

CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES

1.1 Unicelularidad o Multicelularidad – lucha y unidad dialéctica de contrarios.

Inmunidad y organización multicelular son procesos biológicos íntimamente ligados e interdependientes con peculiaridades distintivas que transitan en (simples) sutilezas diferenciales; son destellos de toda una cadena evolutiva que, saturada de intentos y fracasos, han sido eslabones forjados tan solo por unos cuantos organismos.

Durante la filogenia, un requisito indispensable hacia la multicelularidad representaba la discriminación diferencial intercelular. Desde luego, parte de la problemática que implicaba el desarrollo de mecanismos de reconocimiento entre organismos ya se encontraba resuelta, de origen, gracias a la comunidad de los componentes o bloques básicos monoméricos necesarios para la edificación de estructuras de membrana. No obstante, es precisamente la “promiscuidad” (comunidad) de este lazo común obligatorio la que posibilita a organismos enemigos/hostiles a desplegar ciertas tácticas antagónicas de parasitismo.

La disyuntiva erigida frente a los primeros organismos (protoorganismos) fue resuelta en dos formas (unicelularidad vs multicelularidad) aparentemente opuestas, pero albergando en esencia un solo contenido: *supervivencia adaptativa*. Las dos rutas de Evolución unicelular y multicelular – conferían tanto atributos como defectos. Los organismos unicelulares, debido a su relativa simplicidad organizacional y estructural, poseían un alto grado de plasticidad adaptativa, menor tiempo de generación y una elevada flexibilidad nutricional gracias a la amplia gama de compuestos inorgánicos que utilizan como fuentes de carbón y nitrógeno. Por otro lado, la organización compleja multicelular representó un largo y arduo camino, pues involucraba la construcción de todo un complejo sistema de coordinación para edificar primero componentes celulares membranosos compartimentalizados y, a la postre, para formar estructuras coloniales y verdaderas unidades multicelulares. El establecimiento de sistemas y mecanismos de reconocimiento y funcionamiento coordinados es un aspecto de vital importancia no sólo para lograr niveles superiores de celularidad, sino también para mantener la integridad física del nuevo macroorganismo contra los embates de microparásitos; de ahí la efectividad alcanzada por la Naturaleza al aplicar, en la resolución de tareas tan

intrincadas como lo son la discriminación de lo propio y ajeno, respuesta inmunitaria y organización multicelular, algoritmos comunes de señalización (intra- e intercelular) (Figura 1). De esta manera, la multicelularidad fue una estrategia de inversión de alto riesgo y a largo plazo, en busca de calidad y no cantidad, donde se perseguía prevalecer y no simplemente sobrevivir.

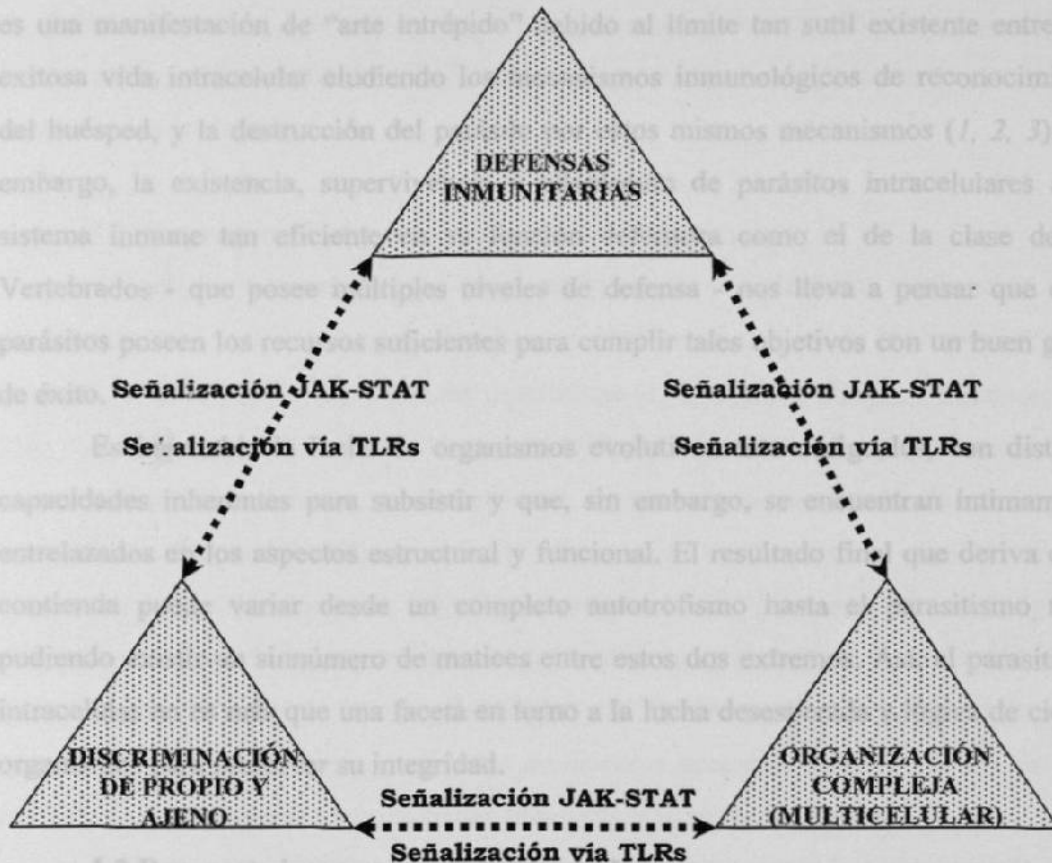


Figura 1. Unidad de fenómenos biológicos a través de la aplicación de algoritmos comunes.

En su camino a la multicelularidad, los organismos unicelulares sacrificaron versatilidad, plasticidad, corto tiempo de generación y otros tantos “privilegios” poseídos desde sus orígenes unicelulares, con el fin de alcanzar eficiencia homeostática y una diversidad adaptativa superior. Pero quizás los verdaderamente valiosos dividendos obtenidos a través de la larga filogenia y ontogenia fueron los cambios

cualitativos surgidos de la integración multicelular que, a su vez, favorecieron la aparición de funciones inéditas hasta entonces; funciones nuevas que permitieron al macroorganismo no solo elevar su competitividad frente a sus contrincantes unicelulares, sino también dominar nuevos nichos.

El parasitismo intracelular en vertebrados, ya sea obligatorio o facultativo e independientemente de que implique una adaptación reciente o lejana en la Evolución, es una manifestación de "arte intrépido" debido al límite tan sutil existente entre una exitosa vida intracelular eludiendo los mecanismos inmunológicos de reconocimiento del huésped, y la destrucción del parásito por estos mismos mecanismos (1, 2, 3). Sin embargo, la existencia, supervivencia y adaptación de parásitos intracelulares a un sistema inmune tan eficiente en su función defensora como el de la clase de los Vertebrados - que posee múltiples niveles de defensa - nos lleva a pensar que estos parásitos poseen los recursos suficientes para cumplir tales objetivos con un buen grado de éxito.

Es inevitable la lucha de organismos evolutivamente desiguales, con distintas capacidades inherentes para subsistir y que, sin embargo, se encuentran íntimamente entrelazados en los aspectos estructural y funcional. El resultado final que deriva de la contienda puede variar desde un completo autotrofismo hasta el parasitismo total, pudiendo existir un sinnúmero de matices entre estos dos extremos. Así, el parasitismo intracelular no es más que una faceta en torno a la lucha desesperada y lógica de ciertos organismos para preservar su integridad.

1.2 Respuesta inmune innata y adquirida.

Dos hallazgos primordiales causaron que los investigadores de la respuesta inmune adquirida relegaran por años, a un segundo plano, a la innata. El primero fue el descubrimiento de la recombinación de segmentos génicos (V, D, J) en linfocitos B y T para generar la inmensa diversidad y exquisita afinidad de receptores antígeno-específicos. El segundo se constituyó a través del descubrimiento de las dos hipotéticas subpoblaciones de linfocitos T CD4⁺, con característicos espectros de citocinas secretadas (Th1 - IFN- γ , IL-2, TNF- β ; Th2 - IL-4, IL-10) y capaces de suprimirse mutuamente y determinar también el tipo de respuesta inmune - humoral o celular.

Por un lado teníamos una estirpe celular filogenéticamente neófita, pero más evolucionada y con cualidades para diferenciarse, según las necesidades, en dos clases de linfocitos – T y B – adjudicados con las herramientas suficientes para explicar cabalmente el reconocimiento de la infinidad de formas antigénicas a las que nos enfrentamos en el transcurso de nuestras vidas. En el otro extremo se encontraban componentes de la respuesta inmune innata que, a pesar de constituir las primeras líneas de defensa contra el proceso de infección – macrófagos, neutrófilos y eosinófilos – fueran considerados como “rígidos” elementos accesorios que carecen de memoria y especificidad inmunológica.

1.3 Heterogeneidad y renovación de macrófagos.

En años recientes hemos sido testigos de una intensa exploración que, paulatinamente, rompe la concepción *per se* establecida acerca de la uniformidad de macrófagos [neutrófilos (4) y células dendríticas (5, 6, 7)]. En efecto, constatamos no sólo una heterogeneidad fenotípica y morfológica, sino también una diversidad en cuanto a actividad génica y estado funcional, siendo esta última ligada clásicamente al concepto de activación, definida como la adquisición de competencia a completar una función compleja (quimiotaxis, fagocitosis, procesamiento y presentación de antígenos, muerte intracelular de microparásitos, etc.), cuantificada por el grado de realización de la tarea dirigida durante un ensayo fisiológico (8, 9). De particular importancia es el potencial de macrófagos a ser activados de diversas maneras, donde cada una de ellas representa la potenciación de una o más funciones y la supresión de otras.

En base a las condiciones de activación, hasta el momento han sido descritos tres tipos de macrófagos que realizan distintas funciones inmunológicas: i) macrófagos activados en forma clásica o Tipo 1 (10, 11); ii) macrófagos activados en forma alternativa (10, 11, 12); iii) macrófagos activados de Tipo 2 (12, 13). Además, los ensayos de microarreglos, RT-PCR y expresión diferencial señalan que las combinaciones de genes inducibles en macrófagos son casi únicas para cada agente activador (virus, bacterias, hongos, levaduras, etc.), existiendo tan solo un traslape parcial entre ellas (14). Por otro lado, los patrones de expresión génica pueden verse modificados considerablemente bajo los efectos combinatorios de citocinas y compuestos químicos (como por ejemplo IFN- γ + LPS) (15).

El “mito” de la inespecificidad de la respuesta inmune innata comienza a ceder paso gracias a los hallazgos de múltiples receptores celulares en macrófagos [receptores para el componente Fc de Igs (IgG, IgA, IgE), complemento (C3b, C3bi, C5a, C1q), citocinas (MIF, MAF, LIF, IL-1, IL-2, IL-4, IFN- α , IFN- β , IFN- γ , IL-12, TNF- α , IL-10 y otras), hormonas (insulina, angiotensina, glucocorticoesteroides), lipoproteínas (PGE₂, LTB₄, LTC₄, LTD₄, PAG), manosil-fucosil, residuos de galactosa] que, al unirse a sus ligandos con estructura química característica, transducen señales intracelulares que desencadenan respuestas inmunológicas específicas.

Los estudios de van Furth (16) inicialmente apoyaban la tesis que las poblaciones macrofágicas tisulares prácticamente no se autorenewan y que su reabastecimiento proviene del reclutamiento de monocitos (95%) periféricos, pero planteamientos más recientes han trazado el origen de estas células residentes por medio del trasplante de células de médula ósea marcadas con el gen lac-Z en animales irradiados. Los resultados mostraron, al mes del trasplante, que las células formadoras de colonias en médula ósea, así como los esplenocitos, procedían del donador (lac-Z⁺), mientras que, un año después, solamente el 61% de los macrófagos alveolares y células de Kupffer fueron reemplazados por células donadoras; los macrófagos de la microglia tardaron aún más en reemplazarse. Así, los autores concluyeron que los macrófagos tisulares/residentes se renuevan lentamente, aunque otra interpretación pudiese ser que no todas las células son sustituidas, en el estado dinámico, por monocitos periféricos, y por tanto existe una no menospreciable proliferación de fagocitos macrofágicos *in situ* (17).

1.4 Moléculas CD1 y TLR.

Los macrófagos magnifican aún más su espectro de respuesta inmunológica gracias a dos sistemas de glicoproteínas de membrana no polimórficas que, sin ser exclusivas, son expresadas en forma prominente por células presentadoras de antígenos (macrófagos, células dendríticas, linfocitos B) – moléculas CD1 y receptores parecidos a Toll (TLRs).

CD1 comprende un grupo de proteínas relacionadas, estructural- y evolutivamente, con las moléculas presentadoras de antígenos codificadas por el Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC). En el cromosoma 1 del humano se encuentran los genes para cinco tipos de moléculas CD1 (Cd1a, CD1b, CD1c y CD1d),

mientras que en el ratón existen dos genes que codifican proteínas homólogas al CD1 humano – mCD1d1 y mCD1d2. En forma análoga a las moléculas MHC I, pero a diferencia de MHC II, las proteínas CD1 se asocian a β_2 -microglobulina por medio de interacciones no covalentes; no obstante, a nivel de secuencias aminoacídicas, CD1 se encuentra igualmente relacionada con los dos tipos de moléculas MHC I y II.

Lo atípico de CD1 es que sus cadenas de aminoácidos (aa) forman hendiduras de naturaleza hidrófoba que presentan lípidos (en contexto MHC-independiente), glucolípidos (18, 19), ácidos micólicos, fosfolípidos que contienen inositol (lipoarabinomanano y manosidas de fosfoinositida) (20) y monomicolato de glucosa (21) de procedencia micobacteriana, pero no péptidos, que serán reconocidos por células T (CD4⁺CD8⁻ doble negativas; CD8⁺; NK) CD1-restringidas.

Los receptores Toll (insectos) y TLR (mamíferos) son miembros de una de las seis familias que, a su vez, integran la superfamilia de IL-1R/TLR (Superfamilia de receptores parecidos a Toll/receptor IL-1). El común denominador para todas las familias es la presencia de una secuencia aminoacídica consenso de 200 aa en el segmento citosólico – llamada TIR (dominio Toll/IL-1R) – que provee la plataforma interna inicial para la activación de una cascada de señales (22-24).

A través de millones de años de Evolución, desde insectos hasta mamíferos, la respuesta inmune innata ha retenido en macrófagos y otras CPAs, la estructura de los receptores Toll/TLR para responder a las amenazas microbianas por medio del reconocimiento de sus Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (PAMP). Cada uno de estos patrones de patógenos es no sólo reconocido específicamente por uno o dos receptores TLR [LPS→TLR-4 (25), lipoproteínas o lipopéptidos→TLR-2 (26), CpGADN→TLR-9 (27), flagelina→TLR-5 (28), péptidoglicano→TLR-2 y TLR-6 (29, 30)], sino que diferentes TLRs pueden cooperar para alcanzar un grado de especificidad más avanzado y descifrar las identidades de varias clases de microorganismos (31-36).

La activación de macrófagos vía TLRs por microparásitos o sus ligandos, facilita la síntesis y secreción dinámica de moléculas efectoras con actividad indirecta como citocinas proinflamatorias [IL-1, IL-6, TNF- α (37-39)], Th1 [IL-12 (40, 41)] y anti-inflamatoria (IL-10), así como otros compuestos con efectos antimicrobianos directos como el óxido nítrico. En reciprocidad, TLRs son inducidos bajo el efecto específico de

citocinas; así, IL-2, IL-1 β , TNF- α e IFN- γ elevan, transitoriamente, la expresión de TLR-2^{ARNm} a las dos horas post-estímulo en la línea macrófaga RAW264.7.

1.5 Fagocitosis.

Lejos de representar un suceso estático, pasivo y unidireccional, la interacción parásito-macrófago acontece de acuerdo a una secuencia ordenada de eventos intercelulares basados en patrones de especificidad y que vislumbran un proceso dinámico (bidireccional) definido en cada momento por factores del huésped y parásito. El contacto físico “adhesivo” del microparásito con la célula huésped es uno de los primeros eventos. Esta adhesión se lleva a cabo a través de la unión de ligandos pertenecientes a la bacteria, llamados adhesinas, con sus receptores de membrana que se encuentran sobre la célula fagocítica. De manera frecuente múltiples ligandos sobre la superficie del patógeno sirven para elevar la fuerza y especificidad (efecto aditivo) de adherencia cuando estos ligandos son reconocidos en forma coordinada. Sin embargo, en situaciones de ausencia de complementariedad, el microparásito ha tomado ventajas de los mecanismos de señalización transmembranal de la célula huésped, desencadenando el mismo el agrupamiento y activación del portal de entrada. Alternativamente a este mecanismo de activación directa de la señalización celular vía componentes bacterianos, existe la posibilidad de una interacción indirecta por medio de la estimulación de liberación de factores activadores solubles celulares (como por ejemplo, citocinas), los cuales una vez secretados actúan de forma paracrina o autocrina e inducen la expresión del receptor celular sobre la célula blanco.

La fagocitosis es un fenómeno en el que convergen sistemas que a primera vista parecieran distantes (proteínas del citoesqueleto, receptores de membrana, enzimas de fosforilación y degradación, citocinas, factores de transcripción génica, etc.). La internación en el macrófago, así como la citostasis y destrucción microbiana, se ven acompañadas de la síntesis y/o liberación de citocinas específicas.

1.6 Rutas de internación de partículas.

La polémica sobre el efecto de la ruta de penetración se ha exacerbado aún más gracias a que, como alternativa de las vías opsonizantes, existen receptores mediadores

de fagocitosis no-opsonizante y, aún más, a la posibilidad de combinación simultánea entre estas dos clases de receptores para la internación antigénica.

Diversos autores reportan que las distintas vías de internación por macrófagos, la naturaleza física y química, así como el estado biológico del objeto a internalizar [soluble, particulado (por ejemplo bacterias)] predeterminan un destino diferente del objeto en la respuesta inmunológica para cada caso (. Así por ejemplo, las micobacterias muertas fagocitadas por los macrófagos son llevadas a fagosomas que difieren parcialmente en su constitución polipeptídica de los fagosomas que reciben a las micobacterias vivas (48). Además, se ha observado que todas estas vías que son utilizadas para lograr la penetración intracelular de sustancias solubles u objetos particulados cambian cuando se tratan las células con citocinas recombinantes como IL-4, IFN- γ , IL-13, y otras.

1.6.1 Vías de internación de Mtb en macrófagos.

M. tuberculosis es un microorganismo patógeno intracelular muy estudiado con capacidad para penetrar en macrófagos a través de al menos diez tipos de receptores celulares – CR1, CR3, CR4, Receptor para Manosa (MR), CD14, al menos tres diferentes tipos de receptores para Sp-A, Fc γ Rs – algunos de los cuales pudiesen estar asociados a una internación microbiana que no desencadena la activación de mecanismos microbicidas del macrófago, como la producción de intermediarios reactivos del oxígeno y nitrógeno.

El MR de macrófagos humanos derivados de monocitos induce la fagocitosis indistinta, tanto de especies micobacterianas no patógenas (*M. phlii* y *M. smegmatis*) como de una patógena oportunista (*M. kansasii*), pero sin desencadenar la activación de NADPH-oxidasa y subsecuente generación de $^{\circ}\text{O}_2^-$ (aún utilizando dosis infecciosas de 50-200 micobacterias/macrófago) ni tampoco la maduración de fagosomas (en comparación con la fagocitosis de partículas de látex recubiertas con manosa-ASB) (43). Es interesante que lipoarabinomananos derivados de *M. bovis* bacillus Calmette-Guérin y *M. tuberculosis* H37Rv (pero no lipoarabinomananos de *M. smegmatis* recubiertos con fosfoinositol) interactúan con el receptor para manosa, suprimiendo la producción de IL-12 por células dendríticas humanas derivadas de monocitos estimulados con LPS (44). Además, la exposición previa (por 18 horas) de la línea macrofágica J774E (MR $^+$)

a IL-4 (citocina prototipo Th2), causa una mayor fagocitosis mediada por MR; por el contrario, IFN- γ (citocina prototipo Th1) eleva la fagocitosis a través del componente Fc de inmunoglobulinas (45).

Tradicionalmente la captación de partículas a través de los receptores macrofágicos para el componente Fc de inmunoglobulinas se vincula con una producción de anión superóxido y liberación de citocinas proinflamatorias del fagocito (46). Sin embargo, la ingestión de micobacterias de la cepa H37Rv opsonizada con IgG, así como no opsonizadas, no evita la supervivencia intracelular microbiana (47). Estos resultados podrían indicar que, al menos en el caso de *M. tuberculosis*, la virulencia depende de factores microbianos que actúan no durante la internación celular (vías de penetración), sino más bien en el proceso de formación y maduración del fagolisosoma (48).

1.6.2 Vías de entrada de otros microparásitos intracelulares.

Los estudios de Rathman et al (49) y Butcher et al. (50) evidencian que el portal de entrada de *Salmonella typhimurium* (cepas SL1344 y mutante BJ66) y *Toxoplasma gondii* (taquizoítos) de la cepa virulenta RH en macrófagos de la línea macrofágica RAW264.7 y macrófagos de ratón derivados de médula ósea, respectivamente, no es relevante para que estas dos especies intracelulares sobrevivan y se multipliquen. Aparentemente, el prerequisite indispensable en ambos casos resulta ser la viabilidad de los microparásitos, ya que la evasión del tráfico endocítico y modificación del fagosoma que contiene a *S. typhimurium*, así como el efecto supresor de *T. gondii* sobre la producción de IL-12 y TNF- α estimulada por LPS, no se realizan cuando se utilizan microorganismos muertos por calor (no viables).

En contraste a las investigaciones arriba citadas, Drevets et al. (51) tratan de evidenciar la existencia de al menos dos diferentes tipos de receptores que interceden la internación de *L. monocytogenes*, uno de los cuales, CR3, es referido a una actividad microbicida efectiva anti-*Listeria*. Los autores usan macrófagos peritoneales inducidos con peptona o tioglicolato, clasificados como listericidos y no-listericidos basándose en el porcentaje de fagocitosis mediada por CR3 de *Listeria* opsonizada con suero – 66 y 35%, respectivamente – y en el hecho que los primeros (listericidos) no permiten el escape de *Listeria* al citoplasma.

1.7 Adhesión.

El reconocimiento/adhesión de patógenos por medio de receptores inmunológicos de la respuesta inmune desencadena en macrófagos la activación de mecanismos celulares de fosforilación (Proteín-cinasa A, Caseín-cinasa II, PKC ξ , I κ B-cinasa, Akt, Fosfatidil-inositol cinasa, raf-1, cinasa dependiente de ARN de doble cadena, etc.). Las señales generadas estimulan la inducción de los factores de transcripción celular NF- κ B [Rel(c-Rel, RelA (p65), RelB, NF- κ B1 (p50 y su precursor p105) y NF- κ B2 (p52 y su precursor p100)], que regulan, en forma positiva o negativa, una gran variedad de genes para citocinas (IL-1, IL-6, TNF- α , IL-12, IFN- γ , GM-CSF), quimiocinas (IL-8, MCP-1, MIP-1 α , RANTES, eotaxina), moléculas de adhesión celular (ICAM, VCAM, E-selectina), proteínas de fase aguda (proteína sérica amiloide 1, factor B del complemento, componente C3 del complemento, etc.), enzimas efectoras (iNOS, COX-2), proteínas del MHC y moléculas coestimuladoras de membrana (como B7.1 y B7.2).

La naturaleza de los ligandos microbianos (LPS, ARN viral de simple o doble cadena, secuencias de ADN estimuladoras, péptidoglicanos, etc.) que inducen la activación de NF- κ B, sugiere que este efector juega un papel crítico en la respuesta inmune innata. Para ejemplificar lo anterior, dos estudios demostraron que macrófagos de la línea celular P388D reaccionan a la infección con *Listeria monocytogenes* con una inmediata inducción transcripcional y de traducción de las citocinas TNF- α e IL-1 α/β (40). La misma respuesta se observó cuando la internación de *L. monocytogenes* por macrófagos fue bloqueada por el tratamiento de citocalasina D, indicando que la adhesión, pero no la fagocitosis, es requerida para la inducción de las citocinas proinflamatorias mencionadas.

1.8 Receptores para el componente Fc de la inmunoglobulina G.

Los complejos inmunes (CIs) pueden potenciar o suprimir la respuesta inmune aferente en dependencia de su combinación precisa y modo de administración (65). En el humano existen tres clases de receptores celulares para el componente Fc de inmunoglobulinas de isotipo γ : Fc γ RI o CD64 (Fc γ RIA, Fc γ RIB y Fc γ RIC) con alta afinidad ($K_d=10^{-8}$ - $10^{-9}M^{-1}$), Fc γ RII o CD32 (Fc γ RIIA, Fc γ RUIB y Fc γ RIIC, con baja

afinidad ($K_d < 10^{-7} M^{-1}$) y FcRIII o CD16 (FcγRIIA y FcγRIIB) con afinidades media y alta, respectivamente ($K_d \pm 3 \times 10^{-7}$ y $< 10^{-7} M^{-1}$); en el ratón, sus equivalentes son FcγRI, FcγRIIB y FcγRIII. En forma adicional se ha descrito la existencia de polimorfismo genético para FcγRIIA, FcγRIIA y FcγRIIB, con aparente relevancia funcional, ya que afecta la unión de IgG e influyen sobre la susceptibilidad a un cierto número de enfermedades infecciosas y autoinmunes (66). Funcionalmente, los FcγRs pueden, a su vez, dividirse en receptores activadores (FcγRI, FcγRIIA y FcγRIIA) e inhibidores (FcγRIIB) en base a la presencia de una secuencia aminoacídica consenso ITAM (Motivo de activación de inmunoreceptor dependiente de tirosina) para los primeros, y para los segundos – ITIM (Motivo de inhibición de inmunoreceptor dependiente de tirosina). La excepción a esta dicotomía funcional es el receptor FcγRIIB sobre neutrófilos, que carece tanto de ITAM e ITIM y funciona como receptor decodificador al ligar CIs, pero sin desencadenar activación o supresión.

FcγRs activadores se encuentran en las membranas de la mayoría de las células del sistema inmune: monocitos, macrófagos, células NK, mastocitos, eosinófilos, neutrófilos y sólo en ciertas subpoblaciones de linfocitos. Por otra parte, los FcγRs inhibidores se hallan en células B, macrófagos, neutrófilos y mastocitos, pero no en células T y NK.

1.8.1 FcγRs activadores.

Estos receptores carecen de actividad tirosin-cinasa intrínseca, pero su entrecruzamiento desencadena la fosforilación de tirosina en ITAM por la familia de cinasas Src, gracias a lo cual se reclutan moléculas, sobre todo de la familia de las cinasas syk, que contienen un dominio SH2 que se une al ITAM fosforilado. Dependiendo del tipo particular de célula activada por el receptor Fc, se involucran diferentes cinasas en estas vías de señalización posterior [en células NK: FcγRIIA → lck; en monocitos y mastocitos: FcγRIIA o FcγRIIA → lyn y hck (67, 68)]. En el mecanismo de transducción posterior existe una similitud en las vías de señalización observadas para otros receptores que contienen ITAM, como BCR y TCR (69, 70).

Uno de los eventos tempranos es la activación de PI3 cinasa, la cual induce la producción de PIP₃ y el reclutamiento de moléculas que poseen el dominio PH, como lo

son las cinasas PLC γ y Tec, a través de la interacción PIP $_3$ -PH (71, 72). PLC γ genera IP $_3$, DAG y la movilización sostenida de calcio necesarios para la realización de tareas inmunitarias: degranulación, fagocitosis, ADCC, transcripción de genes para citocinas y liberación de mediadores proinflamatorios (citocinas, leucotrienos, prostaglandinas, etc.).

La activación mediada por Fc γ Rs (activadores) potencia la respuesta humoral mediada por anticuerpos a través de su internación por CPAs y, además, elevan el procesamiento de antígenos e *influyen en forma selectiva la presentación de ciertos epítopes antigénicos internados por Fc γ RIII, más no aquellos presentados a través de Fc γ RII (73).*

1.8.2 Fc γ Rs inhibidores.

Fc γ RIIB establece umbrales de activación de células B en el momento del entrecruzamiento de Igs de superficie, un mecanismo mediante el cual CIs pueden suprimir la producción de anticuerpos, disminuyendo por tanto la movilización de calcio en linfocitos B y su posterior proliferación celular.

La fosforilación de ITIM genera un dominio de reconocimiento SH2 que es el sitio de unión para la molécula de señalización inhibitoria SHIP (SH2-containing Inositol 5'-Phosphate) que bloquea la activación de ITAM a través de la hidrólisis de PIP $_3$ a fosfatidilinositol 3,4-bisfosfato [PI(3,4)P $_2$]. Estudios en ratones knockout para SHIP coinciden que la deficiencia en células sanguíneas de esta proteína de señalización negativa resulta en mieloproliferación e hiperrespuesta a la estimulación con factores de crecimiento (74). En ausencia de PIP $_3$, las proteínas con dominio PH (por ej. Btk y PLC γ) son liberadas de la membrana celular y se anula la señal impartida por calcio al prevenir el influjo de este catión extracelular, obstruyendo así las funciones inmunitarias ya mencionadas.

Ya que generalmente ambos tipos de Fc γ Rs (activador e inhibidor) se expresan sobre la misma célula, la respuesta celular fisiológica dependerá del balance neto entre las vías de señalización activadora e inhibitoria, así como de la avidéz selectiva para el ligando IgG. Por lo tanto, no es sorprendente que la expresión de estos receptores sea

modulada durante la diferenciación celular (75) – en forma crucial por medio del efecto de citocinas (76).

1.9 Inmunoglobulinas intravenosas.

A más de cincuenta años de su aplicación terapéutica, Samuelsson *et al.* (77) evidenciaron que el mecanismo molecular de la propiedad anti-inflamatoria de IVIG en desordenes autoinmunes se basa en la inducción del receptor inhibitor FcγRIIB sobre células efectoras macrofágicas. Los autores se apoyaron en un modelo de trombocitopenia inmune en ratones BALB/c, en el que la inyección del anticuerpo monoclonal de subclase IgG2a anti-plaquetas 6A6 (MAb 6A6) desencadena el rápido consumo de plaquetas a través de receptores FcγRIII. Mientras que la participación de neutrófilos en el efecto negativo de MAb 6A6 era mínima, existía una aparente implicación de células efectoras esplénicas macrofágicas. La protección de IVIG contra el efecto de destrucción plaquetaria fue dosis-dependiente y conferida por la porción Fc, pero no Fab, de los anticuerpos contenidos; además, la protección a través de IVIG fue defectuosa en animales FcγRIIB-deficientes (vs normales) o al bloquear en forma específica el receptor FcγRIIB en ratones normales. Finalmente, el tratamiento de ratones con IVIG originó un aumento de 60% en el número de macrófagos esplénicos que expresan altos niveles de FcγRIIB. Como ya se ha explicado, el entrecruzamiento simultáneo de receptores FcγRIII y FcγRIIB por CIs induce el reclutamiento de la molécula SHIP, una fosfatasa de inositol que hidroliza PIP₃, abortando una de las fases esenciales en la vía de señalización para fagocitosis y, por tanto, evitando la destrucción de plaquetas.

La unión de receptores FcγRIIB logra no sólo disminuir la expresión de MHC II inducida por IFN-γ en monocitos humanos (78), sino que también puede suprimir la respuesta de anticuerpos antígeno-específicos (79), la actividad fagocítica, y la producción de ácido araquidónico y peróxido de hidrógeno por macrófagos. Así mismo, la captación de CIs formados por IgG y eritrocitos de carnero u ovoalbúmina (IgG-E e IgG-OVA) por FcγRs de macrófagos activados (con IFN-γ + LPS) resulta en una marcada reducción específica de IL-12p35^{ARNm} y IL-12p40^{ARNm}, pero sin alterar la expresión de los ARNs mensajeros para IL-1α, IL-1β, IL-6, y elevando la de IL-10^{ARNm}

(80, 81). Es notable que, a nivel proteico, la inhibición de la producción de IL-12 por IgG-E o IgG-OVA por macrófagos activados, no vuelve estas células refractarias a la producción de IL-10 y otras citocinas proinflamatorias (TNF- α e IL-1, por ejemplo) (82, 83).

Huemophilus influenzae tipo b muerta por calor es capaz de inducir IL-12p40 y niveles relativos de IL-10 ~5000 pg/ml, pero el complejo *H. influenzae*-IgG estimula aún más la producción de esta citocina anti-inflamatoria (~15000 pg/ml). *In vivo*, no sólo se acelera el ritmo de eliminación de IgG-LPS a través de Fc γ R, sino que también disminuye la producción de IL-12p40 (84).

Los estudios demuestran que la activación *in vitro* de macrófagos derivados de médula ósea por IFN- γ ("priming") y expuestos a LPS, dirige los fagocitos hacia una respuesta tipo Th1 a través de la respuesta inmune innata, ya que macrófagos de ratón MyD88^{-/-} (proteína adaptadora que interviene en la señal de transducción por TLRs), no logran producir citocinas tipo Th1 (85). Además, la ligación subsiguiente de CIs, aún cuando fueran estos irrelevantes, modifica en forma dramática estos macrófagos tipo Th1 (secretores excelentes de IL-12) a tipo Th2 – productores de elevadas concentraciones de IL-10 (86, 87). Más aún, el encuentro de estos macrófagos activados tipo Th2 con células vírgenes T, genera clones Tipo Th2 (IFN- γ _{Conc.} < IL-4_{Conc.}) que mantienen este fenotipo estable durante una respuesta inmune secundaria *in vitro* (88).

En forma recíproca, existen citocinas que poseen la capacidad de regular positiva- o negativamente la expresión genética y proteínica de los receptores para Fc γ en dependencia muy estrecha de la célula blanco y cronología de las citocinas y otros estímulos aplicados. IFN- γ aumenta la transcripción del gen para Fc γ RI (89) así como la estabilidad de su respectivo ARNm en monocitos humanos de adultos y recién nacidos, mientras que la expresión de Fc γ RII^{ARNm} se eleva sólo en los monocitos de recién nacidos (90). Por otra parte, la expresión de las proteínas Fc γ RIIA sobre membranas de monocitos circulantes fue potenciada bajo el efecto de IFN- γ , mientras que Fc γ RIIB se elevó al tratar las células monocíticas con IL-4.

El estudio de te Velde *et al.* (91) resulta sobre manera interesante, ya que estos autores reportan que IL-10 regula en forma negativa la expresión de MHC II, pero estimula, en forma comparable con IFN- γ , la actividad citotóxica dependiente de

anticuerpos y la expresión de FcγRI sobre monocitos humanos. El tratamiento de monocitos con IL-10 previene la disminución causada por IL-4 de los tres tipos de receptores Fcγ.

1.10 Maduración del fagosoma.

Después de su fagocitosis, el núcleo estratégico de los patógenos intracelulares (*Chlamydia*, *Legionella*, *Mycobacterium* spp., *Toxoplasma gondii*, *Coxiella burnetti*, *Leishmania* spp., rickettsias, *Trypanosoma cruzi*, *L. monocytogenes*, *Shigella* spp.) se transfiere ahora a la evasión de una correcta maduración del fagosoma y formación de una estructura fagolisosomal en la cual se combinan pH ácido, metabolitos reactivos del oxígeno y nitrógeno, enzimas hidrolíticas y proteínas catiónicas, entre otras, para degradar las partículas fagocitadas. De hecho, el fagosoma es una estructura altamente dinámica que mantiene una considerable serie de proteínas (>200 en el caso de partículas de látex contenidas en fagosomas de la línea celular U937) (52) que le permiten interactuar con el citoesqueleto y la vía endocítica; por si fuera poco, la naturaleza de la partícula contenida en el fagosoma hace más complejas estas interacciones (53).

El contacto realizado por parte de ligando(s) o proteína(s) secretadas del microorganismo y el (los) receptor(es) de la célula hospedera provoca una serie compleja de reacomodamientos del citoesqueleto y la consecutiva polimerización de sus proteínas constitutivas gracias a la fosforilación de tirosina, metabolismo lipídico y activación de las proteínas G con el objetivo no sólo de permitir la entrada del parásito en la célula, sino también de dirigir el movimiento del parásito a través del citosol durante la maduración fagolisosomal (54).

1.11 Inhibición de la maduración fagolisosomal.

En este contexto, aunque la patogénesis de *M. tuberculosis* era referida clásicamente a la inhibición de la fusión fagosoma-lisosoma (55, 56), la nueva información generada sobre el tráfico de membranas en células eucariotas ha permitido establecer que los fagosomas micobacterianos muestran: 1) una disminuida acidificación debida a la escasez de H⁺ATPasa (57); 2) adquisición limitada de marcadores tardíos endosomales; 3) presencia de una forma intermedia, parcialmente procesada, de

catepsina D (52); 4) ausencia de receptores para manosa-6-fosfato (58) y 5) expresión elevada de proteínas fagosomales tempranas, como por ejemplo coronina (59). Las micobacterias inhiben la maduración fagolisosomal, sobreviviendo *de facto* en un compartimiento con características endosomales tempranas.

Fratti *et al.* (60) van más allá y presentan evidencias sobre mecanismos moleculares que pueden explicar, en parte, la inhibición de la maduración del fagosoma que contiene a la micobacteria ("fagosoma micobacteriano"). Estos investigadores infectan macrófagos con *M. tuberculosis* y observan que, a diferencia de los fagosomas que contienen perlas de látex, los fagosomas micobacterianos no adquieren niveles considerables del marcador temprano EEA1 (Autoantígeno Endosomal Temprano 1), el cual es reclutado normalmente en organelos endocíticos mediante la unión a fosfatidilinositol-3-fosfato (PtdIns[3]P) (61). La inhibición de la enzima fosfatidilinositol 3(OH)-cinasa (PI3K) con wortmanina y LY294002 (62) disminuyó el reclutamiento de EEA1 a los fagosomas con partículas de látex y bloqueó también la adquisición de marcadores endocíticos tardíos, indicando que la generación de PtdIns[3]P por PI3K juega un papel en la maduración del fagosoma. Por último, partículas de látex cubiertas con lipoarabinomano-mano (ManLAM), pero no aquellas cubiertas con su precursor manosa de fosfatidilinositol (PIM), redujeron la colocalización de EEA1 en los fagosomas con látex. En este sentido, Beatty *et al.* (63) demostraron que lípidos micobacterianos, incluyendo ManLAM y PIM, son liberados por las micobacterias fagocitadas y se intercalan en varios compartimientos membranosos de la célula huésped.

Por otra parte, Zhang *et al.* (64) reportaron que, durante su fase de crecimiento logarítmica, varias especies bacterianas como *Salmonella typhimurium*, *Yersinia enterocolitica* y algunas cepas de *Escherichia coli*, liberan lipoproteína; más aún, en comparación con el control negativo, las cepas utilizadas de *E. coli* tratadas con el antibiótico ceftazidima, secretan una cantidad 9 veces mayor de lipoproteína, la cual induce la producción de IL-6 por macrófagos peritoneales de la cepa de ratones C3H/HeJ (no respondedora a LPS), sugiriendo además que la activación de los fagocitos profesionales mononucleares se realiza a través de vías de señalización diferentes a la usada por LPS.

1.12 Citocinas.

Las citocinas (92) son proteínas o glicoproteínas con peso molecular de alrededor de 10-24 kDa, y son secretadas por células para producir su efecto de transducción de señales sobre sus blancos en forma paracrina, autocrina, yuxtacrina, retrocrina e intracrina. En condiciones fisiológicas normales, éstas actúan en concentraciones que van de femtomoles ($10^{-15}M$) a nanomoles ($10^{-9}M$); hecho que se hace aún más evidente en patologías o síndromes que son ocasionados, en gran parte, por la sobreproducción de ciertas citocinas [por ejemplo: IL-1 (93, 94), TNF- α (95, 96), IL-6 (97, 98), IL-12 (99)], o por la citotoxicidad colateral en la aplicación de citocinas recombinantes en la terapia clínica de enfermedades inmunes y neoplásicas. En condiciones anormales, algunas de estas glicoproteínas pueden llegar a ser secretadas en grandes cantidades, de tal manera que pueden alcanzar una alta concentración a nivel sistémico y tener, como en los casos de sepsis bacteriana y choque endotóxico, un efecto endocrino.

Es un hecho que estas proteínas son parte de uno de los sistemas más complejos y eficaces, dotado con capacidad para dirigir y modular un gran número de fenómenos biológicos celulares, tales como activación, diferenciación, movimiento, crecimiento, colonización, muerte programada (apoptosis), coordinación del eje neuroendocrino-inmunológico, etc. (Figura 2). En adición, la patobiología que acompaña a procesos infecciosos ocasionados por microorganismos patógenos como *Mycobacterium*, *Listeria*, *Trypanosoma*, *Shigella*, *Leishmania* (100), *Plasmodium* (101), es frecuentemente correlacionada con la presencia, exceso de expresión o supresión de ciertas citocinas [por ejemplo IL-1 α , IL-1 β (102, 103), IL-4, IL-5, IL-6, IL10, IFN- γ , TNF- α , TGF- β , etc].



Figura 2. Algunos fenómenos biológicos en los que intervienen las citocinas como moléculas reguladoras decisivas.

Las observaciones clínicas, así como la experimentación *in vitro* e *in vivo*, documentan el potencial de las citocinas como adyuvantes o moduladores esenciales en enfermedades infecciosas y autoinmunes, así como en procesos neoplásicos y rechazo/aceptación de transplantes.

Las citocinas, incluyendo las secretadas por macrófagos, son uno de los factores solubles de más importancia en la regulación del sistema inmunológico. La relevancia de las citocinas en la inmunomodulación se hace evidente a través de experimentos *in vivo* con animales, en los cuales por medio de ingeniería genética se ha inactivado/eliminado el gen codificador de cierta citocina o su respectivo receptor celular (especies knockout). Sin embargo, la eliminación/inactivación específica de genes para citocinas

frecuentemente revela una de las características más importantes de la red de citocinas – la *redundancia*, gracias a la cual las funciones biológicas efectuadas por una citocina pueden ser cubiertas por otra cuando la primera se encuentra incapacitada para realizar su actividad biológica o está físicamente ausente. De hecho, si un animal knockout para una citocina y/o su receptor muestra letalidad o defecto fenotípico, el gen es considerado relevante; sin embargo, cuando el knockout no exhibe un fenotipo anormal, entonces el gen debe ser aún más importante gracias a que, *per se*, implica la evolución de un sistema de “respaldo” (redundante) que imparte una asombrosa, pero al fin lógica, estabilidad en la red de citocinas para evitar el fatídico colapso funcional del macroorganismo.

El *pleiotropismo* es también otro atributo distintivo de las citocinas, pues cada una de estas moléculas puede abarcar un amplio espectro de efectos biológicos, en ocasiones de naturaleza diametralmente opuesta gracias al contexto en que se sitúa su acción y dependiendo del tipo de célula blanco sobre la cual actúan, así como de su estado de diferenciación celular.

1.13 Citocinas proinflamatorias.

De un modo distintivo, las citocinas activan y reprimen diversos mecanismos protectores que integran el sistema inmunológico en vertebrados. Análisis químicos y estructurales sugieren que estas glicoproteínas, principalmente las de naturaleza proinflamatoria, se caracterizan por su origen filogenético temprano y alto grado de conservatismo a través de la Evolución. Más aún, la continuidad evolutiva de las citocinas promotoras del proceso inflamatorio es evidenciada por el hecho que, al ser transferidas a sistemas de ensayo de vertebrados, las moléculas proinflamatorias aisladas de invertebrados son capaces de desencadenar respuestas inmunológicas similares a las encontradas en sus contrapartes de la Clase superior.

La respuesta de fase aguda es iniciada y coordinada por mediadores inflamatorios como citocinas, quimiocinas, anafilotoxinas, glucocorticoides, componentes del complemento, factores de la coagulación, etc. Las citocinas proinflamatorias (IL-1 α , IL-1 β , IL-6, TNF- α) son producidas principalmente por células fagocíticas mononucleares, pero también por linfocitos, neutrófilos y otra gran variedad de células no inmunitarias que son activadas en respuesta al estímulo inflamatorio. Como se

observa en el presente trabajo, IL-6 es incluida simultáneamente en los grupos de citocinas pro- y anti-inflamatorias debido a su capacidad para potenciar o reprimir el proceso inflamatorio en dependencia del contexto en que se encuentre.

Las citocinas proinflamatorias conforman una de las primeras líneas de defensa del organismo contra agentes infecciosos y actúan antes de la aparición de la respuesta inmune mediada por anticuerpos. Sus principales funciones biológicas son desencadenar y dirigir los procesos inflamatorios, induciendo o suprimiendo la síntesis y/o producción de reactantes de fase aguda (C2, C3, C4, C4bp, Proteína C-reactiva, Proteína Amiloide Sérica A, haptoglobulina, etc.), el reclutamiento de células (neutrófilos, linfocitos T, monocitos) a los sitios de inflamación y la activación de mecanismos microbicidas y destructivos antibacterianos necesarios para la eliminación efectiva del agente inflamatorio.

Interleucina-12 (IL-12) e IFN- γ , consideradas principalmente como citocinas Th1, son agrupadas entre las proinflamatorias por algunos investigadores debido a que se ha observado su producción en la fase aguda de las infecciones y poseen, además, ciertas funciones biológicas que comparten con las otras citocinas de este grupo.

1.13.1 Interleucina-1.

La interleucina-1 fue descrita originalmente en la década de los años 40 del siglo XX como una proteína termolábil y que, inyectada en animales o humanos, causaba fiebre (llamada por esa causa pirógeno endógeno). Posteriormente se supo que los factores activadores de linfocitos descubiertos por Gery y Waksman (104), así como por Bach *et al.* (105), y que potenciaban la respuesta proliferativa de linfocitos T hacia mitógenos, eran idénticos a IL-1. Además, como respuesta a un proceso activo de infección, toxinas microbianas, agentes inflamatorios, productos de linfocitos activados (citocinas), complemento, CIs, ésteres de forbol y factores de la coagulación, virtualmente toda célula nucleada es capaz de sintetizar IL-1.

El término IL-1 abarca dos polipéptidos, IL-1 α e IL-1 β , que poseen múltiples actividades reguladoras en la respuesta del huésped a infecciones, trauma, así como durante los procesos inflamatorios de fase aguda y crónica, respuesta inmune humoral y hematopoyesis. En el humano los genes que codifican las dos variantes de IL-1 se encuentran sobre el brazo largo del cromosoma 2 (de tamaño 10.5 Kb para IL-1 α y 7.8

Kb para IL-1 β) y la homología nucleotídica entre los dos genes es de 45%. Aparentemente existen mecanismos separados de control de transcripción de los genes para IL-1, los cuales sin embargo dan resultado a moléculas proteínicas precursoras de 31 kDa que son escindidas proteolíticamente para formar cadenas polipeptídicas de peso 17 kDa para ambas formas de IL-1, pero que difieren en su punto isoeléctrico (pI de 5.0 y 7.0 para IL-1 α e IL-1 β , respectivamente).

La transcripción de los genes para IL-1 no presupone, todavía, la síntesis y secreción proteínica, pues es necesario un segundo estímulo desencadenante (por ej. LPS, endotoxina, etc.) para ello. En células monocíticas humanas ambos genes son transcritos en los primeros 15 minutos después de ser estimuladas con LPS, mientras que el PMA (Forbol Miristato Acetato) induce la transcripción de IL-1 β , pero no de IL-1 α . En general, existe una expresión diferencial génica de IL-1 α e IL-1 β , dependiendo del tipo de célula que se trate – monocitos (IL-1 β _{Conc.} > IL-1 α _{Conc.}), macrófagos sinoviales (IL-1 β únicamente), etc. De hecho, la traducción de ARNm a proteína no garantiza su secreción al medio extracelular, pues se ha encontrado que IL-1 α puede permanecer en forma intra-citoplásmica, hipotéticamente adquiriendo de esta manera una función intracrina. Más aún, IL-1 α ha sido detectada por medio de inmunofluorescencia anclada a la membrana celular, fungiendo así quizás un papel yuxtacrino (también ejemplificado por otras citoquinas como IL-10 y TNF- α) hacia las células adyacentes con las que efectúen contactos.

1.13.2 Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α).

El período comprendido entre el siglo XVIII hasta los años 70's del siglo XX fue testigo de múltiples reportes, muchos de ellos más precisamente anecdóticos, acerca del tratamiento anticancerígeno exitoso mediado por una infección inducida al paciente. Estas "descripciones" instaron a que William B. Coley (106) utilizara preparaciones que contenían filtrados de *Streptococcus spp.* y *Serratia marcescens* como terapia antineoplásica.

En 1975 Carswell *et al.* (107) describieron una proteína en el suero de ratones inyectados con endotoxina y que previamente habían sido tratados con *Mycobacterium bovis* (cepa Bacillus Calmette-Güerin; BCG); la proteína encontrada

causaba, *in vivo*, necrosis hemorrágica de tumores de sarcoma inducidos por metilcolantreno-A, leucemia por EL-4 y mastocitoma por P-815 y, además, en condiciones *in vitro* tenía un efecto citostático y actividad citocida sobre células tumorales.

A finales de los 80's del siglo pasado, los estudios de Cerami y col. (108) sobre el desgaste severo o "caquexia" causado en animales debido a la infección crónica (persistente) por *Treponema brucei*, condujeron al descubrimiento e identificación de un factor sérico nombrado "caquetina", el cual resultó ser idéntico al TNF- α .

Bajo el efecto de un estímulo adecuado, la principal célula productora de TNF- α es el macrófago, aunque también puede ser sintetizada por otras células como linfocitos, leucocitos polimorfonucleares, eosinófilos, astrocitos, células NK, fibroblastos, etc. El lipopolisacárido (LPS) es el compuesto con mayor capacidad para inducir la biosíntesis y liberación extracelular de TNF- α . Sin embargo, virus (VIH, virus Sendai, virus de influenza), micobacterias, hongos, parásitos (*Trypanosoma spp.*), complejos antígeno-anticuerpo e, importantemente, otras citocinas (como IL-2, GM-CSF, IL-1 α , IL-1 β) representan un estímulo adecuado para la síntesis de TNF- α .

El TNF- α maduro (peso molecular de 17 kDa) se forma a partir de un precursor proteico que porta una secuencia adicional de 76 aa en el término amino. La proteína con actividad biológica completa es una molécula no glicosilada con un peso molecular de 17 kDa (157 aa) y un punto isoelectrico (pI) de 5.3. A diferencia de la mayoría de las proteínas que son secretadas, esta citocina carece de un fragmento (secuencia señal) de aa con comportamiento hidrofóbico para su secreción extracelular.

La forma biológica activa del TNF- α es un trímero de 52 kDa. Cada subunidad contiene un enlace interno de disulfuro y las tres subunidades están unidas entre sí gracias a fuerzas no covalentes, las cuales originan una fuerte interacción entre ellas, ya que no hay indicios de disociación alguna aún a altas diluciones.

La actividad citolítica y citostática *in vitro* del TNF- α frente a muchas líneas celulares tumorales es, quizás, la principal peculiaridad de esta citocina. Básicamente su efecto biológico de citotoxicidad se utiliza como método para detectar y determinar, en forma semi-cuantitativa, la presencia de TNF- α en muestras de suero, plasma, cultivo celular, etc. Las líneas celulares clásicas para detectar esta citocina es la línea L929

(fibrosarcoma) y la clona celular WEHI 164 cl 13. Después que las células son expuestas a concentraciones de picomoles de TNF- α , las sensibles comienzan a morir en cuestión de horas, debido en parte quizás al efecto destructivo de los radicales derivados del oxígeno que son generados bajo el efecto de esta citocina. Las especies reactivas del oxígeno pueden originarse como resultado de la rotura del transporte de electrones en las mitocondrias cuando las células son expuestas al TNF- α (aprox. 1.5 – 2 hrs. después del tratamiento). En consecuencia, los electrones reducen el oxígeno, formando el anión superóxido ($O_2^{\cdot -}$). En ausencia de proteínas de defensa capaces de inhibir o neutralizar estas moléculas oxidativas altamente reactivas, estas últimas pueden causar daños a proteínas, lípidos y ácidos nucleicos.

El fenómeno de caquexia o desgaste metabólico es otro de los efectos biológicos *in vivo* característicos del TNF- α y es causado, parcialmente, por la supresión ejercida sobre la expresión de la enzima lipoproteína-lipasa en adipositos y resorción del tejido pardo y la posterior elevación de triglicéridos en plasma. El TNF- α inhibe la diferenciación de adipocitos y además, en caso de haberse realizado, es capaz de revertirla.

1.14 Citocinas anti-inflamatorias.

En igual o mayor proporción que los mecanismos proinflamatorios, la supervivencia del macroorganismo está ligada íntimamente a un conjunto diverso de reguladores negativos del fenómeno inflamatorio – citocinas anti-inflamatorias, receptores solubles para citocinas, proteínas inhibidoras de la señalización de citocinas, etc.

De acuerdo al *statuo quo*, las principales citocinas anti-inflamatorias son: IL-1ra, IL-4, IL-6, IL-10, IL-11 e IL-13. Sin embargo, recalcamos nuevamente que éstas moléculas son muy versátiles y su trascendencia final – sea esta directa o indirecta – está sujeta a la combinación compleja de numerosos factores (ya antes mencionados).

Interleucina-10.

La interleucina-10 (IL-10) es una molécula proteínica compuesta por 160 aa y con peso molecular de 18.5 kDa. IL-10 tiene poco o ningún grado de glicosilación, cuatro residuos de cisteína que forman dos enlaces disulfuro (enlaces 1-3 y 2-4,

respectivamente). La homología entre la IL-10 humana (hIL-10) y de ratón (mIL-10) es aproximadamente 73%, pero mientras que hIL-10 es activa en células humanas y de ratón, mIL-10 es efectiva solamente sobre células de ratón.

Los genes codificadores para hIL-10 y mIL-10 se encuentran sobre el cromosoma 1. En el humano se han observado varios polimorfismos en la secuencia génica de IL-10 que colinda con el extremo 5'; los polimorfismos incluyen dos áreas de polimorfismos microsatélites con repeticiones múltiples (CA)_n río arriba ~1.2 kb y ~4 kb del sitio de inicio de la transcripción y también muestran tres mutaciones puntuales unidas en tándem en los sitios -1082 (G/A), -819 (C/T) y -592 (C/A). Se piensa que estos polimorfismos acontecen dentro de la región promotora del gen para hIL-10 y en apoyo de esta suposición se ha observado una correlación entre ciertos polimorfismos (macro-satélites) y la secreción de IL-10 por monocitos inducida por LPS. Adicionalmente, una inducción más elevada de IL-10 por células T y monocitos estimulados con ConA fue también asociada, a su vez, con el alelo -1082 (G) (109). Es necesario añadir que, a pesar de que la variación entre individuos en estos estudios fue considerable, las tendencias no fueron estadísticamente significativas.

Para la detección y cuantificación de IL-10 se han implementado ensayos inmunoenzimáticos, técnicas de RT-PCR y pruebas de actividad biológica que se basan en la proliferación de la línea celular de mastocitos D36 de ratón en respuesta a IL-10 humana o de ratón (en presencia de IL-4). La interleucina-10 es producida por linfocitos CD4+, Th0, Th2, B, así como por células cebadas, eosinófilos, monocitos, macrófagos y queratinocitos.

1.15 Granulomas.

El daño sobre un tejido desencadena una secuencia de respuestas complejas denominada *inflamación aguda*, con el fin de neutralizar al agente "ofensivo" y restaurar el tejido dañado a su funcionamiento fisiológico normal. En el transcurso de la reparación tisular, el sitio afectado por el proceso inflamatorio agudo es ocupado por una *composición variable de elementos en proceso de proliferación* – capilares, fibroblastos, macrófagos, células linfoides, componentes de la matriz extracelular – conformando así el denominado *tejido granuloso*.

En condiciones favorables para el macroorganismo, una inflamación aguda conlleva a la organización de un exudado en el cual predominan neutrófilos, y la producción de tejido granuloso que eventualmente puede formar una cicatriz mediante la proliferación y estructuración de tejido fibroso. Así, en la mayoría de los casos, el agente inductor (infeccioso) del daño tisular es destruido o neutralizado durante las etapas tempranas de la reacción inflamatoria aguda. Bajo ciertas circunstancias, sin embargo, es factible que el estímulo dañino no logre ser eliminado, sino que cause una destrucción aún más grave. Esta persistencia trae consigo dos consecuencias:

1) que ocurran en forma *simultánea y concurrente*, pero no secuencial, los procesos de daño tisular, inflamación aguda, formación de tejido granuloso y reparación tisular;

2) la respuesta inflamatoria aguda (no específica) es suplementada con una respuesta de tipo específico, evidenciándose esta última, en parte, por la proliferación de altas cantidades de células linfoides en los tejidos en destrucción.

De esta manera, el intento de resolución y delimitación de la lesión por medio de una *respuesta inflamatoria aguda*, se convierte en un *proceso inflamatorio crónico* que es incapaz de restringir la ola necrótica tisular extrema como reflejo de la lucha entre la reparación y destrucción de tejido.

En esencia, el proceso granulomatoso crónico (granuloma) deriva de la incapacidad del macroorganismo para eliminar partículas extrañas (talco, almidón, madera, metal, vidrio, silicio, berilio) o algún agente infeccioso (*Nocardia brasiliensis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *M. leprae*, *Treponema sp.*, *Leishmania spp.*, *Histoplasma capsulatum*, *Schistosoma spp.*, etc.), aunque existen entidades con etiología aún desconocida/indeterminada (sarcoidosis, enfermedad de Crohn y granulomatosis de Wegener). De lo mencionado arriba, puede deducirse que un granuloma resulta ser una estructura tisular muy organizada en la vecindad del agente causal con el fin de eliminarlo o por lo menos circunscribir y/o limitar su efecto nocivo o presencia.

Una de las características histológicas más comunes de la inflamación granulomatosa es la infiltración de leucocitos mononucleares y sus derivados – células epiteloideas y sus productos de fusión celular (células gigantes multinucleadas - CGMs). Las células epiteloideas construyen membranas fuertemente interdigitadas en forma de zipper con células adyacentes para evitar, en forma de barrera celular, la extensión

(diseminación) de los microorganismos infecciosos. En la patología histológica del granuloma se pueden reconocer dos tipos de células gigantes multinucleadas: 1) CGMs de Langhans, que se encuentra en granulomas causados por micobacterias, y en las cuales los núcleos están localizados en la periferia celular en forma de herradura y 2) CGMs causadas por cuerpos extraños, en las cuales los núcleos mantienen una localización aleatoria a través de todo el citoplasma. Cuando, además de linfocitos y componentes de la matriz extracelular, la formación del granuloma se ve acompañada por calcificación y necrosis caseosa, como es el caso de *M. tuberculosis*, se habla de un **granuloma complejo**. Tanto las células epiteloideas, así como las células gigantes, son considerados un estadio terminal de desarrollo del sistema macrofágico y, en contraste con otros macrófagos, muestran una pobre capacidad fagocítica, pero son poseedores de una elevada actividad enzimática respiratoria y lisosomal.

1.15.1 Formación de granulomas – un fenómeno multifactorial.

La imposibilidad del huésped para eliminar a *N. brasiliensis* a través de una respuesta aguda efectiva, desencadena un proceso inflamatorio crónico. La lesión granulomatosa “brasiliensis” se caracteriza por la presencia de lóculos delimitados en su parte más exterior por un cinturón de fibroblastos y colágeno; en el centro locular se encuentra una masa de microorganismos rodeada por granulocitos seguidos por la presencia prominente de macrófagos espumosos, células epiteloideas y CMGs.

A. Factor cuerda.

El 6,6'-dimicolato de trehalosa (DMT) o comúnmente llamado “factor cuerda”, es un glicolípido de superficie identificado en especies de los géneros *Nocardia*, *Mycobacterium*, *Rhodococcus* y *Corynebacterium*. DMT es una sustancia tóxica, aunque también posee una potente actividad adyuvante al ser coadministrada con un antígeno proteínico, estimulando así la inmunidad mediada por células (110).

DMT de *M. bovis* BCG o *M. tuberculosis* inducen en cobayos y conejos, respectivamente, la formación de granulomas que incluyen linfocitos y macrófagos epiteloideas (111). Por otra parte, la administración i.v. de DMT de *M. tuberculosis* a ratones C57BL/6 provoca la formación de granulomas pulmonares, aunque en forma extraña la aplicación de RT-PCR *in situ* no detectó ARNm para IFN- γ , IL-2, IL-5, IL-10

e IL-12 (p40). No obstante que IL-6^{ARNm}, IL-1^{ARNm} y TNF- α ^{ARNm} aumentaron su expresión relativa significativamente durante el desarrollo granulomatoso, solamente los niveles proteicos de caquetina en tejido pulmonar correlacionaron estrechamente con la inflamación. Adicionalmente, macrófagos derivados de médula ósea expuestos a DMT estimularon la producción de TNF- α , IL-1 β e IL-6 (112, 113).

B. IFN- γ .

La administración intravenosa de *Propionibacterium acnes* muerta por calor en ratones BALB/c normales desencadena la estructuración de granulomas distintivos principalmente por la presencia de una gran cantidad de macrófagos y células epiteloideas en hígado (114). En contraste, el tejido hepático de animales deficientes de IFN- γ (IFN- γ ^{-/-}) fue infiltrado por una menor cantidad de células macrofágicas y epiteloideas, prevaleciendo en su lugar linfocitos y neutrófilos; más aún, el tamaño de los granulomas en este grupo de animales fue menor al observado en sus contrapartes con genotipo IFN- γ ^{+/+} y el número de estas estructuras complejas fue reducido en un 80%.

Hogan *et al.* (115) utilizaron la vía intraperitoneal para inducir con una dosis no letal de *M. bovis* BCG (Pasteur) viable una máxima producción de granulomas hepáticos en ratones C57BL/6 que son resueltos con el tiempo. En comparación a los bien estructurados y compactos granulomas en ratones IFN- γ ^{+/+}, los animales knockout IFN- γ ^{-/-} también exhibieron lesiones granulomatosas bien formadas, pero en mayor número y tamaño, las cuales así mismo contenían superiores concentraciones de bacterias. En contraposición, ratones C57BL/6 TNF- α ^{-/-} desarrollaron extensas lesiones con una escasa y difusa organización tisular que no contuvieron en forma efectiva la infección bacteriana.

C. IL-10.

A diferencia de los ratones normales C57BL/6 (IL-10^{+/+}), el inóculo intranasal de *Chlamydia trachomatis* en sus contrapartes IL-10 KO no ocasionó que se formaran granulomas en pulmón, lo cual aparentemente correlacionó con una elevada producción de IFN- γ , robusta respuesta de hipersensibilidad tardía, así como con una más rápida eliminación de organismos (116). Por otra parte, células mononucleares procedentes de

la parte central del granuloma pulmonar causado por *Echinococcus multilocularis* y estimuladas *in vitro* con antígenos del mismo agente infeccioso, secretan una mayor cantidad de IL-10 y menos IFN- γ , en comparación con las provenientes del tejido periférico granulomatoso (117).

Otro aspecto que ha captado la atención de investigadores es la identidad de las estirpes celulares, así como la contribución relativa de estas, en la generación de granulomas.

D. Células T.

Hansch *et al.* (118) demuestran que ratones normales C57BL/6 depletados de células T CD4⁺, así como animales singénicos SCID infectados con *M. avium* (cepas TMC 724 o SE 01) sufren sólo un retraso (de aprox. 3-4 semanas) en la formación de granulomas, que coincide con una reducción significativa de la expresión tisular relativa de TNF- α ^{ARNm} e IFN- γ ^{ARNm}. A pesar de no reportar los niveles proteícos respectivos, los autores sugieren que el papel de las células T CD4⁺ son sólo parcialmente responsables de la elevada producción *in situ* de IL-4, citocina aparentemente decisiva para la constitución de granulomas tipo Th2 causados por *S. mansoni* en ratones.

1.16 Macrófagos activados en forma alternativa.

L-arginina es un substrato común de arginasa-1 (Arg-1) y sintasa de óxido nítrico-2 (NOS-2) que compiten por este aminoácido para ya sea hidrolizarlo hasta ornitina y urea, u oxidarlo a L-citrulina y óxido nítrico (NO), respectivamente (Figura 3). Ambas enzimas se expresan en macrófagos activados, pero poseen cualidades biológicas opuestas: la expresión de NOS-2 favorece la bacteriostasis o muerte microbiana y vasodilatación en etapas tempranas del proceso inflamatorio, mientras que la manifestación de Arg-1 favorece la síntesis de poliaminas, proliferación de fibroblastos e inducción de colágeno (119).

Mills *et al.* (13) prolongan el alcance del paradigma Th1/Th2 a células macrofágicas, mostrando que macrófagos peritoneales residentes de cepas de ratón clasificadas como Th1 (cepas de ratones C57BL/6 y B10D2), producen en forma preferencial NO en respuesta a IFN- γ o LPS y son catalogados como macrófagos M-1, mientras que los fagocitos mononucleares diferenciados M-2 provienen de animales de

tipo Th2 (cepas de ratones DBA y BALB/c) y sintetizan ornitina principalmente bajo los mismos estímulos.

En 1992 Stein *et al.* (120) observaron que el tratamiento de macrófagos inflamatorios con IL-4 induce un fenotipo "alternativo" de activación caracterizado por una elevada capacidad para eliminar ligandos manosilados y con reducida expresión de MHC II y producción de citocinas proinflamatorias. Hesse *et al.* (121) mostraron que los macrófagos activados en forma alternativa regulan positivamente la inducción de arginasa, conllevando a la biosíntesis de poliaminas y prolina, fenómenos biológicos involucrados con la formación de granulomas a través de la proliferación celular, deposición de colágeno y reparación tisular (119, 121). Por otra parte, el fenotipo de activación "clásico" en macrófagos inflamatorios es originado bajo el efecto conjunto de IFN- γ y TNF- α (o TLRs) (11), en el cual estas células mononucleares se distinguen por su débil avidez fagocítica, pero también por su excelente habilidad para matar y degradar microorganismos patógenos, especialmente intracelulares.

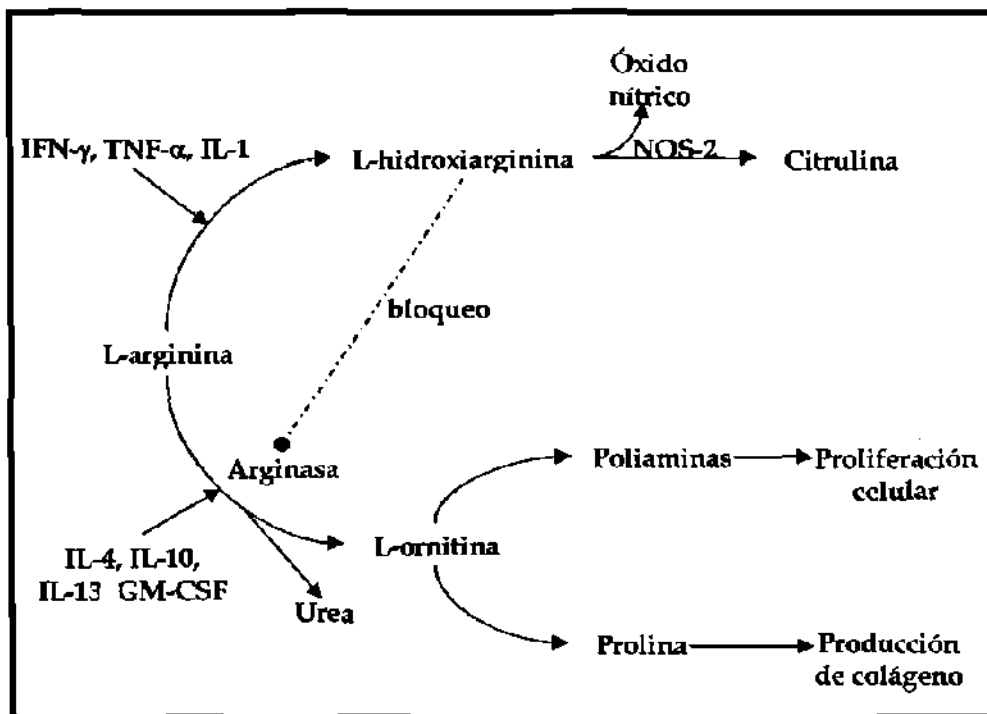


Figura 3. Competencia entre las enzimas Sintasa de Óxido Nítrico y Arginasa en el metabolismo de L-arginina (*J Immunol.* 2001;167(11):6533-44).

El término macrófago activado Tipo II (M-2) fue acuñado por Mosser *et al.* (11), aunque el fenotipo fue en si descrito inicialmente por Sutterwala *et al.* (84), quienes observaron que el ligamiento de los receptores Fc γ sobre macrófagos activados con LPS (en presencia de IFN- γ) induce una elevada producción de IL-10 y también la supresión *selectiva* de IL-12 (a nivel de transcripción y traducción para ambas citocinas), aunque en forma notable permanece intacta la concentración de TNF- α , IL-1 e IL-6. Los niveles de IL-10 endógena producida por la unión de CIs a sus receptores macrofágicos son capaces de inhibir en forma notoria la secreción de IL-12 inducida por IFN- γ + LPS (84, 88). De hecho, la generación de macrófagos con fenotipo M-2 se atribuye en forma directa (122) a la ausencia de IL-12 bioactiva, o quizás de manera indirecta debido a la inducción deficiente de IFN- γ efector por IL-12 (13). Ya en 1985 Unanue *et al.* (123) habían reportado que CIs absortos que contenían la porción Fc γ intacta eran capaces de suprimir la producción de IFN- γ , así como también la expresión de moléculas Ia sobre macrófagos *in vitro*.

Los trabajos de Mosser *et al.* demostraron, por una parte, que: i) el ligamiento de Fc γ Rs es suficiente para la inhibición de IL-12, sin necesitar su internación; sin embargo, se requiere la presencia de un co-estímulo pro-inflamatorio como LPS, unido a los CIs, para inducir IL-10 (124); ii) los macrófagos activados en forma clásica, que polarizan la respuesta de células T hacia el tipo Th1 (IL-4_{Conc.} < IFN- γ _{Conc.}), revierten la dirección de la respuesta inmune hacia un tipo Th2 (IL-4_{Conc.} > IFN- γ _{Conc.}) cuando son expuestos a CIs (88).

Las investigaciones realizadas por Baetselier *et al.* (10) y Hamerman *et al.* (125) describen una transición de fenotipos macrofágicos durante el desarrollo de modelos infecciosos *in vivo*. En el primer estudio (10), los macrófagos de ratones infectados con *T. brucei brucei* deficiente de fosfolipasa C muestran un fenotipo de activación clásica, con una preponderante producción de PG y NO, que se desarrolla en un ambiente de citocinas tipo Th1 (IFN- γ _{Conc.} > IL-10_{Conc.}), mientras que en la fase tardía se observó un fenotipo macrofágico alternativo, con menos formación de PG y NO, así como una mayor producción de IL-10 con respecto a IFN- γ . En forma notable, durante la fase temprana de la infección se estableció una inhibición de la activación de células T por mitógeno (Con-A), superantígeno (enterotoxina estafilocócica B – SEB) y por un

antígeno específico (lisozima de huevo de gallina – LHG), mientras que en la fase tardía siguen siendo operables sólo la activación de células T por mitógeno o superantígeno, mas no la causada por LHG. En el segundo reporte analizado (126), y como consecuencia a la infección de ratones C57BL/6 por *M. bovis* BCG, los autores refieren la presencia temprana de macrófagos que expresan bajos niveles de IA^b e incapaces de secretar compuestos reactivos del nitrógeno (RNI), pero altamente activos para fagocitar partículas opsonizadas con IgG y C3bi (en comparación con macrófagos residentes y tardíos); a los 12 días postinfección, los macrófagos (tardíos) regularon en forma positiva la expresión de IA^b y produjeron en forma activa RNI, pero su capacidad fagocítica había disminuido sensiblemente y era igual a la de los macrófagos en reposo. Es interesante el hecho que, en los macrófagos tardíos (12 días postinfección) se determinó una mayor expresión relativa de TNF- α ^{ARNm} e IP10^{ARNm} en comparación con los niveles observados en macrófagos tempranos (2 días postinfección), a pesar que no se analizó la traducción efectiva del ARNm.

Ratones C57BL/6 infectados con *Schistosoma mansoni* montan una reacción granulomatosa semejante a la observada en humanos, en la que huevos del parásito se incrustan en el hígado, desencadenando la incorporación intensa de macrófagos, eosinofilia, deposición de colágeno y, en algunos casos, fibrosis hepática severa e hipertensión portal (121). Este estudio realizado por Hesse *et al.* sugiere que las actividades de Arg-1 y NOS-2 macrofágicas están funcionalmente relacionados con el desarrollo de la patología granulomatosa causada por *S. mansoni*. Por otra parte, *in vivo* demuestran una aparente exigencia de citocinas tipo Th2, IL-4 e IL-13, en la expresión inducible y activación de Arg-1. Sin embargo es obligatorio enfatizar que el papel de IL-10, clasificada como citocina tipo Th2 también, rompe el esquema, ya que esta molécula, en apariencia relevante para la polarización de la respuesta inmune contra el parásito hacia el tipo Th2, resultó ser prescindible para la generación de células macrofágicas activadas en forma alternativa que expresan Arg-1; aún más, *in vitro* IL-10 sólo fue capaz de inducir en macrófagos derivados de médula ósea una producción marginal de prolina, la cual es requerida para la síntesis de colágeno. En forma destacada, el nivel máximo de formación de granulomas correlacionó siempre con una elevada actividad de Arg-1, mientras que ratones pretratados con una combinación de IL-12 + huevos del parásito antes de la infección, expresaron NOS-2 y mostraron

granulomas más pequeños y mucho menos fibróticos, presuntamente gracias en parte al surgimiento de macrófagos activados en forma clásica bajo el efecto de IL-12.

1.17. *Nocardia brasiliensis*.

N. brasiliensis es agente etiológico del actinomicetoma (micetoma) y está catalogado como un microorganismo infeccioso primario (no oportunista) que actúa sobre hospederos que poseen un sistema inmune con nivel protector “adecuado”. *N. brasiliensis* se encuentra en todo nuestro alrededor – donde sea necesario degradar material biológico. Así que, por lo general, la infección actinomicótica se lleva a cabo cuando la integridad de la piel es traspasada – por medio de una punción con una espina, traumatismo con algún objeto punzo-cortante o raspaduras; razones por las cuales los micetomas se desarrollan a nivel subcutáneo y frecuentemente en el pie, pierna, brazos y manos; aunque también puede darse en cualquier parte del cuerpo como la espalda, hombro, cabeza, ojos. Casi siempre cuando se desarrolla, el micetoma comienza con la aparición de tumefacción dura. Al mismo tiempo se forman abscesos a través de los cuales se expelen pus. La fase crónica del micetoma se caracteriza por la ocurrencia repetitiva de granulomas inflamatorios que se multiplican y avanzan progresivamente a áreas adyacentes, formando nódulos secundarios y nuevos abscesos. El exudado de estos abscesos representa pequeñas colonias del agente infeccioso rodeado por grandes cantidades de células inflamatorias: neutrófilos (en su mayoría), macrófagos, linfocitos, fibroblastos (127).

Una vez que la bacteria ha penetrado la piel del hospedero, la inoculación pueden proseguir por dos vías: 1) la bacteria es eliminada por las defensas del sistema inmune y la infección se resuelve 2) la infección no se resuelve favorablemente, sino que la bacteria modifica la respuesta inmunológica del huésped de tal manera que esta empieza a multiplicarse para entrar en la fase aguda del micetoma. El desarrollo de algunos casos clínicos de micetoma evidencia un tercer camino posible resultante de la interacción concreta entre *N. brasiliensis* y su huésped, ya que esta bacteria (así como otras del género *Nocardia*) tiene mecanismos, no establecidos hasta ahora, que le permiten permanecer en el organismo parasitado durante un período indeterminado (que puede variar de meses a años) de latencia o “hibernación” sin poder ser detectado por los

mecanismos de defensa inmunológicos. La(s) señal(es) o estímulo(s) que interrumpen la “letargia” y reactivan a *N. brasiliensis* también son desconocidos.

Como fue mencionado antes, *N. brasiliensis* se encuentra en todo nuestro alrededor y, prácticamente, todos hemos sido inoculados con esta bacteria al sufrir (repetitivamente) algún trauma. Sin embargo, relativamente pocas de las personas desarrollan micetoma, aún en las regiones consideradas endémicas para esta enfermedad. Hoy es un hecho indudable el aumento de datos que documentan una posible correlación entre los factores que provocan hipersensibilidad, inmunodeficiencia, enfermedades autoinmunes y haplotipos genómicos específicos. Un ejemplo representativo es la diversa susceptibilidad de las distintas cepas de ratones hacia la infección por *M. tuberculosis* y otros agentes infecciosos. Podría ser que, de la misma manera, el fondo genético influya de manera importante sobre el grado de permisibilidad o resistencia que presenta un determinado organismo/individuo hacia *N. brasiliensis* (128, 129).

Los estudios *in vitro* de la fagocitosis de *Nocardia spp.* por macrófagos y PMNs permiten analizar varios aspectos de la interacción huésped-parásito. En comparación con las bacterias utilizadas como control, las nocardias son fagocitadas de manera menos efectiva. Además, aún cuando sea fagocitada, *Nocardia* logra evitar su destrucción inhibiendo los efectos bactericidas tanto de los mecanismos dependientes de oxígeno, así como aquellos que no dependen de él. Durante las primeras horas del enfrentamiento entre fagocitos y nocardias, se detecta la eliminación de la mayor parte de las bacterias, más sin embargo esta etapa es seguida por un aumento significativo en la cuenta viable ocasionado por aquellas bacterias que no fueron destruidas y han logrado multiplicarse.

En algunos de los casos, en las cuales bacterias lograron sobrevivir intracelularmente en los macrófagos, fueron detectados microorganismos sin pared celular (“Gram negativos”) – esferoplastos- con propiedades de las L-formas bacteriales. Aunque hasta el momento no se ha podido corroborar, estas formas de nocardias son una posible explicación a la latencia prolongada no detectable que causaría infecciones crónicas y progresivas, aún después de que se haya conseguido un éxito aparente con la quimioterapia implementada.

Es indudable que *Nocardia*, como muchos otros parásitos, ha desarrollado un sistema complejo de elementos defensivos que predeterminan, en última instancia, su

grado de virulencia. Estos elementos son, en otras palabras, los factores de virulencia que son activados con una coordinación específica - de acuerdo a la etapa de infección en la que se encuentra la bacteria. De acuerdo a los resultados experimentales obtenidos hasta ahora sobre *Nocardia*, podemos destacar varios mecanismos (factores de virulencia) que son correlacionados con su patogenicidad:

- 1.- Uso de diferentes vías de fagocitosis/internación en los macrófagos.
- 2.- Presencia de complejos moleculares inertes, como en *Mycobacterium*, sobre la pared celular y que pueden regular, desde el citosol, la respuesta inmune de la célula hospedera (130, 131).
- 3.- Bloqueo de la acidificación del fagosoma (137).
- 4.- Inhibición de la fusión entre fagosomas y lisosomas (138).
- 5.- Utilización de la enzima ácido fosfatasa como fuente de carbón.
- 6.- Presencia de toxinas (en algunas cepas) como: hemolisinas α y β , factor cuerda (6,6'-dimicolato de trehalosa)
- 7.- Presencia de enzimas degradadoras de metabolitos microbicidas del oxígeno - superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (139).

Los cambios dinámicos ininterrumpidos en la microestructura y composición química de la pared celular durante su desarrollo son, muy probablemente, otro factor determinante en la virulencia y toxicidad de *Nocardia spp.* Distintas cepas de una misma especie pueden tener diversos grados de patogenicidad y, además, experimentos *in vitro* e *in vivo* han demostrado que las formas cocoides, características de la fase estacionaria, son menos virulentas que las filamentosas que se desarrollan en la fase logarítmica.

Distintos investigadores han analizado uno u otro factor de virulencia en *Nocardia*, y en verdad, los resultados conducen a una posible correlación entre el grado de patogenicidad y diversos factores como el contenido de catalasa y superóxido dismutasa, la habilidad de evitar la fusión entre fagosoma y lisosoma, así con la síntesis de ácidos micólicos y GPLs una vez que las nocardias han sido fagocitadas por macrófagos. Sin embargo, hasta el momento no ha sido posible identificar un factor de virulencia que de manera exclusiva determine la patogenicidad de *Nocardia*. Los hechos experimentales más bien nos indican que la virulencia en *Nocardia* está codificada por un grupo de elementos de virulencia que quizás se activan en una cronología determinada y ordenada.

Los peptidoglucanos de *Nocardia spp.* son semejantes estructuralmente a los encontrados en los géneros *Mycobacterium* y *Rhodococcus*. Los glicanos elementales consisten en ácido β -*N*-glucolilmuramírico con L-alanina, que a su vez están unidos al grupo carboxílico del ácido *N*-glucolilmuramírico. Los residuos laterales de los aa están compuestos por tripéptidos di-amidados L-alanina-D- α -glutamina-meso-DAP y tetrapéptidos de L-alanina-D- α -glutamina-meso-DAP-D-alanina. Los tetrapéptidos son entrelazados por medio de uniones directas entre la D-alanina de un polímero al meso-DAP del polímero adyacente; o por uniones entre dos residuos vecinos de meso-DAP. Como en *Mycobacterium* el peptidoglucano de *Nocardia* está anclado a la pared celular a través del enlace fosfodiéster dirigido a la arabinosa del polímero arabinogalactano. Algunos de los residuos de arabinosa de arabinogalactano están esterificados con una molécula de ácido micólico, formando de esta manera un largo complejo de peptidoglucano-arabinogalactano-ácido micólico. Los peptidogalactanos de *Nocardia spp.* muestran epitopes comunes y propiedades inmunogénicas con estos compuestos provenientes de *Mycobacterium*, *Rhodococcus*, *Corynebacterium spp.*

Las grandes semejanzas que comparte *Nocardia* con *Mycobacterium*, con respecto a la estructura química la pared celular y su fisiología, *a priori* nos inclinaria a deducir, de la misma manera, semejanzas en los mecanismos moleculares básicos que estos dos géneros utilizan no solo para parasitar a la célula hospedera, sino también para evadir los distintos niveles de defensa del sistema inmune del macroorganismo parasitado.

N. rubra (ahora clasificada como *Rhodococcus rubra*) es la especie más analizada del género en cuanto a su inmunomodulación de los componentes de la pared celular como causa de la producción de citocinas (142). Así pues, el aumento de IL-1 y de ahí la fiebre, provocados por la pared celular de *N. rubra* son inhibidos por la prostaglandina E₂ (PGE₂) y potenciado aún más por la indometacina (143). Aparentemente ciertas fracciones de la pared celular de *N. opaca* estimulan la producción de los interferones α y β , los cuales a su vez activan a las células asesinas NK. Por otra parte, se ha observado que un extracto de *N. brasiliensis* resultó ser mitogénico para linfocitos B de ratón y Silva y col. anunciaron la presencia de TNF- α en sueros de ratones y el aumento de las Unidades Formadoras de Colonias (UFC) como efecto de la aplicación de una anticuerpo anti-TNF- α (144).

Existe una evidente escasez de datos que permitan integrar una mejor imagen sobre la interacción nocardias-macrófago. En este sentido, se desconoce la manera en que, ciertos parámetros de *N. brasiliensis* (dosis y fase de crecimiento) y la presencia de anticuerpos anti-*Nocardia*, influyen sobre el perfil de citocinas macrofágicas. Recordemos que la presencia de ciertos patrones de citocinas, así como su cinética de producción, han sido indicadas y correlacionadas con etapas decisivas de procesos infecciosos causados por otros microparásitos.

1.18 Hipótesis:

Los macrófagos de ratones BALB/c infectados con *N. brasiliensis* presentan un perfil de citocinas que se modifica en presencia de mediadores de la respuesta inmune humoral.

1.19 Objetivo General:

Determinar el perfil de citocinas sintetizadas por macrófagos infectados por *N. brasiliensis* y analizar el efecto que sobre él tienen diversos mediadores inmunológicos.

1.20 Objetivos Específicos:

- 1.- Comparar el efecto de tres dosis infectantes de *N. brasiliensis* en la producción de citocinas por macrófagos de ratones BALB/c.

- 2.- Determinar la cinética de producción de citocinas por macrófagos infectados con *N. brasiliensis*.

- 3.- Identificar ARNs mensajeros para citocinas en macrófagos infectados con *N. brasiliensis*.

- 4.- Analizar el efecto del complemento sobre la producción de citocinas de macrófagos infectados con *N. brasiliensis*.

- 5.- Determinar el efecto de anticuerpos policlonales anti-*N. brasiliensis* y monoclonales anti-P24 y anti-P61, en la producción de citocinas por macrófagos infectados con *N. brasiliensis*.

CAPÍTULO 2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Estrategia general.

La *Figura 4* muestra en forma sintetizada el procedimiento experimental para llevar a cabo los objetivos específicos propuestos en el presente trabajo. Se aislaron y purificaron *in vitro* macrófagos peritoneales no inducidos, los cuales fueron caracterizados en cuanto a su pureza y funcionalidad. En forma paralela se prepararon inóculos de *N. brasiliensis* HUJEG-1 en etapa de crecimiento estacionaria o logarítmica para lograr los índices de infección nocardias:macrófago deseados. Las muestras tomadas de los cultivos celulares fueron destinadas para determinar la secreción de citocinas macrofágicas (IL-12, IFN- γ , TNF- α , IL-1 e IL-10) así como la expresión relativa de sus respectivos ARNs mensajeros.

2.2 Ratonos.

Se utilizaron ratones de 12 a 16 semanas de edad (hembras y machos) derivados de la cepa BALB/c del Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos de Norteamérica (NIH, Bethesda MD). Los animales se mantuvieron en cajas de acrílico, a una temperatura de 20-25°C y se alimentaron con Purina (Purina México, S.A. de C.V.) y agua destilada estéril *ad libitum*.

2.3 Preparación de las dosis infectantes de *N. brasiliensis* HUJEG-1 en diferentes etapas de crecimiento.

La cepa de *N. brasiliensis* utilizada en este trabajo fue obtenida de un paciente con micetoma dorsal que acudió al Hospital Dr. José Eleuterio González. La bacteria fue identificada mediante pruebas microbiológicas y bioquímicas por el Dr. Manuel A. Rodríguez Quintanilla del Depto. de Microbiología de la Fac. de Medicina de la UANL en Monterrey, N. L. y enviada bajo el nombre de *N. brasiliensis* HUJEG-1 a la Dra. J. Brown del Center for Infectious Disease de Atlanta (USA) para su confirmación. Posteriormente la cepa fue etiquetada bajo el número 700358 en la ATCC.

ESTRATEGIA GENERAL

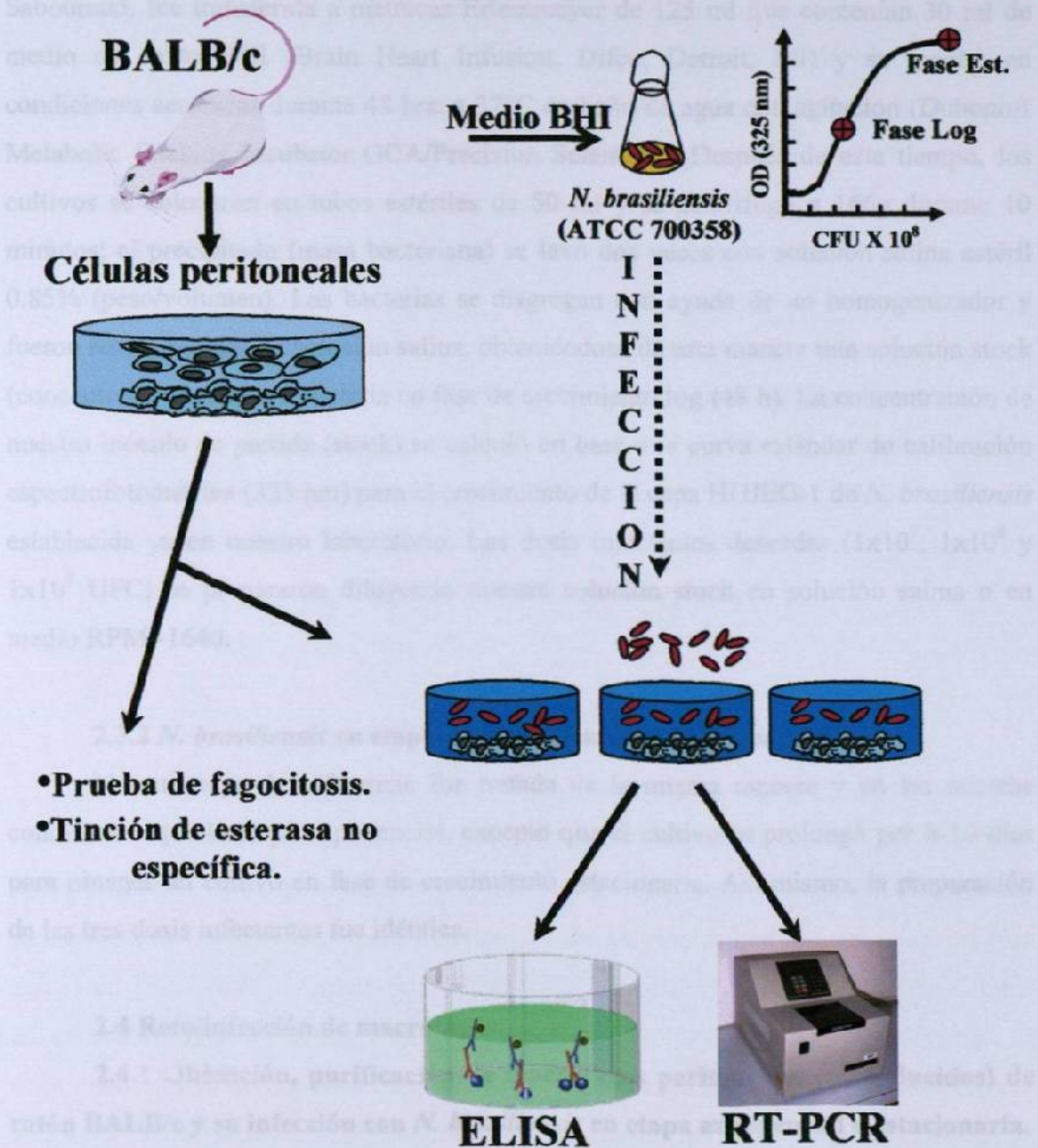


Figura 4. Estrategia general aplicada en la realización de los objetivos.

2.3.1 *N. brasiliensis* en etapa de crecimiento logarítmica.

La cepa de *N. brasiliensis*, mantenida en un medio semisólido de dextrosa-Sabouraud, fue transferida a matraces Erlenmeyer de 125 ml que contenían 30 ml de medio de caldo BHI (Brain Heart Infusion, Difco, Detroit, MI) y se incubó en condiciones aeróbicas durante 48 hrs. a 37°C en baño de agua con agitación (Dubonoff Metabolic Shaking Incubator GCA/Precision Scientific). Después de este tiempo, los cultivos se colocaron en tubos estériles de 50 ml y se centrifugó a 166g durante 10 minutos; el precipitado (masa bacteriana) se lavó dos veces con solución salina estéril 0.85% (peso/volumen). Las bacterias se disgregan con ayuda de un homogenizador y fueron resuspendidas en solución salina, obteniéndose de esta manera una solución stock (concentrada) de nuestra bacteria en fase de crecimiento log (48 h). La concentración de nuestro inóculo de partida (stock) se calculó en base a la curva estándar de calibración espectrofotométrica (325 nm) para el crecimiento de la cepa HUJEG-1 de *N. brasiliensis* establecida ya en nuestro laboratorio. Las dosis infectantes deseadas (1×10^7 , 1×10^8 y 1×10^9 UFC) se prepararon diluyendo nuestra solución stock en solución salina o en medio RPMI-1640.

2.3.2 *N. brasiliensis* en etapa de crecimiento estacionaria.

Nuestra cepa de referencia fue tratada de la misma manera y en las mismas condiciones que la etapa exponencial, excepto que el cultivo se prolongó por 8-10 días para obtener un cultivo en fase de crecimiento estacionaria. Así mismo, la preparación de las tres dosis infectantes fue idéntica.

2.4 Reto/infección de macrófagos.

2.4.1 Obtención, purificación de macrófagos peritoneales (no inducidos) de ratón BALB/c y su infección con *N. brasiliensis* en etapa exponencial o estacionaria.

Los ratones BALB/c fueron sacrificados por dislocación cervical y se desinfectó la piel con alcohol etílico al 98% antes de seguir con el procedimiento dentro de una campana de flujo laminar. Todos los instrumentos de disección fueron previamente esterilizados. Se inyectan 10 ml de medio RPMI-1640 frío (sin agente inductor y sin heparina) en la cavidad peritoneal colocando la aguja de la jeringa en un ángulo de 35-40 grados con respecto a la superficie posterior del peritoneo, por debajo del esternón.

La inyección se hace a través de la línea media-anterior, tomando precaución de evitar una punción del intestino; cuando esto ocurría, el ratón, jeringa y aguja eran desechados. La cantidad inyectada de RPMI-1640 debe ser suficiente para tender la cavidad peritoneal, pero no tanto como para diluir las células peritoneales debajo de 1.5×10^6 células/ml. El lavado peritoneal fue aspirado gentilmente y transferido a un tubo cónico estéril de 50 ml, colocado en hielo, donde se recolectaban los lavados de los ratones. Las cuentas de células nucleadas variaba generalmente entre 1×10^6 y 3×10^6 células totales/ml de lavado peritoneal/ratón (y su viabilidad fue evaluada de acuerdo a la técnica de exclusión de azul de tripano).

Los fagocitos mononucleares cultivados se adhirieron a la placa y adquirieron una morfoloía característica estelada con proyecciones citoplásmicas (*Ver Figura 5 en sección de Resultados*), después de lo cual fueron infectados por separado con cada una de las dosis de *N. brasiliensis*, obteniéndose los índices de infección deseados: 10 UFC/Mφ, 100 UFC/Mφ y 1000 UFC/Mφ. La toma de muestras de los cultivos celulares fue a las 0 horas (antes de la infección), 1 hora (postinfección – p.i.), 3 horas (p.i.), 6 horas (p.i.), 9 horas (p.i.) y 12 horas (p.i.).

2.4.2 Viabilidad celular.

Para calcular el porcentaje de viabilidad celular, una vez preparado el pool de células peritoneales, se tomó una muestra de 10 µl y se colocó en un microtubo de poliestireno de 200 µl; se adicionaron 90 µl de una solución de ácido acético al 2% que contenía también azul de tripano al 2%. De la suspensión celular así preparada se colocaron 15-20 µl en una cámara de Neubauer y se observó la exclusión del colorante en un microscopio invertido a un aumento de 40X. Para nuestros experimentos se utilizaron lavados peritoneales que, después del cálculo de viabilidad, arrojaban valores >95%.

2.4.3 Tinción de esterasa no específica y fagocitosis.

La funcionalidad fagocítica se verificó por medio de la captación e internación de eritrocitos de carnero sensibilizados (*Ver Figura 6 en sección de Resultados*), mientras que como indicio del grado de pureza del cultivo macrofágico se utilizó la tinción de α-

naftol butirato para esterasa monocítica no específica (*Ver Figura 7 en sección de Resultados*).

2.4.4 Enfrentamiento entre nocardias opsonizadas y macrófagos.

2.4.4.1 Nocardias opsonizadas con anticuerpos policlonales anti-*N. brasiliensis*.

Se desarrolló el micetoma experimental en ratones BALB/c, inoculando en el cojinete plantar de los animales 1×10^6 UFC en un volumen de 50 μ l de solución salina. Una vez que el micetoma se encontraba en su fase florida de desarrollo, los ratones fueron sangrados cada tres días, en forma alternada, a través del plexo retro-orbitario con ayuda de pipetas Pasteur. La sangre coagulada se centrifugó durante 20 minutos a 20,000 rpm (a 4°C) para después separar el suero del coágulo. El suero fue inactivado en baño maría a 56°C durante 20 minutos. Utilizando una concentración del suero anti-*Nocardia* inactivado al 10% (Vol/Vol) en medio RPMI-1640, las tres dosis de nocardias fueron incubadas durante 30 minutos en una placa COSTAR en una incubadora con 5% de CO₂, oxígeno y con humedad relativa. Después se hicieron tres lavados con medio RPMI-1640 a 2000 rpm durante 10 minutos para eliminar los anticuerpos no captados por las bacterias y las dosis de nocardias (opsonizadas) correspondientes fueron enfrentadas con los macrófagos peritoneales previamente purificados y estabilizados. El intervalo de enfrentamiento macrófagos-nocardias y la toma de muestras del medio de cultivo celular, fueron como en los experimentos anteriores (*Ver punto 2.4.1*).

2.4.4.2 Nocardias opsonizadas con anticuerpos monoclonales anti-P61

Se utilizaron sobrenadantes de hibridomas productoras de anticuerpos dirigidos contra la proteína inmunodominante P61 de *N. brasiliensis*. Después de haber sido verificada la reactividad y especificidad del sobrenadante anti-P61 por medio de un Western blot (véase más abajo), se llevó a cabo la inactivación en un baño maría a 56°C durante 20 minutos. Utilizando una concentración del sobrenadante anti-P61 inactivado al 10% (vol/vol) en medio RPMI-1640, las tres dosis de nocardias fueron incubadas durante 30 minutos en una placa COSTAR en una incubadora con 5% de CO₂, oxígeno y con humedad relativa. Después se hicieron tres lavados con medio RPMI-1640 a 2000 rpm durante 10 minutos para eliminar los anticuerpos no captados por las bacterias y las

dosis de nocardias (opsonizadas) correspondientes fueron enfrentadas con los macrófagos peritoneales previamente purificados y estabilizados. El intervalo de enfrentamiento macrófagos-nocardias y la toma de muestras del medio de cultivo celular, fueron como en los experimentos anteriores (Ver punto 2.4.1).

2.4.5 Pretratamiento de macrófagos con anticuerpos policlonales anti-*N. brasiliensis*.

Una vez aislados y purificados los macrófagos peritoneales, estos fueron incubados durante 1 hora con suero policlonal anti-*N. brasiliensis* - procedente de ratones BALB/c con micetoma - previamente inactivado a baño maría durante 20 minutos a 56°C, filtrado a través de un filtro MILLIPORE de 0.22 μ y mantenido a 4°C hasta su uso. Antes de ser usado, se verificó a través de la técnica de ELISA la presencia de IL-1 α , IL-1 β , IL-10, IFN- γ e IL-12 en el suero inactivado y filtrado, no lográndose detectar estas citocinas. Las células macrofágicas peritoneales aisladas y purificadas fueron incubadas durante 1 hora con un 10% (vol/vol) del suero inactivado y filtrado; los cultivos celulares se lavaron tres veces en forma enérgica con medio RPMI-1640 y se añadieron, en pozos respectivos, las dosis baja y media de nocardias por un periodo de 3 horas; se tomaron muestras del cultivo después de 1 y 3 horas de incubación.

2.5 Electroforesis en condiciones nativas, sin SDS ni β mercaptoetanol, del extracto celular crudo de *N. brasiliensis*.

Se utilizó el sistema discontinuo de Laemli con un gel de concentración al 8% y un gel de separación al 12%. El gel se montó en un sistema de electroforesis Mini-protean II (BIORAD) y se aplicó el amortiguador de corrimiento (Tris-HCl 25 mM, glicina 12M, pH 8.3) en la cámara de corrimiento. Antes de aplicar el gel, a las muestras se adicionó amortiguador de muestra 2X (Tris-HCl 125 mM pH 6.8, sacarosa al 50% vol/vol, con azul de bromofenol al 0.0005%, p/v, como indicador del frente de corrida). La muestra se aplicó cuidadosamente en cada carril con una pipeta automática. El gel se corrió a 50V por 20 minutos con ayuda de una fuente de poder modelo 1000/500 (BIORAD). Una vez que el frente alcanzó el límite del gel de separación, el voltaje se aumentó a 100 V y se permitió el corrimiento hasta que el azul de bromofenol llegara a

la parte inferior del gel. Dentro del mismo gel, en un carril paralelo a la muestra del extracto de *N. brasiliensis*, se corrió una mezcla de marcadores de peso molecular.

2.6 Tinción de Coomassie.

Una vez terminada la electroforesis, se desarmaron los cassettes de vidrio y el gel se colocó en un recipiente con solución de azul de Coomassie (azul de Coomassie R-250 al 0.1%, p/v, en solución destiñidora: metanol al 40%, v/v, y ácido acético al 10%, v/v, ambos en agua destilada) por 30 minutos. El gel se destiñó con una solución destiñidora por 1-3 horas.

2.7 Inmunoelectrotransferencia (IET) del extracto celular crudo de *N. brasiliensis* y revelado con sobrenadantes de hibridomas y suero anti-*Nocardia*.

La IET se realizó de acuerdo a la técnica de Towbin. Se preparó un minigel de poliacrilamida, sin SDS ni 2-ME, lineal al 12%, pH 6.8. Se colocó un peine con dos carriles de 3 cm cada uno. La muestra fue un extracto celular crudo de *N. brasiliensis*, en fase crecimiento exponencial, cultivada en medio BHI. Al término de la electroforesis se eliminó el gel concentrador y el gel de corrimiento fue dividido en dos partes (de 3 cm cada una) – una para realizar la IET, y otra para ser teñida con azul de Coomassie y observar el patrón proteínico del extracto. La transferencia se realizó sobre un papel de nitrocelulosa con un poro de 0.45µm, utilizando para este objetivo una solución amortiguadora (trizma-base de 25 mM, glicina 192 mM, pH 8.3, con 20% de metanol) y cámaras Mini Trans Blot II y Trans Blot (BIORAD). El extracto de *N. brasiliensis* fue transferido mediante la aplicación de un voltaje constante de 100 V durante 1 hora. Después de este tiempo, el papel se bloqueó con leche Svelty® (Nestlé) al 3% en PBS, pH 7.4) por dos horas a 37°C en agitación gentil y posteriormente se realizaron tres lavados de 10 minutos cada la solución de lavado (PBS 0.1 M, pH 7.4, con Tween 20 en una proporción vol/vol 1:1000). Después del bloqueo, el papel de nitrocelulosa se cortó en tiras de 0.3 cm c/u y se congelaron, envueltas en papel Parafilm, a -20°C hasta su uso. Los sobrenadantes de hibridomas fueron usados sin diluir, mientras que los sueros de ratón BALB/c fueron diluidos 1:25 en leche Svelty al 1% en PBS 0.1 M, pH 7.4, con Tween 20 (1:1000). Las tiras de nitrocelulosa electrotransferidas fueron incubadas con los sobrenadantes o sueros por 1 horas a 37°C en agitación gentil. Posteriormente se lavó

tres veces (10 minutos/lavado) con la solución de lavado mencionada arriba. Después se incubaron las tiras durante 1 hora con anti-gammaglobulinas de ratón (producidas en conejo) conjugadas con peroxidasa y diluidas 1:6000 en leche Svelty al 1% en PBS 0.1 M, pH 7.4, con Tween 20 diluido 1:1000. Al término de la incubación con el conjugado, las tiras fueron expuestas a una solución del cromógeno (10 mg de 3'-diaminobenzidina en 20 ml de PBS 0.1 M, pH 7.4, con 40 ml de peróxido de hidrógeno al 30%). La reacción de revelado fue detenida con HCL 1N. Al final, las tiras se enjuagaron con agua destilada y se colocaron sobre papel absorbente hasta su secamiento.

2.8 Muestreo de cultivos macrófagos.

Una vez que los macrófagos se habían adherido a la placa, se cambió el medio de cultivo RPMI-1640 (1ml/pozo) y se permitió la estabilización del medio por 2 horas. Posteriormente se añadió el volumen necesario de inóculo bacteriano para obtener las relaciones nocardias:macrófagos deseadas – baja (10:1), media (100:1) y alta (1000:1). Paralelamente se realizaron cultivos de macrófagos sin infectar (control negativo) para averiguar si, durante el intervalo de nuestro experimento, existía liberación espontánea de citocinas al medio de cultivo. El volumen total final de trabajo por pozo siempre fue 1 ml. El intervalo del experimento efectivo fue de 12 horas, empezando desde el momento del enfrentamiento entre macrófagos y nocardias. Se tomaron muestras de los pozos a los siguientes intervalos de tiempo (horas): 1, 3, 6, 9, 12. Las muestras fueron centrifugadas por 10 minutos a 20000 rpm, filtradas a través de un filtro MILLIPORE de 0.22 μ y fueron después congeladas a -70°C hasta la posterior determinación de citocinas por medio de la técnica de ELISA siguiendo las instrucciones del fabricante de los kits utilizados (PIERCE ENDOGEN). La sensibilidad de los kits fue: IL-10 < 12 pg/ml, IFN- γ < 10 pg/ml, FNT- α < 9 pg/ml, IL-12 (p70, biológicamente activa) < 5 pg/ml, IL-1 α < 6 pg/ml e IL-1 β < 3 pg/ml.

2.9 Reacción de Transcripción Reversa con Reacción en Cadena de Polimerasa (RT-PCR).

La extracción de ARN total (*Ver Figura 9B en sección de Resultados*) se realizó a través del método de la extracción con isotiocianato de guanidina-fenol-cloroformo

(Ver APÉNDICES al final de la tesis). Se eliminó el medio de cultivo de los macrófagos peritoneales. Se añadieron 600 µl de solución de lisis y se almacenó la muestra a -70°C , para después procesarla. Durante el procesamiento de muestras, de manera consecutiva se añadieron 50 µl de acetato de sodio, 500 µl de fenol ácido y 100 µl de cloroformo. La muestra se dejó en hielo durante 15 minutos, agitando en vórtex cada 5 minutos, y después se centrifugó. La fase acuosa fue removida (aspirando 2 veces 200 µl al introducir la punta de la pipeta por la superficie de la interfase) y precipitada con un volumen igual de alcohol isopropílico a -70°C por una hora. El ARN obtenido se secó, se resuspendió en agua-DEPC y se realizó la transcripción reversa (RT) usando un primer Oligo-dT para obtener cADN total. La Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR) se llevó a cabo utilizando cebadores específicos de los extremos 5' y 3' para los genes de las citocinas de interés. El producto de amplificación fue corrido en un gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio y comparado con el producto de un gen expresado de manera constitutiva por células eucariotas – en nuestro caso - β -actina. De esta manera se obtuvieron resultados de expresión semicuantitativos (Ver Apéndices al final de la tesis).

2.10 Análisis estadístico.

Se utilizó una prueba no paramétrica – U de Mann-Whitney – para muestras independientes, juzgando que existía una diferencia significativa entre los grupos comparados cuando se obtuvo un valor de $P < 0.05$ (Ver Apéndices B, C, D y E).

El análisis de datos se realizó con ayuda de la versión 10.0 del programa estadístico SPSS® para WINDOWS.

CAPÍTULO 3. RESULTADOS

Los macrófagos peritoneales aislados para nuestros experimentos tenían una morfología típica estelada (*Figura 5*) y una función fagocítica normal hacia eritrocitos de carnero sensibilizados con anticuerpos (*Figura 6*). La identidad y pureza de los cultivos macrofágicos se determinó en forma efectiva a través de la tinción para esterasa no específica (*Figura 7*).

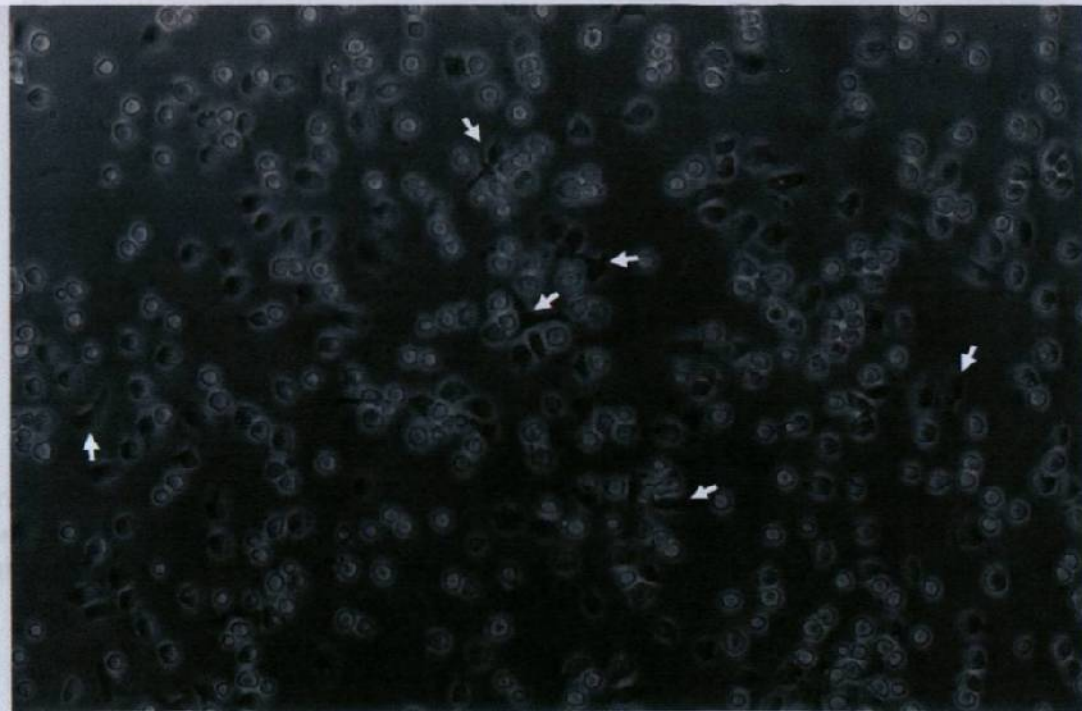


Figura 5. Macrófagos peritoneales no inducidos cultivados *in vitro* en ausencia de suero. Las flechas muestran algunos Mφs que han adquirido una morfología típica estelada. Microscopía de luz con contraste de fase. 200X.

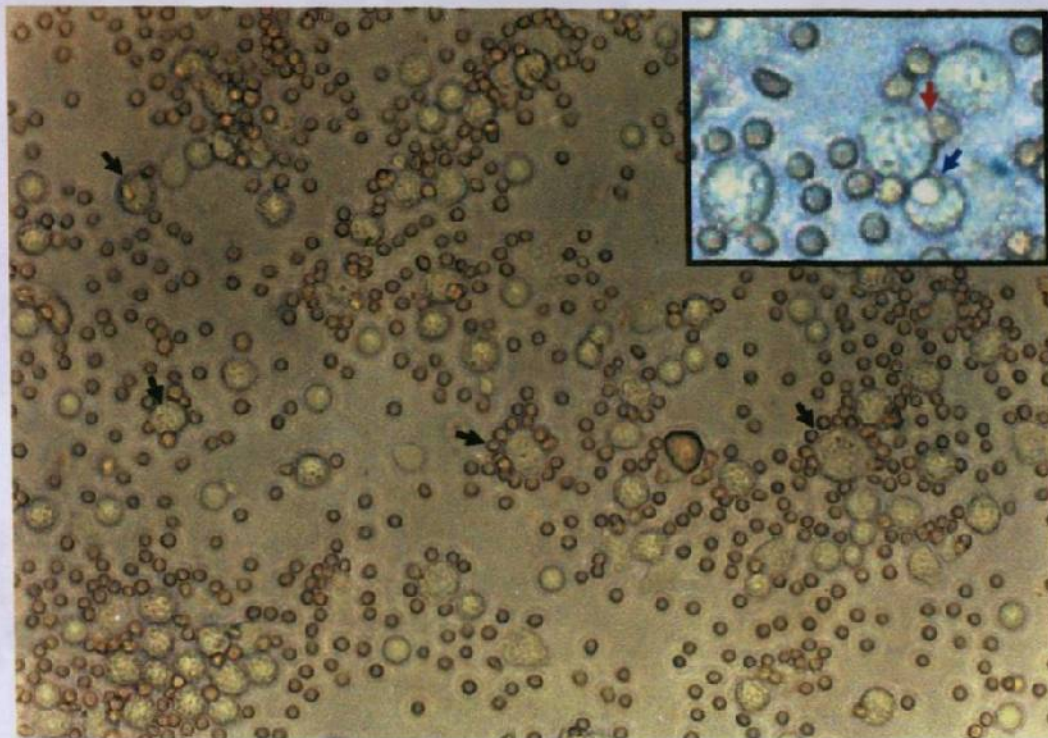


Figura 6. Prueba de funcionalidad fagocítica de macrófagos peritoneales con eritrocitos de carnero sensibilizados. Flechas negras – formación de rosetas. Recuadro: flecha roja – proceso de internación de eritrocito; flecha azul – eritrocito internado. Microscopía de luz con contraste de fase. 400X.

El extracto celular de *N. brasiliensis* HUJEG-1 (ATCC # 700358) fue sometido a electroforesis en condiciones no desnaturizantes y se observó su patrón proteico típico (*Figura 8*). Paralelamente se corroboró la monoespecificidad del sobrenadante de hibridoma monoclonal contra la proteína inmunodominante nocardial P61 por medio de Western blot (*Figura 9A*), mostrando efectivamente que los anticuerpos monoclonales reconocen en forma única y específica la banda proteica correspondiente a P61 (*Carriles 1 y 2 en la Figura 9A*), mientras que el suero policlonal reconoce, adicionalmente, otras proteínas de *N. brasiliensis* (*Carril 4 en la Figura 9A*).

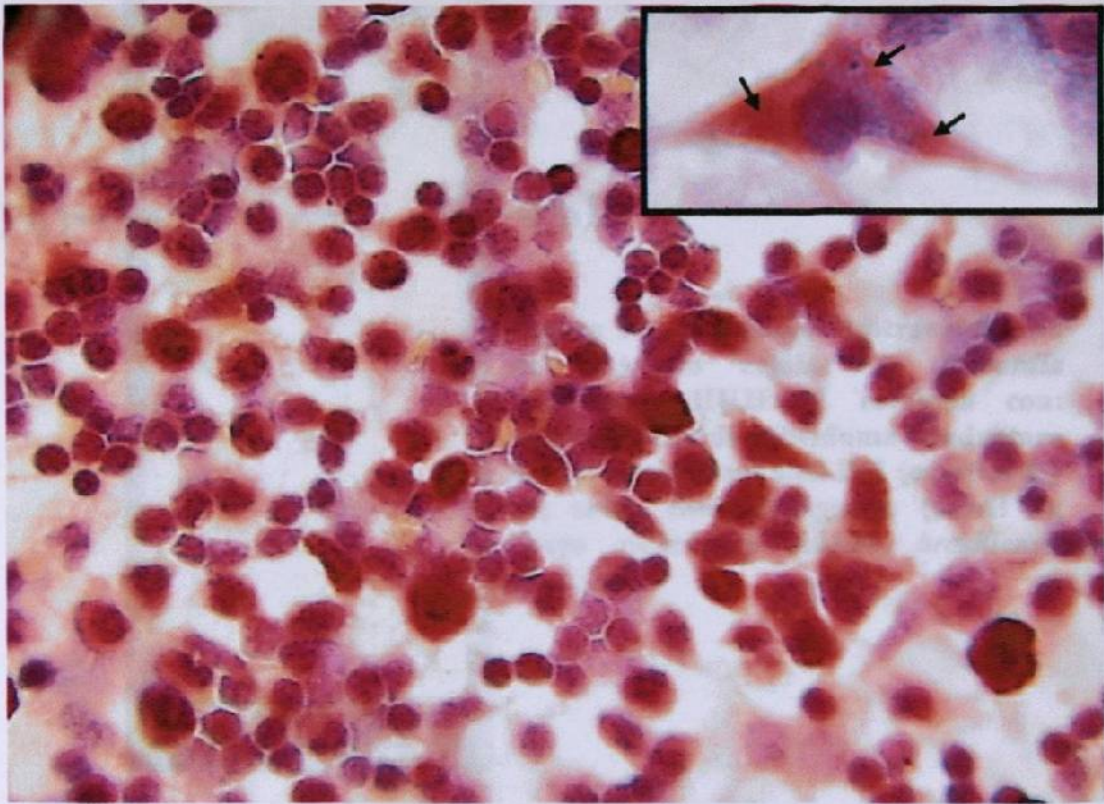


Figura 7. Positividad de macrófagos peritoneales para tinción de esterasa no específica. Recuadro: La flechas indican áreas positivas de una célula macrofágica con morfología típica estelada. Microscopía de luz. 100X inmersión.

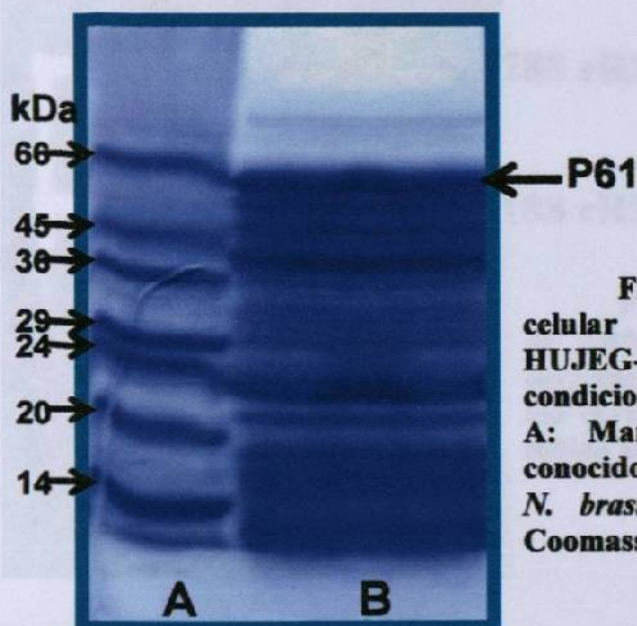


Figura 8. PAGE del extracto celular de *Nocardia brasiliensis* HUJEG-1 en gradiente de 8.75-18% en condiciones no desnaturalizantes. Carril A: Marcadores de peso molecular conocido. Carril B: Extracto celular de *N. brasiliensis*. Tinción con azul de Coomassie R-250.

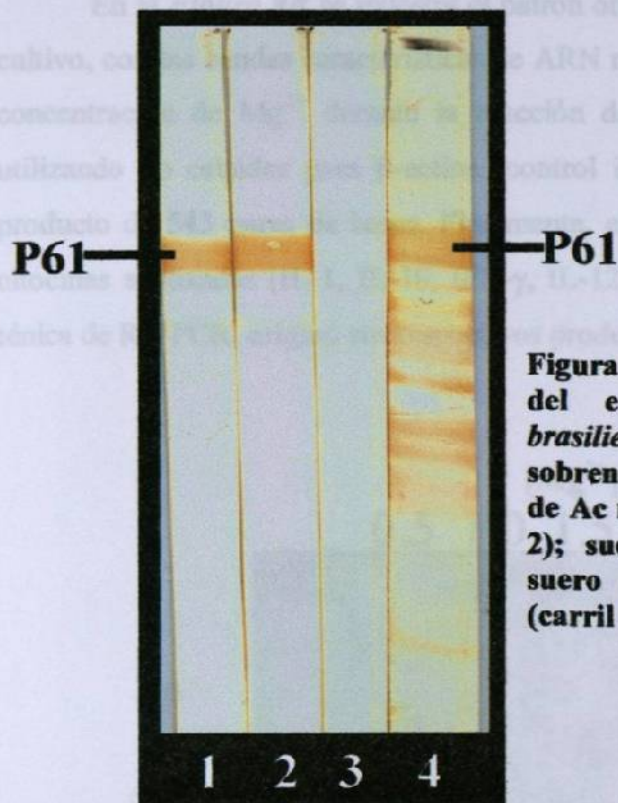


Figura 9A. Inmunoelectrotransferencia del extracto celular de *Nocardia brasiliensis* HUJEG-1 revelada con: sobrenadante de hibridoma productora de Ac monoclonal anti-P61 (carriles 1 y 2); suero control negativo (carril 3); suero policlonal anti-*N. brasiliensis* (carril 4).

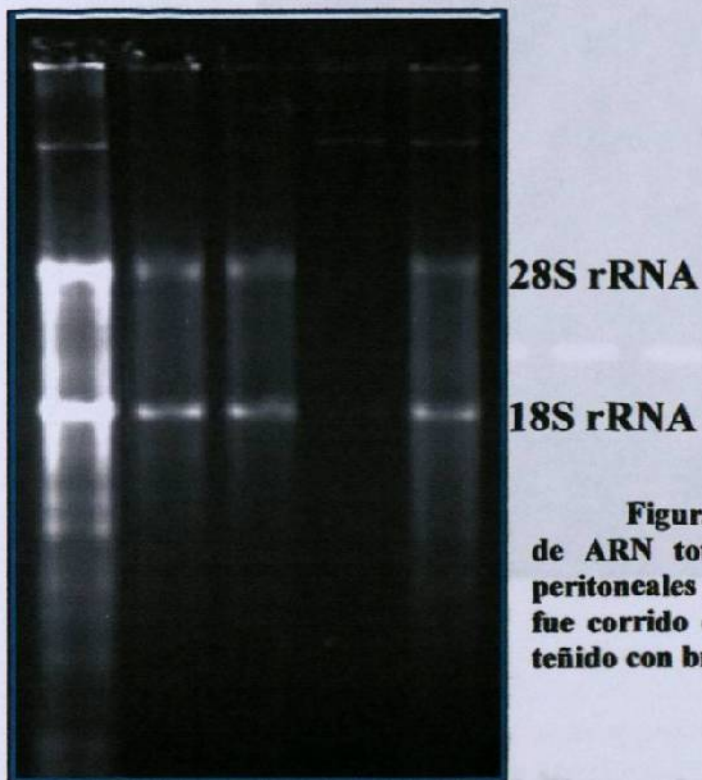


Figura 9B. Patrón electroforético de ARN total aislado de macrófagos peritoneales de ratón BALB/c. El ARN fue corrido en gel de agarosa al 1% y teñido con bromuro de etidio.

En la **Figura 9B** se muestra el patrón obtenido del ARN total de macrófagos en cultivo, con las bandas características de ARN ribosomal 18S y 28S. La titulación de la concentración de Mg^{2+} durante la reacción de PCR es mostrada en la **Figura 10**, utilizando un cebador para β -actina (control interno) que originó en la reacción un producto de 543 pares de bases. Finalmente, el uso de cebadores específicos para las citocinas analizadas (IL-1, IL-10, IFN- γ , IL-12 y TNF- α) durante la realización de la técnica de RT-PCR, originó sus respectivos productos específicos (**Figuras 11 y 12**).



Figura 10. Titulación de $[Mg^{2+}]$ para las condiciones de PCR usando cebadores para β -actina (543 bp).

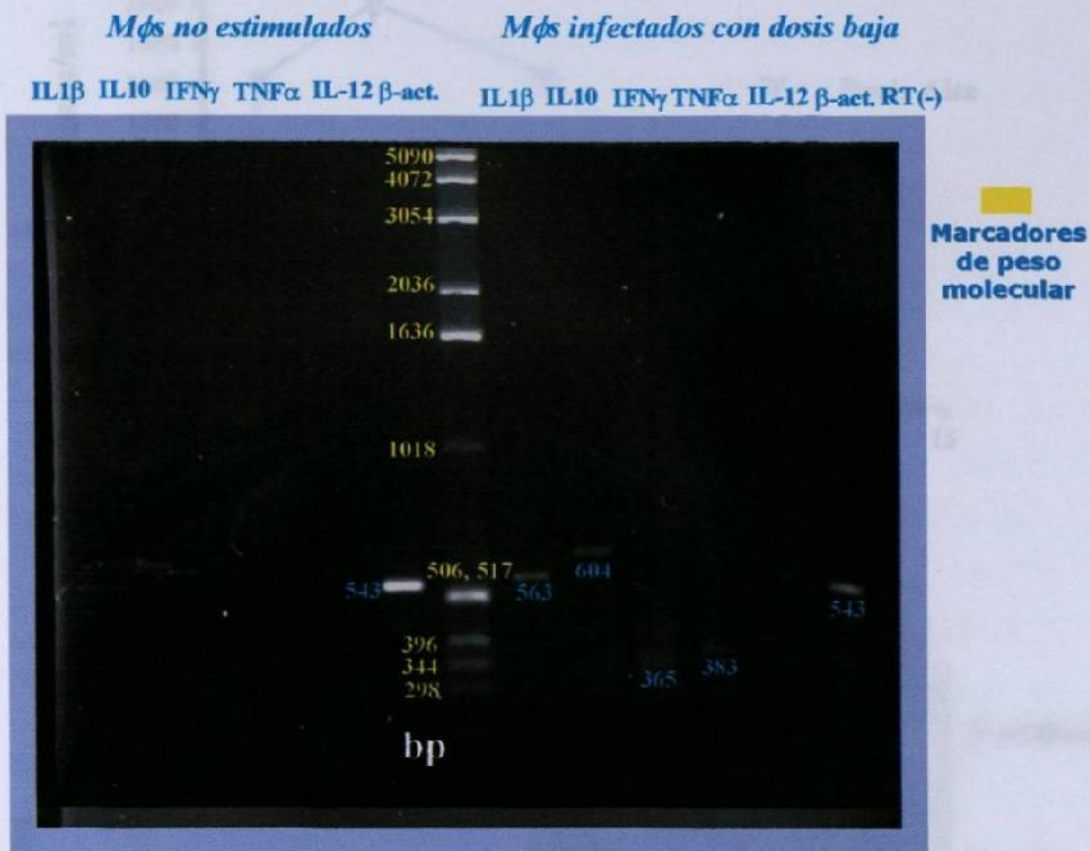


Figura 11. RT-PCR de ARNs mensajeros para las citocinas IL-1 β , IL-10, IFN- γ , TNF- α e IL-12 en macrófagos peritoneales infectados con *N. brasiliensis* (relación 10 nocardias: 1 M ϕ).

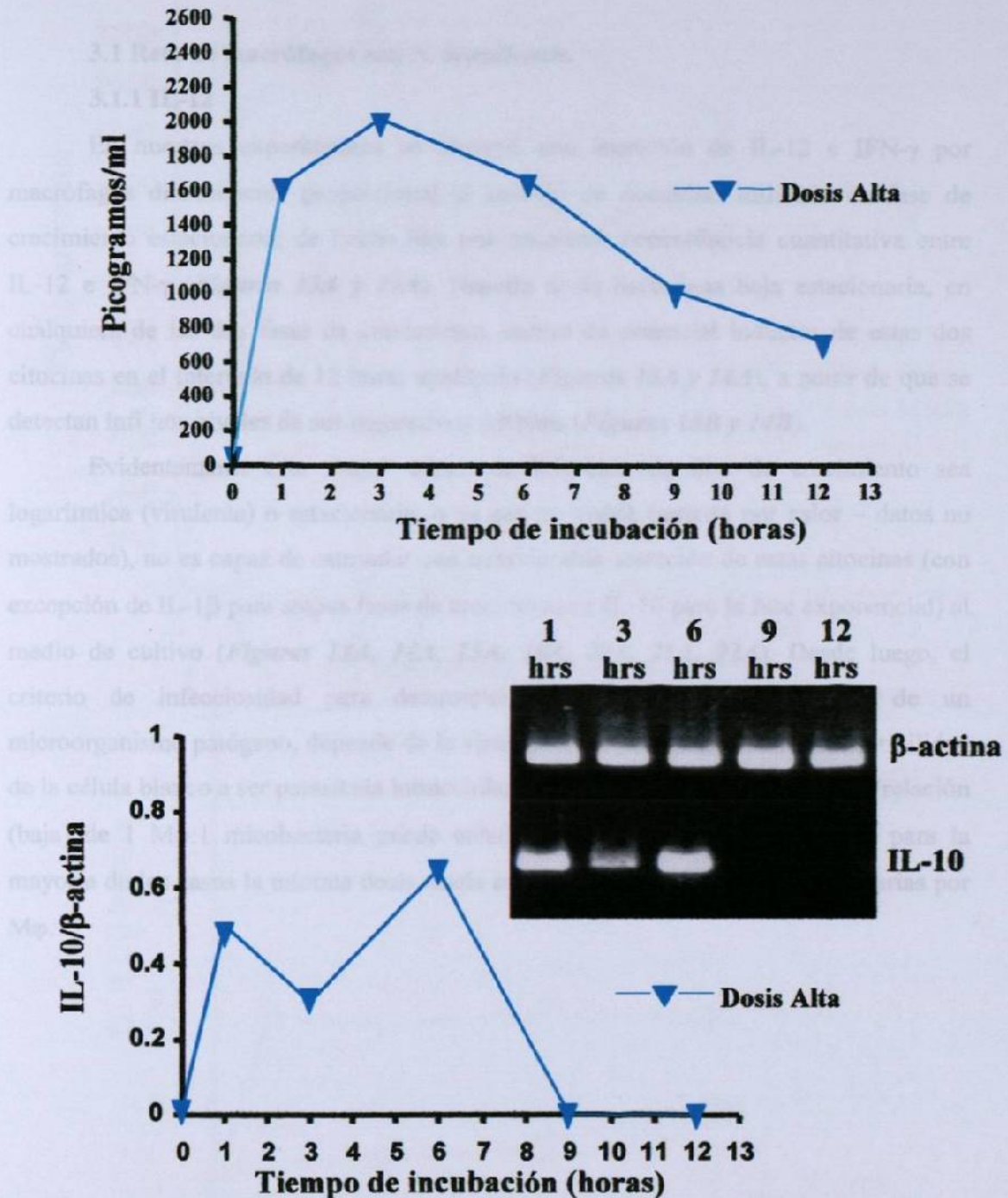


Figura 12. Expresión relativa de ARNm para IL-10 a través de RT-PCR y su traducción proteica (secreción) por Mφs infectados con una dosis alta de *N. brasiliensis* en fase estacionaria.

3.1 Reto de macrófagos con *N. brasiliensis*.

3.1.1 IL-12

En nuestros experimentos se observó una secreción de IL-12 e IFN- γ por macrófagos directamente proporcional al inóculo de nocardias utilizado en fase de crecimiento estacionaria; de hecho hay una excelente concordancia cuantitativa entre IL-12 e IFN- γ (*Figuras 13A y 14A*). Nuestra dosis bacteriana baja estacionaria, en cualquiera de las dos fases de crecimiento, carece de potencial inductor de estas dos citocinas en el intervalo de 12 horas analizado (*Figuras 13A y 14A*), a pesar de que se detectan bajos niveles de sus respectivos ARNm (*Figuras 13B y 14B*).

Evidentemente este “bajo” índice de infección en fase de crecimiento sea logarítmica (virulenta) o estacionaria, o ya sea no viable (muerta por calor – datos no mostrados), no es capaz de estimular una considerable secreción de estas citocinas (con excepción de IL-1 β para ambas fases de crecimiento e IL-10 para la fase exponencial) al medio de cultivo (*Figuras 13A, 14A, 15A, 18A, 20A, 21A, 22A*). Desde luego, el criterio de infecciosidad para determinar una dosis baja (infecciosa) de un microorganismo patógeno, depende de la virulencia del patógeno y de la susceptibilidad de la célula blanco a ser parasitada intracelularmente – para *M. tuberculosis* una relación (baja) de 1 M ϕ :1 micobacteria puede considerarse infecciosa, mientras que para la mayoría de los casos la mínima dosis usada *in vitro* se enmarca entre 4-10 bacterias por M ϕ .

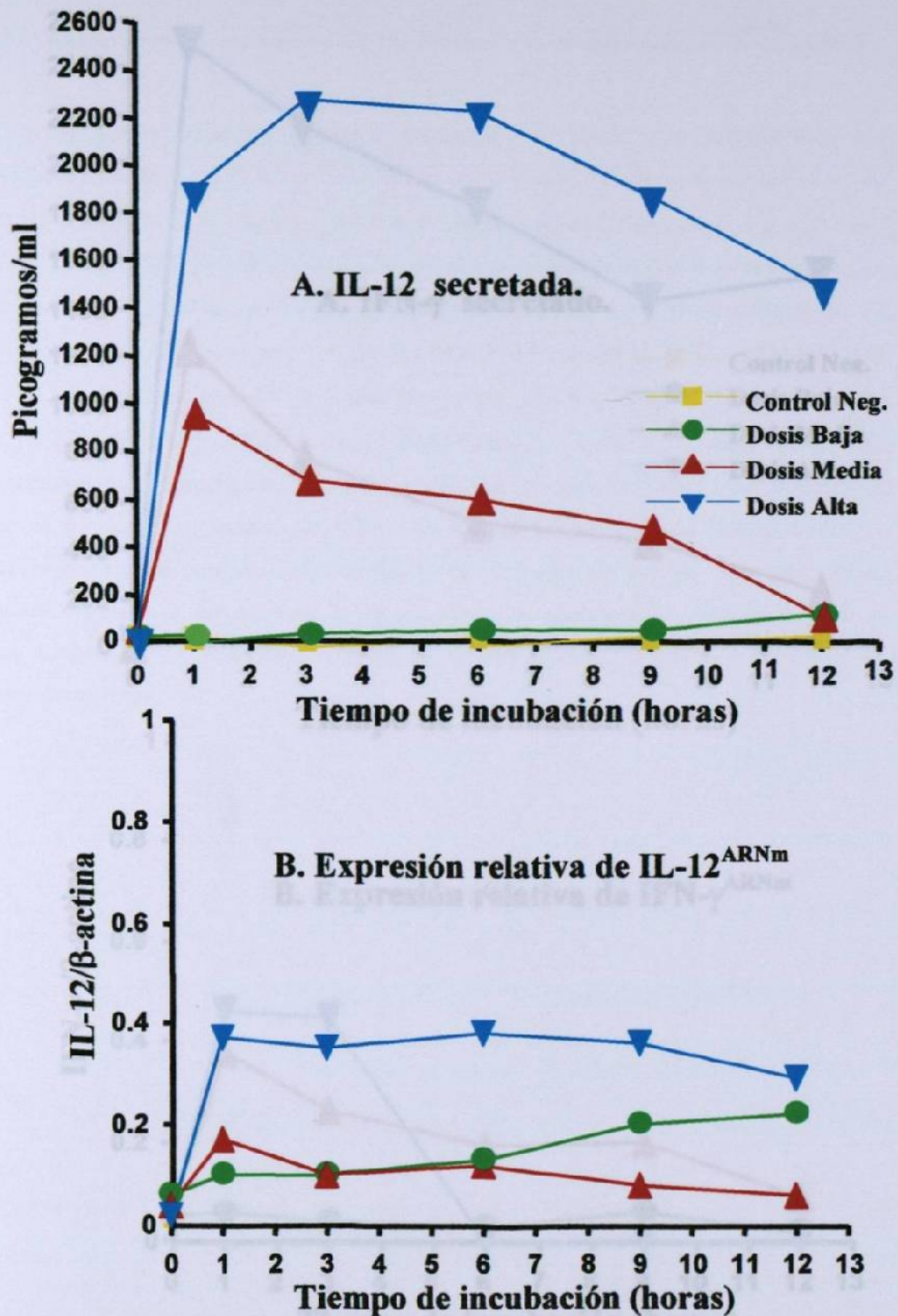


Figura 13. Secreción (A) y transcripción (B) de IL-12 por M ϕ s peritoneales de ratón BALB/c expuestos a *N. brasiliensis* en fase estacionaria.

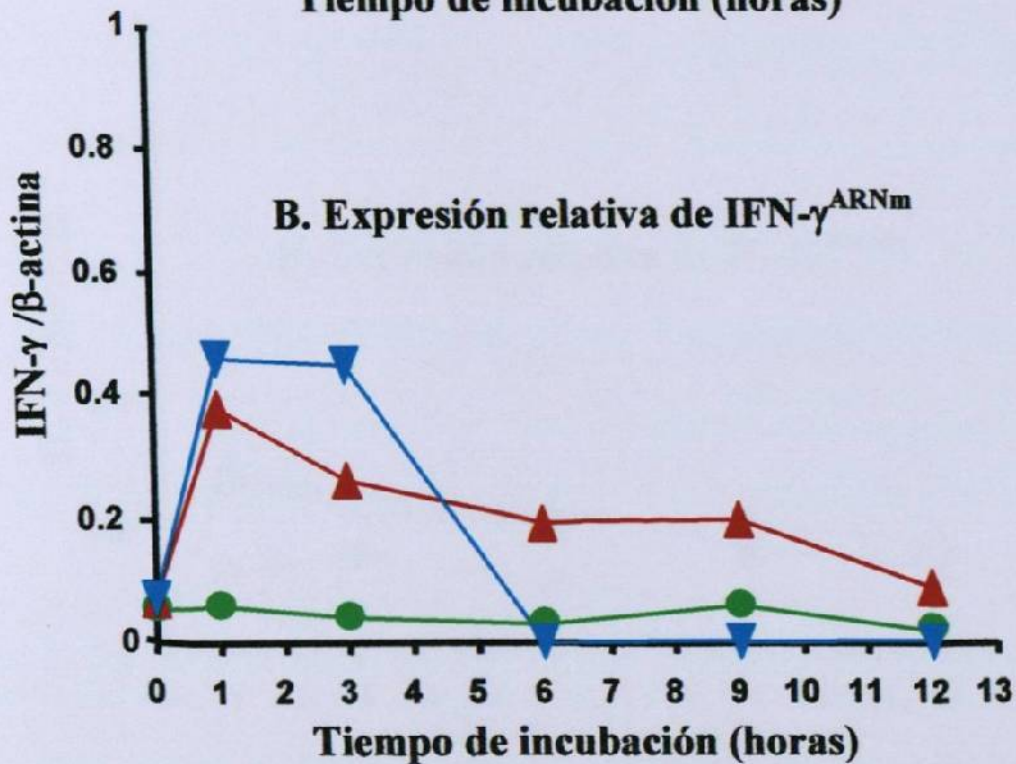
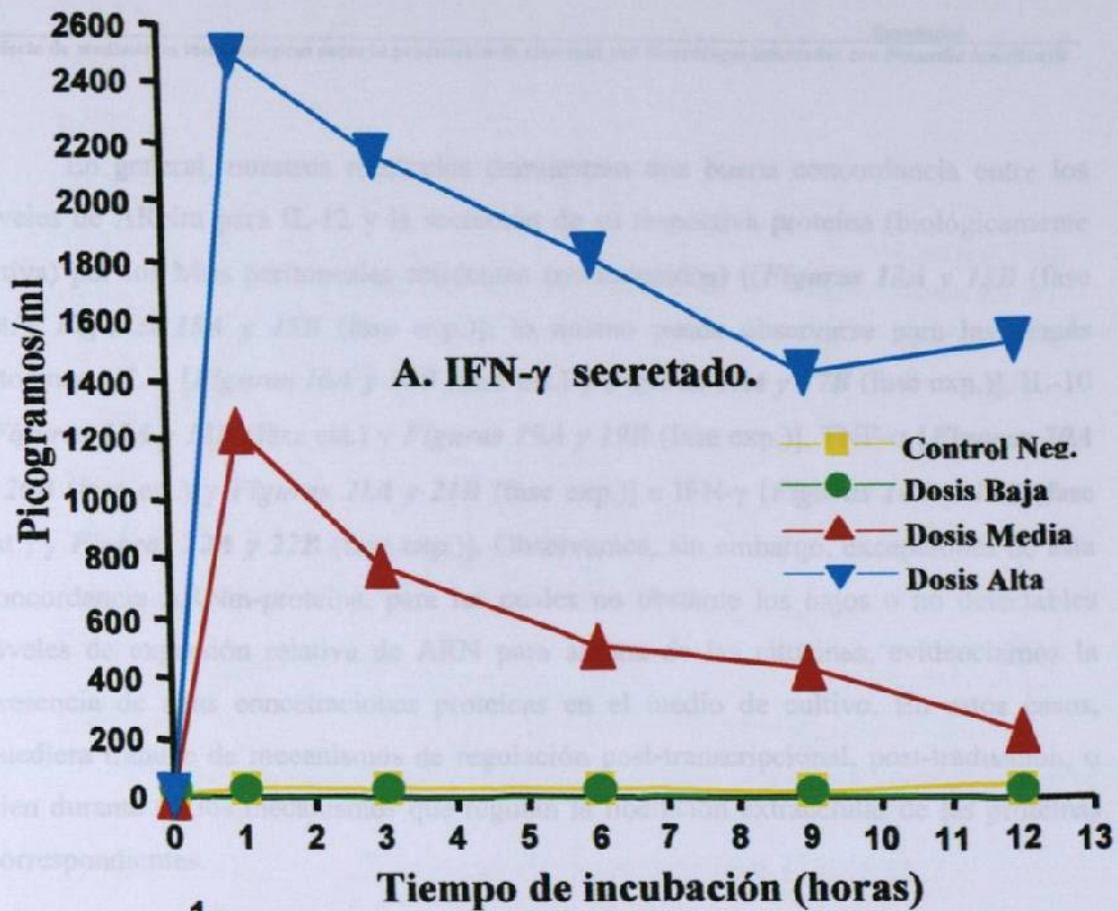


Figura 14. Secreción (A) y transcripción (B) de IFN- γ por M ϕ s peritoneales de ratón BALB/c expuestos a *N. brasiliensis* en fase estacionaria.

En general, nuestros resultados demuestran una buena concordancia entre los niveles de ARNm para IL-12 y la secreción de su respectiva proteína (biológicamente activa) por los Mφs peritoneales residentes (no inducidos) [(*Figuras 13A y 13B* (fase est.); *Figuras 15A y 15B* (fase exp.)); lo mismo puede observarse para las demás citocinas - IL-1 [(*Figuras 16A y 16B* (fase est.) y *Figuras 17A y 17B* (fase exp.)), IL-10 [(*Figuras 18A y 18B* (fase est.) y *Figuras 19A y 19B* (fase exp.)), TNF-α [(*Figuras 20A y 20B* (fase est.) y *Figuras 21A y 21B* (fase exp.))] e IFN-γ [(*Figuras 14A y 14B* (fase est.) y *Figuras 22A y 22B* (fase exp.))]. Observamos, sin embargo, excepciones de esta concordancia ARNm-proteína, para las cuales no obstante los bajos o no detectables niveles de expresión relativa de ARN para alguna de las citocinas, evidenciamos la presencia de altas concentraciones proteicas en el medio de cultivo. En estos casos, pudiera tratarse de mecanismos de regulación post-transcripcional, post-traducción, o bien durante de los mecanismos que regulan la liberación extracelular de las proteínas correspondientes.

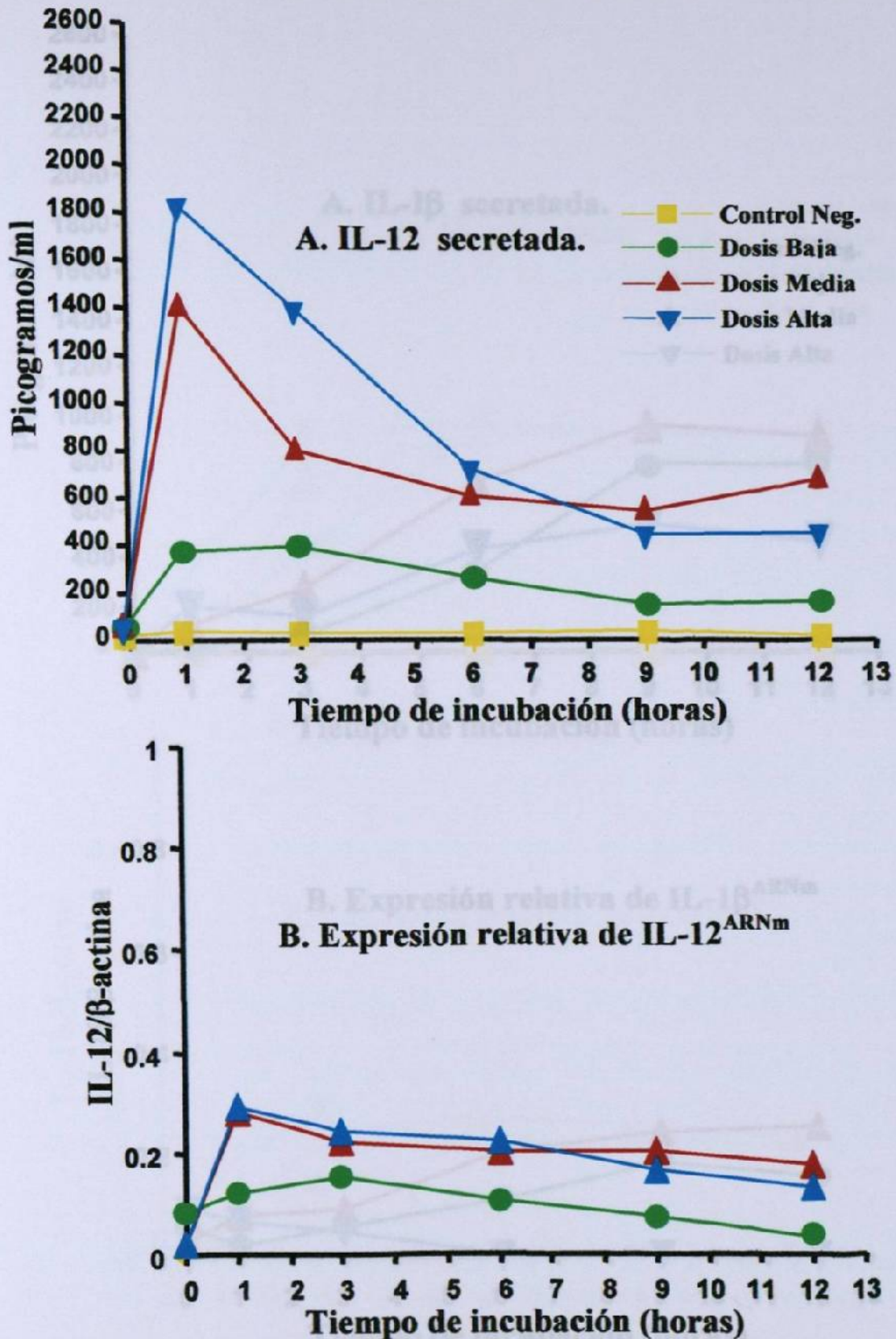


Figura 15. Secreción (A) y transcripción (B) de IL-12 por Mφs peritoneales de ratón BALB/c expuestos a *N. brasiliensis* en fase exponencial.

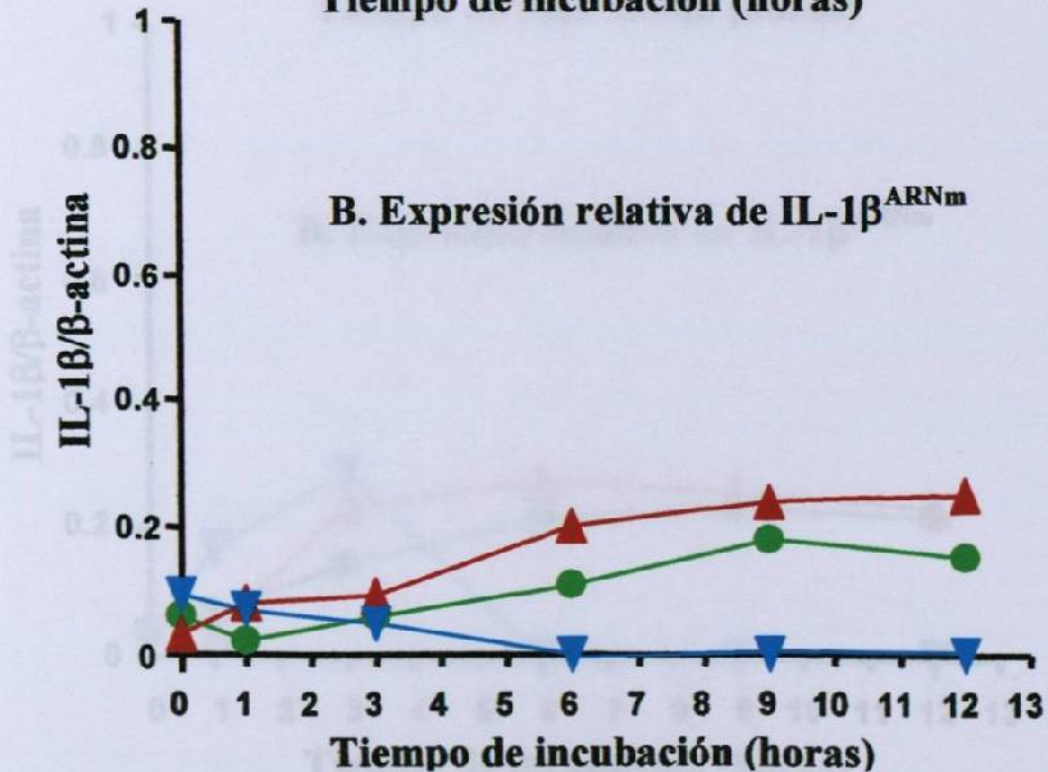
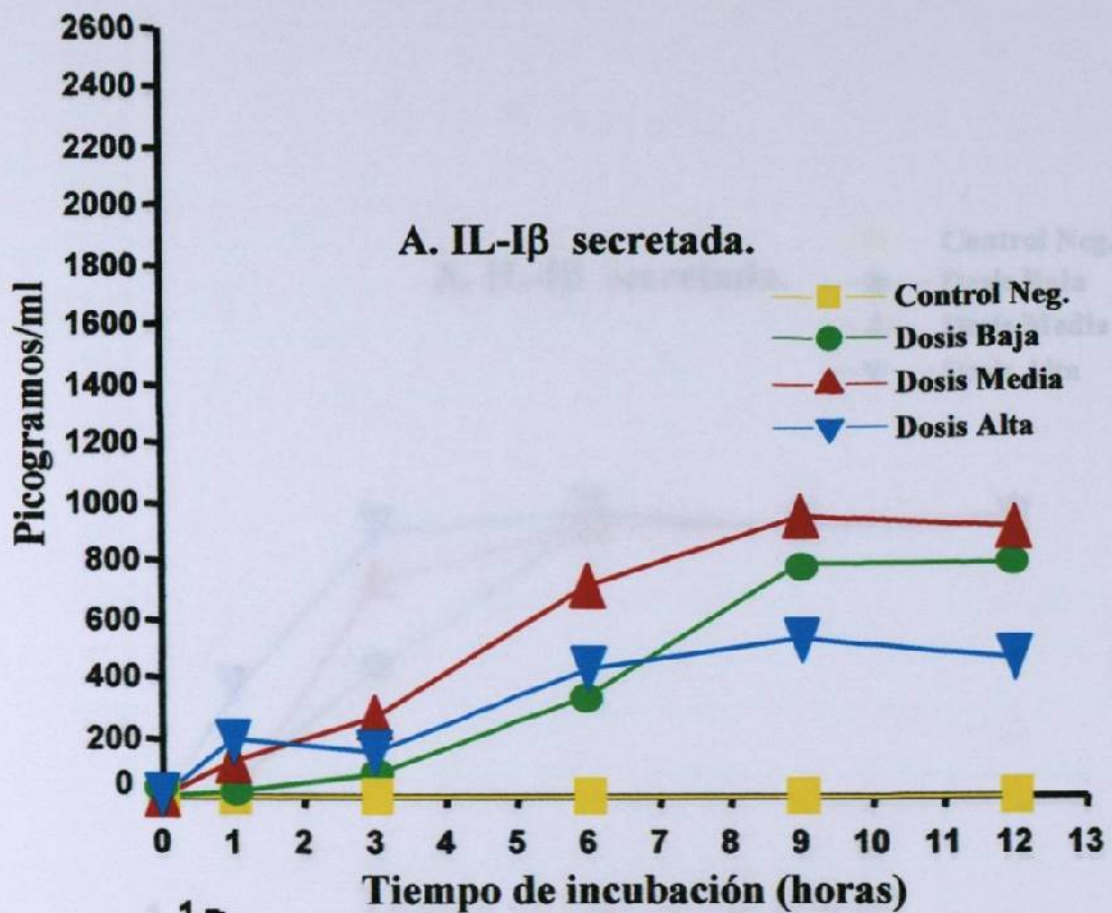


Figura 16. Secreción (A) y transcripción (B) de IL-1 β por M ϕ s peritoneales de ratón BALB/c expuestos a *N. brasiliensis* en fase estacionaria.

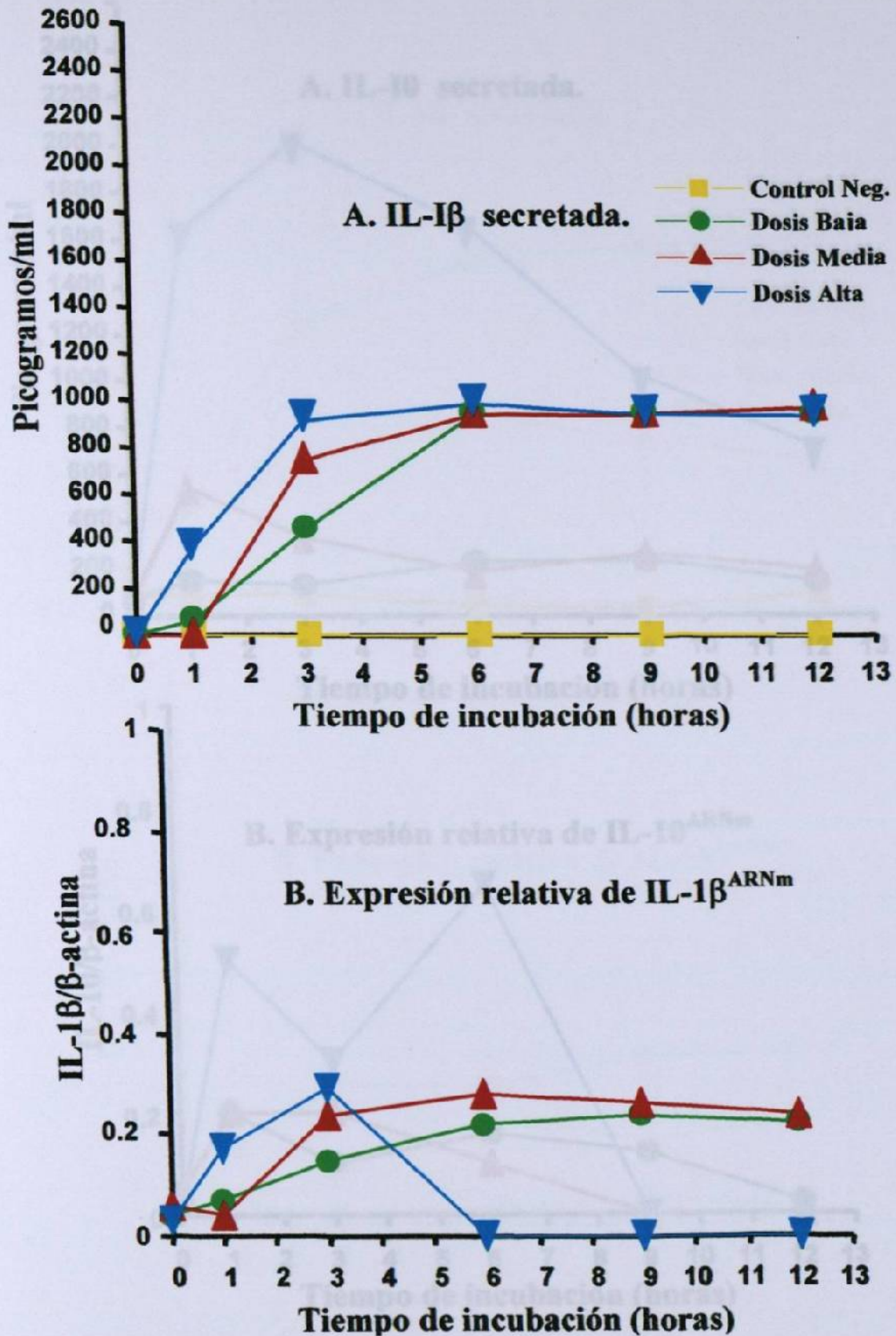


Figura 17. Secreción (A) y transcripción (B) de IL-1 β por M ϕ s peritoneales de ratón BALB/c expuestos a *N. brasiliensis* en fase exponencial.