



Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias
Escuela de Química y Farmacia

PROFESOR PATROCINANTE: Dr. Rafael Burgos A.
INSTITUTO: Farmacología
FACULTAD: Ciencias Veterinarias

PROFESOR CO-PATROCINANTE: Dra. Maria A. Hidalgo
INSTITUTO: Farmacología
FACULTAD: Ciencias Veterinarias

**“ROL DEL CALCIO EN LA LIBERACIÓN DE METALOPROTEINASA-9 EN
NEUTROFILOS HUMANOS INDUCIDOS POR fMLP ”**

Tesis de grado presentada como
parte de los requisitos para optar al
Título de Químico Farmacéutico.

FABIAN EDUARDO PÉREZ NIESEL

VALDIVIA - CHILE
2008

“Sólo cerrando las puertas detrás de uno se abren ventanas hacia el porvenir.”

Françoise Sagan

A mi mamá

AGRADECIMIENTOS

Dar gracias a mi familia, por el constante apoyo, a mi mamá, a mis hermanos Cristian y Sandra por la confianza depositada en mí.

A mi polola Sujei, gracias por la infinita paciencia, el amor fiel e incondicional y por acompañarme en buenos y malos momentos, de verdad muchas gracias.

A los integrantes del Instituto de Farmacología por su gran calidad humana, ya que desde el principio me acogieron y brindaron un grato ambiente, tanto dentro como fuera del Instituto.

Finalmente quiero extender dichos agradecimientos, a mis profesores Dr. Rafael Burgos y Dra. María Angélica Hidalgo, no solo por la formación entregada, sino que además por darme la oportunidad y confianza de realizar mi trabajo de tesis, entregándome toda su disposición y ayuda.

Quiero extender este agradecimiento a los proyectos FONDEF N° D04I1240 y DID N° 200524 por financiar este trabajo de titulación.

INDICE

INDICE	1
ABREVIATURAS	3
RESUMEN	4
SUMMARY	5
INTRODUCCIÓN	6
Neutrófilos	6
N-formil-metionil-leucil-fenilalanina	9
Calcio	11
Vías de señalización (MAPK)	16
Metaloproteinasas de matriz extracelular	20
Hipótesis	23
Objetivo General	23
Objetivos Específicos	23
MATERIALES	24
MÉTODOS	27
Aislamiento de neutrófilos de sangre periférica	27
Medición de Ca ²⁺ intracelular	28
Obtención de Extractos totales	29
Western Blot	30
Estimulación y preparación de la muestra de MMP-9	31
Zimografía en gelatina	31
Análisis Estadístico	32

RESULTADOS	33
Efecto de 2-APB sobre la movilización de calcio intracelular en neutrófilos humanos estimulados con fMLP	33
Efecto de Capsaicina sobre la movilización de calcio intracelular en neutrófilos humanos estimulados con fMLP	35
Efecto de BTP2 sobre la movilización de calcio intracelular en neutrófilos humanos estimulados con fMLP	37
Efecto de inhibidores de canales operados por almacenamiento en la liberación de MMP-9 desde neutrófilos humanos	39
Efecto de inhibidores de vías de señalización en la liberación de MMP-9 desde Neutrófilos Humanos	41
Efecto de inhibidores de canales operados por almacenamiento en la fosforilación de p38 MAPK	43
Efecto de inhibidores de canales operados por almacenamiento en la fosforilación de ERK	46
Tinción de proteínas	49
DISCUSION	52
BIBLIOGRAFIA	59
ANEXOS	68

ABREVIATURAS

fMLP	N-formil-metionina-leucil-fenilalanina.
DMSO	Dimetilsulfoxido.
PAF	Factor activante plaquetario.
ERK 1/2	Quinasas reguladas por señales extracelulares.
MAPK	Proteínas quinasas activadas por mitógeno.
PLC	Fosfolipasa C.
PKC	Proteína quinasa C.
HBSS	Solución balanceada de Hank's.
PI3K	Fosfatidil inositol 3 quinasa.
COX-2	Ciclooxigenasa-2.
MEK	Quinasa extracelular mitógena.
PBS	Buffer de fosfato salino.
MMP-9	Metaloproteinasas de la matriz 9.
2-APB	2-Aminoetoxidifenil borato.
SOCs	Canales de calcio operados por almacenamiento.

RESUMEN

El aumento de Ca^{2+} intracelular en neutrófilos está asociado a una serie de respuestas celulares, como liberación de gránulos secretorios, síntesis de mediadores proinflamatorios y producción de radicales libres derivados del oxígeno. Las metaloproteinasas (MMP-9) son endopeptidasas zinc dependientes. Su principal función es degradar matriz extracelular y membrana basal, lo que resulta vital para remodelar tejidos durante embriogénesis y crecimiento. En diversos eventos celulares, se ha descrito que un incremento de Ca^{2+} induciría un aumento en la liberación de MMP-9 vía ERK 1/2 y p38 MAPK en otros tipos celulares. fMLP, genera un ingreso de Ca^{2+} al citoplasma de neutrófilos humanos, lo que regula la activación de la cascada MAPK ERK 1/2 y la consecuente liberación de MMP-9 desde gránulos terciarios. En el siguiente trabajo de tesis se evaluó la participación de las entradas capacitativas de Ca^{2+} en la activación de la vía de las MAPK y en la liberación de MMP-9 desde gránulos terciarios en neutrófilos humanos estimulados por fMLP.

Los neutrófilos fueron aislados desde sangre de voluntarios sanos, la movilización de Ca^{2+} fue medida por espectrofluorimetría, la liberación de MMP-9 fue cuantificada por zimografía y la fosforilación de ERK 1/2 y p38 fue determinada por medio de western blot. En todos los casos se utilizó fMLP (0,1 μ M) como estímulo y diferentes inhibidores de canales de Ca^{2+} e inhibidores de las vías de transducción de señal. Los resultados obtenidos demuestran que la modulación de los canales capacitativos de Ca^{2+} reduce parcialmente la liberación de MMP-9 en neutrófilos humanos. Por otra parte la liberación de MMP-9 estaría mediada por un mecanismo que involucra la vía ERK 1/2, pero independiente de p38 MAPK.

SUMMARY

The increase of intracellular Ca^{2+} in neutrophils is associated to a series of cellular responses, such as secretory granules release, synthesis of proinflammatory mediators and production of radicals derived from oxygen species. Metalloproteinases (i.e. MMP-9) are zinc-dependent endopeptidases. Their principal function is to degrade extracellular matrix and basal membrane, being this function necessary to remodel tissues during embryogenesis and growth. In diverse cellular events, it has been described that an increase of calcium would induce an increase in the secretion of MMP-9 via ERK 1/2 and p38 MAPK in other cellular types. FMLP generates an influx of calcium to the cytoplasm of human neutrophils, which regulates the activation of cascade MAPK ERK 1/2 and the consequent MMP-9 release from tertiary granules. In the following thesis work the participation of the capacitative calcium entry on the activation of the MAPK pathway and MMP-9 release in human neutrophils stimulated by fMLP was evaluated.

The neutrophils were isolated from peripheral blood of healthy human volunteers, the calcium mobilization was measured by spectrofluorimetry, the MMP-9 liberation was quantified by zymography and the phosphorylation of ERK 1/2 and p38 MAPK was determined through of western blot. In all cases the cells were stimulated with fMLP (0.1 μM). In some experiments the neutrophils were pretreated with several MAPK and putative SOCE inhibitors. The obtained results demonstrate that the modulation of the SOCE partially reduces the liberation of MMP-9 in human neutrophils. On the other hand, the MMP-9 liberation is probably mediated by a mechanism that involves ERK 1/2 pathway, but not of p38 MAPK.

INTRODUCCIÓN

Neutrófilos

El sistema inmune posee componentes celulares y moleculares. Dentro de los componentes celulares se encuentran células clasificadas como leucocitos polimorfonucleares. Entre éstos, los neutrófilos son un pilar fundamental en la respuesta efectiva contra las infecciones producidas por microorganismos extracelulares, como la mayoría de las bacterias y ciertos hongos (Cassatella, 2003; Edwards, 1994).

Los neutrófilos son por lejos la población de leucocitos más abundante, representando cerca del 60% de todos los leucocitos circulantes. Los polimorfonucleares derivan de un progenitor mieloide en la médula ósea. Este proceso de diferenciación es conocido como mielopoyesis, con una duración de aproximadamente 2 semanas (Edwards, 1994; Theilgaard-Monch *et al*, 2006).

El neutrófilo maduro, posee un diámetro de 10-12 μm , y se caracterizan por un núcleo multilobulado, profusión de gránulos citoplasmáticos y acúmulos de glucógeno; tienen escaso retículo endoplásmico, pocos ribosomas y algunas mitocondrias (Patiño y Dávila, 1991). La médula ósea posee un *pool* de neutrófilos adultos que contiene aproximadamente 20 veces el número de neutrófilos en la circulación (Delves y Roitt, 1998).

Al producirse una lesión hay un aumento de la adherencia de los neutrófilos sobre el endotelio vascular (marginación), abriéndose paso con dificultad por comisuras entre células endoteliales

adyacentes (diapédesis), posteriormente migra dentro de los tejidos (quimiotaxis), hasta alcanzar y reconocer al patógeno extraño, iniciándose la fagocitosis y la activación de mecanismos bactericidas. Se produce una liberación de productos citotóxicos, en caso de que el patógeno no pueda ser incluido en una vesícula fagocítica (fagocitosis frustrada), y una liberación de moléculas pro-inflamatorias (quimioattractantes) y otros inmunoestimulantes (citocinas), en caso de ser necesarias más células del sistema inmune (incluyendo más neutrófilos) al sitio de infección (Edwards, 1994; Witko-Sarbat *et al*, 2000).

Según describen Borregaard y Cowland (1997), los neutrófilos contienen cuatro diferentes clases de gránulos:

- ❖ Azurófilo (primario)
- ❖ Especifico (secundario)
- ❖ Terciaria (gelatinasa)
- ❖ Vesículas secretorias.

Los diversos subconjuntos de gránulos contenidos dentro del neutrófilo constituyen un depósito importante no sólo de proteínas antimicrobianas, proteasas, y componentes del sistema NADPH-oxidasa, sino que también de una gran variedad de receptores de membrana para moléculas de adhesión endoteliales, proteínas de la matriz extracelular, productos bacterianos, y mediadores solubles de la inflamación (Faurschou y Borregaard, 2003).

La liberación de gránulos (exocitosis), se produce por 3 mecanismos diferentes: exocitosis simple, exocitosis compuesta y fusión acumulativa o una combinación de estos (Lollike *et al*, 2002).

Es la movilización controlada de estas organelas citoplasmáticas la que permite la transformación del neutrófilo de una pasiva célula circulante, a una potente célula efectora de la inmunidad innata. Adicionalmente, la exocitosis regulada le permite al neutrófilo liberar su arsenal proteico potencialmente citotóxico en una forma dirigida a sectores específicos, así previniendo un daño extendido en el tejido del huésped en la mayoría de situaciones (Faurischou y Borregaard, 2003).

Los neutrófilos desarrollan diversas acciones que favorecen la destrucción de microorganismos, como degranulación lisosómica, producción de radicales libres de oxígeno, fagocitosis, síntesis y liberación de quimioquinas y otros mediadores pro-inflamatorios como por ejemplo TNF α , IL-1- α . Además los neutrófilos inducen enzimas tales como ciclooxigenasa-2 (COX-2) y Oxido Nítrico Sintasa (iNOS) cuyos productos son prostaglandinas y oxido nítrico, respectivamente (Holtmann *et al*, 1999).

Se ha demostrado que los factores quimiotácticos aumentan la adherencia de los neutrófilos provocando una movilización de receptores a la superficie celular para C3bi, laminina desde los gránulos secundarios y terciarios. En este fenómeno interviene el endotelio y participa TNF α e IL-1- α . Las células endoteliales se vuelven adhesivas para leucocitos y empiezan a producir una serie de moléculas que amplifican el fenómeno inflamatorio (Patiño y Dávila, 1991).

La mayor parte de los pasos en este proceso están en función de la movilización de gránulos citoplasmáticos y vesículas secretorias (Faurischou y Borregaard, 2003).

La elevación de Ca^{2+} intracelular produce, como respuesta, exocitosis de gránulos en una gran variedad de células, pero el mecanismo molecular por el cual esto ocurre es desconocido (Sengelov *et al*, 1995; Borregaard y Cowland, 1997).

Una de las sustancias quimiotácticas más importantes es el N-formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLP), péptido bacteriano que es un potente quimioattractante de neutrófilos (Selvatici *et al*, 2006).

N-formil-metionil-leucil-fenilalanina

El fMLP es un tripéptido sintético homólogo a los péptidos originados en la lisis bacteriana. Es un potente quimioattractante de los neutrófilos y es también generalmente adoptado como el patrón de referencia para evaluar la actividad de nuevos análogos sintetizados. Además de su alto carácter lipofílico, debido a la presencia de las tres cadenas laterales hidrófobas, este compuesto se caracteriza por una pronunciada flexibilidad conformacional de su cadena central, lo cual parece ser una característica importante para establecer interacciones eficientes con su receptor (Fabbria *et al*, 2000; Marasco *et al*, 1984).

La estimulación de los neutrófilos con fMLP resulta en un amplio rango de respuestas funcionales incluyendo ensamblaje de actina, adherencia, entrada de Ca^{2+} (Chen y Jan, 2001), quimiotaxis, producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Zhu y He, 2006), liberación de gránulos enzimáticos y fagocitosis (Avdi *et al*, 1996; Nick *et al*, 1997).

El receptor de fMLP, es un receptor acoplado a proteína G, caracterizado por siete dominios de transmembrana hidrófobicos, conectados por los dominios hidrófilos; con sitios de potencial N-glicosilación o fosforilación presentes en la superficie extracelular o intracelular del receptor, respectivamente.

La activación de los neutrófilos con fMLP comienza con la unión de éste a su receptor, que activa la proteína G_{i2} , provocando un cambio de GDP a GTP unido en la subunidad α , y disociación de las subunidades $\beta\gamma$ (Selvatici *et al*, 2006). Sucesivamente se activa la enzima PLC, que provoca la hidrólisis de fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP_2) generando inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3), lo cual libera Ca^{2+} del retículo endoplasmático, y diacilglicerol (DAG). Este ultimo activa distintas isoformas de proteína quinasa C (PKC) (Migeotte *et al*, 2006).

La vía de la fosfatidilinositol-3 quinasa (PI3K), Akt/PKB es también activada por fMLP. Así también otros efectores intracelulares incluyen fosfolipasa A_2 (PLA_2) y fosfolipasa D (PLD), quinasas reguladas por señales extracelulares (ERK 1/2), JNK y p38, miembro de la familia de las MAPK (Avdi *et al*, 1996; Migeotte *et al*, 2006; Selvatici *et al*, 2006).

Se ha demostrado que luego de la unión de fMLP a su receptor se inicia una secuencia de fosforilación de proteínas, eventos que incluyen la activación de la proteína quinasa dependiente Ras (Raf y MAP/ERK kinasa kinasa-1 (MEKK-1) que fosforila y activa la MAP/ERK kinasa (MEK-1 y MEK-2) que activan la MAPK p42/44 (ERK 1/2). La activación de esta vía de quinasas es máxima entre 1-2 minutos después de la exposición con fMLP. Se reporta que fMLP activa fuertemente a las proteínas MAPK p38 y ERK 1/2. La activación de ERK 1/2 por fMLP

ocurre a través de la activación de MEK1/MEK2, mientras la activación de p38 por fMLP parece ocurrir a través de la activación de MKK3 (Nick *et al*, 1997).

Calcio

El Ca^{2+} es un segundo mensajero esencial en virtualmente todos los tipos celulares, regulando un amplio espectro de eventos desde neurotransmisión hasta transcripción de genes (Smyth *et al*, 2006; Petersen *et al*, 2005).

A pesar de que las células se encuentran sumergidas en elevadas concentraciones de Ca^{2+} , los niveles de Ca^{2+} que se encuentran en el citosol en forma libre son extremadamente bajos: hay 10000 veces más Ca^{2+} en el exterior (10^{-3} M) y en el retículo endoplasmático (ER) que en el interior celular (10^{-7} M). A este elevado gradiente químico se suma el hecho de que el Ca^{2+} , cargado positivamente, es atraído hacia el interior celular por el ambiente eléctrico negativo que allí predomina. Cuando una señal abre transitoriamente los canales de Ca^{2+} en alguna de estas dos membranas (plasmática o ER), el Ca^{2+} fluye principalmente al citosol, incrementando dramáticamente la concentración local de Ca^{2+} y activando mecanismos celulares sensibles a Ca^{2+} (Chen y Jan, 2001).

El Ca^{2+} citoplasmático puede ser elevado en células ya sea por liberación de reservas internas, localizadas en el RE o por entrada a través de la membrana plasmática. En muchos casos, la liberación intracelular de Ca^{2+} y la entrada de Ca^{2+} ocurren de forma concertada, así ambas

formas de aumentar la concentración intracelular Ca^{2+} son necesarias para que los procesos de señalización ocurran (Smyth *et al*, 2006).

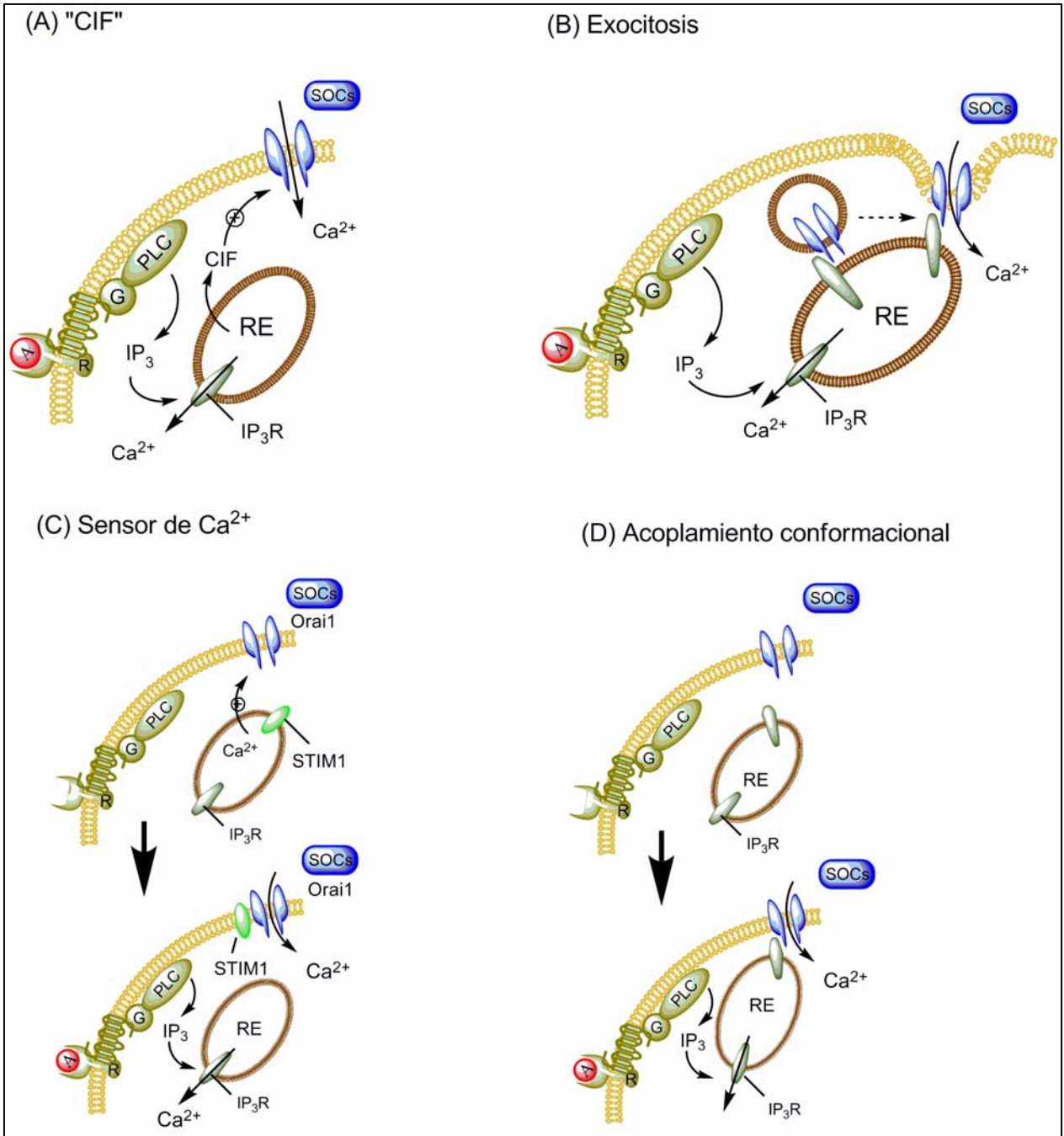
El mecanismo principal de liberación de Ca^{2+} involucran la vía IP_3 , por medio de receptores acoplados a proteína-G, ubicados en la membrana plasmática (Berridge, 1993). El IP_3 es un agente liberador de Ca^{2+} crítico en la célula, y logra esto activando el receptor del IP_3 (IP_3R) localizado en la membrana del RE; la unión de IP_3 a su receptor da como resultado la apertura del receptor/canal y la liberación de Ca^{2+} desde el RE en el citoplasma (Broad *et al*, 2001).

La activación de la vía de los fosfoinosítidos da como resultado la entrada Ca^{2+} por dos mecanismos importantes. Primero, los segundos mensajeros generados río abajo en la activación de la vía de los fosfoinosítidos, como DAG, ácido araquidónico y el mismo Ca^{2+} , directamente pueden activar canales de entrada de Ca^{2+} en la membrana plasmática; estos canales son los llamados canales operados por receptor (ROCs). En segundo lugar, la liberación de Ca^{2+} del RE inducida por IP_3 , causa un estado de depleción de Ca^{2+} ; esta reducción drástica de Ca^{2+} en el RE activa la entrada de Ca^{2+} por la membrana plasmática, un proceso originalmente llamado entrada capacitativa de Ca^{2+} (CCE), a través de canales operados por almacenamiento (SOCs) (store-operated channels) (Berridge, 1995; Dutta, 2000; Putney *et al*, 2001; Smyth, 2006; Putney, 2005; Putney, 2001).

En la actualidad, la identidad molecular de SOCs es desconocida, sin embargo los homólogos de la superfamilia de genes TRP de mamíferos representan los candidatos más promisorios (Dutta, 2000; Birnbaumer *et al*, 1996; Nilius, 2004). Los mecanismos propuestos para SOCs son:

- ❖ CIF (calcium influx factor): Una vez que se agotan las reservas intracelulares de Ca^{2+} , se libera una señal difusible que activaría los SOCs. (Bolotina, 2005; Bolotina y Csutora, 2004)
- ❖ Exocitosis: Una vez agotado el Ca^{2+} del RE, se produce una fusión de vesículas (unidas a RE) que contienen a los SOCs y expone el canal.
- ❖ Sensor de Ca^{2+} : el *pool* de Ca^{2+} se conserva en el RE, el Ca^{2+} se encuentra unido a STIM1, manteniéndose los canales SOCs en un estado inactivo. Vaciándose las reservas de Ca^{2+} del RE, el Ca^{2+} se disocia de STIM1, el cual se trasloca a la membrana plasmática en donde interactúa y activa a canales Orai1, selectivos de Ca^{2+} .
- ❖ Modelo de acoplamiento conformacional: Una vez que se descarga el ER el receptor IP_3 cambia conformacionalmente y es transmitido al canal en la membrana por interacción directa proteína-proteína (Berridge, 2004).

Figura 1. Mecanismos propuestos para la señalización de las entradas capacitativas de Ca^{2+} . En todos los modelos, la activación del agonista, resulta en la producción de IP_3 , que da como resultado la liberación de Ca^{2+} desde el RE. (A) Después del vaciamiento de las reservas de Ca^{2+} del RE, un factor difusible de Ca^{2+} (CIF), es liberado del RE y activa los canales operados por almacenamiento (SOCs) en la membrana plasmática. (B) En el modelo de exocitosis, la depleción de reservas causa fusión de vesículas que contienen canales SOCs. (C) El almacén completo mantiene en estado inhibitorio a los canales en la membrana y el vaciamiento los activa, mediante la traslocación de STIM1, el cual actúa como sensor de los niveles de Ca^{2+} en el RE (D) En el modelo del acoplamiento conformacional, el vaciamiento de las reservas de Ca^{2+} conduce a un cambio conformacional en el receptor IP_3 , lo cual le es transmitido a los canales SOCs por una interacción directa de proteína-proteína. Adaptado de Chang (2006).



Varias líneas de evidencia independientes apuntan a un rol del Ca^{2+} en la activación de la NADPH oxidasa por algunos agonistas. Aumento de los niveles de Ca^{2+} intracelular a menudo anteceden a la activación de oxidantes (Granfeldt *et al*, 2002). La activación de la oxidasa por agonistas tales como PMA ocurre en ausencia de aumentos de Ca^{2+} intracelular. Así DAG es generado en cantidades suficientemente altas para activar la PKC, y a la oxidasa.

Vías de señalización (MAPK)

Las vías de señalización intracelular usadas por neutrófilos en respuesta a los estímulos proinflamatorios han sido ampliamente estudiadas en los últimos años.

Las MAPK son una familia de proteínas quinasas serina/treonina, cuya función y regulación ha sido bien conservada durante la evolución, regulando actividades celulares que van desde la expresión de genes, mitosis, movimiento, metabolismo, y apoptosis. Entre los miembros de esta familia se encuentra las proteínas quinasas reguladas por señales extracelulares (ERK 1/2), las quinasas Jun amino terminal (JNK) y MAPK p38 (Johnson y Lapadat, 2002).

La activación de los distintos subtipos de MAPK es dependiente del tipo de célula y del estímulo usado, y el rol funcional de cada subtipo MAPK puede ser diferente de acuerdo a los tipos de células. En neutrófilos, la vía MAPK controla varias respuestas incluyendo priming, expresión de genes, fagocitosis y producción de superóxido, entre otras (Johnson y Lapadat, 2002; Pearson *et al*, 2001).

La activación de MAPK requiere la fosforilación en residuos de treonina (Thr) y tirosina (Tyr), esta activación es realizada por quinasas específicas que son conocidos como MEKs (MAP/ERK quinasas o MKK). La especificidad de MEK para MAPK es dependiente de la secuencia aminoacídica, ya que todas ejercen fosforilación sobre Thr-Xxx-Tyr, donde X confiere especificidad (Hommes *et al*, 2003).

ERK 1/2 es activada por MKK1 y MKK2, a su vez JNK es activada por MKK4 y MKK7 y la quinasa p38 MAPK es regulada por MKK3, MKK4 y MKK6 tal como se resume en la figura 2. Por lo tanto la activación de MEK específico dará como resultado un set definido de respuestas celulares (Hommes *et al*, 2003).

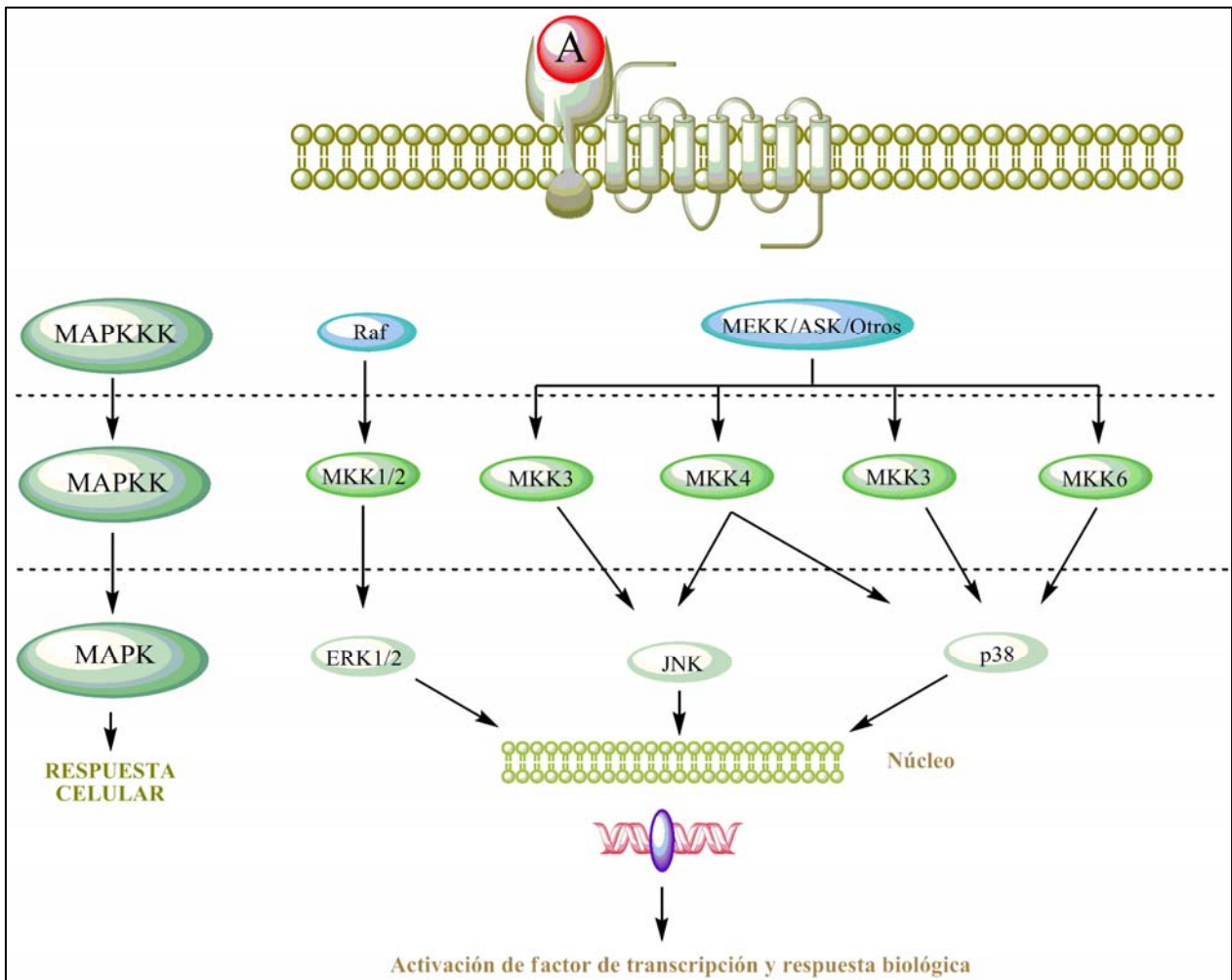


Figura 2. Esquema resumen de la vía de señalización MAPK. Activación de diferentes cascadas de señalización MAPK por diferentes estímulos extracelulares, los que culminan con activación de factores de transcripción y posterior respuesta biológica.

La actividad de MEKs está a su vez controlada por fosforilación. Este control es realizado por las enzimas MEKK (MAP quinasa quinasa quinasa, MAPKKK o MKKK), una familia de proteínas de las cuales el protooncogen c-Raf es el miembro más prominente (Pearson *et al*, 2001).

ERK fue la primera MAPK en ser caracterizada, siendo un mediador vital de un número de procesos celulares incluyendo crecimiento, proliferación y supervivencia. Hay dos isoformas de ERK que son ERK1 y ERK2, a menudo llamadas p42/p44 MAPK. La duración de la activación de ERK1/2 depende de mecanismos reguladores: La remoción de uno o ambos fosfatos en residuos de serina/treonina, o fosfatasas disminuye la actividad de MAPK (Hommes *et al*, 2003).

Otro miembro de la familia de las MAPK activada por Ca^{2+} , es la proteína quinasa 2a (SAPK2A), también conocida como p38 MAPK, es una vía que es activada fuertemente por estrés celular, citoquinas proinflamatorias y por lipopolisacáridos bacterianos (Elzi *et al*, 2001).

Los cambios en la concentración de Ca^{2+} citosólico juegan un papel importante en la fosforilación y activación de p38 y ERK 1/2 MAPK. Sin embargo la p38 MAPK requiere del Ca^{2+} intracelular para su activación y la ERK 1/2 MAPK puede requerir de Ca^{2+} extracelular para su máxima fosforilación (Elzi *et al*, 2001).

Así como en neutrófilos bovinos se ha comprobado que los canales tipo SOCs controlan la alcalinización intracelular y la fosforilación de ERK 1/2 (Sandoval, 2006).

Metaloproteinasas de matriz extracelular

Las metaloproteinasas de la matriz (MMPs; Matrix metalloproteases) son una familia multigénica de endopeptidasas que dependen catalíticamente de iones zinc y tienen la potente habilidad de degradar las proteínas de la matriz extracelular (MEC). El primer indicio de su existencia fue la constatación de la actividad proteolítica responsable de la disolución de la cola del renacuajo (Gross y Nagai, 1965).

Las MMPs pueden definirse por las siguientes características: 1) comparten secuencias de aminoácidos comunes, 2) su acción proteolítica es inhibida por los inhibidores tisulares de las metaloproteinasas (TIMPs), 3) son secretadas como proenzimas o bien existen como proenzimas transmembrana, pero, en cualquier caso, requieren ser activadas para llevar a término sus acciones, 4) el sitio activo contiene zinc (Zn^{2+}) y requiere un segundo cofactor como el Ca^{2+} , y 5) la actividad enzimática es óptima a pHs fisiológicos (Sternlicht y Werb, 2001).

Clásicamente las MMPs se dividen según su especificidad de sustrato en colagenasas, gelatinasas, estromelinas y matrilisinas. Pero debido a la superposición de funciones y a la creciente descripción de nuevos sustratos, se ha adoptado una nueva clasificación en función de las características estructurales (Van den Oteen *et al*, 2002).

La acción de las MMPs es finamente controlada para que esté circunscrita con precisión al lugar requerido. Básicamente las MMPs están sometidas a 3 tipos de regulación: transcripcional, activación proenzimática e inhibición de la activación. Además, se han descrito varios

mecanismos adicionales que no han sido revisados tan profundamente (Van den Oteen *et al*, 2002).

La actividad fundamental de las MMPs es la proteólisis de los componentes de la matriz extracelular. Esta característica de las MMPs tiene una gran importancia biológica en procesos de reestructuración tisular o de pérdida de confinamiento celular. Pero actualmente se le están atribuyendo nuevas funciones a medida que se ha puesto de manifiesto que la acción de las MMPs no está dirigida exclusivamente contra proteínas estructurales, sino que se amplía a una diversidad de sustratos que modulan el comportamiento celular (Sternlicht y Werb, 2001).

Las MMPs intervienen en la mayoría de los procesos fisiológicos que requieren el recambio de la matriz extracelular y tienen un papel bien definido en diversos procesos celulares como la proliferación, apoptosis y la morfogénesis tisular. La presencia de niveles altos de algunos miembros de la familia de las MMPs se ha asociado a destrucción tisular en una amplia variedad de procesos patológicos tales como: diseminación de metástasis tumorales, artritis, formación de aneurismas, aterosclerosis, lesión aguda de pulmón, etc. (Szabo *et al*, 2004; Fliigel *et al*, 2006).

MMP-9, es sintetizada principalmente por neutrófilos abastoados y segmentados, los cuáles representa las etapas retrasadas en la diferenciación mieloide. Se almacena luego como proenzima en gránulos terciarios alcanzando altas concentraciones. La secreción de los diferentes gránulos de neutrófilos depende del estímulo. Por regla general, un incremento de Ca^{2+} intracelular es requerido para desencadenar la exocitosis (Van den Oteen *et al*, 2002).

Se ha descrito que diferentes estímulos exógenos y endógenos provocan degranulación de gránulos terciarios que contienen gelatinasa B, como PMA, fMLP y lipopolisacarido bacteriano (LPS). Entre los reguladores fisiológicos endógenos de degranulación, se describen factores quimiotacticos, como leucotrieno B4 (LTB4), factores de complemento C3a y C5a, y en particular las citoquinas quimiotactica o quimiocinas (Sternlicht y Werb, 2001).

En neutrófilos humanos se ha demostrado la secreción de MMP-9, al ser estimulados por fMLP, PAF, C5a y G-CSF. También se ha señalado que al ser estimulado por IL-8, la liberación de MMP-9 estaría mediado por dos vías, una involucrando a PKC y ERK1/2 y la otra involucraría la familia Src quinasa (Pugin *et al*, 1999; DiScipio *et al*, 2006; Takafuji *et al*, 2003).

Se ha descrito que la liberación de MMP-9 en eosinófilos estimulados por TNP- α y fMLP estaría mediada por p38 MAP quinasa (Wiehler *et al*, 2004). En otros tipos celulares, los resultados sugieren que la estimulación con IL-1, son suficientes para activar la secreción de MMP-9 por las vías duales de señalización, PI3K-Akt y MEK-ERK (Ruhul Amin *et al*, 2003).

Hipótesis

fMLP (Formil-metionil-leucil-fenilalanina), genera un ingreso de Ca^{2+} a través de entradas capacitativas al citoplasma de neutrófilos humanos, lo que regula la activación de la cascada MAPK ERK1/2 y la consecuente liberación de MMP-9 desde gránulos terciarios.

Objetivo General

- ❖ Demostrar la participación de las entradas capacitativas de Ca^{2+} en el desarrollo de procesos involucrados con la respuesta inflamatoria en neutrófilos humanos.

Objetivos Específicos

- ❖ Evaluar el ingreso de Ca^{2+} inducido por fMLP en neutrófilos humanos, utilizando inhibidores de los canales tipo SOCs.
- ❖ Demostrar la participación del Ca^{2+} en la activación de la vía de las MAPK, generada por fMLP en neutrófilos humanos.
- ❖ Valorar el rol del Ca^{2+} en la liberación de MMP-9 desde gránulos terciarios en neutrófilos humanos estimulados por fMLP.

MATERIALES

Laboratorio Merck®

NaCl, HCl, KCl, Glicerol, Azul de bromofenol, NaMoO₄, Na₂HPO₄, KH₂PO₄, D-glucosa, Glicina, CaCl, DMSO, Etanol.

Laboratorio Winkler®

Ácido Acético, Tris, Acrilamida, Bisacrilamida, SDS, β-mercaptoetanol, Reactivo de Bradford.

Calbiochem®

PMSF, NaVO₃, UO126, fMLP, MMP-9, gelatina, BTP2.

Cell Signaling®

Anticuerpos anti-p-ERK1/2, anti-IgG rabbit unido a peroxidasa, anti-IgG mouse unido a peroxidasa, anti-p38, anti-p-p38.

Pharmacia Biotech®

Tween-20, Triton-100.

Santa Cruz®

Anticuerpo anti-ERK1

Promega[®]

SB203580

GE Healthcare[®]Percoll[™]**Sigma[®]**

Anti-Actina, Digitonina, Albúmina de Bovino, 2-APB, Capsaicina.

Amershan Life Science[®]

EGTA

PerkinElmer Life Science[®]ECL Western Lighting[™], Membranas de nitrocelulosa Protan[®].**Eppendorf[®]**

Centrífuga 5702, Tubos Eppendorf 600 µl, 1.5, 2.0 ml.

Hettich[®]

Centrífuga EBA 12, Centrífuga Mikro 22R.

Perkin Elmer[®]

Espectrofluorímetro LS55.

BOECO®

Pipetas automáticas 1,50, 200, 1000 µl, Vortex V-1.

Otros Laboratorios

Inhibidores de proteasas Roche®, Metanol TCL®, Leche Svelty Nestlé®, TEMED BiosChile®, FURA-2AM Molecular Probes®.

Otros materiales

Baño termoregulado Memmert®, Balanza analítica Scientech®, Películas Autoradiográficas Kodak®, Tubos Falcon® 15 y 50 ml, Pipetas Pasteur, Cámara de Neubauer, Microscopio óptico Motic®.

MÉTODOS

Aislamiento de neutrófilos de sangre periférica

Los neutrófilos fueron aislados de sangre de voluntarios sanos, mediante el método de gradiente de Percoll, según describe Metcalf et al (1986).

La sangre se obtuvo por punción de una vena en la parte interior del codo utilizando tubos al vacío de 9 ml que contienen citrato de sodio (Vacutainer®).

El volumen de sangre depende de las pruebas a realizar, en general fue 40mL. A la muestra se le agregó igual volumen de dextrano 3%, en tubos Falcon®, invirtiendo varias veces, dejando incubar por 20 minutos a temperatura ambiente, lo que favorece la sedimentación de los glóbulos rojos.

El pellet es descartado, y el sobrenadante, que contiene las células sanguíneas fue centrifugado a 500 x g por 5 min. Posteriormente se eliminó el sobrenadante y se mantuvo el pellet, el cual contiene leucocitos y glóbulos rojos residuales. El pellet luego fue resuspendido con 4 mL de PBS (Phosphate Buffered Saline o buffer de fosfato salino, que contiene 137 mM de cloruro de sodio, 2,7 mM de cloruro de potasio, 10 mM fosfato ácido de sodio y 2 mM de fosfato diácido de potasio).

Se preparó la columna de percoll, agregando 4 mL de percoll 63% y luego 4 ml de percoll 72% en la parte inferior. Se agregó suavemente la solución por las paredes del tubo a

la columna de percoll, y se centrifugó a 500 x g por 25 minutos. Se extrajo cuidadosamente con pipeta pasteur y se traspasó a otro tubo la capa correspondiente a los neutrófilos, que corresponde a la capa inferior. Se completó con PBS hasta aproximadamente 12 ml, se mezcló y centrifugó a 300 x g por 8 minutos.

Se eliminó el sobrenadante, y si quedaban restos de glóbulos rojos en el pellet, se procedió a realizar una lisis; resuspendiendo el pellet con 1 ml de PBS, se agregaron 2 ml de cloruro de sodio 0,2% y se mezcló por 40 segundos, se agregó 2 ml de cloruro de sodio 1,6%, se mezcló y se agregó PBS hasta 12 ml y se centrifugó 300 x g por 6 minutos. En caso de no haber restos de glóbulos rojos se lavó una vez con PBS.

Posteriormente se resuspendió el pellet en 3 ml de medio HBSS/ Ca^{2+} , y se estimó la viabilidad con azul de tripán 0,5% en PBS y se cuantificaron los neutrófilos. Ambas estimaciones se realizaron con microscopio óptico utilizando cámara de Neubauer. Los ensayos se realizaron con una viabilidad sobre el 95%.

Medición de Ca^{2+} intracelular

Se resuspendieron los neutrófilos para lograr una concentración de 2×10^7 /mL en buffer HBSS/ Ca^{2+} . Se incubó por 30 minutos a 37 °C a una concentración de 2 μ M FURA-2AM. Las células fueron lavadas tres veces y resuspendidas a 2×10^6 /ml con buffer HBSS/ Ca^{2+} . Se midió la fluorescencia en el espectrofluorímetro termoregulado con agitador magnético a 340

nm y 380 nm de excitación y 509 nm de emisión, se usaron 2 ml de células por cubeta 2×10^6 células (Lambert, 1999; Hallett et al, 1999).

Las células fueron estimuladas con fMLP $0,1 \mu\text{M}$, y en algunos casos se utilizaron inhibidores como 2-APB, Capsaicina y BTP2.

Obtención de Extractos totales

Para estos experimentos se usaron 5×10^6 células, estas fueron pretratadas 10 minutos con diferentes inhibidores SOCs, 2-APB ($1-10 \mu\text{M}$), capsaicina ($50-100 \mu\text{M}$), BTP2 ($0,5-1 \mu\text{M}$), posteriormente fueron incubadas con fMLP ($0,1 \mu\text{M}$) por 2 minutos a 37°C . Cumplido este tiempo las células fueron centrifugadas a $20000 \times g$ durante 30 segundos en centrífuga Mikro 22R Hettich[®]. Se eliminó el sobrenadante, y al pellet se le agregó el buffer de lisis (Hepes 20mM pH 7,2; NaCl 50mM ; Glicerol 10% ; Triton X-100 1% ; NaF 50mM ; NaVO₄ 1mM ; PMSF 1mM ; Inhibidores de proteasas: aprotinina $10 \mu\text{g/ml}$, leupeptina $10 \mu\text{g/ml}$, pepstatina $10 \mu\text{g/ml}$), se agitó en Vortex y se dejó en hielo durante 10 minutos, centrifugando posteriormente a $22000 \times g$ a 4°C por 15 min. El sobrenadante corresponde a los extractos totales. Las proteínas fueron cuantificadas por el método de Bradford y guardadas a -80°C .

Western Blot

Las proteínas fueron separadas por electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% en condiciones desnaturalantes a 90 volt en buffer de corrida. La cantidad de proteínas para el análisis de ERK 1/2 y p38 MAPK fue de 45 µg. Luego fueron electrotransferidas a membrana de nitrocelulosa a 0,2 A por 140 minutos, en buffer de transferencia. La membrana fue bloqueada con buffer de bloqueo por lo menos una hora. Luego se incubó toda la noche con anticuerpos anti-pERK 1/2 (1:2000), anti-p-p38 (1:1000), después se lavó tres veces con TBS-T, posteriormente se incubó por una hora y media con un anticuerpo secundario unido a peroxidasa, se lavó tres veces con TBS-T, y finalmente se reveló mediante quimioluminiscencia (ECLTM).

Como control de la cantidad de proteínas en el gel, se removieron los anticuerpos con solución *stripping*, seguido de lavados con TBS-T a lo menos por dos horas, luego la membrana fue bloqueada por una hora, se incubó toda la noche con anticuerpo anti-ERK 1/2 (1:5000) y anti-p38 (1:2000) respectivamente, luego, fue lavada tres veces con TBS-T, y vuelta a incubar por al menos una hora y media con anticuerpo secundario unido a peroxidasa, se lavó tres veces con TBS-T, y luego revelado por quimioluminiscencia. Se realizó un análisis densitométrico de las señales obtenidas con cada anticuerpo, utilizando el programa SCION-IMAGE, del NIH (Seger, 2004).

Estimulación y preparación de la muestra de MMP-9

Para estos experimentos se utilizaron 5×10^5 miles de células, estas fueron pretratadas 10 minutos con diferentes inhibidores SOCs, 2-APB (50-100 μM), Capsaicina (50-100 μM), BTP2 (0.5-1 μM), y por 15 minutos con UO126 1 μM , SB203580 10 μM , luego se incubó con fMLP (0.1 μM) por 20 minutos a 37 °C.

Cumplido este tiempo las células fueron centrifugadas a 600 x g durante 6 minutos en centrífuga Mikro 22R. (Hettich). Se extrajo el sobrenadante (que contiene MMP-9), se alicuotaron y las muestras fueron guardadas a -80 °C.

Zimografía en gelatina

Las proteínas de sobrenadante fueron separadas en una electroforesis en gel de poliacrilamida al 7,5%, que contiene 1% de gelatina en condiciones no denaturantes a 25 mA a una temperatura de 4 °C en buffer de corrida (ver anexo).

Una vez terminada la separación, el gel se lavó con Triton X-100 12,5% por 1 hora, cambiando cada 20 minutos la solución, posteriormente se dejó incubar en buffer de digestión por 14 horas a 37 °C.

A continuación el gel fue teñido con una solución de azul brillante de Coomassie R-250, con ácido acético al 13%, por 1 hora. Para desteñir, se utilizó solución de desteñido (ácido fórmico 1% y 30% metanol) por 1 h, hasta que aparecieron las bandas, y se eliminó el background. Las bandas claras indicaban que la actividad gelatinolítica de MMP-9 estaba presente. La identidad de la banda gelatinolítica de MMP-9 se analizó por comigración con un estándar MMP-9 (Winyard y Willoughby, 2003).

Se realizó un análisis densitométrico de las señales obtenidas, utilizando el programa SCION-IMAGE, del NIH.

Análisis Estadístico

Los resultados fueron expresados como media aritmética \pm su error estándar. Para evaluar las diferencias estadísticas se realizó un test ANOVA, seguido de un test de comparaciones múltiples de Dunnett, el nivel de significancia usado fue del 5 %. Para todos los análisis se utilizó el software GraphPad Prism versión 3.0.

RESULTADOS

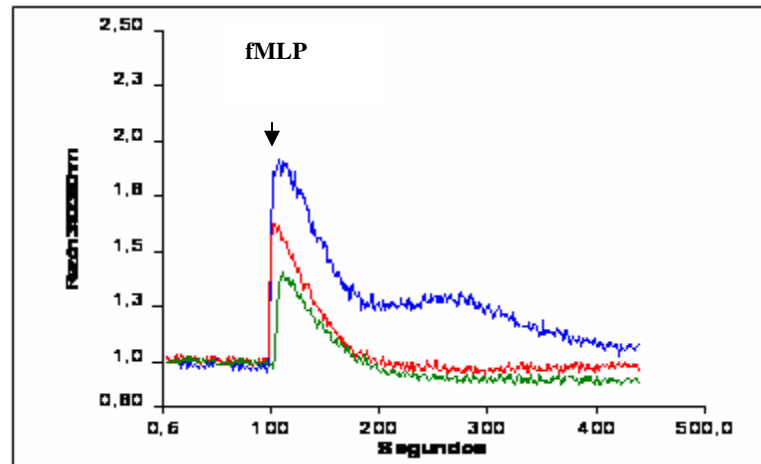
Efecto de 2-APB sobre la movilización de calcio intracelular en neutrófilos humanos estimulados con fMLP

Al estudiar el efecto de 2-APB, un conocido inhibidor de canales SOCs, sobre la movilización de Ca^{2+} inducida con fMLP (0,1 μM), a los 100 segundos fue evaluado en neutrófilos humanos marcadas con FURA2-AM.

Se observó un rápido aumento de Ca^{2+} citosólico libre al utilizar fMLP 0,1 μM como control, pero al preincubar las células con 2-APB en concentraciones de 50 y 100 μM por 10 minutos, se redujo el aumento de Ca^{2+} citosólico en la altura alcanzada y duración de la fase sostenida de entrada de Ca^{2+} (Fig. 3A), lo que muestra que 2-APB reduce el área bajo la curva de una forma dosis dependiente (Fig. 3B).

El cálculo del área bajo la curva, se realizó tomando el intervalo de tiempo, 100 segundos hasta 350 segundos, tomando como basal el valor 1,0, correspondiente a la razón 340/380 nm.

A)



B)

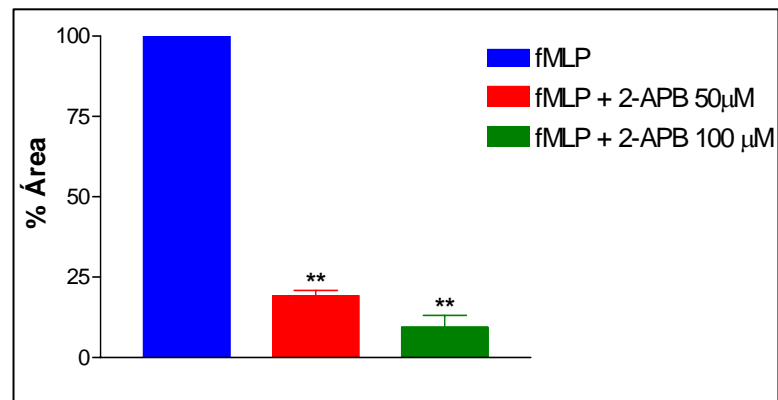


Figura 3. A) Registro representativo de la movilización de Ca^{2+} intracelular inducida por fMLP $0.1 \mu\text{M}$ en el tiempo, y el efecto de 2-APB ($50, 100\mu\text{M}$), monitoreado fluorimétricamente, en neutrófilos marcados con FURA-2AM. B) Gráfico de barra que representa el promedio del porcentaje del área bajo la curva entre los 100 – 350 segundos \pm error estándar, $n = 3$ experimentos independientes, ** $p < 0,01$ comparado con el control.

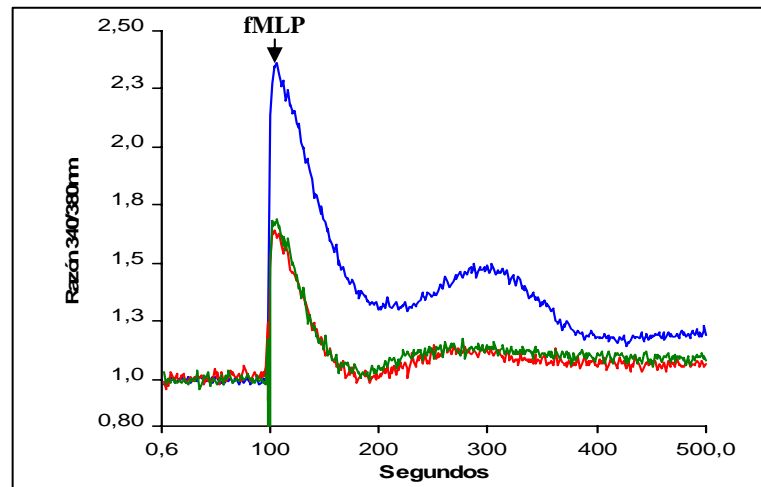
Efecto de Capsaicina sobre la movilización de calcio intracelular en neutrófilos humanos estimulados con fMLP

El efecto de Capsaicina, un conocido inhibidor SOCs, sobre la movilización de Ca^{2+} inducida con fMLP (0,1 μM) a los 100 segundos en neutrófilos humanos marcadas con FURA2-AM fue analizado.

Se observó un rápido aumento de Ca^{2+} citosólico libre al utilizar fMLP 0.1 μM , pero al preincubar las células con capsaicina en concentraciones de 50 y 100 μM por 10 minutos, se redujo el aumento de Ca^{2+} citosólico en la altura alcanzada y duración de la fase sostenida de entrada de Ca^{2+} (Fig. 4A), lo que muestra que capsaicina inhibe las entradas capacitativas de Ca^{2+} de una manera dosis dependiente (Fig. 4B).

El cálculo del área bajo la curva, se realizo tomando el intervalo de tiempo, 100 segundos hasta 350 segundos, tomando como basal el valor 1,0, correspondiente a la razón 340/380 nm.

A)



B)

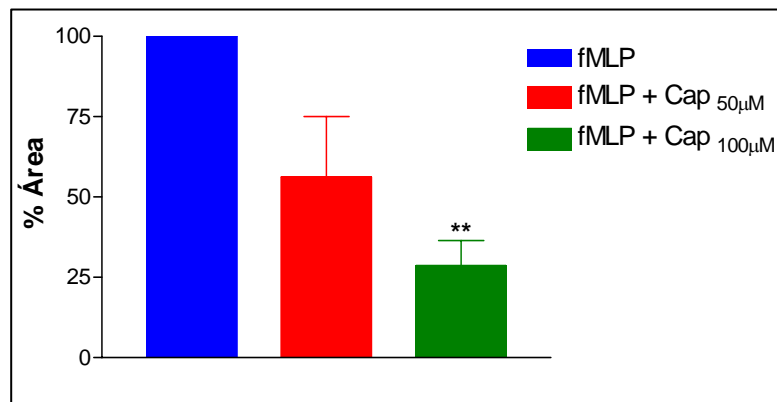


Figura 4. A) Registro representativo de la movilización de Ca^{2+} intracelular inducida por fMLP 0.1 μM en el tiempo, y el efecto de Capsaicina (50, 100 μM), monitoreado fluorimétricamente, en neutrófilos marcados con FURA-2AM. B) Gráfico de barra que representa el promedio del porcentaje del área bajo la curva entre los 100 – 350 segundos \pm error estándar, n = 3 experimentos independientes, ** p < 0,01 comparado con el control.

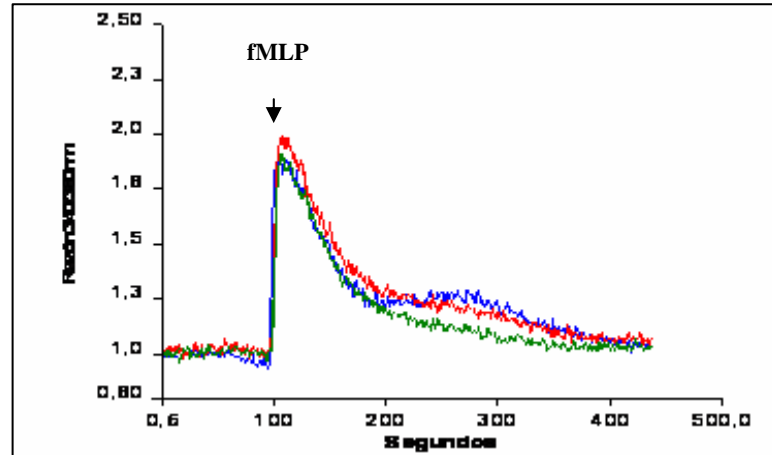
Efecto de BTP2 sobre la movilización de calcio intracelular en neutrófilos humanos estimulados con fMLP

El efecto de BTP2, conocido por inhibir los canales SOCs, sobre la movilización de Ca^{2+} inducida con fMLP (0.1 μM) a los 100 segundos en neutrófilos humanos marcadas con FURA 2-AM fue analizado.

En la figura 5A se observó un rápido aumento de Ca^{2+} citosólico libre al utilizar fMLP 0,1 μM al preincubar las células con BTP2 en concentraciones de 0,5 y 1 μM por 10 minutos, no se observó un cambio significativo en la altura y duración de la fase sostenida de entrada de Ca^{2+} , al comparar con fMLP como control (Fig. 5B).

El cálculo del área bajo la curva se realizó tomando el intervalo de 100 segundos a 350 segundos, tomando como basal el valor 1,0, correspondiente a la razón 340/380 nm.

A)



B)

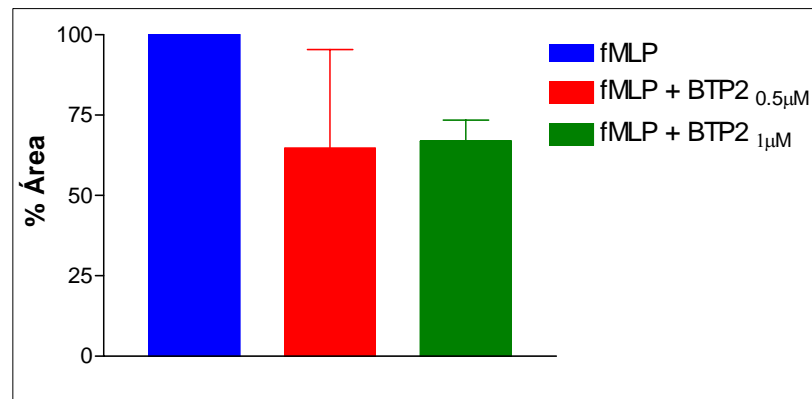


Figura 5. A) Registro representativo de la movilización de Ca^{2+} intracelular inducida por fMLP 0.1 μM en el tiempo, y el efecto de BTP2 (0,5, 1 μM), monitoreado fluorimétricamente, en neutrófilos marcados con FURA-2AM. B) Gráfico de barra que representa el promedio del porcentaje del área bajo la curva entre los 100 – 350 segundos \pm error estándar, n = 3 experimentos independientes.

Efecto de inhibidores SOCs en la liberación de MMP-9 desde neutrófilos humanos

Para determinar el rol que cumplen las entradas capacitativas de Ca^{2+} en la liberación de MMP-9, los neutrófilos fueron preincubadas por 10 minutos con distintos inhibidores, 2-APB (100 μM); capsaicina (100 μM) y BTP2 a (1 μM) y luego estimuladas con 0,1 μM de fMLP por 20 minutos. Posteriormente las muestras fueron tratadas por zimografía en gelatina.

Los resultados mostraron que sólo 2-APB 100 μM fue capaz de afectar la liberación de MMP-9, no así el tratamiento con capsaicina 100 μM y BTP2 1 μM , que no muestran diferencia con respecto a fMLP (Fig.6).

Para cuantificar la cantidad de MMP-9, se utilizó una curva estándar de MMP-9, para cada ensayo (ver anexo).

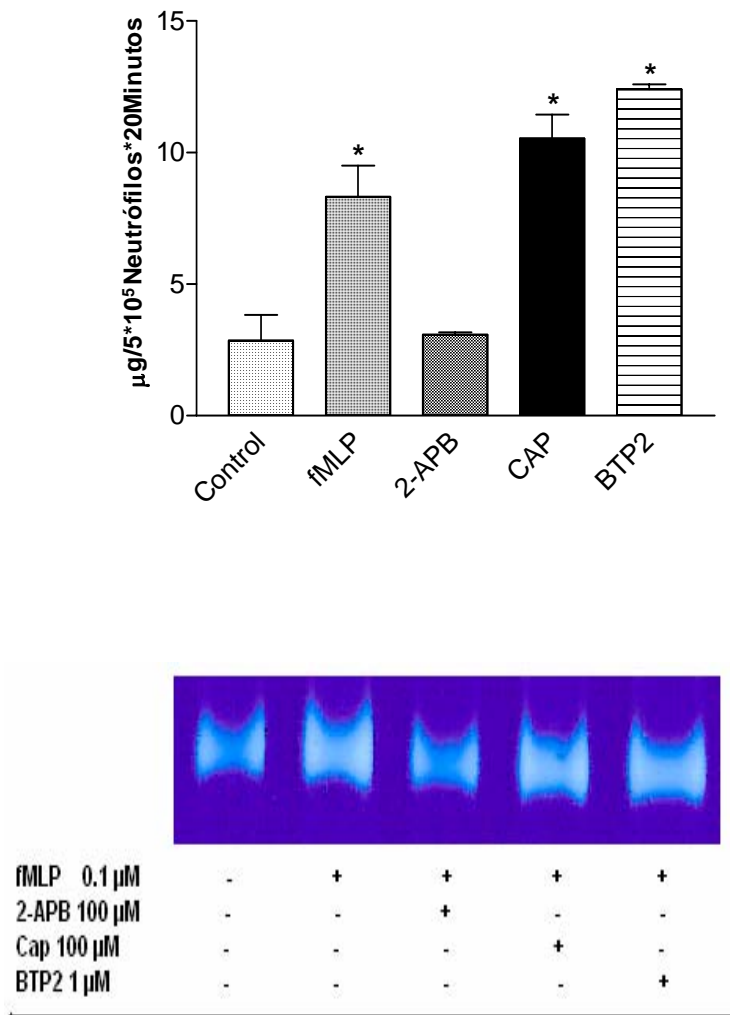


Figura 6. Efecto de 2-APB, Capsaicina y BTP2 en la liberación de MMP-9 en neutrófilos estimuladas con 0.1μM de fMLP. Grafico de barra que representa el promedio de MMP-9 liberada (μg) ± error estándar, n = al menos 3 experimentos independientes, * p < 0,05 comparado con el control.

Efecto de inhibidores de vías de señalización en la liberación de MMP-9 desde Neutrófilos Humanos

Para observar el rol que cumple la vía MAPK (ERK1/2, p38) en la liberación de MMP-9 los neutrófilos fueron pretratados con distintos inhibidores, SB203580 (inhibidor de p38 MAPK) a la concentración de 10 μ M; UO126 (inhibidor de ERK 1/2) a una concentración de 1 μ M, ambos por 15 minutos. Luego las células fueron estimuladas por 20 minutos con fMLP a una concentración de 0,1 μ M.

Posteriormente las muestras fueron analizadas por zimografía en gelatina. Para cuantificar la cantidad de MMP-9, se utilizó una curva estándar de MMP-9, utilizada para cada ensayo (ver anexo).

Los resultados mostraron que solo el inhibidor UO126 fue capaz de inhibir la liberación de MMP-9, por lo que el proceso estaría en parte mediado por ERK 1/2. No se observó efecto sobre la liberación de MMP-9 al utilizar SB203580, por lo que la vía p38 MAPK no estaría involucrada en el proceso. Al utilizar la combinación de inhibidores sólo se apreció el efecto del inhibidor UO126 (Fig. 7).

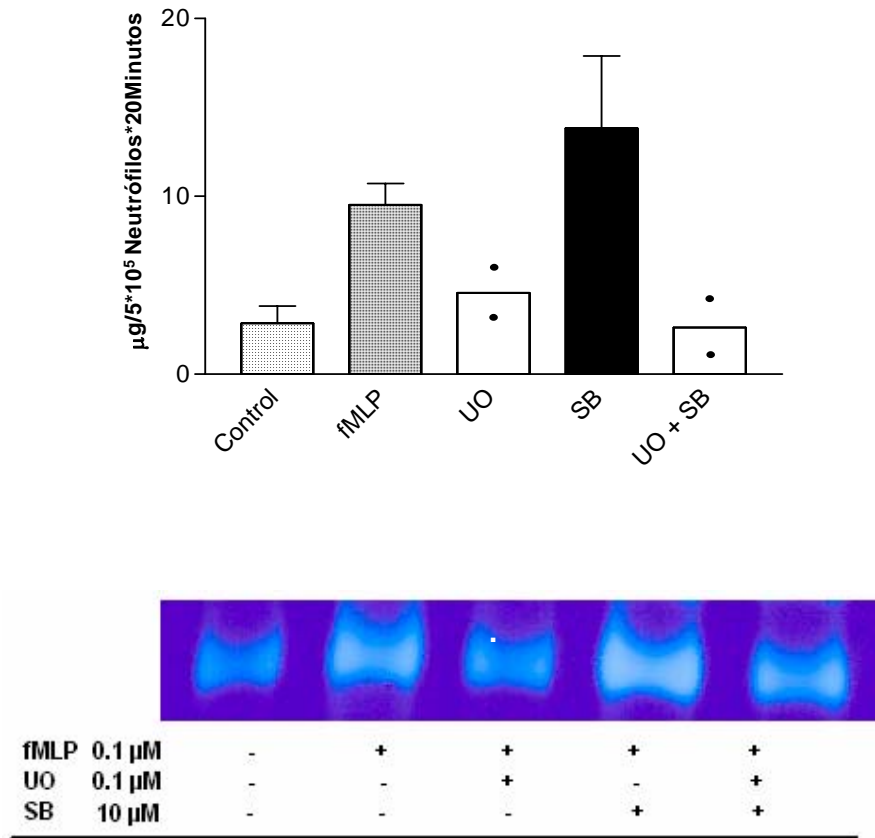


Figura 7. Efecto de UO126, SB203580 sobre la liberación de MMP-9 en neutrófilos estimuladas con 0,1µM de fMLP. Grafica de barra representa el promedio de MMP-9 liberada (µg) ± error estándar, n = al menos 2 experimentos independientes.

Efecto de inhibidores SOCs en la fosforilación de p38 MAPK

Para evaluar el rol que tienen las entradas capacitativas de Ca^{2+} en la activación de p38 MAPK, se valoró el estado de fosforilación de p38 MAPK, utilizando inhibidores de los canales capacitativos de Ca^{2+} .

Las células fueron preincubadas durante 10 minutos con distintos inhibidores: capsaicina, a una concentración de 50 μM y 100 μM , BTP2, a la concentración de 0,5 μM y 1 μM y 2-APB a una concentración de 1 μM y 10 μM . Luego las células fueron estimuladas con fMLP a la concentración de 0,1 μM durante 2 minutos, y analizadas por western blot. Para la fosforilación de las proteínas se ocupó antifosfo-p38 MAPK y como control de cantidad de proteínas anti-p38 MAPK.

En la figura 8 se observa que fMLP tuvo la capacidad de fosforilar la proteína p38 MAPK. Al usar inhibidores capsaicina y BTP2 no se observaron cambios en la activación de la proteína p38 MAPK. En el caso de 2-APB, se apreció que hay una inhibición dosis dependiente de la activación de p38 MAPK (Fig. 9).

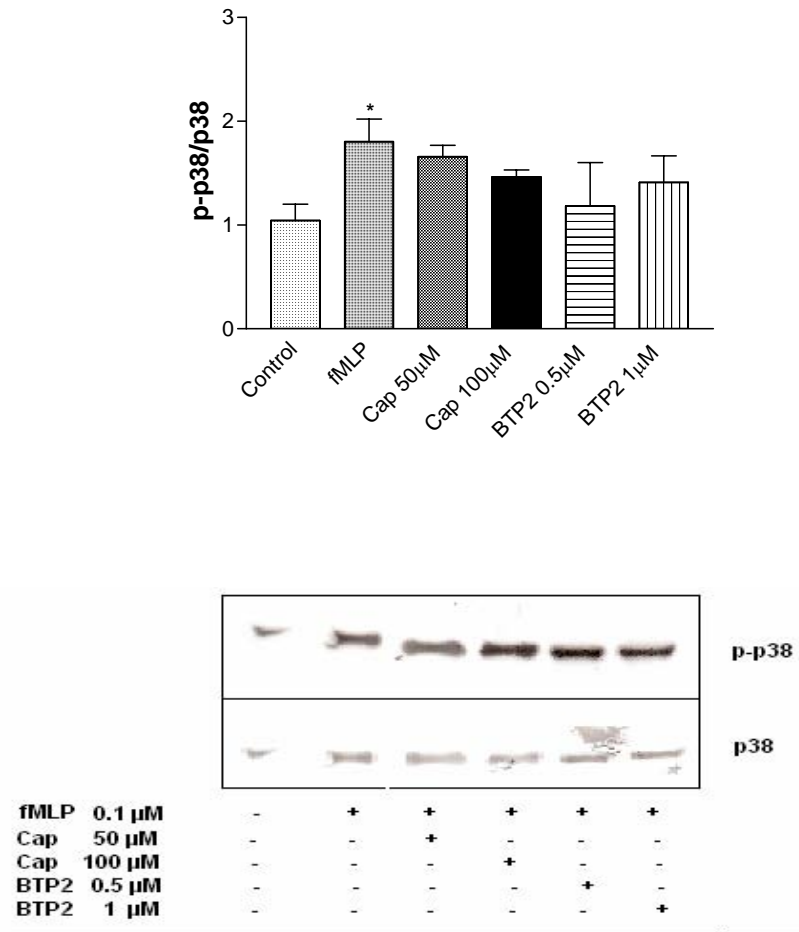


Figura 8. Se observó mediante western blot el efecto de los inhibidores Capsaicina (50 y 100µM) y BTP2 (0,5 y 1µM) sobre la fosforilación de las proteína p38 MAPK, estimuladas con 0,1µM de fMLP, * $p < 0,05$, comparado con el control.

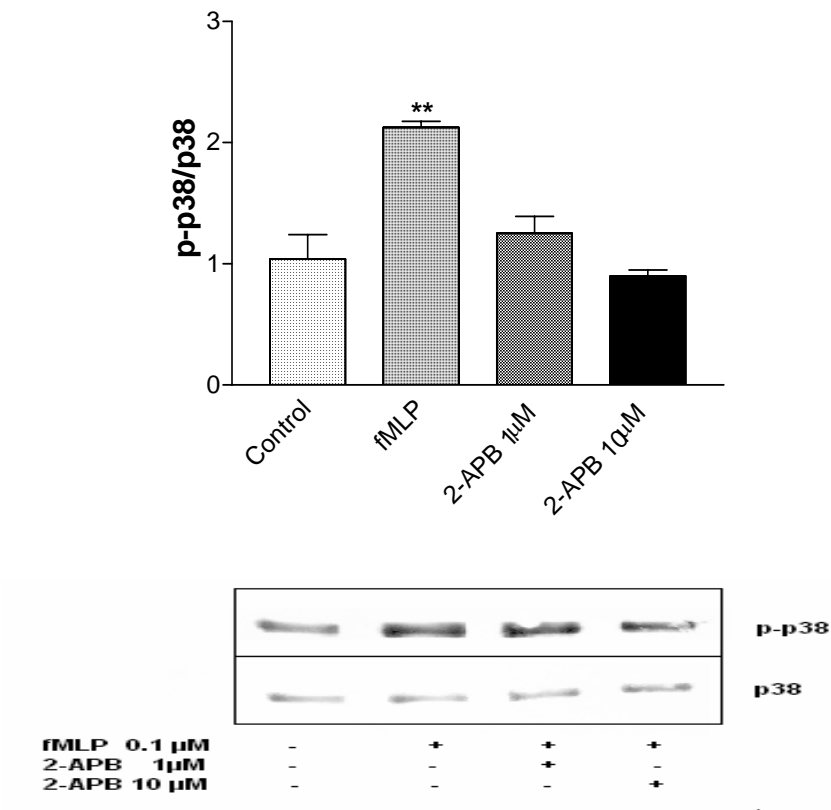


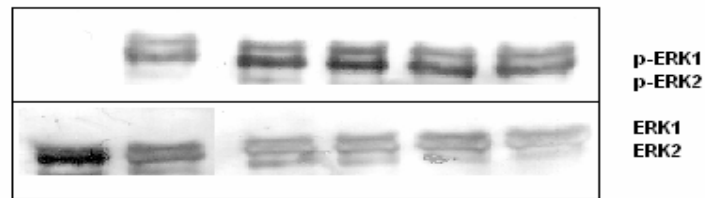
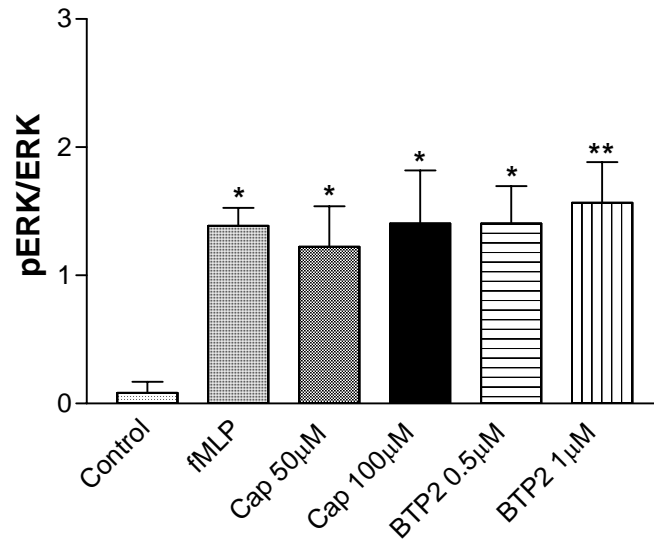
Figura 9. Se observó el efecto del inhibidor 2-APB (1 y 10µM) sobre la fosforilación de las proteínas p38 MAPK, estimuladas con 0,1µM de fMLP. Cada barra del gráfico representa el promedio de al menos tres experimentos con su error estándar, ** p < 0,01 comparado con el control.

Efecto de inhibidores SOCs en la fosforilación de ERK

Para evaluar el rol que tienen las entradas capacitativas de Ca^{2+} en la activación de ERK 1/2, se valoró el estado de fosforilación de ERK 1/2, utilizando inhibidores de los canales capacitativos de Ca^{2+} .

Las células fueron preincubadas durante 10 minutos con distintos inhibidores SOCs, capsaicina, a una concentración de 50 μM y 100 μM , BTP2, a la concentración de 0,5 μM y 1 μM y 2-APB a una concentración de 1 μM y 10 μM . Luego las células fueron estimuladas con fMLP a la concentración de 0,1 μM durante 2 minutos, y analizadas por western blot. Para la fosforilación de las proteínas se ocupó antifosfo-ERK 1/2 y como control de la cantidad de proteínas anti-ERK 1/2.

En la figura 10 y 11 se observa que fMLP tuvo la capacidad de fosforilar la proteína ERK1/2. Al usar inhibidores de entradas capacitativas de Ca^{2+} , no se observan cambios en la activación de ERK 1/2, en comparación con el control fMLP.



fMLP	-	+	+	+	+	+
Cap 50 µM	-	-	+	-	-	-
Cap 100 µM	-	-	-	+	-	-
BTP2 0.5 µM	-	-	-	-	+	-
BTP2 1 µM	-	-	-	-	-	+

Figura 10. Se observa mediante western blot el efecto de los inhibidores Capsaicina (50 y 100µM) y BTP2 (0,5 y 1µM) sobre la fosforilación de las proteína ERK 1/2, estimuladas con 0,1µM de fMLP, * $p < 0.05$, ** $p < 0,01$ comparado con el control.

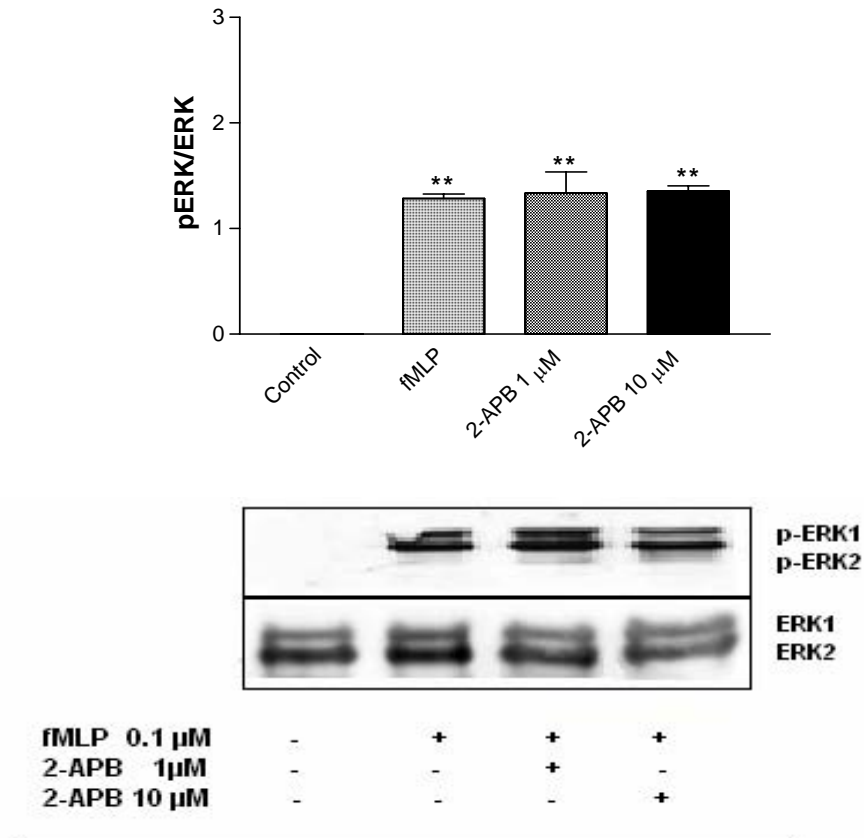


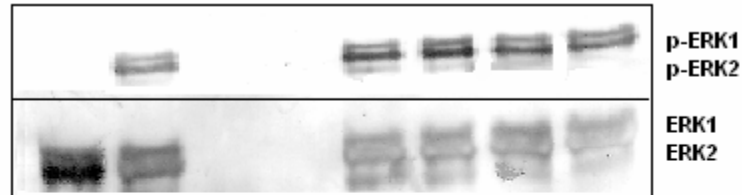
Figura 11. Se observa el efecto del inhibidor 2-APB (1 y 10 μM) sobre la fosforilación de las proteínas ERK 1/2, estimuladas con 0,1 μM de fMLP. Cada barra del gráfico representa el promedio de al menos tres experimentos con su error estándar, ** $p < 0,01$ comparado con el control.

Tinción de proteínas

Para ver el rol que juega las entradas capacitativas de Ca^{2+} en la mediación de la transducción de señal intracelular, se observó la fosforilación de p38 y de ERK1/2. Al usar los inhibidores de canales SOCs se observó que al utilizar 2-APB a las concentraciones 50 y 100 μM , las bandas correspondientes a ERK 1/2 y p38 desaparecen por completo (Fig. 12A, 12B), por lo que se procedió a realizar un perfil proteico del contenido citoplasmático de proteínas, obtenido por separación en electroforesis y posterior tinción con azul de Coomassie. Además se utilizaron concentraciones de 2-APB más bajas para ver el efecto sobre las proteínas.

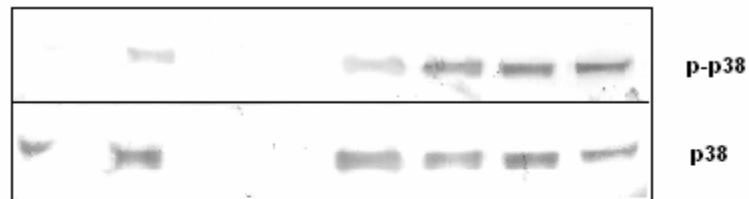
Es posible apreciar que el tratamiento con 2-APB a concentraciones de 50 y 100 μM , las proteínas desaparecen en el rango de 34-72 kDa, precisamente el rango en donde se encuentran ERK 1/2 (42 y 44 kDa respectivamente) y p38 MAPK (43 kDa) (Fig.13A). Para verificar si el efecto provocado por 2-APB corresponde al tratamiento o un efecto sobre el extracto proteico, se realiza otra tinción de proteínas agregando 2-APB al extracto control (sin tratamiento), donde se puede apreciar que no hay efecto sobre la tinción de las proteínas (Fig. 13B).

A)



fMLP (0.1 μM)	-	+	+	+	+	+	+	+
2APB (μM)	-	-	50	100	-	-	-	-
Capsaicina (μM)	-	-	-	-	50	100	-	-
BTP2 (μM)	-	-	-	-	-	-	0.5	1

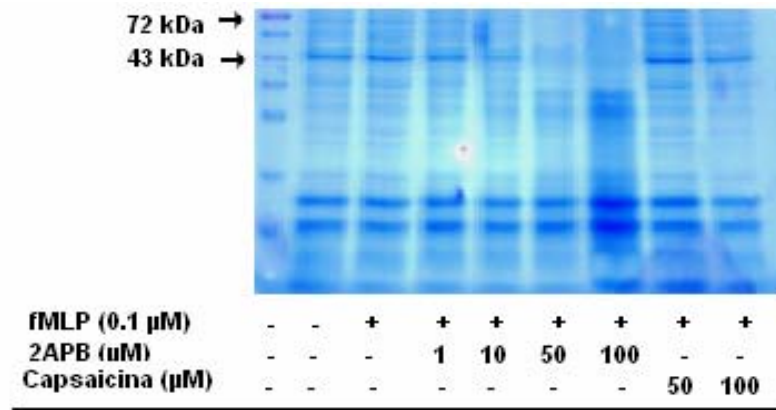
B)



fMLP (0.1 μM)	-	+	+	+	+	+	+	+
2APB (μM)	-	-	50	100	-	-	-	-
Capsaicina (μM)	-	-	-	-	50	100	-	-
BTP2 (μM)	-	-	-	-	-	-	0.5	1

Figura 12. A) Western blot, en donde se apreció la fosforilación de ERK 1/2 con los diferentes inhibidores de canales capacitativos de Ca^{2+} , en el cual con el tratamiento con 2-APB 50 y 100 μM , las bandas correspondiente a p-ERK 1/2 y ERK 1/2 total, desaparecieron totalmente. B) Se observó la fosforilación de p38 con los inhibidores de canales capacitativos de Ca^{2+} , con el tratamiento con 2-APB 50 y 100 μM , las bandas correspondientes a p-p38 y p38 total, desaparecieron totalmente.

A)



B)

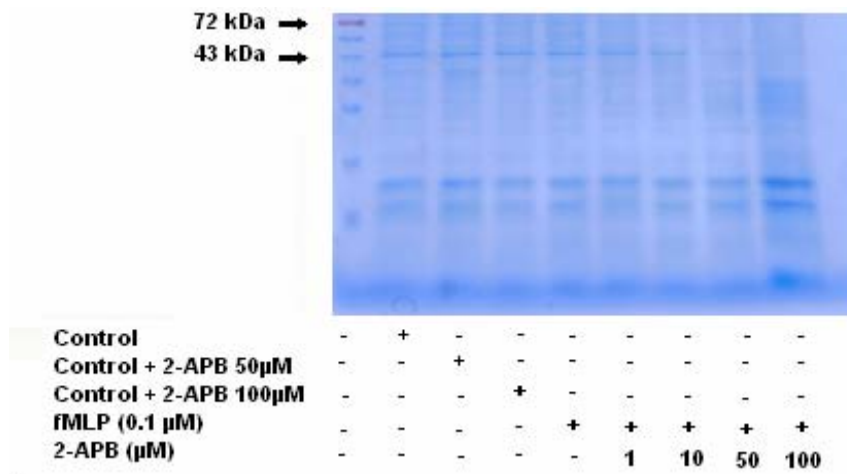


Figura 13. A) Se observa mediante tinción de proteínas el efecto de los inhibidores 2-APB (1, 10, 50 y 100 μM) y Capsaicina (50 y 100 μM) B) se aprecia el efecto 2-APB (50 y 100 μM) sobre extractos proteicos sin ningún tratamiento.

DISCUSION

Los resultados claramente mostraron que 0,1 μM de fMLP causa un incremento significativo en la movilización de Ca^{2+} intracelular, medida en células marcadas con FURA2-AM (Fig. 2-4). Se sabe que fMLP causa una rápida elevación en los niveles de Ca^{2+} citosólico, los cuales son necesarios para la quimiotaxis, fosforilación de proteína tirosina, liberación de gránulos secretorios, síntesis de mediadores proinflamatorios y activación del ensamblaje de NADPH oxidasa (Chen y Jan, 2001). Estos eventos son el resultado de la liberación de Ca^{2+} desde los depósitos intracelulares, de la entrada de Ca^{2+} por la membrana plasmática desde el exterior, o de ambos (Itagaki *et al*, 2002).

Al utilizar el inhibidor 2-APB a concentraciones de 50 y 100 μM , se apreció una baja considerable en el alza de Ca^{2+} citosólico al ser estimulado con fMLP, con respecto al control de fMLP utilizado en forma individual (Fig. 3). Similares resultados se han observado en neutrófilos estimulados con PAF y en otros tipos celulares, en donde se aprecia el carácter de inhibidor de canales SOCs (Sandoval *et al*, 2006; Dobrydneva y Blackmore, 2001).

2-APB fue descrito originalmente como un inhibidor del receptor de IP_3 en el RE, siendo utilizado para investigar el rol de IP_3 en la regulación de SOCs y otros procesos. Sin embargo nuevos estudios han demostrado nuevos sitios de acción de 2-APB, en el exterior de la membrana celular (Hauser *et al*, 2002; Gregory *et al*, 2001).

Al emplear capsaicina a concentraciones de 50 y 100 μM , fue posible observar una baja en el alza de $\text{Ca}^{2+}_{(i)}$ inducida por fMLP, pero de menor magnitud a la observada al utilizar 2-APB (Fig. 4).

Resultados similares a los obtenidos en esta tesis se han reportado en células HL-60 diferenciadas a neutrófilos estimulados con PAF y fMLP, en el cual con el tratamiento con capsaicina se observa una disminución en la entrada de Ca^{2+} por vías capacitativas, lo que se asocia a la inhibición de la producción de especies reactivas de oxígeno dependiente de canales SOCs (Choi *et al*, 2000)

Otros estudios indican que capsaicina en concentraciones mayores de 100 μM , induciría una elevación del Ca^{2+} intracelular por una vía en la que no estaría mediada por canales SOCs, sino que activa una vía dependiente de canales TRPV-1 en neutrófilos de rata. TRPV-1, es un canal poco específico de Ca^{2+} , que es un integrador molecular importante de capsaicina que causa elevación de Ca^{2+} en neuronas (Wang *et al*, 2005).

Al utilizar el BTP2 a concentraciones de 0.5 y 1 μM fue posible apreciar que no hay diferencias en el alza de Ca^{2+} intracelular, al inducida por fMLP (Fig. 5), similar a lo observado en neutrófilos bovinos (Sandoval *et al*, 2007). BTP2 (también llamado YM-58483), es un conocido inhibidor de entradas capacitativas en linfocitos T, interactuando directamente sobre los canales SOCs (Ishikawa *et al*, 2003). En otros estudios se ha visto que es capaz de inhibir las entradas capacitativas de Ca^{2+} en neutrófilos y en células HL-60 diferenciadas a neutrófilos estimuladas con tapsigargina y parcialmente al hacerlo con fMLP (Steinckwich *et al*, 2007), lo que representa una diferencia a los resultados obtenidos en esta

tesis, en donde no se logró ver un efecto inhibitorio en el alza de $\text{Ca}^{2+}_{(i)}$, diferencias que podrían estar dadas por las mayores concentraciones y tiempos de incubación utilizados.

Para evaluar el efecto de las entradas capacitativas de Ca^{2+} en la liberación de MMP-9, se midió la cantidad de MMP-9 secretada por zimografía en gelatina, utilizándose los inhibidores de canales SOCs. Los resultados mostraron que sólo al utilizar 2-APB (100 μM) se apreció una baja en la cantidad de MMP-9 liberada, lo que no es posible observar al utilizar capsaicina (100 μM) y BTP2 (1 μM) (Fig. 6). Otros resultados han implicado a dos isoformas de PKC, PKC α y PKC δ en la regulación de la liberación de MMP-9 en neutrófilos estimulados por TNF- α , siendo PKC α dependiente de Ca^{2+} para su activación (Chakrabarti *et al*, 2006). En neutrófilos tratados con IL-8, la secreción de MMP-9 es independiente de Ca^{2+} , ya que al utilizar BAPTA, un agente quelante de Ca^{2+} , la liberación de MMP-9 no disminuye (Chakrabarti y Patel, 2005).

Por otra parte en neutrófilos tratados con adenosina, se observa que éste no es capaz de bajar el *peak* de Ca^{2+} producido por fMLP, pero si de acelerar notablemente el proceso de normalización de los niveles de Ca^{2+} a valores basales en neutrófilos activados después de la estimulación con fMLP, lo que se asocia con la inhibición significativa de la liberación de MMP-9 por vías capacitativas (Ernens *et al*, 2006).

Para ver el rol que juegan MAPK en la liberación de MMP-9, se utilizaron los inhibidores UO126 y SB203580 (para ERK 1/2 y p38 MAPK respectivamente). Se observó que UO126 (0.1 μM) produjo una inhibición considerable en la cantidad de MMP-9 liberada, la que no fue afectada por SB203580 (10 μM), comparado con la secreción inducida por fMLP (Fig.

7). Esto indicaría que el proceso estaría mediada por ERK 1/2, y no sería necesaria la activación de p38 MAPK para inducir la liberación de MMP-9 en neutrófilos estimulados con fMLP. De forma similar se ha visto que en neutrófilos estimulados por IL-8 el proceso estaría mediado vía ERK 1/2 y no por p38 MAPK (Chakrabarti y Patel, 2005).

Así es como también en células Balb 3T3 (línea celular derivada de fibroblastos) se indica que la vía MEK 1-ERK 1/2 estaría ligada a la secreción de MMP-9 dependiente de IL-1 β , como también la activación de la vía PI3K-Akt, pero ambas actuarían de forma independiente, no así p38 MAPK, la cual no sería necesaria para la liberación de MMP-9 desde células Balb 3T3 estimuladas con IL-1 β (Ruhul Amin *et al*, 2003).

Otro reporte en neutrófilos tratados con TNF- α o fMLP, señala que al inhibir p38 MAPK usando SB203580 no tiene ningún efecto en la liberación de MMP-9. Bajo las mismas condiciones, SB203580 completamente abolió la liberación de MMP-9 desde eosinófilos tratados con TNF- α o fMLP. Esto sugiere que los mecanismos que regulan la liberación de MMP-9 difieren entre neutrófilos y eosinófilos. Ya que la liberación de MMP-9 está diferencialmente regulada en neutrófilos y eosinófilos (Wiehler *et al*, 2003).

Para ver el rol que juega las entradas capacitativas de Ca²⁺ en la mediación de la transducción de señal intracelular, se observó la fosforilación de p38 MAPK y de ERK1/2. Al usar los inhibidores de canales SOC's se observó que al utilizar 2-APB a las concentraciones anteriormente utilizadas (50 y 100 μ M), las bandas correspondientes a ERK 1/2 y p38 MAPK desaparecen por completo (Fig.12), por lo se que utilizaron concentraciones menores de 2-APB (1 y 10 μ M) para estos ensayos.

Los resultados muestran que fMLP fue capaz de inducir la fosforilación de ERK 1/2 y de p38 MAPK, tal como describe Chen *et al*, (2005). Al utilizar los inhibidores de canales SOCs, no se apreció un efecto sobre la fosforilación de ERK 1/2 con ninguno de ellos (Fig. 10 y 11)

En neutrófilos bovinos estimulados por PAF, las entradas capacitativas de Ca^{2+} mediaría la activación de ERK 1/2, ya que al utilizar 2-APB y ácido flufenámico se reduce la fosforilación de ésta. Sin embargo esto difiere de lo descrito en otros trabajos, en donde al utilizar SK&F 96365, un bloqueador de la entrada de Ca^{2+} mediada por agonista en células no excitables como los neutrófilos, la activación de ERK 1/2 y p38 MAPK inducida por fMLP no se reducen con el pretratamiento de SKF96365. Otros datos demuestran que la fosforilación de ERK 1/2 inducida por fMLP no involucra la isoforma de PKC- γ y Ca^{2+} extracelular (Chen *et al*, 2005; Sandoval *et al*, 2007).

Al evaluar el efecto de los inhibidores de canales SOCs, sobre la fosforilación de p38 MAPK, los resultados mostraron que sólo con el inhibidor 2-APB se apreció una baja en la activación de MAPK, y no se apreció mayor diferencia al utilizar capsaicina y BTP2 (Fig. 8 y 9).

Se ha demostrado que el $\text{Ca}^{2+}_{(i)}$ parece ser requerido para la activación de p38 MAPK en respuesta a no sólo ionomicina sino que también para fMLP (Elzi *et al*, 2001; Krump *et al*, 1997), por lo que el efecto de 2-APB sobre la fosforilación de p38 MAPK coincide con el efecto de disminuir la movilización de $\text{Ca}^{2+}_{(i)}$. Capsaicina y BTP2 no producen una disminución en la activación de p38 MAPK, capsaicina podría inducir una elevación del $\text{Ca}^{2+}_{(i)}$, por una vía que no estaría mediada por canales SOCs (Wang *et al*, 2005), lo que podría explicar el bajo efecto inhibitorio en la fosforilación de p38 MAPK. BTP2 no posee

efecto sobre la movilización de $\text{Ca}^{2+}_{(i)}$, por lo que la falta de efecto inhibitorio sobre p38 MAPK coincidiría con el nulo efecto en la movilización de $\text{Ca}^{2+}_{(i)}$ inducido por fMLP.

En conclusión 0,1 μM de fMLP causan un incremento significativo en la movilización de $\text{Ca}^{2+}_{(i)}$, y el orden del efecto inhibitorio observado sobre el ingreso de Ca^{2+} por inhibidores putativos de entradas capacitativas de Ca^{2+} es el siguiente: 2-APB>Capsaicina>BTP2.

fMLP es capaz de inducir la fosforilación de ERK 1/2 y de p38 MAPK, la activación de ERK 1/2 no involucraría vías mediadas por Ca^{2+} para su activación, no así p38 MAPK que si requiere Ca^{2+} parcialmente para su activación.

fMLP es capaz de inducir la liberación de MMP-9, por una ruta donde el aporte de Ca^{2+} por vías capacitativas afectaría parcialmente la liberación desde gránulos terciarios de neutrófilos, ya que al utilizar 2-APB se aprecia una baja en la cantidad de MMP-9 liberada. Por otra parte la liberación de MMP-9 estaría mediada por un mecanismo que involucra la vía ERK 1/2, pero independiente de p38 MAPK, ya que al utilizar el inhibidor SB203580, no induce cambios en la liberación de MMP-9.

El estudio de los aspectos moleculares que gobiernan la liberación de MMP-9 desde neutrófilos humanos, es indispensable para poder entender los mecanismos fisiopatológicos que están involucrados en diversas enfermedades; como EPOC, asma, además su papel en artritis y metástasis del cáncer. MMP-9 tiene por función regular la remodelación del tejido e inflamación que caracteriza estas enfermedades. Los neutrófilos infiltrados en los tejidos

afectados son una fuente importante de MMP-9 en estas enfermedades inflamatorias (Szabo *et al*, 2004).

La excesiva actividad de la MMPs esta asociada a condiciones inflamatorias, que conducen a la destrucción de la arquitectura tisural normal, por lo que el entendimiento de su regulación es fundamental para la aparición de nuevas dianas terapéuticas dirigidas a regular la actividad de la enzima en condiciones patológicas.

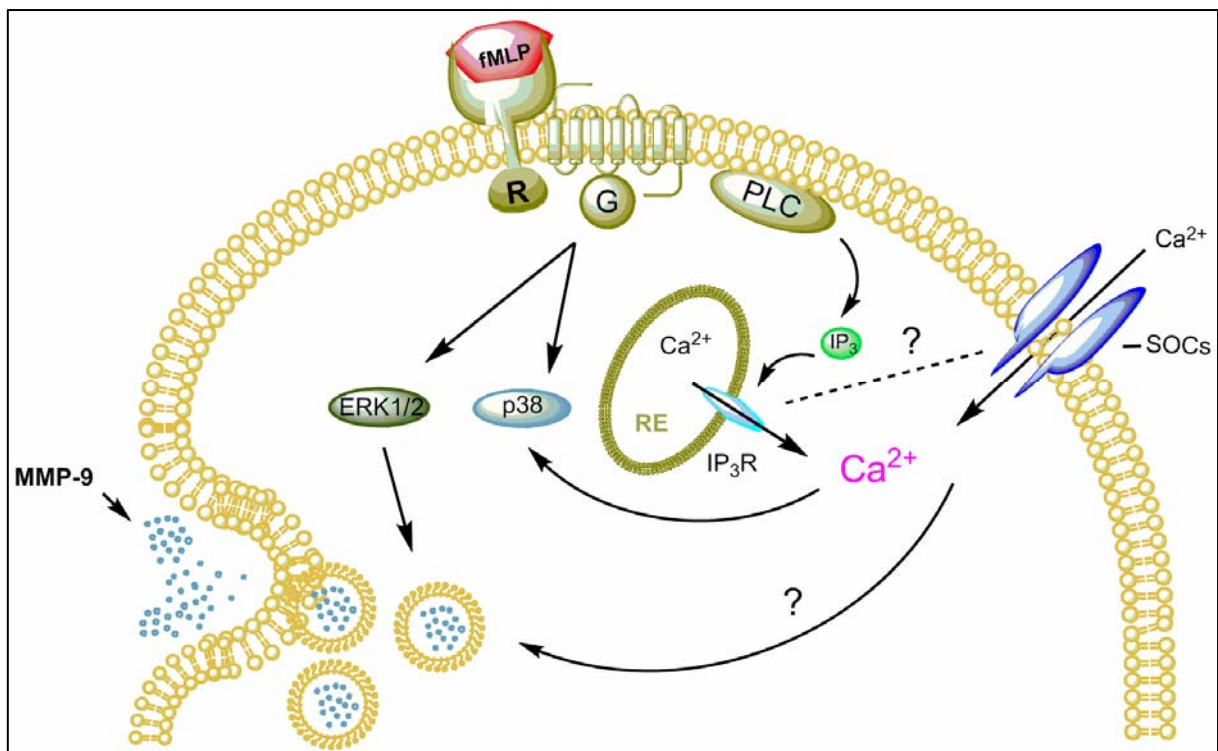


Figura 14. Modelo planteado para los eventos intracelulares que preceden a la liberación de MMP-9, gatillados por fMLP.

BIBLIOGRAFIA

Avdi, N., Winston, Russel. M., Young, S., Jonson, G. and Worthen, S. (1996) Activation of MEKK by formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine in human neutrophils. Mapping pathways for mitogen-activated protein kinase activation. *J. Biol. Chem.*, 271, 33598-606.

Berridge, M. J. (1993) Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature*. 361, 315-25.

Berridge, M. J. (1995) Capacitative calcium entry. *Biochem. J.*, 312, 1-11.

Berridge, M. J. (2004) Conformational Coupling: A Physiological Calcium Entry Mechanism. *Sci. STKE.*, 243, pe33.

Birnbaumer, L., Zhu, X., Jiang, M., Boulay, G., Peyton, M., Vannier, B., Brown, D., Platano, D., Sadeghi, H., Stefani, E. and Birnbaumer, M. (1996) On the molecular basis and regulation of cellular capacitative calcium entry: Roles for Trp proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 93, 15195-202.

Bolotina, V. M. (2004) Store-Operated Channels: Diversity and Activation Mechanisms. *Sci. STKE.*, 243, pe34.

Bolotina, V. M. and Csutora, P. (2005) CIF and other mysteries of the store-operated Ca^{2+} -entry pathway. *Trends Biochem. Sci.*, 30, 378-87.

Borregaard, N. and Cowland, J. B. (1997). Granules of the Human Neutrophilic Polymorphonuclear Leukocyte. *Blood*, 89, 3503-21.

Broad, L. M., Braun, F. J., Lievremont, J. P., Bird, G. S., Kurosaki, T. and Putney Jr., J. W. (2001) Role of the Phospholipase C-Inositol 1,4,5-Trisphosphate Pathway in Calcium

Release-activated Calcium Current and Capacitative Calcium Entry. *J. Biol. Chem.*, 276, 15945-52.

Cassatella, M. A. 2003. *The Neutrophil*. Karger. Basel.

Chakrabarti, S. and Patel, K. D. (2005) Regulation of matrix metalloproteinase-9 release from IL-8-stimulated human neutrophils. *J. Leukoc. Biol.*, 78, 279-88.

Chakrabarti S, Zee J. M., Patel K. D. (2006) Regulation of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in TNF-stimulated neutrophils: novel pathways for tertiary granule release. *J. Leukoc. Biol.*, 79, 214-22.

Chang, W. C. (2006) Store-operated calcium channels and pro-inflammatory signals. *Acta Pharmacol. Sin.*, 27, 813-20.

Chen, L W and Jan, C R. (2001) Mechanisms and modulation of formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP)-induced Ca^{2+} mobilization in human neutrophils. *Int. Immunopharmacol.*, 1, 1341-9.

Chen, L. W., Lin, M. W. and Hsu, C. M. (2005) Different pathways leading to activation of extracellular signal-regulated kinase and p38 MAP kinase by formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine or platelet activating factor in human neutrophils. *J. Biomed. Sci.*, 12, 311-9.

Choi, S. Y., Ha, H. and Kim, K. T. (2000) Capsaicin inhibits platelet-activating factor-induced cytosolic Ca^{2+} rise and superoxide production. *J. Immunol.*, 165, 3992-8.

Delves, P. J. y Roitt, I. M. (1998) *The Encyclopedia of Immunology*. 2^a. Ed. Academic Press, New York.

- DiScipio, R. G., Schraufstatter, I. U., Sikora, L., Zuraw, B. L. and Sriramarao, P.** (2006) C5a mediates secretion and activation of matrix metalloproteinase 9 from human eosinophils and neutrophils. *Int. Immunopharmacol.*, 6, 1109-18.
- Dobrydneva, Y. and Blackmore, P.** (2001) 2-Aminoethoxydiphenyl borate directly inhibits store-operated calcium entry channels in human platelets. *Mol. Pharmacol.*, 60, 541-52.
- Dutta, D.** (2000) Mechanism of store-operated calcium entry. *J. Biosci.*, 25, 397-404.
- Edwards, S. W.** (1994). *Biochemistry and Physiology of the Neutrophil*. Cambridge University Press. New York.
- Elzi, D. J., Bjornsen, A. J., MacKenzie, T., Wyman, T. H. and Silliman, C. C.** (2001) Ionomycin causes activation of p38 and p42/44 mitogen-activated protein kinases in human neutrophils. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*, 281, C350-60.
- Ernens, I., Rouy, D., Velot, E., Devaux, Y. and Wagner, D. R.** (2006) Adenosine inhibits matrix metalloproteinase-9 secretion by neutrophils: implication of A2a receptor and cAMP/PKA/Ca²⁺ pathway. *Circ. Res.*, 99, 590-7.
- Fabbria, E., Spisanib, S., Barbinc, L., Biondic, C., Buzzic, M., Traniellob, S., Pagani Zecchinid, G. and Ferrettic, M. E.** (2000) Studies on fMLP-receptor interaction and signal transduction pathway by means of fMLP-OMe selective analogues. *Cell Signal.*, 12, 391-8.
- Faurschou, M. and Borregaard, N.** (2003) Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes Infect.*, 5, 1317-27.

Fligiel, S. E., Standiford, T., Fligiel, H. M., Tashkin, D., Strieter, R. M. Warner, R. L., Johnson, K. J. and Varani, J. (2006) Matrix metalloproteinases and matrix metalloproteinase inhibitors in acute lung injury. *Hum. Pathol.*, 37, 422-30.

Granfeldt, D., Samuelsson, M. and Karlsson, A. (2002) Capacitative Ca^{2+} influx and activation of the neutrophil respiratory burst. Different regulation of plasma membrane- and granule-localized NADPH-oxidase. *J. Leukoc. Biol.*, 71, 611-7.

Gregory, R. B., Rychkov, G. and Barritt, G. J. (2001) Evidence that 2-aminoethyl diphenylborate is a novel inhibitor of store-operated Ca^{2+} channels in liver cells, and acts through a mechanism which does not involve inositol trisphosphate receptors. *Biochem J.*, 354, 285-90.

Gross, J. and Nagai, Y. (1965) Specific degradation of the collagen molecule by tadpole collagenolytic enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 54, 1197-204.

Hallett, M. B., Hodges, R., Cadman, M., Blanchfield, H., Dewitt, S., Pettit, E. J., Laffafian, I. and Davies, E. V. (1999) Techniques for measuring and manipulating free Ca^{2+} in the cytosol and organelles of neutrophils. *J. Immunol. Methods*, 232, 77-88.

Hauser, C. J., Fekete, Z., Adams, J. M., Garced, M., Livingston, D. H. and Deitch, E. A. (2002) PAF-mediated Ca^{2+} influx in human neutrophils occurs via store-operated mechanisms. *J. Leukoc Biol.*, 69, 63-8.

Holtmann, H., Winzen, R., Holland, P., Eickemeier, S., Hoffmann, E., Wallach, D., Malinin, N. L., Cooper, J. A., Resch, K. and Kracht, M. (1999) Induction of Interleukin-8 Synthesis Integrates Effects on Transcription and mRNA Degradation from at Least Three Different Cytokine- or Stress-Activated Signal Transduction Pathways. *Mol. Cell. Biol.*, 19, 6742-53.

Hommel, D. W., Peppelenbosch, M. P. and van Deventer, S. J. (2003) Mitogen activated protein (MAP) kinase signal transduction pathways and novel anti-inflammatory targets. *Gut*, 52, 144-51.

Ishikawa J, Ohga K, Yoshino T, Takezawa R, Ichikawa A, Kubota H, Yamada T. (2003) A pyrazole derivative, YM-58483, potently inhibits store-operated sustained Ca^{2+} influx and IL-2 production in T lymphocytes. *J Immunol.*, 170, 4441-9.

Itagaki, K., Kannan, K. B., Livingston, D. H., Deitch, E. A., Fekete, Z. and Hauser, C. J. (2002) Store-operated calcium entry in human neutrophils reflects multiple contributions from independently regulated pathways. *J. Immunol.*, 168, 4063-9.

Johnson, G. L. and Lapadat, R. (2002) Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways Mediated by ERK, JNK, and p38 Protein Kinases. *Science.*, 298, 1911-2.

Krump, E., Sanghera, J. S., Pelech, S. L., Furuya, W. and Grinstein, S. Chemotactic peptide N-formyl-met-leu-phe activation of p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) and MAPK-activated protein kinase-2 in human neutrophils. *J Biol Chem.*, 272, 937-44.

Lambert. D. G. (1999) Calcium Signaling Protocols. Humana Press, New York.

Lollike, K., Lindau, M., Calafat, J. and Borregaard, N. (2002) Compound exocytosis of granules in human neutrophils. *J. Leukoc. Biol.*, 71, 973-80.

Marasco, W. A., Phan, S. H., Krutzsch, H., Showell, H. J., Feltner, D. E., Nairn, R., Becker E. L. and Ward, P. A. (1984) Purification and identification of formylmethionyl-leucyl-phenylalanine as the major peptide neutrophil chemotactic factor produced by *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, 259, 5430-9.

Metcalf, J. A., Gallin J. L., Nauseef, W. M. and Rott, R. K. (1986) Laboratory Manual of Neutrophil Function. Raven Press, New York.

Migeotte, I., Communi, D. and Parmentier, M. (2006) Formyl peptide receptors: A promiscuous subfamily of G protein-coupled receptors controlling immune responses. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 17, 501-19.

Nick, J., Avdi, N., Young, S., Knall, C., Gerwins, P., Johnson and G., Worthen, G. S. (1997) Common and Distinct Intracellular Signaling Pathways in Human Neutrophils Utilized by Platelet Activating Factor and fMLP. *J Clin Invest.*, 99, 975-86.

Nilius, B. (2004) Store-Operated Ca^{2+} Entry Channels: Still Elusive!. *Sci. STKE.*, 243, pe36.

Opdenakker G, Van den Steen PE, Dubois B, Nelissen I, Van Coillie E, Masure S, Proost P, Van Damme J. (2001) Gelatinase B functions as regulator and effector in leukocyte biology. *J Leukoc Biol.*, 69, 851-9

Patiño, P. y García, D. (1991) Fisiología de los polimorfos nucleares neutrófilos. *IATREIA*, 4, 81-7.

Pearson, G., Robinson, F., Beers, G.T., Xu, B.E., Karandikar, M., Berman, K. and Cobb, M.H. (2001) Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinase Pathways: Regulation and Physiological Functions. *Endocr. Rev.*, 22, 153-83.

Petersen, O. H., Michalak, M. and Verkhratsky, A. (2005) Calcium signalling: Past, present and future. *Cell Calcium*. 38, 161-9.

Pugin, J., Widmer, M. C., Kossodo, S., Liang, C. M., Preas II, H. L. and Suffredini, A. F. (1999) Human Neutrophils Secrete Gelatinase B In Vitro and In Vivo in Response to Endotoxin and Proinflammatory Mediators. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 20, 458-64.

Putney Jr., J. W. (2001) Pharmacology of Capacitative Calcium Entry. *Mol. Interv.*, 1, 84-94.

Putney Jr., J. W. Broad, L. M., Braun, F. J., Lievremont, J. P. and Bird, G. S. (2001) Mechanisms of capacitative calcium entry. *J. Cell Sci.*, 114, 2223-9.

Putney Jr., J. W. (2005) Capacitative calcium entry: sensing the calcium stores. *J. Cell Biol.*, 169, 381-2.

Ruhul Amin, A. R., Senga, T., Oo, M. L., Thant, A. A. and Hamaguchi, M. (2003) Secretion of matrix metalloproteinase-9 by the proinflammatory cytokine, IL-1 β : a role for the dual signalling pathways, Akt and Erk. *Genes Cells.*, 8, 515-23.

Sandoval, A., Sanhueza, A., Riquelme, J., Hidalgo, M. A., Hancke, J. L. and Burgos, RA. (2006) PAF Induces Capacitative Calcium Entry (CCE) in Neutrophils. Potential Role in the Activation of MAPK ERK^{1/2} and NA⁺/H⁺ Exchanger. *Naunyn. Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 372, 72.

Sandoval, A. J., Riquelme, J. P., Carretta, M. D., Hancke, J. L., Hidalgo, M. A. and Burgos, RA. (2007) Store-operated calcium entry mediates intracellular alkalinization, ERK1/2, and Akt/PKB phosphorylation in bovine neutrophils. *J. Leukoc. Biol.*, 82, 1266-77.

Seger, R. MAP Kinase Signaling Protocols. Humana Press, New , New Jersey.

- Selvatici, R., Falzarano, S., Mollica, A. and Spisani, S.** (2006) Signal transduction pathways triggered by selective formylpeptide analogues in human neutrophils. *Eur. J. Pharmacol.*, 534, 1-11.
- Sengelov, H., Kjeldsen, L. and Borregaard, N.** (1995) Control of Exocytosis in Early Neutrophil Activation. *J. Immunol.*, 150, 1535-43.
- Smyth, J. T., Dehaven, W. I., Jones, B. F., Mercer, J. C., Trebak, M., Vazquez, G. and Putney Jr., J. W.** (2006). Emerging perspectives in store-operated Ca^{2+} entry: Roles of Orai, Stim and TRP. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1763, 1147-60.
- Steinckwich, N., Frippiat, J. P., Stasia, M. J., Erard, M., Boxio, R., Tankosic, C., Doignon, I. and Nüsse, O.** (2007) Potent inhibition of store-operated Ca^{2+} influx and superoxide production in HL60 cells and polymorphonuclear neutrophils by the pyrazole derivative BTP2. *J. Leukoc. Biol.*, 81, 1054-64.
- Sternlicht, M. D. and Werb, Z.** (2001) How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 17, 463-516.
- Szabo, K. A., Ablin, R. J. and Singh, G.** (2004) Matrix metalloproteinases and the immune response. *Clin. Appl. Immunol. Rev.*, 4, 295-319.
- Takafuji, S., Ishida, A., Miyakuni, Y. and Nakagawa, T.** (2003) Matrix metalloproteinase-9 release from human leukocytes. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.*, 13, 50-5.
- Theilgaard-Mönch, K., Porse, B. T. and Borregaard, N.** (2006) Systems biology of neutrophil differentiation and immune response. *Curr. Opin. Immunol.*, 18, 54-60.

Van den Steen, P. E., Dubois, B., Nelissen, I., Rudd, P. M., Dwek, R. A. and Opdenakker, G. (2002) Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9). *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 37, 375-536.

Wang, J. P., Tseng, C. S., Sun, S. P., Chen, Y. S., Tsai, C. R. and Hsu, M. F. (2005) Capsaicin stimulates the non-store-operated Ca^{2+} entry but inhibits the store-operated Ca^{2+} entry in neutrophils. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 209, 134-44.

Wiehler, S., Cuvelier, S.L., Chakrabarti, S. and Patel, K.D. (2004) p38 MAP kinase regulates rapid matrix metalloproteinase-9 release from eosinophils. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 315, 463-70.

Winyard, P. G. and Willoughby, D. A. Inflammation Protocols. Humana Press, New Jersey.

Witko-Sarsat, V., Rieu, P., Descamps-Latscha, B., Lesavre, P. and Halbwachs-Mecarelli, L. (2000) Neutrophils: Molecules, Functions and Pathophysiological Aspects. *Lab. Invest.*, 80, 617-53.

Zhu, L. and He, P. (2006) fMLP-stimulated release of reactive oxygen species from adherent leukocytes increases microvessel permeability. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 290, H365-72.

ANEXOS***Buffer HBSS/Ca²⁺***

KH ₂ PO ₄	0.0544 g
Na ₂ H ₂ PO ₄ x 4H ₂ O	0.0414 g
NaCL	8.0 g
D-Glucosa	1.1892 g
KCl	0.3728 g
CaCl ₂	0.0996 g
H ₂ O c.s.p	1000 ml
Ajustar a pH 7.4	

Buffer de corrida para zimografía

Tris base	3.0285 g
Glicina	14.2633 g
SDS	1.0003 g
H ₂ O c.s.p.	1000 ml
Ajustar a pH 6.8	

Triton X-100 12,5 %

Triton X-100 Absoluto	12.5 ml
H ₂ O c.s.p	500 ml

Buffer de digestión

Tris base	3.0285 g
NaCl	5.844 g
CaCl ₂	0.2773 g
H ₂ O c.s.p	500 ml
Ajustar a pH 7.5	

Solución de Azul de Coomasie

Azul de Coomasie R-250	0.03125 g
Metanol Absoluto	156.25 ml
Acido Acético Absoluto	62.5 ml
H ₂ O c.s.p	250 ml

Solución de desteñido

Acido Fórmico Absoluto	2.5 ml
Metanol Absoluto	75 ml
H ₂ O c.s.p	250 ml

TBS-T

TBS 10X	50 ml
Tween-20	0.5 ml
H ₂ O c.s.p.	500 ml

Buffer de bloqueo

Leche descremada	25.0 g
TBS 10X	50 ml
Tween-20	2.5 ml
H ₂ O c.s.p	500 ml

Buffer De Corrida 5X

Tris base	15.1 g
SDS	94.0 g
Glicina	5.0 g
H ₂ O c.s.p	1000 ml

Diluir a 1X para la corrida electroforética.

Buffer de Transferencia

Buffer De Corrida 5X	200 ml
Metanol absoluto	200 ml
H ₂ O c.s.p	1000 ml

TBS-10X pH 7,6

Tris base	24.2 g
NaCl	80.0 g
H ₂ O c.s.p	500 ml

Ajustar pH a 7,6 con HCl.

Gel separador de zimografía.

Solución de gelatina (20 mg/ml)	1.24 ml
Tris-HCl 1.5 M pH 8.8	3.48 ml
Acril/Bis (30:0.8 %)	3.48 ml
Persulfato 10X	69.5 μ l
TEMED	17.4 μ l
H ₂ O	5.61 ml

Gel concentrador de zimografía.

Tris-HCl 0.5 M pH 6.8	1.23 ml
Acril/Bis (30:0.8 %)	739 μ l
Persulfato 10X	65 μ l
TEMED	9.84 μ l
H ₂ O	2.95 ml

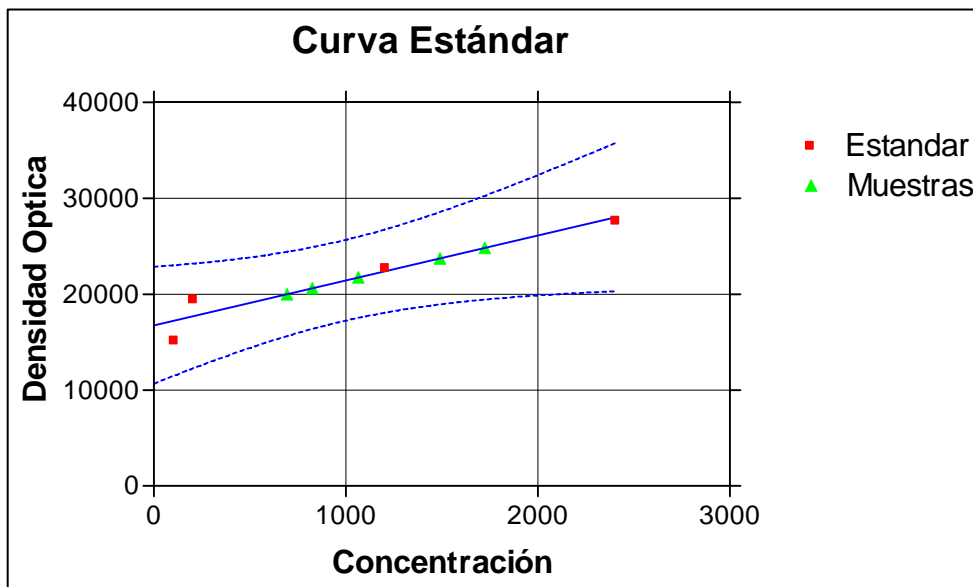


Figura 15. Gráfica representativa de curva estándar de MMP-9 utilizada para determinar la cantidad de MMP-9 liberada desde neutrófilos humanos.