

Efectos de la pepstatina A sobre los neutrófilos; desactivación cruzada con el FMLP*

M. A. Muniain **, F. Pozuelo, J. J. Pérez-Venegas, A. Romero-Tabares,
M.ª C. Rodríguez-Hornillo y M. Garrido

Hospital Universitario
Laboratorio de Investigación 1.º Departamento de Patología y Clínica Médicas
Facultad de Medicina
41009-Sevilla

(Recibido el 23 de marzo de 1984)

M. A. MUNIAIN, F. POZUELO, J. J. PEREZ-VELEGAS, A. ROMERO-TABARES,
M.ª C. RODRIGUEZ-HORNILLO and M. GARRIDO. *Effect of Pepstatin A on Neutrophils; Cross Deactivation with FMLP*. Rev. esp. Fisiol., 41, 125-132. 1985.

The ability of pepstatin A, a protease inhibitor produced by the *Streptomyces testaceus*, to elicit a number of responses by the human PMN has been studied. In the lysozyme and betaglycuronidase release, pepstatin A 10^{-5} M is equivalent to the synthetic oligopeptide N-formyl-metionyl-leucil-phenylalanine (FMLP) 10^{-7} M. In the superoxide release, pepstatin A 10^{-5} M produces 80 % of that originated by FMLP 10^{-7} . After two minutes of incubation the superoxide release is important, there being no further increase after 10 minutes.

Preincubation of the cells with cytochalasin B before stimulation with pepstatin A elicits a noticeable increase in O_2^- release.

In chemotaxis, pepstatin A 10^{-6} originates the same cell motility as FMLP 10^{-6} .

Pepstatin A produces a cross deactivation with FMLP which adds further evidence to the hypothesis that both stimuli compete for the same receptor in the PMN.

Key words: Cross deactivation, FMLP, Pepstatin A, Superoxide.

La Pepstatina A, inhibidor de las proteasas producido por el *Streptomyces testaceus* (19), es quimiotáctico para los neutrófilos humanos (1) y compite con el n-formil-metionil-leucil-fenil-alanina (FMLP) por el mismo receptor (o recep-

tores muy próximos) en el PMN y es capaz así mismo, de liberar enzimas citoplásmicas y producir superóxido (13).

En el presente trabajo se ha realizado un estudio comparativo entre FMLP y Pepstatina. Se han investigado diversas concentraciones y diferentes tiempos de incubación de estas dos substancias, midiendo producción de superóxido, liberación de enzimas y capacidad quimiotáctica.

Por otro lado, es bien conocido que cuando los PMN son preincubados con

* Trabajo subvencionado por el proyecto 985 de la Comisión Asesora.

** A quien debe dirigirse toda la correspondencia: Hospital Universitario, 8.ª planta. Avda. Dr. Fedriani, s/n. 41009-Sevilla.

citocalasina B antes de exponerlos a un estímulo quimiotáctico, se incrementa la liberación de enzimas citoplásmicas. No obstante, existen datos contradictorios sobre los efectos que la citocalasina B ejerce en la producción de anión superóxido (6, 10). Por esta razón, se ha estudiado la liberación de superóxido originada por los PMN preincubándolos con citocalasina B y empleando como estímulo pepstatina A. Para observar si la pepstatina A y el FMLP compiten por los mismos receptores de los PMN, se han preincubado en primer lugar, los PMN con uno de los estímulos y posteriormente los mismos PMN con el otro, midiendo entonces la producción de superóxido.

Material y métodos

El medio utilizado ha sido solución de Hanks 5 mM, suplementada con 1 mg por ml de dextrosa y 1 mg/ml de albúmina bovina, pH 7,4.

Neutrófilos. Los neutrófilos de sangre periférica procedentes de personas sanas, fueron separados mediante sedimentación con Dextrán y posterior centrifugación con Ficoll-Hypaque (Pharmacia Fine Chemical) como ha sido descrito previamente (4). Los eritrocitos se lisaron con cloruro amónico 0,85 % durante 15 min a 37 °C.

La viabilidad, medida por la exclusión de la eosina Y, era del 96 % y la concentración de neutrófilos, evaluada con la tinción de Wright del 96 %.

Factores quimiotácticos. La pepstatina A (Sigma) disuelta en dimetilsulfoxido (DMSO, Fisher Scientific) a concentración de 10^{-2} M y el N-formil-metionil-leucil-fenilalanina (FMLP, Sigma) 10^{-3} M, disueltos en DMSO, se almacenaron a -70 °C.

El C_{5a} parcialmente purificado fue donado gratuitamente por el Dr. Spilberg.

Antes de cada experimento se preparaban con medio las diluciones oportunas.

Producción de superóxido. Todos los experimentos se realizaron por duplicado en tubos de plástico de microcentrifuga (Beckman Instruments, Palo Alto, Ca) con un volumen final de 0,4 ml. Se añadieron por este orden: 0,2 ml de neutrófilos (6×10^6 neutrófilos/ml); 0,1 ml de ferrocitocromo C (4 mg/ml) (Sigma); 0,1 ml de estímulo o medio.

Los tubos se colocaron en un baño de agua a 37 °C, agitándolos periódicamente. Después de tiempos variables (5 min si no se especifica lo contrario), la reacción se detuvo separando el sobrenadante de las células tras centrifugar durante 30 s a 8 000 g.

El cálculo de la producción de superóxido se realizó del siguiente modo: 0,2 ml del sobrenadante y 2,8 ml de buffer fosfato potásico (0,1M, pH 7,4) se midieron en un espectrofotómetro a 550 nm para calcular la cantidad de citocromo C reducido. El coeficiente de extinción del citocromo estudiado se consideró de $21,1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (20).

En los experimentos en los que se utilizó citocalasina B, las células se incubaron primero con 5 µg/ml de citocalasina B durante 5 min, antes de añadir el estímulo (o el medio en los controles).

Liberación de enzimas. Las incubaciones se realizaron por duplicado en un volumen de 1 ml. Los neutrófilos (10×10^6) se incubaron con citocalasina B (5 µg/ml) durante 5 min antes de añadir el estímulo. Después se incubaron los tubos 10 min a 37 °C. La reacción se detuvo centrifugando las células a 8 000 g durante 15 seg y en los sobrenadantes se midieron las enzimas. La lisozima se determinó mediante el coeficiente de lisis de *Micrococcus lysodicticus* (Worthington Biochemical Corp.) medido por la disminución de la absorbancia a 450 nm (7).

La actividad de la betaglucuronidasa se midió tras 18 h de incubación a 37 °C

con ácido betaglucurónico como sustrato (Sigma) y fenolftaleína (Fisher Scientific) como estándar (5).

La liberación de láctico-deshidrogenasa (LDH) se determinó por el método de WACKER *et al.* (21) y se empleó como índice de viabilidad de las células. Los resultados se expresaron como el porcentaje de la actividad total que se libera tras sonicar las células en los tubos controles.

Quimiotaxis. Liberación de cromo: Las células se incubaron primero con Cr^{51} (New England Nuclear) a una concentración suficiente para dar 2 000-3 000 c.p.m. por millón de células (18). La mezcla de Cr^{51} y PMN se incubó en tubos de plástico a 37 °C durante 45 min y se lavó tres veces con PBS.

Se colocaron 10^6 neutrófilos en el compartimiento superior de una cámara de quimiotaxis (Unipore), consistente en dos compartimentos de 0,1 ml de capacidad, separados por dos filtros microporos de 5 μm de tamaño de poro (Millipore) (9), y el factor quimiotáctico (o medio en el control), se colocó en el compartimiento inferior. Después de incubación durante tres horas a 37 °C, se separaron los filtros superiores (FS) de los inferiores (FI). La radiactividad de cada uno fue medida en un contador gamma durante dos minutos. Los resultados expresados como índice quimiotáctico se obtuvieron:

$$\text{FI} \times 100 / \text{FS} + \text{FI} - \text{el control.}$$

Desactivación cruzada en la producción de superóxido. Después de incubar las células durante 5 min a 37 °C con medio o estímulo se centrifugan los tubos y se resuspenden nuevamente con medio o con el otro estímulo a estudiar. Es en esta segunda incubación cuando se añade el citocromo C. El resto de los cálculos se hacen del mismo modo que en la producción de superóxido descrita más arriba.

Resultados

En la figura 1 se expresan los nmoles de citocromo C reducido al preincubar las células con pepstatina y FMLP. La producción óptima de O_2^- se obtiene con una concentración final de pepstatina A de 10^{-5}M y es aproximadamente el 80 % de la obtenida con FMLP 10^{-7} .

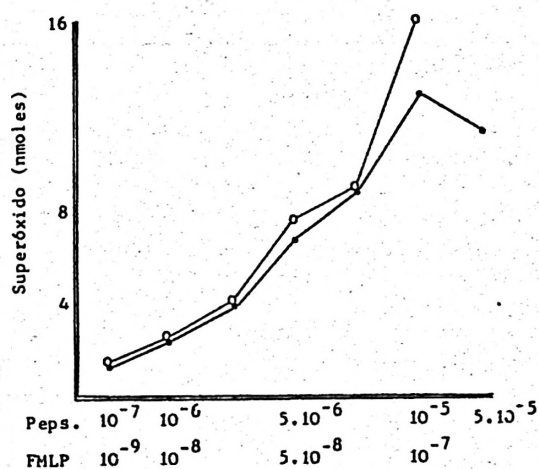


Fig. 1. Producción de superóxido originada por pepstatina A (●) y FMLP (○).

Los niveles de O_2^- obtenidos tras diversos tiempos de incubación alcanzaban el máximo de producción en la mayoría de los experimentos a los 2 min y en algunos existía un ligero aumento de producción hasta los 10 min. En ningún caso se incrementaron los valores tras 15 min de incubación (tabla I).

Los valores de lisozima y betaglucuronidasa obtenidos con pepstatina A 10^{-5}M son superponibles a los obtenidos con FMLP 10^{-7}M (figs. 2 y 3).

Ninguno de los dos factores quimiotácticos origina una producción de LDH superior al 5 %.

Tras la preincubación con citocalasina B existe un marcado incremento en la producción de superóxido, es decir, la citocalasina B origina un aumento en la

Tabla I. *Producción de superóxido.*
Efecto del tiempo de incubación. Los resultados expresan los valores de Densidad Óptica (DO).

	Tiempo de Incubación (min)			
	2	5	10	15
Medio	0,040	0,040	0,042	0,044
Medio células	0,039	0,042	0,044	0,047
FMLP 10^{-7}	0,081	0,084	0,080	0,080
Pepstatina A 10^{-5}	0,079	0,079	0,080	0,079
Pepstatina A 10^{-6}	0,051	0,060	0,047	0,056
Pepstatina A 10^{-7}	0,046	0,043	0,044	0,049

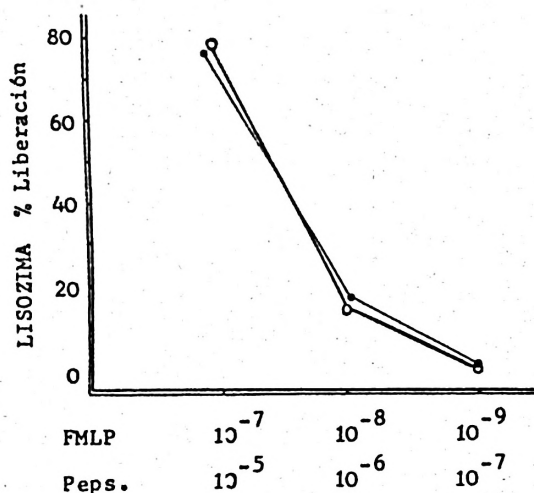


Fig. 2. *Liberación de lisozima.*

Los resultados se expresan en tantos por ciento de un tubo control cuyas células fueron sonificadas. Actividad total de lisozima 105 ± 4 .
Pepstatina (●); FMLP (○).

Tabla II. *Efecto de la citocalasina B en la producción de superóxido.*
Los resultados expresan nanomoles de citocromo C reducido.

Estímulo	Sin citocalasina	Con citocalasina
Medio	0	0
Medio	0	0
Pepstatina A 10^{-5}	12,4	18
FMLP 10^{-7}	14,5	16,5

liberación de enzimas citoplásmicas, así como un incremento en la liberación de superóxido (tabla II).

Estos experimentos se realizaron con una doble incubación para demostrar que la citocalasina B, por sí misma (sin estímulo quimiotáctico) no origina liberación de superóxido.

Con el método de liberación de Cr^{51} ambas sustancias se mostraron como buenos factores quimiotácticos, siendo la concentración óptima de pepstatina A 10^{-6}M y la del FMLP 10^{-8}M .

Las células preincubadas con FMLP muestran una clara desactivación cuando posteriormente son expuestas a pepstatina A, y a la inversa. Las células eran en

Tabla III. *Producción de superóxido.*
Las células se incubaron durante 5 min con cada uno de los estímulos. nM = nanomoles.

1.º estímulo	2.º estímulo	nM de citoc. C reducido
FMLP 10^{-7}	Peps. A 10^{-5}	1,2
Peps. A 10^{-5}	FMLP 10^{-7}	0,7
Medio	Peps. A 10^{-5}	8,3
Medio	FMLP 10^{-7}	8,8
Medio	Medio	0
Peps. A 10^{-5}	C_{3a}	7,0
Medio	C_{3a}	7,5

cambio capaces de reaccionar a la fracción 5a del complemento (C_{5a}) tras ser expuestas a pepstatina A (tabla III).

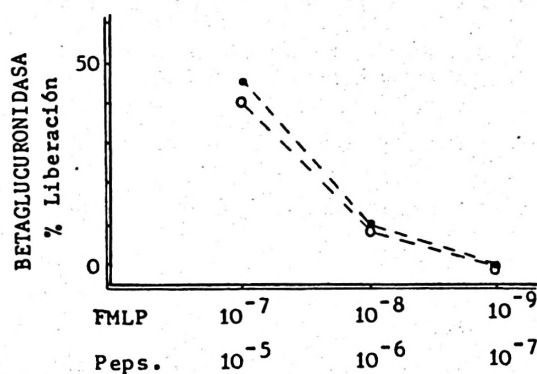


Fig. 3. Liberación de betaglucuronidasa. Los resultados se expresan del mismo modo que en la figura 2. Actividad total de betaglucuronidasa $0,204 \pm 0,05$. Pepstatina (●); FMLP (○).

Discusión

Se ha demostrado que la pepstatina A es capaz de inhibir algunas proteasas, en concreto, la pepsina (19), renina, catépsina D en los macrófagos de conejo (11) y las proteinasas de algunos hongos (2). De hecho, por las propiedades antes expuestas, no deja de ser interesante el hecho de que se hayan realizado ensayos clínicos con pepstatina A tratando de prevenir el úlcus gástrico con buenos resultados en los animales (19), pero no en el hombre (17, 12).

No está bien aclarado si su capacidad de inhibir las proteasas juega algún papel en la activación de los PMN. En favor de esta hipótesis hay que considerar que otros estímulos de los PMN tienen también actividad antiproteásica (11, 14). En contra iría el hecho de que la capacidad de inhibir a las proteasas y más en concreto a la pepsina, se realiza a un pH entre 2 y 4, lejos de los pH fisiológicos de los que se ha trabajado en este experimento (4, 7).

Por trabajos previos (16) se ha comprobado que la pepstatina A compite probablemente por el mismo receptor, o en estrecha proximidad, con el FMLP a pesar de la diferente composición en aminoácidos entre ambos péptidos. En este sentido, los trabajos de FREER *et al.* (8) han señalado que más importante que la composición de los péptidos, son algunas características estructurales de los mismos, los que dan su capacidad estimuladora. En concreto, dentro del amplio grupo de los péptidos formil-metionil, los más activos estimuladores de los PMN son aquellos que tienen el radical N-formil y grupos sulfuros contenidos en las cadenas laterales de la metionina y que la sustitución de los aminoácidos isovalina y valina, disminuye dicha capacidad estimuladora. Esto puede ser la razón de por qué la pepstatina A, que tiene una composición de aminoácidos diferentes del FMLP (formil-metionil-leucil-fenilalanina), puede competir con él; la pepstatina es un pentapéptido hidrofóbico N-bloqueado que contiene dos moléculas de valina.

La pepstatina A y el FMLP presentan una desactivación cruzada casi completa, en ambas direcciones, en la producción de superóxido. Esto no puede ser debido a la pérdida de viabilidad o agotamiento de los PMN, ya que cuando éstos, tras ser incubados con pepstatina son nuevamente estimulados con C_{5a} , son capaces de responder. Por tanto, parece que se trata de una verdadera desactivación y que la pepstatina y la FMLP compiten entre sí no sólo por el *binding* como demostraron SHOWELL *et al.* (16) sino también con la función. Estos experimentos tomados en conjunto añaden evidencia posterior a la hipótesis de BECKER (3) de un receptor para los péptidos, pluri-funcional, en los PMN, al menos en su activación.

Se ha estudiado así mismo la capacidad de preincubación con citocalasina B de incrementar la producción de super-

óxido tras la estimulación con pepstatina A. Estaba bien probado que este metabolito, de un hongo, origina un incremento muy notable en la liberación de enzimas lisosómicos, pero sobre la producción de superóxido existían resultados contradictorios (6, 15). En el presente trabajo se muestra que esta preincubación origina un incremento marcado de la producción de anión superóxido. No obstante, la liberación de enzimas lisosómicos sin previa estimulación con citocalasina B es muy escasa, siendo considerable la de superóxido.

Por tanto se puede concluir que la pepstatina A es un buen estímulo para la liberación de enzimas lisosómicos, producción de superóxido y es un buen factor quimiotáctico. En todas estas funciones es menos activo que las concentraciones óptimas del péptido sintético FMLP, mejor estudiado. Y aunque su reproducibilidad también es menor, parece que se puede incluir en el arsenal de estímulos para los PMN en los estudios sobre la inflamación.

Resumen

Se estudia la capacidad de la pepstatina A, un inhibidor de las proteasas producido por el *Streptomyces testaceus*, para estimular a los PMN humanos. La liberación de lisozima y betaglucuronidasa, originada por la pepstatina A a 10^{-6} M es comparable a la originada por el oligopéptido sintético N-formil-metionil-leucil-fenilalanina (FMLP) 10^{-7} M. La producción de superóxido es considerable ya a los 2 minutos de incubación, no produciéndose más después de 10 minutos. La preincubación de las células con citocalasina B antes de estimularlas con pepstatina, origina incremento en la liberación de O_2^- . En quimiotaxis, la pepstatina A 10^{-6} M origina la misma movilidad de las células que el FMLP 10^{-7} M. Por último, la pepstatina A origina una desactivación cruzada con el FMLP, lo que añade una evidencia posterior a la hipótesis de que ambos estímulos compiten por el mismo receptor en los PMN.

Bibliografía

1. ACKERMAN, S. K. y DOUGLAS, S. D.: *Clin. Immunol. Immunopathol.*, **14**, 244-350, 1979.
2. AOYAGI, T., KUNIMOTO, S. K., TAKENCHI, T. y UMEZAWA, H.: *J. Antibiotics*, **24**, 687-694, 1971.
3. BECKER, E. L.: *J. Reticul. Soc.*, **26**, 701-709, 1979.
4. BOYUM, A.: *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, **21**, 27-32, 1968.
5. BRITTINGER, G., HIRSCHRON, R., DOUGLAS, S. D. y WEISSMAN, G.: *J. Cell. Biol.*, **37**, 394-397, 1968.
6. CURNUTTE, J. T. y BABIOR, B. M.: *Blood*, **45**, 851-861, 1975.
7. DECKER, L. A.: En «Worthington Enzyme Manual». Worthington Biochemical Corp. Freehold. N.J., 1977, p. 185.
8. FREER, R. J., DAY, A. R., RADDING, J. A., SCHIFFM, E., ASWANIKUMAR, S., SHOWELL, H. J. y BECKER, E. L.: *Biochemistry*, **19**, 2404-2410, 1980.
9. GALLIN, J. I., CLARK, R. A. y KIMBALL, H. R.: *J. Immunol.*, **110**, 233-240, 1973.
10. HIGSON, F. K. y JONES, T. G.: *Ann. Rheumat. Dis.*, **42**, supl., 110-111, 1983.
11. McADOO, M. H., DANNENBERG, A. M., HAYES, C. J., JAMES, S. P. y SANNER, J. H.: *Infect. Immun.*, **7**, 655-664, 1973.
12. MORISHIMA, H., TAKITA, T. y UMEZAWA, H.: *J. Antibiot.*, **25**, 551-552, 1972.
13. NELSON, R. D., ACKERMAN, S., FIEGEL, V., BAUMAN, M. y DOUGLAS, S. D.: *Infect. Immun.*, **26**, 996-999, 1979.
14. OKADA, K., KUROSAWA, Y. y NAGOCI, S.: *Chem. Pharm. Bull.*, **27**, 2163-2170, 1979.
15. ROOS, D., HOMAN-MULLER, J. W. T. y WEENING, R. S.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **68**, 43-50, 1976.
16. SHOWELL, H., FREER, R. J., ZIGMOND, S. H., SCHIFFMAN, E., ASWANIKUMAR, S., CORCORAN, B. y BECKER, E. L.: *J. Exper. Med.*, **143**, 1154-1169, 1978.
17. SPENDSEN, L. B., CHRISTIANSEN, P. M. y BONNEOIL, O.: *Scand. J. Gastroenterol.*, **14**, 929-932, 1979.

18. SPILBERG, I., GALLACHER, A. y MANDELL, B.: *J. Lab. Clin. Med.*, 85, 631-636, 1975.
19. UMEZAWA, H., AAYAGI, T., MORISHIMA, H., MATSUZAKI, M., HAMADA, M. y TAKENCHI, T.: *J. Antibiotics.*, 23, 259-262, 1970.
20. VAN GELDER, B. F. y SLATER, E. C.: *Biochem. Biophys. Acta*, 58, 593-599, 1962.
21. WACKER, W. E. C., ULMER, D. D. y VALLU, B. L.: *N. Engl. J. Med.*, 255, 449-452, 1956.

