

Figura 18. Secreción (A) y transcripción (B) de IL-10 por Mφs peritoneales de ratón BALB/c expuestos a *N. brasiliensis* en fase estacionaria.

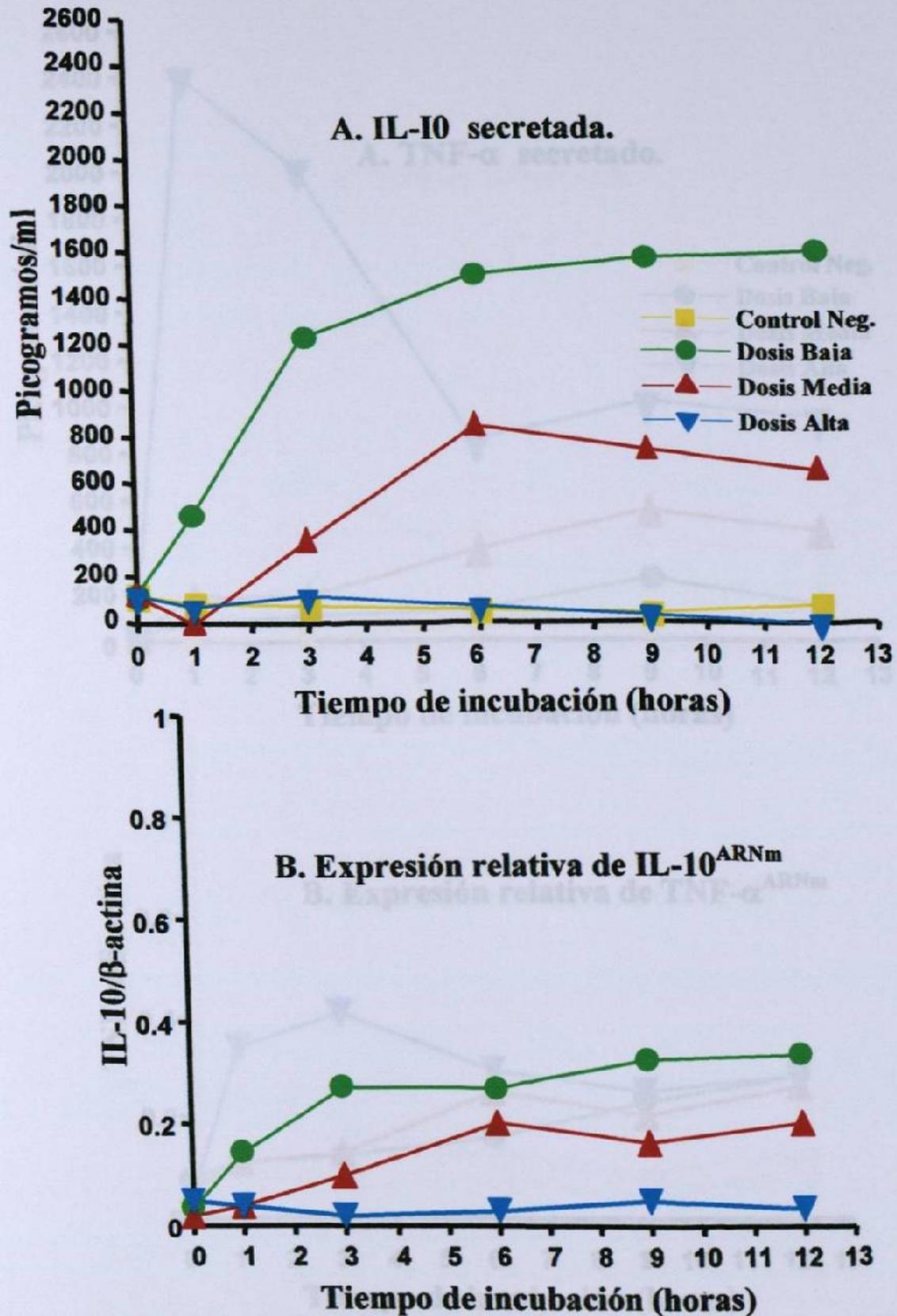


Figura 19. Secreción (A) y transcripción (B) de IL-10 por Mφs peritoneales de ratón BALB/c expuestos a *N. brasiliensis* en fase exponencial.

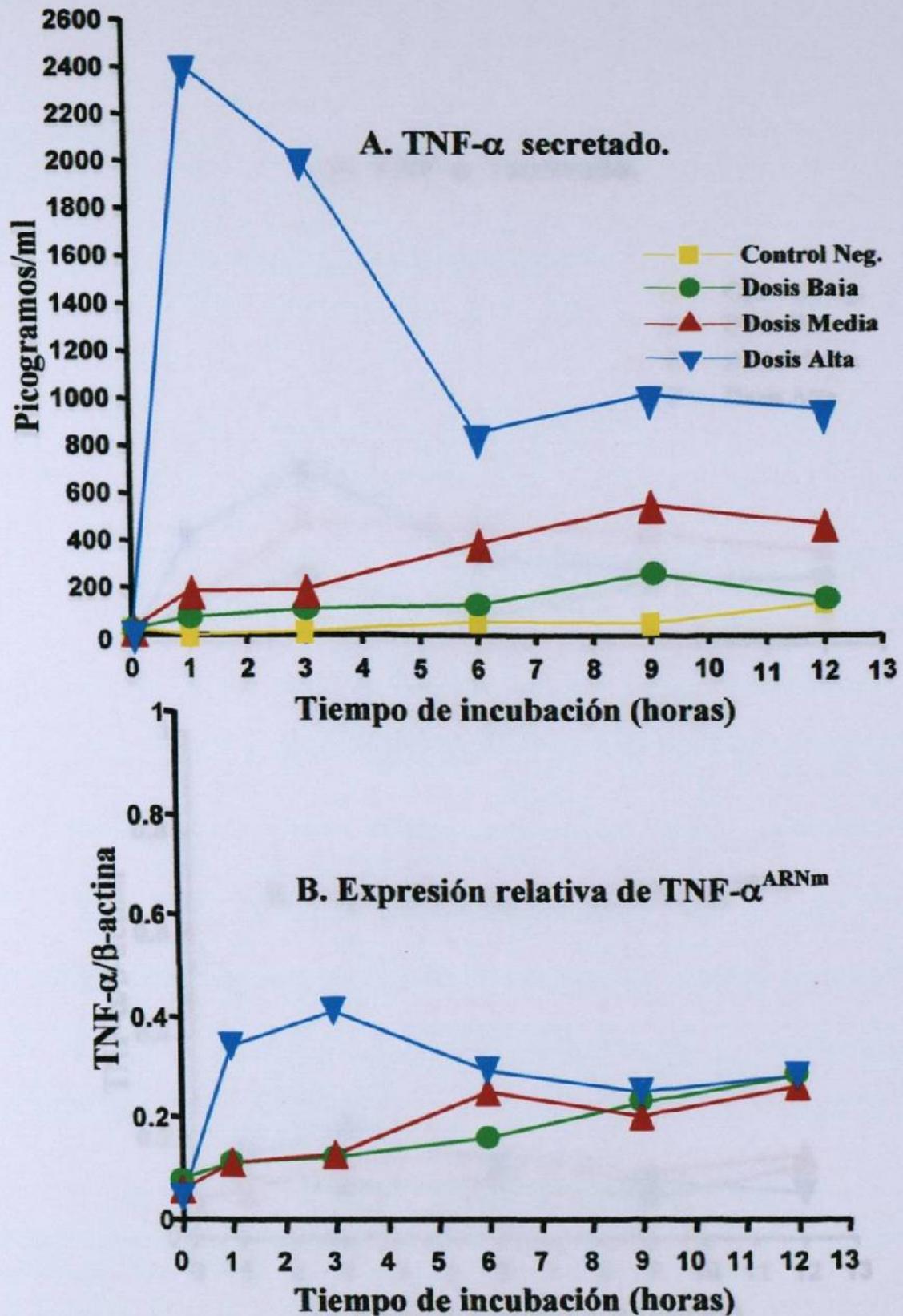


Figura 20. Secreción (A) y transcripción (B) de TNF- $\alpha$  por M $\phi$ s peritoneales de ratón BALB/c puestos a *N. brasiliensis* en fase estacionaria.

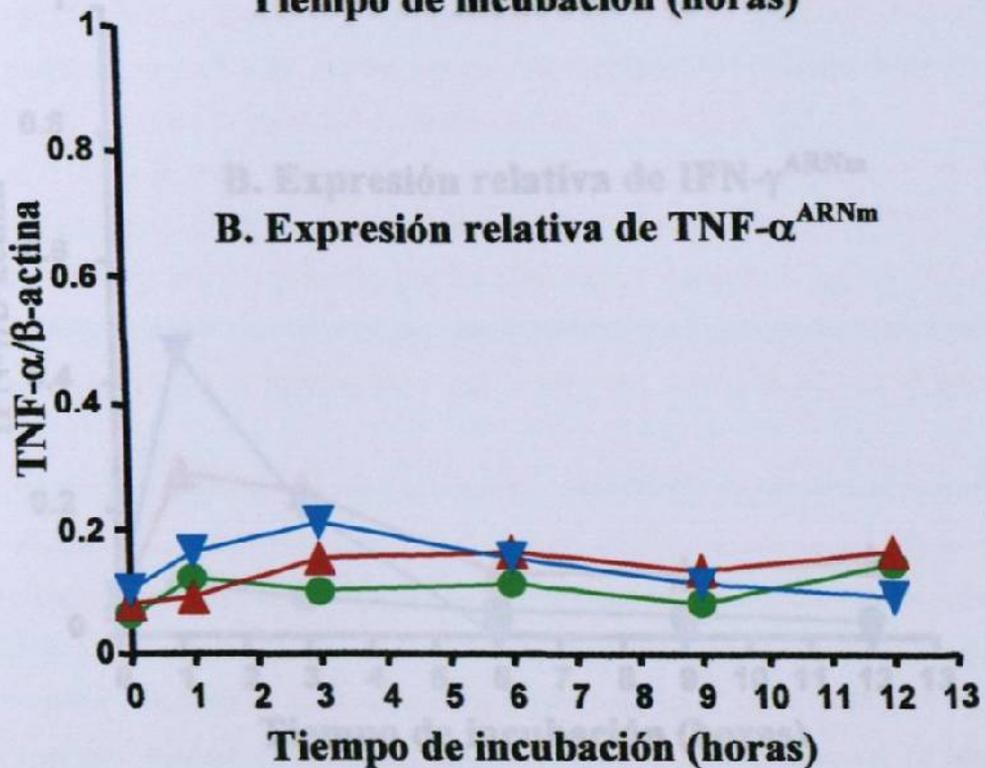
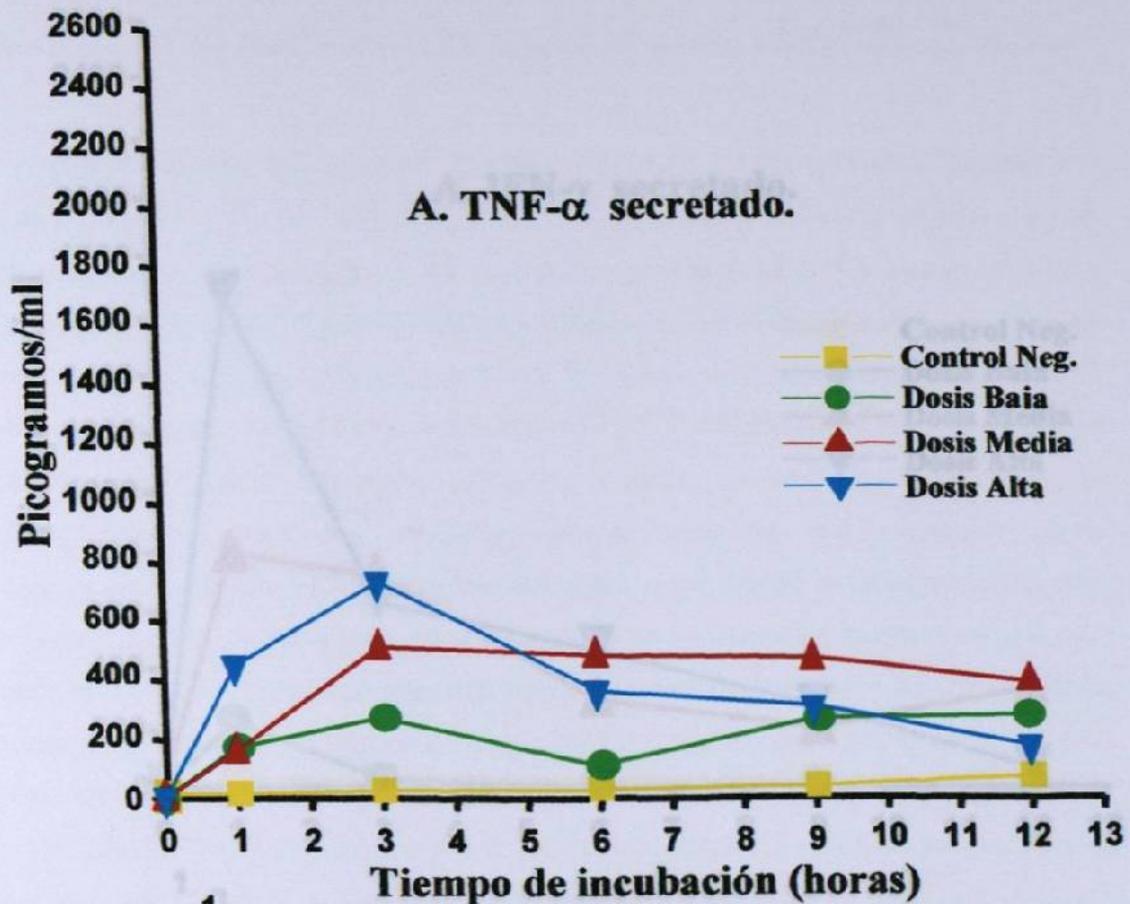


Figura 21. Secreción (A) y transcripción (B) de TNF- $\alpha$  por M $\phi$ s peritoneales de ratón BALB/c expuestos a *N. brasiliensis* en fase exponencial.

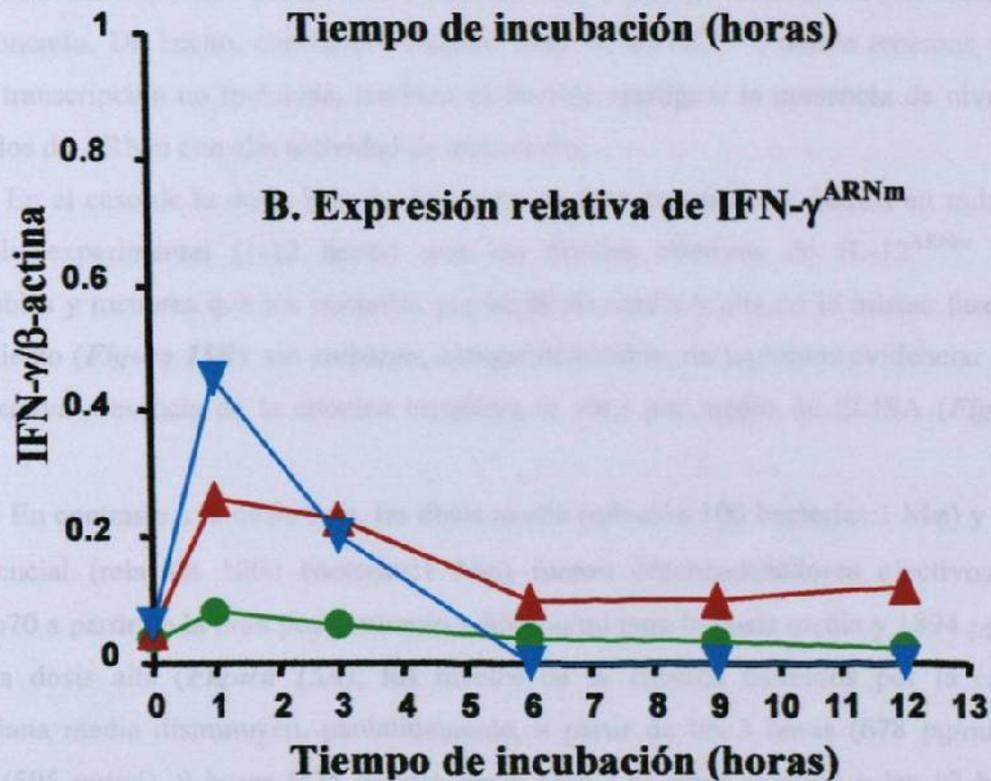
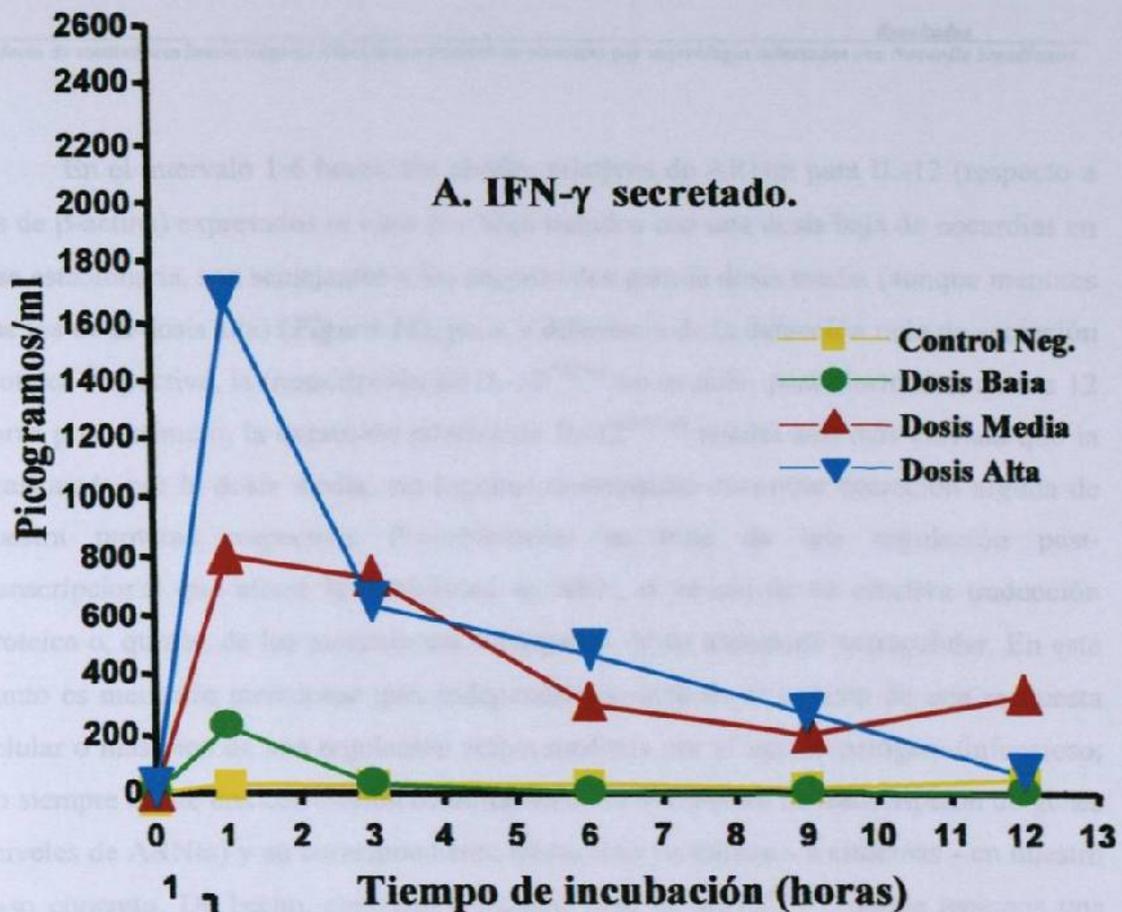


Figura 22. Secreción (A) y transcripción (B) de IFN- $\gamma$  por M $\phi$ s peritoneales de ratón BALB/c expuestos a *N. brasiliensis* en fase exponencial.

En el intervalo 1-6 horas, los niveles relativos de ARNm para IL-12 (respecto a los de  $\beta$ -actina) expresados *in vitro* por M $\phi$ s tratados con una dosis baja de nocardias en fase estacionaria, son semejantes a los encontrados para la dosis media (aunque menores que los de la dosis alta) (*Figura 11*), pero, a diferencia de la detección nula de secreción proteica respectiva, la transcripción de IL-12<sup>ARNm</sup> no es nula; posteriormente, de 6 a 12 horas post-estímulo, la expresión relativa de IL-12<sup>ARNm</sup> resulta aún más elevada que la ocasionada por la dosis media, sin lograrse nuevamente encontrar secreción alguna de nuestra proteína respectiva. Probablemente se trate de una regulación post-transcripcional que afecte la estabilidad de ARN, o ya sea de su efectiva traducción proteica o, quizás, de los mecanismos encargados de su transporte extracelular. En este punto es meritorio mencionar que, independientemente de si se trata de una respuesta celular o más bien de una regulación activa mediada por el agente patógeno/infeccioso, no siempre existe una correlación cuantitativa entre los niveles de transcripción de genes (niveles de ARNm) y su correspondiente traducción proteínica - a citocinas - en nuestro caso concreto. De hecho, contrario a nuestro caso de IL-12<sup>ARNm</sup>, donde tenemos una mayor transcripción no traducida, también es factible atestiguar la presencia de niveles reducidos de ARNm con alta actividad de traducción.

En el caso de la dosis baja de *Nocardia* en fase exponencial, vemos en todo el intervalo experimental (1-12 horas) que los niveles relativos de IL-12<sup>ARNm</sup> son detectables y menores que los causados por las dosis media y alta en la misma fase de crecimiento (*Figura 15B*); sin embargo, aunque detectable, no logramos evidenciar una significativa presencia de la citocina bioactiva *in vitro* por medio de ELISA (*Figura 15A*).

En contraste a la dosis baja, las dosis media (relación 100 bacterias:1 M $\phi$ ) y alta exponencial (relación 1000 bacterias:1 M $\phi$ ) fueron desencadenadores efectivos de IL-12p70 a partir de la hora post-estímulo - 955 pg/ml para la dosis media y 1894 pg/ml para la dosis alta (*Figura 15A*); los niveles de la citocina causados por la carga bacteriana media disminuyen, paulatinamente, a partir de las 3 horas (678 pg/ml), 6 horas (595 pg/ml), 9 horas (475 pg/ml), hasta caer a su nivel mínimo a las 12 horas postinfección (104 pg/ml). Por otro lado, con la dosis alta estacionaria, IL-12 alcanza 1894 pg/ml a la hora y aumenta aún más en las próximas 2 horas (2277 pg/ml), para posteriormente disminuir en forma gradual (2225 y 1871 pg/ml a las 6 y 9 horas,

respectivamente) hasta un nivel mínimo de 1486 pg/ml a las 12 horas (*Figura 13A*). En buena medida, la expresión relativa de IL-12<sup>ARNm</sup> en respuesta a las dosis media y alta en fase estacionaria, mantienen una lógica relación, siendo los niveles de transcripción mayores para la dosis alta, con respecto a la media, durante todo el intervalo (12 horas) (*Figura 13B*).

Las curvas de las cinéticas de producción de IL-12 al medio de cultivo reflejan la complejidad del efecto de la fase virulenta exponencial de *N. brasiliensis* a dosis media y alta (*Figura 15A*). Así, se observa que las dosis media causa, a la hora postinfección, un nivel significativo de IL-12 en el medio de cultivo, 1399 pg/ml, el cual sin embargo, disminuye drásticamente a 789 pg/ml (3 horas) y posteriormente se mantiene en ~650 pg/ml hasta el final del experimento. Por otro lado, IL-12 alcanza 1823 pg/ml una hora postinfección al utilizarse la dosis alta pero, nuevamente, a partir de las 3 horas disminuye bruscamente (1385 pg/ml) y aún más a las 6 horas (713 pg/ml), para establecerse en un nivel mínimo (~430 pg/ml) durante el intervalo 9-12 horas. Además del descenso repentino en la producción de IL-12 por Mφs 1 hora postinfección al aplicar la dosis alta (exponencial) es notorio el hecho que, en comparación con la estacionaria, a partir de las 3 horas postinfección todos los puntos de muestreo (3, 6, 9 y 12 horas) indican cantidades menores de IL-12; más aún, después de que en el período 1-3 horas la dosis alta exponencial demuestra ser un mejor inductor de IL-12 con respecto a la dosis media exponencial (1800-1385 vs 1399-789 pg/ml), su efecto pasa por un punto temporal de equivalencia (6-9 horas) de aprox. 600 pg/ml, para posteriormente observarse una tendencia de supremacía de la dosis media sobre la alta (535-669 vs 433-441 pg/ml) en el intervalo 9-12 horas postinfección.

La máxima transcripción del gen para IL-12 en Mφs peritoneales residentes cultivados *in vitro*, causada por la infección de la dosis alta de *N. brasiliensis* (relación 1000 nocardias:1 Mφ) en fase de crecimiento estacionaria, coincide en el período analizado de 12 horas, con la secreción de su proteína respectiva al medio de cultivo (*Figuras 13A y 13B*). El efecto de la dosis media bacteriana sobre el nivel de IL-12<sup>ARNm</sup> es más "irregular", ya que, efectivamente, en todos los muestreos temporales (1, 3, 6, 9 y 12 horas) es inferior en relación al causado por la dosis alta, más sin embargo en el período 3-6 horas es equiparable, semicuantitativamente, al de la dosis baja (en fase log)

y en el segmento 9-12 horas se abate aún por debajo de los niveles causados por la dosis baja en la misma fase log.

### 3.1.2 IFN- $\gamma$

Las cinéticas de producción de IFN- $\gamma$  por M $\phi$ s no inducidos, como efecto de las dosis (baja, media y alta) de nocardias en fase estacionaria de crecimiento, guardan una excelente concordancia, en los tres casos, con el comportamiento observado para IL-12 (*Figuras 14A y 13A*). De esta manera, nuestros experimentos dejan de manifiesto la incapacidad de la dosis baja (10 bacterias/M $\phi$ ) para inducir secreción alguna de IFN- $\gamma$  en el intervalo 1-12 horas. Un estímulo 10 veces más potente (relación 100:1) es, ahora sí, un efectivo inductor de interferón, elevándose sus niveles a partir de la hora postinfección (~1234 pg/ml), para después disminuir repentinamente a las 3 horas (~767 pg/ml) y continuar con una disminución paulatina durante el trayecto 6-9-12 horas (511, 427 y 224 pg/ml, respectivamente). A una hora postinfección, la dosis alta (relación 1000:1) desencadena una drástica elevación para alcanzar los 2500 pg/ml y, 2 horas más tarde, caer en forma escalonada a 2151 pg/ml (3 horas), 1806 pg/ml (6 horas) y finalmente a 1421-1551 pg/ml en el período final de 9-12 horas.

El patrón de expresión transcripcional del gen para IFN- $\gamma$  en M $\phi$ s, en dependencia de la dosis de nocardias en fase de crecimiento estacionaria, difiere en varios aspectos de su traducción proteínica y secreción al medio de cultivo (*Figuras 14B y 14A*); se hace evidente que en el intervalo experimental de 0-12 horas, el gen para IFN- $\gamma$  en los M $\phi$ s ha sufrido una mínima pero perceptible actividad, para la cual no fuimos capaces de detectar un ulterior desenlace de traducción y secreción de la proteína correspondiente. Más aún, continúa la ruptura de la proporcionalidad directa IFN- $\gamma^{\text{ARNm}} \rightarrow$  proteína cuando advertimos que, a una hora post-estímulo se detectan niveles relativos de IFN- $\gamma^{\text{ARNm}}$  casi equivalentes tras la aplicación de las dosis media y alta; más sin embargo ésta última induce una traducción y secreción de más del doble de proteína en comparación con la primera (2500 vs 1234 pg/ml) (*Figura 14A*). Estas discrepancias causa-efecto entre las dosis media y alta parecieran empezar a conciliarse a partir de las 3 horas del estímulo, cuando se detectan niveles relativos mayores para dosis alta (~0.4 vs 0.2 de la dosis media); sin embargo, la disminución paulatina del

efecto de la dosis media a 6 (0.2), 9 (0.2) y 12 horas (0.16) contrasta con el completo y sorprendente abatimiento de los transcritos para IFN- $\gamma$  a partir de las 6 horas (*Figura 14B*).

Si bien se infiere una lógica racional que úne la disminución paulatina de transcritos para IFN- $\gamma$  a las 6, 9 y 12 horas (0.2, 0.2 y 0.16, respectivamente) y su proteína secretada al medio de cultivo (511, 427 y 224 pg/ml) como efecto de la dosis media estacionaria de nocardias, resulta sorprendente que, no obstante el completo abatimiento de la transcripción detectada para la citocina en respuesta a la dosis alta de nocardias, los niveles de IFN- $\gamma$  secretados por los M $\phi$ s infectados, se sostienen elevados (1806, 1421 y 1531 pg/ml) durante este lapso de tiempo y superan ampliamente los logrados por la dosis bacteriana media.

La fuente celular de IFN- $\gamma$  durante la fase de inmunidad adquirida ha sido adscrita a células linfocíticas T y más tarde la producción temprana (T-independiente) fue adjudicada a células NK y TCD8<sup>+</sup> (145-7). Aunque actualmente está en proceso la estructuración de un marco sólido de evidencias experimentales, en los últimos años (a partir de 1998) ha comenzado el reconocimiento del M $\phi$  como célula capaz de producir rápidamente cantidades significativas de IFN- $\gamma$  con potencial para influir, en forma cardinal, la respuesta inmune innata y adaptativa.

### 3.1.3 TNF- $\alpha$

La heterogeneidad del origen celular de esta citocina proinflamatoria se encuentra íntimamente ligada, históricamente, a la tuberculosis. Y sin embargo no fue hasta a principios de los 90s del siglo XX que Flesch y Kaufmann (148) establecieron el efecto coestimulador del TNF- $\alpha$  hacia el IFN- $\gamma$  para inducir la función antimicrobiana en M $\phi$ s. En la actualidad crece la certeza acerca de la trascendencia funcional de la caquetina no sólo en la respuesta inmune inata contra parásitos intracelulares, sino que también se le atribuye vital importancia en la polémica formación de granulomas.

Nuestros experimentos revelan la abolición de TNF- $\alpha$  secretada por M $\phi$ s no inducidos al aplicar como estímulo dosis bajas de *N. brasiliensis* en fase estacionaria (*Figura 20A*); partiendo de 75 pg/ml (1 hora) el pico máximo de 260 pg/ml se alcanza a las 9 horas postinfección y disminuye nuevamente hasta 155 pg/ml al final del ensayo

(12 horas). Es excepcional el hecho que una carga bacteriana 10 veces mayor a la anterior no sólo permanece inocua prácticamente al inicio (1-3 horas ~190 pg/ml), sino que su sobrio acrecentamiento – 390-470 pg/ml – en las siguientes 9 horas nos advierte que su impacto es claramente menoscabado. La actividad inhibitoria de la nocardia en fase estacionaria se ve doblegada temporalmente al utilizar una concentración bacteriana  $10^2$  mayor que la dosis baja; 1 hora postinfección, detectamos una impresionante secreción temprana de ~2411 pg/ml de TNF- $\alpha$  al medio de cultivo celular, la cual sin embargo se ve drásticamente menguada a 2000 pg/ml (3 horas) y finalmente a ~853 pg/ml (6-12 horas postinfección).

Los escasos niveles relativos de TNF- $\alpha$ <sup>ARNm</sup> (*Figura 20B*) en M $\phi$ s infectados con dosis baja y media de cultivos bacterianos en crecimiento estacionario son concomitantes a la ya referida menguada secreción extracelular de la citocina (*Figura 20A*). En contraste, advertimos una discordancia en la sesgada actividad transcripcional para TNF- $\alpha$  como efecto de la dosis alta de nocardias (1000 bacterias/M $\phi$ ), la cual aunque semejante a la causada por las dosis baja y media, conduce a una elevada (1-3 horas ÷ 2411-2023 pg/ml, respectivamente) o moderada (6-12 horas ~941 pg/ml en promedio) producción proteica extracelular. Evidentemente la explicación de la aparente antitética relación *baja transcripción*→*elevada traducción* explique quizás no sólo una más anérgica potencia de transcripción del IFN- $\gamma$ <sup>ARNm</sup>, sino también una superior estabilidad de este último, sin claro eximir la contribución de los mecanismos celulares encargados de gobernar la transportación intercelular y translocación extracelular de las moléculas de citocina sintetizadas.

En comparación con la fase avirulenta (estacionaria), una dosis baja en fase virulenta de *N. brasiliensis* no se comporta como un mejor inductor de TNF- $\alpha$  (con rango de 109-272 pg/ml) (*Figura 21A*). Más aún, el aumento de la multiplicidad de infección con 1 o dos logaritmos (dosis media y alta, respectivamente) no desencadena ningún efecto de potenciación proporcional al inóculo utilizado. De esta manera, a una hora de aplicar la dosis media, procede la producción de niveles detectables (~159 pg/ml), pero relativamente bajos, de caquetina secretada en el medio de cultivo celular; 2 horas después la citocina se incrementa a 505 pg/ml y disminuye gradualmente a 382 pg/ml al finar (12 horas), lo cual podríamos catalogar como una producción moderada en

base a nuestros parámetros y condiciones. Sorpresivamente, la dosis alta log origina, 1 hora postinfección, apenas 445 pg/ml de TNF- $\alpha$  (vs 2411 pg/ml de su contraparte en etapa estacionaria) y aumenta ulteriormente a niveles moderados de 729 pg/ml (3 horas postinfección), más sin embargo descienden a 359, 299 y 169 pg/ml en el trayecto 6-9-12 horas (vs 420, 400 y 380 pg/ml para el mismo tiempo con la dosis media de nocardias).

### 3.1.4 IL-10

La interleucina-10 fue descrita inicialmente como un factor inhibidor de la síntesis de citocinas, secretado por clonas de células Th2 - pero no Th1 - estimuladas con ConA o antígeno, y el cual poseía la capacidad de inhibir la producción de IFN- $\gamma$ , IL-12, TNF- $\beta$  por células Th1 (149). Aunque en el ratón es frecuentemente clasificada como una citocina Th2, en el humano IL-10 rompe la dicotomía Th1 vs Th2, ya que en esta última especie (y en otras) es secretada por ambas subpoblaciones de linfocitos Th1 y Th2.

En la actualidad sabemos que el origen celular de IL-10 es mucho más diverso, siendo las células monocíticas y macrofágicas una fuente vital de esta citocina; además, IL-10 es reconocida principalmente como factor *regulador negativo* de los procesos inflamatorios a pesar que se ha reportado que esta citocina posee cualidades activadoras en ciertas circunstancias.

Nuestros resultados evidencian que a 1 hora postinfección con la fase de crecimiento estacionaria (*Figura 18A*), los M $\phi$ s peritoneales tienden a producir IL-10 en proporción directa a la dosis aplicada al cultivo celular (dosis baja - 148 pg/ml; dosis media - 543 pg/ml y dosis alta - 1633 pg/ml); sin embargo, a partir de las 3 horas observamos como el efecto de la dosis media de nocardias diezma (333 pg/ml), para ser después, prácticamente, equiparable al causado por la carga bacteriana baja en el intervalo 6-12 horas - aprox. 200 pg/ml para ambas dosis. En contraste, la dosis alta de nocardias (en fase estacionaria) permanece siendo (a 3 horas de la infección de M $\phi$ s) un estímulo considerable para la producción de IL-10 (2012 pg/ml), la cual sufre una disminución gradual a las 6 y 9 horas (1656 y 1012 pg/ml, respectivamente) hasta llegar a su punto mínimo de producción (718 pg/ml) a las 12 horas.

En general, los niveles de expresión de IL-10<sup>ARNm</sup> (*Figuras 18B y 19B*) concuerdan bien con la secreción de la citocina (*Figuras 18A y 19A*). Como excepción tenemos el intervalo 9-12 horas correspondiente a las dosis media y alta estacionaria, período durante el cual no fuimos capaces de detectar el ARNm específico para esta citocina (*Figura 18B*). Sin embargo, es evidente que la presencia de considerables niveles de IL-10 (*Figura 18A*) demuestra la existencia del ARNm respectivo (no detectable en nuestro protocolo), con una gran actividad post-transcripcional. Alternativamente, podríamos hipotetizar, efectivamente, una degradación del IL-10<sup>ARNm</sup>, pero que coincide con cierto grado de estabilización de su respectiva proteína sintetizada, a 9-12 horas del tratamiento de Mφs con dosis media y alta de *N. brasiliensis* en fase estacionaria.

Aunque desconcertante a primera vista, es inequívoco el patrón inverso, respecto al causado por la fase estacionaria, que describen las cinéticas de secreción de IL-10 al someter Mφs residentes peritoneales a la nocardia en fase de crecimiento exponencial (fase virulenta) (*Figura 19A*). En contraposición a la fase estacionaria, la respuesta de IL-10 en base a la dosis log aplicada es inversamente proporcional al estímulo; así, estimulando con una dosis baja de *Nocardia* virulenta, la concentración de IL-10 en el medio de cultivo se eleva de 460 pg/ml (1 hora) a 1223-1490 pg/ml (3-6 horas) y se mantiene (aprox. 1557-1590 pg/ml) hasta el final (12 horas) sin lograr vislumbrar tendencia alguna de disminución. Por otro lado, no es hasta las 3 horas postinfección que la dosis media logra inducir niveles detectables pero modestos (~353 pg/ml) de IL-10, y después, alcanzar apenas una concentración sostenida (6-12 horas) de aprox. 650-840 pg/ml. Finalmente, atestigüamos con que una relación infecciosa nocardias:Mφs alta (1000:1) mantiene (inhibe) la secreción de esta citocina anti-inflamatoria en niveles (0-100 pg/ml) básicamente iguales a los basales (Control Negativo no infectado) a lo largo de todo el trayecto experimental (0-12 horas).

Con una conducta similar a la secreción proteínica, la transcripción de IL-10<sup>ARNm</sup> durante el experimento resulta ser inversamente proporcional a la dosis bacteriana de nocardias en fase exponencial (*Figura 19B*), existiendo una mayor actividad transcripcional como efecto de la carga baja, siguiendo a la media en potencia y finalizando en una mínima actividad causada por la dosis alta de bacteriana.

### 3.1.5 IL-1

Una y tres horas después del estímulo con nocardias en fase estacionaria, en general los niveles secretados de IL-1 $\beta$  para las tres dosis empleadas (8-77, 115-266 y 193-146 pg/ml, respectivamente para las dosis baja, media y alta), son mínimos y sin diferencias significativas entre ellas (*Figura 16A*). No es hasta las 6 horas de estímulo cuando el efecto de la carga bacteriana media (~719 pg/ml) se hace notorio y sobrepasa no sólo al de la carga baja (338 pg/ml), sino también aquella de la dosis alta (429 pg/ml). A partir de las 9 horas en adelante las curvas de las dosis baja y media sufren un ascenso con niveles muy semejantes de IL-1 $\beta$  (aprox. 790 y 927 pg/ml para cada una de ellas), superando significativamente las cantidades inducidas por la dosis alta para el mismo período de tiempo (9-12 horas).

La efectividad de la dosis alta exponencial se hace notoria a la hora postinfección, logrando un nivel moderado (~362 pg/ml) de IL-1 $\beta$ , mientras que esta citocina permanece casi inalterada (68 y 0 pg/ml) al aplicar las dosis menores (baja y media) (*Figura 17A*). Posteriormente, a las 3 horas postinfección, la relación 1000 nocardias:1 M $\phi$  duplica su efecto y eleva la producción de esta citocina proinflamatoria a 906 pg/ml; por su parte las relaciones infecciosas baja y media virulentas originan acúmulos de IL-1 $\beta$  (443 y 731 pg/ml), menores a los causados por la dosis alta en la misma fase de crecimiento y respetando la proporcionalidad relativa del efecto en base a la cantidad del inóculo bacteriano utilizado. En forma interesante, la dosis alta mantiene su nivel (~986 pg/ml) de expresión a las 6 horas del ensayo, punto en el que se le unen, hasta el final, las trayectorias cinéticas causadas por las dosis baja y media de nocardias (933 y 966 pg/ml, respectivamente).

Los patrones cinéticos relativos de IL-1 $\beta$ <sup>ARNm</sup> (*Figuras 16B y 17B*) concuerdan en general con la secreción proteica, a pesar de que, nuevamente, en apariencia existe una mayor actividad post-transcripcional que origina una elevada concentración de citocina en el medio de cultivo; a partir de las 6 horas postinfección no detectamos IL-1 $\beta$ <sup>ARNm</sup> para la dosis alta log (*Figura 17B*), pero sí logramos detectar cantidades considerables de su respectiva proteína – aprox. 980 pg/ml (*Figura 17A*).

### **3.2 Efecto de anticuerpos monoclonales y policlonales anti-*Nocardia* sobre la producción de citocinas macrofágicas.**

#### **3.2.1 Pretratamiento de macrófagos con anticuerpos policlonales anti-*Nocardia*.**

La parte complementaria de nuestra investigación era dilucidar si la presencia de anticuerpos dirigidos ya sea contra antígenos específicos de *N. brasiliensis* o policlonales anti-*N. brasiliensis* HUJEG-1, pudiera alterar de algún modo la producción o cinética de las citocinas seleccionadas (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-12, IFN- $\gamma$  e IL-10); para la serie restante de experimentos se utilizó la fase logarítmica (virulenta) microbiana.

Emprendimos la realización de estos objetivos, sometiendo nuestros macrófagos a un pretratamiento *in vitro* de corta duración con anticuerpos policlonales anti-*Nocardia*. Al exponer las células fagocíticas pretratadas a dosis infectantes media y alta de nocardias, fue desconcertante advertir que, en el primer caso – dosis media – no fuimos capaces de detectar IL-10 o TNF- $\alpha$  (*Figuras 23 y 24*) en el medio de cultivo, mientras que sólo se determinaron mínimas o moderadas concentraciones de IFN- $\gamma$  (60 pg/ml a 1 y 3 horas) e IL-1 $\alpha/\beta$  (68/92 y 305/473 pg/ml a 1 y 3 horas postinfección), respectivamente (*Figuras 23 y 24*). Al incrementar la dosis infectante (a alta), TNF- $\alpha$ , IL-10 e IFN- $\gamma$  permanecieron prácticamente inalterables, es decir ausentes para fines prácticos; más sin embargo, los niveles moderados de IL-1 $\alpha/\beta$ , se habían convertido ahora en mínimos para las dos isoformas – 135 y 89 pg/ml a las 3 horas postinfección – bajo el efecto de la carga alta de nocardias.

En todos los experimentos realizados con bacterias opsonizadas con anticuerpos anti-*Nocardia*, sean estos monoclonales o policlonales, fue imposible determinar con nuestro protocolo de RT-PCR niveles considerables de ARNs mensajeros para las citocinas estudiadas – IL-12, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-10 (*Figuras 25A, 25B, 26A, 26B, 27, 28A, 28B, 29A, 29B, 30*).

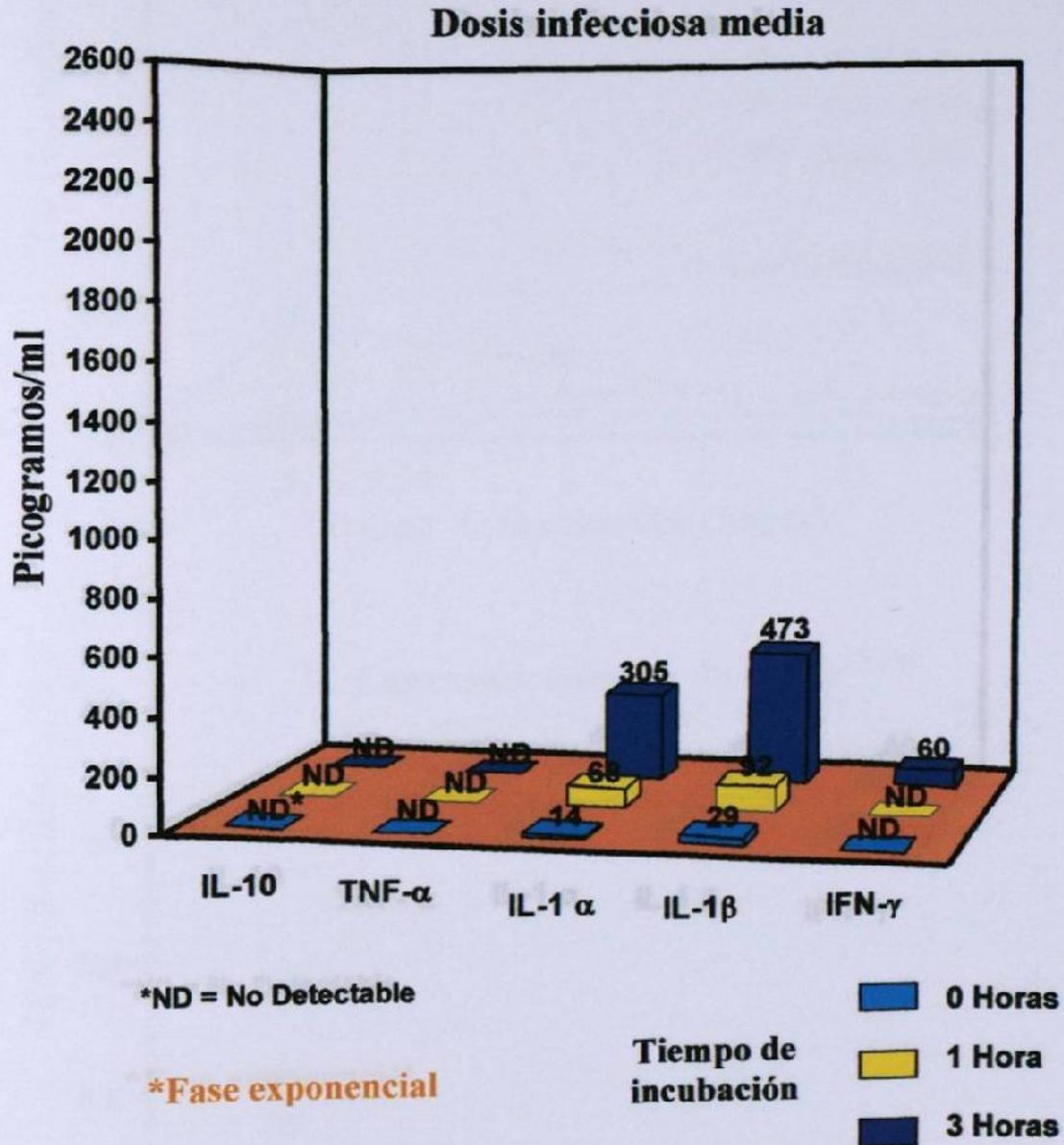


Figura 23. Producción de citocinas por M $\phi$ s peritoneales pretratados con Acs policlonales anti-*N. brasiliensis*\*.

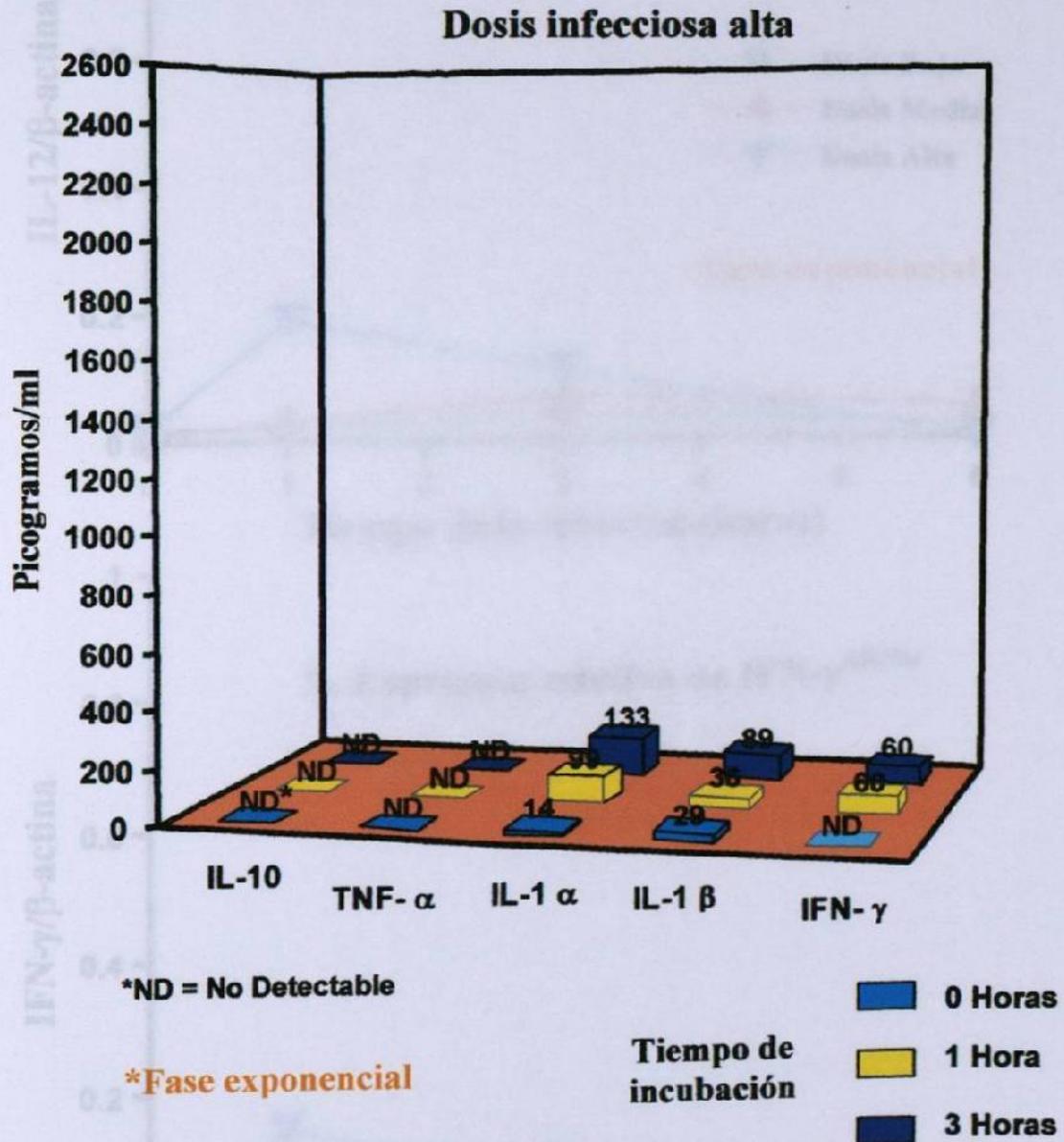


Figura 24. Producción de citocinas por M $\phi$ s peritoneales pretratados con Acs policlonales anti-*N. brasiliensis*\*.

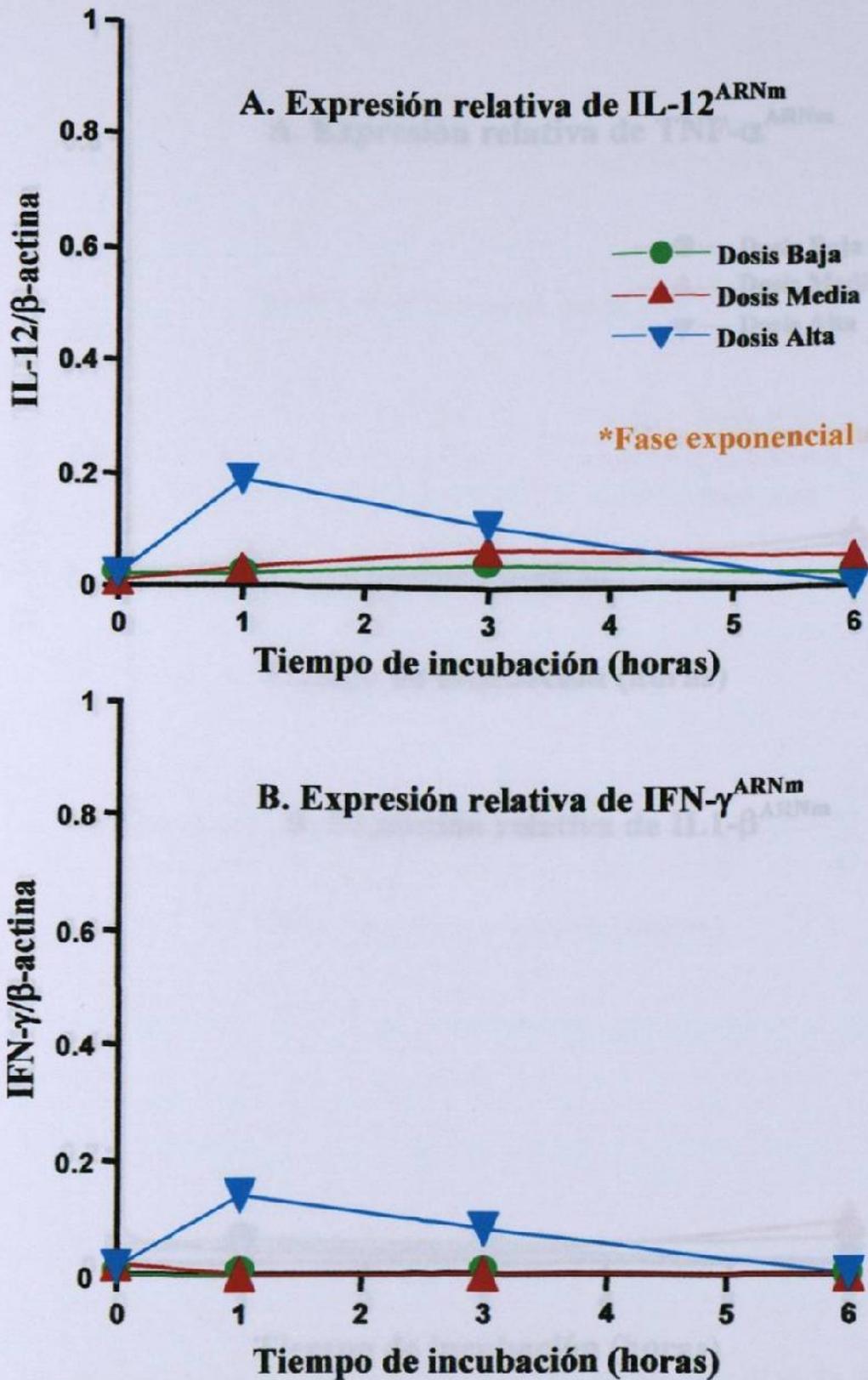


Figura 25. Transcripción de IL-12 (A) e IFN- $\gamma$  (B) en M $\phi$ s peritoneales de ratón BALB/c expuestos a *N. brasiliensis*\* opsonizada con Ac monoclonal anti-P61.

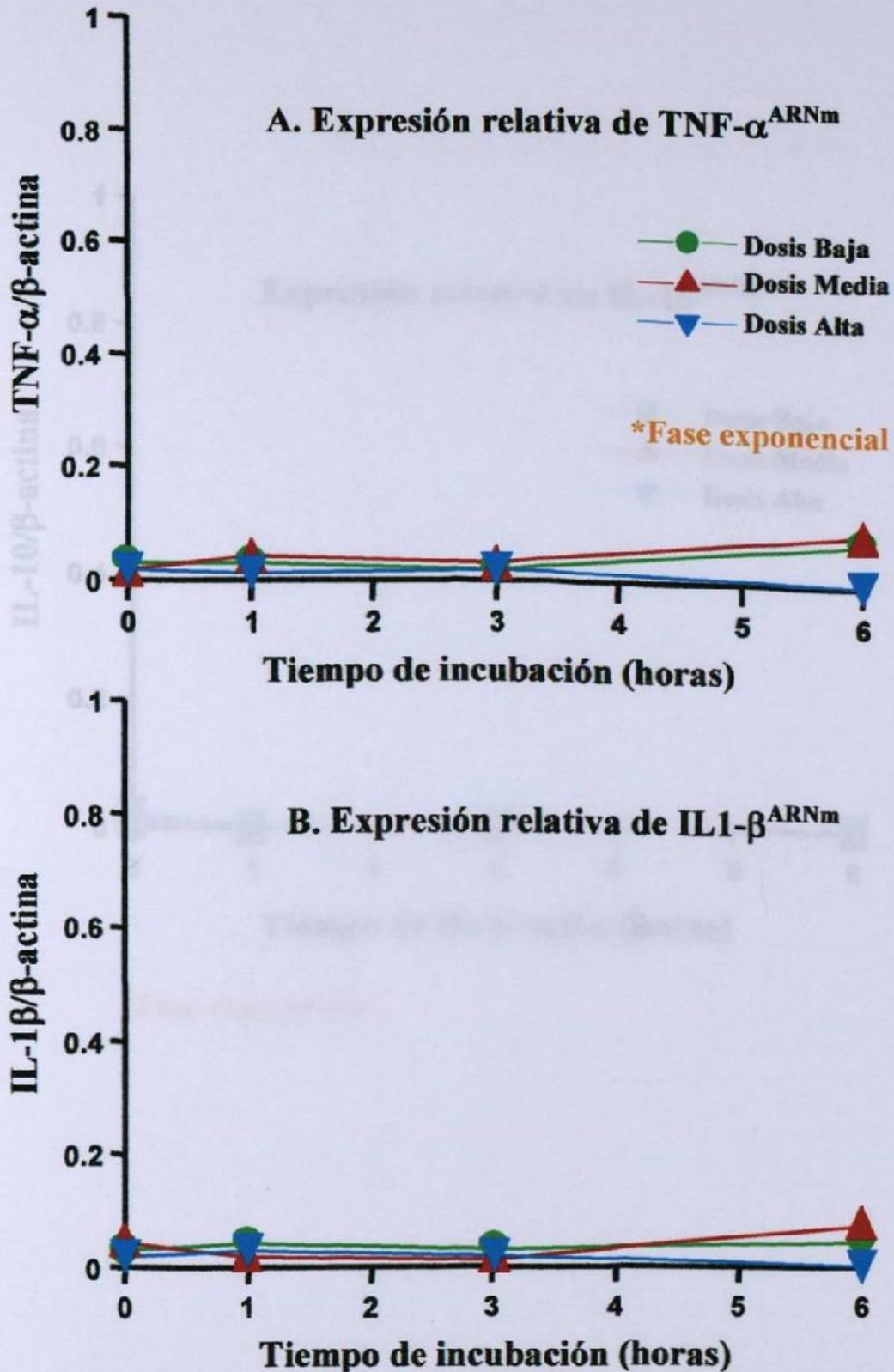
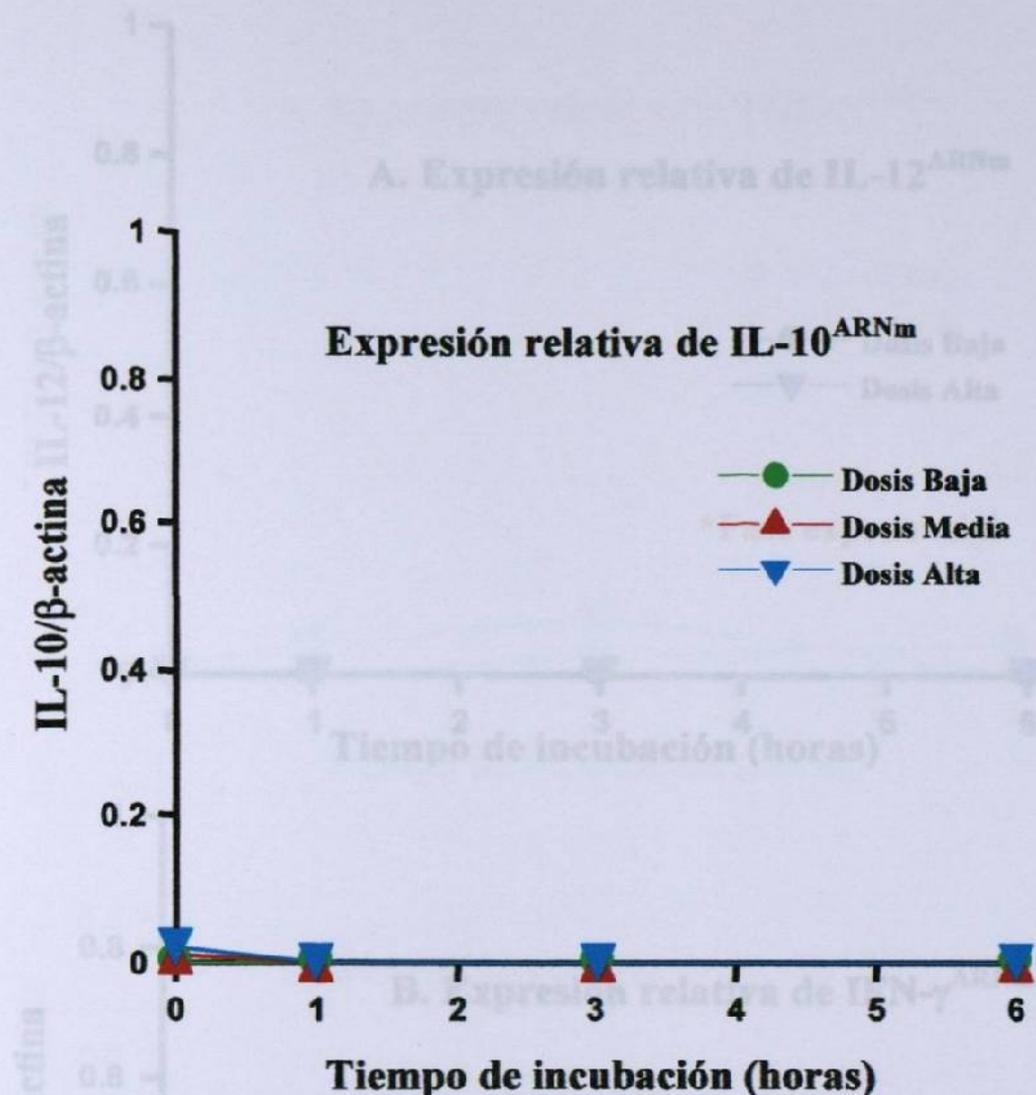


Figura 26. Transcripción de  $TNF-\alpha$  (A) e  $IL-1\beta$  (B) en Mφs peritoneales de ratón BALB/c expuestos a *N. brasiliensis*\* opsonizada con Ac monoclonal anti-P61.



\*Fase exponencial

Figura 27. Transcripción de IL-10 en M $\phi$ s peritoneales de ratón BALB/c expuestos a *N. brasiliensis*\* opsonizada con Ac monoclonal anti-P61.

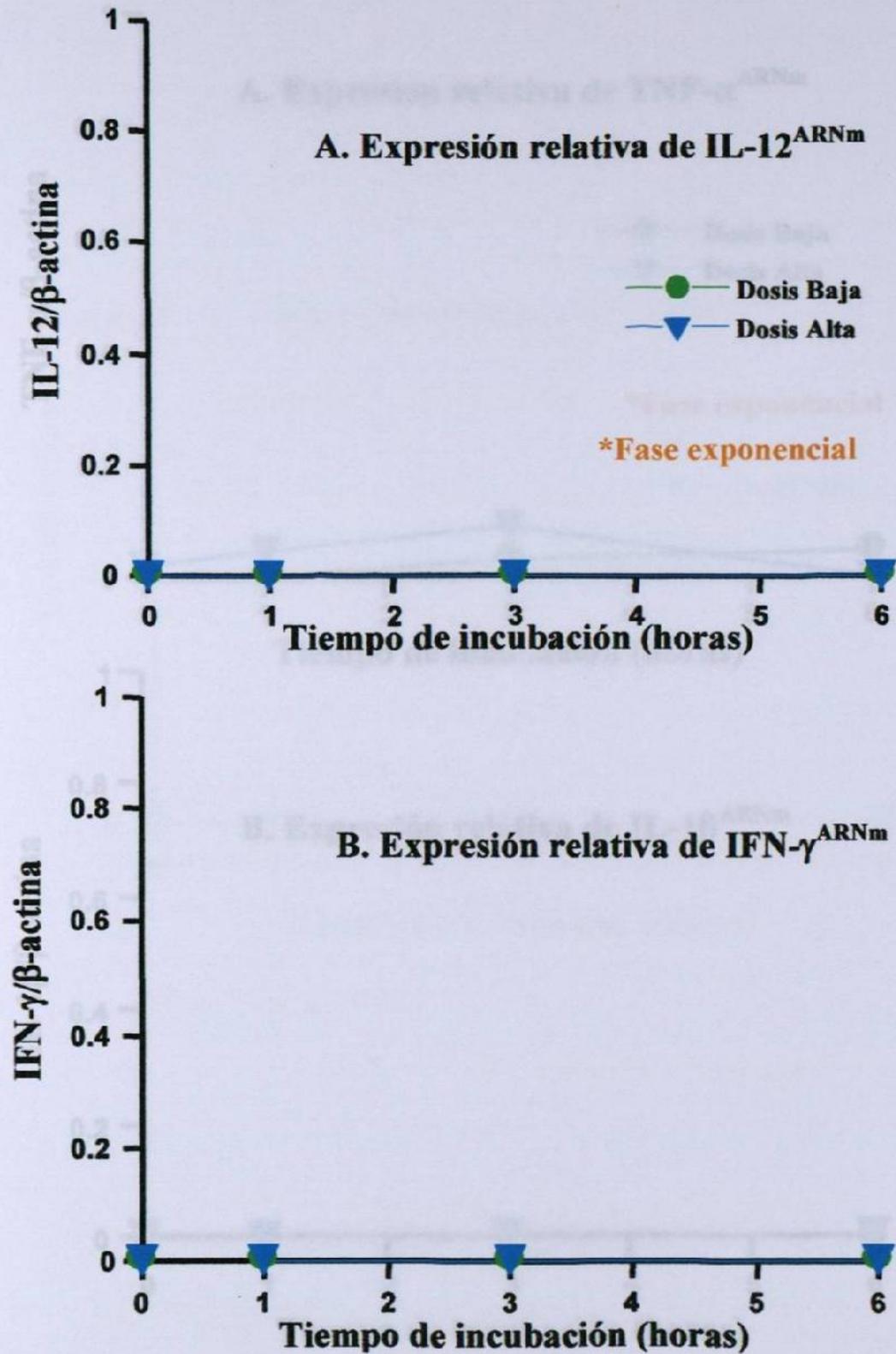


Figura 28. Transcripción de IL-12 (A) e IFN- $\gamma$  (B) en M $\phi$ s peritoneales de ratón BALB/c expuestos a *N. brasiliensis*\* opsonizada con Acs policlonales anti-*N. brasiliensis*.

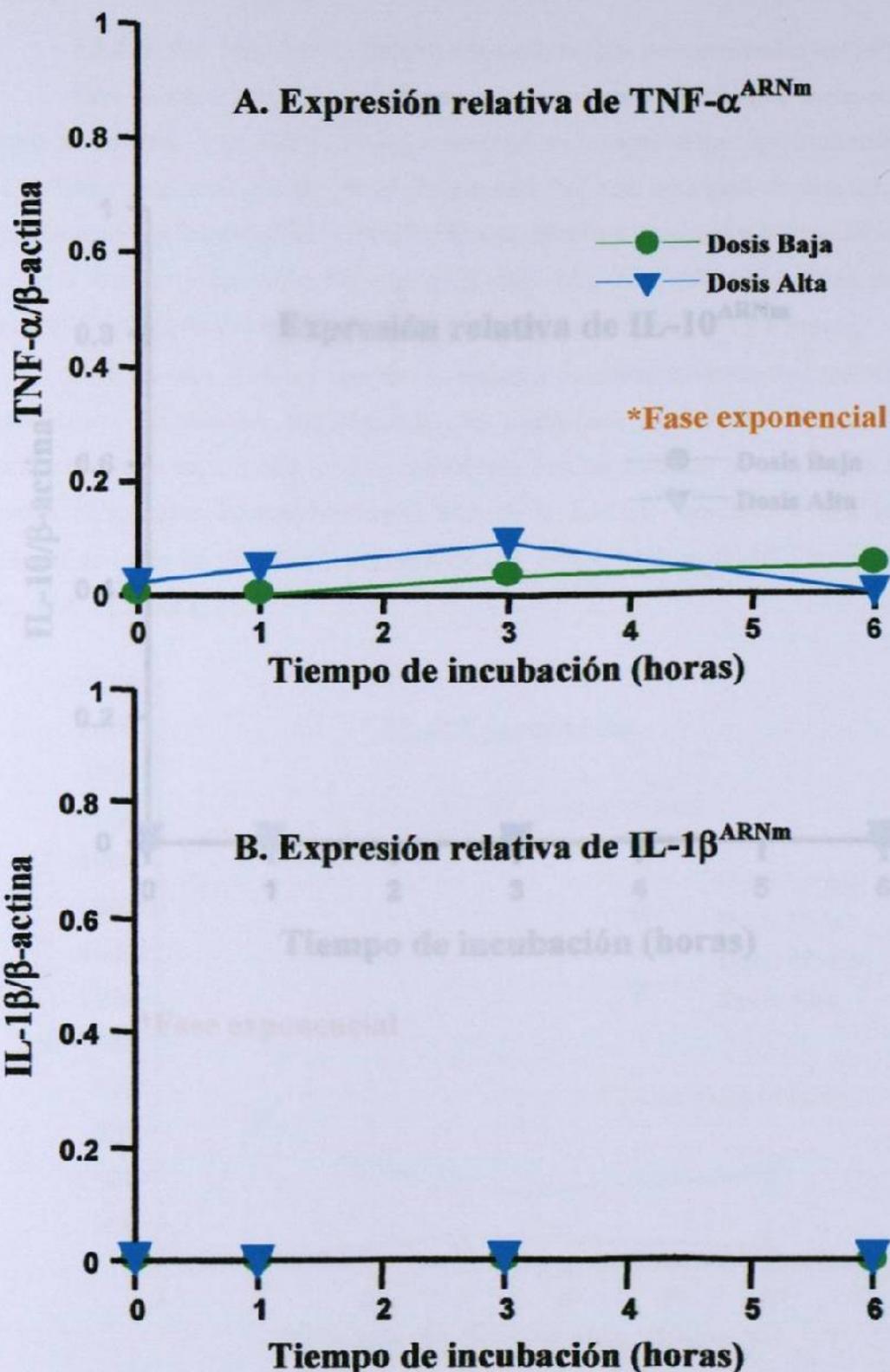
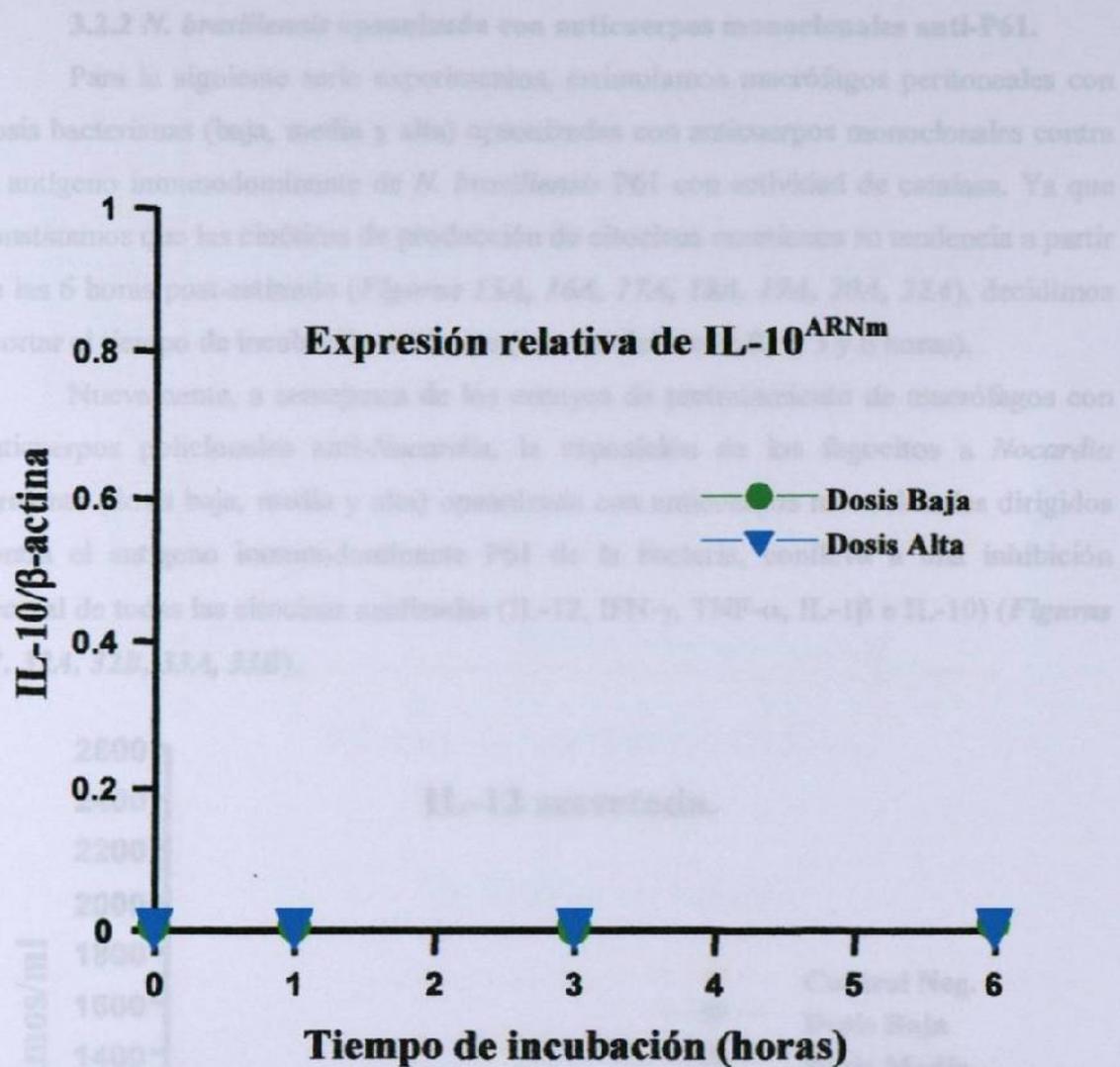


Figura 29. Transcripción de  $\text{TNF-}\alpha$  (A) e  $\text{IL-1}\beta$  (B) en M $\phi$ s peritoneales de ratón BALB/c expuestos a *N. brasiliensis*\* opsonizada con Acs policlonales anti-*N. brasiliensis*.



\*Fase exponencial

Figura 30. Transcripción de IL-10 en M $\phi$ s peritoneales de ratón BALB/c expuestos a *N. brasiliensis*\* opsonizada con Acs policlonales anti-*N. brasiliensis*.

### 3.2.2 *N. brasiliensis* opsonizada con anticuerpos monoclonales anti-P61.

Para la siguiente serie experimentos, estimulamos macrófagos peritoneales con dosis bacterianas (baja, media y alta) opsonizadas con anticuerpos monoclonales contra el antígeno inmunodominante de *N. brasiliensis* P61 con actividad de catalasa. Ya que constatamos que las cinéticas de producción de citocinas mantienen su tendencia a partir de las 6 horas post-estímulo (*Figuras 15A, 16A, 17A, 18A, 19A, 20A, 22A*), decidimos acortar el tiempo de incubación a 6 horas (con mediciones a 0, 1, 3 y 6 horas).

Nuevamente, a semejanza de los ensayos de pretratamiento de macrófagos con anticuerpos policlonales anti-*Nocardia*, la exposición de los fagocitos a *Nocardia* virulenta (dosis baja, media y alta) opsonizada con anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno inmunodominante P61 de la bacteria, conlleva a una inhibición general de todas las citocinas analizadas (IL-12, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-10) (*Figuras 31, 32A, 32B, 33A, 33B*).

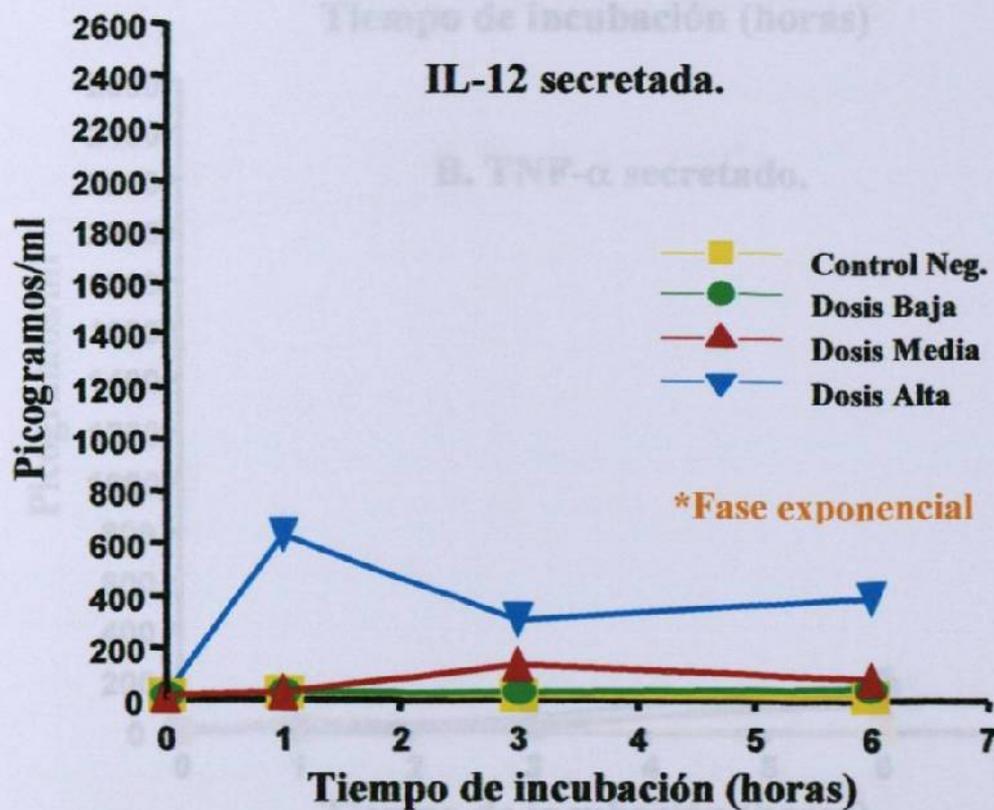


Figura 31. Secreción de IL-12 por M $\phi$ s peritoneales de ratón BALB/c expuestos a *N. brasiliensis*\* opsonizada con Ac monoclonal anti-P61.

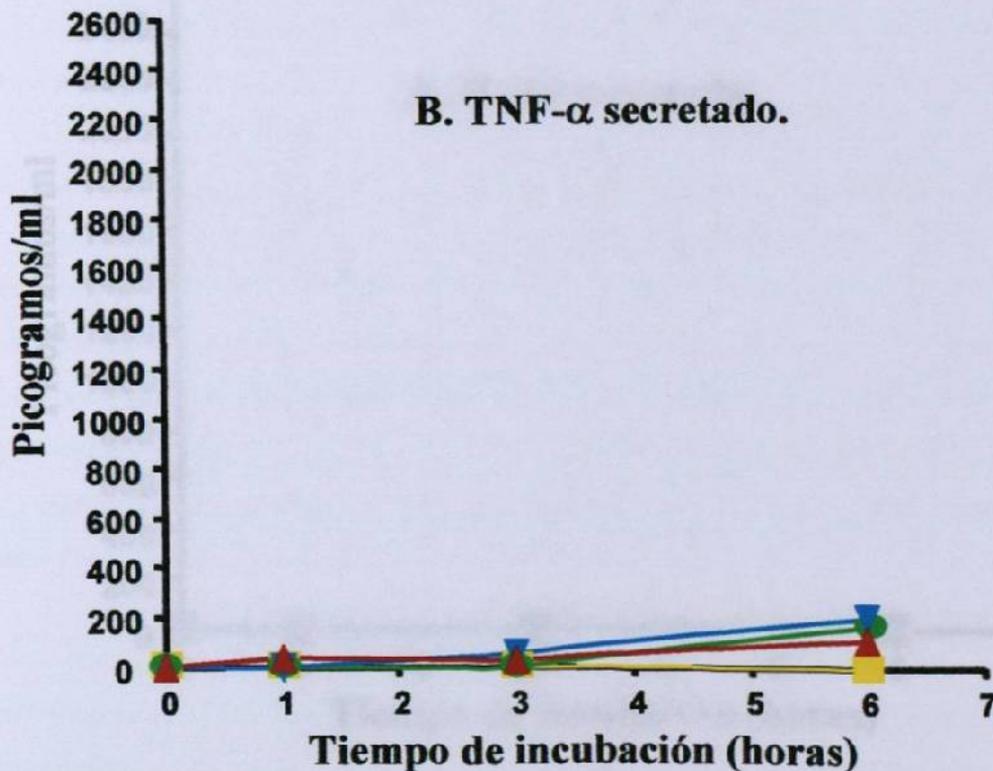
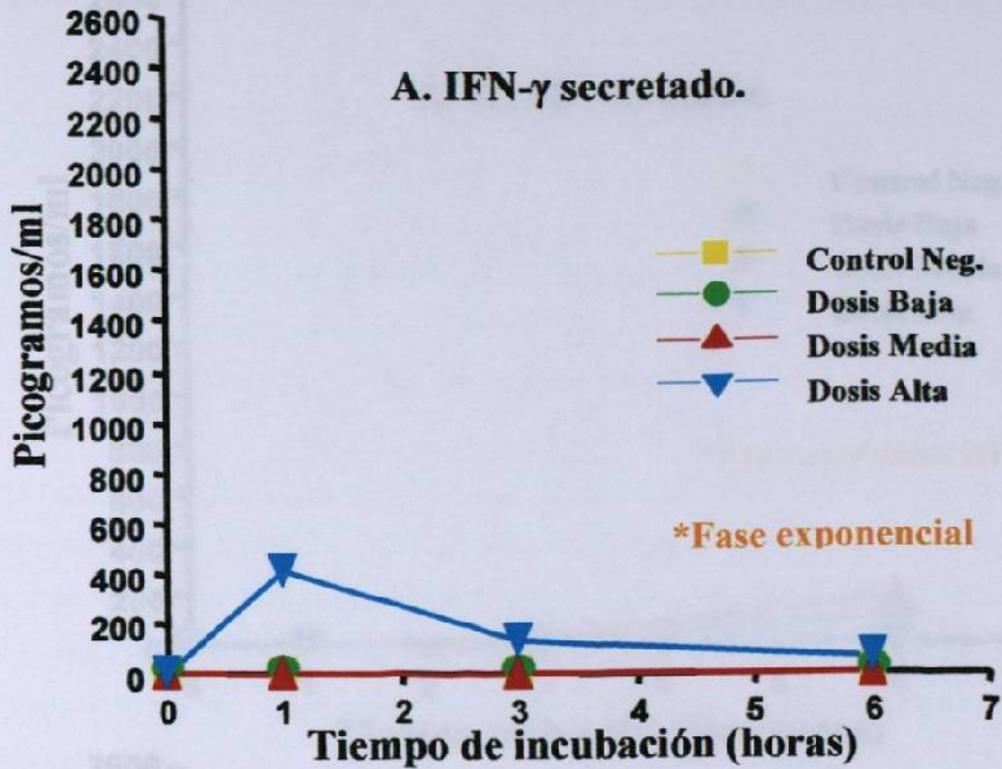


Figura 32. Secreción de IFN- $\gamma$  (A) y TNF- $\alpha$  (B) por M $\phi$ s peritoneales de ratón BALB/c expuestos a *N. brasiliensis*\* opsonizada con Ac monoclonal anti-P61.

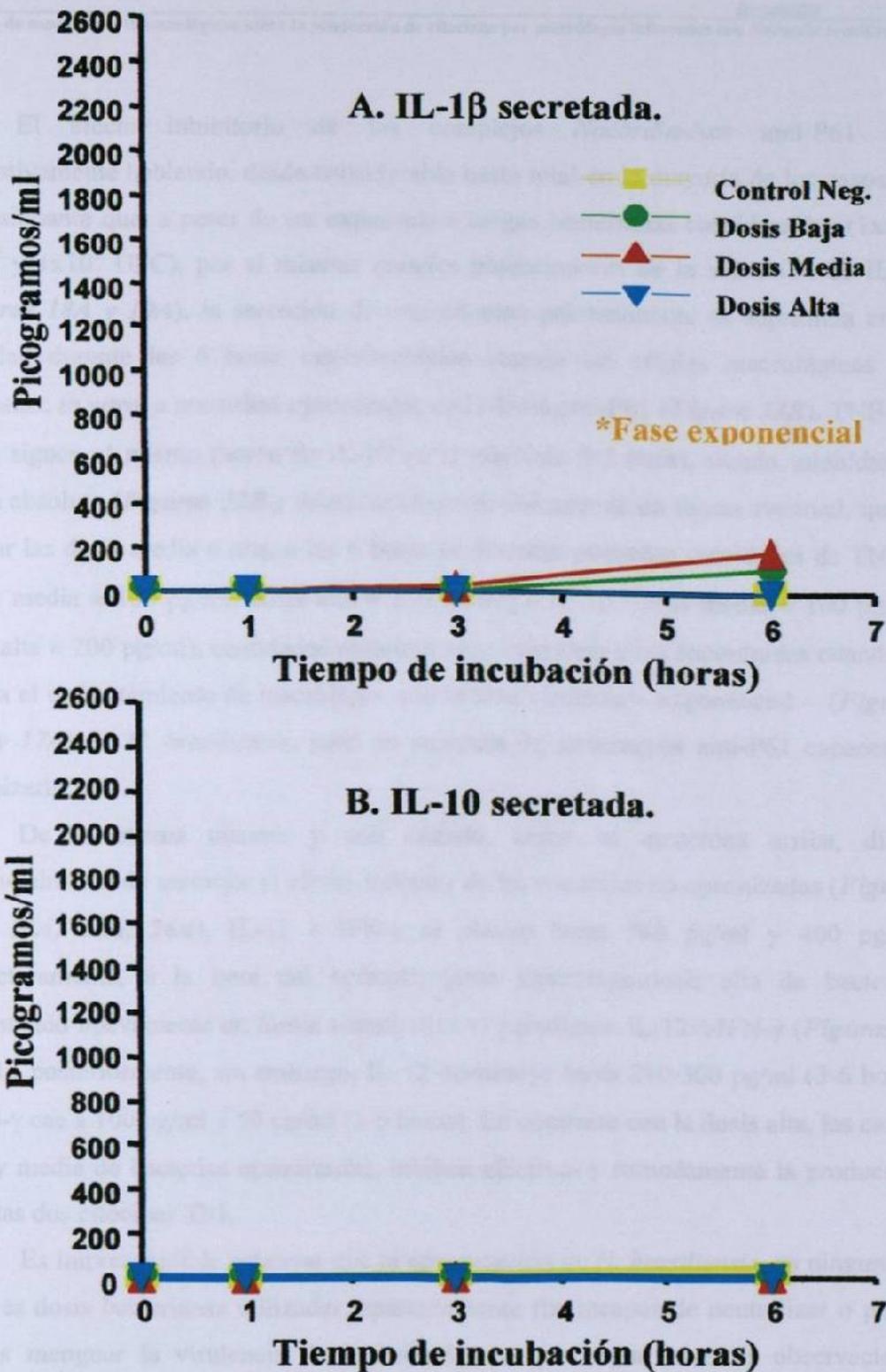


Figura 33. Secreción de IL-1 $\beta$  (A) e IL-10 (B) por M $\phi$ s peritoneales de ratón BALB/c expuestos a *N. brasiliensis*\* opsonizada con Ac monoclonal anti-P61.

El efecto inhibitorio de los complejos *Nocardia*-Acs anti-P61 fue, cualitativamente hablando, desde considerable hasta total en la mayoría de los casos. Es impresionante que, a pesar de ser expuestos a cargas bacterianas considerables ( $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$  y  $1 \times 10^9$  UFC), por sí mismas grandes potenciadoras de la secreción de IL-10 (*Figuras 18A y 19A*), la secreción de esta citocina prácticamente es suprimida en su totalidad durante las 6 horas experimentales cuando las células macrofágicas son expuestas, *in vitro*, a nocardias opsonizadas con MAbs anti-P61 (*Figura 33B*). TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  siguen el mismo patrón de IL-10 en el intervalo 0-3 horas, siendo inhibidas en forma absoluta (*Figuras 32B y 33A*); se observa, únicamente en forma eventual, que al utilizar las dosis media o alta, a las 6 horas se detectan pequeñas cantidades de TNF- $\alpha$  (dosis media  $\approx$  100 pg/ml; dosis alta  $\approx$  250 pg/ml) e IL-1 $\beta$  (dosis media  $\approx$  100 pg/ml; dosis alta  $\approx$  200 pg/ml), cantidades proteicas muy inferiores a las encontradas cuando se realiza el enfrentamiento de macrófagos con la fase virulenta – exponencial – (*Figuras 21A y 17A*) de *N. brasiliensis*, pero en ausencia de anticuerpos anti-P61 capaces de opsonizarla.

De la misma manera y aún cuando, como se menciona arriba, distan sustancialmente de asemejar el efecto inductor de las nocardias no opsonizadas (*Figuras 13A, 14A, 15A, 26A*), IL-12 e IFN- $\gamma$  se elevan hasta 560 pg/ml y 400 pg/ml, respectivamente, a la hora del enfrentamiento macrófago-dosis alta de bacterias, sustentando nuevamente en forma cuantitativa el paradigma IL-12 $\Rightarrow$ IFN- $\gamma$  (*Figuras 31 y 32A*); posteriormente, sin embargo, IL-12 disminuye hasta 280-300 pg/ml (3-6 horas) e IFN- $\gamma$  cae a 100 pg/ml y 50 pg/ml (3-6 horas). En contraste con la dosis alta, las cargas baja y media de bacterias opsonizadas, inhiben efectiva- y rotundamente la producción de estas dos citocinas Th1.

Es imprescindible subrayar que la opsonización de *N. brasiliensis*, en ninguna de sus tres dosis bacterianas utilizadas, aparentemente fue incapaz de neutralizar o por lo menos menguar la virulencia de la bacteria, ya que según nuestras observaciones macroscópicas, esta logró infectar y propagarse entre las células hospederas (observaciones no mostradas).

### 3.2.3 *N. brasiliensis* opsonizada con anticuerpos policlonales anti-*Nocardia*.

Debido a los efectos contrastantes entre ellas, la última secuencia de ensayos se llevó a cabo con concentraciones bacterianas baja y alta opsonizadas con anticuerpos policlonales anti-*Nocardia*.

Es impresionante la observación que la producción macrofágica de IL-12 (*Figura 34A*), IFN- $\gamma$  (*Figura 34B*), IL-1 $\beta$  (*Figura 35B*) e IL-10 (*Figura 36*) es abolida totalmente al utilizar como estímulo cargas bajas o altas de nocardias (fase exponencial) opsonizadas con anticuerpos policlonales anti-*N. brasiliensis*. La única ligera excepción fue el efecto de la carga bacilar alta sobre la cinética de producción de TNF- $\alpha$  (*Figura 35A*), la cual sí fue detectada en el intervalo 3-6 horas (160-370 pg/ml, respectivamente), pero aún en cantidades significativamente inferiores a las encontradas a los mismos tiempos en cultivos celulares tratados con iguales concentraciones del microorganismo en fase de crecimiento exponencial.

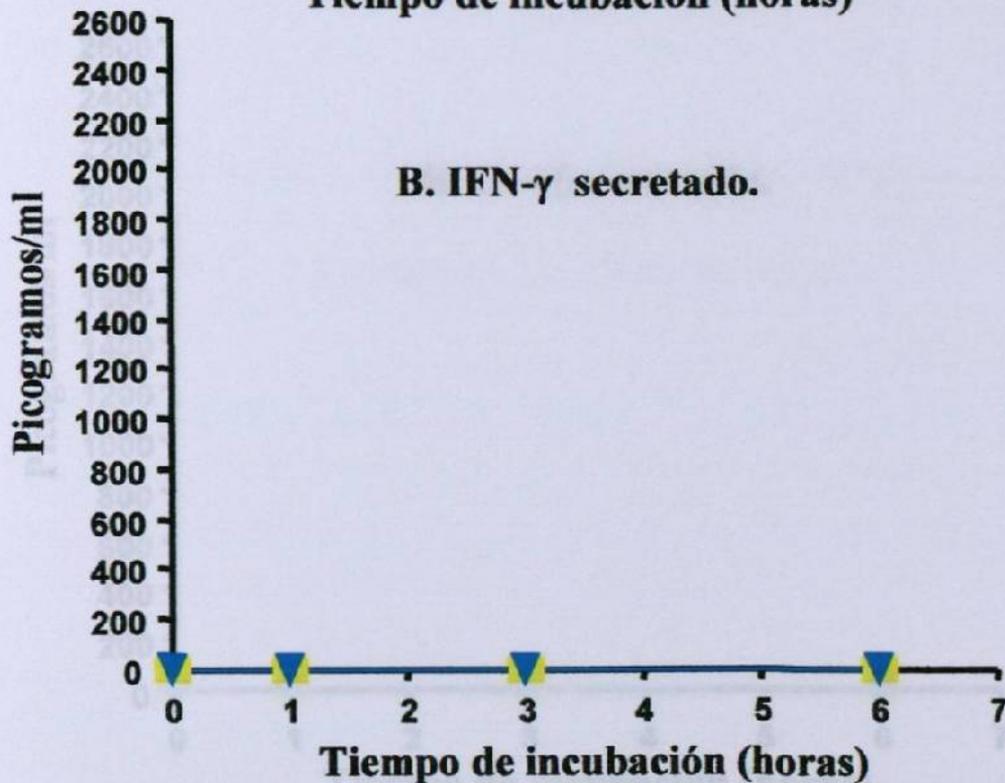
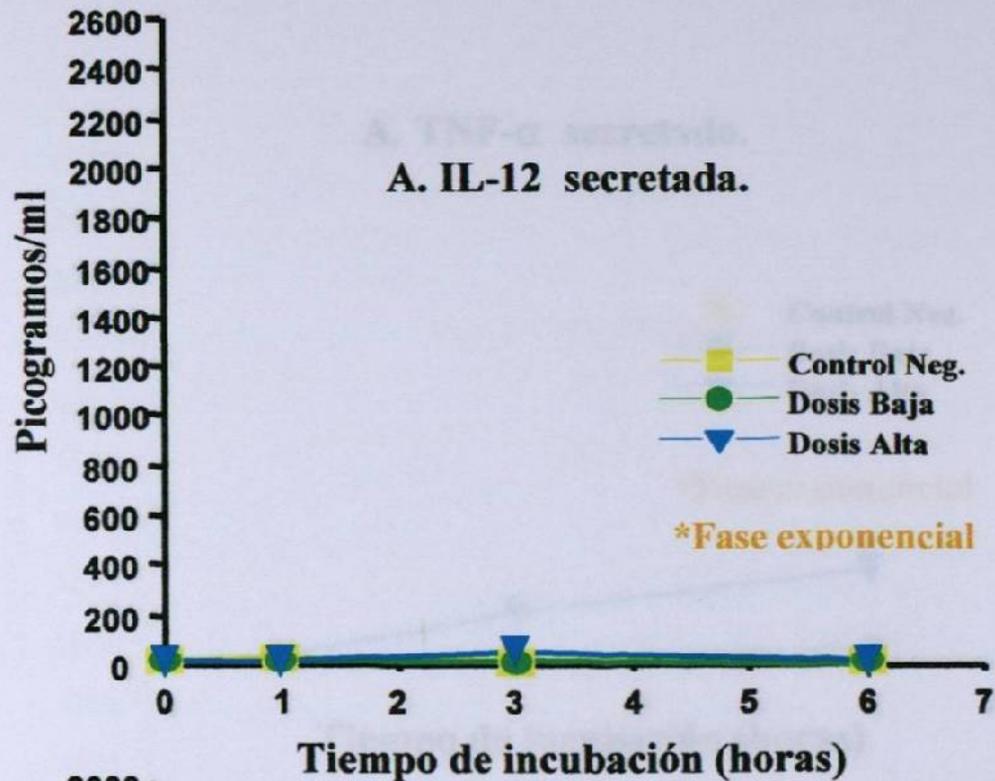


Figura 34. Secreción de IL-12 (A) e IFN- $\gamma$  (B) por M $\phi$ s peritoneales de ratón BALB/c expuestos a *N. brasiliensis*\* opsonizada con Acs policlonales anti-*N. brasiliensis*.

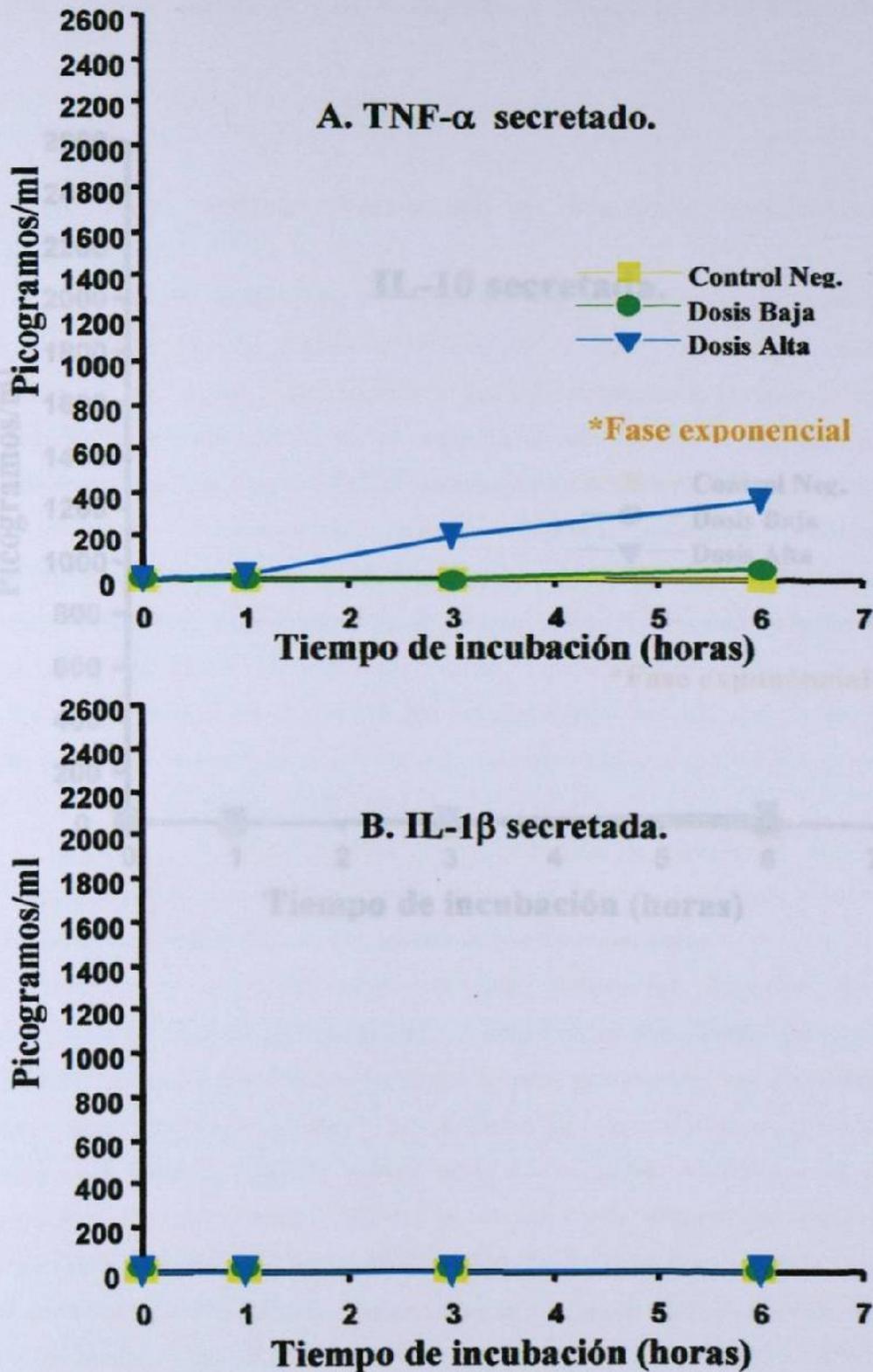


Figura 35. Secreción de TNF- $\alpha$  (A) e IL1- $\beta$  (B) por M $\phi$ s peritoneales de ratón BALB/c expuestos a *N. brasiliensis* opsonizada con Acs policlonales anti-*N. brasiliensis*.

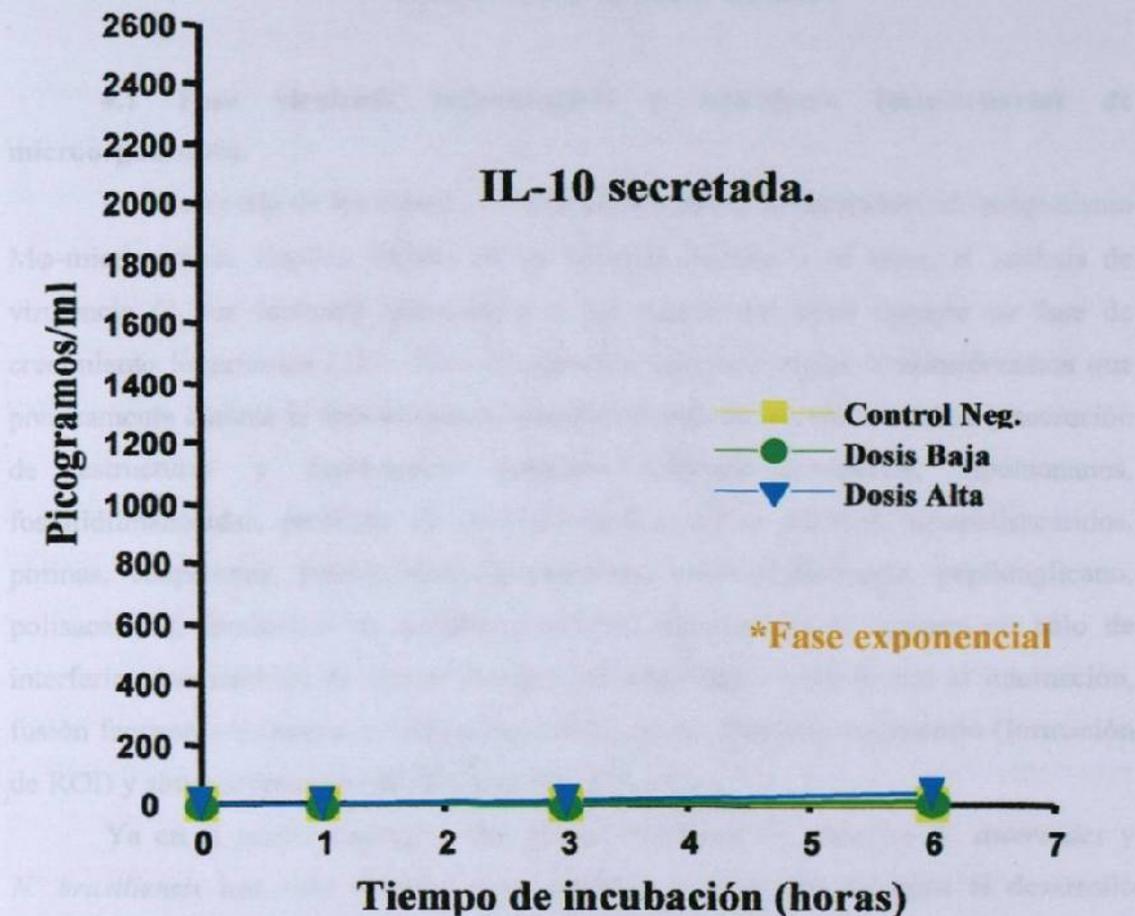


Figura 36. Secreción de IL-10 por M $\phi$ s peritoneales de ratón BALB/c expuestos a *N. brasiliensis*\* opsonizada con Acs policlonales anti-*N. brasiliensis*.

## CAPÍTULO 4. DISCUSIÓN

### 4.1 Fase virulenta (exponencial) y avirulenta (estacionaria) de microorganismos.

En la mayoría de los casos, y *N. brasiliensis* no es la excepción, el antagonismo Mφ-microparásito implica, tratase de un enfoque *in vivo* o *in vitro*, el análisis de virulencia (o sus factores) inherente(s) a los microorganismos durante su fase de crecimiento logarítmica (153). Esta constatación adquiere lógica si consideramos que precisamente durante la fase de crecimiento logarítmica se acelera la síntesis y secreción de estructuras y compuestos químicos (lipoarabinomananos, lipomananos, fosfatidilmanosidas, proteínas de choque térmico, ácidos teioicos, lipopolisacáridos, porinas, chaperones, lipopéptidos, lipoproteínas, muramil-dipéptido, péptidoglicano, polisacáridos, dimicolato de trehalosa, toxinas, superantígenos) capaces no sólo de interferir, sino también de alterar eventos del macrófago como lo son la internación, fusión fagosoma-lisosoma, acidificación del fagosoma, estallido respiratorio (formación de ROI) y síntesis/secreción de citocinas (44, 111-113).

Ya en el marco específico del género *Nocardia*, las especies *N. asteroides* y *N. brasiliensis* han sido elegidas como objetos de investigación para el desarrollo experimental de la tríada *fase de crecimiento-estructura-virulencia*.

Beaman *et al.* (134) establecen que, durante su transición de fases lag→log→estacionaria, *N. asteroides* 14759 sufre modificaciones complejas específicas en péptidoglicanos, lípidos, azúcares, ácidos grasos, peptidoglucanos y lipoproteínas. Posteriormente, Beaman y Maslan (131) constatan no sólo que la fase exponencial de *N. asteroides* GUH-2 acumula mayor masa en su pared celular que el estadio estacionario, sino que también la primera es 130 veces más virulenta que la segunda en ratones suizos Webster. En cooperación con Moring, Beaman sugiere que la virulencia de *N. asteroides* GUH-2P en fase log hacia ratones de la cepa BALB/c podría asociarse con la presencia de una mayor cantidad de ácido micólico C<sub>54:3</sub> sobre su pared celular (133).

En otro plano, células macrofágicas primarias e inmortales son infectadas por Beaman *et al.* con *N. asteroides* GUH-2 en sus dos fases – log y estacionaria. Así, los macrófagos alveolares vírgenes de conejo son susceptibles a ambas fases de crecimiento,

más sin embargo la fase filamentosa (log) muestra una mayor multiplicación; por otro lado, los macrófagos provenientes de conejos inmunizados (Mφs preactivados) inhiben el crecimiento de la fase cocobacilar (estacionaria), pero siguen siendo permisivos a la contraparte en etapa log (181). De igual manera, el crecimiento intracelular de GUH-2 en fase estacionaria en las líneas macrofágicas derivadas de monocitos J774A.1 y P388D1, disminuye a la mitad del observado para la fase logarítmica.

Salinas *et al.* se refieren a la infecciosidad exclusiva de la fase exponencial de la cepa de *N. brasiliensis* (ATCC 700358) para desarrollar un modelo de micetoma experimental en ratones BALB/c. Más aún, estos investigadores dilucidan actualmente si existe un vínculo efecto-causa entre el grado de virulencia de la forma filamentosa de *N. brasiliensis* y la expresión relativa de ciertos tipos de enzimas (proteasa, SOD, catalasa) y ácidos micólicos en la nocardia, así como la secreción de citocinas (proinflamatorias, Th1 y Th2) por el hospedero *in vivo*.

Silva *et al.* (183) observan que ni siquiera la forma coco-bacilar (fase de crecimiento estacionaria) de *N. brasiliensis* logra ser eliminada *in vitro* completamente por macrófagos peritoneales activados. Por otra parte, Beaman *et al.* (184) evidenciaron que la exposición *in vitro* de monocitos o macrófagos a *N. asteroides* en presencia de las combinaciones IFN- $\gamma$  + LPS o TNF- $\alpha$  + LPS, resulta sólo en la inhibición del crecimiento de nocardias, sin ser destruidas por completo. Además, aunque fagocitos preactivados por un corto tiempo con estos compuestos destruyeron a *Coccidioides immitis* y *Toxoplasma gondii*, estas células no mostraron igual actividad microbicida contra *N. asteroides*; más aún, la preincubación de las células fagocíticas con estos compuestos durante 24 horas causó un aumento del crecimiento intracelular de nocardias.

#### 4.2 Efectos de la dosis bacteriana.

La dosis infectante es uno de los parámetros que modelan el tipo de inmunidad (celular, humoral o mixta) durante los procesos infecciosos, y el análisis de su repercusión en animales y *ex-vivo* reverbera una dialéctica de cambios cuantitativos graduales seguidos por drásticos saltos cualitativos de la variable biológica sometida a escrutinio [llámese esta secreción de citocinas, fusión celular, formación de células gigantes multinucleadas (CGMs), etc.] bajo condiciones determinadas y controladas.

Sin embargo, la complejidad deriva del hecho que el punto exacto de transición cuantitativo-cualitativo de nuestra variable bajo análisis en nuestro sistema concreto microparásito-huésped es, casi siempre, desconocido o difícil de predecir; más aún, la permutación cantidad-calidad, así como si misma existencia, puede ser predeterminada no sólo por la carga bacteriana aplicada, sino también modificada cardinalmente por la viabilidad o no del microorganismo e, importantemente, por el despliegue dinámico (no pasivo) de estrategias microbianas de virulencia.

McHugh *et al.* (157) y Demuth *et al.* (40) demuestran que, en macrófagos de ratón infectados con diferentes concentraciones de *L. pneumophila* ( $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$  UFC) y *L. monocytogenes* ( $5 \times 10^6$  y  $5 \times 10^7$  UFC), se lleva a cabo la transcripción temprana de los genes codificadores de las citocinas IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$ , así como su posterior traducción y secreción proteica; además, ambos procesos (transcripción y traducción) son directamente proporcionales al estímulo (dosis bacteriana) aplicada.

Otros fenómenos biológicos, como la formación de células gigantes multinucleadas por monocitos fusionados, así como la presentación antígeno-específica a células T por macrófagos, pueden ser vinculados también en forma directa a la carga bacteriana. Así, Gasser y Most (185) describen que el porcentaje de la fusión de monocitos por BCG como medida de la formación de CGMs, se eleva proporcionalmente al incrementar la relación BCG/M $\phi$  - al menos dentro del intervalo 0-1.2. En otro estudio, Ramachanda *et al.* (186) utilizan tres índices de infección (1:1, 10:1 y 100:1) de *M. tuberculosis* en macrófagos para evidenciar que el procesamiento y presentación del antígeno específico Ag 85B a sus células T cognatas, aumenta a medida que se acrecenta la dosis bacteriana.

#### 4.3 Tiempos cortos de experimentación.

Las células macrofágicas poseen una gran diversidad de receptores de membrana (TLRs, receptor de manosa, CR1, CR2, CR3, CR4, etc.) que les permite determinar (discriminar) la procedencia microbiana (Patrones Moleculares Asociados a Patógenos) que enfrenta (27, 187, 188). Es así como, con impresionante prontitud, el establecimiento de la identidad antigénica hostil conlleva a la secreción de una batería de citocinas que refuerzan y regulan no sólo las funciones fagocítica y microbicida del

macrófago, sino que también trascienden al instruir la naturaleza de la respuesta inmune innata y adoptiva (10, 11, 189).

En principio, no podíamos afirmar si lo descrito arriba podría ser legítimo para nuestro sistema macrófagos-*N. brasiliensis* (dosis de 10, 100 y 1000 UFC de la cepa HUJEG-1 ATCC 700358) y en las condiciones experimentales concretas (medio de cultivo celular libre de suero), ya que la exploración de la literatura revela que en rigor es casi imposible encontrar dos estudios, sean *in vitro* ó *in vivo*, completamente equiparables en cuanto a sus múltiples parámetros experimentales. En relación a esto último, y sin temer a ser iterativos, es ineludible enfatizar el hecho que no encontramos ningún estudio, en al menos 800 artículos científicos revisados, con parámetros experimentales equiparables a los nuestros. Confrontar los efectos de las dosis media (100 nocardias) y alta (1000 nocardias) con la literatura existente, resulta ser francamente complicado debido en primer lugar a que son escasos las investigaciones *in vitro* que utilicen tales cargas bacterianas para estudiar no sólo la transcripción del gen para IL-12 y su posterior traducción proteica, sino en general la expresión de citocinas por Mφs residentes y bajo condiciones al menos equiparables a las nuestras.

Nuestro trabajo se centró en el análisis de la forma en que inciden parámetros de *N. brasiliensis* – fase de crecimiento y dosis bacteriana – así como del macroorganismo – presencia de anticuerpos anti-*Nocardia* – sobre el patrón y cinética de citocinas macrofágicas proinflamatorias (IL-1 y TNF- $\alpha$ ), tipo Th1 (IL12 e IFN- $\gamma$ ) y tipo Th2/reguladora (IL-10), así como de sus respectivos ARNs mensajeros.

En general observamos una correspondencia adecuada entre las concentraciones de citocinas liberadas por macrófagos al medio de cultivo y los niveles relativos expresados de ARN mensajeros específicos para las citocinas analizadas. Sin embargo, es evidente que la relación ARNm – proteína se torna más complicada debido a que en ciertos casos no fuimos capaces de detectar productos amplificados o detectamos mínimos niveles de amplificación utilizando los primers específicos, aún cuando sí determinamos concentraciones elevadas de las respectivas proteínas secretadas, por lo cual inferimos que en estas situaciones pudiesen estar involucrados mecanismos de regulación a nivel de post-transcripción, traducción y/o secreción proteica extracelular.

La exploración y confrontación de las cinéticas de citocinas para las fases de crecimiento estacionaria y exponencial evidencian principalmente contrastes entre ellas, aunque también algunas similitudes.

La primer semejanza entre ambas fases de crecimiento es que una dosis infecciosa baja (10 nocardias/macrófago) es, a excepción de los casos especiales de IL-1 $\beta$  e IL-10, un pobre inductor de citocinas (IL-12, IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ ). La fase estacionaria de nocardias se caracteriza por una mayor susceptibilidad a los efectos microbicidas intracelulares de macrófagos y menor capacidad de multiplicación, pero es también poseedora de un marcado carácter inerte a ser degradada quizás debido a la composición química de su pared celular. En contraste, la fase exponencial es una estructura más dinámica, diversa y abierta con el objetivo de proliferar rápidamente; esta apertura y diversidad temporal rompe sólo parcialmente aquel carácter "inerte" que le confiere la propiedad de inhibir en forma "pasiva" la producción de citocinas, mostrándose como un mejor inductor, en comparación con la misma dosis (baja) en fase estacionaria, pero aún lejos de la efectividad de la dosis media y alta.

La segunda similitud entre las dos fases de crecimiento de *Nocardia* está relacionada a la producción de IL-1 $\beta$ . Ambos estadios de la bacteria inducen concentraciones significativas de IL-1 $\beta$  en el intervalo 6-12 horas postinfección, aún tratándose de la dosis infecciosa baja (10 bacterias/macrófago).

Ya hemos subrayado la capacidad inherente de *N. brasiliensis* en algunos casos para inhibir/limitar la producción de citocinas macrofágicas *in vitro*, ya que es indispensable la aplicación de 100 y 1000 veces mayores cantidades de bacterias para alcanzar concentraciones significativas de citocinas; sin embargo, en algunos casos es claro que aún cumpliendo esta condición de concentración bacteriana, los niveles de citocinas secretados son, en el mejor de los casos, moderados.

Es por demás interesante el hecho que la dosis baja de nocardias (10 UFC/M $\phi$ ) utilizada por nosotros para enfrentar a los macrófagos, coincide con la dosis infecciosa aplicada *in vivo* a ratones BALB/c en nuestro laboratorio para desarrollar el modelo de micetoma experimental. Es precisamente esta dosis, más no la media (100 UFC/M $\phi$ ) ni la alta (1000 UFC/M $\phi$ ), la que se caracteriza por su imposibilidad para inducir la producción de IL-12, IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ ; las excepciones son IL-10 e IL-1 $\beta$ .

Únicamente el estadio exponencial de nocardias es capaz de inducir la producción de IL-10 en forma inversamente proporcional a la dosis; así, la dosis baja causa una mayor producción sostenida de esta citocina, en comparación a las dosis media y alta. En contraparte, la fase estacionaria en dosis baja genera un comportamiento directamente proporcional a la dosis en el intervalo 1-3 horas, siendo la dosis alta el mayor estímulo durante todo el intervalo experimental (1-12 horas).

#### 4.4 IL-12 e IFN- $\gamma$

La determinación de los niveles proteicos de IL-12 se ven complicados, porque los investigadores miden ya sea la presencia física de las moléculas (trátase del heterodímero, p70, o de sus monómeros p40 y/o p35, por separado) o de las molécula biológicamente activa (p70), como fue nuestro caso. Curiosamente, Matsunaga *et al.* (156) reportan la concentración final detectada *in vitro* por ELISA de IL-12 como la sumatoria de IL-12p40 + IL-12p70, sin especificar si se trata o no del heterodímero bioactivo.

IL-12 no sólo es capaz de inducir su propia producción y la de IFN- $\gamma$ , sino que juntas sinergizan este efecto, al mismo tiempo que potencian la liberación de citocinas proinflamatorias (como IL-1 y TNF- $\alpha$ ), provocando la activación de macrófagos y la expresión de moléculas de coestimulación, adhesión intercelular y del Complejo Mayor de Histocompatibilidad de Clase II sobre endotelio y leucocitos.

No obstante que el IFN- $\gamma$  se caracteriza por inducir en macrófagos actividades microbicidas no provistas por los interferones tipo I ( $\alpha$ ,  $\beta$ ), la efectividad antimicrobiana del interferón inmune en humanos es, paradójicamente, insuficiente. Una explicación parcial a la imposibilidad de activación microbicida de macrófagos tratados con IFN- $\gamma$ , podría ser la observación realizada por Ting *et al.* (197), quienes encontraron que *M. tuberculosis* bloquea la respuesta macrofágica al IFN- $\gamma$  vía unión directa de componentes de la pared celular micobacteriana al factor de transcripción nuclear CBP/p300, secuestrándolo de esta manera y evitando su interacción con STAT-1, impidiendo la transcripción posterior. Curiosamente, la presencia de IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$  ha sido asociada con el deterioro de la respuesta contra *M. tuberculosis in vitro* e *in vivo* (198).

Salinas *et al.* (182) detectaron niveles séricos considerables (>4000 pg/ml) de IFN- $\gamma$  en ratones BALB/c infectados con *N. brasiliensis* HUJEG-1 a las 24 horas post-inoculación, indicando que su producción ocurre temprano en la infección, aún antes de evidenciarse una respuesta inmune específica de anticuerpos anti-*Nocardia* (7 días). Por su parte, Ellis *et al.* (199) determinaron la presencia intracelular de IFN- $\gamma$  en neutrófilos infiltrados en pulmones de ratones C57BL/6 infectados con *N. asteroides* GUH-2.

Nuestro estudio revela la ausencia casi total de IL-12 e IFN- $\gamma$  en presencia de la dosis infecciosa baja de nocardias, lo cual puede estar asociado a una ineficiente activación de macrófagos y, consecuentemente, contribuir así al establecimiento de la infección, favoreciendo la supervivencia y multiplicación bacteriana. Creemos que la secreción elevada de estas dos citocinas tipo Th1 en respuesta a las dosis media y alta – 10 y 100 veces mayor concentración bacteriana que la dosis baja – podría ser indicativo de que, al multiplicarse y aumentar su carga bacteriana, *N. brasiliensis* en forma exitosa, ahora sí destaca la secreción cuantiosa de IL-12 e IFN- $\gamma$  que activan a macrófagos. A pesar de que la nueva presencia significativa de IL-12 e IFN- $\gamma$  no logre causar la erradicación completa de las nocardias establecidas al inicio de la infección, sí contribuiría sin embargo, a una contención parcial y temporal del microorganismo a través de la restructuración de granulomas.

En condiciones *in vitro* semejantes a las nuestras, M $\phi$ s derivados de monocitos estimulados con una relación 1M $\phi$ :1 micobacteria (*M. tuberculosis* H37Rv; ATCC 27294) no secretan niveles detectables de IL-12p70 a las 6 y 16 horas (190); el mismo resultado negativo para IL-12 fue obtenido en el intervalo 1-10 días utilizando como célula blanco M $\phi$ s derivados de monocitos en un relación 80 M $\phi$ s:1 bacteria (*M. tuberculosis* H37Ra y H37Rv); sin embargo, en este último estudio la relación 1M $\phi$ :5 bacterias causa, a las 24 horas, una producción de 3500 pg/ml (200). Por su parte, Host *et al.* (151), demuestran que una dosis baja (1 M $\phi$ :1 bacteria) de *Salmonella dublin* en fase log induce a M $\phi$ s de ratón BALB/c a secretar elevados niveles de IL-12p40 (>2 ng/ml), los cuales, argumentan los autores, son quizás la causa de la supresión observada sobre el heterodímero secretado (IL-12p70). La disminuida bioactividad de IL-12p70 en cultivos de M $\phi$ s tratados con la dosis baja de *Salmonella dublin* (1M $\phi$ :10 bacterias), medida a través de la habilidad del heterodímero

para estimular la producción de IFN- $\gamma$  por esplenocitos de ratón, corroboró que, no obstante la dosis de reto usada, esta bacteria fue un pobre estímulo y/o supresor para la producción de IL-12p70 biológicamente activa por M $\phi$ s peritoneales de ratón BALB/c inducidos con adyuvante incompleto de Freund (200). En fase estacionaria, una dosis de promastigotes de *Leishmania donovani* (10 promastigotes:1 M $\phi$ ) inhibe (a las 24 horas) la producción de IL-12p40/p70 por M $\phi$ s de ratón, mientras que los amastigotes en la misma relación causan niveles mayores de esta citocina (~700 pg/ml).

La neutralización física o biológica de IL-12, citocina de vital importancia para el desencadenamiento de una efectiva respuesta inmune celular contra parásitos intracelulares, ha acupado una prerrogativa de supervivencia: 1) promastigotes de *Leishmania major* (relación 8 parásitos:1 M $\phi$ ) inhiben la producción de IL-12p40 por M $\phi$ s derivadas de monocitos de ratón C57BL/6 activados, o no, previamente con IFN- $\gamma$ , aún en presencia de lipopolisacárido, el cual por sí solo es un potente inductor de IL-12p40 (201); 2) *Histoplasma capsulatum* muerta por calor suprime la secreción de IL-12p70 por monocitos humanos (relación 10 hifas: 1 M $\phi$ ) de sangre periférica preactivados con IFN- $\gamma$  (202); 3) *M. avium* (cepas 100, 101 y 104 – aisladas de pacientes con SIDA), en una relación 10 bacterias:1 M $\phi$ , suprimen la producción de IL-12p70 en ausencia o presencia de IFN- $\gamma$ ; más aún, la pre-infección micobacteriana antes de su activación con IFN- $\gamma$  evita la síntesis inducida por contacto con *L. monocytogenes* (relación 10 bacterias:1 M $\phi$ ) (203).

El estudio de Matsunaga *et al.* (156) analiza el efecto inhibitorio de varias dosis de una cepa virulenta de *Legionella pneumophila* sobre la secreción de IL-12p40/p70 por M $\phi$ s peritoneales inducidos; de las tres relaciones bacterias:M $\phi$  utilizados (1:1; 10:1 y 100:1), la más alta posee el máximo poder negativo y disminuye aprox. 5 veces la concentración de IL-12p40/p70 secretada en comparación con la relación 1:1. Por su parte, Hessle *et al.* (204) parten de la hipótesis de la existencia de patrones diferenciales definidos para microorganismos Gram negativos y Gram positivos, detectando niveles considerables de IL-12p70 secretados por monocitos *in vitro* enfrentados a cargas bacterianas de siete especies Gram negativas y siete Gram positivas en una razón 250 bacterias:1 M $\phi$  (respuesta promedio de ~1900 pg/ml para Gram positivos vs ~400 pg/ml para Gram negativos. Butcher *et al.* (50) detectan por ELISA niveles significativos (~4

ng/ml) de IL-12p40 al medir la estimulación de MDMs con BCG muerta por calor (en una relación 2500 bacterias/Mφ); dicha producción de IL-12p40 se vió inhibida, considerablemente a la mitad, por el pretratamiento de los Mφs con *Toxoplasma gondii* (en una relación 4 parásitos:1 Mφ).

Shibuya *et al.* (205) deducen que las células NK son la principal fuente temprana de IFN-γ en ratones C57BL/6-IL-10<sup>tm/Cm</sup> (knockout para IL-10), a pesar que en ningún momento del artículo se menciona acerca de la capacidad alguna por Mφs para producir esta citocina. En el mismo tenor, infecciones *in vivo* llevadas a cabo con *Bacillus abortus* (206), *Candida albicans* y *C. brucei* (207), Gram positivas y Gram negativas (7 especies de cada grupo) (208), *L. monocytogenes* (208) y *M. tuberculosis* (209) se basan en el análisis *ex-vivo* de tejidos o fracciones tisulares con alto grado de heterogeneidad celular como lo son células mononucleares de sangre periférica, bazo, y combinaciones mixtas de Mφs con linfocitos T, con el fin de inferir el origen del IFN-γ secretado al medio de cultivo. En todos los casos, el análisis de los diseños experimentales e idea integral expuesta en el texto introductorio y discusión, vislumbra una tácita, aunque no siempre directa, aseveración que involucra exclusivamente a células NK y T (CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup>) en la producción de IFN-γ, el cual ahora sí actúa sobre las células macrofágicas.

Mφs alveolares (de ratones C57BL/6), infectados con BCG (0.5x10<sup>6</sup> UFC por vía intra-traqueal) y estimulados posteriormente *ex-vivo* con PPD o LPS, producen cantidades considerables de interferón gamma, no así el caso de Mφs pleurales aislados de ratones knockout para IL-12 (IL-12<sup>-/-</sup>) con el mismo fondo genético (209). En este estudio, en ausencia de IL-12, una cepa atenuada de *M. bovis* (relación 50 micobacterias:1 Mφ) fue incapaz de inducir la secreción de IFN-γ por Mφs alveolares vírgenes (de la cepa C57BL/6). Munder *et al.* (210) demostraron que el IFN-γ endógeno producido por Mφs derivados de médula ósea (cepa de ratón AKR/N) tratados con una combinación de IL-12 e IL-18, posee actividad biológica al ser capaz de inducir, en forma autócrina, la actividad de iNOS. Salins *et al.* (211), por su parte, observaron una correlación entre la multiplicación intracelular de *L. pneumophila* en Mφs inducidos (con tioglicolato), y la expresión de IFN-γ<sup>ARNm</sup> y su posterior traducción a proteína.

No obstante que en la mayoría de las infecciones causadas por microparásitos intracelulares la presencia de IFN- $\gamma$  se asocia a la estructuración de una respuesta inmune celular benéfica para el huésped, algunos antecedentes sustentan la hipótesis controversial que los M $\phi$ s están involucrados como efectores centrales en la inhibición de la respuesta blastogénica de células T a mitógenos y antígenos durante la infección originada por *Trypanosoma brucei* – tripanosomiasis africana (212). Este papel supresivo de M $\phi$ s, a través de la producción de IFN- $\gamma$ , es secundado por los estudios de Darji *et al.* (213), en el que muestran que células de hibridoma macrofágicas 2C11-12P infectadas con *T. brucei* (relación 100 parásitos:1M $\phi$ ) actúan en el entorno local, secretando IFN- $\gamma$  (y probablemente otros factores solubles) para inhibir las respuestas proliferativas de células T CD4<sup>+</sup> y T CD8<sup>+</sup>; simultáneamente el interferón inmune de procedencia macrofágica obra sobre células T CD8<sup>+</sup> para provocar, con la ayuda sinérgica de TNF- $\alpha$ , ahora una hiperproducción del IFN- $\gamma$  “inmunosupresor”. Por su parte, Baetselier *et al.* (10) inoculan por vía intraperitoneal *T. brucei* ( $2 \times 10^3$  parásitos) en ratones BALB/c y evidencian que durante las fases temprana y tardía de la infección *in vivo*, los M $\phi$ s inducidos adquieren un fenotipo funcional Th1, el cual se ajusta al bloqueo de la activación *ex-vivo* de células T por mitógeno, superantígeno o antígeno. Hertz *et al.* (214) contribuyen a la controversia en torno al papel del IFN- $\gamma$  en la inhibición causada durante tripanosomiasis (africana), al presentar una correlación inversa entre la producción de IFN- $\gamma$  *in vivo* en ratones infectados con *T. brucei rhodesiense* ( $1 \times 10^5$  tripanosomas/ ratón vía i.p.) y el crecimiento del parásito; sin embargo, este último grupo de investigadores subraya que la fuente primaria del IFN- $\gamma$  producido durante la respuesta inmune a los antígenos del parásito son explícitamente células T CD4<sup>+</sup>, TCR- $\alpha\beta$ , MHC-restringidas.

Valiéndose de una estrategia diferente a la de *T. cruzi*, *M. avium* viable reprime la expresión (2 horas postinfección) de IFN- $\gamma^{\text{ARNm}}$  (e IL-12) en M $\phi$ s humanos derivados de monocitos de sangre periférica infectados con una dosis baja de micobacterias (relación 5 micobacterias:1 M $\phi$ ) (215), convirtiéndose para individuos inmunocomprometidos, de una bacteria intracelular no-patógena en una con capacidad para multiplicarse con impunidad en esta clase de huéspedes. *M. tuberculosis*, pero no *Escherichia coli*, exhibe una similitud a *M. avium* para suprimir, a 12 horas