubación con o sin IFN. Por otra parte, en relación con la producción basal de H₂O₂, sí se observó una diferencia significativa en los monocitos de pacientes con LES, que presentaron mayores niveles basales de producción de este intermediario reactivo del oxígeno^{12,13}. Este hecho podría tener significado biológico en los mecanismos patogénicos del LES.

BIBLIOGRAFÍA

1. ZIEGLER-HEITBROCK HWL, FINGERLE G, SRTÖBEL M, SCHRAUT W, STELTER F, SCHÜTT C et al. The novel subset of CD14+/CD16+ blood monocytes is expanded in sepsis patients. *Euro J Immunol* 1993; 23: 2053-2058.
2. ZIEGLER-HEITBROCK HWL, ULEVITCH RJ. CD14: cell surface receptor and differentiation marker. *Immunol Today* 1993; 14: 121-125.
3. WRIGHT SD, DETMERS PA, JONG MTC et al. Interferon-gamma depresses binding of ligand by C3b and C3bi receptors on cultured human monocytes and effected reversed by fibronectin. *J Exp Med* 1986; 163: 1245-1249.
4. PERUSSIA B, DAYTON ET, LAZARUS R, FANNING V, TRINCHIERI G. Immune interferon induces the receptor for monomeric IgG1 on human monocyte and myeloid cells. *J Exp Med* 1983; 158: 1092-1113.
5. GUYRE PM, MORGANELLI PM, MILLER RJ. Recombinant iminune interferon increase immonoglobulin G Fc receptors on cultured human mononuclear phagocytes. *J Clin Invest* 1983; 72: 393-397.
6. GONWA TA, STOBO JD. Differential expression of la molecules by human monocytes. *J Clin Invest* 1984; 74: 859-866.
7. BASHAM TY, MERIGAN TC. Recombinant interferon-gamma increase HLA-DR syn-

- thesis and expression. *J Immunol* 1983; 130; 1492-1494.
8. CASADO JA, MERINO J, CID J, SUBIRA ML, SANCHEZ-IBARROLA A. Simultaneous evaluation of phagocytosis and Fc_R-mediated oxidative burst in human monocytes by a simple flow cytometry method. *J Immunol Method* 1993; 159; 173-176.
 9. CASADO JA, MERINO J, CID J, SUBIRA ML, SANCHEZ-IBARROLA A. The type of interaction with Fc_R in human monocytes determines the efficiency of the generation of oxidative burst. *Immunology* 1994; 83; 148-154.
 10. ZELLER JM, ROTHBERG L, LANDAY AL. Evaluation of human monocyte oxidative metabolism utilizing a flow cytometric assay. *Clin Exp Immunol* 1989; 78; 91-96.
 11. PASSLICK B, FLIEGER D, ZIEGLER-HEITBROCK HWL. Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood* 1989; 74; 2527-2534.
 12. CLARKSON SB, ORY PA. CD 16: developmentally regulated Ig G Fc receptors on cultured human monocytes. *J Exp Med* 1988; 167; 408-420.
 13. FIRESTEIN GS, ZVAIFLER NJ. Down regulation of human monocyte differentiation antigens by interferon gamma. *Cell Immunol* 1987; 104; 343-354.