

Actividad enzimática de macrófagos cultivados sobre miliporos tratados con inmunocomplejo a los cuales se les añadió talidomida

T. MOISÉS Y C. FINLAY

Dpto. de Bioquímica e Inmunología, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Ciudad de la Habana, Cuba

Recibido: 23 de abril de 1982

ABSTRACT. Thalidomide at concentrations of 10,5 and 1 $\mu\text{g/ml}$ inhibits the selective release of acid hydrolases from macrophages exposed to immune-complexes dispersed along non phagocytatable surfaces. Thalidomide could inhibit leprotic reaction through a direct effect on the release of acid hydrolases from mononuclear cell phagocytes exposed to immune complexes.

RESUMEN. La talidomida a las concentraciones de 10,5 y 1 $\mu\text{g/ml}$ inhibe la liberación selectiva de hidrolasas ácidas de macrófagos expuestos a inmunocomplejos depositados sobre superficies no fagocitables. La talidomida pudiera inhibir la reacción leprótica a través de un efecto directo sobre la liberación de hidrolasas ácidas de células fagocíticas mononucleares expuestas a inmunocomplejos.

INTRODUCCION

La Talidomida se usa en el tratamiento de la lepra. Los pacientes que padecen de lepra lepromatosa sufren ataques agudos inflamatorios denominados reacción leprótica, (RLL) en dichas reacciones aparecen lesiones inflamatorias en la piel (eritema nodoso, eritema multiforme, vasculitis necrotizante), articulaciones, ojos y nervios. Esta entidad ha sido considerada como una forma de fenómeno de Arthus y/o enfermedad por inmunocomplejos^{1,2}. Esto último junto con el papel ya señalado que pueden jugar los inmunocomplejos en la patogenia de la reacción leprótica de la lepra lepromatosa y otras enfermedades inflamatorias crónicas nos sugieren la utilidad de conocer la acción de esta droga sobre exocitosis de enzimas lisosomales inducidas por inmunocomplejos en nuestro sistema experimental.

Todos los reactivos químicos y substratos fueron de las firmas BDH, Sigma y Koch Ligth. El medio 199 de Grand Island Biological Co. El suero bovino fue obtenido en el laboratorio de cultivo de tejidos del CENIC. La Talidomida fue suministrada por Grünenthal, Stolberg (FRG).

Animales

Se emplearon ratones machos o hembras del bioterio del CENIC, cuyo peso oscilaba entre 25 y 30 g.

Preparación de la IgG anti HSA

El suero hiperinmune de conejo se obtuvo mediante el siguiente esquema de inmunización: una primera inyección subcutánea en el lomo del animal de 1 ml con una suspensión conteniendo 5 μ g de albúmina humana sérica (HSA) y adyuvante completo de Freund, las tres inyecciones semanales y posteriores se realizaron en forma idéntica pero sustituyendo el adyuvante completo por adyuvante incompleto. El suero hiperinmune se precipitó con SO_4NH_4 al 50% de saturación. Las globulinas así obtenidas se dializaron contra tampón fosfato 0.0175 M, pH 6,8. Después de dializada la muestra se cromatografió en una columna de dietil amino etil celulosa (DEAE) 23, obteniéndose como inmunoglobulina G (IgG) el material que no se unió a la columna. Se recogieron las fracciones de acuerdo a la lectura de 280 nm en un espectrofotómetro y se verificó la pureza de la misma según describieron Cheise y Wage³.

Preparación de los miliporos

Para la preparación de los miliporos se siguió la técnica empleada por Henson⁴. Se usaron filtros miliporos (Milipore Filter Corp) de 25 mm de diámetro. Los miliporos se esterilizaron en la autoclave antes de ser sometidos a los distintos tratamientos. Después de esto se usaron sin tratamiento posterior o sometidos a tratamiento con una solución de HSA (10 mg/ml), una hora a temperatura ambiente. Se lavaron tres veces con ClNa al 0,9% y posteriormente, se incubaron en una solución de IgG anti HSA de conejo (10 mg/ml) durante 45 minutos a 37°C, lavándose tres veces con solución salina fisiológica.

Cultivo de macrófagos

Los ratones fueron inyectados en la cavidad peritoneal con dos ml de

medio de Thioglicolato estéril al 2,9%. Cuatro días después de la inyección peritoneal se colectó el exudado peritoneal como describieron Cohn y Benson⁵. El líquido obtenido se centrifugó a 800 r.p.m. y el botón celular se resuspendió en medio 199 + 10% de suero de ternero y antibióticos, hasta obtener una concentración final de 2 a 3 X 10⁶ células por ml. De esta suspensión se sembraron 2 ml en cada placa conteniendo un miliporo, se incubaron durante 15 minutos a 37°C en atmósfera de 95% de aire y 5% de CO₂. Al cabo de este tiempo los miliporos se lavaron tres veces y se trasladaron a placas limpias que contenían medio fresco, suero al 10% y antibióticos con o sin droga.

Para estudiar el efecto de la droga en nuestro sistema experimental, realizamos dos series experimentales: una que mantuvimos tres horas y otra durante 6 horas. Para el experimento de 6 horas de duración, los macrófagos obtenidos de la forma habitual descrita anteriormente se sembraron en miliporos tratados con el inmunocomplejo. Se realizó una serie experimental usando siete grupos de cuatro placas cada uno. Un primer grupo de placas contenía macrófagos cultivados sobre miliporos sin tratar y sin droga (grupo control), un segundo grupo que tenía miliporos tratados con el inmunocomplejo (HSA-IgG anti HSA) sin la droga y los restantes cinco grupos conteniendo miliporos tratados con el inmunocomplejo en las concentraciones siguientes: 10, 1, 0.1, 0.01 y 0.001 µg/ml.

En la segunda serie experimental escogimos las concentraciones de 0.1, 1 y 10 µg/ml y le añadimos la de 5 µg/ml ya que los efectos inhibitorios de la droga estudiados fueron mayores en las concentraciones de 1 y 10 µg/ml. Se sembraron los macrófagos como describimos anteriormente en seis grupos de cuatro placas cada uno, un primer grupo contenía macrófagos cultivados sobre miliporos sin tratar y sin droga (grupo control), un segundo grupo con miliporos tratados con el inmunocomplejo pero sin la droga y los cuatro restantes contenían miliporos tratados con el inmunocomplejo y la droga a las concentraciones de 0.1, 1, 5 y 10 µg/ml. En todos los grupos experimentales tanto los que no tenían droga como los que sí la tenían, el disolvente (dimetil sulfóxido) se encontró siempre a una concentración final de 0.1%. Los medios con drogas así como los medios con el disolvente, se añadieron a los macrófagos en el momento de sembrar los mismos y se mantuvieron hasta el final del experimento, en este caso durante 3 y 6 horas.

Estudio Bioquímico

Los grupos que formaron parte de las distintas experiencias se realizaron siempre empleando cuatro placas como mínimo para cada grupo. Además, se incubó medio sin células en iguales condiciones al inicio de cada experimento, procesándose dichas placas para obtener controles de medio al inicio y al final de cada experimento.

Preparación de homogeneizado celular

Al terminar los experimentos se aspiró el medio de cultivo. Lavamos las placas una vez con ClNa al 0.9% con 0.1% de Tritón X-100 dejando la solución durante una hora en contacto con el miliporo y así obtener homogeneizado celular.

Determinaciones enzimáticas

Las determinaciones enzimáticas fueron realizadas a las muestras del medio incubado con células y homogeneizado celular. También se realizaron determinaciones enzimáticas a los medios incubados sin células (blancos de medio). Las determinaciones se efectuaron en condiciones que permitieron la liberación lineal de los productos de la reacción con respecto al tiempo de incubación y a la cantidad de muestra empleada.

Deshidrogenasa Láctica. EC 1.1.127 (LDH). Determinamos la velocidad de oxidación del nicotinamida adenín-dinucleótido reducido a 340 nm, siguiendo exactamente las instrucciones del biochemical LDH test combination de la Boheringer. Expresamos los resultados en mU/1.10⁶ células.

N-acetil B-D Glucosaminidasa. EC 3.2.1.30 Empleamos el método de Woolen y cols.⁶. El sustrato utilizado fue el p-nitrofenil 2-acetamido-desoxy B-D glucopiranosido en tampón citrato 0.1 M.

B-Galactosidasa. EC 3.2.1.23 Determinamos su actividad por el método de Conchie y cols.⁷. El sustrato empleado fue el p-nitrofenil B-D galactopiranosido.

Catepsina B. EC 3.4.32.1 Utilizamos el método descrito por Barret⁸. Empleamos como sustrato benzoil DL arginino 2-naftilamida HCl en dimetil sulfóxido.

Catepsina C. EC 3.4.4.9. Se determinó según Finlay y cols.⁹ Empleamos como sustrato gly-2-fenil alanina naftilamida disuelta en tampón fosfato 0.1 M pH 6.5 a concentración de 0.4 M.

Conteo de células en los miliporos

Los filtros miliporos fueron procesados para su estudio al microscopio óptico según Shelton y Orenstein¹⁰.

Se fijaron en glutaraldehído al 2.5% en tampón fosfato pH 7.4. Después de lavados en PBS frío se tiñeron con hematoxilina y eosina, deshidratados con concentraciones crecientes de alcohol etílico, añadiéndose dos lavados en tolueno y dos lavados en xilol. En los miliporos teñidos y procesados de esta forma se contaron las células adheridas a los mismos que en un 95% fueron macrófagos. El número de células por miliporo en cada grupo experimental se determinó contando el número de células adheridas en 20 campos de 0.072 mm², los cuales se multiplicaron por el factor del área del miliporo. Se contaron siempre cuatro miliporos por cada grupo experimental.

Análisis estadístico

Se utilizó un test de "t" previa comprobación de homogeneidad en las varianzas. Los resultados se expresaron como la media + desviación estándar de 4 valores.

RESULTADOS

Como se aprecia en la Fig. 1, en los cultivos de seis horas, el estudio de la N-acetil B-D Glucosaminidasa mostró una disminución significativa ($p < 0.001$) en el % de exocitosis con las concentraciones de 10, 1, 0.1, 0.01 $\mu\text{g/ml}$, siendo esta disminución más intensa con las concentraciones de 10 y 1 $\mu\text{g/ml}$. El estudio de la B-Galactosidasa mostró una disminución significativa ($p < 0.001$) en el % de exocitosis con las concentraciones de 1 y 10 $\mu\text{g/ml}$, así como también una disminución menor ($p < 0.005$) con la concentración de 0.1 $\mu\text{g/ml}$. La catepsina B mostró una disminución significativa ($p < 0.001$) en el % de exocitosis con las concentraciones de 1 y 10 $\mu\text{g/ml}$. La catepsina C presentó una disminución evidente ($p < 0.001$) con las concentraciones de 1 y 10 $\mu\text{g/ml}$ y una discreta disminución ($p < 0.02$) con las concentraciones de 0.1 y 0.01 $\mu\text{g/ml}$. La actividad enzimática total se incrementó significativamente en la Catepsina B a las concentraciones de 1 y 10 $\mu\text{g/ml}$ ($p < 0.005$). La actividad de la LDH no mostró variaciones significativas ni en su actividad en el medio ni en la actividad total en los distintos grupos.

Como se aprecia en la Fig. 2, en los cultivos de tres horas, encontramos una disminución significativa ($p < 0.001$) a las concentraciones de 1 y 5 $\mu\text{g/ml}$, tanto de la actividad enzimática de los medios como del % de

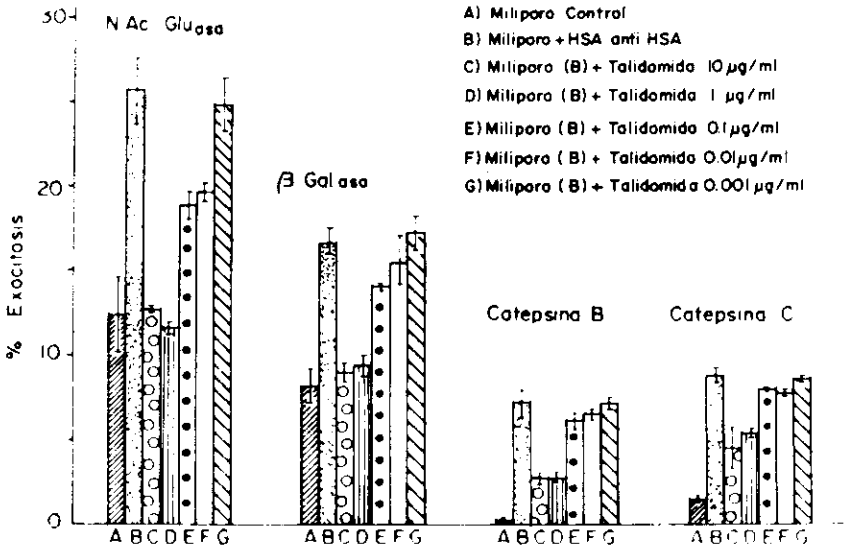


Fig. 1. Macrófagos cultivados sobre miliporos tratados con inmunocomplejos y distintas concentraciones de Talidomida durante 6 horas. Se expresa en las barras el % de actividad en el medio con respecto a la actividad total (% de exocitosis).

exocitosis en las cuatro enzimas lisosomales estudiadas. La actividad enzimática total de las Catepsinas B y C se incrementaron significativamente a las concentraciones de 1, 5 y 10 $\mu\text{g/ml}$. La actividad de la LDH no mostró variaciones significativas ni en su actividad en los medios ni en la actividad total en los distintos grupos.

Los valores encontrados de actividad enzimática, así como del % de exocitosis en las distintas concentraciones se compararon siempre con los valores encontrados en el segundo grupo de placas que contenían macrófagos cultivados sobre miliporos tratados con el inmunocomplejo pero sin droga.

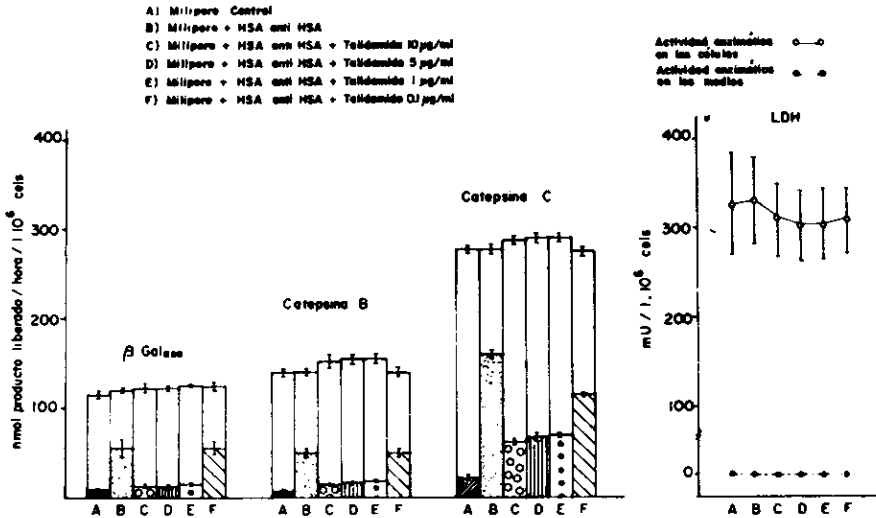


Fig. 2. Actividad enzimática de macrófagos cultivados sobre miliporos no tratados (control), miliporos tratados con el inmunocomplejo y miliporos tratados con el inmunocomplejo y la Talidomida a distintas concentraciones. Las barras expresan la actividad total y las zonas sombreadas de las barras expresan en nanomoles de producto liberado/hora/ 1.10^6 células. La actividad de la LDH en $mU/1.10^6$ células.

DISCUSION

La Talidomida es altamente eficaz en el tratamiento de los síntomas y signos de la reacción leprótica¹¹, aunque no ejerce un efecto directo sobre el *Micobacterium Leprae* y no cura la lepra¹², no conociéndose el mecanismo de acción de esta droga.

Existen algunos reportes sobre un posible efecto inmunosupresivo¹³, pero son contradictorios. Gohiman-Yahr y cols.¹⁴, señalaron que, en la reacción leprótica (RLL) la presencia de un gran número de micobacterias muertas, bajo ciertas condiciones, induce algún tipo de respuesta de hipersensibilidad con lesiones inflamatorias en piel, ojos y articulaciones. Y estos mismos autores (Gohiman-Yahr y cols.)¹⁵, reportaron que la Talidomida fue efectiva en el tratamiento de estos síntomas. Estos autores y otros^{16,17} reportaron que en algunas formas de enfermedad por hiper-

sensibilidad retardada existe una respuesta neutrofílica la cual es bloqueada posteriormente por células mononucleares fagocíticas y que estos fenómenos pueden ser ocasionados originalmente por una linfoquina. Es interesante señalar que las células mononucleares fagocíticas al igual que los leucocitos polimorfonucleares generan superóxido cuando son estimulados a través de sus receptores de membrana con inmunocomplejos,^{18,19} y que a su vez estos cambios metabólicos pueden acompañarse de exocitosis de enzimas lisosomales^{20,21}. Es posible, que la Talidomida altere de alguna forma la vía oxidativa que origina el superóxido y de esta forma disminuya la liberación selectiva de enzimas lisosomales.

La Talidomida es un derivado de la 2-6 piperidin-diona y el uso original de la droga fue de índole hipnótica y sedativa. Al metabolizarse la misma, sufre una hidrólisis no enzimática a pH 7.4 de las uniones amidas y cierta hidrolización de la molécula de ácido tállico, uniéndose una porción de la droga a los ácidos nucleicos, histonas y fosfolípidos. Esta porción de la molécula original adquiere una capacidad acilante muy fuerte y de ahí su gran reactividad. Es posible que al combinarse el grupo amino primario y convertirse en un amino terciario, esto pudiera conferirle a la molécula propiedades químicas semejantes a las que poseen las fenotiazinas y algunos anestésicos, pudiendo a semejanzas de estas drogas, desplazar el Ca de la membrana. Esto último puede traer como consecuencia una inhibición de los procesos secretorios al alterar las propiedades de la membrana que tienen que ver con el proceso de fusión celular²². Goldstein y cols.²³, mostraron que los anestésicos locales y las drogas del tipo de las fenotiazinas inhibían la exocitosis de enzimas lisosomales, la producción de superóxido y además que agentes estabilizadores de membrana, tales como, ciertos corticoides adrenales reducen tanto la liberación de enzimas como la producción de superóxido²⁴. Anteriormente, Hawkins²⁵ encontró que la hidrocortisona disminuye la exocitosis de enzimas lisosomales en polimorfonucleares cultivados con inmunocomplejos no fagocitables. No negamos que en el animal vivo el efecto inmunosupresor de la Talidomida así como el que se le atribuye a ciertos corticoides²⁶ pueda jugar un papel en efectos antiinflamatorios de estas drogas, pero en nuestro sistema experimental "in vitro" libre de la influencia de otras células así como de factores del plasma, es evidente que este mecanismo no se puede tener en cuenta e independientemente del resto de los posibles efectos que dichas drogas pueden tener en el animal vivo la inhibición de la exocitosis inducida por inmu-

nocomplejos es una hipótesis muy atractiva para explicar el efecto beneficioso de la Talidomida en el tratamiento de la reacción leprótica.

REFERENCIAS

1. MORAN C. J., RYDER G., TURK J. L. AND WATERS M.F.R. *Lancet II*, 572, 1972.
2. ROJAS-ESPINOSA O., MÉNDEZ-NAVARRETE I. AND ESTRADA PARRA S. *Clin. Exp. Immunol.* 12, 215, 1972.
3. CHEISE A. AND WAGE R. J. *Immunol.* 104, 1205, 1971.
4. HENSON P. M. *J. Immunol.* 107, 1535, 1971.
5. COHN Z. A. AND BENSON B. *J. Exp. Med.* 121, 153, 1965.
6. WOOLEN J. W., HEYWORTH R. AND WALKER P. G. *Biochem. J.* 78, 111, 1961.
7. CONCHIE J., FINDLAY J. AND LEVY G. A. *Biochem. J.* 71, 318, 1959.
8. BARRET A. J. *Analyt. Biochem.* 47, 280, 1972.
9. FINLAY C., DAVIES P. AND ALLISON A.G. *Agents and Actions* 5, 345, 1975.
10. SHELTON E. AND ORENSTEIN J. M. *Exp. and Mol. Pathology* 23, 2201, 1975.
11. CONVIT J., SOTO J. M. AND SHESKIN J. *Lepr.* 35, 446, 1967.
12. SHESKIN J. AND SAGHER F. *Int. J. Lepr.* 39, 585, 1971.
13. CERRUTI-MAINARDI P., BORRANES C., AND TAMBUSI A.M. *Minerva paediat.* 15, 1392, 1963.
14. GOHIMAN-YHAR M., CONVIT J., RODRÍGUEZ OCHOA G., ARANZAZN N., VILLALBA PIMENTEL L., OCANTO A. AND GÓMEZ M. E. *Allergy appl. Imm.* 57, 317, 1978.
15. GOHIMAN-YHAR M., REQUENA M. A., VALLECALIE-SNEGART E. AND CONVIT J. J. *Int. J. Lepr.* 42, 266, 1974.
16. LEVINE S. AND HOENIG E. M. *Am. J. Path.* 64, 13, 1971.
17. LEVINE S. AND SOWINSKY R. *Science* 171, 498, 1971.
18. JOHNSTON R. B. JR., LEHMEYER J. E. AND GUTTIERE L. A. *J. Exp. Med.* 148, 115, 1978.

19. ANDO M., SUGA M., SUGIMOTO M. AND TOKNOMI H. *Infect. and Immun.* 24, 404, 1979.
20. HENSON P.M. AND OADES Z.G. *J. Clin. Invest.* 56, 1053, 1975.
21. KAY N.E., DOUGLAS S.D. AND NELSON R.D. *Infect. and Imm.* 26, 12, 1979.
22. PAPAHDJAPoulos D., JACOBSON K., POSTE G. AND SHEPPARD G. *Biochim. Biophys. Acta* 394, 504, 1975.
23. GOLDSTEIN I.M., CIRQUEIRA M., LINDS S. AND KAPLAN H.B. *J. Exp. Med.* 146, 483, 1977.
24. GOLDSTEIN I.M., ROOS D., WEISSMANN G. AND KAPLAN H.B. *Inflammation* 1, 305, 1976.
25. HAWKINS D. *Clinical Immunology and Immunopathology* 2, 141, 1974.
26. VAN FURTH R. In Activation of Macrophages. 178, Eds. Wagner W.H. and Hahn H. Proceeding of the second Workshop Conference 1974.