

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



ESTUDIOS SOBRE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA
DEL MACROFAGO EN CONTRA DEL COMPLEJO
Mycobacterium avium-M. intracellulare

Por

RICARDO ALBERTO GOMEZ FLORES

Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS con Especialidad en Microbiología

Diciembre, 1995

71

TD
QR185
.8
.M3
G6
c.1



1080072449

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



ESTUDIOS SOBRE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA
DEL MACROFAGO EN CONTRA DEL COMPLEJO
Mycobacterium avium-M. intracellulare

Por

RICARDO ALBERTO GOMEZ FLORES

Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS con Especialidad en Microbiología

Diciembre, 1995

TO
QR185
.8
.M3
G6



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESTUDIOS SOBRE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA
DEL MACROFAGO EN CONTRA DEL COMPLEJO
Mycobacterium avium-M. intracellulare

Por

RICARDO ALBERTO GOMEZ FLORES

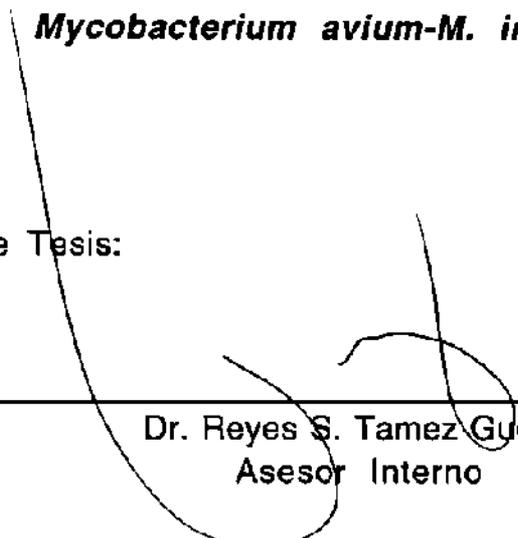
Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS con Especialidad en Microbiología

Diciembre, 1995

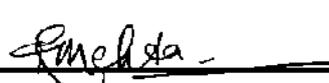
**ESTUDIOS SOBRE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA
DEL MACROFAGO EN CONTRA DEL COMPLEJO**

Mycobacterium avium-M. intracellulare

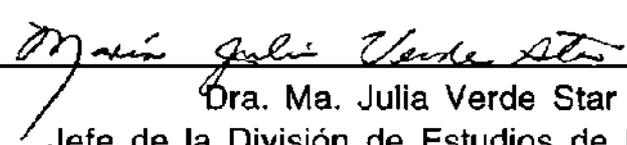
Aprobación de Tesis:



Dr. Reyes S. Tamez Guerra
Asesor Interno



Dra. Reeta T. Mehta
Asesora Externa



Dra. Ma. Julia Verde Star
Jefe de la División de Estudios de Posgrado

DEDICATORIA

A la Memoria de mi abuela Paula Lozano de Flores por haber sido un ejemplo de entereza, dedicación y sacrificio ante la adversidad.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Reyes S. Tamez Guerra por su invaluable amistad y asesoría, y por sus ejemplares cualidades éticas, profesionales e intelectuales. Además, le estoy infinitamente agradecido por enseñarme Inmunología, que ahora es mi fascinación, y por ser el artífice para que la obtención de éste grado fuese una realidad.

A la Dra. Reeta T. Mehta por seguir día a día mi progreso con su experiencia profesional y creatividad. Además, le quedo profundamente agradecido por haberme iniciado en el apasionante mundo de la micobacteriología en un ambiente de reto e independencia.

Al Dr. Gabriel López-Berestein por su apoyo y constante motivación, y por haberme brindado la oportunidad de desarrollar éste trabajo, haciendo uso de sus instalaciones en la Sección de Inmunobiología y Acarreadores de Drogas del Centro de Cancerología M. D. Anderson en Houston, TX, que tan atinadamente dirige.

Al Dr. Stanley D. Tucker por sus valiosos consejos en el uso de citocinas y cultivo de células.

Al Dr. Bharat B. Aggarwal por sus recomendaciones y generosidad en proveerme de factor necrótico de tumores- α .

A la Dra. Rita Kansal por su colaboración en el desarrollo de los estudios en animales.

A la Dra. Enriqueta Fernández por su comprensión y apoyo, y por ser un gran ser humano.

A los maestros de la Facultad de Ciencias Biológicas por su extraordinaria preparación académica y científica, y por darme el privilegio de formar parte de sus vidas.

A mis compañeros y estudiantes del Departamento de Bioinmunoterapia del Centro de Cancerología M. D. Anderson y del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas por brindarme su amistad, y por todo el apoyo recibido.

A todas aquellas personas que de alguna u otra manera fueron partícipes en el desarrollo y culminación de éste proceso, y que sin intención omito.

Un agradecimiento muy especial:

A mis padres por hacer de mi educación una prioridad.

A mis hermanos Carlos, Rogelio, Perla y Mónica por ser una fuente de inspiración.

“El Cosmos podría estar densamente poblado de seres inteligentes. Pero la lección Darwiniana está clara: No existen seres humanos dondequiera, sólo aquí. Sólo en éste pequeño planeta. Somos una especie rara, que está en peligro de extinción. Desde una perspectiva cósmica, cada uno de nosotros es muypreciado. Si un ser humano está en desacuerdo contigo, déjalo vivir. No encontrarás otro en cien billones de galaxias”.

Carl Sagan, COSMOS

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
1. INTRODUCCION	1
1.1 El Macrófago	1
1.1.1 Origen	2
1.1.2 Caracterización	4
1.1.3 Funciones	8
1.1.4 Activación del Macrófago	10
1.1.4.1 Mediadores Intracelulares en la Respuesta Antibacteriana del Macrófago	10
1.2 Modificadores de la Respuesta Biológica	15
1.2.1 Interferón- γ (IFN- γ)	15
1.2.2 Factor de Necrosis Tumoral- α (TNF- α)	22
1.3 Complejo <i>Mycobacterium avium-</i> <i>M. intracellulare</i> (MAC)	29
1.3.1 Características y Epidemiología	29
1.3.2 Patogenicidad	30
1.3.3 Respuesta Inmune del Huésped en contra de MAC	33
1.3.4 Modelos de Infección por MAC en Macrófagos	35
1.3.5 Modelos Animales de Infección por MAC.	36
1.4 Clofazimina	39
1.4.1 Mecanismo de Acción	40
1.4.2 Efectos Colaterales	43
1.5 Liposomas	44
1.6 Tratamiento de la Infección por MAC	55
1.7 Sinopsis y Objetivos	57

Capítulo	Página
2. MATERIALES Y METODOS	59
2.1 Reactivos, Lípidos y Medios de Cultivo	59
2.2 Preparación de MTT y Solución de Extracción	60
2.3 Preparación de Clofazimina Libre y Liposomal	61
2.4 Cultivo de Micobacterias	61
2.5 Modelo de Infección por MAC en Macrófagos	62
2.5.1 Obtención y Cultivo de Macrófagos	62
2.5.2 Infección de Macrófagos	63
2.6 Efecto de la Clofazimina Libre y Liposomal en las Funciones del Macrófago	64
2.6.1 Determinación de la Viabilidad	64
2.6.2 Actividad Antibacteriana	65
2.6.2.1 Actividad Profiláctica	65
2.6.2.1.1 Efecto del Tiempo de Preincubación	66
2.7 Activación del Macrófago	66
2.7.1 Tratamiento con IFN- γ	66
2.7.1.1 Determinación de la Fagocitosis	66
2.7.1.2 Cuantificación de la Incorporación de Clofazimina	67
2.7.1.3 Actividad Antibacteriana del IFN- γ	69
2.7.1.4 Determinación de la Producción de Nitritos	70
2.7.1.4.1 Efecto del NG-monometil-L-arginina (NMA)	70
2.7.1.5 Combinación de IFN- γ con Clofazimina Libre o Liposomal	71

Capítulo	Página
2.7.2 Tratamiento con TNF- α	72
2.7.2.1 Determinación de la Producción de TNF- α	72
2.7.2.1.1 Análisis de la Actividad del TNF- α	72
2.7.2.2 Actividad Antibacteriana del TNF- α	73
2.7.2.2.1 Neutralización de la Actividad del TNF- α	74
2.7.2.2.2 Inhibición por Pentoxifilina	75
2.7.2.3 Combinación de TNF- α con Clofazimina Libre o Liposomal	75
2.7.3 Determinación de la Actividad Antibacteriana	76
2.7.3.1 Incorporación de Glicerol Tritiado	76
2.7.3.2 Determinación del Número de Colonias Bacterianas (UFC)	77
2.8 Estudios <i>In Vivo</i>	78
2.8.1 Efecto de la Clofazimina Liposomal y del IFN- γ en forma Individual o en Combinación en contra de la Infección por MAC	78
2.8.2 Actividad Profiláctica de la Clofazimina Liposomal y del IFN- γ en contra de la Infección por MAC	80
2.9 Análisis Estadístico	81
3. RESULTADOS	82
3.1 Efecto de la Clofazimina Libre y Liposomal en las Funciones del Macrófago	82
3.1.1 Viabilidad	82
3.1.2 Actividad Antibacteriana	82
3.1.2.1 Actividad Profiláctica	85
3.1.2.1.1 Efecto del Tiempo de Preincubación	85

Capítulo	Página
3.2 Efecto de Citocinas	88
3.2.1 Tratamiento con IFN- γ	88
3.2.1.1 Fagocitosis	88
3.2.1.2 Incorporación de Clofazimina	88
3.2.1.3 Actividad Antibacteriana	91
3.2.1.4 Producción de Nitritos	93
3.2.1.4.1 Inhibición por NMA	96
3.2.1.5 Combinación de IFN- γ con Clofazimina Libre o Liposomal	98
3.2.2 Tratamiento con TNF- α	100
3.2.2.1 Producción de TNF- α	100
3.2.2.2 Efecto del TNF- α Exógeno en la Respuesta Antibacteriana del Macrófago	103
3.2.3 Inhibición por Anticuerpos contra TNF- α	103
3.2.4 Inhibición por Pentoxifilina	106
3.2.5 Combinación de TNF- α con Clofazimina Libre o Liposomal	106
3.3 Estudios <i>In Vivo</i>	110
3.3.1 Efectos de la Clofazimina Liposomal, IFN- γ y NMA en contra de la Infec- ción por MAC <i>In Vivo</i>	110
3.3.2 Actividad Profiláctica de la Clofazimina Liposomal en forma Individual o en Combinación con IFN- γ en contra de la Infección por MAC	119
4. DISCUSION	125
5. CONCLUSIONES	138

REFERENCIAS

Tabla	Página
10. Actividades de la CLF-lip, IFN- γ y NMA en contra de la Infección por MAC en Ratones Beige a los 7 Días de Tratamiento	111
11. Actividades de la CLF-lip, IFN- γ y NMA en contra de la Infección por MAC en Ratones Beige a los 19 Días de Tratamiento	112
12. Actividades <i>In Vivo</i> de la CLF-lip, IFN- γ y NMA en contra de la Infección por MAC en Macrófagos Peritoneales de Ratones Beige	119
13. Actividad Profiláctica de la CLF-lip e IFN- γ en contra de la Infección por MAC en Ratones Beige a los 7 Días de Tratamiento	120
14. Actividad Profiláctica de la CLF-lip e IFN- γ en contra de la Infección por MAC en Ratones Beige a los 19 Días de Tratamiento	123
15. Actividad Profiláctica <i>In Vivo</i> de la CLF-lip e IFN- γ en contra de la Infección por MAC en Macrófagos Peritoneales de Ratones Beige	125

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Sistema de Fagocitos Mononucleares	3
2. Activación de Macrófagos	9
3. Vías para la Producción de Oxidantes Inorgánicos por Macrófagos Activados	11
4. Origen Celular del IFN- γ	18
5. Micrografía Electrónica (8000 X) de un Macrófago Peritoneal Infectado con MAC	32
6. Vías Metabólicas de la Clofazimina en Humanos	41
7. Estructura de un Liposoma	46
8. Representación Esquemática de las dos Fases de la Bicapa Fosfolípida	48
9. Fagocitosis de Liposomas por Macrófagos	54
10. Efecto de la Clofazimina en la Viabilidad de Macrófagos Residentes	83
11. Actividad Antimicobacteriana de la Clofazimina en Macrófagos	84

Figura	Página
12. Actividad Profiláctica de la Clofazimina en contra de MAC en Macrófagos .	86
13. Efecto del Tiempo de Preincubación con Clofazimina en la Respuesta Antimicobacteriana del Macrófago .	87
14. Efecto del IFN- γ en la Fagocitosis de MAC por Macrófagos	89
15. Incorporación de Clofazimina por Macrófagos Residentes y Preactivados con IFN- γ .	90
16. Efecto de la Preactivación del Macrófago con IFN- γ en el Crecimiento Intracelular de MAC	92
17. Efecto del Tiempo de Preincubación de Macrófagos con IFN- γ en el Crecimiento Intracelular de MAC	94
18. Efecto Postinfección del IFN- γ en la Respuesta de Macrófagos Preactivados con IFN- γ en contra de MAC	95
19. Efecto del NMA en la Respuesta del Macrófago Activado con IFN- γ en contra de MAC .	97

Figura	Página
20. Actividad Postinfección del IFN- γ en el Crecimiento de MAC en Macrófagos .	101
21. Efecto del NMA en la Respuesta Antibacteriana del Macrófago Estimulado con IFN- γ Postinfección	102
22. Efecto del IFN- γ en la Producción de TNF- α y en la Actividad Antibacteriana del Macrófago	104
23. Supresión de la Actividad Antibacteriana del Macrófago Estimulado con TNF- α Mediante el Uso de Anticuerpos contra TNF- α .	105
24. Supresión de la Actividad Antimicobacteriana del Macrófago Estimulado con IFN- γ Mediante el Uso de Anticuerpos contra TNF- α	107
25. Efecto de la Pentoxifilina en la Respuesta del Macrófago Preactivado con IFN- γ en contra de MAC	108

CAPITULO 1

INTRODUCCION

1.1 El Macrófago

La naturaleza ha provisto a los metazoarios con una célula capaz de mantener la integridad y la homeostasis del cuerpo: el macrófago. Los macrófagos fueron inicialmente descritos por Metchnikoff (1, 2) como células con la habilidad para ingerir partículas grandes, fenómeno al que le denominó "fagocitosis". Metchnikoff demostró que los macrófagos tenían una función protectora en contra de infecciones, opuesto a la creencia de que factores humorales en el suero (anticuerpos) estaban involucrados en la resistencia natural del huésped. Los macrófagos son capaces de reconocer y eliminar partículas que pueden ser dañinas al organismo como bacterias, hongos, levaduras, protozoarios, eritrocitos en degeneración, leucocitos muertos, cuerpos extraños, etc.

1.1.1 Origen

Los macrófagos pertenecen al sistema de fagocitos mononucleares (SFM) (3) el cual incluye células que tienen un origen común y que comparten características morfológicas, bioquímicas y funcionales. El SFM reemplazó al antiguo concepto denominado sistema reticuloendotelial (SRE) que fue descrito por Aschoff (4) y el cual incluía fibroblastos, células endoteliales, reticulares y dendríticas, además de los macrófagos. La distinción entre el SFM y el SRE ayuda a delinear el papel del fagocito mononuclear en la homeostasis y en los procesos patológicos (5). De acuerdo con el SFM, todos los macrófagos presentes en las cavidades serosas (por ejemplo, los macrófagos peritoneales) y tejidos derivan de los monocitos de la sangre que a su vez se originan de una célula precursora de la médula ósea (6-8) (Figura 1). Sin embargo, los macrófagos se pueden originar directamente en centros germinales de la cavidad peritoneal (9-12). Las células de Langerhans de la piel, las células interdigitales en los ganglios linfáticos, y las células dendríticas en los órganos linfoides, no pertenecen al SFM debido a que no existe evidencia de que dichas células deriven de monocitos o de sus precursores en la médula ósea y además, éstas células



- | | |
|----------------------|---------------------------------------|
| -Bazo | -hígado (células de Kupffer) |
| -gánglios linfáticos | -tejido conectivo y piel (histiocito) |
| -pulmones | -sistema nervioso central (microglia) |
| -médula ósea | -hueso (osteoclasto) |
| -timo | |
| -cavidad peritoneal | |

Figura 1. Sistema de Fagocitos Mononucleares.

(Adaptada de R. van Furth, Mononuclear Phagocytes, 1992)

difieren en muchos aspectos de los macrófagos (8).

1.1.2 Caracterización

Los fagocitos mononucleares poseen propiedades específicas o marcadores que los caracterizan (Tabla 1). El marcador más confiable es la presencia de esterasa inespecífica, casi todos los monocitos y macrófagos reaccionan positivamente cuando se incuban con α -naftil butirato o acetato (7, 13). Por otro lado, la presencia de lisozima se puede demostrar mediante un método inmunofluorescente o de peroxidasa inmune utilizando un anticuerpo anti-lisozima (específico de especie) (14, 15). La presencia de peroxidasa es un marcador que permite distinguir diferentes estadios de los fagocitos mononucleares; los gránulos de peroxidasa se pueden observar en monoblastos, promonocitos, monocitos, y macrófagos de exudados; los macrófagos residentes son negativos para dichas granulaciones (Tabla 2) (14). Las ectoenzimas, 5'-nucleotidasa, aminopeptidasa de leucina y fosfodiesterasa alcalina I, que se encuentran en la membrana plasmática de los fagocitos mononucleares, se detectan por su actividad enzimática en lisados celulares (16, 17). La actividad de la 5'-nucleotidasa es alta en macrófa-

TABLA 1

MARCADORES PARA LA IDENTIFICACION DE FAGOCITOS
MONONUCLEARES

Estructura	características morfológicas al microscopio de luz, de con- traste de fases y electrónico
Enzimas lisosomales y citoplásmicas	esterasa no específica, lisozima, peroxidasa
Ectoenzimas	nucleotidasa-5', aminopeptidasa de leucina, fosfodiesterasa alcalina I
Características de membrana	receptores para Fc y C, antígenos específicos
Función	fagocitosis inmune, pinocitosis
Proliferación celular	incorporación de timidina tritiada, contenido de ADN del núcleo, sobrevivencia o multiplicación en cultivo

(Adaptada de R. van Furth, *Mononuclear Phagocytes*, 1980)

TABLA 2

ACTIVIDAD DE PEROXIDASA EN FAGOCITOS MONONUCLEARES

	mono- blasto	promo- nocito	mono- cito	macrófago residente
Golgi		+	-	-
Gránulos	+	+	+	-
RER	+	+	-	+
EN	+	+	-	+

RER = retículo endoplásmico rugoso.

EN = envoltura nuclear.

(Adaptada de R. Sherwood, Macrophage Biology, 1985)

gos residentes y extremadamente baja en macrófagos activados (18). Otro tipo de marcadores lo constituyen los componentes del complemento (por ejemplo, C3), ya que estas proteínas son sintetizadas por los monocitos y los macrófagos. Su presencia citoplásmica se puede demostrar inmunológicamente con un antisuero específico (14). La presencia de receptores inmunológicos (para la fracción Fc de la IgG y para el C3) sobre la superficie celular, y características funcionales tales como endocitosis, son propiedades intrínsecas de los fagocitos mononucleares (19). Otras características importantes de los fagocitos mononucleares son su habilidad para ingerir bacterias opsonizadas o eritrocitos cubiertos con IgG (fagocitosis inmune) (20), y dividirse. La distinción entre células inmaduras que se dividen (como lo son los monoblastos y los promonocitos) de células que no se dividen (monocitos y macrófagos), se puede determinar en base a la incorporación de timidina tritiada, o mediante la determinación del contenido de ácido desoxirribonucleico (ADN) del núcleo (21).

1.1.3 Funciones

Los macrófagos tienen como función esencial impedir el establecimiento y la diseminación de enfermedades microbianas (22-24) y neoplásicas (25-27). Además, los macrófagos actúan como células accesorias en la inducción y expresión de las respuestas inmunes humoral y celular (28-30). Otras funciones atribuidas a los macrófagos incluyen la secreción de sustancias biológicamente activas (26, 31), y la participación en funciones homeostásicas no relacionadas con la defensa del huésped, tales como la remoción de eritrocitos en degeneración, y resorción y remodelaje de hueso (32, 33).

El desarrollo de macrófagos con actividad inespecífica microbiana y/o tumoricida, definidos como macrófagos "activados" (14, 34), en sitios de reacciones inmunes, requiere la presencia simultánea de señales de activación y fagocitos mononucleares competentes (14, 35). La activación de macrófagos es por etapas. Los macrófagos se sensibilizan o preactivan después de un estímulo inicial (por ejemplo, linfocinas), y finalmente se estimulan por una segunda señal (por ejemplo, endotoxina) para desarrollar una completa actividad funcional (36, 37) (Figura 2). La activación de la

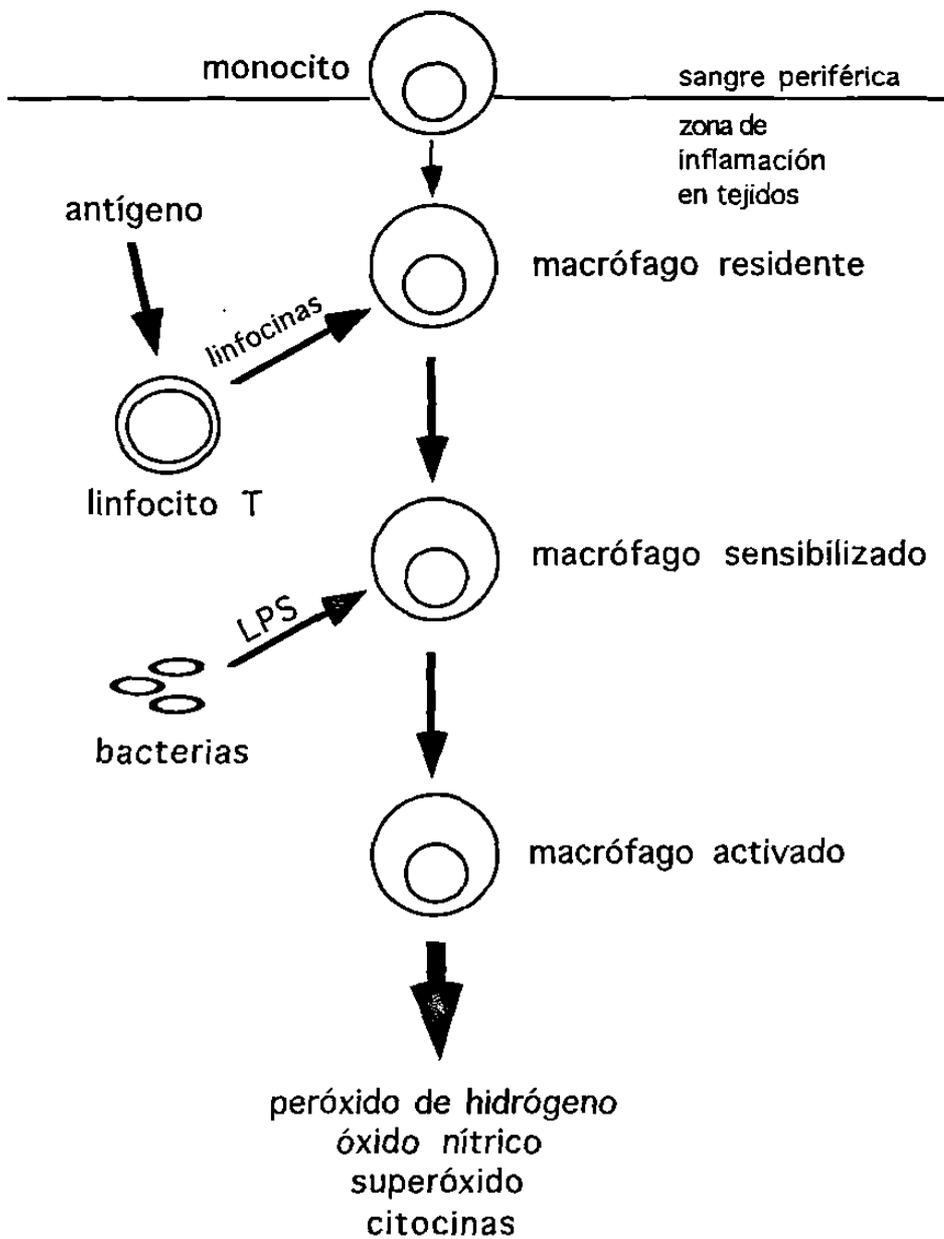


Figura 2. Activación de Macrófagos.

(Adaptada de M. S. Meltzer, J. Reticuloendothel. Soc. 26:403-415, 1979)

función antimicrobiana del macrófago es esencial para la sobrevivencia de las especies en contra de patógenos intracelulares que causan algunas de las enfermedades infecciosas de mayor prevalencia e importancia en el mundo (38).

1.1.4 Activación del Macrófago

1.1.4.1 Mediadores Intracelulares en la Respuesta Antibacteriana del Macrófago

Los principales factores antimicrobianos que son estimulados por citocinas, se clasifican como intermediarios reactivos del oxígeno (IRO) e intermediarios reactivos del nitrógeno (IRN) (39, 40) (Figura 3). Los IRO (anión superóxido, peróxido de hidrógeno, radical hidroxilo) se han asociado a la función antimicrobiana del macrófago en contra de patógenos tales como *Toxoplasma gondii*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania*, *Candida* y *Micobacterias* (39, 41-43). Los IRO causan peroxidación de cadenas insaturadas de ácidos grasos de las membranas dañando así sus funciones, y causando inactivación de proteínas, y otros efectos tóxicos (44). Por lo tanto, la inmunidad mediada por células en contra de parásitos intracelulares depende en

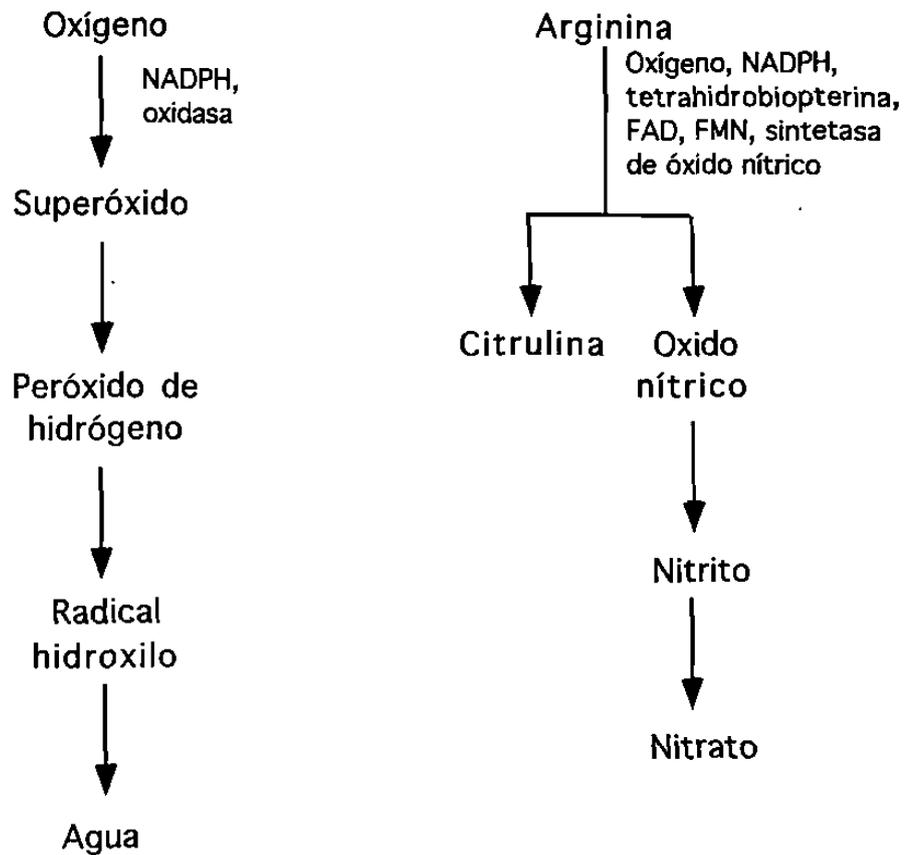


Figura 3. Vías para la Producción de Oxidantes Inorgánicos por Macrófagos Activados.

(Adaptada de R. van Furth, Mononuclear Phagocytes, 1992)

gran parte de la producción de IRO por macrófagos.

En 1985, Stuehr y Marletta fueron los primeros en demostrar la síntesis de IRN por macrófagos activados (40). El óxido nítrico es el IRN más estudiado al cual se le ha otorgado un papel relevante en la actividad antimicrobiana de macrófagos murinos en contra de infecciones causadas por *Cryptococcus*, *Schistosoma*, *Leishmania*, *Toxoplasma*, *Francisella*, *Listeria*, *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium leprae* (45-48). Además, se ha involucrado al óxido nítrico en la respuesta antibacteriana de macrófagos murinos en contra de *Mycobacterium avium-M. intracellulare* complex (MAC) (45), y en la actividad de macrófagos humanos en contra de *Mycobacterium avium* (49). Por el contrario, existe evidencia que sugiere que el óxido nítrico no participa en infecciones en contra de MAC (50), ya que al parecer MAC es resistente a la actividad del óxido nítrico (51). Se ha demostrado que el óxido nítrico puede matar o inhibir el crecimiento de otros patógenos tales como ciertos hongos (52), parásitos (53-61). Estudios recientes sugieren que el óxido nítrico bloquea la replicación viral (62-63) y además, posee actividad antitumoral (64).

El óxido nítrico inhibe la producción de trifosfato de adenosina

en tres diferentes etapas, (a) bloqueando la glicólisis mediante la transferencia de adenosin difosfato-ribosa (ADP-ribosa) a gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa, (b) rompiendo el ciclo de Krebs mediante su unión al grupo hemo de la *cis*-aconitasa, e (c) inhibiendo la fosforilación oxidativa mediante su asociación con el grupo hemo de la ubiquinona reductasa (65). El óxido nítrico puede también inhibir la síntesis de ADN al inactivar a la ribonucleótido reductasa (66, 67) y puede dañar al ADN directamente por deaminación (65, 68).

El óxido nítrico es un intermediario de la oxidación del nitrógeno guanidino de la L-arginina catalizada por la enzima sintetasa de óxido nítrico (Figura 3). Dicha enzima es una óxidoreductasa dependiente de fosfato de nicotinamina adenina dinucleótido reducido (NADPH) que requiere de los cofactores tetrahidrobiopterina, flavin adenin dinucleótido (FAD) y flavin mononucleótido (FMN) (69). Existen dos clases principales de sintetasas de óxido nítrico: la constitutiva y la inducible (70). Las enzimas constitutivas tienen un papel regulatorio: el óxido nítrico inducido por este tipo de enzimas, controla el tono vascular (71), regula la agregación plaquetaria, y actúa como un neurotransmisor

(72, 73). La activación de la enzima inducible ocurre comúnmente por la acción sinérgica del interferón- γ , - α , o - β y el lipopolisacárido, o del interferón- γ y el factor de necrosis tumoral- α sobre el macrófago (74-77) lo cual a su vez, activa la transcripción intracelular de factores nucleares tales como el factor nuclear- κ B que participa en la producción de la sintetasa de óxido nítrico (78, 79). La producción de óxido nítrico que involucra a la sintetasa de óxido nítrico, es un proceso específico de células eucarióticas (40).

1.2 Modificadores de la Respuesta Biológica

1.2.1 Interferón- γ (IFN- γ)

El IFN- γ pertenece a una familia de proteínas que son producidas por las células en respuesta a virus, ácido ribonucleico de doble cadena, antígenos y mitógenos (80-82) (Tabla 3). El IFN fue descubierto en 1957 por Alick Isaacs y Jean Lindenmann (83) quienes encontraron que células de embrión de pollo infectadas con virus de influenza liberaban una sustancia que les confería resistencia en contra de una amplia variedad de virus. Aunque los IFNs se reconocen por sus potentes propiedades antivirales, ellos también afectan el metabolismo y el crecimiento celular, la inmunidad y el crecimiento tumoral (84-98). En base a ciertos criterios, los IFNs se han dividido en tres clases distintas denominadas IFN- α , - β , y - γ (Tabla 3) (81, 82, 99, 100). La producción de IFNs (α , β , y γ) ocurre *de novo* después de activación celular. El IFN- α es producido por los linfocitos T, linfocitos B y macrófagos, mientras que el IFN- β es producido por fibroblastos, células epiteliales y macrófagos. Los IFN- α y β se designan como IFNs del Tipo I, y se producen principal-

TABLA 3

CARACTERISTICAS PRINCIPALES DE LOS INTERFERONES

Propiedad	IFN- α	IFN- β	IFN- γ
NOMENCLATURA	Tipo I	Tipo I	Tipo II
ORIGEN CELULAR	Linfocitos T, linfocitos B y macrófagos	Fibroblastos y células epiteliales	Linfocitos T y células NK
INDUCTORES	Virus	Virus, LPS	Antígenos Mitógenos
PROPIEDADES FISICAS			
Peso molecular (kDa)	20	20	17
Aminoácidos	165-166	166	143
Forma activa	Monómero	Monómero	Homodímero
Estabilidad al pH	Estable	Estable	Inestable
ESTRUCTURA GENICA			
Número de genes	26	26	1
Localización cromosom.			
Murino	4	4	10
Humano	9	9	12

(Adaptada de M. A. Farrar, Annu. Rev. Immunol. 11:571-611, 1993)

mente en respuesta a virus (81, 82).

En 1965, Wheelock fue el primero en demostrar la actividad del IFN- γ en cultivos de células mononucleares de sangre periférica humana estimuladas con fitohemaglutinina (mitógeno de células T) (101). Posteriormente, el IFN- γ , también denominado IFN del Tipo II o IFN Inmune, se identificó como un producto de linfocitos T (T_H0 , células cooperadoras T_H1 $CD4+$ y casi todas las células $CD8+$) y células asesinas naturales (NK) estimuladas por antígenos o mitógenos (82, 101-103). La interleucina-12 (un producto de células B y macrófagos) también es capaz de inducir la expresión del gene para IFN- γ en células T y NK (104) (Figura 4). El IFN- γ influye en la clase de anticuerpos producidos por células B, regula la expresión de antígenos de clase I y II del complejo principal de histocompatibilidad (MHC), e incrementa la actividad antimicrobiana del macrófago en contra de parásitos intracelulares (105, 106). Las principales actividades biológicas de los IFNs se muestran en la Tabla 4.

El IFN- γ es codificado por un gene con tres intrones que se localiza en el cromosoma 12. El producto del gene carece de puentes

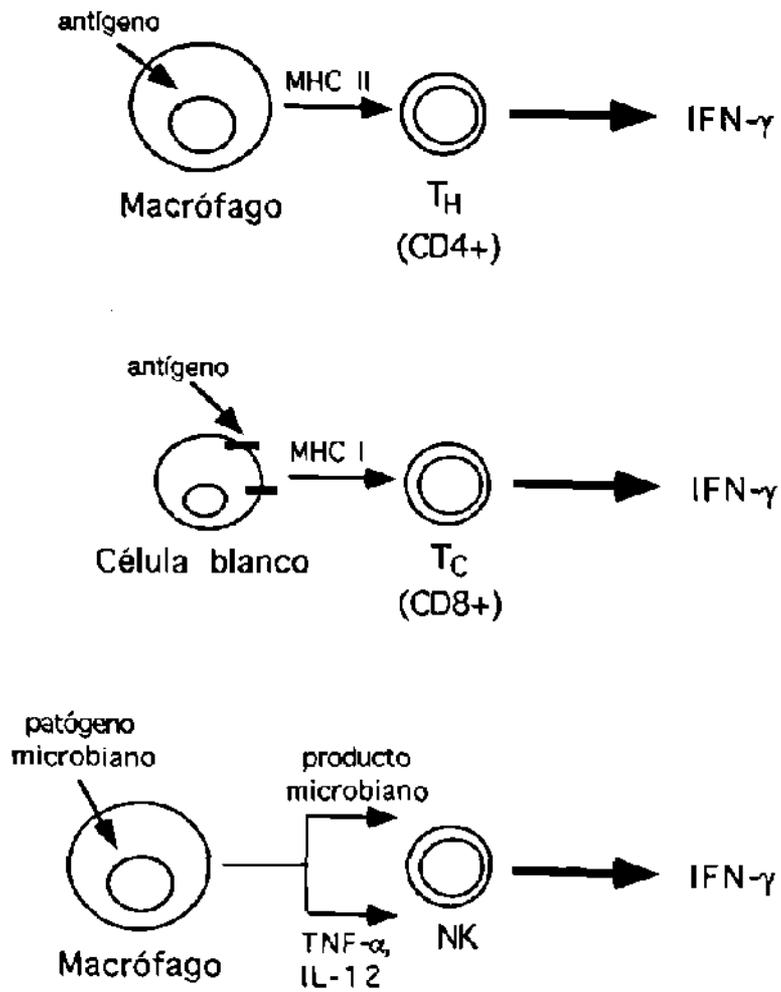


Figura 4. Origen Celular del IFN- γ .

(Adaptada de M. A. Farrar et al., Annu. Rev. Immunol. 11:571-611, 1993)

TABLA 4

ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS INTERFERONES

<i>Propiedades biológicas</i>	<i>Tipo de interferón</i>
Actividad antiviral	α, β, γ
Actividad antimicrobiana	γ
Inducción de diferenciación	α, β, γ
Interacción con citocinas	α, β, γ
Inducción del receptor para IL-2	γ
Inhibición de angiogénesis	α, β, γ
Activación de monocitos/macrófagos	γ
Incremento en la expresión de antígenos de histocompatibilidad de clase I	α, β
Incremento en la expresión de antígenos de histocompatibilidad de clase II	γ
Incremento en la actividad de células NK	α, β, γ
Incremento en la actividad de linfocitos Tc	α, β, γ

(Adaptada de Z. Estrov, Interferons, 1993)

disulfuro y es ácido lábil. La transcripción del IFN- γ se inicia directamente como consecuencia de activación antigénica, y su producción se puede también promover por las interleucinas 2 y 12. EL IFN- γ no tiene afinidad por el receptor del Tipo I y únicamente se asocia con receptores de Tipo II (99, 107). El receptor de Tipo II es una glicoproteína de 90 kDa. El IFN- γ es altamente específico de especie cuyo receptor se expresa en todas las células, a excepción de los eritrocitos (108-110). La unión de IFN- γ a su receptor (la forma biológica del IFN- γ es un homodímero) (111, 112), aparentemente induce dimerización del receptor y activación de las tirosina cinasas JAK1 y JAK2. El receptor de IFN- γ y una proteína adicional llamada STAT91 se fosforilan posteriormente. La proteína STAT91 fosforilada se dimeriza y posiblemente en combinación con otra proteína entran al núcleo donde el complejo se une a distintos sitios en los promotores de los genes de respuesta al IFN- γ , por ejemplo, el *sitio de activación del interferón gamma* y el *elemento de respuesta estimulado por interferón* (113-117). Esta unión induce la expresión de al menos 20 proteínas distintas, 12 de las cuales son únicas de la estimulación por IFN- γ (118).

El IFN- γ tiene la habilidad de estimular la actividad citocida inespecífica del macrófago hacia una variedad de parásitos intracelulares y extracelulares, y células neoplásicas (119-121). Tal actividad es mediada principalmente por IRO, IRN, y por el factor de necrosis tumoral- α (122). Existe una amplia variedad de patógenos susceptibles a macrófagos activados con IFN- γ *in vitro* e *in vivo* la cual incluye protozoarios (*Toxoplasma gondii*, *Leishmania*, *Trypanosoma cruzi*, *Entamoeba histolytica* y *Plasmodium falciparum*); helmintos (*Schistosoma mansoni*); bacterias (*Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Haemophilus influenzae*, *Diplococcus pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, *Mycobacterium tuberculosis* y el complejo *Mycobacterium avium-M. intracellulare*); hongos (*Histoplasma capsulatum*, *Candida albicans*, *Blastomyces dermatitidis* y *Cryptococcus neoformans*); clamidias (*C. psittaci* y *C. trachomatis*) y rickettsias (*R. prowasekii*, *R. coronii* y *R. tsutsugamushi*) (96, 123, 124). Otro papel importante que juega el IFN- γ en la defensa del huésped, es la interacción entre el IFN- γ y otras citocinas en respuestas biológicas, y la interacción del IFN- γ con células que resulta en la producción de otras citocinas. Muchas

de las citocinas que son importantes en la defensa del huésped, en contra de diferentes infecciones bacterianas, son inducidas por IFN- γ , o sus actividades biológicas son reguladas por IFN- γ . Por ejemplo, se conoce que el IFN- γ modula la producción del factor de necrosis tumoral- α y de la interleucina-1 (IL-1) por macrófagos (125, 126), y a su vez, la IL-1 promueve la producción de interleucina-2 (IL-2) por células T cooperadoras e induce la expresión del receptor para IL-2 (antígeno Tac) sobre la superficie de células T cooperadoras y supresoras (127, 129). La IL-2 regula la síntesis de IFN- γ en células estimuladas con antígenos o mitógenos, sin embargo la producción inicial de IFN- γ parece ser independiente de IL-2 (130-132).

1.2.2 Factor de Necrosis Tumoral- α (TNF- α)

William Coley fue el primero en estudiar el fenómeno de necrosis tumoral en el contexto de una enfermedad infecciosa. El fue capaz de inducir la involución de ciertos tumores en pacientes con enfermedades neoplásicas inoperables, mediante la administración de un preparación filtrada de un medio condicionado por el crecimiento de bacterias gram-positivas y gram-negativas (133). En

forma independiente, otros investigadores estudiaron y aislaron un polisacárido bacteriano de *Serratia marcescens*, ahora conocido como lipopolisacárido (LPS), el cual tenía la habilidad de inducir necrosis hemorrágica de tumores transplantables en ratones (134). Sin embargo, el LPS demostró tener un índice terapéutico similar al de la preparación original de Coley. Por otro lado, Carswell *et al.* fueron capaces de transferir actividad necrosante de tumores de un animal a otro al demostrar que un factor producido en ratones pretratados con el bacilo de Calmette-Guérin (BCG), y subsecuentemente retados con LPS, era capaz de causar necrosis hemorrágica del sarcoma meth A, desarrollado en la piel de un animal receptor (135). Desde entonces, este factor se conoció como "factor de necrosis tumoral" o TNF.

El TNF- α es una de las citocinas más pleiotrópicas y pluripotentes conocidas, y comparte varias propiedades con otras citocinas (136). Se pueden distinguir dos clases de TNF: el TNF- α y el TNF- β . El TNF- α es producido principalmente por macrófagos activados, sin embargo, las células NK, ciertas células linfoblastoides-B, los linfocitos T, las células cebadas, los astrocitos, las células de Kupffer, las células de granulosa y las

células de músculo liso también tienen la capacidad de producirlo (Tabla 5). El TNF- β o linfoxina, es producido por linfocitos activados. La producción de TNF- α puede ser controlada por una variedad de agentes que incluyen a las bacterias gram-negativas, virus, protozoarios, mitógenos, algunas citocinas, células tumorales y ésteres de forbol (136).

El TNF- α se aisló y purificó por primera vez a partir del medio condicionado de una línea celular promielocítica humana (HL-60) tratada con ésteres de forbol (137). El TNF- α humano tiene un peso molecular de 17 kDa determinado mediante geles de poliacrilamida conteniendo dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE), y de 45 kDa determinado mediante filtración en gel. El TNF- α existe como una proteína no glicosilada con un punto isoeléctrico de aproximadamente 5.3. El monómero contiene 157 aminoácidos y posee un puente disulfuro intramolecular a partir de dos cisteínas. La molécula con actividad biológica es un trímero compacto (138) cuya oligomerización es el resultado de interacciones no covalentes (139). Análisis recientes de la estructura terciaria del TNF- α humano mediante cristalografía de rayos X, han confirmado que es

TABLA 5

ORIGENES CELULARES, AGENTES INDUCTORES Y SUPRESORES DE LA PRODUCCION DE TNF- α

<i>Origen celular</i>	<i>Agentes supresores</i>
Monocitos/Macrófagos	Ciclosporina A
Linfocitos	Dexametasona
Neutrófilos	Prostaglandina E2
Eosinófilos	Nucleótidos cíclicos
Células NK	Antagonistas del receptor del factor activador plaquetario
Células endoteliales	Inhibidores de lipooxigenasa
Células cebadas	Factor de crecimiento transformante β
Células gliales	Interleucina-4
Células de Langerhans	Interleucina-6
Astroцитos	Interleucina-10
Células de Kupffer	
Células de músculo liso	

Agentes inductores

Endotoxina (LPS)	Complejos antígeno-anticuerpo
Poli I:C	Interleucina-1
Mitógenos	Interleucina-2
Virus: VIH, influenza	Interferones
Hongos	Esteres de forbol
Parásitos	Ionóforos
Micobacterias	Indometacina
Células tumorales	Sílica
Factor estimulante de colonias de macrófagos-granulocitos	

(Adaptada de B. B. Aggarwal, Tumor Necrosis Factors, 1992 y K. J. Tracey, Tumor Necrosis Factor, 1994)

una molécula trimérica, no helicoidal, formada por hojas β antiparalelas (140). Por otra parte, se ha demostrado que una forma transmembranal de TNF- α de 26 kDa, posee actividad citotóxica durante interacciones celulares (141, 142). Esta puede también actuar como "receptor" para la forma soluble del receptor para TNF- α , cuya interacción induce activación celular similar a la inducida directamente por citocinas (143). En el hombre, el gene que codifica para TNF- α se localiza en el cromosoma 6, próximo a los genes para el MHC y los genes para linfotoxina (144). El TNF- α despliega su actividad mediante su unión a un receptor de superficie celular de alta afinidad (145). Se han identificado dos receptores diferentes para el TNF- α , con pesos moleculares de 55-60 kDa y de 75-85 kDa, que se conocen también como p60 (TNF-R-I o TNF-R- α) y p80 (TNF-R-II o TNF-R- β), respectivamente (146, 147). Ni el TNF- α , ni sus receptores poseen actividad intrínseca de proteína cinasa. Una vez que se une a su receptor específico, el TNF- α se internaliza en vesículas cubiertas con clatrina, se mueve a los endosomas y a los cuerpos multilamelares, y finalmente termina en los lisosomas en donde se degrada (148). Hasta hoy, no se ha demostrado la presencia

de un mensajero secundario en particular o universal para la señal de transducción del TNF- α , sin embargo existe fuerte evidencia de la activación de varios sistemas de mensajes (145), entre los cuales se hallan las proteínas G (149), el monofosfato de adenosina cíclico (AMPc), la proteína cinasa A (150), la proteína cinasa C (151), y la fosfolipasa A_2 (152). *Aparentemente, la inducción de TNF- α no induce la elevación intracelular de calcio o fosfatos de inositol (153).* El TNF- α puede activar o inactivar una variedad de genes; entre los genes activados están genes para citocinas y factores de crecimiento, receptores, moléculas de adhesión celular, mediadores de inflamación, proteínas de fase aguda, proteínas del MHC, proteínas retrovirales, factores de transcripción (tales como los factores NF- κ B, AP-1, IRF-1 y NF-GM α), factores de traducción, y otras proteínas (145).

El TNF- α participa en la respuesta inmune en contra de neoplasias y enfermedades infecciosas, en remodelaje y reparación tisular, y en angiogénesis (154). Es capaz de causar hemorragia y necrosis de tumores sólidos (135, 155, 156), y puede causar caquexia, que es un estado patológico que se observa durante

infecciones por bacterias gram negativas, o que puede ser inducido por inyección parenteral de endotoxina (157, 158).

En su papel como agente antimicrobiano, el TNF- α promueve la resistencia inespecífica de ratones en contra de bacterias, parásitos y hongos (154, 159, 160), particularmente, en contra de la infección causada por MAC (49, 161). MAC es un patógeno que causa infecciones crónicas, particularmente en individuos inmunosuprimidos (162). MAC es fácilmente fagocitado por los macrófagos en donde los bacilos sobreviven y replican. La sobrevivencia en los macrófagos parece depender de la virulencia de las bacterias; organismos avirulentos son eliminados más eficientemente por los macrófagos que bacilos virulentos. La resistencia de los macrófagos en contra de organismos avirulentos depende, aparentemente, de la producción de elevadas cantidades de TNF- α ; por el contrario, organismos virulentos inducen la producción de niveles reducidos de TNF- α por los macrófagos (163-165). Sin embargo, se ha observado que la producción de TNF- α se puede incrementar significativamente mediante la activación de macrófagos con IFN- γ (125, 126, 161, 166).

1.3 Complejo *Mycobacterium avium-*

M. intracellulare (MAC)

1.3.1 Características y Epidemiología

MAC pertenece a un grupo de patógenos conocidos como “micobacterias atípicas” que causan enfermedades crónicas en humanos. El término “micobacterias atípicas” se acuñó durante las décadas de los 1940s y 1950s para designar a aquellos organismos diferentes a *M. tuberculosis* y *M. leprae* (167). Las micobacterias tienen algunas características en común: son ácido resistentes (cuando se tiñen con colorantes de anilina, no se decoloran fácilmente, ni con una mezcla de etanol y ácido acético), son aeróbicos, no forman esporas y no son móviles. Estas bacterias miden de 0.2 a 0.6 μm de ancho por 1.0 a 10 μm de largo. Sus paredes celulares tienen un alto contenido lipídico (168).

MAC fue originalmente descrito en los 1800s como un organismo causante de enfermedad en pollos. La bacteria se puede aislar del agua, suelo, y de una variedad de animales que incluyen al cerdo, perro, gato e insectos (169-172). MAC representa a dos organismos estrechamente relacionados, *M. avium* y *M*

intracellulare, los cuales se pueden diferenciar mediante pruebas serológicas. Dichos organismos se pueden también diferenciar mediante el uso de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), cromatografía de gases, o sondas de ADN. La terapia es esencialmente la misma para ambas especies; por lo tanto, la serotipificación se usa con fines epidemiológicos. Sin embargo, se ha sugerido que las serovariedades 1, 4 y 8 de *M. avium* (no *M. intracellulare*) se encuentran comúnmente en pacientes con el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) que están infectados con MAC (169).

1.3.2 Patogenicidad

MAC se considera un organismo de baja patogenicidad que en forma ocasional causa enfermedad en humanos saludables. MAC puede causar infecciones en pacientes que no tienen SIDA, pero que han padecido de enfermedades pulmonares. La vía más frecuente de infección por MAC en estos pacientes es por aire (aerosoles) (173-175). Sin embargo, durante las últimas dos décadas, el número de pacientes infectados con MAC se ha incrementado notablemente

debido a la aparición del SIDA (176). MAC es un patógeno intracelular que reside y replica en los macrófagos (Figura 5). Estas células juegan un papel central en la inmunidad del huésped en contra de infecciones por MAC y otros parásitos intracelulares (174, 177, 178). En los pacientes con SIDA, la principal vía de entrada de MAC al organismo es el intestino. MAC se puede multiplicar en la mucosa intestinal (179), por lo tanto, la presencia de micobacterias en los intestinos, constituye una foco permanente de infección y diseminación de la enfermedad (180).

La patogénesis de la enfermedad por MAC no se comprende con claridad. Si embargo, la carencia de drogas efectivas (181) es relevante en la enfermedad causada por MAC; MAC se caracteriza por su resistencia a drogas empleadas para tratar a la tuberculosis, por ello, MAC es un organismo de alta patogenicidad. La severa inmunosupresión que presentan los pacientes con SIDA, como consecuencia de la reducción en los niveles de células CD4+ a menos de 50 células/mm³, facilita la progresión de la infección por MAC (167, 182). Además, otros factores tales como citocinas (183-185) y etanol (186), se han asociado a la patogenicidad de este organismo. La infección por MAC se caracteriza por diseminarse en macrófagos

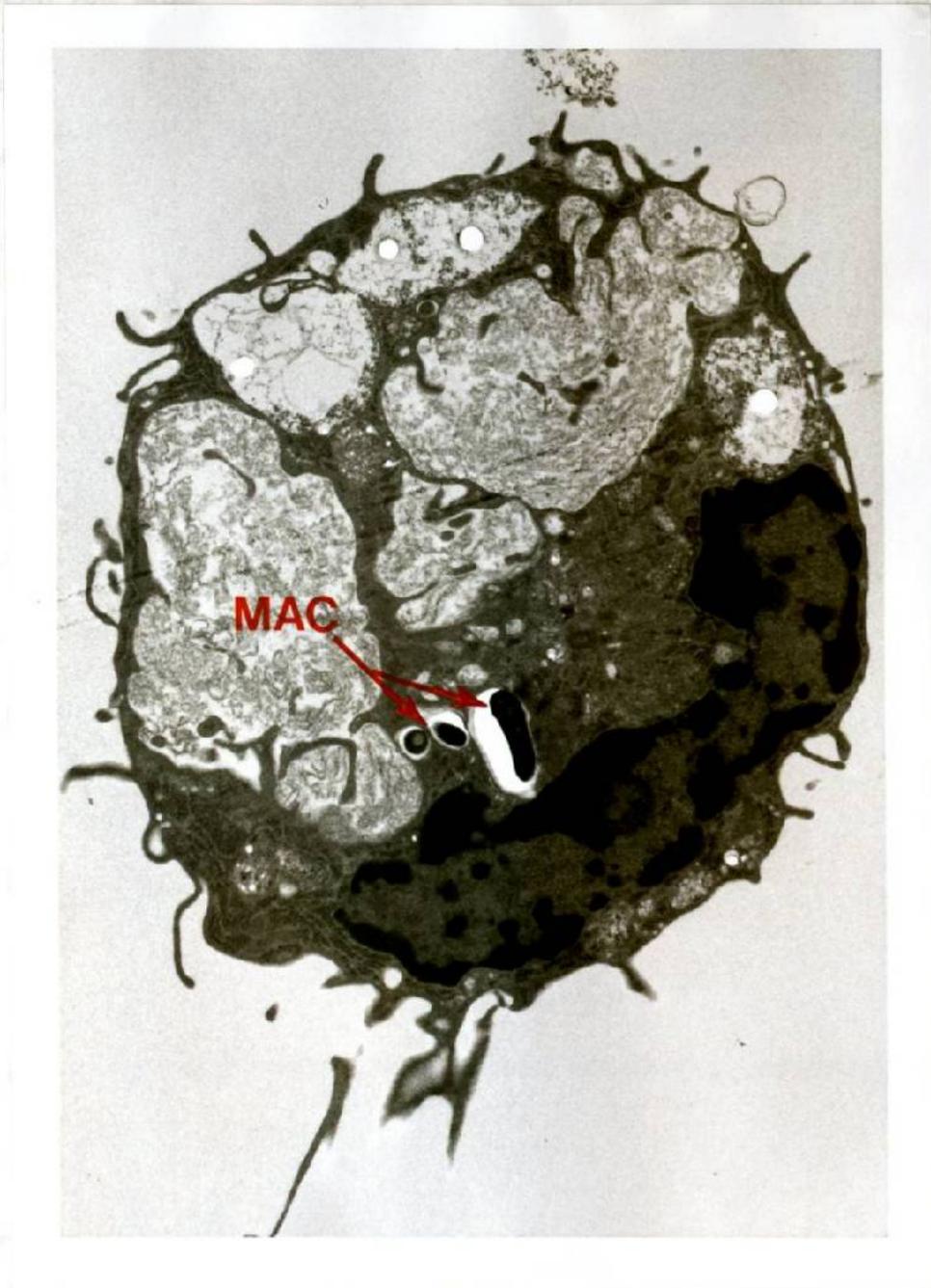


Figura 5. Micrografía Electrónica (8000 X) de un Macrófago Peritoneal Infechado con MAC.

a través del cuerpo, en particular a órganos del sistema de fagocitos mononucleares que incluyen al hígado, bazo, pulmones, gánglios linfáticos y médula ósea. La enfermedad ocasionada por MAC se asocia con un alto grado de bacteremia y destrucción de los tejidos infectados (187). Esta enfermedad se diagnostica *antemortem* en casi 30% de los pacientes con SIDA, y se detecta *postmortem* en más del 60% de dichos pacientes. Se ha observado que los pacientes con SIDA que están infectados con MAC, sobreviven menos tiempo que los pacientes que no se hallan infectados por ésta micobacteria (169, 172).

1.3.3 Respuesta Inmune del Huésped en contra de MAC

El indicador principal que determina el riesgo a contraer infección por MAC lo constituye el número de linfocitos T cooperadores (CD4+) de sangre periférica; los valores promedio en pacientes con infección diseminada por MAC varía de 10 a 50 células CD4+/milímetro cúbico (162). La respuesta del huésped en contra de micobacterias depende de la producción de IFN- γ por parte de los linfocitos T activados (166, 188-190). Los linfocitos T de pacientes

con SIDA secretan cantidades reducidas de IFN- γ (189, 190), cuya producción se puede estimular con citocinas (130-132, 194). Se han reportado estudios sobre el efecto del IFN- γ sobre los macrófago en contra de la infección por MAC, los cuales muestran resultados controversiales: se ha documentado que el IFN- γ inhibe el crecimiento micobacteriano (166, 188, 191-194), sin embargo, también se ha observado ausencia de efecto o promoción del crecimiento bacteriano por esta citocina (161, 195, 196). Esta respuesta heterogénea del macrófago en contra de MAC podría ser el resultado de la ocurrencia de diferentes eventos en macrófagos activados con IFN- γ , antes o después de la infección. Se considera, sin embargo, que la producción de TNF- α por macrófagos mediada por IFN- γ , es un factor determinante en la resistencia del huésped en contra de MAC (49, 161). Además del TNF- α , se ha reportado que el factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF) tiene actividad anti-MAC *in vitro* e *in vivo* (49, 161, 197, 198). Por otro lado, citocinas tales como el factor de crecimiento transformante- β (TGF- β) y la IL-10, pueden contrarrestar los efectos de citocinas inmunoactivadoras, facilitando así la sobrevivencia

intracelular de MAC (183, 184, 199). El TGF- β suprime la capacidad del macrófago para producir TNF- α y GM-CSF, y para responder a IFN- γ , TNF- α y GM-CSF (200). Por otro lado, se ha demostrado que la producción de IL-6 por macrófagos infectados suprime su actividad antibacteriana y promueve el crecimiento intracelular y extracelular de MAC (201).

1.3.4 Modelos de Infección por MAC en Macrófagos

MAC infecta y se replica en los macrófagos. El uso de macrófagos para medir la actividad de drogas en contra de organismos intracelulares, tiene sus orígenes en los estudios clásicos de Mackaness (202). Varios sistemas de macrófagos se utilizan actualmente para estudiar aspectos diversos de las interacciones huésped-parásito de la enfermedad ocasionada por MAC. Para la mayoría de los estudios inmunológicos y quimioterapéuticos, se han utilizado macrófagos peritoneales y de médula ósea de ratón, ya que se pueden obtener en gran número. Por el contrario, los estudios con macrófagos humanos han sido limitados debido al requerimiento de gran cantidad de células (203).

Una alternativa eficaz la constituye el uso de líneas celulares de crecimiento continuo, tales como la línea celular de macrófagos murinos J-774, o la línea de células monocitoides humanas U-937 (203, 204). El modelo de macrófagos puede sustituir a modelos animales cuando se trata de predecir alguna actividad antibacteriana intracelular de agentes quimioterapéuticos (203). Es decir, si un compuesto no tiene actividad en algún modelo de macrófagos, a pesar de tener actividad *in vitro* (sin involucrar macrófagos), es muy improbable que dicho compuesto tenga actividad *in vivo* o tenga uso *clínico*.

1.3.5 Modelos Animales de Infección por MAC

Los estudios sobre infecciones experimentales con MAC han estado limitados hasta hoy debido a la carencia de un modelo animal apropiado (205). Aunque se ha sugerido que el conejo es susceptible a la infección por MAC (206), éste no ha resultado un modelo útil (207). Collins fue el primero en demostrar que el ratón puede ser infectado con MAC (208). Sin embargo, en este modelo, la progresión de la enfermedad es muy lenta, tomando hasta meses para

manifestarse. Ya que este modelo no es adecuado para estudios quimioterapéuticos, fue necesario establecer un modelo animal de infección aguda. El modelo de ratón beige (C57BL/6/bgi/bgi) resultó ser el más apropiado para estudiar la enfermedad causada por MAC, ya que estos ratones no solamente están inmunosuprimidos en forma natural, siendo altamente susceptibles a la infección, sino que también son fáciles de manipular (209). El ratón beige es el modelo clásico para la enfermedad inmunológica humana denominada "síndrome de Chediak-Higashi", la cual se caracteriza por que los monocitos, neutrófilos y células NK de los pacientes presentan deficiencias funcionales (196). Sin embargo, este modelo no debe ser visto como un modelo para el SIDA o de enfermedad pulmonar.

Una forma alterna de estudiar la infección por MAC en animales, es la de utilizar huéspedes que han sido inmunuprimidos artificialmente (210). Entre las estrategias para reducir los mecanismos naturales de defensa en animales, se hallan la administración de agentes inmunosupresores tales como la ciclofosfamida (211) y la cortisona (212), o la combinación de éstas drogas (213); el azul tripano (214); la sílica sola (215) o en combinación con cortisona (216); el sulfato de dextrano (217); la

carragenina (218); las paredes celulares de algunos microorganismos (219); y las dietas prooxidantes (220). El efecto primordial de la mayoría de tales agentes es el de disminuir el número y función antimicrobiana de los macrófagos haciendo al huésped más susceptible a infecciones (213, 221, 222).

Otra alternativa de modelo animal para estudiar el efecto de drogas en contra de la infección por MAC, lo constituye el ratón timentomizado deficiente en células CD4+, también llamado ratón desnudo (223). A diferencia del ratón desnudo, el ratón beige se puede mantener y crecer fácilmente, sin requerir de un medio ambiente especial, y sin riesgo de infecciones cruzadas. Además del amplio uso que se le ha dado a los ratones beige para estudiar el efecto de drogas para el tratamiento de infecciones por MAC, estos ratones se han utilizado para investigar las interacciones huésped-parásito asociadas a infecciones por MAC (224). La vía intravenosa es la más efectiva para infectar ratones beige con MAC. Esto resulta en un alto grado de infección en bazo, hígado, pulmones, ganglios linfáticos y otros tejidos, y en una aparición temprana de cultivos positivos en sangre. Este aspecto es muy importante, ya que la bacteremia debida a la infección por MAC es una característica

esencial en pacientes con SIDA. Los ratones beige también pueden ser infectados por vía rectal y oral, lo que resulta en una elevada infección en bazo y pulmones, así como bacteremia, y además se observan cambios histopatológicos significativos en la mucosa intestinal (203, 225, 226).

1.4 Clofazimina

La clofazimina [3-(*p*-cloroanilina)-10-(*p*-clorofenil)-2, 10-dihidro-2-(isopropilimino)fenazina] es una iminofenazina sustituida que tiene un peso molecular de 473.4 (Figura 6) (227). Se diseñó originalmente para el tratamiento de la tuberculosis (228). Esta droga posee actividad antimicrobiana e antiinflamatoria, y ha sido utilizada para el tratamiento de la lepra (229, 230), lupus eritematoso discoide (231), y pioderma gangrenoso (232, 233). Con la aparición del SIDA, la clofazimina ha sido componente esencial en el tratamiento con múltiples drogas de la infección diseminada ocasionada por MAC (234-237). La clofazimina es altamente lipofílica y tiene la tendencia a depositarse en tejido graso y células del SFM, particularmente en hígado, bazo, pulmones, gánglios

linfáticos y médula ósea (238). Es frecuente encontrar depósitos de cristales de clofazimina en el intestino, hígado, y macrófagos de los ganglios linfáticos. Esta droga se metaboliza muy poco; menos del 1% de la droga se puede recuperar como productos metabólicos en la orina en un período de 24 h (239, 240). Se han identificado tres productos metabólicos urinarios en humanos (Figura 6), pero se desconoce si estos tienen alguna actividad farmacológica. Además, se puede recuperar en las heces hasta un 50% de una dosis administrada de la droga (241). NO se ha establecido el período medio de eliminación de la clofazimina. Aparentemente hay un fase inicial de eliminación de la droga de entre 7 a 10 días (239). Esto es seguido de un período mayor de eliminación, como probable resultado de liberación de la droga de tejido graso y del SFM, de aproximadamente 70 días.

1.4.1 Mecanismo de Acción

La clofazimina inhibe el crecimiento de MAC tanto *in vitro* como *in vivo* (242-248). Sin embargo, se desconoce hasta ahora el mecanismo exacto de acción de la clofazimina. Aparentemente la

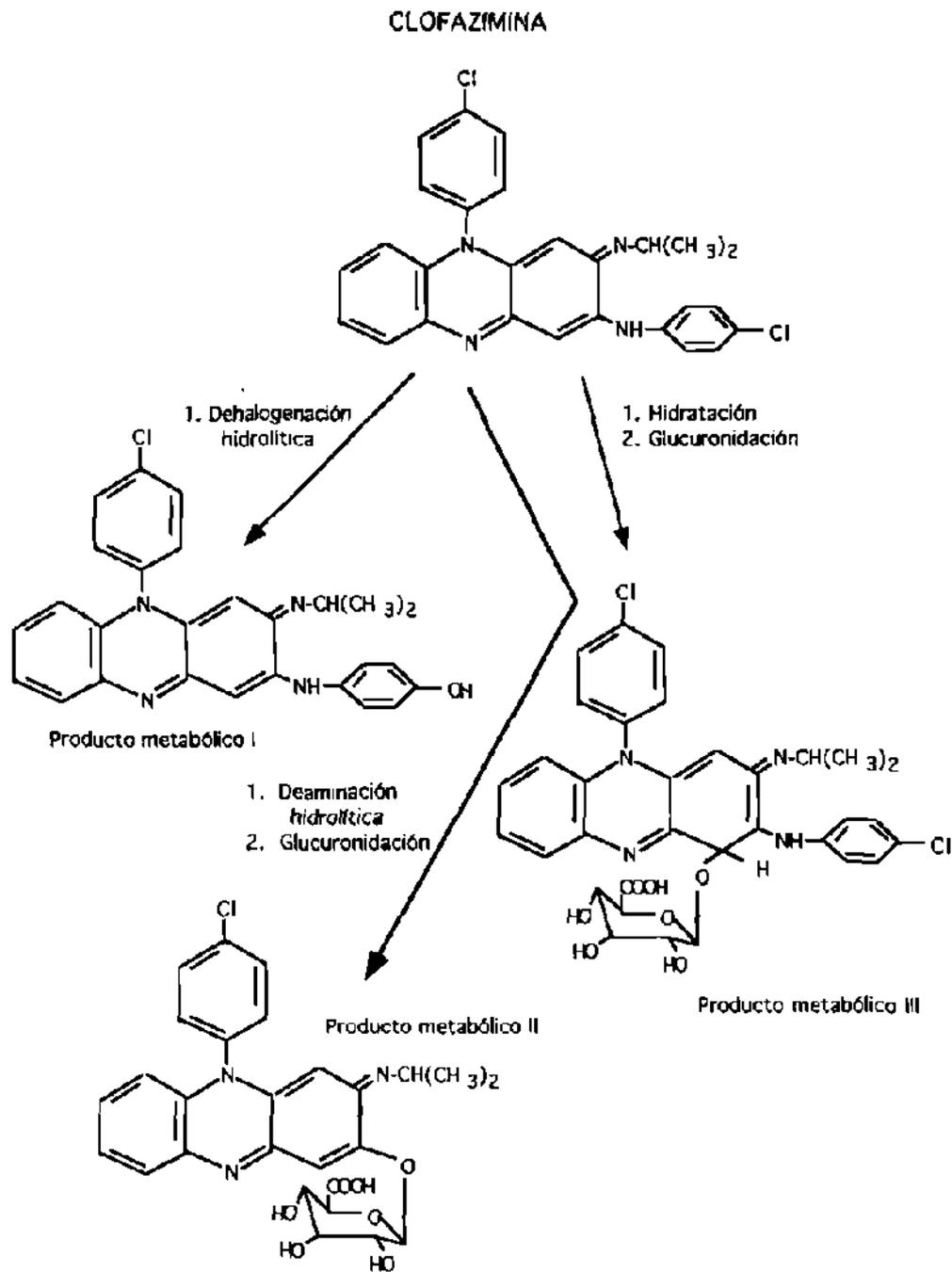


Figura 6. Vías Metabólicas de la Clofazimina en Humanos.

(Adaptada de M. R. Holdiness, Clin. Pharmacokinet. 16:74-85, 1989)

antiproliferativos *in vitro* e *in vivo* en contra de tumores (259-262).

1.4.2 Efectos Colaterales

La clofazimina es bien tolerada por los pacientes a dosis ≤ 100 mg/día. A dosis más altas, especialmente ≥ 300 mg/día, la clofazimina puede causar reacciones adversas que afectan a la piel, tracto gastrointestinal, y al ojo. El síntoma más común es la pigmentación de la piel a un color anaranjado-rosado (227). La ictiosis es el segundo efecto colateral cutáneo más común (263). La clofazimina se puede excretar en varios flúidos corporales, tales como las lágrimas, leche y esputo (264). Esta droga puede teñir la córnea y la conjuntiva, sin afectar la visión (265, 266). Sin embargo, la pigmentación ocular o en la piel desaparece a los pocos meses de discontinuar la terapia (227). El efecto secundario más serio ocasionado por la clofazimina lo constituye el depósito de cristales en la mucosa del intestino delgado, lo cual puede causar severa enteropatía (267).

El uso de la clofazimina tiene limitaciones debido a su baja

asimilación y a las reacciones secundarias que ésta causa (227). Se ha observado que el uso de liposomas para encapsular drogas, reduce significativamente los efectos tóxicos de agentes antimicrobianos y antitumorales (268, 269), y mejora la incorporación de las drogas por los macrófagos (269-271). Nuestro laboratorio ha demostrado que la actividad antimicrobiana de la clofazimina se puede mantener después de su encapsulación en liposomas (247).

1.5 Liposomas

Los liposomas fueron descritos originalmente por Bangham en 1964 quién los llamó "minúsculas burbujas de grasa", después de examinar la dispersión de vesículas de fosfolípidos en agua (272); sin embargo, el nombre de liposomas fue acuñado por Gerald Weissmann. Los liposomas son vesículas preparadas en forma artificial, que consisten de bicapas fosfolipídicas concéntricas que alternan con compartimientos acuosos. Los fosfolípidos que forman los liposomas son biodegradables y reciclables. Cuando los fosfolípidos se dispersan en agua, estos se arreglan espontáneamente en bicapas, de tal modo que los grupos de ácidos

grasos hidrofóbicos se protegen del agua por cabezas hidrofílicas. Las drogas que son solubles en agua ó lípidos se incorporan en la fase acuosa o lipídica respectivamente, durante la formación de los liposomas (Figura 7). Las bicapas fosfolipídicas que forman los liposomas en principio son idénticas a las membranas biológicas de las células. Algunas estructuras representativas de fosfolípidos se muestran en la Tabla 6. El fosfolípido más común es la fosfatidilcolina o lecitina, que es una molécula anfipática en las cuales un puente de glicerol enlaza un par de cadenas de ácidos grasos hidrofóbicos, con una cabeza polar hidrofílica de fosfocolina. Siendo el principal componente de muchas membranas celulares, la fosfatidilcolina se usa como fosfolípido esencial en la preparación de liposomas (273).

Los fosfolípidos poseen una temperatura de transición la cual se puede detectar mediante calorimetría (274). A la temperatura de transición, los fosfolípidos cambian de una fase "sólida" o "de gel", a una fase "de cristal-líquido" (Figura 8). Las membranas adquieren mayor fluidez, permeabilidad y estabilidad cuando los fosfolípidos se hallan a la temperatura de transición. Esta es una función del tamaño de las cadenas de ácidos grasos; el fosfolípido en su estado

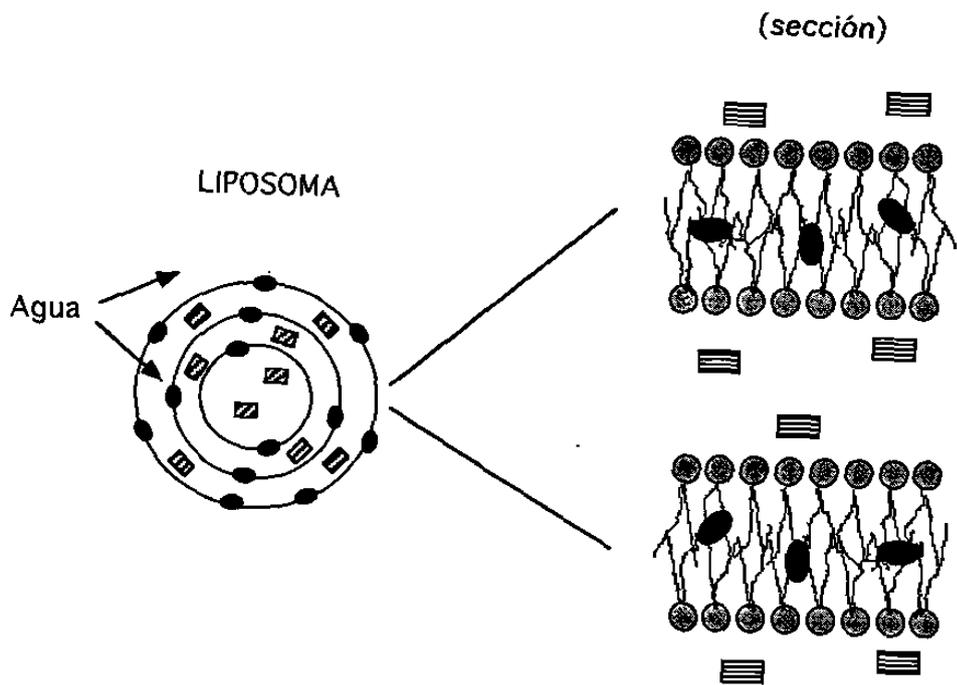


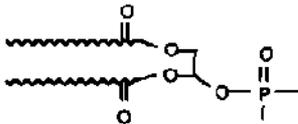
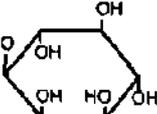
Figura 7. Estructura de un Liposoma.

- Agente liposoluble
- ▢ Agente hidrosoluble
- ⦿ Fosfolípido

(Adaptada de A. D. Bangham, Hosp. Pract. 27:51-62, 1992)

TABLA 6

CLASES PRINCIPALES DE FOSFOLIPIDOS

Fracción fosfatidil	Grupo polar	Nombre común
	$\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$	fosfatidil- -colina (PC)
	$\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_3^+$	-etanolamina (PE)
	$\text{O}-\text{CH} \begin{cases} \text{NH}_3^+ \\ \text{COO}^- \end{cases}$	-serina (PS)
	$\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2 \begin{cases} \text{OH} \\ \text{OH} \end{cases}$	-glicerol (PG)
	$\text{O}-\text{H}$	ácido fosfatídico (PA)
		-inositol (PI)

(Adaptada de R. R. C. New, Liposomes, 1992)

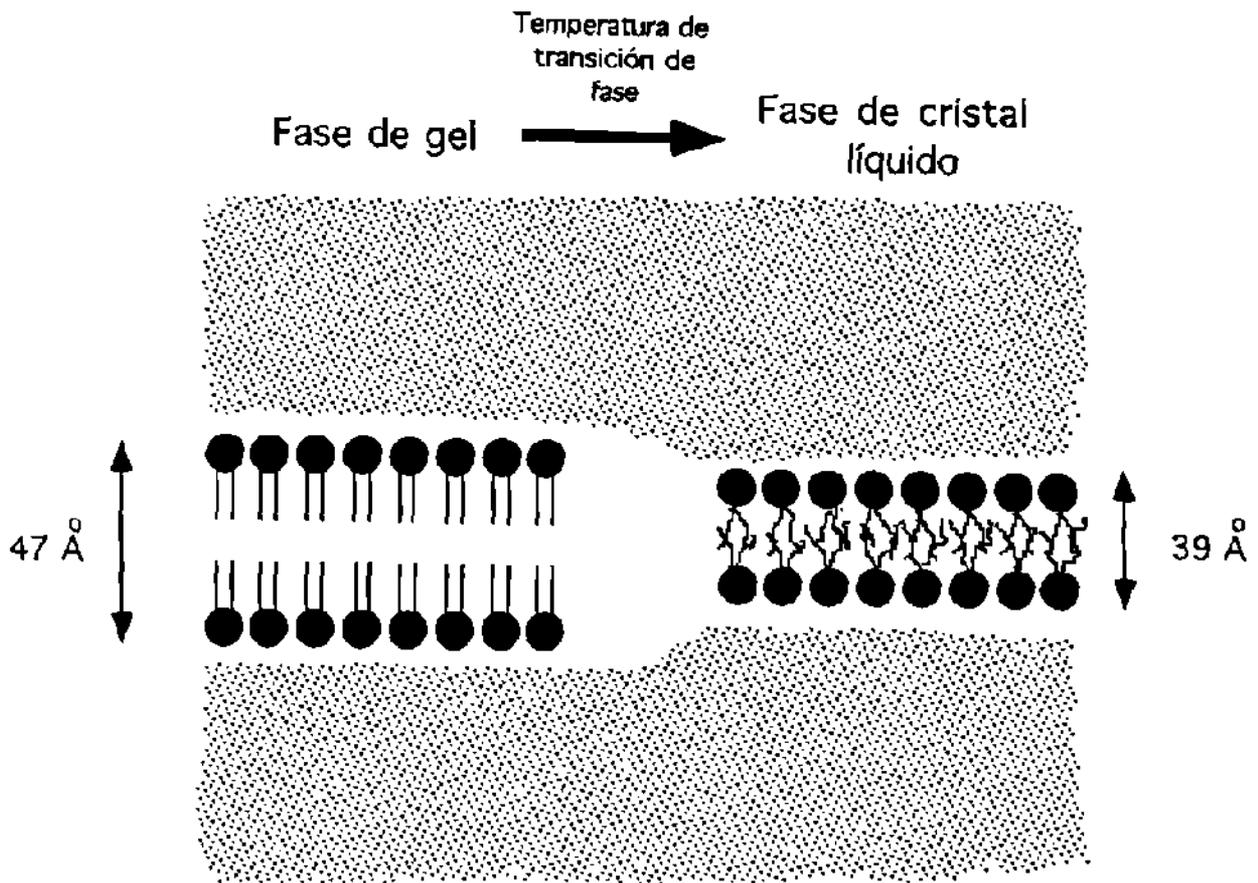


Figura 8. Representación Esquemática de las dos Fases de la Bicapa Fosfolipídica. ● residuo polar; $\equiv \sphericalangle$ cadenas hidrofóbicas.

(Adaptada de P. Machy, Liposomes in Cell Biology and Pharmacology, 1987)

puro y compuesto de dos cadenas idénticas de ácidos grasos, tendrá una temperatura de transición que se incrementa de 14°C a 17°C por cada incremento de dos unidades de metileno de las dos cadenas de ácidos grasos (Tabla 7).

El tamaño de los liposomas varía de decenas de nanómetros a micrómetros de diámetro. Los liposomas pueden estar constituidos de bicapas sencillas (liposomas unilamelares), o bien, pueden estar formados de múltiples bicapas concéntricas (liposomas multilamelares). Los liposomas uni- y multilamelares tienen diámetros que varían de 0.2 a 2 μm , y de 0.1 a 5 μm respectivamente. El diámetro de los liposomas unilamelares pequeños es de 0.02-0.08 μm (274). Sin embargo, el uso de vesículas multilamelares tiene la ventaja de que el material hidrosoluble o liposoluble que contienen, puede ser liberado en forma gradual y sostenida debido a que las bicapas fosfolípídicas se degradan una por una en el sitio blanco (275).

Los liposomas interactúan casi exclusivamente con macrófagos que residen en órganos del SFM como lo son el hígado, bazo, pulmones, ganglios linfáticos y médula ósea. Factores tales como el tamaño, la carga y la composición de los liposomas influyen signifi-

TABLA 7

PROPIEDADES DE LOS FOSFOLIPIDOS COMUNMENTE UTILIZADOS EN LIPOSOMAS

Lípido	Número de carbonos	Abreviación	Carga	Temperatura de transición de fase (°C)
Dilauriloilfosfatidilcolina	12	DLPC	0	-1.8
Dimiristoilfosfatidilcolina	14	DMPC	0	23
Dipalmitoilfosfatidilcolina	16	DPPC	0	41
Diestearoilfosfatidilcolina	18	DSPC	0	58
Dilauriloilfosfatidilglicerol		DLPG	-1	4
Dimiristoilfosfatidilglicerol		DMPG	-1	23
Dipalmitoilfosfatidilglicerol		DPPG	-1	41
Diestearoilfosfatidilglicerol		DSPG	-1	55

(Adaptada de P. Machy, Liposomes in Cell Biology and Pharmacology, 1987)

cativamente en su incorporación por los macrófagos. Los macrófagos en general, y los macrófagos peritoneales en particular, prefieren liposomas con carga neta negativa (276-280). Además, se ha demostrado que la incorporación de liposomas por los macrófagos es más eficiente cuando contienen fosfatidilcolina; la presencia de fosfatidilserina mejora este proceso (276). Cuando los liposomas se inyectan en la sangre, sus membranas superficiales se cubren con una variedad de proteínas plasmáticas que incluyen a las α y β globulinas, inmunoglobulina G, fibronectina, factores de coagulación y albúmina, los cuales pueden afectar el reconocimiento de los liposomas por los macrófagos, y como consecuencia el grado en el que los liposomas son incorporados por las células del SFM (280, 281).

Los liposomas se pueden administrar por vía oral, transdérmica, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal, sin embargo, la ruta más efectiva es la intravenosa (282). Los liposomas se pueden utilizar en la terapia de enfermedades infecciosas causadas por parásitos intracelulares que infectan al macrófago como son la leishmaniasis y la micobacteriosis (275, 283, 284). Los liposomas pueden ser efectivos también en la terapia de tumores ya

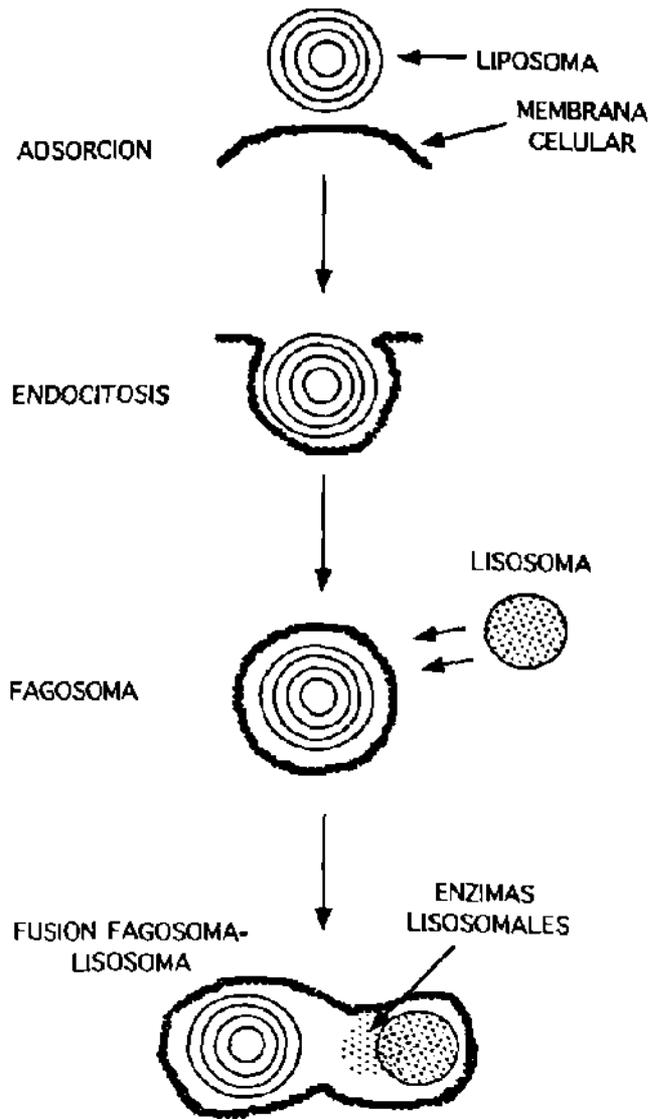


Figura 9. Fagocitosis de Liposomas por Macrófagos.

(Adaptada de R. R. C. New, Liposomes, 1992)

sosomales rompen a los liposomas cuyos fosfolípidos son hidrolizados a ácidos grasos, los cuales se pueden reciclar y reincorporar a los fosfolípidos de la célula huésped. Durante el proceso de rompimiento de los liposomas en los fagosomalisosomas, el contenido de los compartimientos acuoso y lipídico es liberado lentamente y se distribuye al resto de la célula, o es secretado mediante el proceso de exocitosis (292).

1.6 Tratamiento de la Infección por MAC

El objetivo de la terapia en contra de MAC, es el de reducir el número de bacilos viables en los pacientes, o erradicar la infección, para mejorar la calidad de vida del paciente o prolongar su sobrevivencia. Se ha reportado que la monoterapia con drogas tales como la azitromicina, claritromicina, clófazimina, rifampina o etambutol, puede reducir el número de bacterias en la sangre de pacientes con SIDA (234, 293-295), sin embargo, los pacientes experimentan relapso microbiológico y clínico, y la aparición de cepas resistentes (296). Por lo tanto, una estrategia más apropiada en contra de la infección por MAC, es el uso combinado de drogas (234-237). Sin embargo, este tipo de régimen de múltiples drogas tiene efectos tóxicos. La toxicidad de las drogas se puede disminuir mediante su encapsulación en liposomas (297). Las drogas liposomales tienen la ventaja de tener como célula blanco primario al macrófago, en el cual residen las micobacterias (187). De ésta forma se previene que las drogas se dirijan a sitios en donde pueden causar efectos tóxicos (296). Las formas liposomales de drogas tales como la amikacina, estreptomicina, ciprofloxacina,

claritromicina, clofazimina, ofloxacina, kanamicina y gentamicina, han sido utilizadas independientemente o en combinación, para tratar infecciones por MAC en macrófagos murinos (270, 298) y humanos (299, 300), y en el modelo de ratones beige (297, 301-305). En este último modelo, las combinaciones de drogas que contienen clofazimina han demostrado ser las más eficaces en el tratamiento de infecciones por MAC (305). Además, la gentamicina liposomal se ha utilizado recientemente para tratar infecciones por MAC en pacientes con SIDA (306). Por otro lado, el uso de drogas antimicobacterianas en combinación con citocinas tales como IFN- γ , TNF- α o GM-CSF ha demostrado mejorar la eficacia individual de dichos agentes en contra de MAC (198, 307-310).

La prevención de la infección causada por MAC es otro objetivo esencial en el control de la enfermedad, ya que ésta se asocia frecuentemente con una alta morbilidad y mortalidad en pacientes con SIDA (174, 177, 178). Hasta hoy, la rifabutina es la única droga que ha demostrado tener efectividad en contra de la infección por MAC en estudios de profilaxis (311). Por lo tanto, es necesario desarrollar nuevos agentes terapéuticos o mejorar los ya existentes, para el tratamiento de infecciones por MAC.

1.7 Sinopsis y Objetivos

MAC es un patógeno que comúnmente se relaciona con una alta mortalidad en individuos inmunocomprometidos, especialmente pacientes con SIDA. En estos pacientes, MAC afecta tejidos tales como el bazo, hígado, pulmones y gánglios linfáticos. La sobrevivencia de dichos pacientes se reduce considerablemente una vez que han sido infectados por MAC.

MAC es un parásito intracelular del macrófago que es resistente a las drogas utilizadas para tratar a la tuberculosis. Drogas tales como la clofazimina, azitromicina, rifampina, rifabutina, amikacina, etambutol o ciprofloxacina se han empleado en forma individual o en combinación, en contra de la infección por MAC. La clofazimina ha demostrado ser una droga de imprescindible cuando se emplean combinaciones de drogas. Sin embargo, los regímenes de múltiples drogas son poco tolerados por los pacientes, por lo que el tratamiento de infecciones por MAC requiere de la búsqueda y aplicación de nuevos agentes terapéuticos, o de la mejoría de la terapia ya existente. La encapsulación de drogas en liposomas no sólo reduce la toxicidad de los agentes antimicobacterianos, sino que les permite acumularse en los macrófagos en donde MAC reside y multiplica.

Por otro lado, es bien conocido que el sistema inmune de los pacientes con SIDA se encuentra severamente deprimido debido primordialmente a una reducción significativa del número de

linfocitos T cooperadores. Además, la producción de citocinas involucradas en la actividad antimicrobiana del macrófago, tales como el IFN- γ y el TNF- α , se halla notablemente reducida en los pacientes con SIDA.

El presente estudio se llevó a cabo para evaluar la eficacia de combinaciones de clofazimina con citocinas, en un intento para potenciar sus actividades individuales en contra de la infección por MAC. Los objetivos de éste estudio fueron:

1. Determinar la actividad de la clofazimina libre y liposomal en macrófagos en contra de MAC.
2. Investigar el efecto de citocinas en:
 - (a) la fagocitosis de MAC por macrófagos
 - (b) la incorporación de clofazimina libre y liposomal por macrófagos
 - (c) la activación de macrófagos en contra de MAC
 - (d) forma individual o en combinación con clofazimina libre y liposomal en contra de MAC en macrófagos.
3. Evaluar la eficacia terapéutica de la clofazimina libre y liposomal, en forma individual o en combinación con citocinas, en contra de la infección por MAC *in vivo*.

CAPITULO 2

MATERIALES Y METODOS

2.1 Reactivos, Lípidos y Medios de Cultivo

El IFN- γ recombinante murino (actividad específica de 1×10^7 U/mg) y los medios RPMI 1640 y DMEM-F12 se obtuvieron de los Laboratorios Gibco (Grand Island, NY, USA). El medio EX-CELL 300 se obtuvo de JRH Biosciences (Lenexa, KS, USA). El TNF- α recombinante murino (actividad específica de 5×10^7 U/mg) fue provisto por el Laboratorio de Investigación sobre Citocinas del Hospital M. D. Anderson en Houston, TX, USA. El suero hiperinmune de conejo anti TNF- α se adquirió de Genzyme (Cambridge, MA, USA). La pentoxifilina fue provista por Hoechst-Roussel Pharmaceuticals Inc. (Somerville, NJ, USA). La NG-monomethyl-L-arginina (NMA) se obtuvo de Calbiochem-Novabiochem Co. (La Jolla, CA, USA). La clofazimina se obtuvo de Ciba-Geigy (Basel, Switzerland). Los fosfolípidos L- α -dimiristoilfosfatidil-colina (DMPC) y L- α -dimiristoilfosfatidilglicerol (DMPG) se obtuvieron de Avanti Polar-Lipids Inc. (Alabaster, AL, USA). El suero fetal de bovino, el

amortiguador hepes, la solución de penicilina-estreptomicina, el dimetilsulfóxido (DMSO), el NaOH, el HCl, el Tween 80, el metanol, el butanol terciario, el bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio (MTT), el dodecil sulfato de sodio (SDS), y la N,N-dimetil-formamida (DMF) se obtuvieron de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). El amortiguador fosfato salino (PBS) se obtuvo de Mediatech, Herndon, VA, USA. El caldo de Middlebrook 7H9 (MBB) y el agar 7H11 se adquirieron de Difco Laboratories (Detroit, MI, USA).

2.2 Preparación de MTT y Solución de Extracción

El MTT se disolvió en PBS a una concentración de 5 mg/ml a temperatura ambiente. La solución se esterilizó por filtración (Gelman Sciences, Ann Arbor, MI, USA) y se almacenó a 4°C en tubos de polipropileno (Becton Dickinson Co., Lincoln Park, NJ, USA) cubiertos con papel aluminio. Se prepararon soluciones frescas de MTT cada 15 días. La solución de extracción se preparó disolviendo 20% (p/v) de SDS a 37°C en una solución de 50% de DMF y agua desmineralizada; finalmente el pH se ajustó a 4.7.

2.3 Preparación de Clofazimina Libre y Liposomal

La clofazimina (CLF) se preparó disolviendo 1 mg de clofazimina en 0.5 ml de DMSO, 0.5 ml de metanol y 1.5 μ l de HCl 6 N, y las diluciones se prepararon en agua. La clofazimina liposomal (CLF-lip) se preparó disolviendo 10.5 mg de DMPC, 4.5 mg de DMPG y 1 mg de clofazimina en 0.8 ml de butanol terciario y 0.2 ml de agua. Esta solución se sonicó (sonicador de tipo de baño de agua, con 80 watts de fuerza, Laboratory Supplies Company, Hicksville, NY), se congeló en hielo seco y acetona, y se liofilizó (Labconco Co., Kansas City, MO, USA) por dos días. El liofilizado se almacenó a una temperatura de -20°C hasta su uso. Los liposomas se prepararon reconstituyendo el liofilizado en 1 ml de medio EX-CELL 300. La eficiencia de encapsulación se determinó por espectrofotometría a una longitud de onda de 284 nm, siendo ésta >95% (247).

2.4 Cultivo de Micobacterias

La cepa 101 de MAC fue proporcionada por el Hospital Infantil en Los Angeles, CA, USA. Este organismo se cultivó y mantuvo en

medio de Lowenstein-Jensen (Remel, Lenexa, KS, USA). Se prepararon suspensiones de MAC, cultivando un inóculo inicial en placas de agar 7H11 (Difco) y subcultivando las bacterias en MBB (Difco) durante 72 h a 37°C. Las suspensiones se sonicaron por 15 segundos en un ultrasonicador de tipo de baño de agua (Laboratory Supplies Company) para deshacer los acúmulos bacterianos y tener suspensiones homogéneas. Los cultivos se ajustaron a una concentración de 3 unidades Klett/ml mediante el uso de un colorímetro Klett-Summerson (Klett Manufacturing, Brooklyn, NY, USA) y se congelaron a -70°C hasta su uso (se prepararon cultivos frescos en forma mensual). Estas suspensiones se descongelaron al momento de su uso, y se sonicaron por 90 segundos. Este proceso da como resultado una población bacilar que contiene 10^7 bacilos viables/ml (determinado mediante cultivo en agar 7H11) (312).

2.5 Modelo de Infección por MAC en Macrófagos

2.5.1 Obtención y Cultivo de Macrófagos

Se utilizaron ratones suizos-ICR machos de 6 a 8 semanas de edad, los cuales se obtuvieron de Harlan Sprague Dawley Inc.

(Indianapolis, IN, USA). Estos se sacrificaron por dislocación cervical, y las células residentes en la cavidad peritoneal se colectaron mediante la infusión de RPMI 1640 frío. La suspensión celular se centrifugó a 200 X g durante 10 min a 6°C y se resuspendió en RPMI 1640 precalentado a 37°C y conteniendo 10% de suero fetal de bovino, 1% de solución de penicilina/estreptomina y 1% de amortiguador hepes (a éste medio se le denominó RPMI completo). El número de células se ajustó a 1.7×10^6 células/ml utilizando un contador Coulter (Coulter Electronics, Hialeah, FL, USA). Se transfirieron volúmenes de 100 µl en placas de 96 pozos (Becton Dickinson Co.). Después de incubar las placas durante 2 h a 37°C en un ambiente de 5% de CO₂, los cultivos se lavaron dos veces con RPMI completo para remover las células no adherentes (313).

2.5.2 Infección de Macrófagos

Los macrófagos se lavaron en dos ocasiones con medio EX-CELL 300 conteniendo 1% de amortiguador hepes, y se cultivaron en este mismo medio. El cambio de medio RPMI completo por EX-CELL 300 sin antibióticos en ésta etapa, se debió a que se ha reportado que el

suero inhibe el crecimiento de MAC (314); además, el medio EX-CELL 300 no requiere la adición de suero para mantener cultivos de macrófagos. Estos cultivos se infectaron con una suspensión de MAC en una relación de 10 bacterias:1 macrófago, durante 4 h a 37°C/5% CO₂. Después de lo cual se lavaron 2 veces con medio EX-CELL 300 para remover los bacilos extracelulares que no fueron fagocitados. Los cultivos se reconstituyeron con 200 µl de medio EX-CELL 300.

2.6 Efecto de Clofazimina Libre y Liposomal en las Funciones del Macrófago

2.6.1 Determinación de la Viabilidad

Se determinó el efecto de la CLF o CLF-lip en la viabilidad de macrófagos residentes. Los macrófagos se incubaron por 24 h en medio EX-CELL 300, se lavaron dos veces y se cultivaron por 24 h en presencia o ausencia de CLF o CLF-lip (0.037 a 2.5 µg/ml), liposomas vacíos (conteniendo una cantidad de lípidos equivalente a la de CLF-lip) y solvente de CLF. Posteriormente, se añadió MTT (5 mg/ml) a los cultivos y éstos se incubaron por 4 h a 37°C. Los sobrenadantes se removieron y a las células se les añadieron 100 µl de DMSO/pozo

para disolver los cristales de formazán, que se producen mediante la reducción del MTT por macrófagos con un metabolismo activo. La absorbancia se leyó a 570 nm en un lector de microplacas (Molecular Devices Corporation, Palo Alto, CA, USA).

2.6.2 Actividad Antibacteriana

Se evaluó la actividad antimicobacteriana de la CLF y la CLF-lip en macrófagos. Los cultivos de macrófagos se infectaron, se incubaron por 48 h y se trataron por 48 h adicionales con CLF o CLF-lip (0.037-0.6 $\mu\text{g/ml}$). Después de la incubación, los macrófagos se lisaron y procesaron como se explicó previamente.

2.6.2.1 Actividad Profiláctica.

Se investigaron los efectos de CLF y CLF-lip utilizados como agentes profilácticos. Los cultivos de macrófagos se incubaron por 24 h con CLF o CLF-lip (0.075-1.2 $\mu\text{g/ml}$) e infectaron con MAC como se describió previamente. Después de incubar por 48 h adicionales, los macrófagos se lisaron y procesaron para determinar la actividad antibacteriana como se describirá posteriormente.

2.6.2.1.1 Efecto del Tiempo de Preincubación. Estos experimentos se llevaron a cabo con el objeto de investigar el efecto del tiempo en la actividad de la clofazimina después de haber sido incorporada por los macrófagos. Cultivos de macrófagos se incubaron con CLF o CLF-lip (0.6 μ g/ml) por períodos de 2, 4 y 6 días. Al finalizar los períodos de incubación, los macrófagos se lavaron para remover la droga extracelular y posteriormente se infectaron. Los macrófagos infectados y pretratados con la droga, se incubaron por 48 h adicionales, después de los cual los macrófagos se lisaron y procesaron para determinar la actividad antibacteriana como se describirá posteriormente.

2.7 Activación del Macrófago

2.7.1 Tratamiento con IFN- γ

2.7.1.1 Determinación de la Fagocitosis.

La fagocitosis de micobacterias por macrófagos se llevó a cabo en cámaras de cultivo montadas sobre portaobjetos (Miles Scientific, Naperville, IL, USA). Después de transcurrido el período de infección (4 h), los macrófagos se lavaron dos veces con medio EX-

CELL 300 para remover los bacilos no ingeridos, y se fijaron con 150 μ l de una solución de paraformaldehído al 4% por 10 min a temperatura ambiente. Los cultivos se lavaron tres veces con PBS, se secaron al aire y se tiñeron con el colorante de Ziehl-Nielsen (315). Se determinó la distribución de los bacilos ingeridos por los macrófagos infectados, mediante la observación de 500 células por monocapa/tratamiento.

2.7.1.2 Cuantificación de la Incorporación de Clofazimina.

Se cultivaron macrófagos residentes y macrófagos preactivados con IFN- γ (50 U/ml; 24 h) en placas de 12 pozos (Becton Dickinson) a una concentración de 2×10^6 células/pozo. Posteriormente, éstos cultivos se infectaron e incubaron por 48 h adicionales, después de lo cual se trataron por 24 h con CLF o CLF-lip (0.6 μ g/ml). Después de la incubación, los sobrenadantes se removieron y las células se colectaron utilizando 0.5 ml de agua y un gendarme (tubo de vidrio con una terminación de hule), repitiendo el proceso con 0.5 ml de metanol; el material celular se disgregó en un ultrasonicador de tipo de baño de agua (Laboratory Supplies Company) por 10 min. La fase acuosa se evaporó en una centrifuga

con vacío (Speedvac RC 10-10, Jouan Inc., Winchester, VA) y el precipitado se disolvió en 0.5 ml de metanol, seguido de centrifugación a 200 X g/5 min. La concentración de clofazimina se determinó en los sobrenadantes de este último paso, mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) siguiendo el método de Peters (316). El análisis se llevó a cabo utilizando un sistema de transporte de solvente modelo 6000 A, un autoinyector Wisp modelo 712, y un detector de longitud de onda variable modelo 481 (Waters Chromatography Division, Millford, MA, USA). La clofazimina se cuantificó utilizando una columna C18 Bondapak (Millipore Corporation, Millford, MA, USA). El volumen de inyección de la muestra fue de 50 µl. La fase móvil para la elución consistió de ácido fosfórico 0.0425 M en metanol al 81%, pH 2.46, a un flujo de 1.0 ml/min. La detección de la clofazimina se llevó a cabo analizando el efluente de la columna a 287 nm. El tiempo de corrimiento de las muestras fue de 10 min y el tiempo de retención de la clofazimina fue de 7.2 min. Las soluciones estándar de la clofazimina (0.078-10 µg/ml) se prepararon en metanol.

2.7.1.3 Actividad Antibacteriana del IFN- γ .

Los cultivos de macrófagos se incubaron en RPMI completo en presencia o ausencia de IFN- γ (1, 10, 100 y 1000 U/ml) por 24 h, o 50 U/ml de IFN- γ por 24, 48 y 72 h, se infectaron y se lisaron a las 48 h como se explica posteriormente. Además, se diseñaron otros experimentos para determinar el efecto del IFN- γ postinfección. Para esto, se infectaron macrófagos y se incubaron por 48 h. Después, los macrófagos infectados se trataron con una dosis de IFN- γ (50 U/ml) por 24, 48 y 72 h, después de lo cual se lisaron. En experimentos adicionales, macrófagos pretratadas con IFN- γ (50 U/ml) por 24 h, se infectaron y se incubaron por 48 h, después de lo cual se trataron con una dosis de IFN- γ (50 U/ml) por 6 h, 2 días y 6 días. Después de los períodos de incubación, las células infectadas se lisaron (para el tratamiento de 6 h, las células se lavaron una vez para remover el IFN- γ , y se incubaron por 24 h). Antes de lisar las células, se tomaron muestras del medio condicionado (MC) de los cultivos para determinar los niveles de nitritos. La viabilidad celular a lo largo de este estudio se determinó mediante la exclusión del azul tripano y fue >95%.

2.7.1.4 Determinación de la Producción de Nitritos.

La acumulación de nitritos en el MC de los cultivos de macrófagos, se utilizó como un indicador de la producción de óxido nítrico. Se mezclaron alíquotas de 50 μ l del MC con 50 μ l del reactivo de Griess (317), se incubaron a temperatura ambiente por 10 min y se midieron las absorbancias a 540 nm en un lector de microplacas (Molecular Devices Corporation).

2.7.1.4.1 Efecto del NG-monometil-L-arginina (NMA) en la Producción de Oxido Nítrico. Se utilizó NMA (un inhibidor de la producción de óxido nítrico) para determinar el papel del óxido nítrico en la actividad del macrófago en contra de MAC. Para esto, se desarrollaron dos series de experimentos. En uno de estos, los macrófagos se incubaron por 24 h en presencia o ausencia de 50 U/ml de IFN- γ , se infectaron con MAC y se cultivaron por 48 h. Posteriormente, se incubaron con o sin IFN- γ (50 U/ml) por 24 h adicionales en presencia o ausencia de NMA (200 μ g/ml). En otra serie de experimentos, macrófagos residentes se infectaron, incubaron por 48 h, y se trataron por 72 h con IFN- γ (50 U/ml) en presencia o ausencia de NMA (200 μ g/ml). Los macrófagos se lisaron

después de los períodos de incubación y se determinó el efecto de dichos tratamientos en el crecimiento intracelular de MAC como se describirá posteriormente. Antes de lisar las células, se tomaron muestras del MC de los cultivos y se determinaron los niveles de nitritos.

2.7.1.5 Combinación de IFN- γ con Clofazimina Libre o Liposomal.

Se infectaron cultivos de macrófagos residentes o preactivados con IFN- γ (50 U/ml; 24 h) y se incubaron por 48 h en presencia o ausencia de CLF o CLF-lip (0.075 μ g/ml). Esta concentración de clofazimina se seleccionó debido a que causa entre un 20 a 30% de inhibición del crecimiento de MAC en los macrófagos, de esta manera se puede observar cualquier efecto adicional debido a IFN- γ . Después de la incubación, los macrófagos se lisaron y se procesaron para determinar la actividad antibacteriana como se explicará posteriormente.

2.7.2 Tratamiento con TNF- α

2.7.2.1 Determinación de la Producción de TNF- α .

Se obtuvo MC proveniente de cultivos de macrófagos residentes o preactivados con IFN- γ (50 U/ml; 24 h), para determinar la actividad de TNF- α después de 4 h de infección. Posteriormente, los cultivos se lavaron dos veces y se reconstituyeron con medio EX-CELL 300, después de lo cual se tomaron muestras del MC inmediatamente después de añadir el medio (0 h), y a las 1.5, 3 y 6 h postinfección. El MC se filtró con unidades de filtración de 0.2 μ m de tamaño de poro, con baja afinidad para proteínas (Gelman Sciences), y se mantuvieron a 4°C hasta su uso. Los niveles de TNF- α en el MC se cuantificaron mediante el uso de células sensibles a la actividad del TNF- α (células del fibrosarcoma L929) (318).

2.7.2.1.1 Análisis de la Actividad del TNF- α . La citotoxicidad del MC conteniendo TNF- α se midió de la siguiente manera. Se sembraron 1.5×10^4 células de L929/pozo de microplacas de 96 pozos en un volumen de 150 μ l y se incubaron por 18-24 h en medio

DMEM-F12. Al finalizar este período de incubación, se añadieron 50 μ l de medio DMEM-F12 conteniendo 1% de una solución de penicilina/estreptomina, y actinomicina D (concentración final de 1 μ g/ml). Después de 2 h de incubación, se añadieron 100 μ l/pozo del MC o del estándar y se hicieron diluciones 1:3 (el blanco son los primeros tres pozos de la octava fila del estándar). Las placas se incubaron por 18 h, después de lo cual se les añadieron 50 μ l del colorante rojo neutro (concentración final de 0.002%). Después, los cultivos se incubaron por una hora y se lavaron tres veces con PBS. Finalmente se añadieron 150 μ l de una solución conteniendo 70% de etanol y 0.6% de ácido acético glacial para solubilizar el colorante incorporado en las células. La absorbancia se lee a 540 nm en el lector de microplacas (Molecular Devices Corporation). El valor de la actividad de TNF- α dado en U/ml, es el recíproco de la dilución de 1 ml capaz de inducir 50% de lisis de las células L929.

2.7.2.2 Actividad Antibacteriana del TNF- α .

Para determinar el efecto del TNF- α en activar mecanismos microbicidas en el macrófago, se desarrolló el siguiente protocolo. Se infectaron cultivos de macrófagos e incubaron con una dosis de

TNF- α (30 U/ml) por 4 días, después de lo cual las células se lisaron y procesaron como se explica posteriormente.

2.7.2.2.1 Neutralización de la Actividad del TNF- α . La actividad del TNF- α en cultivos de macrófagos se neutralizó mediante el uso de un antisuero específico contra TNF- α (de acuerdo al distribuidor, 1 μ l de este antisuero es suficiente para neutralizar la actividad de 1000 unidades de TNF- α). Se incubaron cultivos de macrófagos preactivados o no con IFN- γ en presencia o ausencia de anticuerpos contra TNF- α (40-160 unidades neutralizantes de TNF- α /ml) durante el período de infección (4 h). En otra serie de experimentos, se trataron macrófagos infectados con TNF- α (30 U/ml) por 4 días en presencia o ausencia de antisuero anti TNF- α (150-250 unidades neutralizantes de TNF- α /ml). Se estudió el efecto de la neutralización del TNF- α sobre el crecimiento intracelular de MAC, midiendo la actividad antibacteriana del macrófago como se describe posteriormente.

2.7.2.2.2 Inhibición por Pentoxifilina. Se investigó el efecto de la pentoxifilina, un inhibidor específico de la expresión de TNF- α por macrófagos (319, 320), en la respuesta del macrófago en contra de MAC. Se infectaron macrófagos preactivados con IFN- γ y se incubaron con 1-100 $\mu\text{g/ml}$ de pentoxifilina por 48 h. Posteriormente las células se lisaron y procesaron para la determinación de la actividad antibacteriana como se explica posteriormente.

2.7.2.3 Combinación de TNF- α con Clofazimina Libre o Liposomal.

Se incubaron macrófagos infectados por 4 días en presencia o ausencia de TNF- α (30 U/ml). A las 48 h de tratamiento con TNF- α , los cultivos se incubaron en presencia o ausencia de CLF o CLF-lip (0.075 $\mu\text{g/ml}$) por 48 h. Al terminar el período de 4 días de incubación, los macrófagos se lisaron y procesaron como se explica posteriormente.

2.7.3 Determinación de la Actividad Antibacteriana

El efecto de citocinas en contra de la infección por MAC en macrófagos, se determinó mediante la incorporación de glicerol tritiado por bacterias viables en medio líquido, y mediante la enumeración de las unidades formadoras de colonias de micobacterias en agar 7H11. Después de transcurridos los períodos de incubación correspondientes a los tratamientos (con o sin citocinas o clofazimina) de macrófagos infectados descritos previamente, el medio de cultivo (EX-CELL 300) se removió completamente y se reemplazó con 100 μ l/pozo de MBB (sin glicerol). Los macrófagos infectados se lisaron mediante la adición de 10 μ l de NaOH 1N, 10 μ l de HCl 1N (para neutralizar el NaOH) y 10 μ l de Tween 80 al 5% (321).

2.7.3.1 Incorporación de Glicerol Tritiado.

Para la determinación de la incorporación de glicerol radioactivo por micobacterias, a los lisados de macrófagos se les añadieron 50 μ Ci/ml de glicerol tritiado (ICN Biochemicals, Irvine, CA, USA) (321). Las placas se incubaron por 4 días a 37°C. Al final de

este período de incubación, se añadieron 50 µl/pozo de una solución de hipoclorito de sodio al 5.25% para matar a las micobacterias, y posteriormente las bacterias muertas se colectaron en filtros de fibra de vidrio mediante el uso de un colector celular semiautomático (Cambridge Technology, Inc., Watertown, MA, USA). Los filtros se secaron toda la noche en viales individuales y se analizó la radioactividad incorporada (cpm) por las bacterias mediante el uso de líquido de centelleo (Scintiverse II, Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ, USA), y un contador de centelleo de partículas beta (Packard Instrument Company, Laguna Hills, CA, USA).

2.7.3.2 Determinación del Número de Colonias Bacterianas (UFC).

Para la determinación del número de colonias de micobacterias, se tomaron alíquotas de 100 µl de lisados de macrófagos (a los cuales no se les añadió glicerol tritiado) y se diluyeron 1:250 en PBS; posteriormente, se sembraron alíquotas de 100 µl en placas de agar 7H11 las cuales se sellaron (Scientific Device Laboratory, Glenview, IL, USA) y se incubaron de 8 a 12 días

hasta poder observar colonias bacterianas. Se tomaron como controles de crecimiento de MAC, a los valores de cfu o cpm de macrófagos infectados pero sin tratar; la disminución en cfu o cpm ocasionada por cualquier tratamiento, se comparó con el control y se expresó como porcentaje de inhibición del crecimiento intracelular de MAC.

2.8 Estudios *In Vivo*

2.8.1 Efecto de la Clofazimina Liposomal y del IFN- γ en forma Individual o en Combinación en contra de la Infección por MAC

Se utilizaron ratones beige C57BL/6 hembras (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA) de 6 semanas de edad como modelo de infección diseminada por MAC (203, 205, 209, 211, 212, 297). Los ratones beige se infectaron con 10^6 bacilos por vía intravenosa. (vena lateral de la cola) en un volumen de 0.1 ml de solución salina. Después de 24 h de infección, los ratones (en grupos de 3) se trataron cada tres días con CLF-lip o liposomas vacíos (25 mg/kg por vía intravenosa) hasta completar 6 dosis. Los ratones también se trataron cada dos días postinfección con IFN- γ (6.25×10^5 U/kg por

vía intraperitoneal) en forma individual o en combinación con NMA (2 mg/kg por vía intraperitoneal) hasta completar 9 dosis. Los ratones se sacrificaron 24 h después de la tercera y sexta dosis de CLF-lip (a los 7 y 19 días postinfección). Se removieron asépticamente el hígado, bazo y pulmones. Los órganos se pesaron y se disgregaron en PBS utilizando un homogenizador eléctrico (Tech Quest Company, Houston, TX, USA). Se prepararon diluciones en PBS de las suspensiones resultantes y se cultivaron alíquotas en agar 7H11 suplementado con 10% de OADC (Remel). Se enumeraron las colonias bacterianas después de 8-12 días de incubación a 37°C y se determinaron las UFC por gramo de tejido. Además, se obtuvieron macrófagos peritoneales después de 7 y 19 días de infección, y se incubaron a 37°C por 2 h en placas de 96 pozos (Becton Dickinson) a una concentración de 1.7×10^6 células/ml. Después de incubar, los macrófagos se lavaron e inmediatamente se lisaron para liberar los bacilos intracelulares. Posteriormente, se determinó la incorporación de glicerol radioactivo por micobacterias viables, después de añadir glicerol tritiado (50 μ Ci/ml) e incubar por 4 días.

2.8.2 Actividad Profiláctica de la Clofazimina Liposomal y del IFN- γ en contra de la Infección por MAC

Se investigó el efecto profiláctico de la CLF-lip y del IFN- γ en contra de la infección causada por MAC. Los ratones beige (en grupos de 3) se trataron con CLF-lip (25 mg/kg por vía intravenosa) o con CLF-lip (25 mg/kg por vía intravenosa) en combinación con IFN- γ (6.25×10^5 U/kg por vía intraperitoneal) 24 h antes de la infección. Se infectaron los ratones tratados con CLF-lip, y se les administraron 6 dosis adicionales de CLF-lip como se explicó anteriormente. Al grupo que recibió CLF-lip e IFN- γ , se le administró una dosis de IFN- γ en el día de la infección, y posteriormente se trató con ambos agentes como se describió previamente. Al finalizar el período de tratamiento (a los 7 y 19 días postinfección), los ratones se sacrificaron y se cuantificó el grado de infección en el hígado, bazo, pulmones y macrófagos de la cavidad peritoneal como se explicó previamente.

2.9 Análisis Estadístico

Los resultados que se muestran en este estudio, se expresan como la media \pm la desviación estándar (D. E.) de al menos tres repeticiones por tratamiento de un experimento representativo; todos los experimentos se hicieron tres veces. El nivel de significancia se determinó mediante la prueba *t* de Student.

CAPITULO 3

RESULTADOS

3.1 Efecto de la Clofazimina Libre y Liposomal en las Funciones del Macrófago

3.1.1 Viabilidad

En éste estudio se demostró que la CLF es significativamente más tóxica que la CLF-lip para macrófagos residentes a concentraciones mayores que 1 µg/ml ($P < 0.01$; Figura 10).

3.1.2 Actividad Antibacteriana

En éste estudio se ha observado que el tratamiento de macrófagos con CLF o CLF-lip después de la infección, inhibe significativamente el crecimiento intracelular de MAC. Dicha respuesta es proporcional a la dosis. Además, se observó que las actividades antimicobacterianas de la CLF y CLF-lip son comparables (Figura 11).

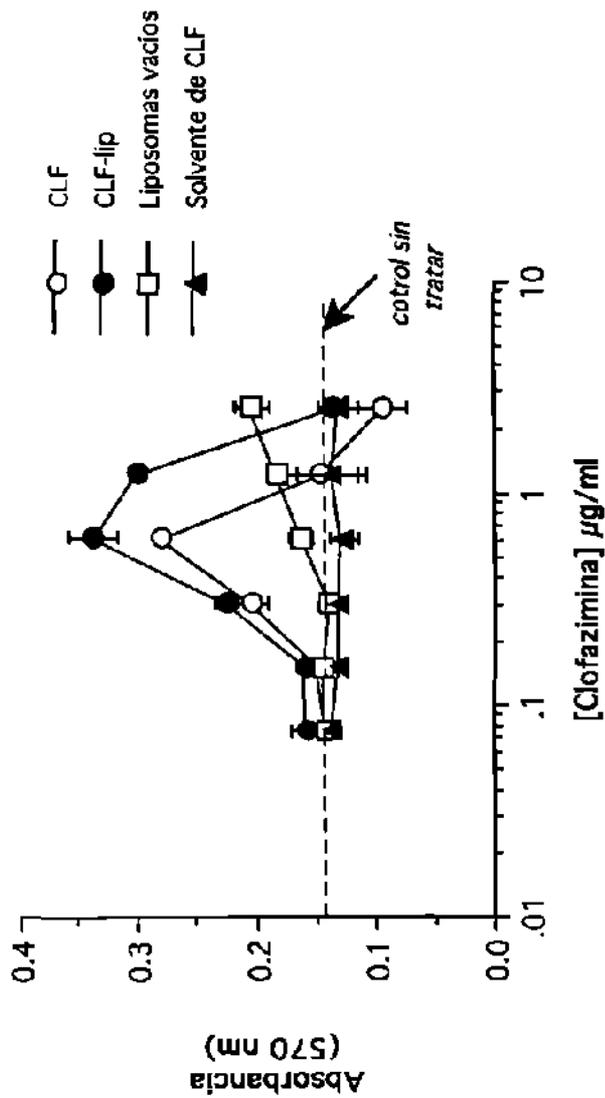
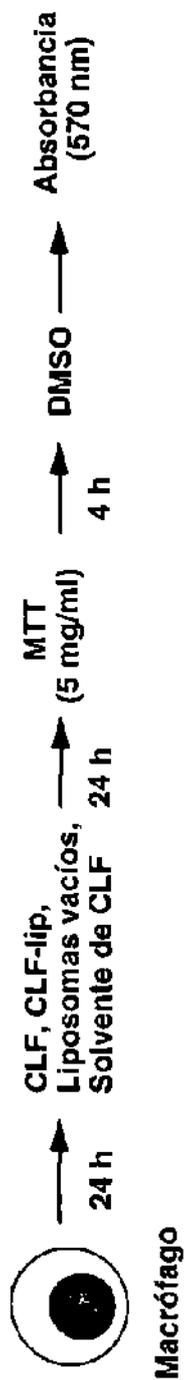


Figura 10. Efecto de la Clofazimina en la Viabilidad de Macrófagos Residentes.

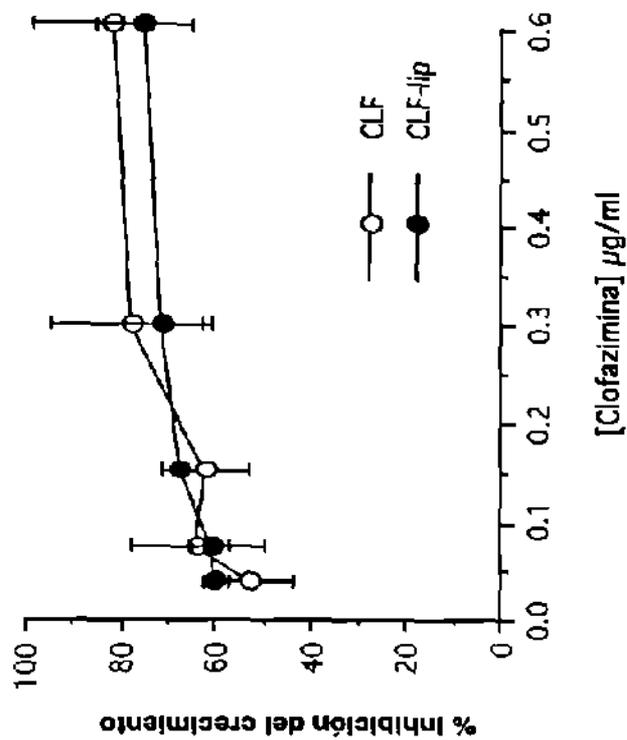
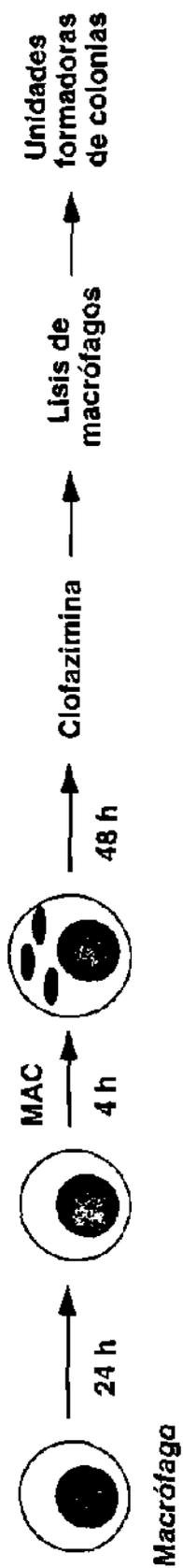


Figura 11. Actividad Antimicrobacteriana de la Clofazimina en Macrófagos.

3.1.2.1 Actividad Profiláctica.

En este trabajo también se demostró que la CLF y la CLF-lip tienen actividad profiláctica en contra de la infección por MAC en macrófagos. Esta respuesta es proporcional a la dosis. Además, se observó que las actividades de la CLF y la CLF-lip son similares. Se observó 50% de inhibición del crecimiento intracelular de MAC a una dosis de 0.075 µg/ml (Figura 12).

3.1.2.1.1 Efecto del Tiempo de Preincubación. Con el objeto de determinar la capacidad del macrófago para retener a la CLF o CLF-lip y correlacionarlo con la actividad antimicobacteriana de la droga, los macrófagos se incubaron con CLF o CLF-lip por 2, 4 y 6 días antes de infectar. El efecto de la droga se determinó 48 h después de la infección. Como se observa en la Figura 13, la actividad antibacteriana de la CLF disminuyó de un 62% a un 35% (48% de reducción), y la actividad de la CLF-lip se redujo de un 44% a un 38% (14% de disminución) después de 6 días de pretratamiento. Sin embargo, > 35% de inhibición del crecimiento fue aún evidente 6 días después de la incorporación de la droga. Además, se observaron cristales de clofazimina en el MC de macrófagos incubados con CLF

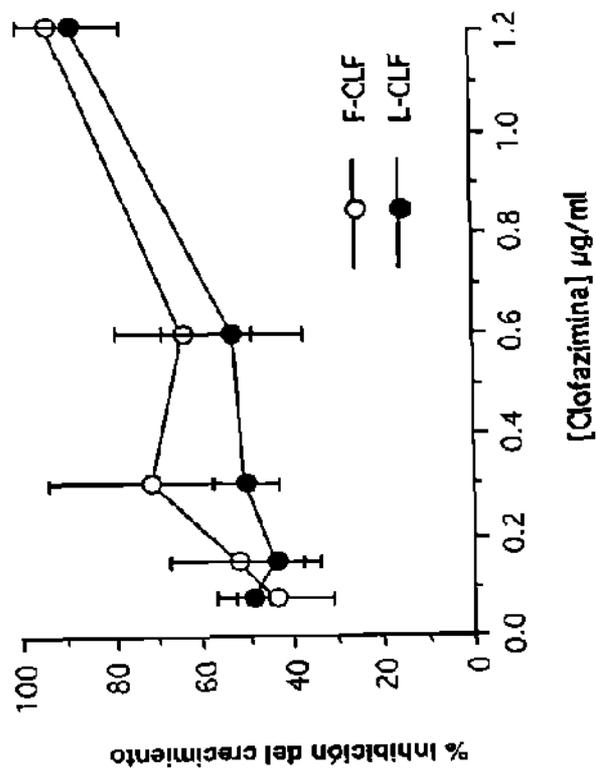
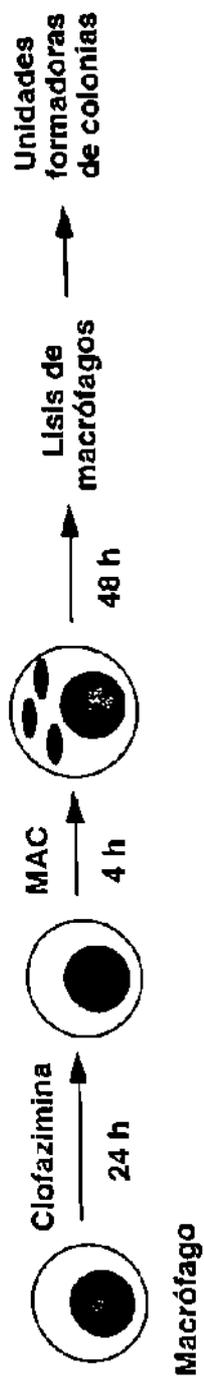


Figura 12. Actividad Profiláctica de la Clotazimina en contra de MAC en Macrófagos.

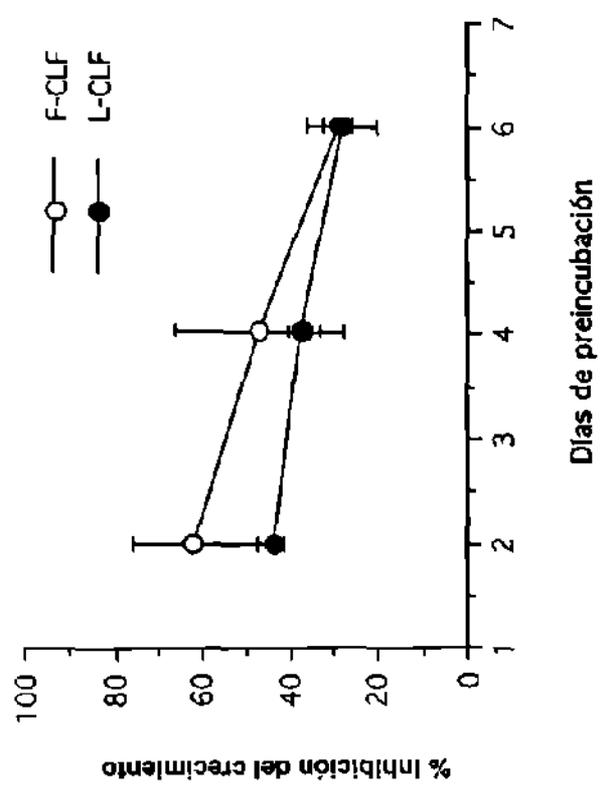
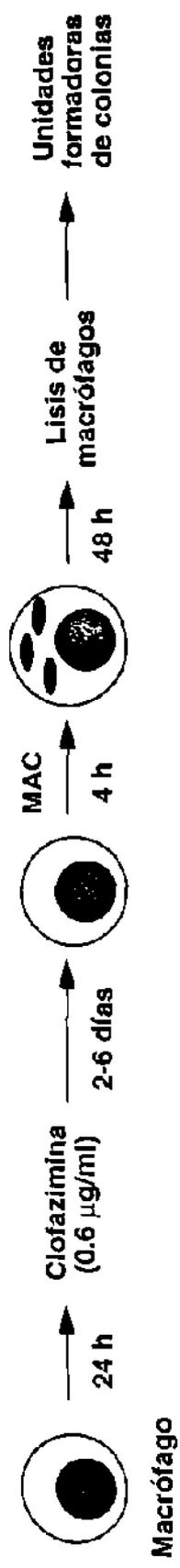


Figura 13. Efecto del Tiempo de Preincubación con Clofazimina en la Respuesta Antimicrobacteriana del Macrófago.

por 6 días; no se observaron cristales en el MC de macrófagos infectados y tratados con CLF-lip. Estos datos sugieren que la retención de la clofazimina y en consecuencia, su actividad en contra de MAC, se mejora considerablemente después de su encapsulación en liposomas.

3.2 Efecto de Citocinas

3.2.1 Tratamiento con IFN- γ

3.2.1.1 Fagocitosis.

Se observó que el pretratamiento con IFN- γ no incrementó o disminuyó la habilidad del macrófago para ingerir micobacterias (Figura 14).

3.2.1.2 Incorporación de Clofazimina.

Se determinó la capacidad de macrófagos residentes y preactivados con IFN- γ para incorporar CLF y CLF-lip. Como podemos observar en la Figura 15, la incorporación de CLF o CLF-lip fue similar para macrófagos residentes ($79\% \pm 15$ y $92\% \pm 3$ de incorpo-

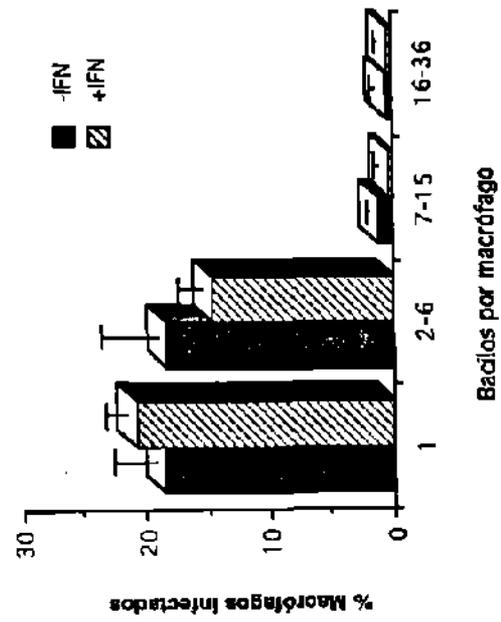
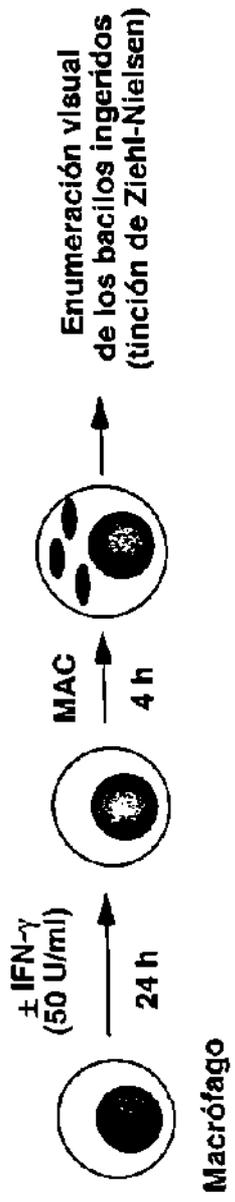


Figura 14. Efecto del IFN- γ en la Fagocitosis de MAC por Macrófagos.

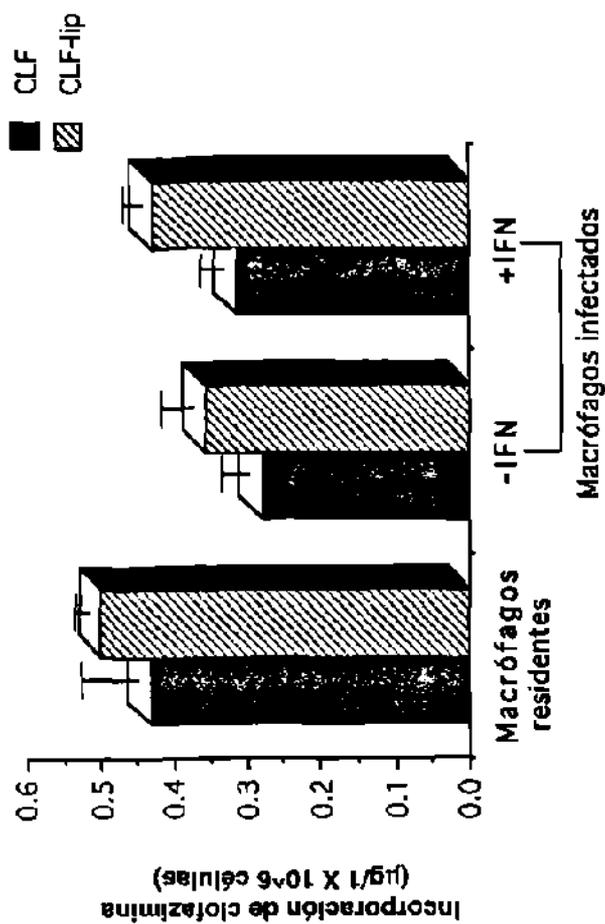
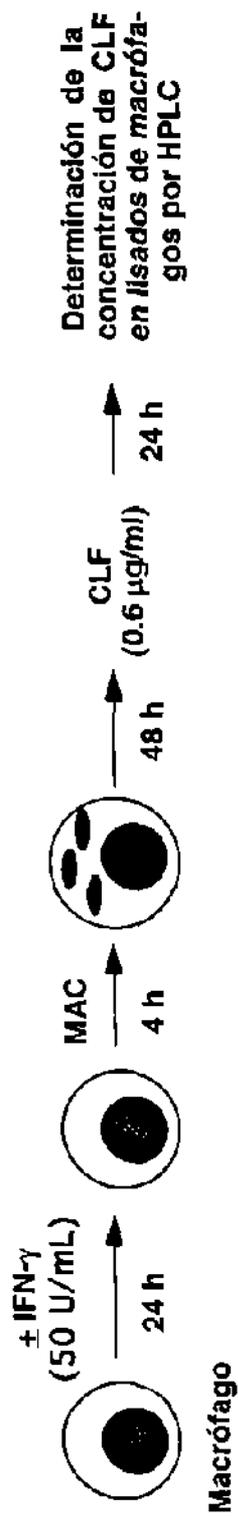


Figura 15. Incorporación de Clofazimina por Macrófagos Residentes y Preactivados con IFN- γ .

ración, respectivamente), sin embargo la infección por MAC causó una reducción significativa ($P < 0.05$) en la incorporación de CLF o CLF-lip por los macrófagos ($51\% \pm 6.6$ y $65\% \pm 7.8$, respectivamente). No se observó diferencia significativa entre la incorporación de CLF o CLF-lip por macrófagos infectados. Sin embargo, la preactivación de macrófagos con IFN- γ incrementó la incorporación de CLF-lip por macrófagos infectados ($78.6\% \pm 4$) en comparación con la incorporación de CLF ($57.5\% \pm 6$) ($P < 0.05$).

3.2.1.3 Actividad Antibacteriana.

El pretratamiento de macrófagos por 24 h con 1, 10, 100 y 1000 U/ml de IFN- γ indujo $19\% \pm 3$, $27\% \pm 9$, $30\% \pm 10$, y $38\% \pm 14$ de inhibición del crecimiento intracelular de MAC, respectivamente, al determinarse la incorporación de glicerol tritiado por los bacilos (Figura 16a). Estas diferencias fueron estadísticamente significativas con respecto al control sin tratar ($P < 0.05$), sin embargo no se observaron diferencias significativas en la respuesta del macrófago a diferentes dosis de IFN- γ .

El pretratamiento de macrófagos con IFN- γ (50 U/ml) por 24 y

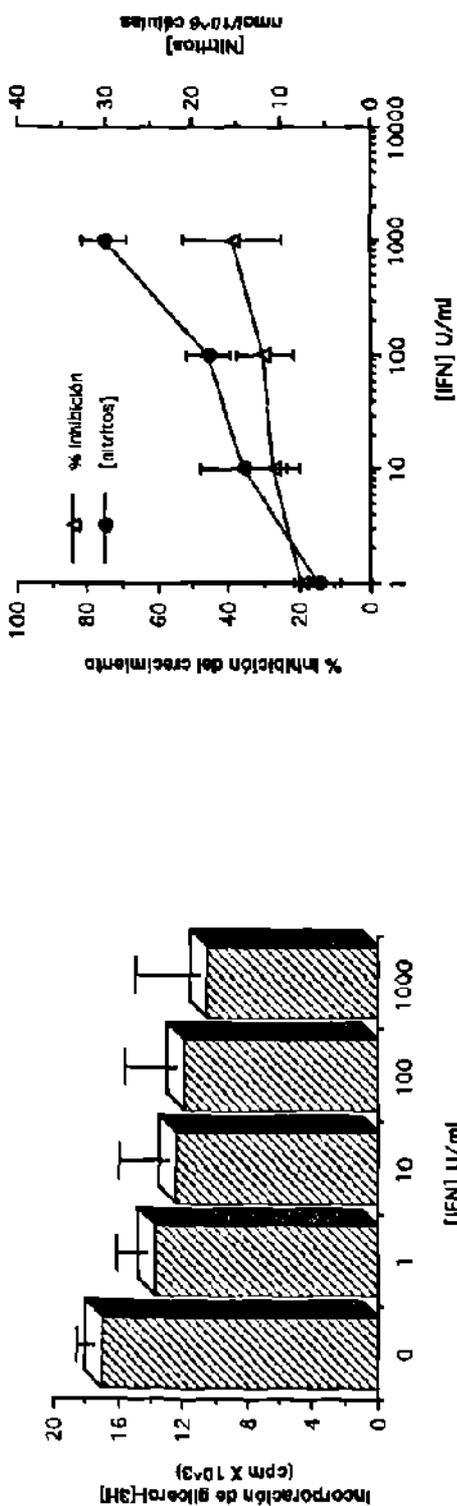
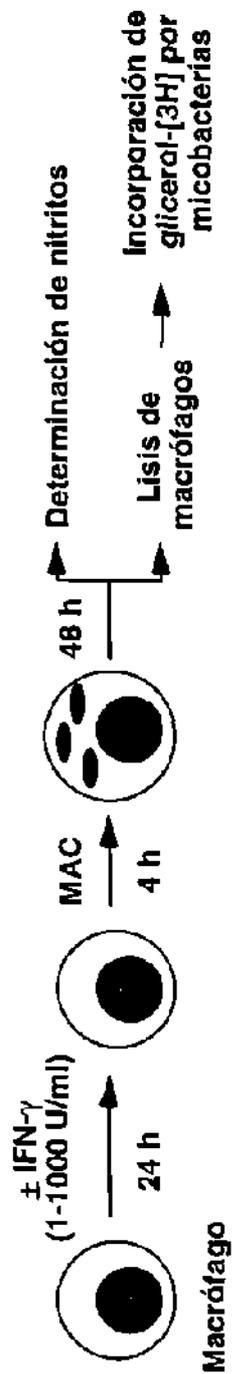


Figura 16. Efecto de la Preactivación del Macrófago con IFN- γ en el Crecimiento Intracelular de MAC.

48 h, pero no por 72 h, antes de la infección, redujo significativamente la incorporación de glicerol tritiado por los bacilos ($P < 0.05$) (Figura 17a); tal respuesta correspondió a $37\% \pm 11$, $52\% \pm 31$, y $3\% \pm 1$ de inhibición del crecimiento de MAC, respectivamente (Figura 17b).

Cuando los macrófagos pretratados con IFN- γ se infectaron, se incubaron por 48 h, y se reconstituyeron con IFN- γ , se observó disminución de la respuesta antibacteriana del macrófago al comparar dicha respuesta con la de cultivo de macrófagos no reconstituidos con ésta citocina ($P < 0.01$). Los valores de inhibición del crecimiento de MAC para macrófagos pretratados con IFN- γ fueron de $39\% \pm 8$, $28\% \pm 7$, y 0% , mientras que para las células reconstituidas con IFN- γ los valores fueron de $22\% \pm 1.8$, $19\% \pm 2$, y 0% , a los 2, 4 y 8 días después de la infección, respectivamente (Figura 18a).

3.2.1.4 Producción de Nitritos.

La preactivación de macrófagos infectados con IFN- γ indujo la producción de nitritos que fue dependiente de la dosis de la citocina. Como se observa en la Figura 16b, dosis de 1, 10, 100 y 1000 U/ml

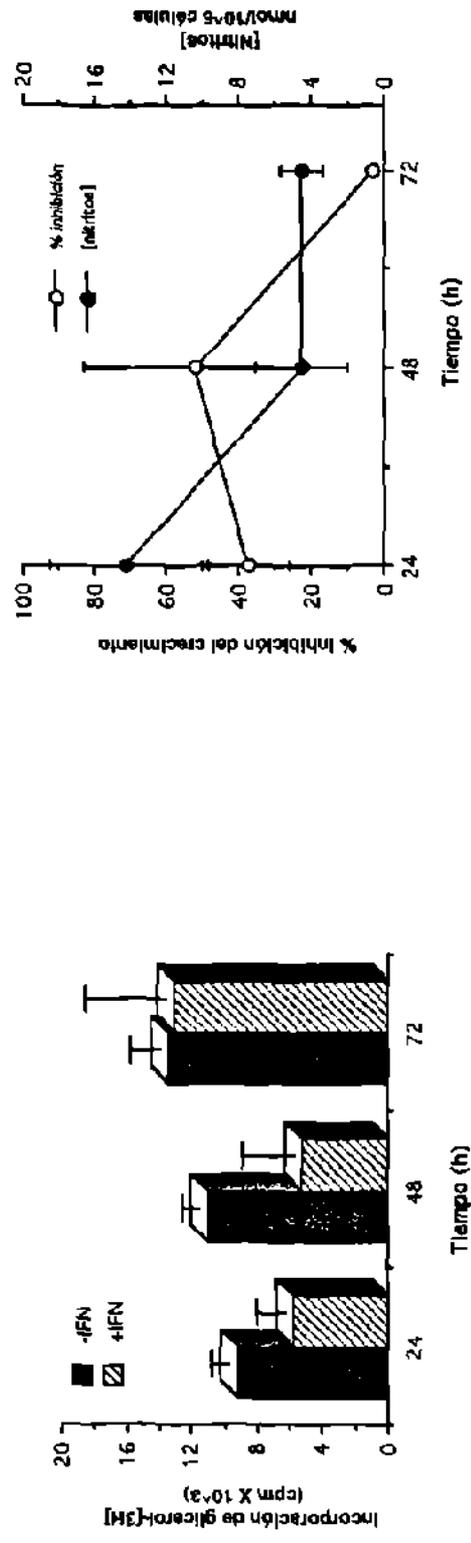
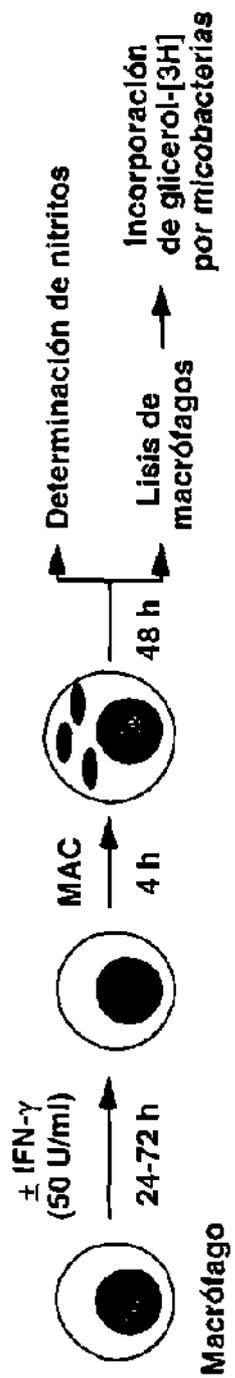


Figura 17. Efecto del Tiempo de Preincubación de Macrófagos con IFN- γ en el Crecimiento Intracelular de MAC.

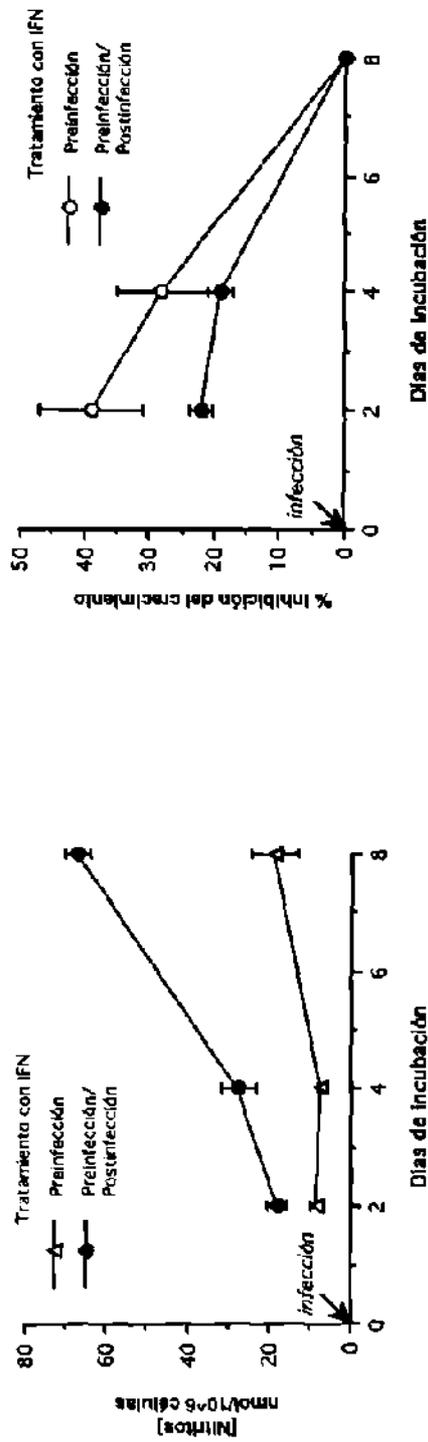
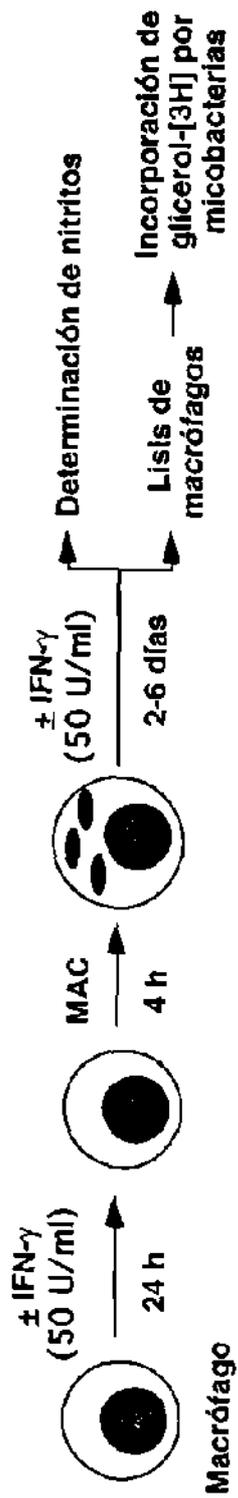


Figura 18. Efecto Postinfección del IFN- γ en la Respuesta de Macrófagos Preactivados con IFN- γ en contra de MAC.

de IFN- γ estimularon la producción de 6, 15, 20 y 30 nmol de nitritos/ 10^6 células, respectivamente. También se observó que el pretratamiento con IFN- γ (50 U/ml) por 24 h fue más efectivo en estimular la producción de nitritos por macrófagos infectados, que el pretratamiento por 48 o 72 h ($P < 0.01$; Figura 17b). Además, se observó que el tratamiento postinfección con IFN- γ de macrófagos preactivados con éstacitocina, indujo un incremento significativo en los niveles de nitritos en comparación con células no tratadas con IFN- γ postinfección ($P < 0.01$; Figura 18b).

3.2.1.4.1 Inhibición por NMA. El uso de NMA redujo significativamente los niveles de nitritos producidos por macrófagos preactivados con IFN- γ , infectados y reconstituidos con IFN- γ ($P < 0.01$; Figura 19a). La reducción en la producción de nitritos se asoció con una mejoría significativa en la actividad antimicobacteriana del macrófago ($P < 0.01$; Figura 19b).

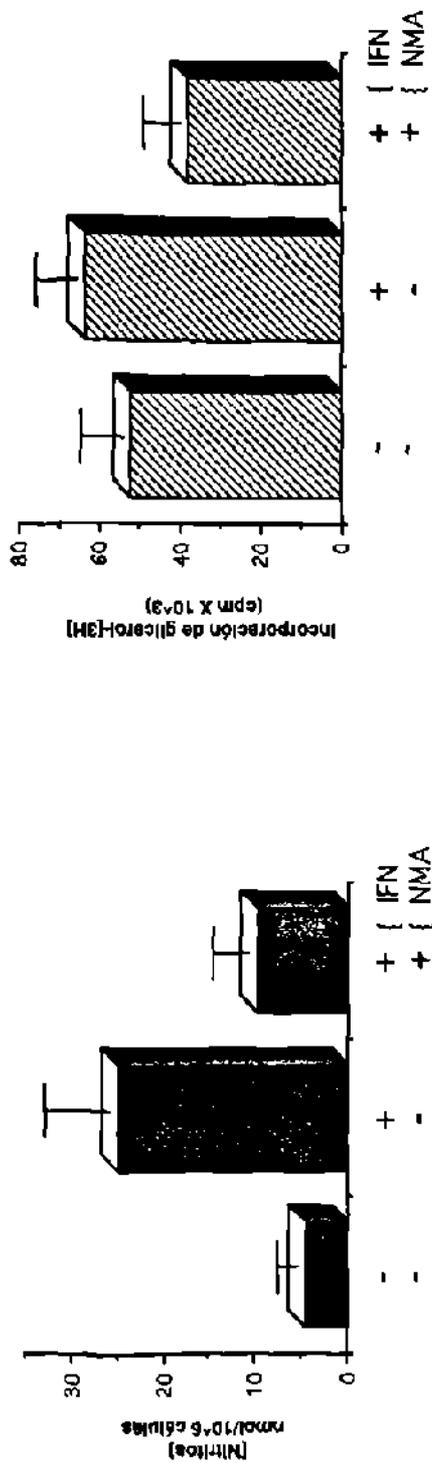
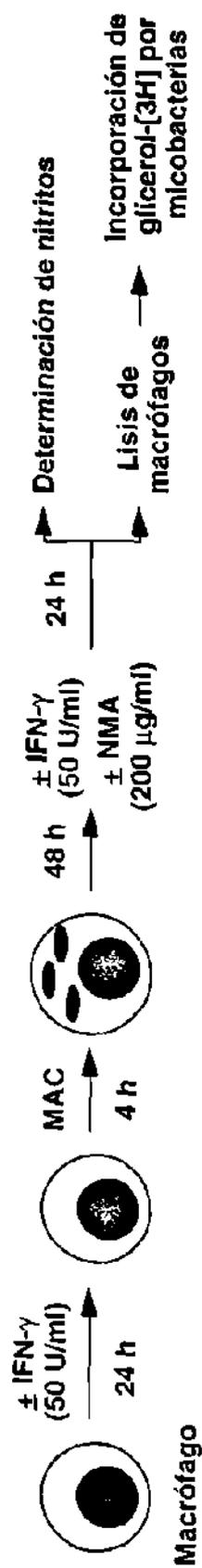


Figura 19. Efecto del NMA en la Respuesta del Macrófago Activado con IFN- γ en contra de MAC.

3.2.1.5 Combinación de IFN- γ con Clofazimina Libre o Liposomal.

En la Tabla 8 se observa que el pretratamiento con IFN- γ (50 U/ml), o el tratamiento postinfección con CLF o CLF-lip (0.075 μ g/ml), en forma individual reduce significativamente el número de colonias de MAC en comparación con controles sin tratar (18-27%; $P < 0.05$). La combinación de IFN- γ con CLF o CLF-lip resultó en un reducción adicional de 21% y 17% en el número de colonias, respectivamente, en comparación con la actividad individual del IFN- γ ($P < 0.05$), y una disminución adicional de 21% y 29% en el número de colonias de micobacterias en comparación con la actividad individual de la CLF o CLF-lip, respectivamente ($P < 0.05$). Los controles de liposomas vacíos y el solvente de la clofazimina a dosis equivalentes, no afectaron la viabilidad del macrófago y no tuvieron efecto en el crecimiento intracelular de MAC.

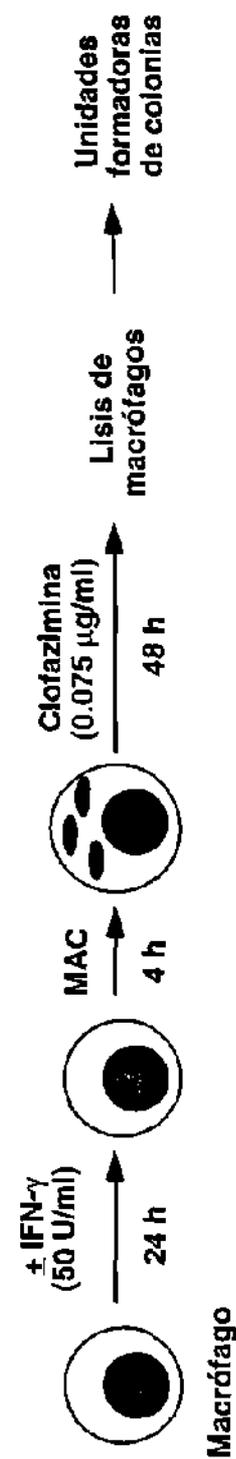
3.2.1.6 Actividad Postinfección del IFN- γ .

Se infectaron cultivos de macrófagos, se incubaron por 48 h, y se trataron con IFN- γ (50 U/ml) por 24, 48 y 72 h. Después de 24 h de tratamiento se observó sólo un 9% de inhibición del crecimiento de

TABLA 8

Actividad del IFN- γ en Combinación con CLF o CLF-lip en contra de MAC en Macrófagos

Tratamiento	UFC/ml de lisado de macrófagos (media \pm D.E.)	% Inhibición del crecimiento	P
Control sin tratar	$1.2 \pm 0.08 \times 10^5$		
IFN- γ	$8.7 \pm 0.04 \times 10^4$	26	< 0.05
CLF	$8.7 \pm 0.02 \times 10^4$	26	< 0.05
CLF-lip	$9.7 \pm 0.01 \times 10^4$	18	< 0.05
IFN- γ + CLF	$6.9 \pm 0.04 \times 10^4$	42	< 0.01
IFN- γ + CLF-lip	$7.2 \pm 0.02 \times 10^4$	39	< 0.01



MAC; no se observó efecto de tratamiento después de 48 h de tratamiento, mientras que el tratamiento de macrófagos con IFN- γ por 72 h indujo un 32% de incremento en el crecimiento de MAC ($P < 0.01$) al compararse con el control sin tratar (Figura 20a). El aumento en crecimiento intracelular de MAC que se observó después de 72 h de tratamiento con IFN- γ , correlacionó con un incremento significativo en la producción de nitritos por macrófagos (Figura 20b). El uso de NMA no sólo redujo los niveles de nitritos ($P < 0.01$; Figura 21a) sino que restauró la capacidad antibacteriana del macrófago estimulado por 72 h con IFN- γ ($P < 0.01$; Figura 21b).

3.2.2 Tratamiento con TNF- α

3.2.2.1 Producción de TNF- α .

En este estudio se observó que la preactivación con IFN- γ (50 U/ml) estimuló la producción de TNF- α por macrófagos infectados (los niveles de TNF- α que se determinaron 4 h después de la infección, fueron 5 veces más altos que los de macrófagos sin estimular, $P < 0.01$) y se asoció con inhibición del crecimiento de

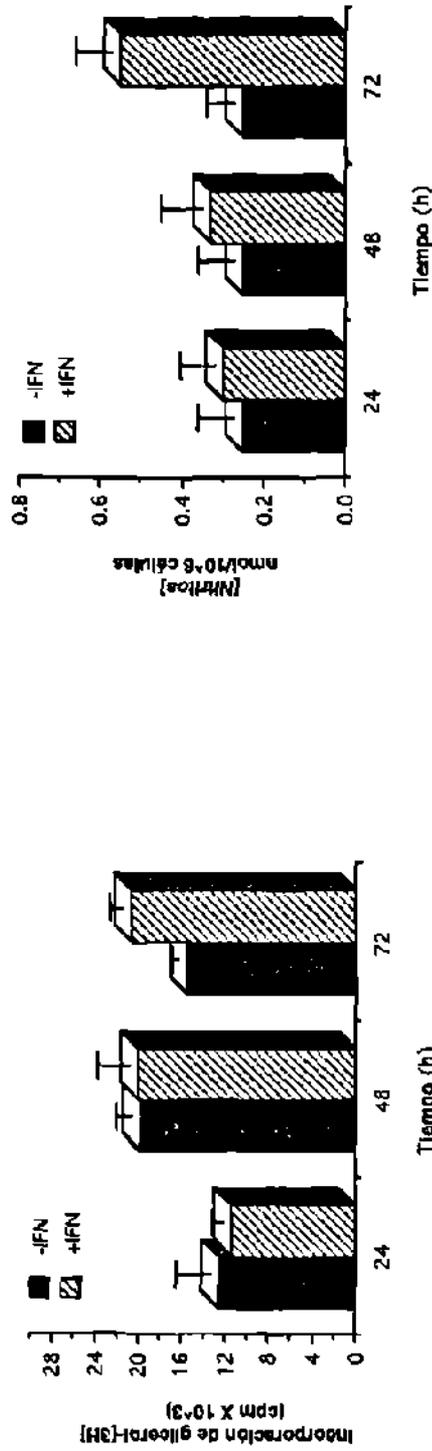
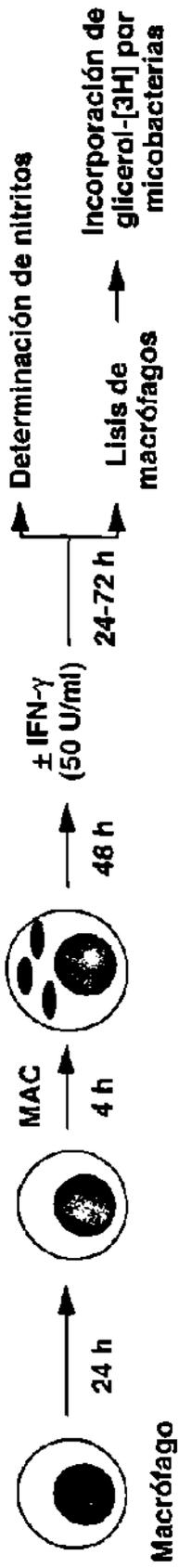


Figura 20. Actividad Postinfección del IFN- γ en el Crecimiento de MAC en Macrófagos.

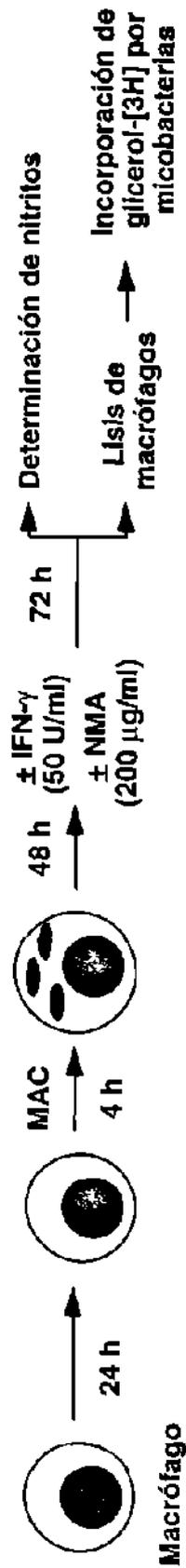


Figura 21. Efecto del NMA en la Respuesta Antibacteriana del Macrófago Estimulado con IFN- γ Postinfección.

MAC (Figura 22a). Además, se observó la producción de cantidades significativas de TNF- α por macrófagos preactivados con IFN- γ en comparación con controles sin tratar, durante las primeras horas posteriores a la infección ($P < 0.01$; Figura 22b).

3.2.2.2 Efecto del TNF- α Exógeno en la Respuesta Antibacteriana del Macrófago.

Con el objeto de investigar el efecto de TNF- α exógeno en la actividad antibacteriana del macrófago en contra de MAC, macrófagos infectados se trataron con TNF- α (30 U/ml) durante 4 días en presencia o ausencia de anticuerpos anti TNF- α . El tratamiento de macrófagos con TNF- α resultó en una reducción significativa del número de colonias (125×10^3 UFC/ml) comparado con el control sin tratar (180×10^3 UFC/ml) ($P < 0.01$); ésta respuesta se suprimió mediante el uso de anticuerpos específicos (250 unidades neutralizantes de TNF- α) ($P < 0.01$; Figura 23).

3.2.3 Inhibición por Anticuerpos contra TNF- α

Se suprimió la actividad antibacteriana del macrófago inducida

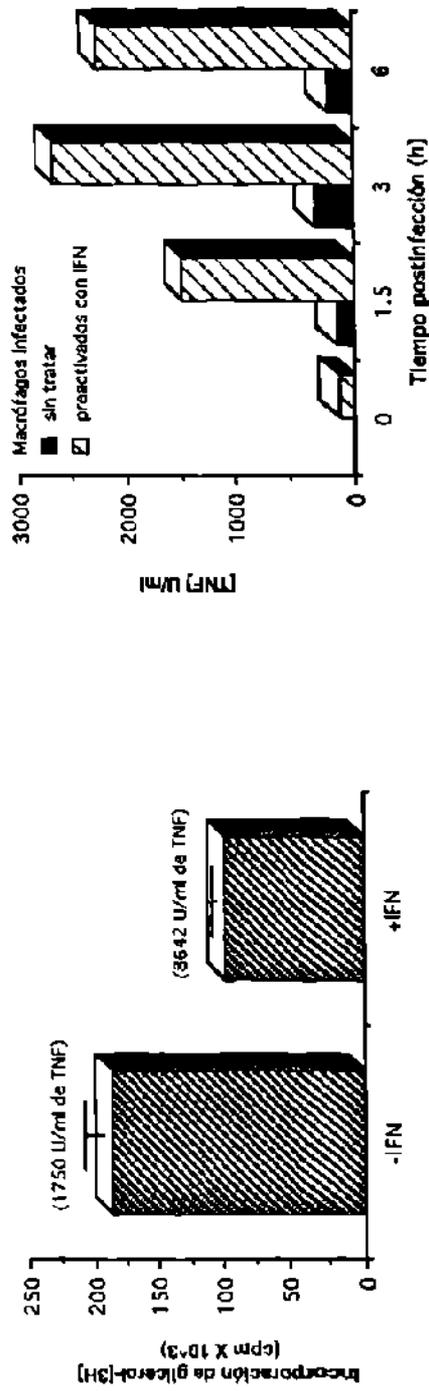
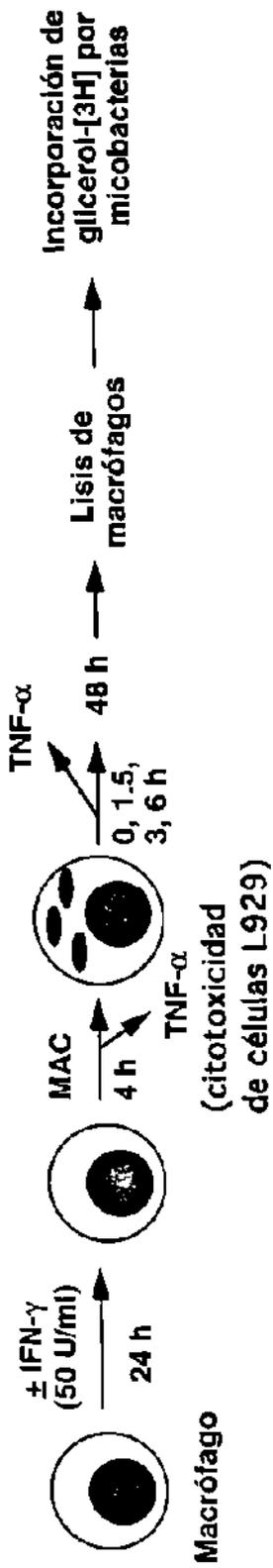


Figura 22. Efecto del IFN- γ en la Producción de TNF- α y en la Actividad Antibacteriana del Macrófago.

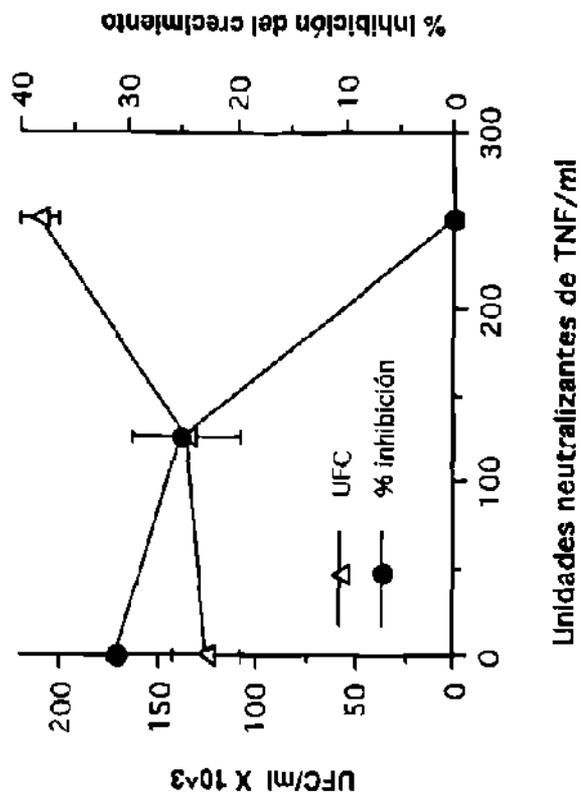
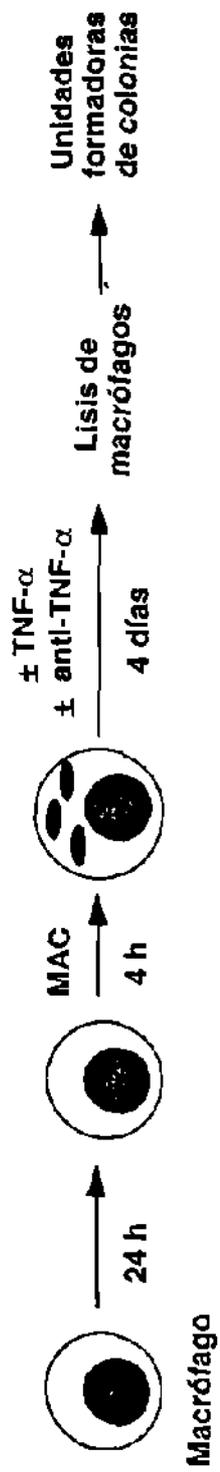


Figura 23. Supresión de la Actividad Antibacteriana del Macrófago Estimulado con TNF- α Mediante el Uso de Anticuerpos contra TNF- α .

por IFN- γ , mediante el uso de anticuerpos anti TNF- α . Se observó supresión total de la respuesta antibacteriana del macrófago, con 160 unidades neutralizantes de TNF- α que inactivaron 8000 U/ml de TNF- α ($P < 0.01$; Figura 24).

3.2.4 Inhibición por Pentoxifilina

Igualmente se suprimió la actividad antimicobacteriana del macrófago mediante el uso de pentoxifilina, un inhibidor específico de la expresión de TNF- α . Se observó supresión total de la respuesta del macrófago en contra de MAC con 100 $\mu\text{g/ml}$ de pentoxifilina ($P < 0.01$; Figura 25); dicha dosis del inhibidor no fue tóxica para el macrófago.

3.2.5 Combinación de TNF- α con Clofazimina Libre o Liposomal

En la Tabla 9 se observa que el tratamiento postinfección de macrófagos con TNF- α (30 U/ml), CLF o CLF-lip (0.075 $\mu\text{g/ml}$), en forma individual reduce en forma significativa el número de colonias de MAC en comparación con controles sin tratar (25-31% $P < 0.05$). La combinación de TNF- α con CLF o CLF-lip resultó en una disminu-

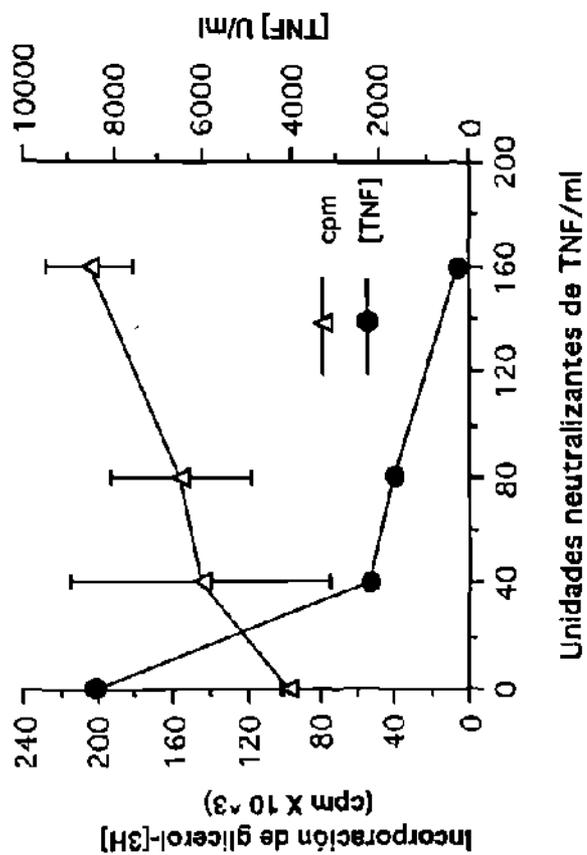
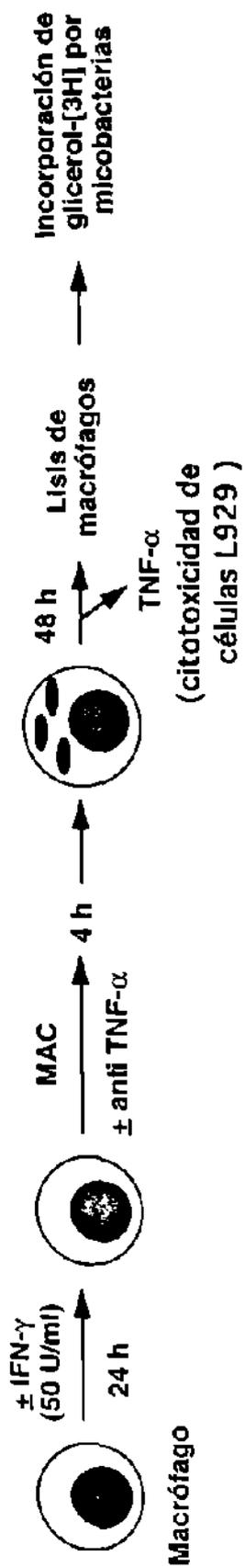


Figura 24. Supresión de la Respuesta Antimicrobacteriana del Macrófago Preactivado con IFN- γ Mediante el Uso de Anticuerpos contra TNF- α .

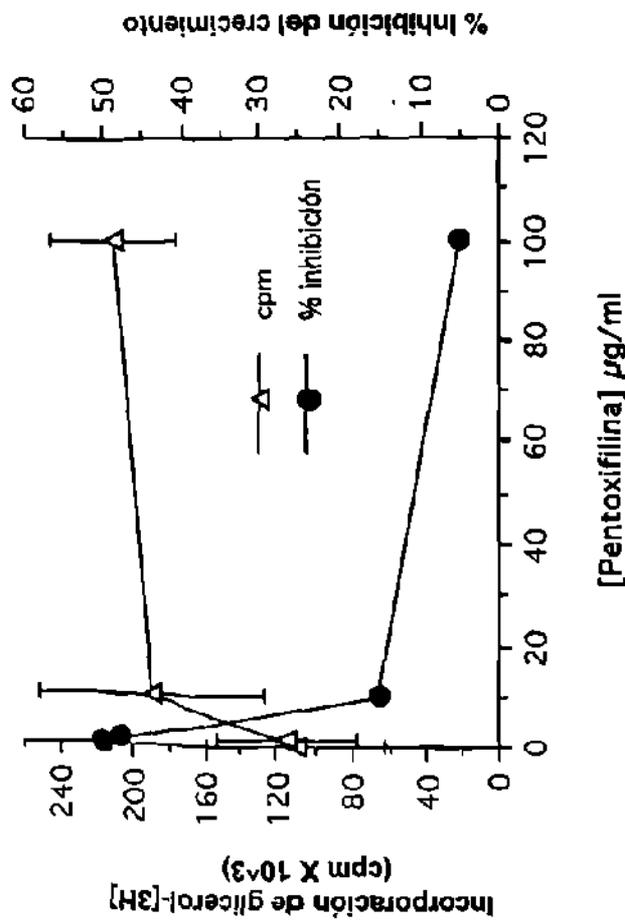
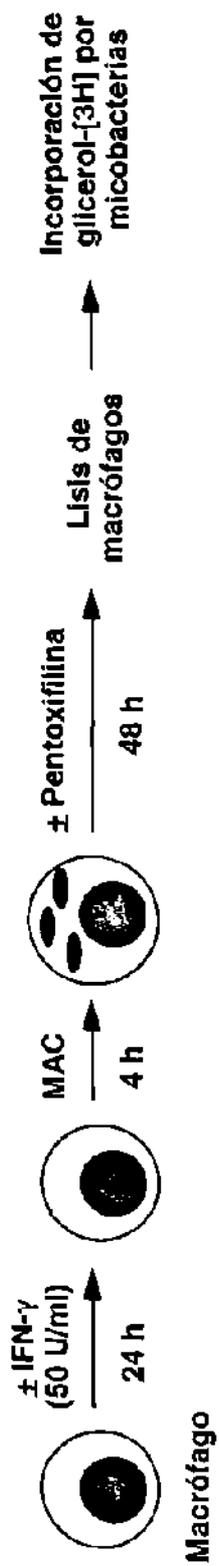
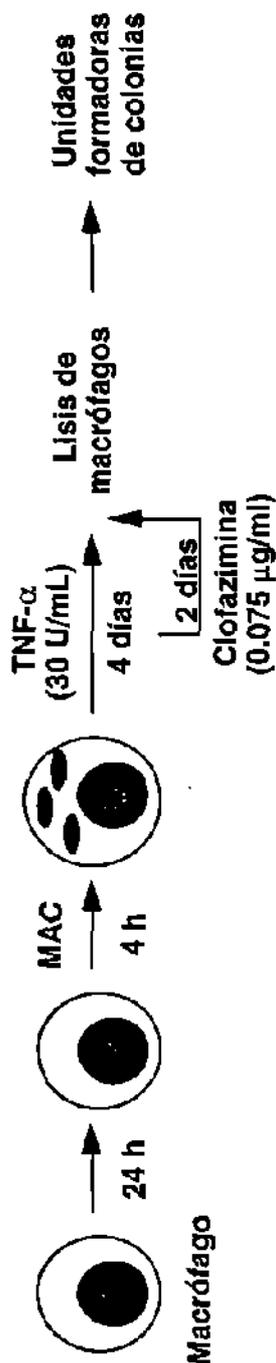


Figura 25. Efecto de la Pentoxifilina en la Respuesta del Macrófago Preactivado con IFN- γ en contra de MAC.

TABLA 9

Actividad del TNF- α en Combinación with CLF o CLF-lip en contra de MAC en Macrófagos

Tratamiento	UFC/ml de lisado de macrófagos (media \pm D.E.)	% Inhibición del crecimiento	P
Control sin tratar	$3.2 \pm 0.15 \times 10^5$		
TNF- α	$2.2 \pm 0.18 \times 10^4$	31	< 0.05
CLF	$2.3 \pm 0.30 \times 10^4$	28	< 0.05
CLF-lip	$2.4 \pm 0.35 \times 10^4$	25	< 0.05
TNF- α + CLF	$1.7 \pm 0.10 \times 10^4$	46.9	< 0.01
TNF- α + CLF-lip	$1.7 \pm 0.20 \times 10^4$	46.9	< 0.01



ción adicional del 23% en el número de colonias bacterianas en comparación con la actividad individual del TNF- α ($P < 0.05$), o una reducción adicional del 26% y 29% en el número de colonias de MAC en comparación con las actividades individuales de la CLF y la CLF-lip respectivamente ($P < 0.05$).

3.3 Estudios *In Vivo*

3.3.1 Efectos de la Clofazimina Liposomal, IFN- γ y NMA en la Infección por MAC *In Vivo*

En las Tablas 10 y 11 se muestran los efectos de la CLF-lip, IFN- γ y NMA en contra de la infección por MAC en ratones beige después de 7 y 19 días de tratamiento, respectivamente. Como se observa en la Tabla 10, el tratamiento con IFN- γ por 7 días indujo 10% ($P > 0.1$), 36% ($P > 0.1$) y 0% de reducción en el número de colonias en el hígado, bazo y pulmones, respectivamente, en comparación con el control sin tratar. El tratamiento con CLF-lip, sin embargo, se asoció con 54%, 64% y 81% de reducción en el número de colonias en el hígado, bazo y pulmones, respectivamente, en comparación con el control (liposomas vacíos) ($P < 0.01$). La

TABLA 10

Actividades de la CLF-lip, IFN- γ y NMA en contra de la Infeccción por MAC en Ratones Beige a los 7 días de Tratamiento

Tratamiento	UFC/gm X 10 ⁴ (media \pm D. E.)			
	Hígado	Bazo	Pulmones	
Control sin tratar	39 \pm 10	98 \pm 38	0.3 \pm 0.1	
IFN- γ	35 \pm 4	63 \pm 37	1.6 \pm 0.7	
CLF	13 \pm 1	64 \pm 6	0.64 \pm 0.2	
CLF-lip + IFN- γ	14 \pm 3	62 \pm 8	0.23 \pm 0.15	
CLF-lip+IFN- γ /NMA	12 \pm 4	19 \pm 7	0.8 \pm 0.3	
Liposomas vacíos	28 \pm 0.5	176 \pm 15	3.4 \pm 0.5	

NOTA: Los valores de infección a las 24 h fueron de 43 \pm 12, 62 \pm 12 y 1.5 \pm 0.14 en hígado, bazo y pulmones, respectivamente.

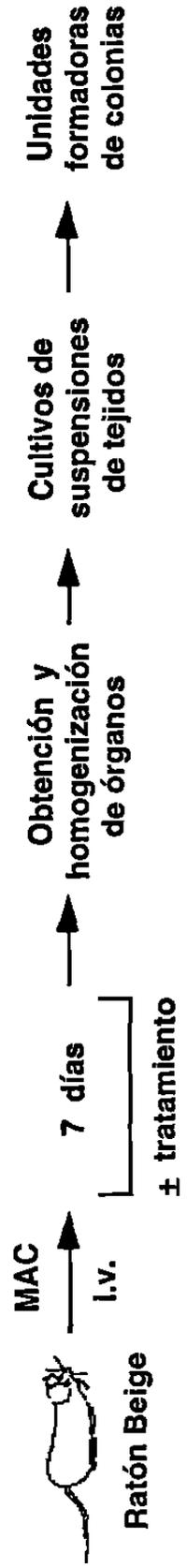


TABLA 11

Actividades de la CLF-lip, IFN- γ y NMA en contra de la Infección por MAC en Ratones Beige a los 19 días de Tratamiento

Tratamiento	UFC/gm X 10 ⁴ (media \pm D. E.)			
	Hígado	Bazo	Pulmones	
Control sin tratar	29 \pm 6	880 \pm 390	4 \pm 1	
IFN- γ	27 \pm 9	540 \pm 360	0.2 \pm 0.1	
CLF	12 \pm 3	1 06 \pm 50	0.5 \pm 0.3	
CLF-lip + IFN- γ	8.9 \pm 1	87 \pm 30	0.3 \pm 0.3	
CLF-lip+ IFN- γ /NMA	6 \pm 0.7	52 \pm 2	0.2 \pm 0.06	
Liposomas vacíos	64 \pm 12	540 \pm 260	18.6 \pm 9	

NOTA: Los valores de infección a las 24 h fueron de 43 \pm 12, 62 \pm 12 y 1.5 \pm 0.14 en hígado, bazo y pulmones, respectivamente.



combinación de CLF-lip e IFN- γ indujo 53%, 63% y 93% de reducción en el número de colonias en el hígado, bazo y pulmones, respectivamente, en comparación con el control (liposomas vacíos) ($P < 0.01$). Esta combinación se asoció con 60% ($P < 0.01$), 2% ($P > 0.1$) y 86% ($P < 0.01$) de reducción en el número de colonias de micobacterias en el hígado, bazo y pulmones, respectivamente, en comparación con la actividad individual del IFN- γ , y con 0%, 3% ($P > 0.1$) y 64% ($P = 0.05$) de disminución en el número de colonias en el hígado, bazo y pulmones, respectivamente, en comparación con la actividad individual de la CLF-lip. Además, la combinación de CLF-lip, IFN- γ y NMA demostró ser el tratamiento más efectivo en contra de la infección por MAC en el bazo a los 7 días de tratamiento (Tabla 10), o en el hígado y bazo a los 19 días de tratamiento (Tabla 11). En este estudio se ha observado que el uso de NMA mejora la actividad antimicrobiana del IFN- γ mediante la reducción de los niveles de nitritos (Figuras 19 y 21); el NMA en forma individual no tiene actividad antimicobacteriana (Figura 21). La combinación de CLF-lip, IFN- γ y NMA se asoció con 57%, 89% y 77% de reducción en el número de colonias en el hígado, bazo y

pulmones, respectivamente, en comparación con el control (liposomas vacíos) ($P < 0.01$). Esta combinación indujo 66%, 70% y 50% de disminución en el número de colonias en el hígado, bazo y pulmones, respectivamente, en comparación con la actividad individual del IFN- γ ($P < 0.01$), y con 8% ($P > 0.1$), 70% ($P < 0.01$) y 0% de reducción en el número de colonias en el hígado, bazo y pulmones, respectivamente, en comparación con la actividad individual de la CLF-lip. Dicha combinación también se asoció con 14% ($P > 0.1$), 69% ($P < 0.01$) y 0% de reducción en el número de colonias de micobacterias en el hígado, bazo y pulmones, respectivamente, en comparación con la combinación CLF-lip/IFN- γ (Tabla 10).

Además, se evaluó el efecto de los tratamientos a los 7 días de infección en comparación con la infección a las 24 h. El IFN- γ se asoció con 19% ($P > 0.1$), 0% y 0% de reducción en el número de colonias en el hígado, bazo y pulmones, respectivamente. La CLF-lip indujo 70% ($P < 0.01$), 0% y 57% ($P < 0.01$) de disminución en el número de colonias en el hígado, bazo y pulmones, respectivamente. La combinación de CLF-lip e IFN- γ indujo 67% ($P < 0.01$), 0% y 85% ($P < 0.01$) de reducción en el número de colonias en el hígado, bazo y

pulmones, respectivamente, y la combinación CLF-lip, IFN- γ y NMA se asoció con 72%, 69% y 47% de reducción en el número de colonias en el hígado, bazo y pulmones, respectivamente ($P < 0.01$) (Tabla 10).

La Tabla 11 muestra los efectos de la CLF-lip, IFN- γ y NMA a los 19 días postinfección. El tratamiento con IFN- γ indujo 7% ($P > 0.1$), 39% ($P > 0.1$) y 94% ($P < 0.01$) de disminución en el número de colonias de micobacterias en el hígado, bazo y pulmones, respectivamente, en comparación con el control sin tratar. El tratamiento con CLF-lip, sin embargo, se asoció con 81%, 80% y 97% de reducción en el número de colonias en el hígado, bazo y pulmones, respectivamente, en comparación con el control (liposomas vacíos) ($P < 0.01$). La combinación de CLF-lip e IFN- γ indujo 86%, 85% y 98% de reducción en el número de colonias en el hígado, bazo y pulmones, respectivamente, en comparación con el control (liposomas vacíos) ($P < 0.01$). Esta combinación se asoció con 67% ($P < 0.01$), 85% ($P < 0.01$) y 0% de disminución en el número de colonias de micobacterias en el hígado, bazo y pulmones, respectivamente, en comparación con la actividad individual del IFN- γ , y con 27%, 25% y 32% de reducción en el número de colonias en el hígado, bazo y pulmones,

respectivamente, en comparación con la actividad individual de la CLF-lip ($P > 0.1$). La combinación de CLF-lip, IFN- γ y NMA se asoció con 90%, 90% y 99% de reducción en el número de colonias en el hígado, bazo y pulmones, respectivamente, en comparación con el control (liposomas vacíos) ($P < 0.01$). Esta combinación indujo 77% ($P < 0.01$), 90% ($P < 0.01$) y 0% de disminución en el número de colonias en el hígado, bazo y pulmones, respectivamente, en comparación con la actividad individual del IFN- γ ($P < 0.01$), y con 48% ($P < 0.01$), 50% ($P < 0.01$) y 60% ($P > 0.1$) de disminución en el número de colonias de micobacterias en el hígado, bazo y pulmones, respectivamente, en comparación con la actividad individual de la CLF-lip. Dicha combinación también se asoció con 26% ($P < 0.01$), 40% ($P < 0.01$) y 41% ($P > 0.1$) de reducción en el número de colonias en el hígado, bazo y pulmones, respectivamente, en comparación con la combinación CLF-lip/IFN- γ (Tabla 11).

Además, se evaluó el efecto de los tratamientos a los 19 días de infección en comparación con la infección a las 24 h. El IFN- γ se asoció con 37% ($P > 0.1$), 0% y 85% ($P < 0.01$) de reducción en el número de colonias en el hígado, bazo y pulmones, respectivamente.

La CLF-lip indujo 72% ($P < 0.01$), 0% y 67% ($P < 0.01$) de disminución en el número de colonias en el hígado, bazo y pulmones, respectivamente. La combinación de CLF-lip e IFN- γ indujo 79% ($P < 0.01$), 0% y 77% ($P < 0.01$) de reducción en el número de colonias en el hígado, bazo y pulmones, respectivamente, y la combinación CLF-lip, IFN- γ y NMA se asoció con 86% ($P < 0.01$), 16% ($P > 0.1$) y 87% ($P < 0.01$) de reducción en el número de colonias en el hígado, bazo y pulmones, respectivamente (Tabla 11).

En éste estudio también se investigaron los efectos *in vivo* de la CLF-lip, IFN- γ y NMA en contra de la infección por MAC en macrófagos peritoneales. En la Tabla 12 se puede observar que el tratamiento con IFN- γ indujo 82% y 99% de reducción en la incorporación de glicerol radioactivo por los bacilos, a los 7 y 19 días postinfección, respectivamente, en comparación con el control sin tratar ($P < 0.01$). La CLF-lip, se asoció con 97% y 99% de disminución en la incorporación de glicerol radioactivo por las micobacterias, a los 7 y 19 días postinfección, respectivamente, en comparación con el control (liposomas vacíos) ($P < 0.01$). La combinación de IFN- γ y CLF-lip no mejoró los efectos individuales de

TABLA 12

Actividades *In Vivo* de la CLF-lip, IFN- γ y NMA en contra de la Infección por MAC en Macrófagos Peritoneales de Ratones Beige

Tratamiento	cpm (media \pm D. E)	
	7 días	19 días
Control sin tratar	3305 \pm 1070	73320 \pm 18030
IFN- γ	581 \pm 221	536 \pm 77
CLF	635 \pm 96	366 \pm 33
CLF-lip + IFN- γ	550 \pm 142	471 \pm 121
CLF-lip + IFN- γ NMA	557 \pm 32	376 \pm 74
Liposomas vacíos	23616 \pm 15642	52156 \pm 12401

NOTA: El valor para macrófagos no infectados fue de 200 cpm.



estos agentes (Tabla 12).

3.3.2 Actividad Profiláctica de la Clofazimina Liposomal en forma Individual o en Combinación con IFN- γ en contra de la Infección por MAC

Se evaluaron los efectos profilácticos de la CLF-lip y el IFN- γ en forma individual o en combinación en contra de MAC a los 7 y 19 días postinfección. Como se muestra en la Tabla 13, el tratamiento con CLF-lip se asoció con 93%, 95% y 93% de reducción en el número de colonias bacterianas en el hígado, bazo y pulmones, respectivamente, en comparación con el control (liposomas vacíos) ($P < 0.01$) a los 7 días postinfección. Además, la combinación CLF-lip/IFN- γ indujo 84%, 95% y 92% de reducción en el número de colonias bacterianas en el hígado, bazo y pulmones, respectivamente, en comparación con el control (liposomas vacíos) ($P < 0.01$). No se observó diferencia significativa con el uso de CLF-lip en combinación con IFN- γ .

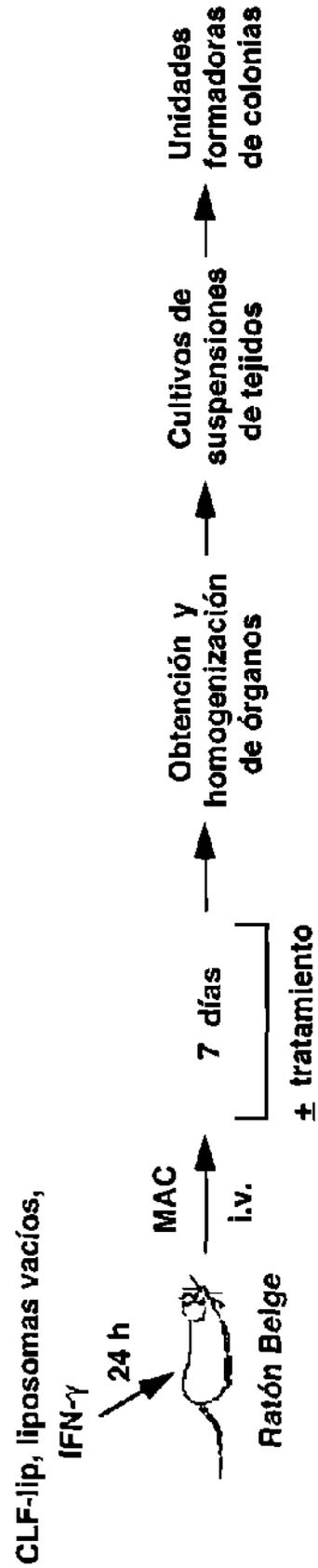
Además, la CLF-lip indujo 84% ($P < 0.01$), 24% ($P > 0.1$) y 80% ($P < 0.01$) de disminución en el número de colonias bacterianas en el hígado, bazo y pulmones, respectivamente, en comparación con la

TABLA 13

Actividad Profiláctica de la CLF-lip e IFN- γ en contra de la Infección por MAC en Ratones Beige a los 7 días de Tratamiento

Tratamiento	UFC/gm X 10 ⁴ (media \pm D. E.)			
	Hígado	Bazo	Pulmonas	
Control sin tratar	39 \pm 10	98 \pm 38	0.3 \pm 0.1	
CLF-lip	6.7 \pm 1.8	47 \pm 4	0.3 \pm 0.07	
CLF-lip + IFN- γ	15 \pm 0.7	48 \pm 16	0.38 \pm 0.2	
Liposomas vacíos	96 \pm 20	1020 \pm 120	4.6 \pm 2	

NOTA: Los valores de Infección a las 24 h fueron de 43 \pm 12, 62 \pm 12 y 1.5 \pm 0.14 en hígado, bazo y pulmones, respectivamente.



infección a las 24 h. La combinación de CLF-lip e IFN- γ se asoció con 65% ($P < 0.01$), 23% ($P > 0.1$) y 75% ($P < 0.01$) de reducción en el número de colonias bacterianas en el hígado, bazo y pulmones, respectivamente, en comparación con la infección a las 24 h. No se observó diferencia significativa entre la actividad de la CLF-lip y la combinación CLF-lip/IFN- γ (Tabla 13).

Igualmente se determinó el efecto profiláctico de la CLF-lip y del IFN- γ a los 19 días postinfección. En la Tabla 14 se observa que el tratamiento con CLF-lip se asoció con 95%, 98% y 98% de reducción en el número de colonias bacterianas en el hígado, bazo y pulmones, respectivamente, en comparación con el control (liposomas vacíos) ($P < 0.01$). Además, la combinación CLF-lip/IFN- γ indujo 97%, 99% y 99% de reducción en el número de colonias bacterianas en el hígado, bazo y pulmones, respectivamente, en comparación con el control (liposomas vacíos) ($P < 0.01$). No se observó diferencia significativa con el uso de CLF-lip en combinación con IFN- γ .

Además, la CLF-lip indujo 77% ($P < 0.01$), 0% y 63% ($P < 0.01$) de disminución en el número de colonias bacterianas en el hígado,

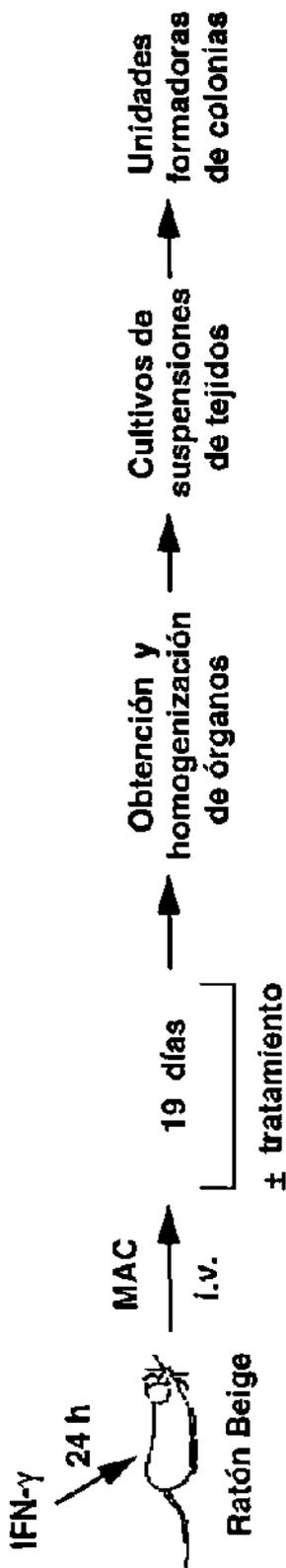
TABLA 14

Actividad Profiláctica de la CLF-lip e IFN- γ en contra de la Infección por MAC en Ratones Beige a los 19 días de Tratamiento

Tratamiento	UFC/gm X 10 ⁴ (media \pm D. E.)			
	Hígado	Bazo	Pulmones	
Control sin tratar	29 \pm 6	880 \pm 390	4 \pm 1	
CLF-lip	9.9 \pm 3	103 \pm 48	0.56 \pm 0.33	
CLF-lip+ IFN- γ	6.8 \pm 1	84 \pm 28	0.28 \pm 0.31	
Liposomas vacíos	200 \pm 50	6500 \pm 1800	33.6 \pm 1.5	

NOTA: Los valores de infección a las 24 h fueron de 43 \pm 12, 62 \pm 12 y 1.5 \pm 0.14 en hígado, bazo y pulmones, respectivamente.

CLF-lip, liposomas vacíos,



bazo y pulmones, respectivamente, en comparación con la infección a las 24 h. La combinación de CLF-lip e IFN- γ se asoció con 84% ($P < 0.01$), 0% y 81% ($P < 0.01$) de reducción en el número de colonias bacterianas en el hígado, bazo y pulmones, respectivamente, en comparación con la infección a las 24 h. No se observó diferencia significativa entre la actividad de la CLF-lip y la combinación CLF-lip/IFN- γ .

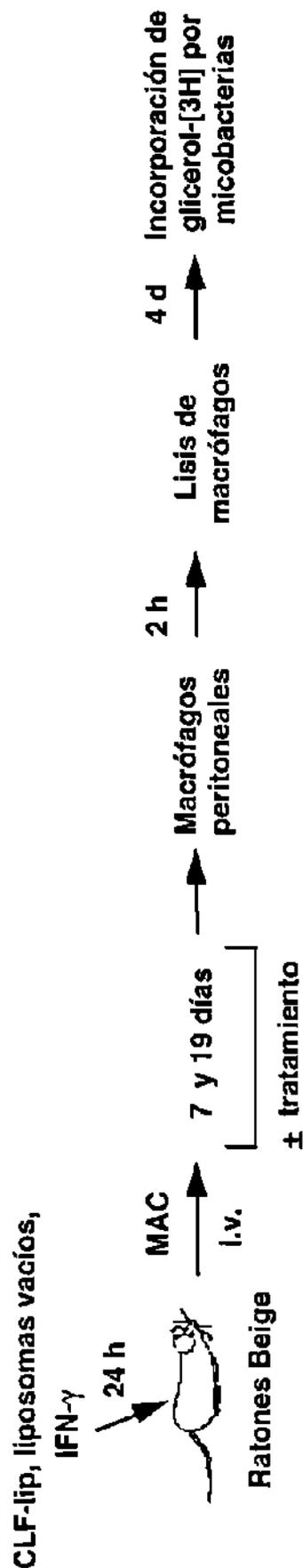
Se investigaron las actividades profilácticas *in vivo* de la CLF-lip en forma individual o en combinación con IFN- γ en contra de la infección por MAC en macrófagos peritoneales. La Tabla 15 muestra que el tratamiento con CLF-lip indujo 96% y 99% de reducción en la incorporación de glicerol radioactivo por las micobacterias, a los 7 y 19 días postinfección, respectivamente, en comparación con el control (liposomas vacíos) ($P < 0.01$). La combinación CLF-lip/IFN- γ se asoció con 93% y 99% de disminución en la incorporación de glicerol radioactivo por las micobacterias, a los 7 y 19 días postinfección, respectivamente, en comparación con el control (liposomas vacíos) ($P < 0.01$). La combinación CLF-lip/IFN- γ no mejoró el efecto individual de la CLF-lip.

TABLA 15

Actividad Profiláctica *In Vivo* de la CLF-lip e IFN- γ en contra de la Infección por MAC en Macrófagos Peritoneales de Ratones Beige

Tratamiento	cpm (media \pm D. E.)	
	7 días	19 días
Control sin tratar	3305 \pm 1070	73320 \pm 18030
CLF-lip	414 \pm 115	414 \pm 173
CLF-lip+ IFN- γ	672 \pm 93	479 \pm 147
Liposomas vacíos	9223 \pm 18301	47504 \pm 19584

NOTA: El valor para macrófagos no infectados fue de 200 cpm.



CAPITULO 4

DISCUSION

MAC es un patógeno oportunista que infecta a individuos con compromiso inmunológico, particularmente a pacientes con SIDA en quienes causa una alta mortalidad (178). MAC es fácilmente fagocitado por los macrófagos en donde los bacilos sobreviven y se replican. Entonces, para combatir exitosamente la infección por MAC, es esencial dirigir los antibióticos a los macrófagos; la encapsulación de drogas en liposomas facilita dicho proceso (268, 277, 279). Sin embargo, la infección por MAC es difícil de tratar debido a la resistencia intrínseca de la bacteria a gran variedad de antibióticos (174, 177, 178, 181, 333, 334). Por lo tanto, es necesario contar con drogas efectivas para el tratamiento de la infección diseminada causada por MAC.

Efecto de la Clofazimina

Se ha demostrado previamente que encapsular clofazimina en liposomas resulta muy efectivo para inhibir el crecimiento de MAC

(247). El objetivo primordial del presente estudio fue el de investigar el efecto de combinación de citocinas (IFN- γ y TNF- α) con clofazimina (libre y liposomal) en contra de la infección causada por MAC. Para llevar a cabo éste objetivo, fue necesario determinar el efecto individual de estos agentes antes de utilizar combinaciones. Por lo tanto, se estudiaron los efectos individuales de la CLF y la CLF-lip en las funciones del macrófago.

La viabilidad del macrófago se investigó en cultivos tratados con varias dosis de CLF o CLF-lip. Dosis de 0.037 a 1.2 $\mu\text{g/ml}$ no afectaron la viabilidad del macrófago, sin embargo, dosis mayores de 1.2 $\mu\text{g/ml}$ de CLF o de 2.5 $\mu\text{g/ml}$ de CLF-lip fueron tóxicas para los macrófagos (Figura 10).

En los experimentos sobre la incorporación de clofazimina por macrófagos, se observó que la infección redujo significativamente la incorporación de CLF o CLF-lip por macrófagos; sin embargo, la preactivación con IFN- γ mejoró la incorporación de CLF-lip por macrófagos infectados (Figura 15).

En los experimentos diseñados para estudiar la actividad antibacteriana de la clofazimina en los macrófagos, se demostró que tanto la CLF como la CLF-lip fueron efectivas para inhibir el

crecimiento intracelular de MAC, cuando ambas formas de la droga se utilizaron como agentes profilácticos y postinfección. La CLF y la CLF-lip tuvieron efectos comparables para inhibir el crecimiento intracelular de MAC (Figuras 11 y 12). Sin embargo, la retención de la clofazimina en los macrófagos fue mejor después de su encapsulación (Figura 13), sin observar pérdida de actividad o cristalización de la droga.

Los pacientes pueden tolerar los efectos colaterales ocasionados por la clofazimina (330), sin embargo, es preferible utilizar CLF-lip, ya que la droga puede ser llevada directamente al macrófago infectado y así incrementar su eficacia. Además, se puede reducir la dosis de la droga debido a que la CLF-lip tiende a acumularse en los macrófagos (227). Otra ventaja de utilizar CLF-lip es que se puede administrar por vía intravenosa facilitando así, el tratamiento de la infección diseminada por MAC.

Efecto del IFN- γ en la Actividad Antibacteriana del Macrófago

La sobrevivencia depende aparentemente de la virulencia de los bacilos; los organismos que no son virulentos son eliminados más eficientemente por los macrófagos que los virulentos. Se ha

reportado que la resistencia de los macrófagos contra micobacterias no virulentas depende de la producción de cantidades elevadas de TNF- α (163-165). De hecho, la respuesta natural del huésped en contra de MAC depende de las actividades de las citocinas IFN- γ y TNF- α (161, 166, 188, 191, 193, 194), ya que se ha observado que la muerte intracelular de MAC, se asocia con la producción de TNF- α por macrófagos pretratados con IFN- γ (161).

Aunque los macrófagos pueden ser estimulados con IFN- γ para inhibir el crecimiento de MAC (166, 188, 191, 193, 194), otros efectos que se han observado son, la promoción del crecimiento bacteriano o la ausencia de efecto activador del IFN- γ (161, 195, 196). Las diferencias de las actividades del IFN- γ en macrófagos en contra del crecimiento de MAC podrian estar relacionadas a varios factores: (a) origen de los macrófagos, (b) virulencia de las cepas de MAC y (c) grado de infección.

En este estudio se investigó el efecto del IFN- γ antes o después de la infección, en la actividad antibacteriana del macrófago en contra de MAC, y su relación con la producción de marcadores de activación del macrófago, como lo son los niveles de nitritos y TNF-

α . Se observó que el pretratamiento de macrófagos con varias dosis de IFN- γ redujo en forma significativa el crecimiento intracelular de MAC. Esta respuesta, sin embargo, no dependió de la dosis de IFN- γ , no se correlacionó con la producción de nitritos por macrófagos, ni se debió a una reducción en la fagocitosis de los bacilos debido a la preactivación de macrófagos con IFN- γ , como otros lo han sugerido (196) (la proporción de macrófagos residentes infectados con micobacterias fue de $38\% \pm 7.5$, mientras que el $36\% \pm 0.3$ de los macrófagos pretratados con IFN- γ fagocitaron micobacterias. (Figuras 14 y 16)). Se decidió utilizar la dosis de 50 U/ml de IFN- γ para los experimentos posteriores, ya que dosis mayores (se probaron hasta 1000 U/ml) no incrementaron el efecto antibacteriano del IFN- γ en macrófagos (Figura 16). Además, se observó una inhibición significativa del crecimiento bacteriano cuando los macrófagos se pretrataron con IFN- γ no sólo por 24 h, sino por 48 h, pero el pretratamiento por 72 h no tuvo efectos en la actividad antibacteriana del macrófago (Figura 17a). Esta última observación ha sido reportada previamente (161). La producción de nitritos no se correlacionó con la respuesta del macrófago en contra de MAC

(Figura 17b). Por el contrario, la producción de elevadas cantidades de nitritos disminuyó significativamente la respuesta antibacteriana del macrófago (Figura 18). La reducción en los niveles de nitritos por macrófagos preactivados con IFN- γ mediante el uso de NMA, restauró la capacidad antibacteriana del macrófago (Figura 19). La producción de óxido nítrico por macrófagos activados (324, 325) se ha asociado con inhibición del crecimiento intracelular de MAC (45). Por el contrario, existe evidencia de que el óxido nítrico no participa en contra de infecciones por MAC (50, 193), o de la resistencia de MAC hacia el óxido nítrico (51). Además, se ha observado que el óxido nítrico puede inhibir las funciones microbicidas del macrófago (326) y suprimir la proliferación de linfocitos T (327).

Por otro lado, el tratamiento postinfección de macrófagos con IFN- γ causó un patrón diferente de respuesta del macrófago a la infección, que el observado para macrófagos preactivados con IFN- γ . Como se puede observar en la Figura 20a, el tratamiento de macrófagos infectados con IFN- γ por 24 h indujo 9% de inhibición del crecimiento de MAC; no se observó actividad al tratar macrófagos

por 48 h, sin embargo, el tratamiento de macrófagos con IFN- γ por 72 h, promovió el crecimiento bacteriano en un 32%, ésta última observación ha sido previamente reportada por otros (161). La promoción del crecimiento de MAC se asoció con el incremento en la producción de nitritos (Figura 20b); el uso de NMA no sólo redujo los niveles de nitritos, sino que restauró la capacidad antibacteriana del macrófago (Figura 21). Esto sugiere que el óxido nítrico puede producirse a niveles que afectan la función microbicida del macrófago.

Efecto del TNF- α en las Funciones del Macrófago en contra de MAC

El TNF- α ha mostrado ser esencial en la resistencia del huésped en contra de infecciones por MAC (161, 328). En éste estudio se observó que la preactivación de macrófagos con IFN- γ incrementa en forma significativa la producción de TNF- α . El aumento en los niveles de TNF- α se correlacionó con una inhibición significativa del crecimiento intracelular de MAC (Figura 22). Se ha observado que las cepas virulentas de MAC inducen bajos niveles de TNF- α por macrófagos (163-165). En este estudio, se demostró que los

macrófagos producen niveles muy bajos de TNF- α después de haber sido infectados con MAC, que es una cepa virulenta. Sin embargo, la producción de TNF- α se incrementó significativamente mediante la preactivación de los macrófagos con IFN- γ (Figura 22).

La producción de TNF- α se correlacionó con la inhibición del crecimiento de MAC ya que el uso de anticuerpos específicos contra TNF- α , suprimió la respuesta antimicobacteriana del macrófago (Figuras 23 y 24); se ha reportado que la inactivación de TNF- α por su antisuero específico, mejora la infección experimental con MAC (328). Otra estrategia que se diseñó para confirmar el papel del TNF α en la respuesta del macrófago contra MAC, fue el uso de pentoxifilina, un inhibidor específico de la producción de TNF- α (319, 320). Como se muestra en la Figura 25, la pentoxifilina suprimió la actividad de macrófagos preactivados con IFN- γ en contra de MAC, sugiriendo que el TNF- α estaba involucrado en la respuesta antibacteriana del macrófago. Se ha reportado previamente que la pentoxifilina disminuye en forma significativa la actividad del macrófago en contra de MAC (329). Además, se ha observado en éste estudio, que el uso de TNF- α exógeno (30 U/ml)

estimuló los mecanismos antibacterianos del macrófago. Esta dosis se seleccionó en base a estudios previos que indicaron que mayores concentraciones de TNF- α (se probaron hasta 1000 U/ml) no mejoraron la capacidad microbicida del macrófago (estos datos no se muestran).

Actividades del IFN- γ y TNF- α en Combinación con Clofazimina en contra de MAC en Macrófagos

Se estudió el efecto de combinación del IFN- γ y TNF- α con la CLF o CLF-lip con el objeto de mejorar la capacidad individual de los mismos, para reducir el crecimiento de MAC en los macrófagos. Se ha demostrado previamente que las combinaciones de citocinas con drogas antimicrobianas, han sido efectivas en el tratamiento de infecciones por MAC (198, 307-310). En los experimentos que se reportan en este estudio, se observó que la respuesta de macrófagos al pretratamiento con IFN- γ , o al tratamiento con TNF- α , mejoró notablemente la actividad de la CLF o CLF-lip en contra de MAC en macrófagos (Tablas 8 y 9). El mecanismo exacto de la interacción de estos agentes no está claro. El IFN- γ puede estimular la actividad

antibacteriana del macrófago en contra de MAC mediante la inducción de TNF- α (Figura 15) (161, 166). El TNF- α , a su vez, ha demostrado ser un factor clave en contra de MAC (161, 328). Además, se ha reportado que el TNF- α tiene la capacidad de incrementar los efectos pro-oxidantes de la clofazimina, los cuales pudieran estar involucrados en la actividad antimicobacteriana del macrófago (250, 252).

Actividades In Vivo de la Clofazimina Liposomal, IFN- γ y NMA en contra de la Infección por MAC

Se evaluaron los efectos del IFN- γ en combinación con CLF-lip en ratones beige, una vez que se había demostrado su efectividad *in vitro* en contra de la infección por MAC. Se ha investigado previamente el uso de TNF- α en el tratamiento de animales infectados con MAC (161, 328); sin embargo, los efectos tóxicos del TNF- α limitan su uso (331). Por lo tanto, se decidió utilizar IFN- γ debido a su baja toxicidad para los animales y a su capacidad de inducir la producción de TNF- α por los macrófagos (166). Además, se seleccionó a la CLF-lip en vez de la forma libre de la droga, ya que se

pueden emplear concentraciones mayores de la droga encapsulada en liposomas sin causar toxicidad para los animales.

Los resultados obtenidos éste estudio muestran que el uso de CLF-lip indujo una reducción significativa en la infección por MAC en el hígado, bazo y pulmones. La combinación de CLF-lip e IFN- γ no mejoró el efecto individual de la CLF-lip. Sin embargo, la adición de NMA a dicha combinación resultó en una disminución significativa en la infección en hígado y bazo, en comparación con los efectos de la CLF-lip y del IFN- γ en forma individual o en combinación (Tablas 10 y 11). En adición a los probables efectos de interacción entre el IFN- γ y la CLF-lip que se discutieron previamente, se ha observado que la preactivación de macrófagos con IFN- γ mejora la incorporación de CLF-lip (Figura 15). Además, se ha observado que el NMA puede regular la producción de niveles de óxido nítrico potencialmente tóxicos para el macrófago, que pudieran afectar la viabilidad y las funciones microbicidas del mismo tales como la fagocitosis y la producción de superóxido (326). Igualmente, se ha reportado que el NMA reduce la producción de óxido nítrico por macrófagos humanos en respuesta a *Mycobacterium avium* lo cual parece reducir su

crecimiento intracelular (332).

Se observó que el tratamiento con IFN- γ no redujo la infección en hígado y bazo. Sin embargo, los macrófagos peritoneales respondieron bien a ésta terapia (99% de reducción de la infección en comparación con el control sin tratar) (Tablas 10-12). En éste estudio se ha demostrado que el uso de IFN- γ , antes o después de la infección, determina el efecto de la citocina en la infección por MAC (Figuras 16 y 20). Los datos que se presentan en éste trabajo demuestran que la preactivación de macrófagos con IFN- γ , induce la producción de TNF- α y de ésta manera se estimula la actividad microbicida del macrófago en contra de MAC (Figuras 16 y 22). Sin embargo, el uso de IFN- γ después de la infección, no tuvo efecto en contra de MAC o se asoció con un aumento significativo del crecimiento intracelular de MAC (Figura 20). Por lo tanto, es posible que la ausencia de efecto que se observa con el uso de IFN- γ en contra de la infección por MAC en el hígado y bazo, y el efecto significativo que tiene el IFN- γ en contra de MAC en macrófagos peritoneales, se relacione a la actividad de ésta citocina antes o después de la infección. Además, se observó que el tratamiento con

IFN- γ reduce en forma significativa la infección en los pulmones después de 19 días de tratamiento (Tabla 11). Esta respuesta podría ser el resultado de preactivación de macrófagos con IFN- γ antes de la infección, como se observa en la Figura 16.

Actividad Profiláctica In Vivo de la CLF-lip, IFN- γ y NMA en contra de la Infección por MAC

En éste estudio también se observó que la CLF-lip tenía efecto profiláctico en contra de la infección por MAC en hígado, bazo y pulmones. Sin embargo, la combinación con IFN- γ no mejoró la actividad de la CLF-lip (Tablas 13 y 14). El efecto de la CLF-lip en profilaxis es alentador, ya que se carece de drogas efectivas en contra de MAC. Hasta hoy, la rifabutina es la única droga que se ha probado como agente profiláctico en contra de la enfermedad causada por MAC; sin embargo, la toxicidad de ésta droga para pacientes con SIDA limita su uso (311). Además, la CLF-lip redujo la infección en macrófagos peritoneales cuando se utilizó en forma profiláctica; sin embargo, la combinación de CLF-lip e IFN- γ no mejoró sus efectos individuales en contra de MAC (Tabla 15).

CAPITULO 5

CONCLUSIONES

La infección por el complejo *Mycobacterium avium-M. intracellulare* (MAC) es una de las causas más comunes de bacteremia en pacientes con SIDA. MAC sobrevive en los macrófagos y la infección es difícil de tratar debido a la resistencia de éste organismo a muchos antibióticos. La severa inmunosupresión que padecen los pacientes con SIDA, que se asocia a niveles reducidos de linfocitos T cooperadores y a la deficiencia de dichas células para producir IFN- γ , constituye un factor adicional y muy significativo involucrado en la infección diseminada por MAC. El IFN- γ induce la producción de TNF- α y éste es un factor determinante en la resistencia del huésped en contra de la infección por MAC. La sobrevivencia de los pacientes con SIDA que están infectados por MAC es significativamente menor que la de los pacientes no infectados.

Se investigó el efecto de activar macrófagos con IFN- γ o TNF- α

en un intento de mejorar la actividad intracelular de la clofazimina en contra de MAC. La CLF y la CLF-lip tienen actividad antibacteriana en macrófagos, cuando se usan antes o después de la infección. A pesar de que los pacientes pueden tolerar los efectos colaterales de la clofazimina, la CLF-lip tiene la ventaja de acumularse en los macrófagos y de ésta manera se incrementa su eficacia en contra de MAC. La activación de macrófagos con citocinas inhibió el crecimiento de MAC. Así, la eficacia de la CLF o CLF-lip en contra de MAC en macrófagos, se incrementó cuando la clofazimina se combinó con IFN- γ o TNF- α . La relevancia de utilizar regímenes inmunoterapéuticos reside en atacar a MAC en forma simultánea por diferentes mecanismos: el antimicrobiano, por la toxicidad directa de la droga contra MAC; y el inmunomodulador, mediante la activación de la respuesta microbicida del macrófago.

En éste estudio se demostró que el uso de IFN- γ , antes o después de la infección, determina el destino de MAC en macrófagos. Si los macrófagos son estimulados con el IFN- γ antes de ser infectados, se inhibe el crecimiento de MAC debido a la producción de TNF- α . Por el contrario, el tratamiento de macrófagos con IFN- γ

no tiene efecto antibacteriano si se usa después de la infección; de hecho, en éste estudio se observó que el IFN- γ utilizado postinfección promueve el crecimiento micobacteriano. Este efecto se debe probablemente a la producción de óxido nítrico, ya que se suprimió mediante el uso de NMA.

El uso *in vivo* de la CLF-lip, IFN- γ y NMA en combinación, resultó en una reducción significativa de la infección en hígado, bazo y pulmones en comparación con los efectos individuales o en combinación de la CLF-lip y el IFN- γ . Es posible que el NMA incremente la eficacia del IFN- γ , mediante la reducción de los niveles de óxido nítrico que pudieran ser tóxicos para el macrófago (326). Además, tanto el IFN- γ como la CLF-lip redujeron en forma significativa la infección *in vivo* en los macrófagos peritoneales.

REFERENCIAS

1. Metchnikoff, E. Lectures on the comparative pathology of inflammation. Reprinted 1968. Dove Publications, New York, N. Y. (1891).
2. Metchnikoff, E. Immunity in infective diseases. F. G. Binnie (ed.), Cambridge University Press, Trans. London (1905).
3. Van Furth, R., Cohn, Z. A., Hirsch, J. G., Humphrey, J. H., Spector, W. G. y Langevoort, H. L. The mononuclear phagocyte system: a new classification of macrophages, monocytes and their precursor cells. *Bull. Wild. Hlth. Org.* 46:845-852. (1972).
4. Aschoff, L. Das reticulo-endotheliale system. *Ergebn. inn. Med. Kinderheilk.* 26:1-118. (1924).
5. Werb, Z. How the macrophage regulates its extracellular environment. *Am. J. Anatomy.* 166:237-256. (1983).
6. The Lancet, Editorial. 8160:130-132. (1980).
7. Van Furth, R. Cells of the mononuclear phagocyte system: nomenclature in terms of sites and conditions. *In: Mononuclear phagocytes*, R. van Furth (ed.). Martinus Nijhoff Publishers, The Hague-Boston-London, p. 1-30. (1980).
8. Van Furth, R. Production and migration of monocytes and kinetics of macrophages. *In: Mononuclear phagocytes*, R. van Furth (ed.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht-Boston-London, p. 3-12. (1992).
9. Wisse, E. On the Kupffer cell origin of Kupffer cells. *Blood Cells* 6:91-92. (1980).

10. Daems, W. T. y de Bakker, J. M.. Do resident macrophages proliferate ? Immunobiol. 161:204-212. (1982).
11. Tarling, J., Lin, H. y Hsu, F. Self renewal of pulmonary macrophages: evidence from radiation chimera studies. J. Leukoc. Biol. 42:443-450. (1987).
12. Wijffels, J. F., Hendrickx, R. J., Steenbergen, J. J. E., Eestermans, I. L. y Beelen, R. H. J. Milky spots in the mouse omentum may play an important role in the origin of peritoneal macrophages. Res. Immunol. 143:401-409. (1992).
13. Osbaldiston, G. W., Sullivan, R. J. y Fox, A. Cytochemical demonstration of esterases in peripheral blood leukocytes. Am. J. Vet. Res. 39:683-685. (1978).
14. Van Furth, R., Diesselhoff, M. M. C., Raeburn, J. A., van Zet, T., Crofton, R. y van Blussé, O. A. A. Characteristics, origin and kinetics of human and murine mononuclear phagocytes. *In: Mononuclear phagocytes. Functional aspects.* R. van Furth (ed.). Martinus Nijhoff Publishers, The Hague-Boston-London, p. 279-298. (1980).
15. McClelland, D. B. L. y van Furth, R. *In vitro* synthesis of lysozyme by human and mouse tissues and leukocytes. Immunology 28:1099-1114. (1975).
16. Bursucker, I. y Goldman, R. Derivation of resident and inflammatory peritoneal macrophages from precursor cells differing in 5'-nucleotidase activity. J. Reticuloendothel. Soc. 26:205-208. (1979).
17. Wachsmuth, E. D. y Stoye, J. P. Aminopeptidase on the surface of differentiating macrophages: concentration changes on individual cells in culture. J. Reticuloendothel. Soc. 22:485-497. (1977).

18. Edelson, P. J. y Cohn, Z. A. 5'-nucleotidase activity of mouse peritoneal macrophages. I. Synthesis and degradation in resident and inflammatory populations. *J. Exp. Med.* 144:1581-1595. (1976).
19. Hubber, H. y Fudenberg, H. H. The interaction of monocytes and macrophages with immunoglobulins and complement. *Ser. Haematol.* 3:160-175. (1970).
20. Rabinovitch, M. *Macrophage spreading in vitro.* *In: Mononuclear phagocytes in infection, immunity and pathology*, R. van Furth (ed.). Blackwell Scientific Publications, Oxford-London-Edinburgh-Melbourne, p. 1-87. (1975).
21. Van Furth, R. Mononuclear phagocytes in inflammation. *In: Handbook of experimental pharmacology*, vol 50/1, J. R. Vane y S. H. Ferreira (eds.). Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, p. 68-105. (1978).
22. Mackaness, G. B. Cellular resistance to infection. *J. Exp. Med.* 116:381-407. (1962).
23. Ruskin, J., McIntosh, M. y Remington, J. S. Studies on the mechanisms of resistance to phylogenetically diverse organisms. *J. Immunol.* 103:252-259. (1969).
24. Steigbigel, R. T., Lambert, L. H. y and Remington, J. S. Phagocytic and bactericidal properties of normal human monocytes. *J. Clin. Invest.* 53:131-142. (1974).
25. Adams, D. O. y Snyderman, R. Do macrophages destroy nascent tumours ? *J. Natl. Cancer Inst.* 62:1341-1345. (1979).
26. Adams, D. O. Macrophage activation and secretion. *Fed. Proc.* 41:2193-2197. (1982).
27. Adams, D. O., Johnson, W. J. y Marino, P. A. Mechanisms of target destruction in macrophage-mediated tumor

cytotoxicity. Fed. Proc. 41:2212-2221. (1982).

28. Gorczynski, R. M. Control of the immune response: role of macrophages in regulation of antibody and cell-mediated immune responses. Scan. J. Immunol. 5:1031-1047. (1976).
29. Unanue, E. R. The regulatory role of macrophages in antigenic stimulation, part two: symbiotic relationship between lymphocytes and macrophages. Adv. Immunol. 31:1-136. (1981).
30. Howie, S. y McBride, W. H. Cellular interactions in thymus-dependent antibody responses. Immunol. Today 3:273-278. (1982).
31. Nathan, C. F., Murray, H. W. y Cohn, Z. A. The macrophage as an effector cell. N. Engl. J. Med. 303:622-626. (1980).
32. Douglas, S. D. Mononuclear phagocytes and tissue regulatory mechanisms. Dev. Comp. Immunol. 4:7-10. (1980).
33. Silverstein, S. C. Membrane receptors and the regulation of mononuclear phagocyte effector functions. Adv. Exp. Med. Biol. 155:21-31. (1980).
34. Morahan, P. S. Editorial: Macrophage nomenclature: where are we going ? J. Reticuloendothel. Soc. 27:223-231. (1980).
35. Meltzer, M. S., Ruco, L. P., Boraschi, D. y Nacy, C. A. Macrophage activation for tumor cytotoxicity: analysis of intermediary reactions. J. Reticuloendothel. Soc. 26:403-415. (1979).
36. Meltzer, M. S., Occhionero, M. y Ruco, L. P. Macrophage activation for tumor cytotoxicity: regulatory mechanisms for induction and control of cytotoxic activity. Fed. Proc. 41:2198-2205. (1982).

37. Ruco, L. P. y Meltzer, M. S. Macrophage activation for tumor cytotoxicity: development of macrophage cytotoxic activity requires completion of a sequence of short-lived intermediary reactions. *J. Immunol.* 121:2035-2042. (1978).
38. Nathan, C. F. y Gabay, J. Antimicrobial mechanisms of macrophages. *In: Mononuclear phagocytes*, R. van Furth (ed.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht-Boston-London, p. 259-267. (1992).
39. Bermudez, L. E. M. y Young, L. S. Oxidative and non-oxidative intracellular killing of *Mycobacterium avium* complex. *Microb. Pathog.* 7:289-298. (1989).
40. Stuehr, D. J. y Marletta, M. A. Mammalian nitrate biosynthesis: mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 82:7738-7742. (1985).
41. Nathan, C. F. Macrophage microbicidal mechanisms. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 77:620-630. (1983).
42. Gangadharam, P. R. J. y Edwards III, C. K. Release of superoxide anion from resident and activated mouse peritoneal macrophages infected with *Mycobacterium intracellulare*. *Am. Rev. Respir. Dis.* 130:834-838. (1984).
43. Gangadharam, P. R. J. y Pratt, P. F. Susceptibility of *Mycobacterium intracellulare* to hydrogen peroxide. *Am. Rev. Respir. Dis.* 130:309-311.
44. Vladimirov, Y. A., Olenov, V. I., Suslova, T. B. y Cheremisina, Z. P. Lipid peroxidation in mitochondrial membrane. *Adv. Lipid Res.* 17:173-247.
45. Nathan, C. y Hibbs Jr., J. B. Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Curr. Opin. Immunol.*

3:65-70. (1991).

46. Fortier, A. H., Polsinelli, T., Green, S. J. y Nacy, C. A. Activation of macrophages for destruction of *Francisella tularensis*: identification of cytokines, effector cells, and effector molecules. *Infect. Immun.* 60:817-825. (1992).
47. Denis, M. Interferon-gamma-treated murine macrophages inhibit growth of tubercle bacilli via the generation of reactive nitrogen intermediates. *Cell. Immunol.* 132:150-157. (1991).
48. Becjerman, K. P., Rogers, H. W., Corbett, J. A., Schreiber, R. D., McDaniel, M. L. y Unanue, E. R. Release of nitric oxide during T cell-independent pathway of macrophage activation. Its role in resistance to *Listeria monocytogenes*. *J. Immunol.* 150:888-895. (1993).
49. Denis, M. Tumor necrosis factor and granulocyte macrophage-colony stimulating factor stimulate human macrophages to restrict growth of virulent *Mycobacterium avium* and to kill avirulent *M. avium*: killing effector mechanism depends on the generation of reactive nitrogen intermediates. *J. Leukoc. Biol.* 49:380-387. (1991).
50. Bermudez, L. E. Differential mechanisms of intracellular killing of *Mycobacterium avium* and *Listeria monocytogenes* by activated human and murine macrophages. The role of nitric oxide. *Clin. exp. Immunol.* 91:277-281. (1993).
51. Doi, T., Ando, M., Akaike, T., Suga, M., Sato, K. y Maeda, H. Resistance to nitric oxide in *Mycobacterium avium* complex and its implication in pathogenesis. *Infect. Immun.* 61:1980-1989. (1993).
52. Alspaugh, J. A. y Granger, D. L. Inhibition of *Cryptococcus*

neoformans replication by nitrogen oxides supports the role of these molecules as effectors of macrophage-mediated cytostasis. *Infect. Immun.* 59:2291-2296. (1991).

53. Liew, F. Y., Li, Y. y Millott, S. Tumour necrosis factor (TNF-alpha) in leishmaniasis. II. TNF-alpha-induced macrophage leishmanicidal activity is mediated by nitric oxide from L-arginine. *Immunology* 71:556-559. (1990).
54. Mael, J., Flansijn, A. y Buchmuller-Rouiller, Y. Killing of *Leishmania* parasites in activated murine macrophages is based on an L-arginine-dependent process that produces nitrogen derivatives. *J. Leukoc. Biol.* 49:73-82. (1991).
55. Green, S. J., Meltzer, M. S., Hibbs Jr., J. B. y Nacy, C. A. Activated macrophages destroy intracellular *Leishmania major* amastigotes by an L-arginine-dependent killing mechanism. *J. Immunol.* 144:278-283. (1990).
56. Muñoz-Fernández, M. A., Fernández, M. A. y Fresno, M. Synergism between tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma on macrophage activation for the killing of intracellular *Trypanosoma cruzi* through a nitric oxide-dependent mechanism. *Eur. J. Immunol.* 22:301-307. (1992).
57. Gazzinelli, R. T., Oswald, I. P., James, S. L. y Sher, A. IL-10 inhibits parasite killing and nitrogen oxide production by IFN-gamma-activated macrophages. *J. Immunol.* 148:1792-1796. (1992).
58. Vincendeau, P. y Daulouede, S. Macrophage cytostatic effect on *Trypanosoma musculi* involves an L-arginine-dependent mechanism. *J. Immunol.* 146:4338-4343. (1991).
59. Lin, J. Y. y Chadee, K. Macrophage cytotoxicity against *Entamoeba histolytica* trophozoites is mediated by nitric

- oxide from L-arginine. *J. Immunol.* 148:3999-4005. (1992).
60. Rockett, K. A., Awburn, M. M., Aggarwal, B. B., Cowden, W. B. y Clark, I. A. *In vivo* induction of nitrite and nitrate by tumor necrosis factor, lymphotoxin, and interleukin-1: possible roles in malaria. *Infect. Immun.* 60:3725-3730. (1992).
 61. James, S. T. y Glaven, J. G. Macrophage cytotoxicity against Schistosomula of *Schistosoma mansoni* involves arginine-dependent production of reactive nitrogen intermediates. *J. Immunol.* 143:4208-4212. (1989).
 62. Croen, K. D. Evidence for antiviral effect of nitric oxide. Inhibition of herpes simplex virus type 1 replication. *J. Clin. Invest.* 91:2446-2452. (1993).
 63. Karupiah, G., Xie, Q., Buller, R. M. L., Nathan, C., Duarte, C. y MacMicking, J. D. Inhibition of viral replication by interferon-gamma induced nitric oxide synthase. *Science* 261:1445-1448. (1993).
 64. Hibbs, J. B. Jr., Taintor, R. R., Vavrin, Z. y Rachlin, E. M. Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 157:87-94. (1988).
 65. Lowenstein, C. J., Dinerman, J. L. y Snyder, S. H. Nitric oxide: a physiologic messenger. *Ann. Intern. Med.* 120:227-237. (1994).
 66. Lepoivre, M., Fieschi, F., Coves, J., Thelander, L. y Fontecave, M. Inactivation of ribonucleotide reductase by nitric oxide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 179:442-448. (1991).
 67. Kwon, N. S., Stuehr, D. J. y Nathan, C. F. Inhibition of tumor cell ribonucleotide reductase by macrophage derived nitric

- oxide. *J. Exp. Med.* 174:761-768. (1991).
68. Wink, D. A., Kasprzak, K. S., Maragos, C. M., Elespuru, R. K., Misra, M., Dunams, T. M., Cebula, T. A., Koch, W. H., Andrews, A. W., Allen, J. S. y Keefer, L. K. DNA deaminating ability and genotoxicity of nitric oxide and its progenitors. *Science* 254:1001-1003. (1991).
 69. Stuehr, D. J. y Griffith, O. W. Mammalian nitric oxide synthases. *Adv. Enzymol.* 65:287-346. (1992).
 70. Henry, Y., Lepoivre, M., Drapier, J. C., Ducrocq, C., Boucher, J. L y Guissani, A. EPR characterization of molecular targets for NO in mammalian cells and organelles. *FASEB J.* 7:1124-1134. (1993).
 71. Ignarro, L. J. Biosynthesis and metabolism of endothelium-derived nitric oxide. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 30:535-560. (1990).
 72. Snyder, S. H. Nitric oxide and neurons. *Curr. Opin. Neurobiol.* 2:323-327. (1992).
 73. Snyder, S. H. Nitric oxide: first in a new class of neurotransmitters ? *Science* 257:494-496. (1992).
 74. Moncada, S., Palmer, R. M. J. y Higgs, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* 43:109-142. (1991).
 75. Ding, A., Nathan, C. F. y Stuehr, D. J. Release of reactive nitrogen intermediates from mouse peritoneal macrophages: comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *J. Immunol.* 141:2407-2412. (1988).
 76. Drapier, J. C., Wietzerbin, J. y Hibbs Jr., J. B. Interferon- γ and tumor necrosis factor induce the L-arginine-dependent

cytotoxic effector mechanism in murine macrophages. *Eur. J. Immunol.*18:1587-1592. (1988).

77. Hibbs, J. B. Jr., Granger, D. L., Krahenbuhl, J. L. y Adams, L. B. Synthesis of nitric oxide from L-arginine: a cytokine inducible pathway with antimicrobial activity. *In: Mononuclear phagocytes*, R. van Furth (ed.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht-Boston-London, p. 279-292. (1992).
78. Lowenstein, C. J., Alley, E., Raval, P., Snyder, S. H., Russel, S. W. y Murphy, W. Nitric oxide synthase gene: two upstream regions mediate its induction by interferon-gamma and lipopolysaccharide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 90:9730-9734. (1993).
79. Xie, Q., Whisnant, R. y Nathan, C. Promoter of the mouse gene encoding calcium-independent nitric oxide synthase confers inducibility by interferon-gamma and bacterial lipopolysaccharide. *J. Exp. Med.* 177:1779-1784. (1993).
80. Zeev, E., Kurzrock, R. y Talpaz, M. Structural, physical and physiological properties of interferon. *In: Interferons. Basic principles and clinical applications*, E. Zeev, R. Kurzrock y M. Talpaz (eds.). R.G. Landes Company, Austin, p. 1-19. (1993).
81. Farrar, M. A. y Schreiber, R. D. The molecular cell biology of interferon- γ and its receptor. *Annu. Rev. Immunol.* 11:571-611. (1993).
82. Baron, S., Coppenhauer, D. H., Dianzani, F., Fleischmann, Jr., W. R., Hughes Jr., T. K., Klimpel, G. R., Niessel, D. W., Stanton, G. J. y Tying, S. K. Introduction to the interferon system. *In: Interferon: principles and medical applications*, S. Baron, D. H. Coppenhauer, F. Dianzani, W. R. Fleischmann, Jr., T. K. Hughes Jr., G. R. Klimpel, D. W. Niessel, G. J. Stanton y S. K. Tying (eds.). The University of Texas

Medical Branch at Galveston, Tx, p. 1-15. (1992).

83. Isaacs, A. y Lindenman, J. Virus interference: I. The interferon. *Proc. R. Soc. Lond. (Biol)* 147:258-267. (1957).
84. Samuel, C. E. Mechanisms of the antiviral action of interferons. *Prog. Nucleic. Acid. Res. Mol. Biol.* 35:27-72. (1988).
85. Woll, P. J. y Crowther, D. The interferons: their properties and clinical role-an overview. *In: Interferons: mechanisms of action and role in cancer therapy*, D. Crowther (ed.). Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, London-Paris-Tokyo-Hong Kong-Barcelona-Budapest, p. 3-13. (1991).
86. Svet, M. G. J., Nemirovskaya, B. M. y Osipova, T. V. Interferogenicity and antigen recognition. *Nature* 247:205-206. (1974).
87. Baron, S. The biological significance of the interferon system. *In: Interferons*, N. B. Finter (ed.). North-Holland Publishing Company, Amsterdam, Holland, p. 268-293. (1966).
88. McCabe, R. E., Remington, J. S. y Aravjo, F. G. Enhancement of resistance to *Trypanosoma cruzi* infection by recombinant IFN γ . *In: Interferon and nonviral pathogens*, G. I. Byrne y J. Turco (eds.). Marcel Dekker, New York, p. 203-215. (1988).
89. Herman, R. y Baron, S. Effects of interferon inducers on the intracellular growth of the protozoan parasite *Leishmania donovani*. *Nature* 226:168-170. (1970).
90. Schofield, L. y Ferreira, A. Antimalarial activity of IFN γ : requirement for immunity to sporozoite challenge. *In: Interferon and nonviral pathogens*, G. I. Byrne y J. Turco (eds.). Marcel Dekker, New York, p. 217-233. (1988).

91. Black, C. M., Remington, J. S. y McCabe, R. E. *Toxoplasma*. *In: Interferon and nonviral pathogens*, G. I. Byrne y J. Turco (eds.). Marcel Dekker, New York, p. 131-148. (1988).
92. Havell, E. A. Induction and possible functions of interferons during murine listeriosis. *In: Interferon and nonviral pathogens*, G. I. Byrne y J. Turco (eds.). Marcel Dekker, New York, p. 237-261. (1988).
93. Muotiala, A. y Mäkelä, H. The role of IFN γ and monoclonal IFN γ antibody in murine *Salmonella typhimurium* infection. *Microbial. Path.* 8:135-141. (1990).
94. Weigent, D. A., Huff, T. L., Peterson, J. W., Stanton, G. J. y Baron, S. Role of interferon during streptococcal infection. *Microbial. Path.* 1:399-407. (1986).
95. Anthony, L. S., Ghadirian, E., Nestel, F. P. y Kongshaun, P. A. The requirement for IFN γ in resistance of mice to experimental tularemia. *Microbial. Path.* 7:421-428. (1989).
96. Baron, S., Dianzani, F., Stanton, G. J. y Fleischmann, Jr., W. R. (eds.). 1987. *The interferon system: a current review to 1987*. University of Texas Press, Austin, Tx.
97. Dianzani, F. y Antonelli, G. Physiological mechanisms of production and action of interferons in response to viral infections. *Adv. Exp. Med. Biol.* 257:47-60. (1989).
98. Nelson, B. E. y Borden, E. C. Interferons: biological and clinical effects. *Semin. Surg. Oncol.* 5:391-401. (1989).
99. Zoon, K. C. Human interferons: structure and function. *In: Interferon 9*, Gresser (ed.). New York Academic Press, New York, p. 1-12. (1987).
100. Kurzrock, R., Talpaz, M. y Gutterman, J. U. Interferon-alpha,

beta, gamma: basic principles and preclinical studies. *In: Biologic therapy of cancer: principles and practice*, V. de Vita, S. Hellman y S. A. Rosenberg (ed.). J. B. Lippincott, Philadelphia, p. 247-274. (1991).

101. Weelock, E. F. 1965. Interferon-like virus inhibitor induced in human leukocytes by phytohemagglutinin. *Science* 169:310-312.
102. Green, J. A., Cooperband, S. R. y Kibrick, S. Immune specific induction of interferon production in cultures of human lymphocytes. *Science* 164:1415-1417. (1969).
103. Youngner, J. S. y Salvin, S. B. Production and properties of migration inhibitory factor and interferon in the circulation of mice with delayed hypersensitivity. *J. Immunol.* 111:1914-1922. (1973).
104. Wolf, S. F., Temple, P. A., Kobayashi, M., Young, D., Dicig, M., Lowe, L., Dzialo, R., Fitz, L., Ferenz, C., Hewick, R. M., Kellenher, K., Herrmann, S. H., Clark, S. C., Azzoni, L., Chan, S. H., Trinchieri, G. y Perussia, B. Cloning of cDNA for natural killer cell stimulatory factor, a heterodimeric cytokine with multiple biologic effects on T and natural killer cells. *J. Immunol.* 146:3074-3080. (1991).
105. Mogensen, S. C. y Virelizier, J. L. The interferon-macrophage alliance. *Interferon* 8:55-84. (1987).
106. Ijzermans, J. N. y Marquet, R. L. Interferon-gamma: a review. *Immunobiology* 179:456-473. (1989).
107. Gunther, G. y Otto, B. Interferon. An overview of the state of basic research with special regard to interferon-gamma. *Arzneimittelforschung* 43:182-188. (1993).
108. Aguet, M., Dembic, Z. y Merlin, G. Molecular cloning and

expression of the human interferon-gamma receptor. *Cell* 55:273-280. (1988).

109. Hershey, G. K. y Schreiber, R. D. Biosynthetic analysis of the human interferon-gamma receptor. Identification of N-linked glycosylation intermediates. *J. Biol. Chem.* 264:11981-11988. (1989).
110. Valente, G., Ozmen, L., Novelli, F., Geuna, M., Palestro, G., Forni, G. y Garotta, G. Distribution of interferon- γ receptor in human tissues. *Eur. J. Immunol.* 22:2403-2412. (1992).
111. Greenlund, A. C., Wenner, C. A., Schreiber, R. D. Analysis of IFN- γ receptor binding to IFN- γ . *J. Interferon Res. (Abstr.)* 12:S103. (1992).
112. Fountoulakis, M., Zulauf, M., Lustig, A., Garotta, G. Stoichiometry of interaction between interferon- γ and its receptor. *Eur. J. Biochem.* 209:781-787. (1992).
113. Williams, B. R. Transcriptional regulation of interferon-stimulated genes. *Eur. J. Biochem.* 200:1-11. (1991).
114. Shuai, K., Stark, G. R., Kerr, I. M. y Darnell Jr., J. E. A single phosphotyrosine residue of Stat91 required for gene activation by interferon-gamma. *Science* 261:1744-1746. (1993).
115. Sadowski, H. B., Shuai, K., Darnell Jr., J. E. y Gilman, M. Z. A common nuclear signal transduction pathway activated by growth factor and cytokine receptors. *Science* 261:1739-1744. (1993).
116. Decker, T., Lew, D. J., Mirkovitch, J. y Darnell Jr., J. E. Cytoplasmic activation of GAF, an IFN-gamma-regulated DNA-binding factor. *EMBO J.* 10:927-932. (1991).
117. Mirkovitch, J., Decker, T. y Darnell Jr., J. E. Interferon induction

of gene transcription analyzed by *in vivo* footprinting. *Mol. Cell. Biol.* 12:1-9. (1992).

118. Harris, C. A., Hunte, B., Krauss, M. R., Taylor, A. y Epstein, L. B. Induction of leucine aminopeptidase by interferon-gamma. Identification by protein microsequencing after purification by preparative two-dimensional gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* 267:6865-6869. (1992).
119. Schreiber, R. D., Hicks, L. J., Celada, A., Buchmeier, N. A. y Gray, P. W. Monoclonal antibodies to murine gamma-interferon which differentially modulate macrophage activation and antiviral activity. *J. Immunol.* 134:1609-1618. (1985).
120. Bancroft, G. J., Schreiber, R. D., Bosma, G. C., Bosma, M. J. y Unanue, E. R. A T cell-independent mechanism of macrophage activation by interferon-gamma. *J. Immunol.* 139:1104-1107. (1987).
121. Liew, F. Y., Li, Y. y Millott, S. Tumor necrosis factor-alpha synergizes with IFN-gamma in mediating killing of *Leishmania major* through the induction of nitric oxide. *J. Immunol.* 145:4306-4310. (1990).
122. Ding, A. H., Nathan, C. F. y Stuehr, D. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages: comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *J. Immunol.* 141:2407-2412. (1988).
123. Murray, H. W. Interferon-gamma, the activated macrophage, and host defense against microbial challenge. *Ann. Intern. Med.* 108:595-608. (1988).
124. Niessel, D. W. y Klimpel, G. R. Interferon as a mediator of host defense against bacteria. *In: Interferon: principles and medical applications*, S. Baron, D. H. Coppenhauer, F.

Dianzani, W. R. Fleischmann, Jr., T. K. Hughes Jr., G. R. Klimpel, D. W. Niessel, G. J. Stanton y S. K. Tying (eds.). The University of Texas Medical Branch at Galveston, Tx, p. 311-328. (1992).

125. Kawada, N., Mizoguchi, Y., Kobayashi, K., Morisawa, S., Monna, T. y Yamamoto, S. Interferon gamma modulates production of interleukin 1 and tumor necrosis factor by murine Kupffer cells. *Liver* 11:42-47. (1991).
126. Williamson, B. D., Carswell, E. A., Rubin, B. Y., Predergast, J. S. y Old, L. J. Human tumor necrosis factor produced by human B cell lines: synergistic cytotoxic interaction with human interferon. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80:5397-5401. (1983).
127. Smith, K. A., Lachmann, L. B., Oppenheim, J. J. y Farata, M. F. The functional relationship of the interleukins. *J. Exp. Med.* 151:1551-1556. (1980).
128. Kaye, J., Gillis, S., Mizel, S. B., Shevach, E. M., Malek, T. R., Dinarello, C. A., Lachmann, L. B. y Janeway, C. A. Growth of a cloned helper T cell line induced by a monoclonal antibody specific for the antigen receptor: interleukin 1 is required for the expression of receptor for interleukin 2. *J. Immunol.* 133:1339-1345. (1984).
129. Le, J., Lin, J. X., Henriksen-Destefano, D. y Vilcek, J. Bacterial lipopolysaccharide-induced interferon-gamma production: roles of interleukin-1 and interleukin-2. *J. Immunol.* 136:4525-4530. (1986).
130. Grabstein, K., Dower, S., Gillis, S., Urdal, D. y Larsen, A. Expression of interleukin 2, interferon-gamma, and the IL2 receptor by human peripheral blood lymphocytes. *J. Immunol.* 136:4503-4508. (1986).
131. Vilcek, J., Henriksen-Destefano, D., Siegel, D., Klion, A., Robb,

- R. J. y Le., J. Regulation of IFN-gamma induction in human peripheral blood cells by exogenous and endogenously produced interleukin 2. *J. Immunol.* 135:1851-1856. (1985).
132. Kasahara, T., Hooks, J. J., Dougherty, S. F. y Oppenheim, J. J. Interleukin 2-mediated immune interferon (IFN-gamma) production by human T cells and T cell subsets. *J. Immunol.* 130:1784-1789. (1983).
133. Coley, W. B. Late results of the treatment of inoperable sarcoma by the mixed toxins of erysipelas and *Bacillus prodigiosus*. *Am. J. Med. Sci.* 131:375-430. (1906).
134. Shear, M. J. Chemical treatment of tumors. IX. Reactions of mice with primary subcutaneous tumors to injection of a hemorrhage-producing bacterial polysaccharide. *J. Natl. Cancer Inst.* 4:461-476. (1944).
135. Carswell, E. A., Old, L. J., Kassel, R. L., Green, S., Fiore, N. y Williamson, B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72:3666-3670. (1975).
136. Aggarwal, B. B. Comparative analysis of the structure and function of TNF- α and TNF- β . *In: Tumor necrosis factors: structure, function, and mechanism of action*, B. B. Aggarwal y J. Vilcek (eds.). Marcel Dekker, Inc., New York-Basel-Hong Kong, p. 61-78. (1992).
137. Aggarwal, B. B., Kohr, W. J., Hass, P. E., Moffat, B., Spencer, S. A., Henzel, W. J., Bringman, T. S., Nedwin, G. E., Goeddel, D. V. y Harkins, R. N. Human tumor necrosis factor: production, purification, and characterization. *J. Biol. Chem.* 260:2345-2354. (1985).
138. Arakawa, T. y Yphantis, D. A. Molecular weight of recombinant human tumour necrosis factor- α . *J. Biol. Chem.* 262:7484-

7485. (1987).

139. Davis, J. M., Narachi, M. A., Alton, N. K. y Arakawa, T. Structure of human TNF- α derived from recombinant DNA. *Biochemistry* 26:1322-1326. (1987).
140. Jones, E. V., Stuart, D. I. y Walter, N. P. C. The three-dimensional structure of TNF. *In: Cytokines and lipocortins in inflammation*, M. Melli y L. Parente (eds.). Progress in Clinical and Biological Research Series, vol. 349, Wiley-Liss, New York, p. 321-327. (1990).
141. Kriegler, M., Perez, C., Defay, K., Albert, I. y Lu, S. D. A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein. *Cell* 52:45-53. (1988).
142. Perez, C., Albert, I., DeFay, K., Zachariades, N., Gooding, L. y Kriegler, M. A nonsecretable cell surface mutant of TNF kills by cell-to-cell contact. *Cell* 63:251-258. (1990).
143. Porteu, F. y Nathan, C. Shedding of tumour necrosis factor receptors by activated human neutrophils. *J. Exp. Med.* 172:599-607. (1990).
144. Spies, T., Blanck, G., Bresnahan, M., Sands, J. y Strominger, J. L. A new cluster of genes within the human major histocompatibility complex. *Science* 243:214-217. (1989).
145. Kronke, M., Schutze, S., Scheurich, P. y Pfizenmaier, K. Tumour necrosis factor: signal transduction and TNF-responsive genes. *In: Tumor necrosis factor: structure, function and mechanism of action*, B. B. Aggarwal y J. Vilcek (eds.). Marcel Dekker Publishers, New York, P. 189-216. (1991).
146. Gray, P. W., Barrett, K., Chantry, D., Turner, M. y Fedman, M. Cloning of human tumour necrosis factor (TNF) receptor cDNA and expression of recombinant soluble TNF-binding

- protein. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:7380-7384. (1990).
147. Sprang, S. R. The divergent receptors for TNF. Trends Biochem. Sci. 15:366-368. (1990).
 148. Mosselmans, R., Hepburn, A., Dumont, J. E., Fiers, W. y Galand, P. Endocytic pathway of recombinant murine tumour necrosis factor in L-929 cells. J. Immunol. 141:3096-4000. (1988).
 149. Earl, C. Q., Stadel, J. M. y Anzano, M. A. Tumour necrosis factor-mediated biological activities involve a G-protein-dependent mechanism. J. Biol. Response Mod. 9:361-367. (1990).
 150. Zhang, Y. H., Lin, J. X., Yip, Y. K. y Vilcek, J. Enhancement of cAMP levels and of protein kinase activity by tumour necrosis factor and interleukin-1 in human fibroblasts: role in the induction of interleukin 6. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:6802-6805. (1988).
 151. Schutze, S., Nottrott, S., Pfizenmaier, K. y Kronke, M. Tumour necrosis factor signal transduction. Cell-type-specific activation and translocation of protein kinase C. J. Immunol. 144:2604-2608. (1990).
 152. Knauer, M. F., Longmuir, K. J., Yamamoto, R. S., Fitzgerald, T. P. y Granger, G. A. Mechanism of human lymphotoxin and tumour necrosis factor induced destruction of cells *in vitro*: phospholipase activation and deacylation of specific-membrane phospholipids. J. Cell. Physiol. 142:469-479. (1990).
 153. Spriggs, D. R., Sherman, M. L., Imamura, K., Mohri, M., Rodriguez, C., Robbins, G. y Kufe, D. W. Phospholipase A2 activation and autoinduction of tumour necrosis factor gene expression by tumour necrosis factor. Cancer Res. 50:7101-7107. (1990).

154. Rege, A. A., Huang, K. y Aggarwal, B. B. Tumor necrosis factor. *In: Cytokine therapy*, D. W. Galvani y J. C. Cawley (eds.). Cambridge University Press, Great Britain, p. 152-176. (1992).
155. Palladino, M. A. Jr., Shalaby, M. R., Kramer, S. M., Ferraiolo, B. L., Baughman, R. A., Deleo, A. H., Crose, D., Marfino, B., Aggarwal, B. B., Figari, I. S., Liggitt, D. y Patton, J. S. Characterization of the antitumor activities of human tumor necrosis factor- α and the comparison with other cytokines: induction of tumor specific immunity. *J. Immunol.* 138:4023-4032. (1987).
156. Havell, E. A., Fiers, W. y North, R. J. The antitumor function of tumor necrosis factor (TNF). I. Therapeutic action of TNF against an established murine sarcoma is indirect, immunologically dependent, and limited by severe toxicity. *J. Exp. Med.* 167:1067-1085. (1988).
157. Beutler, B., Greenwald, D., Hulmes, J. D., Chang, M., Pan, Y. C. E., Mathison, J., Ulevitch, R. y Cerami, A. Identity of tumor necrosis factor and the macrophage secreted factor cachetin. *Nature (London)* 316:552-554. (1986).
158. Beutler, B. y Cerami, A. Cachetin and tumor necrosis factor as two sides of the same biological coin. *Nature (London)* 320:584-588. (1986).
159. Parant, M., Parant, F., Vinit, M. A. y Chedid, L. Protective effect of tumor necrosis factor (TNF) obtained by genetic recombination against experimental bacterial or fungal infection. *C. R. Acad. Sci. III.* 304:1-4. (1987).
160. Freudenberg, M. A. y Galanos, C. Tumor necrosis factor alpha mediates lethal activity of killed gram-negative and gram-positive bacteria in D-galactosamine-treated mice. *Infect. Immun.* 59:2110-2115. (1991).

161. Bermudez, L. E. y Young, L. S. Tumor necrosis factor, alone or in combination with IL-2, but not IFN-gamma, is associated with macrophage killing of *Mycobacterium avium* complex. *J. Immunol.* 140:3006-3013. (1988).
162. Nightingale, S. D., Byrd, L. T., Southern, P. M., Jockusch, J. D., Cal, S. X. y Wynne, B. A. Incidence of *Mycobacterium avium-intracellulare* complex bacteremia in human immunodeficiency virus-positive patients. *J. Infect. Dis.* 165:1082-85. (1992).
163. Furney, S. K., Skinner, P. S., Roberts, A. D., Appelberg, R. y Orme, I. M. Capacity of *Mycobacterium avium* isolates to grow well or poorly in murine macrophages resides in their ability to induce secretion of tumor necrosis factor. *Infect. Immun.* 60: 4410-4413. (1992).
164. Shiratsuchi, H., Toossi, Z., Mettler, M. A. y Ellner, J. J. Colonial morphotype as a determinant of cytokine expression by human monocytes infected with *Mycobacterium avium*. *J. Immunol.* 150:2945-2954. (1993).
165. Sarmiento AM, Appelberg R. Relationship between virulence of *Mycobacterium avium* strains and induction of tumor necrosis factor alpha production in infected mice and in *in vitro*-cultured mouse macrophages. *Infect. Immun.* 63:3759-64. (1995).
166. Appelberg, R., Castro , A. G., Pedrosa, J., Silva, R. A., Orme, I. M. y Minóprio, P. Role of gamma interferon and tumor necrosis factor alpha during T-cell-independent and -dependent phases of *Mycobacterium avium* infection. *Infect. Immun.* 62:3962-3971. (1994).
167. Young, L. S. Atypical mycobacteria. *In: Texbook of AIDS Medicine*, S. Broder, T. C. Merigan, Jr. y D. Bolognesi (eds.). Williams & Wilkins, Baltimore-Philadelphia-Hong Kong.

London-Munich-Sydney-Tokyo, p.283-294. (1994).

168. Roberts, G. D., Koneman, E. W. y Kim, Y. K. *Mycobacterium*. In: Manual of Clinical Microbiology, W. J. Hausler, Jr., K. L. Herrmann, H. D. Isenberg y H. J. Shadomy (eds.). American Society for Microbiology, Washington, DC, p.304-339. (1991).
169. Horsburgh, J. C., Jr. *Mycobacterium avium* complex infection in the acquired immunodeficiency syndrome. N. Engl. J. Med. 324:1332-1338. (1991).
170. Horsburgh, C. R., Jr. y Selik, R. M. The epidemiology of disseminated nontuberculous mycobacterial infection in the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). Am. Rev. Respir. Dis. 139:4-7. (1989).
171. Kirschner, R. A., Jr., Parker, B. C. y Falkinham, J. O. III. Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria: *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, and *Mycobacterium scrofulaceum* in acid, brown water swamps of the southeastern United States and their association with environmental variables. Am. Rev. Respir. Dis. 145:271-275. (1992).
172. Benson, C. A. Disease due to the *Mycobacterium avium* complex in patients with AIDS: epidemiology and clinical syndrome. Clin. Infect. Dis. 18:S218-S222. (1994).
173. Iseman, M. D. *Mycobacterium avium* and the normal host. N. Engl. J. Med. 321:896-898. (1989).
174. Iseman, M. D., Corpe, R. F., O'Brien, R. J., Rosenweg, D. Y. y Wolinsky, E. Disease due to *Mycobacterium avium-intracellulare*. Chest 187:139S-149S. (1985).
175. Nassos, P. S., Yajko, D. M., Sanders, C. A. y Kadley, K. Prevalence of *Mycobacterium avium* complex in respiratory

specimens from AIDS and non-AIDS patients in a San Francisco Hospital. *Am. Rev. Respir. Dis.* 143:66-68. (1991).

176. Grange, J. M., Yates, M. D. y Boughton, E. The avian tubercle bacillus and its relatives. *J. Appl. Bacteriol.* 88:411-431. (1990).
177. Armstrong, D. C., Gold, J. W. M., Dryjanski, J., Whimbey, E., Polsky, B., Hawkins, C., Brown, A. E., Bernard, E. y Kiehn, T. E. Treatment of infections in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *Ann. Intern. Med.* 103:738-743. (1985).
178. Hawkins, C. C., Gold, J. W. M., Whimbey, E., Kiehn, T. E., Brannon, P., Cammarata, R., Brown, A. E. y Armstrong, D. *Mycobacterium avium* complex infections in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *Ann. Intern. Med.* 105:184-188. (1986).
179. Damsker, B., y Bottone, E. J. *Mycobacterium avium-Mycobacterium intracellulare* from the intestinal tracts of patients with the acquired immunodeficiency syndrome: concepts regarding acquisition and pathogenesis. *J. Infect. Dis.* 151:179-181. (1985).
180. Bermudez, L. E., Petrovsky, M., Kolonsky, P. y Young, L. S. An animal model of *Mycobacterium avium* complex disseminated infection after colonization of the intestinal tract. *J. Infect. Dis.* 165:75-79. (1992).
181. Yajko, D. M., Nassos, P. S. y Hadley, K. Therapeutic implications of inhibition versus killing of *Mycobacterium avium* complex by antimicrobial agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* 31:117-120. (1987).
182. Chin, D. P., Reingold, A. L., Stone, E. N., Vittinghoff, E., Horsburgh, Jr., R., Simon, E. M., Yajko, D. M., Hadley, W. K.,

- Ostroff, S. M. y Hopewell, P. C. The impact of *Mycobacterium avium* complex bacteremia and its treatment on survival of AIDS patients: a prospective study. *J. Infect. Dis.* 170:578-584. (1994).
183. Bermudez, L.E. Production of transforming growth factor- β by *Mycobacterium avium*-infected human macrophages is associated with unresponsiveness to IFN- γ . *J. Immunol.* 150:1838-1845. (1993).
184. Bermudez, L. E. y Champisi, J. Infection with *Mycobacterium avium* induces production of interleukin-10 (IL-10), and administration of anti-IL-10 antibody is associated with enhanced resistance to infection in mice. *Infect. Immun.* 61:3093-3097. (1993).
185. Bermudez, L. E., Wu, M., Petrofsky, M. y Young, L. S. Interleukin-6 antagonizes tumor necrosis factor-mediated mycobacteriostatic and mycobactericidal activities in macrophages. *Infect. Immun.* 60:4245-4252. (1992).
186. Bermudez, L. E., Young, L. S., Martinelli, J. y Petrofsky, M. Exposure to ethanol up-regulates the expression of *Mycobacterium avium* complex proteins associated with bacterial virulence. *J. Infect. Dis.* 168:961-968. (1993).
187. Greene, J. B., Sidhu, G. S., Lewin, S., Levine, J. F., Masur, H., Simberkoff, M. S., Nicholas, P., Good, R. C., Zolla-Pazner, S. B., Pollock, A. A., Tapper, M. L. y Holzman, R. S. *Mycobacterium avium-intracellulare*: a cause of disseminated life-threatening infection in homosexuals and drug abusers. *Ann. Intern. Med.* 97:539-546. (1982).
188. Edwards, III C., Hedegaard, H. B., Zlotnik, A., Gangadharam, P. R. J. y Pabst, M. J. Chronic infection due to *Mycobacterium intracellulare* in mice: association with macrophage release of prostaglandin E₂ and reversal by injection of

- indomethacin, muramyl dipeptide, or interferon- γ . *J. Immunol.* 136:1820-27. (1986).
189. Murray, H.W. Interferon- γ , the activated macrophage, and the host defense against microbial challenge. *Ann. Intern. Med.* 108:595-608. (1988).
190. Murray, H. W., Scavuzzo, D. A. y Chaparas, S. D. T lymphocyte responses to mycobacterial antigen in AIDS patients with disseminated *Mycobacterium avium-Mycobacterium intracellulare* infection. *Chest* 193:922-925. (1988).
191. Beschin, A., Brijs, L., Baetselier, P. D. y Cocito, G. Mycobacterial proliferation in macrophages is prevented by incubation with lymphocytes activated *in vitro* with a mycobacterial antigen complex. *Eur. J. Immunol.* 21:793-797. (1991).
192. Appelberg, R. y Orme, IM. Effector mechanisms involved in cytokine-mediated bacteriostasis of *Mycobacterium avium* infections in murine macrophages. *Immunology* 80:352-359. (1993).
193. Appelberg, R., Orme, I. M., Pinto de Sousa, M. I. y Silva, M. T. *In vitro* effects of interleukin-4 on interferon- γ -induced macrophage activation. *Immunology* 76:553-559. (1992).
194. Shiratsuchi, H., Johnson, J. L., Toba, H. y Ellner, J. J. Strain- and Donor-related differences in the interaction of *Mycobacterium avium* with human monocytes and its modulation by interferon- γ . *J. Infect. Dis.* 162:932-938. (1990).
195. Toba, H., Crawford, J. T. y Ellner, J. J. Pathogenicity of *Mycobacterium avium* for human monocytes: absence of macrophage-activating factor activity of gamma interferon. *Infect. Immun.* 57:239-44. (1989).

196. Denis, M. y Gregg, E. O. Modulation of *Mycobacterium avium* growth in murine macrophages: Reversal of unresponsiveness to interferon-gamma by indomethacin or interleukin-4. *J. Leukoc. Biol.* 49:65-72. (1991).
197. Bermudez, L. E. y Young, L. S. Oxidative and non-oxidative intracellular killing of *Mycobacterium avium* complex. *Microbiol. Pathol.* 7:289-297. (1989).
198. Bermudez, L. E., Martinelli, J., Petrofsky, M., Kolonoski, P. y Young, L. S. Recombinant granulocyte-macrophage colony-stimulating factor enhances the effects of antibiotics against *Mycobacterium avium* complex infection in the beige mouse model. *J. Infect. Dis.* 169:575-580. (1994).
199. Denis, M. y Ghadirian, E. IL-10 neutralization augments mouse resistance to systemic *Mycobacterium avium* infections. *J. Immunol.* 151:5425-5430. (1993).
200. Tsunawaki, S., Sporn, M., Ding, A. y Nathan, C. Deactivation of macrophages by transforming growth factor-beta. *Nature* 334:260-263. (1989).
201. Denis, M. Interleukin-6 enhances the growth of *M. avium*: presence of specific receptors. *Cell. Immunol.* 141:182-188. (1992).
202. Mackaness, G. B. The action of drugs on intracellular tubercle bacilli. *J. Path. Bacteriol.* 64:429-446. (1952).
203. Gangadharam, P. R. y Reddy, M. V. Contributions of animal and macrophage models to the understanding of host parasite interaction of *Mycobacterium avium* complex (MAC) disease. *Res. Microbiol.* 145:214-224. (1994).
204. Rastogi, N., Potar, M. y David, H. L. Intracellular growth of pathogenic mycobacteria in continuous murine

- macrophage cell line J-774: ultrastructural and drug-susceptibility studies. *Current Microbiol.* 16:79-92. (1987).
205. Gangadharam, P. R. J. Murine models for mycobacterioses. *Semin. Respir. Med.* 1:250-261. (1986).
206. Kleeberg, H.H. y Nel, E. E. Occurrence of environmental atypical mycobacteria in South Africa. *Proc. Third. Int. Coll. Mycobact.* 201-214. (1973).
207. Engbaek, H. C. Pathogenicity and virulence of atypical mycobacteria for experimental animals (with particular reference to pathologic process in joints and tendon sheaths of rabbits). *Acta Tuberc. Scand.* 40:35-50. (1961).
208. Collins, F. M. Acquired resistance to mycobacterial infections. *Adv. Tuberc. Res.* 18:1-30. (1972).
209. Gangadharam, P. R. J., Perumal, V. K., Farhi, D. C. y LaBrecque, J. The beige mouse model for *Mycobacterium avium* complex (MAC) disease: optimal conditions for the host and parasite. *Tubercle* 70:257-271. (1989).
210. Peloquin, C. A. Controversies in the management of *Mycobacterium avium* complex infection in AIDS patients. *Ann. Pharmacother.* 27:928-937. (1993).
211. Gangadharam, P. R. J. Beige mouse model for *Mycobacterium avium* complex disease. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:1647-1654. (1995).
212. Gangadharam, P. R. J., Perumal, V. K., Parikh, K., Taylor, R. B. y Farhi, D. C. Susceptibility of beige mice to *Mycobacterium avium intracellulare* infections by different routes of challenge. *Am. Rev. Respir. Dis.* 139:1098-1104. (1989).

213. Bermudez, L. E., Petrofsky, M., Kolonoski, P. y Young, L. S. An animal model of *Mycobacterium avium* complex disseminated infection after colonization of the intestinal tract. *J. Infect. Dis.* 165:75-79. (1992).
214. Gangadharam, P. R., Pratt, P. F. y Davidson, P. T. Experimental infections with *Mycobacterium intracellulare*. *Rev. Infect. Dis.* 3:973-978. (1981).
215. Balow, J. E., Hurley, D. L. y Fauci, A. S. Cyclophosphamide suppression of established cell mediated immunity: quantitative vs. qualitative changes in lymphocyte populations. *J. Clin. Invest.* 56:65-70. (1975).
216. Balow, J. E., Hurley, D. L. y Fauci, A. S. Immunosuppressive effects of glucocorticosteroids: differential effects of acute vs chronic administration on cell mediated immunity. *J. Clin. Invest.* 114:1072-1076. (1975).
217. Pennington, J. E. Quantitative effects of immunosuppression on bronchoalveolar cells. *J. Infect. Dis.* 136:127-131. (1977).
218. Strauss, R. R., Patel, N. y Patel, C. Suppression of the immune response in Balb/C mice by trypan blue. *J. Reticuloendothel. Soc.* 22:533-543. (1977).
219. Allison, A. C., Harrington, J. S. y Birberk, M. An examination of the cytotoxic effects of silica on macrophages. *J. Exp. Med.* 124:141-154. (1966).
220. King, E. J., Harrison, C. V. y Attygale, D. The effect of cortisone on established silicotic fibrosis in the lungs of rats. *Br. J. Ind. Med.* 12:228-232. (1955).
221. Hahn, H., y Bierther, M. Effect of dextran sulphate 500 on cell-mediated antibacterial immunity in mice. *In: Activation*

of macrophages, W. H. Wagner y H. Hahn (ed.). Excerpta Medica, Amsterdam, p. 249-256. (1974).

222. Williams, G. A historical study of the connective tissue reaction to carrageenin. *J. Pathol. Bacteriol.* 73:557-563. (1957).
223. Baker, L. A. y Campbell, P. A. *Listeria monocytogenes* cell walls induce decreased resistance to infection. *Infect. Immun.* 20:99-107. (1978).
224. Bergel, M. Influence of various prooxidant nutritional conditions on the growth *in vivo* of *M. leprae*. *Lepr. Rev.* 15:153-158. (1959).
225. Kamat, S. R., Rossiter, C. E. y Gilson, J. C. A retrospective clinical study of pulmonary disease due to "anonymous mycobacteria" in Wales. *Thorax* 16:297-308. (1961).
226. Goren, M. B., D'Arcy Hart, P., Young, M. R. y Armstrong, J. A. Prevention of phagosome-lysosome fusion in cultured macrophages by sulfatides of *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 73:2510-2514. (1976).
227. Garrelts, J. C. Clofazimine: a review of its use in leprosy and *Mycobacterium avium* complex infection. *Ann. Pharmacother.* 25:525-531. (1991).
228. Barry, V. C., Belton, J. G., Conalty, M. L., Denny, J. M., Edward, D. W., O'Sullivan, J. F., Twomey, D. T. y Winder, F. A new series of phenazines (rimino-compounds) with high antituberculosis activity. *Nature* 179:1013-1015. (1957).
229. Browne, S. G. y Hogerzeil, L. M. B663 in the treatment of leprosy: preliminary report of a pilot trial. *Lepr. Rev.* 33:6-16. (1962).

230. Levy, L., Shepard, C. C. y Fasal, P. Clofazimine therapy of lepromatous caused by dapsone-resistant *Mycobacterium leprae*. Am. J. Trop. Med. Hyg. 21:315-321. (1972).
231. Mackey, J. P. y Barnes, J. Clofazimine in the treatment of discoid lupus erythematosus. Br. J. Dermatol. 91:93-96. (1979).
232. Michaelsson, G., Molin, L., Ohman, S., Gip, L., Lindstrom, B., Skogh, M. y Trolin, I. Clofazimine: a new agent for the treatment of pyoderma gangrenosum. Arch. Dermatol. 112:344-349. (1976).
233. Kaplan, B., Trau, H., Sofer, E., Feinstein, A. y Schewach-Millet, M. Treatment of pyoderma gangrenosum with clofazimine. Int. J. Dermatol. 31:591-593. (1992).
234. Kemper, C. A., Meng, T., Nussbaum, J., Chiu, J., Feugal, D. F., Bartok, A. E., Leedom, J. M., Tilles, J. G., Deresinski, S. C. y McCutchan, J. A. Treatment of *Mycobacterium avium* complex bacteremia in AIDS with a four drug oral regimen: rifampin, ethambutol, clofazimine and ciprofloxacin. Ann. Intern. Med. 116:466-472. (1992).
235. Horsburgh, Jr., C. R., Havlik, J. A., Ellis, D. A., Kennedy, E., Fann, S. A., Dubois, R. E. y Thompson, S. E. Survival of patients with acquired immune deficiency syndrome and disseminated *Mycobacterium avium* complex infection and without antimycobacterial chemotherapy. Am. Rev. Respir. Dis. 144:557-559. (1991).
236. Agins, B. D., Berman, D. S., Spicehandler, D., EL-Sadr, W., Simberkoff, M. S. y Rahal, J. J. Effect of combined therapy with ansamycin, clofazimine, ethambutol, and isoniazid for *Mycobacterium avium* infection in patients with AIDS. J. Infect. Dis. 159:784-787. (1989).
237. Hoy, J., Mijch, A., Sandland, M., Grayson, L., Lucas, R. y Dwyer, B.

- Quadruple-drug therapy for *Mycobacterium avium-intracellulare* bacteremia in AIDS patients. J. Infect. Dis. 161:801-805. (1990).
238. Mansfield, R. E. Tissue concentrations of clofazimine (B663) in man. Amer. J. Trop. Med. Hyg. 23:1116-1119. (1974).
239. Holdiness, M. R. Clinical pharmacokinetics of clofazimine. A review. Clin. Pharmacokinet. 16:74-85. (1989).
240. Feng, P. P. C., Fenselau, C. C., y Jacobson, R. R. Metabolism of clofazimine in leprosy patients. Drug Metab. Dispos. 9:521-524. (1989).
241. Banerjee, D. K., Ellard, G. A., Gammon, P. T. y Waters, M. F. R. Some observations on the pharmacology of clofazimine of clofazimine (B663). Am. J. Trop. Med. Hyg. 23:1110-1119. (1974).
242. Gangadharam, P. R. y Candler, E. R. 1977. Activity of some antileprosy compounds against *Mycobacterium intracellulare in vitro*. Am. Rev. Respir. Dis. 115:705-708. (1977).
243. Gangadharam, P. R., Edwards, C. K., Murthy, P. S. y Pratt, P. F. An acute infection model for *Mycobacterium intracellulare* disease using beige mice: preliminary results. Am. Rev. Respir. Dis. 127:468-469. (1983).
244. Gangadharam, P. R., Perumal, V. K., Jairam, B. T., Rao, P. N., Nguyen, A. K., Farhi, D. C. y Iseman, M. D. Activity of rifabutin alone or in combination with clofazimine or ethambutol or both against acute and chronic experimental *Mycobacterium intracellulare* infections in mice. Am. Rev. Respir. Dis. 136:329-333. (1987).
245. Gangadharam, P. R., Perumal, V. K., Podapati, N. R., Kesavalu, L. y Iseman, M. D. *In vivo* activity of amikacin alone or in

- combination with clofazimine or rifabutin or both against acute experimental *Mycobacterium avium* complex infections in beige mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* 32:1400-1403. (1988).
246. Kailasam, S., Wise, D. L. y Gangadharam, P. R. Bioavailability and chemotherapeutic activity of clofazimine against *Mycobacterium avium* complex infections in beige mice following a single implant of a biodegradable polymer. *J. Antimicrob. Chemother.* 33:273-279. (1994).
247. Mehta, R. T., Keyhani, A., McQueen, T. J., Rosenbaum, B., Rolston, K. V. y Tarrand, J. J. *In vitro* activities of free and liposomal drugs against *Mycobacterium avium-intracellulare* complex and *M. tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 137:2584-2587. (1993).
248. Gangadharam, P. R. y Parikh, K. *In vivo* activity of streptomycin and clofazimine against established infections of *Mycobacterium avium* complex in beige mice. *J. Antimicrob. Chemother.* 30:833-838. (1992).
249. Morrison, N. E. y Marley, G. M. Clofazimine binding studies with deoxyribonucleic acid. *Int. J. Lepr.* 44:475-481. (1976).
250. Krajewska, M. M., Anderson, R. y O'Sullivan, J. F. Effects of clofazimine analogues and tumor necrosis factor- α individually and in combination on human polymorphonuclear leukocyte functions *in vitro*. *Int. J. Immunopharmacol.* 15:99-111. (1993).
251. Anderson, R., Beyers, A. D., Savage, J. E. y Nel, A. E. Apparent involvement of phospholipase A2, but not protein kinase C, in the pro-oxidative interactions of clofazimine with human phagocytes. *Biochem. Pharmacol.* 37:4635-4641. (1988).
252. Krajewska, M. M. y Anderson, R. R. An *in vitro* comparison of the

effects of the prooxidative riminophenazines clofazimine and B669 on neutrophil phospholipase A2 activity and superoxide generation. *J. Infect. Dis.* 167:899-904. (1993).

253. Brandt, L. y Svensson, B. Stimulation of macrophage phagocytosis by clofazimine. *Scand. J. Haemat.* 10:261-264. (1973).
254. Sarracent, J. y Finlay, C. M. The action of clofazimine on the level of lysosomal enzymes of cultured macrophages. *Clin. exp. Immunol.* 48:261-267. (1982).
255. Anderson, R., Zeis, B. M. y Anderson, I. F. Clofazimine-mediated enhancement of reactive oxidant production by human phagocytes as a possible therapeutic mechanism. *Dermatologica* 176:234-242. (1988).
256. Van Rensburg, C. E. J., Joone, G. K., O'Sullivan, J. F. y Anderson, R. Antimicrobial activities of clofazimine and B669 are mediated by lysophospholipids. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36:2729-2735. (1992).
257. Van Rensburg, C. E. J., Gatner, E. M., Imkamp, F. M. y Anderson, R. Effects of clofazimine alone or combined with dapsone on neutrophil and lymphocyte functions in normal individuals and patients with lepromatous leprosy. *Antimicrob. Agents Chemother.* 21:693-697. (1982).
258. Ramasesh, N., Krahenbuhl, J. L. y Hasting, R. C. *In vitro* effects of antimicrobial agents on *Mycobacterium leprae* in mouse peritoneal macrophages. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33:657-662. (1989).
259. Van Rensburg, C. E. J., Anderson, R., Myer, M. S., Joone, G. K. y O'Sullivan, J. F. The riminophenazine agents clofazimine and B669 reverse acquired multidrug resistance in a human lung cancer cell line. *Cancer Lett.* 85:59-63.

(1994).

260. Van Rensburg, C. E. J., van Staden, A. M. y Anderson, R. The riminophenazine agents clofazimine and B669 inhibit the proliferation of cancer cell lines in vitro by phospholipase A₂-mediated oxidative and nonoxidative mechanisms. *Cancer Res.* 53:318-323. (1993).
261. Anderson, R. y Smit, M. J. Clofazimine and B669 inhibit the proliferative responses and Na⁺, K⁺-adenosine triphosphatase activity of human lymphocytes by a lysophospholipid-dependent mechanism. *Biochem. Pharmacol.* 46:2029-2038. (1993).
262. Van Rensburg, C. E. J., Durandt, C., Garlinski, P. J. y O'Sullivan, J. F. Evaluation of the antineoplastic activities of the riminophenazine agents clofazimine and B669 in tumor-bearing rats and mice. *Int. J. Lepr.* 3:1011-1013. (1993).
263. Caver, C. V. Clofazimine-induced ichthyosis and its treatment. *Cutis* 29:341-343. (1982).
264. Freerksen, E. y Seydel, J. K. Critical comments on the treatment of leprosy and other mycobacterial infections with clofazimine. *Arzneim. Forsch.* 42:1243-1245. (1992).
265. Girdhar, A., Venkatesan, K., Chauhan, S. L., Malaviya, G. N. y Girhar, B. K. Red discoloration of the sputum by clofazimine simulating hemoptysis: a case report. *Lepr. Rev.* 63:47-50. (1992).
266. Sandler, E. D., Ng, V. L. y Hadley, W. K. Clofazimine crystals in alveolar macrophages from a patient with the acquired immunodeficiency syndrome. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 116:541-543. (1992).
267. Belaube, P., Devaux, J., Pizzi, M., Boutboul, R. y Privat, Y. Small

bowel deposition of crystals associated with the use of clofazimine in the treatment of prurigo nodularis. *Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.* 51:328-330. (1983).

268. Lopez-Berestein G., Fainstein V., Hopfer, R., Mehta, K., Sullivan, M.P., Heating, M., Rosenblum, M. G., Mehta, R., Luna, M., Hersh, E. M., Reuben, J., Juliano, R. L. y Bodey, G. P. Liposomal amphotericin B for the treatment of systemic fungal infections in patients with cancer: a preliminary study. *J. Infect. Dis.* 151:704-710. (1985).
269. Mayhew, E. G. y Papahadjopoulos, D. Therapeutic applications of liposomes. *In: Liposomes*, Ostro M. J. (ed.). M. Dekker, New York, N. Y., p. 289-341. (1983).
270. Ashtekar, D., Düzgünes, N., Gangadharam, P. R. J. Activity of free and liposome encapsulated streptomycin against *Mycobacterium avium* complex (MAC) inside peritoneal macrophages. *J. Antimicrob. Chemother.* 28:615-617. (1991).
271. Fidler, I. J., Sone, S., Fogler, W. E. y Barnes, Z. L. Eradication of spontaneous metastases and activation of alveolar macrophages by intravenous injection of liposomes containing muramyl dipeptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:1680-1684. (1981).
272. Bangham, A. D. y Horne, R. W. Negative staining of phospholipids and their structural modification by surface-active agents as observed in the electron microscope. *J. Mol. Biol.* 8:660-668. (1964).
273. Machy, P. y Laserman, L. Composition, properties and preparation of liposomes. *In: Liposomes in Cell Biology and Pharmacology*, P. Machy y L. Leserman (eds.). John Libbey, London-Paris, p. 8-31.
274. Papahadjopoulos, D. Liposomes and their uses in Biology and

Medicine, Papahajopoulos, D. (ed.). New York Acad. Sci., New York, N. Y., vol. 308. (1978).

275. Gregoriadis, G. y Allison, A. C. *Liposomes in Biological Systems*, Gregoriadis, G. y Allison, A. C. (eds.). Wiley, New York, N. Y. (1980).
276. Schroit, A. J. y Fidler, I. J. Effects of liposome structure and lipid composition on the activation of the tumoricidal properties of macrophages by liposomes containing muramyl dipeptide. *Cancer Res.* 42:161-167. (1982).
277. Fidler, I. J., Raz, A., Fogler, W. E., Kirsh, R., Bugelski, P. y Poste, G. Design of liposomes to improve delivery of macrophage-augmenting agents to alveolar macrophages. *Cancer Res.* 40:4460-4466. (1980).
278. Raz, A., Bucana, C., Fogler, W. E., Poste, G. y Fidler, I. J. Biochemical, morphological, and ultrastructural studies on the uptake of liposomes by murine macrophages. *Cancer Res.* 41:487-494. (1981).
279. Juliano, R. L. y Lin, G. *Liposomes and Immunobiology*, Tom, B. y Six, H. (eds.). Elsevier, North Holland, New York, p. 49-89. (1980).
280. Nishikawa, K., Arai, H. y Inoue, K. Scavenger receptor-mediated uptake and metabolism of lipid vesicles containing acidic phospholipids by mouse peritoneal macrophages. *J. Biol. Chem.* 265:5226-5231. (1990).
281. Black, C. D. y Gregoriadis, G. Interaction of liposomes with blood plasma proteins. *Biochem. Soc. Trans.* 4:253-256. (1976).
282. Bangham, A. D. Liposomes: realizing their promise. *Hosp. Pract.* 27:51-62. (1992).

283. Gregoriadis, G., Senior, J. y Trouet, A. Targeting of drugs, Gregoriadis, G., Senior, J. y Trouet, A. (eds.). Plenum Press, New York-London. (1981).
284. Knight, G. Liposomes: from physical structure to therapeutic applications, Knight, G. (ed.). Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam. (1981).
285. Sandra, A. y Pagano, R. E. Liposome-cell interactions. Studies of lipid transfer using isotopically asymmetric vesicles. *J. Biol. Chem.* 254:2244-2249. (1979).
286. Scherphof, G., Roerdink, F., Waite, M. y Parks, J. Disintegration of phosphatidylcholine liposomes in plasma as a result of interaction with high-density lipoproteins. *Biochim. Biophys. Acta* 542:296-307. (1978).
287. Alderson, J. C. E. y Green, C. Enrichment of lymphocytes with cholesterol and its effect on lymphocyte activation. *FEBS Lett.* 52:208-211. (1975).
288. Van Renswoude, A. J. y Hoekstra, D. Cell-induced leakage of liposome contents. *Biochemistry* 20:540-546. (1981).
289. Pagano, R. E. y Takeichi, M. Adhesion of phospholipid vesicles to chinese hamster fibroblasts. Role of cell surface proteins. *J. Cell. Biol.* 74:531-546. (1977).
290. Leserman, L. D., Barbet, J., Kourilsky, F. y Weinstein, J. N. Targeting to cells of fluorescent liposomes covalently coupled with monoclonal antibody or protein A. *Nature* 288:602-604. (1981).
291. Felgner, P. L., Gadek, T. R., Holm, M., Roman, R., Chan, H. W., Northrop, J. P., Ringold, G. M. y Danielson, M. Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:7413-7417. (1987).

292. Lüllmann-Rauch, R. *Lyposomes in Applied Biology and Therapeutics*, Dingle, J. T., Jacques, P. J. y Shaw, I. H. (eds.), North Holland Publishing Co., Amsterdam, p. 49-97. (1979).
293. Heifets, L. B., Lindholm-Levy, P. J. y Comstock, R. D. Clarithromycin minimal inhibitory and bactericidal concentrations against *Mycobacterium avium*. *Am. Rev. Respir. Dis.* 145:856-858. (1992).
294. Heifets, L. B. e Iseman, M. D. Individualized therapy versus standard regimens in the treatment of *Mycobacterium avium* infections. *Am. Rev. Respir. Dis.* 144:1-2. (1991).
295. Young, L. S., Wiviott, L., Wu, M., Kolonoski, P., Bolan, R. e Inderlied, C. B. Azithromycin for treatment of *Mycobacterium avium-intracellulare* complex infection in patients with AIDS. *Lancet* 338:1107-1109. (1991).
296. Benson, C. A. Treatment of disseminated disease due to the *Mycobacterium avium* complex in patients with AIDS. *Clin. Infect. Dis.* 18:S237-S242. (1994).
297. Gangadharam, P. R. J., Ashtekar, D., Ghori, N., Goldstein, J. A., Debs, R. y Düzgünes, N. Chemotherapeutic potential of free and liposome encapsulated streptomycin against experimental *Mycobacterium avium* complex infections in beige mice. *J. Antimicrob. Chemother.* 28:425-435. (1991).
298. Kesavalu, L., Goldstein, J. S., Debs, R. J., Duzgunes, N. y Gangadharam, P. R. J. Differential effects of free and liposome encapsulated amikacin on growth of *M. avium* complex in mouse peritoneal macrophages. *Tubercle* 71:215-217. (1990).
299. Majumdar, S., Flasher, D., Friend, D. S., Nassos, P., Yajko, D.,

- Hadley, W. K. y Düzgünes, N. Efficacies of liposome-encapsulated streptomycin and ciprofloxacin against *Mycobacterium avium-M. intracellulare* complex infections in human peripheral blood monocyte/macrophages. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36:2808-2815. (1992).
300. Onyeji, C. O., Nightingale, C. H., Nicolau, D. P. y Quintilliani, R. Efficacies of liposome-encapsulated clarithromycin and ofloxacin against *Mycobacterium avium-M. intracellulare* complex in human macrophages. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38:523-527. (1994).
301. Tomioka, H., Saito, H., Sato, K. y Yoneyama, T. Therapeutic efficacy of liposome-encapsulated kanamycin against *Mycobacterium intracellulare* infection induced in mice. *Am. Rev. Respir. Dis.* 144:575-579. (1991).
302. Düzgünez, N., Ashtekar, D. R., Flasher, D. L., Ghorri, N., Debs, R. J., Friend, D. S. y Gangadharam, P. R. J. Treatment of *Mycobacterium avium-intracellulare* complex infection in beige mice with free and liposome-encapsulated streptomycin: role of liposome type and duration of treatment. *J. Infect. Dis.* 164:143-151. (1991).
303. Klemens, S. P., Cynamon, M. H., Swenson, C. E. y Ginsberg, R. S. Liposome-encapsulated gentamicin therapy of *Mycobacterium avium* complex infection of beige mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* 34:967-970. (1990).
304. Cynamon, M. H., Swenson, C. E., Palmer, G. S. y Ginsberg, R. S. Liposome-encapsulated-amikacin therapy of *Mycobacterium avium* complex infection in beige mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33:1179-1183. (1989).
305. Ji, B., Lounis, C., Truffot-Pernot, C. y Grosset, J. H. Effectiveness of various multidrug regimens against *M. avium* in beige mouse model. Program and Abstracts of

the 33rd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. American Society for Microbiology, Washington, D. C., p. 171. (1993).

306. Nightingale, S. D., Saletan, S. L., Swenson, C. E., Lawrence, A. J., Watson, D. A., Pilkewics, F. G., Silverman, E. G. y Cal, S. X. Liposome-encapsulated gentamicin treatment of *Mycobacterium avium-Mycobacterium intracellulare* complex bacteremia in AIDS patients. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37:1869-1872. (1993).
307. Holland, S. M., Eisenstein, E. M. y Kuhns, D. B. Treatment of refractory disseminated nontuberculous mycobacterial infection with interferon gamma. *N. Eng. J. Med.* 330:1348-1355. (1994).
308. Squires, K. E., Brown, S. T., Armstrong, D., Murphy, W. F. y Murray, H. W. Interferon- γ treatment for *Mycobacterium avium-intracellulare* complex bacteremia in patients with AIDS. *J. Infect. Dis.* 166:686-687. (1992).
309. Bermudez, L. E. M. y Young, L. S. Activities of amikacin, roxithromycin, and azithromycin alone or in combination with tumor necrosis factor against *Mycobacterium avium* complex. *Antimicrob. Agents Chemother.* 32:1149-1153. (1988).
310. Onyeji, C. O., Nightingale, C. H., Tessier, P. R., Nicolau, D. P. y Bow, L. M. Activities of clarithromycin, azithromycin, and ofloxacin in combination with liposomal or unencapsulated granulocyte-macrophage colony-stimulating factor against intramacrophage *Mycobacterium avium-Mycobacterium intracellulare*. *J. Infect. Dis.* 172:810-816. (1995).
311. Nightingale, S. D., Cameron, D. W. y Gordin, F. M. Two controlled trials of rifabutin prophylaxis against *Mycobacterium avium* complex infection in AIDS. *N. Engl.*

J. Med. 329:828-833. (1993).

312. Gomez-Flores, R., Gupta, S., Tamez-Guerra, R. y Mehta, R. T. Determination of MICs for *Mycobacterium avium-M. intracellulare* complex in liquid medium by a colorimetric method. J. Clin. Microbiol. 33:1842-1846. (1995).
313. Mehta, R. T., Mehta, K., Lopez-Berestein, G. y Juliano, R. L. Effect of liposomal amphotericin B on murine macrophages and lymphocytes. Infect. Immun. 47:429-433. (1985).
314. Douvas, G. S., May, M. H., Ross, E. y Crowle, A. J. Characterization of inhibition of *Mycobacterium avium* replication in macrophages by normal human serum. Infect. Immun. 60:345-352. (1992).
315. Chadwick, M. V. Methods for identifying mycobacteria. In: Mycobacteria, F. J. Baker (ed.). John Wright & Sons Ltd, London, p. 61-87. (1982).
316. Blanchard, D. K., Michelini-Norris, M. B. y Djeu, J. Y. A rapid [³H]glycerol radioassay for determination of monocyte-mediated growth inhibition of disease due to *Mycobacterium avium*. J. Immunol. Methods 133:285-290. (1990).
317. Green, L. C., Wagner, D. D. A., Glogowski, J., Skepper, P. L., Wishnok, J. S. y Tannenbaum, S. R. Analysis of nitrate, nitrite and [¹⁵N]nitrate in biological fluids. Anal. Biochem. 124:131-138. (1982).
318. Klostergaard, J. A rapid extremely sensitive, quantitative microassay for cytotoxic cytokines. Lymphokine Res. 4:309-318. (1985).
319. Doherty, G. M., Jensen, J. C., Alexander, H. R., Buresh, C. M. y

- Norton, J. A. Pentoxifylline suppression of tumor necrosis factor gene transcription. *Surgery* 110:192-198. (1991).
320. Dezube, B. J., Lederman, M. M. y Spritzler, J. G. High-dose pentoxifylline in patients with AIDS: inhibition of tumor necrosis factor production. *J. Infect. Dis.* 171:1628-1632. (1995).
321. Peters, J. H., Hamme, K. J. y Gordon, G. R. Determination of clofazimine in plasma by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 229:503-508. (1982).
322. Bermudez, L. E. M., Stevens, P., Kolonoski, P., Wu, M. y Young, L. S. Treatment of experimental disseminated *Mycobacterium avium* complex infection in mice with recombinant IL-2 and tumor necrosis factor. *J. Immunol.* 143: 2996-3000. (1989).
323. Tracy, K. J., Fong, Y., Hesse, D. G., Manogue, K. R., Lee, A. T., Kuo, G. C., Lowry, S. F. y Cerami, A. Anti-cachectin/TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteremia. *Nature* 330: 662-664. (1987).
324. Stuehr, D. J. y Nathan, C. F. Nitric oxide: a macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells. *J. Exp. Med.* 169:1543-1555. (1989).
325. Hibbs, J. B., Traintor, R. R., y Vavrin, Z. Macrophage cytotoxicity: role for L-arginine deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. *Science* 235:473-476. (1987).
326. Albina, J. E., Mills, C. D., Henry, W. L. Jr. y Caldwell, M. D. Regulation of macrophage physiology by L-arginine: Role of the oxidative L-arginine deiminase pathway. *J. Immunol.* 143:3641-3646. (1986).

327. Albina, J. E., Abate, J. A. y Henry, W. L. Nitric oxide production is required for murine resident peritoneal macrophages to suppress mitogen-stimulated T cell proliferation. *J. Immunol.* 147:144-148. (1991).
328. Denis, M. Modulation of *Mycobacterium avium* growth *in vivo* by cytokines: Involvement of tumour necrosis factor in resistance to atypical mycobacteria. *Clin. Exp. Immunol.* 83: 466-471. (1991).
329. Sathe, S. S., Tsigler, D., Sarai, A. y Kumar, P. Pentoxifylline impairs macrophage defense against *Mycobacterium avium* complex. *J. Infect. Dis.* 172:863-866. (1995).
330. Moore, V. J. A review of side-effects experienced by patients taking clofazimine. *Lepr. Rev.* 54: 327-335. (1983).
331. Vassalli, P. The pathophysiology of tumor necrosis factors. *Ann. Rev. Immunol.* 10:411-452. (1992).
332. Dumarey, C. H., Labrousse, V., Rastogi, N., Vargaftig, B. B. y Bachelet, M. Selective *Mycobacterium avium*-induced production of nitric oxide by human monocyte-derived macrophages. *J. Leukoc. Biol.* 56:36-40. (1994).
333. Rastogi, N., Frehel, C., Ryter, A., Ohahon, H., Lessourd, M. y David, H. L. Multiple drug resistance in mycobacterium: is the cell wall architecture responsible for the exclusion of antimicrobial agents? *Antimicrob. Agents Chemother.* 20:666-677. (1981).
334. Brass, J. B. *Mycobacterium avium-M. intracellulare*: rational therapy of chronic pulmonary infection. *Am. Rev. Respir. Dis.* 134:431-432. (1986).

RESUMEN

Ricardo Alberto Gómez Flores

Fecha de Graduación: Diciembre, 1995

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Ciencias Biológicas

Título del Estudio: **ESTUDIOS SOBRE LA ACTIVIDAD
ANTIBACTERIANA DEL MACROFAGO
EN CONTRA DEL COMPLEJO
*Mycobacterium avium-M. intracellulare***

Número de Páginas: 183

Candidato para el Grado de Doctorado
en Ciencias con Especialidad en
Microbiología

Area de Estudio: Ciencias Naturales

Propósito y Método del Estudio: La infección por el complejo *Mycobacterium avium-M. intracellulare* (MAC) es una de las causas más comunes de bacteremia en pacientes con SIDA en los cuales MAC se asocia a una alta mortalidad. MAC es un parásito intracelular del macrófago. El presente estudio se llevó a cabo para evaluar la eficacia, tanto *in vitro* (macrófagos peritoneales) como *in vivo* (ratones beige), de la clofazimina libre y liposomal en combinación con los activadores del macrófago interferón- γ (IFN- γ) y factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), con el propósito de incrementar sus efectos individuales en contra de la infección por MAC.

Contribuciones y Conclusiones: En éste estudio se observó que la clofazimina fue efectiva en contra de la infección por MAC; la encapsulación de ésta droga en liposomas redujo significativamente su toxicidad para macrófagos y para los animales, manteniendo su actividad antibacteriana. La combinación de IFN- γ o TNF- α con la clofazimina (libre o liposomal) fue más efectiva que el uso individual de dichos agentes en contra de MAC.

FIRMA DE LOS ASESORES: _____

RESUMEN AUTOBIOGRAFICO

Ricardo Alberto Gómez Flores

Candidato para el Grado de

Doctor en Ciencias con Especialidad en Microbiología

Tesis: ESTUDIOS SOBRE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DEL
MACROFAGO EN CONTRA DEL COMPLEJO *Mycobacterium*
avium-M.intracellulare

Area de Estudio: Ciencias Naturales

Biografía:

Datos Personales: Nacido en Monterrey, Nuevo León, el 6 de Junio de 1960, hijo de Carlos Gómez Martínez y Perla Flores Lozano.

Educación: Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León, Grado obtenido Químico Bacteriólogo Parasitólogo en 1984 con Mención Honorífica, Primer Lugar en la Generación. Obtención de la Maestría en Ciencias con Especialidad en Inmunobiología en 1989 con Mención Honorífica; Premio de Investigación en 1990 otorgado por ésta Universidad.

Experiencia Profesional: Maestro e Investigador de Tiempo Completo de la Universidad Autónoma de Nuevo León desde 1985.

Organizaciones Profesionales: Miembro de las Sociedades Mexicanas de Inmunología y de Microbiología desde 1986. Miembro del Colegio de Químicos Bacteriólogos Parasitólogos desde 1986. Miembro de la Sociedad Americana de Microbiología (ASM) desde 1993.

