

Fagocitosis y lisis de *C. albicans* por granulocitos neutrófilos humanos normales en presencia de pANCA

Brissón, C.; Blanzaco, P.; Pedro, M.; Denner, S.; Giugni, M.; Minella, K.; D'Alessandro M.

Departamento de Bioquímica Clínica y Cuantitativa. Facultad de Bioquímica y Cs. Biológicas.

Universidad Nacional del Litoral

Dirección postal: Prof. Cecilia Brissón

Paraje El Pozo - Ciudad Universitaria - CC 230 - (3100) - Santa Fe

Dirección electrónica: cbrisson@entrieros.net

RESUMEN: Los anticuerpos anticitoplasma del neutrófilo (ANCA) han sido descritos en las vasculitis sistémicas idiopáticas y en una amplia variedad de enfermedades inflamatorias. Estos anticuerpos reaccionan con moléculas de los gránulos azurófilos de los granulocitos neutrófilos (PMN). Se evaluó el efecto de estas interacciones sobre funciones esenciales del PMN. **Método:** Los PMN se separan por adherencia al vidrio y se los enfrenta a suspensiones de *C. albicans* durante 5, 15, 30, 40 y 60 minutos en presencia y ausencia de pANCA. Se diferencian las levaduras vivas de las muertas por coloración de Giemsa. **Resultados:** Se observó disminución relativa de la fagocitosis en el sistema con pANCA a t= 5, 15, 30 y 40 minutos ($p < 0.05$) y disminución relativa de la lisis en presencia de pANCA a los 60 minutos ($p < 0.05$). **Conclusiones:** Estas observaciones demuestran alteraciones en la inmunidad producidas por la presencia de pANCA y podrían ser de significado patogénico en las vasculitis sistémicas.

Palabras clave: ANCA - pANCA - MPO - fagocitosis - *C. albicans* - neutrófilo

SUMMARY: Brissón, C; Blanzaco, P; Pedro, M; Denner, S; Giugni, M; Minella, K; D'Alessandro M. Antineutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA) have been described in the idiopathic systemic vasculitides, but also in a wide variety of other inflammatory disorders. They react against molecules of neutrophils azurophilic granules (PMN). The aim of the present study was to determine pANCA interference with the physiological functions of the PMN.

Methods: The PMN are separated through glass-adherence and then exposed to *C. albicans* suspensions during 5, 15, 30, 40 y 60 minutes with pANCA presence and absence. Live and dead yeast are identified using Giemsa's stain. **Results:** Phagocytosis pANCA system phagocytosis was found decreased to t= 5, 15, 30 and 40 minutes ($p < 0.05$) and pANCA system intracellular killing was found decreased to 60 minutes ($p < 0.05$). **Conclusions:** our data demonstrate an impairment of the immunity exerted by pANCA. The fact could be of pathogenic significance in systemic vasculitis.

Key words: ANCA - pANCA - MPO - phagocytosis - *C. albicans* - neutrophil

Introducción

Los anticuerpos anticitoplasma del neutrófilo reaccionan contra enzimas presentes en los gránulos azurófilos de los PMN y monocitos principalmente. Fueron descritos inicialmente por Davies y col en 1982 (1) y se asocian fuertemente a varias formas de vasculitis (2) que se han clasificado como "vasculitis asociadas a ANCA" (granulomatosis de Wegener (WG), glomerulonefritis necrotizante segmentaria (GN), poliangeitis microscópica (MPA)), a enfermedad inflamatoria intestinal (EII) (asociada principalmente a colitis ulcerosa (CU) (3)) y a enfermedades reumáticas (4). También se los ha descrito

en procesos infecciosos como infecciones por HIV (5), toxoplasmosis, lepra, sepsis, etc. (6-8).

Si el PMN se expone a bajas dosis de moléculas proinflamatorias, como factor de necrosis tumoral (TNF) o IL-1, expresa sobre su membrana el contenido de los gránulos azurófilos, sobre los que pueden actuar los ANCA. Los principales antígenos para ANCA son: la proteinasa 3 (PR3), asociado fuertemente a anti-PR3 en WG y de patrón generalmente citoplasmático (cANCA) cuando se detectan por inmunofluorescencia indirecta (IFI) sobre neutrófilos fijados con etanol (9); la mieloperoxidasa (MPO) (10,11), responsable principal del patrón perinuclear (pANCA) y otras enzimas como la lactoferrina (LF),

la proteína bactericida por incremento de la permeabilidad (BPI), la catépsina G, etc.

Los ANCA se asocian a enfermedades de base inmunológica y se discute si su papel en las mismas es patogénico o un epifenómeno. Se debe avanzar en el conocimiento del rol fisiopatológico de cada célula que en forma básica aportará a la comprensión de los mecanismos de lesión, reparación y/o regulación, de los aspectos que hacen a su inmunocompetencia para la prevención de infecciones que pudieran estar asociadas y de la posibilidad de una inmunomodulación como terapia.

El desafío de los PMN con levaduras opsonizadas induce la fagocitosis y la activación celular con liberación de especies reactivas de oxígeno. La integridad anatómica y funcional de la membrana citoplasmática es básica para una fagocitosis eficiente. La acción de la MPO es fundamental en el asa bactericida dependiente de oxígeno y es la principal enzima implicada en la destrucción de *C. albicans* (12). MPO es el principal antígeno asociado a pANCA (13), por lo que se seleccionó esta levadura para identificar alteraciones en la fagocitosis y de la lisis y se estudiaron las funciones en forma dinámica.

Pacientes y método

Pacientes: los sueros fueron obtenidos de los individuos sanos seleccionados para establecer la prevalencia de estos anticuerpos en nuestra zona (14) que resultaron positivos para pANCA por IFI sobre PMN fijados con etanol absoluto (The Binding Site, Birmingham, UK). Fueron utilizados solamente aquellos sueros que resultaron negativos para factores antinucleares (ANA) sobre células HEp2 y cuyo patrón era definidamente perinuclear y que se hicieron citoplasmáticos haciendo la prueba con PMN fijados con formalina absoluto (The Binding Site, Birmingham, UK). La muestra se seleccionó teniendo en cuenta los títulos de pANCA que presentaban, utilizándose aquellos que diferían en ± 1 título respecto al valor modal obtenido en el laboratorio con la técnica de IFI. De esta manera, se trabajó con sueros cuya concentración de anticuerpos no difería entre sí de acuerdo a las convenciones empleadas en la interpretación de las técnicas de cuantificación por dilución. Se utilizó el valor modal para poder contar más sueros para utilizar en las pruebas.

Método (12,15)

El método emplea como técnica de separación de los neutrófilos su propiedad de adherencia al vidrio. Esta técnica posee un rendimiento de 40 a 60 fagocitos por campo de 1000x, con una viabilidad mayor al 99%. La función de fagocitosis y de lisis se mide ofreciendo levaduras fagocitadas que, al final del proceso, se colorean con Giemsa para su recuento. El colorante de Giemsa colorea en forma diferencial las levaduras vivas (oscuras) y las muertas (imagen en sacabocado).

Levaduras: se utilizaron cultivos de *C. albicans* en agar Sabouraud de 8 y 10 h. Las suspensiones se prepararon en el momento de usar, ajustando su concentración a 5-8.10⁶ candidas/ml. La suspensión se realizó en solución de Hanks'. Se opsonizó con 20% de suero pANCA (pruebas) o pool de sueros AB, ANCA negativos (controles).

PMN: neutrófilos humanos normales grupo O, Rh positivos, MPO positivos por citoquímica. El criterio de normalidad utilizado considera que el dador no refiriera historia de infecciones bacterianas a repetición, periodontitis, abscesos fríos, granulomas, fiebre de origen desconocido.

Separación de los PMN por adherencia al vidrio: la sangre se obtuvo por punción venosa, se colocó sobre portaobjetos limpios aproximadamente 2 ml de sangre, se incubó 30 minutos a 37°C en cámara húmeda, se despegó el coágulo y se lavó con Hanks'.

Fagocitosis y lisis: se agregó 2 ml de la suspensión de levaduras a cada portaobjetos y se incubó 5, 15, 30, 40 y 60 minutos. Cumplidos los tiempos se lavó y dejó secar. Luego se coloreó con Giemsa. Cada punto se procesó por duplicado.

Recuento: se contó el número de levaduras fagocitadas (azules) y lisadas (imagen en sacabocados) por 200 neutrófilos y se refirió a porcentaje empleándose como dato el promedio de las lecturas de los duplicados.

Análisis estadístico: las variables fagocitosis (F) y lisis dependiente de MPO (LMPO) distribuyen según curvas normales. Se aplicó la prueba t de Student para comparar si la diferencia entre normales y tratados es estadísticamente significativa fijando un nivel de significación igual a 0.05.

a) Fagocitosis

Tabla 1: Fagocitosis de *C. albicans* frente a sueros controles o sueros con pANCA

Tiempo en minutos	Fca/100 PMN		Valor de p
	Sueros Controles Media \pm S	Sueros pANCA Media \pm S	
5	190,500 \pm 10,015	167,750 \pm 21,907	0,026
15	307,667 \pm 7,967	257,250 \pm 27,876	0,001
30	319,667 \pm 4,033	278,250 \pm 14,028	0,001
40	338,667 \pm 11,894	308,375 \pm 18,462	0,030
60	428,500 \pm 19,305	404,625 \pm 29,071	0,090

Conclusión: al nivel de significación alfa = 0.05 hay diferencia estadística para la fagocitosis de *C. albicans* por PMN normales entre las pruebas opsonizadas con sueros controles y las opsonizadas

con sueros pANCA en los tiempos 5, 15, 30 y 40 minutos.

Con el mismo criterio, los valores hallados para t=60 min. en ambos sistemas, no difieren entre sí.

b) Lisis

Tabla 2: Lisis de *C. albicans* frente a sueros controles o sueros con pANCA

Tiempo en minutos	LMPO/100 PMN		Valor de p
	Sueros Controles Media \pm S	Sueros pANCA Media \pm S	
5	0,833 \pm 0,258	0,875 \pm 0,443	0,829
15	1,167 \pm 0,258	1,250 \pm 0,267	0,568
30	1,500 \pm 0,316	1,500 \pm 0,463	1,000
40	2,167 \pm 0,408	1,750 \pm 0,534	0,124
60	3,917 \pm 0,665	3,125 \pm 0,518	0,038

Conclusión: al nivel de significación alfa = 0.05 no hay diferencia estadística para la lisis de *C. albicans* por PMN normales entre las pruebas opsonizadas con sueros controles y las opsonizadas con sueros pANCA para t= 5, 15, 30, y 40 minutos.

Con el mismo criterio, los valores hallados para t=60 min en ambos sistemas, difieren entre sí.

Discusión

Los hallazgos experimentales muestran una alteración significativa en las funciones de fagocitosis y de lisis dependiente de la MPO de los

PMN cuando se las evalúa en presencia de pANCA. Su análisis cinético nos permite postular una serie de mecanismos causales y es una fuente de hipótesis para nuevas investigaciones funcionales del PMN en relación a las vasculitis asociadas a pANCA.

Se han propuesto dos modelos para explicar el mecanismo de la fagocitosis, el clásico modelo de la cremallera (zipper) y el modelo del disparo (trigger). El primero implica control local de la fagocitosis de las partículas opsonizadas (las opsoninas son moléculas que pueden unirse a la partícula por alguna parte de su estructura y por otra a receptores específicos sobre el PMN) y requiere reclutamiento secuencial de receptores que interactúan con el res-

to de la superficie celular. Esto resulta en la formación de un pseudópodo que se extiende sobre la partícula en la zona donde los ligandos se unen a sus receptores. La respuesta está completamente bajo control local y sostiene que el proceso completo incluye el reclutamiento de otros receptores además de los involucrados en la unión inicial. El segundo modelo explica la fagocitosis según un mecanismo de disparo de una señal que precipita una respuesta celular cuya magnitud es independiente de la intensidad de la misma y donde no se produce una unión tan continua de la membrana celular a la partícula.

1. Posibles causas de la disminución de la fagocitosis hasta los 40 minutos

(a) El bloqueo de los Fc γ R por los complejos ANCA-Ag disminuiría la cantidad de receptores para opsoninas inmunoglobulinas específicas para las levaduras. Estos receptores pueden ser ocupados también por otros complejos Ag-Ac presentes en el microentorno celular, en este caso pANCA-Ag, y lo que discontinuaría la "cremallera". Los antígenos para los ANCA llegarían al medio extracelular de los gránulos liberados al medio durante la fagocitosis (obsérvese que para $t = 5$ min hay ya una importante cantidad de levaduras fagocitadas).

(b) La reacción de pANCA por F(ab') sobre sus antígenos expresados en la membrana podrían generar interacciones que dificultaran la formación eficiente de pseudópodos a pesar de inducir la activación del PMN (16,17).

2. Posibles mecanismos que intervienen en la normalización de los valores de fagocitosis para los tiempos de prueba más avanzados ($t = 60$ min)

(a) Metabolitos de las levaduras podrían facilitar la fagocitosis (18) haciéndose ésta más independiente de la continuidad de los sitios de anclaje (modelo "trigger") entre la partícula opsonizada y el receptor (¿favorecedores no opsonicos?).

(b) La fagocitosis puede estar facilitada preferencialmente por CR en esta etapa. El complemento podría activarse por las reacciones Ag-Ac provistas por los complejos Ac-levaduras y ANCA-Ag para ANCA proveyendo las fracciones con actividad opsonica. La fijación aislada de las partículas opsonizadas con complemento a su receptor no es suficiente para activar la formación de pseudópodos sino que también necesita fijarse a la fibronectina y la laminina extracelulares y la acción de ciertas citocinas. La IL-1 podría ser provista por los

monocitos presentes en la muestra. Esto puede explicar también la disminución de la lisis para *C. albicans* en este período ya que la unión por CR1 atenúa la liberación de MPO y la producción de HOCl iniciada por unión por Fc, sistemas microbicidas fundamentales para el neutrófilo (19).

3. Posibles causas y mecanismos que intervienen en las alteraciones de la lisis

(a) El análisis de los datos muestra que en los primeros 40 minutos de prueba no hay diferencias en la capacidad de lisis entre ambos sistemas en estudio. Los anticuerpos anti-MPO actúan sobre un sitio del complejo haluro-MPO-H₂O₂ que disminuye su eficacia microbicida. Aún esta disminución es suficiente, en unión al resto de los mecanismos no MPO dependientes o no dependientes de otros ANCA diferentes de anti-MPO presentes en las muestras para resolver la oferta de partículas en los primeros momentos de la prueba. Si la tendencia observada para los valores superiores de tiempo se mantiene y no se trata de una fluctuación experimental, el aumento de levaduras fagocitadas o el agotamiento de los sistemas de compensación condicionan una disminución de la lisis de estos microorganismos.

Conclusión

Estas observaciones sugieren un rol patogénico "in vivo" para pANCA y explican en cierto grado su relación a las infecciones como iniciadoras de las vasculitis o de las recaídas (1,5,6,7,9,11): una temprana liberación de gránulos a partir de la fagocitosis que pueden interactuar con los pANCA en su microentorno y la persistencia de los PMN en el sitio de la infección, prolongada por una fagocitosis menos efectiva en un principio y una lisis disminuida posteriormente, no suficientemente alteradas para predisponer a estos individuos a las infecciones piógenas pero sí para desbalancear el fenómeno inflamatorio local.

Abreviaturas utilizadas

ANCA: anticuerpos anticitoplasma del neutrófilo; pANCA: anticuerpos anticitoplasma del neutrófilo de patrón perinuclear; PMN: polimorfonuclear neutrófilo; MPO: mieloperoxidasa; TNF: factor de necrosis tumoral; IL-1: interleukina-1; WG: granulomatosis de

Wegener; GN: glomerulonefritis necrotizante segmentaria; MPA: poliangiitis microscópica; Ell: a enfermedad inflamatoria intestinal; CU: colitis ulcerosa; LF: lactoferrina; BPI: la proteína bactericida por incremento de la permeabilidad; FcyR: receptor para Fc de IgG; CR: receptores para fragmentos de C3.

Bibliografía

- 1- Davies D., Moran J., Niall J., Ryan G., 1982. Segmental necrotising glomerulonephritis with antineutrophil antibody: possible arbovirus aetiology. *BMJ* **285**, 606-609.
- 2- Hoffman G., Specks U., 1998. Review: Antineutrophil cytoplasmic antibodies. *Arthritis & Rheumatism* **41**, 9: 1521-1537.
- 3- Papo M., Quer J., Pastor R. et al., 1998. Anticuerpos anticitoplasma de neutrófilo en la enfermedad inflamatoria del intestino. *Medicina Clínica* **110**, 1: 11-15.
- 4- Kallenberg C., Mulder A., Tervaert J., 1992. Antineutrophil cytoplasm antibodies: a still growing class of autoantibodies in inflammatory diseases. *Am J Med* **93**: 675-682.
- 5- Savige J. et al., 1994. Antinuclear, antineutrophil cytoplasmic and anti-glomerular basement membrana antibodies in HIV infected individuals. *Autoimmunity* **18**: 205-211.
- 6- Galperin C. et al., 1996. Anti-neutrophil cytoplasm antibodies in patients with chromomycosis. *Clin Exp Rheumatol* **14**: 479-483.
- 7- Efthimiou J., Spickett G., Lane D., Thomson A., 1991. Antineutrophil cytoplasmic antibodies, cystic fibrosis, and infection. *Lancet* **337**: 1037-1039.
- 8- CARDINALI A., 1999. Anticuerpos anti-citoplasma de neutrófilos: aspectos bioquímicos y metodológicos. Importancia en diferentes patologías. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana* **2**: 167-196.
- 9- Van Der Woude F., Rasmussen N., Lobatto S., Wiik A., Perman H., Van Es La et al., 1985. Autoantibodies against neutrophils and monocytes: tool for diagnosis and marker of disease activity in Wegener's granulomatosis. *Lancet* **1**: 425-9.
- 10- Kallenberg C., 1996. "Autoantibodies". Elsevier. (Londres). 53-60.
- 11- Falk R., Jennette J., 1988. Antineutrophil cytoplasmic autoantibodies with specificity for myeloperoxidase in patients with systemic vasculitis and idiopathic necrotizing and crescentic glomerulonephritis. *N Engl J Med* **25**: 1651-1657.
- 12- Lehrer R., 1975. The fungicidal mechanisms of human monocytes. I. Evidence for myeloperoxidase-linked and myeloperoxidase-independent candidacidal mechanisms. *J Clin Invest* **55**, 2: 338-346.
- 13- Falk R., Jennette J., 1989. Immunofluorescence and ELISA determination of ANCA with description of a sub-class with antimyeloperoxidase activity. *APMIS* **97**: 48-49
- 14- Brissón C., Blanzaco P; D'Alessandro M.; Pedro A., Giugni M., Minella K., Denner S., Fernandez V., Roldán J., 2001. Anticuerpos anticitoplasma del neutrófilo (ANCA): prevalencia en población sana de Santa Fe. FACIB. Enviado a publicar.
- 15- Ballart I., Estevez M., Diez R., Sen L., 1987. Comparison of Candida killing activity measured by chemiluminescence and cytomorphological methods in human phagocytes. *J Immunol Methods* **97**: 263-268.
- 16- Mulder A., Horst G., Limburg P., Kallenberg C., 1994. Activation of granulocyte by neutrophil cytoplasmic antibodies (ANCA): a FcγRII-dependent process. *Clin Exp Immunol* **98**: 270-278.
- 17- Yang J., Tuttle R., Hogan S., Taylor J., Phillips B., Falk R., Jennette J., 2000. Target antigens for anticytoplasmic autoantibodies (ANCA) are on the surface of primed an apoptotic but not unstimulated neutrophils. *Clin Exp Immunol* **121**: 165-172.
- 18- Swanson J.; Baer S., 1995. Phagocytosis by zippers and triggers. *Trends in Cell Biology* **5**: 89-93.
- 19- Sambandam T., Chatham W., 1998. Ligation of CR1 attenuates Fc receptor-mediated myeloperoxidase release and HOCl production by neutrophils. *J Leukoc Biol* **63**: 477-485.