

postinfección, la expresión y traducción de IFN- γ ^{ARNm} (e IL-12) en M ϕ s humanos derivados de sangre periférica dentro de una amplio índice de infección – 5-50 micobacterias/M ϕ (143). Salins *et al.* (211) demuestran que la multiplicación de *L. pneumophila* en M ϕ s (inducidos con tioglicolato) de la cepa de ratón BALB/c o AJ, puede o no ser respectivamente acompañada por la expresión de IFN- γ ^{ARNm} y una efectiva traducción proteínica a las 24 y 28 horas postinfección en dependencia del fondo genético; más aún, el inicio de la actividad macrofágica anti-*L. pneumophila* y la restricción del crecimiento intracelular de la bacteria, coinciden cronológicamente con la producción del interferón.

4.5 TNF- α

Compuestos químicos microbianos con diversa composición y estructura son inductores en monocitos/macrófagos de TNF- α , citocina privilegiada por estar involucrada en la degradación de partículas internadas en las células fagocíticas mononucleares, así como en su posterior procesamiento y presentación antigénica a células accesorias T, contribuyendo al desarrollo operativo innato y adquirido de la respuesta inmunológica (218). La ausencia o neutralización de esta citocina proinflamatoria – ya sea como consecuencia de la estrategia de virulencia de patógenos infecciosos o sea por factores intrínsecos al huésped uni- o multicelular, o aún quizás debido al acoplamiento de estos dos grupos de factores – ha sido coligada en forma reiterada a la susceptibilidad a infecciones *in vivo* e *in vitro* (219, 222-225).

El factor de necrosis tumoral alfa es uno de los puntos neurálgicos en la discordia existente entre patógenos y huésped. Por un lado, los efectos biológicos de esta citocina prototipo proinflamatoria [apoptosis de células infectadas (9), sinergismo microbicida con IFN- γ , producción de NO (219), inducción de TLR-2^{ARNm} (231), degradación de I- κ B y activación del factor de transcripción NF- κ B (233), inducción de quimiocinas (234), inducción de la enzima sintasa de óxido nítrico NOS2 en macrófagos en combinación con IFN- γ , amplificación de la producción de metabolitos del O₂ por neutrófilos y macrófagos (10, 233), etc.] se vinculan, clásicamente, con una actividad citostática y/o citocida *in vivo* contra microorganismos intracelulares. Por otra parte, los microparásitos intracelulares contrarrestan la actividad microbicida de TNF- α al

estimular la liberación de receptores celulares solubles para TNF- α [*M. tuberculosis* (220)] o restringiendo la producción de esta citocina [*M. avium* (240)]; aún más, la producción elevada de caquetina se ha asociado con la patogénesis bacteriana de *M. tuberculosis*, inmunosupresión de la respuesta proliferativa de células T CD4⁺ y CD8⁺ por *T. brucei* y supresión de la producción de IL-12 por macrófagos [por *Corynebacterium parvum* (241)].

Underhill *et al.* (242) observaron que los componentes de la pared bacteriana de *M. tuberculosis* interactúan con TLR-2 en macrófagos para promover la producción de TNF- α , mientras que, en el caso de la pared celular de *M. bovis* BCG, Tsuji *et al.* (243) demostraron que sus estructuras contactan vía TLR-2 y TLR-4 para inducir en células dendríticas la síntesis de caquetina, la cual a su vez causó la maduración de estas células (elevando la expresión de CD40, CD80, CD83 y CD86). Por otro lado, células dendríticas derivadas de médula ósea de ratones TNFKO infectadas con un adenovirus recombinante no lograron madurar lo suficiente (en base a los niveles de MHC II, CD86/B7-2 y CD40) en comparación a células dendríticas provenientes de animales normales (239). Así mismo, ratones TNF^{-/-} infectados con *M. tuberculosis* no formaron tejidos linfoides ni granulomas bien estructurados y compactos, y fueron deficientes en la neutralización del bacilo (240), aunque fue notable el hecho que la actividad fagocítica de macrófagos permaneció normal. Brodskyn *et al.* (165) notaron que los glucoinositolfosfolípidos de *T. cruzi* inhiben en forma importante la maduración causada por LPS o CD40L *in vitro* en células macrofágicas (disminuyendo la expresión de CD80, CD83, CD86, HLA-DR, CD40 y CD57) y dendríticas (disminuyendo la expresión CD80, CD83, CD86, HLA-DR y CD-40) a través de la inhibición de TNF- α .

En el último estudio citado (165), los autores demostraron que es precisamente la porción de ceramida de los glucoinositolfosfolípidos el principal responsable de la inhibición de la síntesis de TNF- α macrofágico. Barber *et al.* (246) describen que los macrófagos procedentes de ratones no responsivos a LPS (*lps^d*) no son capaces de montar una respuesta contra la ceramida. Fratti *et al.* (59) evidenciaron que la manosida de lipoarabinomanano (ManLAM) aislado de *M. tuberculosis* H37Rv, otro compuesto lipídico glicosilado con grupo acilo ceramida, interfiere el reclutamiento de EEA1 a fagosomas de macrófagos que contienen partículas de látex fagocitadas, reduciendo así la maduración fagolisosomal. A su vez, Dahl *et al.* (167) muestran que ManLAM

proveniente de cepas virulentas de *M. tuberculosis* (cepas Erdman y H37Rv) es incapaz de inducir cantidades significativas de TNF- α *in vitro* por monocitos humanos de sangre periférica.

Una parte substancial de estudios *in vitro* apoyan la tesis que el desarrollo de factores de virulencia por microparásitos intracelulares se ha encaminado, al menos parcialmente en M ϕ s, a suprimir la transcripción del gen para TNF- α o su efectiva traducción proteínica, o ya sea para reducir su bioactividad y/o neutralizar sus efectos biológicos como activadores de M ϕ s. Murthy *et al.* (247) observaron (a la 48 horas) que la producción de TNF- α por células monocíticas humanas de la línea THP-1 (pretratadas con Vitamina D₃), disminuía (de ~1600 a 280 pg/ml) al aumentar la concentración (10⁵, 10⁶, 10⁷, 10⁸; relaciones respectivas parásito:M ϕ 1:10; 1:1; 10:1 y 100:1) de *Borrelia burgdorferi* (cepa JD1). Tal disminución podría ser causada, según los autores, por la liberación de TNF-R55 y TNF-R75 que neutralizan la citocina. Por su parte, el grupo de Balcewicz-Sablinska *et al.* (150), hacen una conexión entre la virulencia o avirulencia de dosis bajas (15 bacterias/M ϕ) de *M. tuberculosis* (cepas H37Rv y H37Ra, respectivamente) y la presencia física de TNF- α , así como con la citotoxicidad y apoptosis celular inducidas por la caquetina. Los mencionados autores detectaron niveles semejantes de TNF- α (~1-1.7 ng/ml para ambas cepas) al tratar M ϕ s alveolares humanos (6-24 horas postinfección); sin embargo, los ensayos de citotoxicidad y apoptosis determinaron una actividad aprox. dos veces mayor en los sobrenadantes de M ϕ s infectados con la cepa avirulenta de *M. tuberculosis* (H37Ra); más aún, nuevamente se observó una correlación entre la virulencia/avirulencia y la secreción de altos/bajos niveles de sTNF-R2 (pero no de sTNF-R1) en el medio de cultivo.

Sarmento *et al.* (240) utilizaron sobre M ϕ s peritoneales residentes de ratón BALB/c relaciones infecciosas bajas (10 bacterias/M ϕ) para el análisis de virulencia de dos cepas de *M. avium* (cepas 25291 y 1983, respectivamente virulenta y avirulenta); 7 días postinfección se detectó una mayor bioactividad T- y NK-independiente de TNF- α en cultivos de M ϕ s infectados con la cepa avirulenta de *M. avium* en contraste con la virulenta (~250 U/ml vs 15 U/ml, respectivamente), lo cual correlaciona inversamente con el crecimiento micobacteriano en M ϕ s – aprox. 14 veces mayor proliferación bacilar de la cepa 25291 (virulenta) en comparación con la cepa 1983 (avirulenta).

Los estudios realizados por Reiling *et al.* (37) y Greenwell-Wild *et al.* (215) se basaron en Mφs humanos (derivados de monocitos de sangre periférica) infectados *M. bovis* (cepa 2701 y una cepa suave transparente; ambas con capacidad de infectar humanos/animales inmunodeficientes). A pesar de la diversidad de las cantidades absolutas de TNF- α encontradas en cultivo debido a la variabilidad entre los donadores, el grupo de Reiling observó que, a 12 horas postinfección, un índice infeccioso de 10 micobacterias/Mφ induce elevadas concentraciones de TNF- α (~11000-15000 pg/ml). Greenwell-Wild *et al.*, por su parte, registran un aumento de 140 veces en la transcripción del gen para TNF- α al aplicar una dosis infecciosa de 5 micobacterias/Mφ; esta elevada actividad transcripcional (2 horas post-estimulación) se ve acompañada de una efectiva secreción proteica de >2000 pg/ml. El grupo de Reiling también detecta niveles muy semejantes de TNF- α a las 8 horas postestímulo con una relación infecciosa de 3 micobacterias/Mφ. Al unificar los datos de ambos estudios, se deduce que la aplicación de una rango de índices “bajos” de infección micobacterias:Mφs (MOIs de 1:1; 3:1; 5:1 y 10:1) desencadenan una inicial (2-24 horas) y dramática producción de TNF- α , pero incapaz de sostenerse ulteriormente.

La susceptibilidad y resistencia de ganado bovino a *M. avium* subespecie *paratuberculosis* y *M. avium* subespecie *avium*, respectivamente, fue tomada como base para el estudio realizado por Weiss *et al.* (248). Los autores encontraron (6 horas postinfección) una expresión de TNF- α ^{ARNm} dos veces menor en Mφs bovinos de sangre periférica expuestos a una dosis bacteriana baja (10 bacterias/Mφ) de la subespecie virulenta (*paratuberculosis*); así mismo, la bioactividad (citotoxicidad) del TNF- α fue el doble para los cultivos celulares expuestos a la subespecie *avium*, en comparación con la subespecie *paratuberculosis*.

A simple vista, algunos investigadores han planteado en ciertos estudios *in vitro* la hipótesis de la existencia de un vínculo, directamente proporcional, entre la virulencia microbiana y la producción de TNF- α por células macrofágicas.

En el estudio de McHugh *et al.* (157) parece haber una correlación inversa entre la habilidad de multiplicación de una cepa virulenta de *L. pneumophila* en Mφs inducidos de ratón A/J y la reducción de elevados niveles de TNF- α y su respectivo

ARN mensajero. Además, el aumento de la dosis de infección (1:1; 10:1 y 100:1) conllevó, al mismo tiempo, a un incremento de la citocina secretada al medio de cultivo.

Engle *et al.* (152) muestran que la infección de Mφs alveolares humanos con dosis bajas (MOIs: 0.5, 2, 5 y 10) de micobacterias (*M. tuberculosis* y *M. bovis*) virulentas, induce elevadas concentraciones de TNF- α , en contraposición a las mismas especies atenuadas que carecen dicho potencial inductor. Más aún, la adición de TNF- α recombinante a los cultivos de Mφ potencia el crecimiento intracelular de las cepas virulentas.

Teniendo en cuenta lo anterior, así como los múltiples mecanismos de retroalimentación negativa que existen para regular la red de citocinas y sus receptores, sería aventurado referirse a un efecto estimulador directo del TNF- α para la proliferación bacteriana intracelular en Mφs. Más admisible sería inferir una secuela indirecta mediada por segundos o terceros elementos mensajeros que, ahora sí, actúan sobre el Mφ, permitiendo una mayor proliferación bacteriana. En este contexto, y a pesar de tratarse de un modelo experimental basado en una agente infeccioso extracelular, resulta interesante que Ma *et al.* (249) pretratan Mφs humanos (derivados de monocitos de sangre periférica) con TNF- α recombinante, inhibiendo así en forma específica la producción de IL-12 (p40 y p70) causada normalmente por una alta dosis de *S. aureus* (relación 10000 bacterias:1 Mφ) con o sin IFN- γ ; dicha inhibición parece caracterizarse por su independencia de IL-10, pues anticuerpos neutralizadores de esta citocina anti-inflamatoria no logran restaurar la síntesis de IL-12, y por el requerimiento de un período considerable (~16 horas) de pre-incubación con TNF- α , lo cual sugiere que el TNF- α pudiera estar induciendo procesos de síntesis proteínica *de novo* necesarios para sus actividades inhibitorias indirectas.

Finalmente debemos mencionar un tercer grupo de resultados experimentales, como el de Guiguère y Prescott (250), en el cual dosis bajas de una cepa virulenta de *R. equi* (103⁺) o su variante sin plásmido (103⁻) interactúan con Mφs residentes peritoneales sin lograr discernir alguna tendencia, y mucho menos divergencias estadísticamente significativas en la expresión de TNF- α ^{ARNm} y su traducción proteica (causados por cualquiera de los dos grupos).

De lo expuesto anteriormente se puede deducir que existe un consenso en que la presencia física y/o bioactividad *in vitro* o *in vivo* de TNF- α son parámetros asociados a un estatus inmunitario del huésped (uni- o multicelular) que determinaría, en parte, el grado de permisividad o resistencia hacia parásitos intracelulares infecciosos; sin embargo los datos empíricos no logran apoyar en forma conclusiva esta hipótesis y más bien los antecedentes de experimentos *in vitro* sustentan una controversia en torno a la relación que guarda la génesis de TNF- α y la virulencia microbiana:

- 1) Existe una correlación inversamente proporcional entre la virulencia (grado de patogenicidad) y la producción de TNF- α (por M ϕ s).
- 2) La relación virulencia – concentración de TNF- α existe, más sin embargo esta es inversa; es decir, a mayor virulencia – mayor síntesis de TNF- α y viceversa.
- 3) No hay relación causal entre virulencia/avirulencia y la cantidad de TNF- α producida *in vitro*.

En nuestro laboratorio, Salinas *et al.* (182) detectaron niveles séricos considerables de citocinas [tipo Th1 (IFN- γ), tipo Th2 (IL-4 e IL-10) y proinflamatorias (IL-6)] a las 24 horas postinfección con la fase de crecimiento logarítmica (virulenta) de *N. brasiliensis* HUJEG-1 vía s.c.; sin embargo, curiosamente, las concentraciones de TNF- α e IL-2 permanecieron inalteradas durante la infección.

Ratones BALB/c infectados por vía i.v. con la fase estacionaria de *N. brasiliensis* cepa 519, eliminaron la carga bacteriana en un intervalo de 5 semanas, y esta resolución de la infección correlaciona con un aumento del título sérico de TNF- α ; la neutralización específica de la citocina proinflamatoria conllevó a una significativa proliferación de nocardias. Además, macrófagos peritoneales provenientes de animales infectados, al ser estimulados *in vitro* con LPS, secretan concentraciones mayores de TNF- α con actividad citotóxica, en comparación a macrófagos de ratones no infectados (183).

Una de las características más sobresalientes de *N. brasiliensis* HUJEG-1 es su capacidad para restringir *in vitro* la producción de TNF- α por macrófagos peritoneales residentes en un amplio diapasón de carga bacteriana – 1×10^7 a 1×10^9 UFC. Encontrándose en fase estacionaria (avirulenta), la dosis baja (10 UFC/M ϕ) y media

(100 UFC/Mφ) utilizadas en nuestros experimentos no fueron capaces de inducir elevados niveles de TNF- α ; únicamente el estímulo de una dosis mucho más elevada - 1000 UFC/Mφ - logró desencadenar una secreción destacada de esta citocina a partir de una hora postinfección (\approx 2400 pg/ml). Más notable aún fue el hecho que la fase filamentosa (log) de nocardias posee una mayor facultad de modulación negativa sobre TNF- α , ya que ni siquiera la carga de nocardias alta (1000 UFC/Mφ) causó una destacada presencia de esta citocina proinflamatoria; de hecho, el efecto máximo de la dosis alta log se situó a 3 horas postinfección con un nivel moderado de TNF- α - \approx 750 pg/ml - para posteriormente disminuir definitivamente a $<$ 400 pg/ml.

A nuestro juicio, un inóculo de 10 UFC de *N. brasiliensis* con respecto a cada macrófago residente, debiera representar en sí un suficiente estímulo para la producción de citocinas proinflamatorias al menos. El amplio uso de macrófagos pre-activados (inducidos) en la experimentación *in vitro* dificulta considerablemente la comparación de nuestros resultados, ya que es claro que las células fagocíticas inducidas muestran un sesgo, ya sea este negativo o positivo, de la respuesta normal biológica como secuela a un estímulo inductor (74). Sin embargo, los estudios de Greenwell-Wild *et al.* (215) y Weiss *et al.* (70) evidenciaron que macrófagos residentes infectados con dosis baja de *M. avium* (5 bacterias/Mφ), así como de *M. avium paratuberculosis* (relación 10 bacterias/Mφ) y *M. avium avium* (relación 10 bacterias/Mφ), inducen, en un intervalo de 2-6 horas postinfección, \geq 2000 pg/ml de TNF- α *in vitro*.

Reiling *et al.* (37) sometieron Mφs derivados de médula ósea, provenientes de las cepas normales de ratón BALB/c, C57BL/6 y C3HHeN, a un diapasón infeccioso relativamente bajo de *M. tuberculosis* cepa H37Rv - relaciones bacterias/Mφ 1:1; 3:1 y 10:1. Sin importar el fondo genético de las células macrofágicas, la dosis infectante 10:1, en contraste a lo que observamos en el caso de la misma relación infecciosa de *N. brasiliensis*, fue siempre un potente estímulo para la producción (24 horas postinfección) de considerables cantidades de TNF- α (\sim 1500 pg/ml para las cepas BALB/c y C57BL/6; \sim 4700 pg/ml para C3H HeN).

En resumen, con respecto a la producción de TNF- α por macrófagos, nuestro estudio revela un impresionante poder inhibitorio de *N. brasiliensis* HUJEG-1 en las dos fases de crecimiento (log y estacionaria) y dentro de un amplio rango de dosis infecciosa

(10-1000 UFC/Mφ). Nuestra hipótesis es que la ausencia o secreción insuficiente de TNF- α macrofágica podría beneficiar la supervivencia intracelular de *N. brasiliensis* mediante la restricción de: i) la generación de moléculas reactivas del oxígeno y nitrógeno con acción nocardicida; ii) la maduración de fagosomas que contienen nocardias fagocitadas; iii) la expresión de moléculas de membrana en macrófagos (como por ejemplo CD80, CD86, CD40, MHC II, etc.) que les permiten adquirir una competencia efectiva como célula presentadoras de antígenos.

4.6 IL-1 β

IL-1 β es una molécula proteica que induce funciones proinflamatorias y microbicidas en neutrófilos y actúa como señal promotora de crecimiento y diferenciación de células B, coestimulando de esta manera la producción de anticuerpos. Además, IL-1 β regula en forma positiva la proliferación de fibroblastos y la síntesis de colágeno, por lo cual esta citocina podría estar involucrada en los procesos fibróticos desencadenados en enfermedades inflamatorias e infecciones como es el caso de formación de granulomas causados por *N. brasiliensis* y *M. tuberculosis*, entre otros.

No obstante que macrófagos y monocitos son productores primarios de IL-1, esta es también sintetizada por otras estirpes celulares, revelando un impresionante origen multicelular para esta citocina, además de poseer una excepcional actividad pleiotrópica involucrada en una gran diversidad de procesos fisiológicos normales y, trascendentalmente, en condiciones patológicas asociadas a su elevada producción a nivel sistémico durante procesos inflamatorios y/o infecciosos.

La virulencia de microorganismos patógenos se vincula a la supresión o ya sea la inducción de IL-1. Guiguère *et al.* (250) reportan que dosis bajas (2-5 bacterias) de *R. equi* 103⁺ (virulenta) inducen en Mφs residentes menores concentraciones de IL-1 β en comparación con la misma especie curada (*R. equi* 103⁻) – 10-30 pg/ml vs 40-90 pg/ml. En otro estudio (144), dosis bajas de BCG y *M. leprae* son cotejadas en cuanto a su capacidad de inducir en monocitos humanos de sangre periférica la producción de IL-1 β , estableciendo que la infección por el agente causal de la lepra conlleva a una mínima producción de la citocina proinflamatoria, más sin embargo evoca la secreción de una sustancial cantidad del receptor antagónico para IL-1 (IL-1ra). Por otro lado,

Méndez-Samperio *et al.* (257) demuestran que aún una especie relativamente inocua para monocitos humanos, como lo es BCG, puede suprimir su producción de IL-1 β a través de la acción negativa de IL-10 endógena secretada post-estímulo; en este contexto, IL-10 recombinante (10 U/ml) previene (18 horas) la producción de IL-1 β por monocitos humanos de sangre periférica enfrentados a dosis bajas *C. neoformans* (relaciones 2/M ϕ y 10/M ϕ) o *C. albicans* (relaciones 1/2M ϕ s y 2/M ϕ).

Shannon *et al.* (258) analizan el agente causal de la enfermedad de los legionarios y en contraste a los mencionado anteriormente, observan que una cepa virulenta de *L. pneumophila* (M124), mas no su concurrente avirulenta (AV-M124), origina una sustancial producción de IL-1 α por M ϕ s peritoneales inducidos (relación infecciosa 10 bacterias/M ϕ) a las 24 y 48 horas postinfección dentro del orden de 4-8 ng/ml; curiosamente, los niveles de la isoforma β (~120-350 pg/ml) son muy inferiores a la α . En general, e independiente de la presencia o no de virulencia, los autores evidencian una clara superioridad en las concentraciones relativas de los productos amplificados para IL-1 β sobre los obtenidos para IL-1 α ; sin embargo, esta desigualdad cuantitativa es re-orientada por el dinamismo post-transcripcional de IL-1 α ^{ARNm} que finalmente predomina.

Por último, bajo influencia patógena de dosis bajas de *M. tuberculosis* H37Rv (0.1-10 micobacterias/M ϕ), la expresión génica de IL-1 y traducción de su respectivo ARNm *in vitro*, pueden adoptar patrones únicos en células dendríticas y macrofágicas humanas, superando considerablemente estas últimas a las primeras en ambos parámetros durante la etapa temprana (3-24 horas) del encuentro huésped-parásito (190, 259, 260).

La presencia de IL-1 β , así como de TNF- α , es requerida en ratones BALB/c estimulados con IL-12 para un óptimo desarrollo de la respuesta inmune tipo Th1 hacia el antígeno OVA (ovoalbúmina) (205). Por otro lado, Suzuki *et al.* (261) muestran que monocitos humanos estimulados con *M. leprae*, en contraposición a los estimulados con BCG, producen mínimas concentraciones de IL-1, pero una cantidad sustancial de IL-1ra, favoreciendo quizás la infección por agente causal de la lepra.

IL-10 parece ser no sólo un mejor contrabalance fisiológico de los efectos patológicos incitados por IL-1 β (262), sino que es posible incrementar la concentración

de esta citocina proinflamatoria *in vitro* en presencia de *M. bovis* mediante la neutralización de IL-10 con anticuerpos específicos (257).

Nuestros experimentos muestran que IL-1 β es la única citocina producida por los macrófagos en forma constante y significativa como respuesta a la dosis baja de *N. brasiliensis* (en ambas fases de crecimiento – log y estacionaria). La fase log estimula en forma más dinámica y sostenida la producción de esta citocina, mientras que la fase estacionaria también lo logra, pero en forma paulatina y también efectiva. Al observar las cinéticas de la secreción de IL-1 β en respuesta a las tres dosis (estacionaria y log) infecciosas de nocardias utilizadas, parece no existir una relación dosis-efecto, sea esta directa o inversa; más bien creemos que quizás se esté llevando a cabo, al menos en el rango de la concentración bacteriana aplicada, una producción de IL-1 β independiente de la dosis de nocardias enfrentadas a los macrófagos.

4.7 IL-10

Interleucina-10 o factor inhibidor de síntesis de citocinas, fue descrito inicialmente como una molécula proteínica secretada por células Th2 de ratón y que inhibe la activación de células Th1, así como también su proliferación (263). Actualmente sabemos que esta molécula representa un excelente regulador negativo de fenómenos inmunológicos.

La producción de IL-10 es concomitante a la producción de quimiocinas y citocinas proinflamatorias causada por productos bacterianos y puede prevenir o revertir manifestaciones inmunológicas no deseadas, como choque séptico, enfermedad granulomatosa de Wegener (271), rechazo de aloimplantes (272) y psoriasis (273), entre otros. Además, la presencia de IL-10 contribuye al estatus de “privilegio inmune” en el ojo, gracias en parte a la regulación negativa de la respuesta inmune Th1 por esta citocina – fenómeno denominado desviación inmune asociada a la cámara anterior (149).

La interleucina-10 es no solamente una potente citocina anti-inflamatoria producida en diversas condiciones de estrés, siendo su inducción génica o post-transcripcional vinculadas con la desactivación de macrófagos, supresión de proliferación de células T e inhibición de producción de citocinas. Más aún, bacterias, hongos y parásitos han desarrollado estrategias dirigidas hacia la regulación de

moléculas pro- y anti-inflamatorias (TNF- α , IL-1Ra, IL-12, IFN- γ , sTNF-R2) con el fin de prolongar la presencia/producción de esta citocina anti-inflamatoria/desactivadora.

Los datos señalan que células monocíticas y/o macrófágicas son inducidas, bajo el estímulo de bacterias Gram positivas, Gram negativas, así como de micobacterias, hongos y microparásitos, a producir considerables concentraciones de IL-10 (204, 207).

La virulencia bacteriana puede ser vinculada con la capacidad intrínseca para inducir IL-10, como ejemplifica el estudio realizado por Balcewicz-Sablinska *et al.* (226), en el que los autores hipotetizan que la reducción de los efectos biológicos del TNF- α (apoptosis y citotoxicidad) liberado al infectar M ϕ s alveolares con la cepa virulenta H37Rv de *M. tuberculosis*, pero no la cepa avirulenta H37Ra, se debe, en gran parte, a que la citocina proinflamatoria es neutralizada por moléculas del receptor solubles para TNF- α Tipo 2, inducidas finalmente por IL-10. En el mismo tenor, se observa una expresión diferencial de IL-10^{ARNm} en M ϕ s bovinos infectados con una dosis baja (10 micobacterias/M ϕ) de una cepa virulenta (*M. avium* subespecie *paratuberculosis*) o avirulenta (*M. avium* subespecie *avium*) – 12 veces más para la subespecie *paratuberculosis* vs 4.2 de la subespecie *avium* (con respecto al Control Negativo) (248). De hecho, en esta última investigación citada, así como en la realizada por Rojas *et al.* (9) con M ϕ s de ratón infectados con *M. tuberculosis* virulenta), se subraya y refuerza el ya descrito antagonismo clásico existente entre IL-10 y TNF- α , y que la producción de ambas citocinas por el M ϕ infectado deriva en una relación cuantitativa IL-10/TNF- α con poder para definir un parámetro de resistencia/susceptibilidad del huésped. Y, efectivamente, el pretratamiento *in vitro* con IL-10 de monocitos y/o macrófagos humanos activados (con IFN- γ) no sólo revierte la activación celular, sino que además promueve la multiplicación de *L. pneumophila* y *Coxiella burnetti*. Más aún, M ϕ s residentes o inducidos de ratón IL-10^{-/-} captan moléculas de IL-10 sobre su membrana que inhiben la actividad listericida y potencian el crecimiento intracelular de *L. monocytogenes*.

La potenciación de la inmunidad contra *M. avium* *in vivo* se ha asociado a la neutralización de IL-10 (277, 278) y se ha observado que las células T procedentes de pacientes tuberculosos anérgicos secretan concentraciones significativas de interleucina-10 en forma constitutiva (279). Por otro lado, ratones C3H/HeN, con TLR-4

funcional y productores de IL-10, mantienen en forma indefinida el virus de tumor mamario en ratones (MMTV), mientras que mutantes para TLR-4 (de la cepa C3H/HeJ) eliminaron el virus a través de una respuesta inmune citotóxica. En contraste, aunque ratones C57BL/6 deficientes de IL-10 infectados con *Leishmania amazonensis* redujeron la carga parasitaria en lesiones, los parásitos persistieron y su persistencia fue asociada con el desarrollo de lesiones crónicas semejantes a las ocurridas en animales control.

En honor a la imparcialidad y equidad, debemos señalar experimentos en los que la infección de Mφs residentes de ratón BALB/c o Mφs humanos (derivados de monocitos) con aislados clínicos patógenos de *M. tuberculosis* H37Rv y *R. equi* VapA⁺, conlleva a una mayor multiplicidad dentro de sus respectivos huéspedes celulares, en comparación con sus contrapartes carentes de virulencia (*M. tuberculosis* H37Ra y *R. equi* VapA⁻); sin embargo, la elevada viabilidad y/o crecimiento intracelular bacteriano no se encontró ligado a una mayor producción de IL-10 (250, 280). Por último, bajo la influencia de una mismo estímulo y de igual intensidad (es decir, igual índice de infección), el tipo de célula presentadora de antígeno (monocito, macrófago, célula dendrítica, linfocito B) podría determinar la presencia o ausencia de IL-10 (y otras citocinas) (190). Confirmación de lo anterior es el estudio *in vitro* desarrollado por Matsunaga *et al.* (156), en el cual la infección de Mφs peritoneales de ratón, y no monocitos humanos, con una cepa virulenta de *L. pneumophila* suprime la síntesis de IL-12, pero de manera IL-10-independiente.

Nosotros mostramos en el presente trabajo que IL-10 es producida en forma rápida y cuantiosa por los macrófagos expuestos a la dosis baja virulenta, pero no avirulenta, de *N. brasiliensis* HUJEG-1. Esta citocina, muy probablemente, actúa como citocina reguladora, mas no ejemplifica el prototipo riguroso de citocina tipo Th2, como podría ser quizás bajo ciertas circunstancias IL-4. Uno de los factores que determinan la función biológica de IL-10 es precisamente el tiempo de aparición (281) con respecto a otras citocinas y la célula blanco sobre la que actúan.

En macrófagos IL-10 inhibe la producción de TNF- α , IFN- γ e intermediarios reactivos del oxígeno (245), suprime la expresión de las moléculas de membrana CD80, CD86, CD54 y Mac1, evita la proliferación de macrófagos en respuesta a M-CSF (259); el pretratamiento de monocitos humanos con IL-10 suprime la inducción de IL-8^{ARNm} y su traducción proteínica como respuesta a *M. bovis* BCG (285). IL-10 también afecta

negativamente a otras células integrantes del sistema inmune innato como neutrófilos y células dendríticas, inhibiendo la actividad fagocítica y bactericida de las primeras, y suprimiendo la síntesis de IL-12 por las segundas (286, 287). Células dendríticas estimuladas *in vitro* con LPS o CD40L (en presencia de anti-IL1A-DR) secretan altas concentraciones de IL-10, pero la neutralización de la citocina con MAb anti-IL-10 no sólo conlleva a la producción de TNF- α e IL-12, sino que también promueve la maduración celular (a través de la inducción de moléculas de superficie CD80, CD83, CD86 y MHC I) y estimulación alogénica de células virgen T hacia una diferenciación tipo Th1 (288).

Bajo la acción de IL-10, monocitos humanos y macrófagos residentes aumentan la expresión de la misma IL-10, así como de SOCS-3 (Inhibidor de la Señalización de Receptores para Citocinas) e IL-1ra (Receptor Antagónico de IL-1 soluble) que inhiben la respuesta proinflamatoria. Macrófagos activados con LPS en presencia de IL-10 acrecientan los transcritos de IL-4R α , sugiriendo una mayor sensibilidad de los fagocitos a IL-4; ambas citocinas, IL-10 e IL-4, promueven el fenotipo alternativo de macrófagos, los cuales poseen una alta capacidad fagocítica, pero también una exigua habilidad para destruir patógenos. La supresión génica de citocinas proinflamatorias (TNF- α , IL-1 α , IL-1 β) por IL-10 en macrófagos primarios de ratón se lleva a cabo, en parte, a través de la desestabilización acelerada de sus ARNs mensajeros (289) que contienen en su región 3' no traducida Elementos Ricos en AU (ERAs).

En una situación *in vitro*, la multiplicación de *Coxiella burnetti* y *Legionella pneumophila* en monocitos humanos es fomentada por el pretratamiento con IL-10 y este efecto se vincula a la inhibición de la producción de TNF- α y subversión del efecto de IFN- γ , respectivamente. Finalmente, se ha documentado que macrófagos no listericidos muestran altos niveles de IL-10 sobre su membrana celular en comparación a los fagocitos listericidas, y esta citocina superficial de membrana es biológicamente activa y regula en forma negativa la actividad anti-*Listeria in vitro* (41).

Toda la evidencia mostrada hasta este punto en este trabajo parece incitar, convincentemente, la proyección de IL-10 como una molécula reguladora negativa del proceso inflamatorio que, ante una coyuntura de proceso infeccioso por (micro)parásitos intracelulares, frecuentemente parece resultar perjudicial para el huésped *in vivo* o *in vitro* debido a que constriñe/inhíbe directa- o indirectamente: i) la adquisición de

marcadores de membrana asociados a la maduración de fagocitos; ii) la producción de citocinas pro-inflamatorias y tipo Th1; iii) la generación de metabolitos del oxígeno con actividad microbicida. No obstante, antes de asumir como correcta esta tesis sobre la trascendencia adversa de IL-10 en la defensa anti-microorganismos a nivel celular y de macroorganismo, quizás debiésemos cuestionar ¿cómo es que la filogenia y ontogenia no sólo han integrado, sino también preservado una característica aparentemente nociva (como lo es la producción de altas concentraciones de IL-10 a nivel celular y multicelular/sistémico)?

Wagner *et al.* (290, 291) observaron que el número de células que expresaban IL-10 en el hígado de ratones infectados con *L. monocytogenes* aumentaron durante el primer día de infección y la positividad de células para IL-10 permaneció elevada durante el estadio temprano de la infección, cuando las bacterias se multiplican en hígado y bazo. Hasta este punto, los datos correlacionaron con la teoría que IL-10 inhibe o retarda el surgimiento de inmunidad protectora. Sin embargo, aunque el tratamiento con MAb anti-IL-10 potenció la resistencia de los ratones a la listeria, también provocó una más lenta eliminación de la infección del hígado; más aún, cuando la neutralización de IL-10 *in vivo* se realizó 1 a 3 días postinfección, se deterioró la resistencia anti-*Listeria* de los animales.

En contraposición a la actividad reguladora negativa citada, IL-10 actúa sobre macrófagos aumentando la expresión de CD14 (receptor para LPS), CD16 (FcγRII), CD64 (FcγRI) y CD163 – una molécula denominada en español receptor “pepenador” y que es regulado en forma negativa por LPS, IFN-γ y TNF-α (292, 293). Más aún, los equipos de investigación de Stahl y Ezekowitz (326), Devitt *et al.* (294) y Platt *et al.* (295) evidencian, respectivamente, que el receptor para manosa, CD14 y el grupo diverso de receptores “pepenadores” (scavenger), internan partículas pero no desencadenan inflamación y podrían además suprimirla en forma activa (296). Reiling *et al.* (37) demuestran que, a diferencia de TLR-2 y TLR-4, el receptor CD14 no está involucrado en la producción de TNF-α e IL-12p40 por macrófagos primarios infectados con *M. tuberculosis in vitro*. En adición, trabajando con monocitos humanos, Koppelman *et al.* (298) aplicaron IL-10, reduciendo así drásticamente los elevados niveles expresados de HLA-DP, HLA-DQ y HLA-DR a causa de IFN-γ, mientras que te Velde *et al.* (91) evidencian que los niveles monocíticos de CD16, CD64 y TNFRp55 de

hecho aumentaron en presencia de IL-10. Finalmente, esta citocina anti-inflamatoria promueve *in vitro* en células dendríticas (CD1a⁺CD14⁻) su conversión en células con fenotipo macrófago (CD1a⁻CD14⁺) con elevada actividad fagocítica anti-micobacteriana (153).

La exposición de monocitos o macrófagos humanos a IL-4 inhibe la expresión de los tres tipos de FcγRs y la ingestión de partículas mediada por estos receptores; sin embargo, esta supresión fue bloqueada pre-incubando las células fagocíticas con IL-10, y la captación de IL-10 con anticuerpos MAbs específicos para la citocina reduce significativamente la capacidad para internalizar partículas cubiertas con IgG (299). Así mismo, el pretratamiento de células mononucleares de sangre periférica, monocitos y células dendríticas con IL-10, aumenta la expresión de CD14; más aún, en células dendríticas este efecto se ve acompañado de una elevada actividad fagocítica hacia *M. tuberculosis* (153).

Pacientes con artritis reumatoide (AR) tratados con IL-10 no mostraron mejoría clínica, sino que hubo en ellos una significativa disminución de trombocitos, correlacionada con una elevada expresión de FcγRI y FcγRIIA sobre monocitos y macrófagos; en forma semejante, células monocíticas y macrófagos de pacientes con AR fueron inducidas *ex-vivo* a expresar elevados niveles de FcγRI y FcγRIIA bajo el efecto de interleucina-10, además de que aumentaron su producción de TNF-α al ser expuestas a CIs (301).

En síntesis, IL-10 contrarresta el desarrollo del proceso inflamatorio, así como la proliferación y maduración celular de macrófagos y células dendríticas, mientras que por otro lado potencia la actividad fagocítica a través de receptores para Fcγ, CD14, manosa y moléculas scavenger.

Por tanto, nuestra investigación demuestra que únicamente la forma virulenta de *N. brasiliensis*, en dosis baja, induce una alta concentración de IL-10, la cual suponemos no sólo inhibe, a excepción de IL-1-β, la producción de TNF-α, IL-12 e IFN-γ, sino que posiblemente acrecienta la actividad fagocítica del macrófago quizás mediante la expresión inducida de FcγRs y otros receptores alternativos. La actividad pro-fagocítica de IL-10 sobre macrófagos pudiese o no ser un fenómeno "natural" montado por la célula huésped al enfrentarse a *N. brasiliensis*, sin embargo la consecuencia de este

hecho sería una mayor internación de bacterias por el macrófago, lo cual *no* significa, *a priori*, una destrucción efectiva del microorganismo. En este sentido, Moore *et al.* (281) presentan una lista de patógenos intracelulares – bacterias (*Salmonella choleraesuis*, *L. monocytogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Borrelia burgdorferi*, *Chlamydia trachomatis*), micobacterias (*M. avium*, *M. tuberculosis*, *M. bovis* BCG), hongos (*Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Coccidioides immitis*, *Aspergillus fumigatus*) y protozoarios (*L. major*, *Trypanosoma cruzi*, *T. congolense*, *Toxoplasma gondii*), para los cuales existe evidencia que la presencia de bajos niveles de IL-10 aumentan la resistencia a la infección en modelos experimentales en ratones, mientras que altas concentraciones de la citocina los hacen susceptibles. Uno pudiera hipotetizar que la fagocitosis de microparásitos intracelulares potenciada por IL-10 es benéfica dentro de un margen racional, pero en exceso sobrepasaría la capacidad microbicida del huésped, contribuyendo así a la patogénesis. Por otra parte, Kane *et al.* (209) demostraron que los amastigotes de *Leishmania* recubiertos de IgG y encontrados en las lesiones causadas por el protozoario, ligaban los receptores Fc γ sobre macrófagos, induciendo la producción de grandes cantidades de IL-10, la cual a su vez previno la activación de estas células y disminuyó su producción de IL-12 y TNF- α . Más aún, el pretratamiento de células macrofágicas con IL-10 recombinante, las vuelve refractarias a la activación por IFN- γ .

4.8 Efecto de anticuerpos anti-*Nocardia* sobre la producción de citocinas macrofágicas.

La interacción de CIs con los receptores gamma para el componente Fc de inmunoglobulinas de las células blanco, potencia o atenúa: i) la producción de quimiocinas o citocinas proinflamatorias y tipo Th1 (282); ii) la fagocitosis (77); iii) la transducción de señales o proliferación de linfocitos T/B (308); iv) la actividad antitumoral por células T (5, 190); v) la maduración de macrófagos o células dendríticas (311); vi) la presentación de antígenos (78, 84). El efecto neto atenuante o potenciador ejercido sobre cualquiera de estas facetas inmunológicas depende, principalmente, del balance cuantitativo entre el receptor inhibitorio Fc γ RIIB y los receptores activadores Fc γ RI, Fc γ RIIA y Fc γ RIII (77). Más aún, a través de modelos experimentales *in vivo* se

ha demostrado que los CIs, en ausencia o deficiencia de Fc γ RIIB, aumentan significativamente la propensión a romper la tolerancia inmunológica y desarrollar procesos autoinmunes como glomerulonefritis, neumonitis hemorrágica (319), alveolitis (346), artritis inducida por colágeno (321) y reacciones anafilácticas (242).

CIs IgG-OVA administrados en el momento de desafío con *L. monocytogenes*, causan en ratones A/J y CBA/J un estado transitorio de susceptibilidad a la infección por éste parásito intracelular, asociado a la supresión de la respuesta inmune celular y al bloqueo de la expresión de moléculas Ia (equivalente al MHC II en el humano) sobre macrófagos *in vivo* (323, 324). *In vitro*, CIs – IgG-DNP₃₄ASB, IgG-DNP-KLH o IgG-FITC₅ASB – adheridos, pero no solubles, inhiben la inducción de moléculas codificadas por loci H2 (I-A, I-E y K) sobre macrófagos tratados (“primed”) con IFN- γ y posteriormente estimulados con *L. monocytogenes* muerta por calor; la inhibición involucra la presencia del componente Fc de inmunoglobulinas, mas no la porción F(ab')₂ y es independiente de células T. En contraste a la disminución de expresión de glicoproteínas I-A^K, la citotoxicidad antitumoral (hacia la línea celular P-815) de macrófagos peritoneales (inducidos y pretratados con la combinación IFN- γ + LPS) es potenciada por los CIs – un efecto asociado probablemente al aumento de TNF- α (324).

La ausencia de la cadena común γ para los receptores Fc γ RI, Fc γ RII y Fc ϵ RI, así como de anticuerpos circulantes en ratones transgénicos [que contienen células B funcionales, pero no secretan Ig – mIgM/JHDTg – y/o secretan sólo IgM – (m+s) IgM/JHDTg] evita que se sostenga la infección cutánea causada por miembros del complejo *Leishmania mexicana* (*L. mexicana amazonensis* y *L. mexicana pifanoi*) (325). Por otro lado, ratones mutantes μ MT (con fondo genético C57BL/6, pero con células B deficientes del dominio transmembranal para IgM) son capaces de controlar y eliminar en forma efectiva en el bazo a los parásitos de *L. donovani* (cepa etiopiana LV9), agente causal de la leishmaniasis visceral, pero desarrollan una exagerada patología hepática destructiva (326).

Los amastigotes aislados del cojinete plantar de ratones BALB/c infectados con *L. major* mostraron niveles altos de IgG adherida a la superficie parasitaria, mientras que amastigotes anéxicos carecieron de ella. Así, macrófagos derivados de médula ósea estimulados con amastigotes provenientes de lesiones, en conjunción con LPS, inducen la producción de IL-10 que es capaz de suprimir la secreción de IL-12 (p70) y TNF- α

por células macrofágicas activadas con IFN- γ + LPS. Además, se requiere la ligación de Fc γ R en conjunto con una señal coestimuladora (como por ej. productos bacterianos) para que se realice la máxima liberación de IL-10 por macrófagos infectados con amastigotes (327).

Los sueros de individuos infectados con *S. mansoni* contienen altos niveles de CIs ASHS-anti-ASHS (ASHS – Antígenos Solubles de Huevos de *Schistosoma*), los cuales inhiben en mayor grado la proliferación de linfocitos hacia SEA, en comparación a los sueros de sujetos sanos (328). Por otra parte, ratones C57BL/6J infectados con cercarias de *S. japonica* producen un factor inhibidor específico de linfoproliferación que resultó ser IgG1 (329, 330). En el caso de *S. mansoni* se observó que los granulomas desarrollados eran de menor tamaño en pacientes con CIs, en comparación con aquellos individuos sin CIs, aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas (331). En adición, IgG1 originada *in vivo* por *S. japonica* y transferida en forma pasiva a ratones infectados de manera activa, inhibe el desarrollo de granulomas hepáticos, en comparación con el grupo receptor de IgG1 no específica para *S. japonica* (330).

Por lo que respecta a patógenos virales, la unión del componente Fc con su receptor de membrana FcR sobre monocitos y macrófagos *in vitro* favorece la infección de éstas células fagocíticas por virus ARN mortales y promueve, en forma simultánea, la producción de IL-10 y proteínas SOCS que pudiesen suprimir la respuesta antiviral del huésped. Además, un modelo de infección *in vivo* para el Virus Sincitial Respiratorio (VSR) demuestra que la exacerbación de la enfermedad en ratones es mediada por CIs, pero es abrogada sólo en animales deficientes de células B y componentes C3 del complemento.

Uno de los resultados más intrigantes en nuestro estudio, junto con la inhibición de TNF- α por ambas fases de crecimiento de *N. brasiliensis* e inducción de concentraciones elevadas de IL-10 por la dosis baja exponencial de *Nocardia*, fue indiscutiblemente el efecto supresor generalizado de nocardias opsonizadas con anticuerpos anti-*N. brasiliensis*, sean estos monoclonales anti-P61 o policlonales anti-*N. brasiliensis*, sobre la producción de las cinco citocinas analizadas – IL-10, IL-12, IFN- γ , TNF α e IL-1 – por macrófagos peritoneales no inducidos. Más aún, este fenómeno inhibitorio lo observamos también cuando las células fagocíticas son

pretratadas con los anticuerpos policlonales anti-*Nocardia* y posteriormente son expuestas a *N. brasiliensis*.

La manifestación de altos niveles de anticuerpos anti-*N. brasiliensis* a nivel sistémico en humanos infectados por esta bacteria es indicativa de un proceso infeccioso activo, aunque sigue siendo controversial si este tipo de resistencia humoral resulta benéfica o no para el huésped (333, 334).

Beaman y Maslan (335) supusieron que una aplicación i.p. única de ciclofosfamida a ratones suizos Webster desencadena una supresión de la respuesta humoral mediada por células B que explicaría la mayor susceptibilidad a la infección por *N. asteroides* (cepas 10905, 14759 y GUII-2) y la persistencia de cargas bacterianas superiores en los órganos de animales tratados, en comparación con el grupo que no recibió el medicamento. Sin embargo, la ciclofosfamida es un compuesto alquilante que previene la división celular en forma inespecífica y en un estudio posterior Beaman *et al.* (336) admiten que la inespecificidad de este agente anticancerígeno pudo haber afectado, simultáneamente, a otras estirpes celulares. Así, en un esfuerzo por definir el papel de anticuerpos sintetizados por células B en la respuesta inmune anti-*N. asteroides*, estos investigadores utilizaron ratones CBD2/F1 (CBA/N x DBA2) machos y hembras – los primeros portadores de células B defectuosas incapaces de producir anticuerpos y los segundos productores normales de inmunoglobulinas. En forma inesperada, los resultados mostraron que la presencia de anticuerpos anti-*N. asteroides* en las hembras no potenció la resistencia contra la infección, sino que por el contrario, incrementó su susceptibilidad a una dosis letal i.v. de *N. asteroides*, en comparación a los machos que carecían de inmunoglobulinas anti-*Nocardia*.

Uno de los estudios más sugestivos acerca del papel de los inmunoglobulinas anti-*N. brasiliensis*, desde nuestro punto de vista, es el realizado por Rico *et al.* en 1982 (337) en ratones BALB/c con *N. brasiliensis* UPHG-24. En esta investigación, el desarrollo de actinomicetoma y la pérdida de los trenes infectados fueron intensificados ya sea por la administración de anticuerpos anti-*Nocardia* o de nocardias opsonizadas con estas mismas opsoninas. En adición, la exclusión selectiva de linfocitos B con receptores específicos para esta cepa bacteriana disminuyó el proceso infeccioso, así como también la amputación espontánea de trenes infectados en ratones.

La lesión “brasiliensis” descrita por Folb *et al.* (338) se caracteriza por la presencia de macrófagos espumosos que contienen nocardias en diferentes etapas de degradación, así como de material hialino eosinofílico en la interfase del gránulo de nocardias y los componentes celulares del huésped (187, 338). Conde *et al.* (339) evidencian que este material hialino se debe a la acumulación de complemento y, curiosamente, inmunoglobulinas anti-*N. brasiliensis* en las lesiones granulomatosas actinomicóticas; estos anticuerpos en tejido infectado son detectados aún antes (a los 14 días postinfección) de ser observados en suero (45 días postinfección). En forma interesante, estos autores sugieren que la ausencia de Igs (o complemento) en algunos sitios de los gránulos actinomicóticos podría deberse a la fagocitosis de CIs Igs-Ags de *Nocardia* mediada por receptores para el componente Fc de inmunoglobulinas sobre células inflamatorias efectoras – entre las cuales pudiesen encontrarse, al menos, macrófagos linfocitos B.

Finalmente surge la pregunta controversial: ¿Son los anticuerpos anti-*Nocardia* un elemento inocuo, benéfico o detrimental para el huésped en la resistencia a la infección? Nuestra hipótesis es que la supresión de citocinas ejercida por CIs formados entre inmunoglobulinas de clase G y *N. brasiliensis* podría representar una plausible explicación parcial del efecto negativo/inocuo de los anticuerpos anti-*Nocardia* reportado por otros autores. De hecho, la inducción de IL-10 observada en nuestros experimentos en respuesta a nocardias en estadio de crecimiento virulento (*Figura 37*) pudiera elevar la expresión de los receptores Fcy que captan estos complejos inmunes, imposibilitando así, al menos momentáneamente, no sólo la activación de células macrófágicas que internan CIs, sino también de células fagocíticas mononucleares adyacentes vírgenes (*Figura 38*).

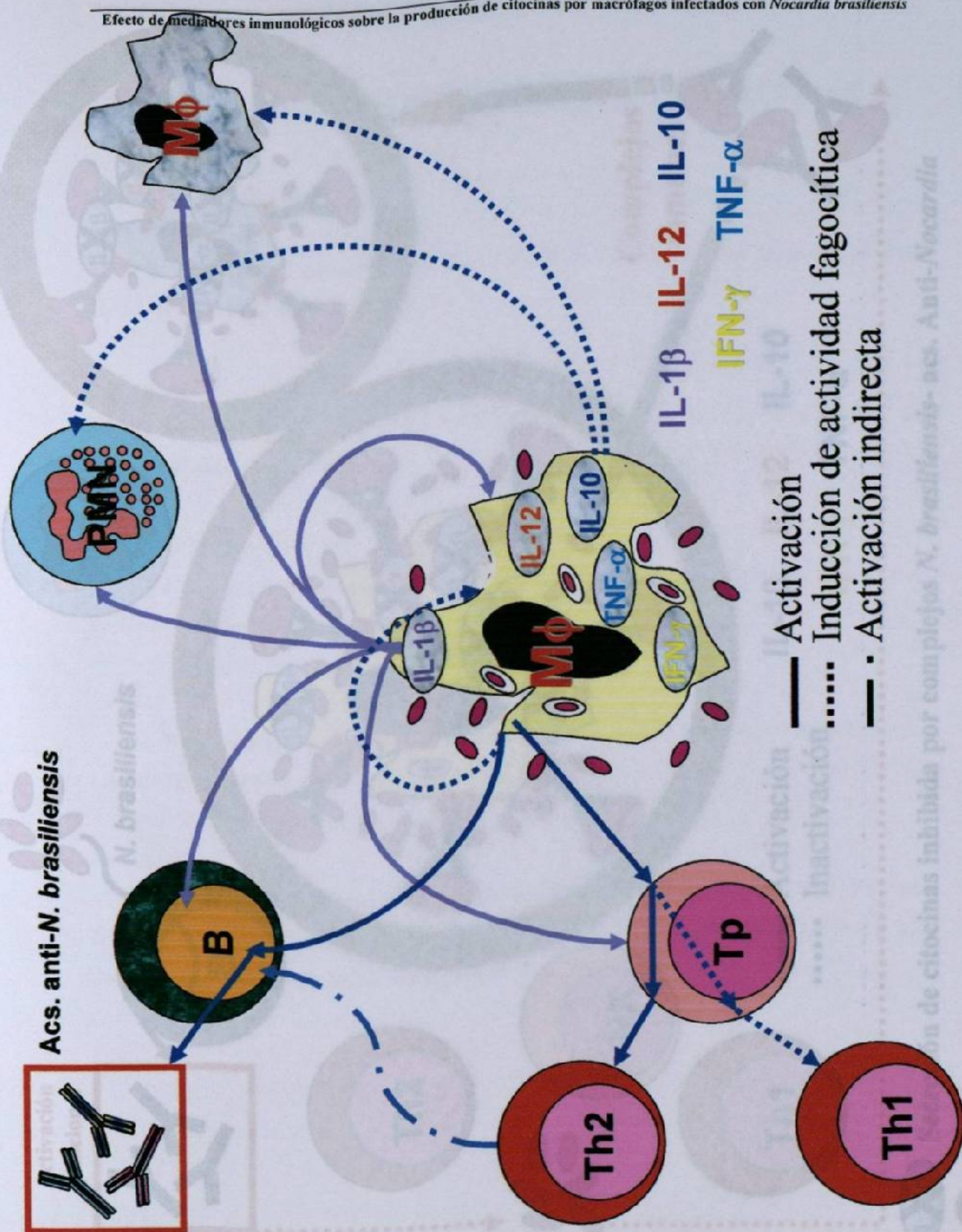


Figura 37. Escenario hipotético de infección de Mφs con una dosis infecciosa inicial baja de *N. brasiliensis* en fase de crecimiento exponencial (virulenta).

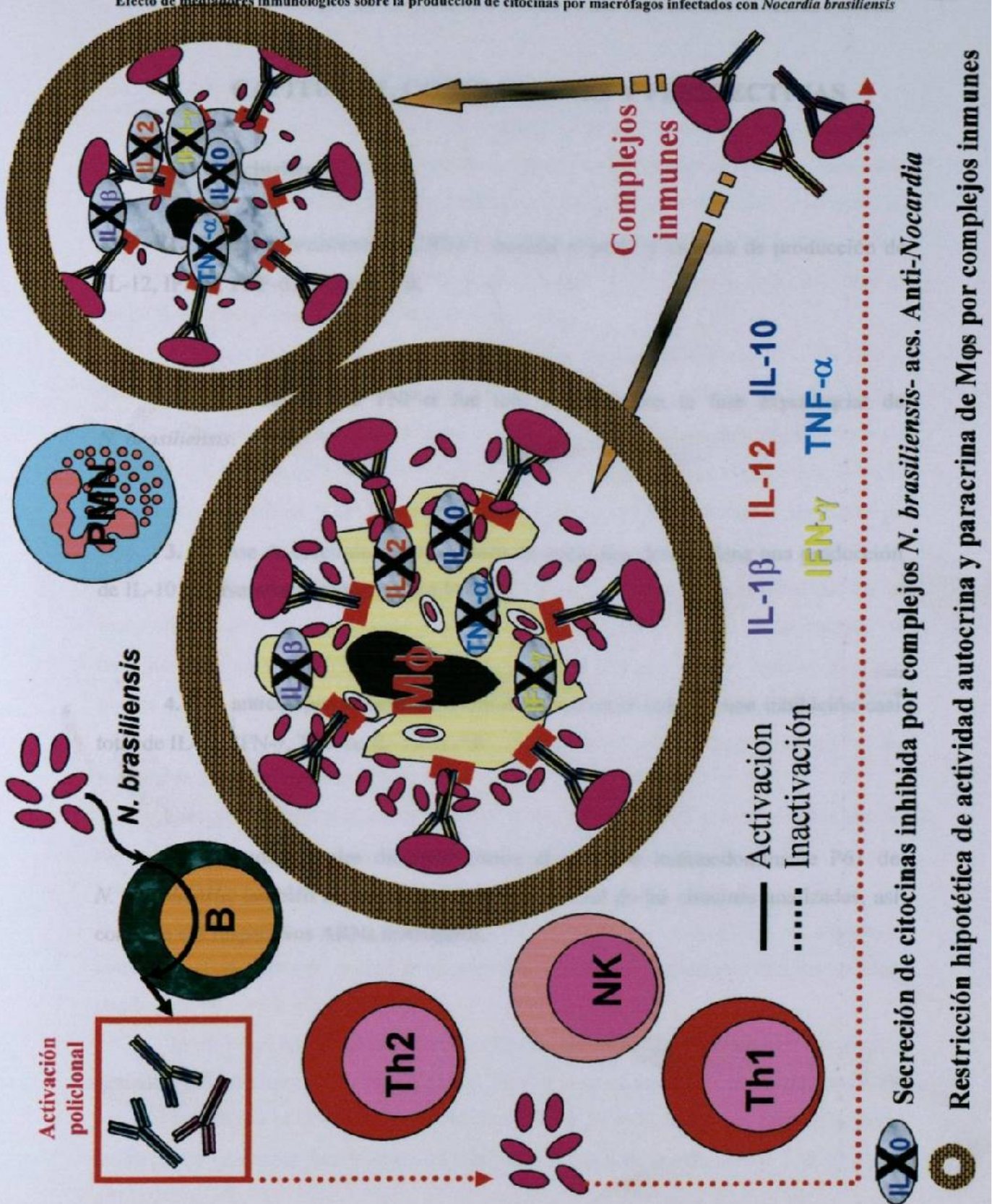


Figura 38. Efecto hipotético de complejos inmunes *N. brasiliensis*-acs. anti-*Nocardia* sobre la producción de citocinas macrofágicas.

CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

5.1 Conclusiones.

1. *Nocardia brasiliensis* HUJEG-1 modula el perfil y cinética de producción de IL-12, IFN- γ , TNF- α , IL-1 e IL-10.

2. La inhibición de TNF- α fue más marcada con la fase exponencial de *N. brasiliensis*.

3. La fase de crecimiento logarítmica de nocardias desencadena una producción de IL-10 inversamente proporcional a la dosis.

4. Los anticuerpos policlonales anti-*N. brasiliensis* inducen una inhibición casi total de IL-12, IFN- γ , TNF- α , IL-1 e IL-10.

5. Los monoclonales dirigidos contra el antígeno inmunodominante P61 de *N. brasiliensis*, también inducen una inhibición general de las citocinas analizadas, así como de sus respectivos ARNs mensajeros.

5.2 Perspectivas.

Es evidente que las incógnitas generadas al final de este trabajo superan en forma cuantitativa cualquier eventual sensación concluyente. Sin embargo, los resultados derivados de nuestros ensayos representan conocimiento concreto que contribuye al esclarecimiento de la naturaleza de la consecuencia de las interacciones tempranas entre *N. brasiliensis* y algunos componentes del sistema inmunológico como los son el macrófago y anticuerpos específicos anti-*Nocardia*.

Sabemos ahora que el patrón y cinética de producción de citocinas (IL-12, IFN- γ , TNF- α , IL-1 e IL-10) por macrófagos infectados *in vitro* con *N. brasiliensis* pueden definirse en base a la combinación concreta de la dosis bacteriana aplicada y su fase de crecimiento, destacando el estadio logarítmico por su singular efecto inhibitorio sobre la producción de TNF- α y por su antípoda inducción de IL-10. Ignoramos sin embargo cuál es la naturaleza del componente o compuesto que posee la fase virulenta de *N. brasiliensis* para provocar tal modulación característica, así como la identidad de su receptor cognado en el fagocito mononuclear. Tampoco sabemos si un campo de citocinas dominado por IL-10, en ausencia de IL-12, IFN- γ y TNF- α , pudiera o no ser nocivo para las funciones nocardicidas del macrófago y afectar negativamente también su maduración fagocítica, adquisición de competencia antígeno-presentadora y su función de activador celular paracrino.

Uno de los resultados más excepcionales fue el hecho que la exposición de macrófagos a anticuerpos anti-*N. brasiliensis* acota la producción de las 5 citocinas a niveles ínfimos sin importar el tamaño del inóculo bacteriano. En adición, cuando el factor variable es la dosis, pero la concentración de los anticuerpos se mantiene constante, el aumento de nocardias disponibles para formar complejos inmunes parece conllevar a un mayor efecto inhibitorio.

Desde luego que existen reportes sobre la inhibición de citocinas por complejos inmunes, más siempre se ha tratado de un efecto parcial, ya que en todos los casos se observó así mismo la inducción de otras citocinas en forma simultánea. En contraparte, nuestros experimentos demuestran una inhibición general de IL-12, IFN- γ , TNF- α , IL-1 e IL-10.

Ya que el balance cuantitativo entre receptores para Fc inhibitorios y activadores se ha involucrado en la índole (proinflamatoria o anti-inflamatoria) de tareas

inmunitarias, sería interesante averiguar cuál es la relación cuantitativa entre estas dos clases de receptores, así como dar seguimiento a su expresión en el macrófago durante la infección con distintas dosis de nocardias y en diferentes fases de crecimiento, o aún en respuesta al tratamiento con bacterias no viables opsonizadas. Quizás sea atractivo también indagar si el efecto inhibitorio sobre la producción de citocinas se realiza por la acción combinada de fagocitosis opsonizante (mediante FcRs) y no opsonizante (mediante CD14, TLRs, etc.).

Con respecto a la activación de macrófagos, sería interesante investigar si, efectivamente, durante el enfrentamiento macrófago-nocardia surgen, en forma simultánea o alternada y en espacios adyacentes, macrófagos con diferentes fenotipos de activación (Tipo 1, Tipo2, Tipo alternativo) que pudieran estar involucrados en las etapas de la formación de granulomas.

TABLA I

**PRODUCCIÓN DE CITOCINAS *IN VITRO* POR MACRÓFAGOS
PERITONEALES INFECTADOS CON DIFERENTES
DOSIS DE *N. brasiliensis* EN FASE DE
CRECIMIENTO ESTACIONARIA.**

		C I T O C I N A (pg/ml ± DS ^a)						
		IL-12	IFN-γ	TNF-α	IL-1	IL-10		
Tiempo de incubación (horas)	0	17±17	0±0	25±11	0±0	68±11	Control Negativo	Relación infecciosa (UFC ^b /Mφ ^c)
	1	14±5	23±6	0±0	0±0	83±6		
	3	9±2	32±7	15±6	0±0	93±4		
	6	12±1	33±9	60±11	0±0	38±9		
	9	18±5	12±3	50±5	0±0	28±13		
	12	22±12	40±9	135±30	0±0	93±11		
	0	17±17	0±0	25±11	0±0	68±11	Baja (100 UFC/Mφ)	
	1	25±14	0±0	75±11	8±3	148±12		
	3	30±6	0±0	110±15	77±8	128±6		
	6	47±9	0±0	130±18	338±30	228±10		
	9	44±13	0±0	260±14	791±12	233±18		
	12	112±12	0±0	155±14	792±21	143±13		
0	17±17	0±0	25±11	0±0	68±11	Media (100 UFC/Mφ)		
1	955±21	1234±12	185±16	115±5	543±8			
3	678±14	767±15	190±6	266±8	333±20			
6	595±30	511±10	390±9	719±17	183±10			
9	475±31	427±15	550±22	949±15	258±19			
12	104±14	224±12	470±7	905±13	193±19			
0	17±17	0±0	25±11	0±0	68±11	Alta (1000 UFC/Mφ)		
1	1894±23	2500±50	2411±11	193±6	1633±35			
3	2277±30	2151±26	2023±8	146±16	2012±19			
6	2225±13	1806±16	853±8	429±26	1656±13			
9	1871±31	1421±23	1016±11	541±36	1012±19			
12	1486±24	1531±17	954±10	462±20	718±18			

^a DS – Desviación estándar.^b UFC – Unidades Formadoras de Colonia.^c Mφ - Macrófago.

TABLA II

**PRODUCCIÓN DE CITOCINAS *IN VITRO* POR MACRÓFAGOS
PERITONEALES INFECTADOS CON DIFERENTES
DOSIS DE *N. brasiliensis* EN FASE DE
CRECIMIENTO EXPONENCIAL.**

		C I T O C I N A (pg/ml ± DS ^a)						
		IL-12	IFN-γ	TNF-α	IL-1	IL-10		
Tiempo de incubación (horas)	0	9±5	0±0	12±6	0±0	117±33	Control Negativo	Relación infecciosa (UFC ^b /Mφ ^c)
	1	25±5	23±6	13±5	0±0	88±6		
	3	18±12	32±7	24±6	0±0	78±34		
	6	16±6	33±9	29±10	0±0	56±17		
	9	24±8	12±3	33±5	0±0	39±21		
	12	8±9	40±9	68±7	0±0	77±8		
	0	39±5	0±0	12±6	0±0	117±33	Baja (100 UFC/Mφ)	
	1	361±19	231±17	169±16	68±8	460±108		
	3	383±47	31±4	269±18	443±22	1223±64		
	6	251±24	0±0	109±10	933±13	1490±26		
	9	137±26	0±0	259±21	933±19	1557±21		
	12	151±39	0±0	272±10	933±42	1590±28		
	0	39±5	0±0	12±6	0±0	117±33	Media (100 UFC/Mφ)	
	1	1399±47	797±18	159±7	0±0	0±0		
	3	789±20	724±19	505±17	731±28	353±17		
	6	599±22	297±20	479±19	941±13	840±36		
	9	535±15	194±20	459±10	945±14	733±5		
	12	669±39	334±20	382±17	966±15	653±36		
	0	39±5	0±0	12±6	0±0	117±33	Alta (1000 UFC/Mφ)	
	1	1823±22	1667±16	445±9	362±12	70±20		
	3	1386±11	631±15	729±18	906±12	117±43		
	6	713±34	464±15	359±17	986±16	70±13		
	9	433±17	274±13	299±26	945±15	30±13		
	12	441±23	57±14	169±8	938±36	0±0		

^a DS – Desviación estándar.^b UFC – Unidades Formadoras de Colonia.^c Mφ – Macrófago.

TABLA III

**PRODUCCIÓN DE CITOCINAS *IN VITRO* POR MACRÓFAGOS
PERITONEALES EXPUESTOS A DIFERENTES DOSIS DE
N. brasiliensis, EN FASE DE CRECIMIENTO
EXPONENCIAL, OPSONIZADAS CON
ANTICUERPOS MONOCLONALES
ANTI-P61.**

C I T O C I N A (pg/ml ± DS ^a)								
		IL-12	IFN-γ	TNF-α	IL-1	IL-10		
Tiempo de incubación (horas)	0	10±4	0±0	0±0	0±0	10±6	Control Negativo	Relación infecciosa (UFC ^b /Mφ ^c)
	1	28±5	0±0	5±5	0±0	0±0		
	3	9±4	8±4	11±5	0±0	12±2		
	6	9±6	6±5	6±6	0±0	11±3		
	0	10±4	0±0	0±0	0±0	10±6	Baja (100 UFC/Mφ)	
	1	28±2	0±0	0±0	0±0	0±0		
	3	31±15	0±0	0±0	0±0	0±0		
	6	40±10	0±0	160±14	114±14	0±0		
	0	10±4	0±0	0±0	0±0	10±6	Media (100 UFC/Mφ)	
	1	25±4	0±0	0±0	0±0	0±0		
	3	137±11	0±0	50±10	21±4	0±0		
	6	81±17	0±0	197±11	190±17	0±0		
0	10±4	0±0	0±0	0±0	10±6	Alta (1000 UFC/Mφ)		
1	632±17	407±20	40±10	0±0	0±0			
3	298±16	130±26	30±4	0±0	0±0			
6	391±20	57±6	113±11	0±0	0±0			

^aDS - Desviación estándar.

^bUFC - Unidades Formadoras de Colonia.

^cMφ - Macrófago.

TABLA IV

PRODUCCIÓN DE CITOCINAS *IN VITRO* POR MACRÓFAGOS PERITONEALES EXPUESTOS A DIFERENTES DOSIS DE *N. brasiliensis*, EN FASE DE CRECIMIENTO EXPONENCIAL, OPSONIZADAS CON ANTICUERPOS POLICLONALES ANTI-*N. brasiliensis*.

C I T O C I N A (pg/ml ± DS^a)								
		IL-12	IFN- γ	TNF- α	IL-1	IL-10		
Tiempo de incubación (horas)	0	10±5	0±0	0±0	0±0	0±0	Control Negativo	Relación infecciosa (UFC^b/Mϕ^c)
	1	28±2	0±0	0±0	0±0	0±0		
	3	9±2	10±4	0±0	0±0	10±5		
	6	9±3	13±5	0±0	0±0	40±5		
	0	10±5	0±0	0±0	0±0	0±0	Baja (100 UFC/Mϕ)	
	1	11±4	0±0	0±0	0±0	0±0		
	3	16±5	0±0	0±0	0±0	0±0		
	6	0±0	0±0	50±13	0±0	5±4		
	0	10±5	0±0	0±0	0±0	0±0	Alta (1000 UFC/Mϕ)	
	1	17±3	0±0	23±6	0±0	0±0		
	3	55±5	0±0	190±10	0±0	10±1		
	6	16±3	0±0	356±30	0±0	40±4		

^a DS – Desviación estándar.

^b UFC – Unidades Formadoras de Colonia.

^c M ϕ - Macrófago.

TABLA V

PRODUCCIÓN DE CITOCINAS *IN VITRO* POR MACRÓFAGOS PERITONEALES PRETRATADOS CON ANTICUERPOS POLICLONALES ANTI-*N. brasiliensis* Y EXPUESTOS A DIFERENTES DOSIS DE *N. brasiliensis* EN FASE DE CRECIMIENTO EXPONENCIAL

C I T O C I N A (pg/ml ± DS ^a)								
		IFN-γ	TNF-α	IL-1α	IL-1β	IL-10		
Tiempo de incubación (horas)	0	0±0	0±0	14±5	29±7	0±0	Control Negativo	Relación infecciosa (UFC ^b /Mφ ^c)
	1	0±0	24±7	23±6	12±11	23±7		
	3	0±0	10±10	10±3	26±8	22±14		
	0	0±0	0±0	14±5	29±7	0±0	Media (100 UFC/Mφ)	
	1	0±0	0±0	68±8	92±8	0±0		
	3	60±10	0±0	305±13	473±13	0±0		
	0	0±0	0±0	14±5	29±7	0±0	Alta (1000 UFC/Mφ)	
	1	60±13	0±0	99±14	36±5	0±0		
	3	60±10	0±0	133±8	89±8	0±0		

^aDS - Desviación estándar.

^bUFC - Unidades Formadoras de Colonia.

^cMφ - Macrófago.

BIBLIOGRAFÍA

1. **Koch AL.** The origin of intracellular and intercellular pathogens. *Quarterly Review of Biology.* 1995. 70(4):423-15).
2. **Mahmoud AA.** The challenge of intracellular pathogens. *N Engl J Med.* 1992. 326(11):761-2.
3. **Vidal SM, Malo D, Vogan K, Skamene E, Gros P.** Natural resistance to infection with intracellular parasites: isolation of a candidate for Bcg. *Cell.* 1993. 73(3):469-85.
4. **Yamashiro S, Kamohara H, Wang JM, Yang D, Gong WH, Yoshimura T.** Phenotypic and functional change of cytokine-activated neutrophils: inflammatory neutrophils are heterogeneous and enhance adaptive immune responses. *J Leukoc Biol.* 2001. 69(5):698-704. Review.
5. **de Jong EC, Vieira PL, Kalinski P, Schuitemaker JH, Tanaka Y, Wierenga EA, Yazdanbakhsh M, Kapsenberg ML.** Microbial compounds selectively induce Th1 cell-promoting or Th2 cell-promoting dendritic cells in vitro with diverse th cell-polarizing signals. *J Immunol.* 2002. 168(4):1704-9.
6. **Jankovic D, Liu Z, Gause WC.** Th1- and Th2-cell commitment during infectious disease: asymmetry in divergent pathways. *Trends Immunol.* 2001 Aug;22(8):450-7. Review.
7. **Kalinski P, Hilkens CM, Wierenga EA, Kapsenberg ML.** T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal. *Immunol Today.* 1999. 20(12):561-7. Review.
8. **Adams DO, Hamilton TA.** The cell biology of macrophage activation. *Annu Rev Immunol.* 1984;2:283-318. Review.
9. **Rojas M, Olivier M, Gros P, Barrera LF, Garcia LF.** TNF-alpha and IL-10 modulate the induction of apoptosis by virulent *Mycobacterium tuberculosis* in murine macrophages. *J Immunol.* 1999;162(10):6122-31.
10. **Baetselier PD, Namangala B, Noel W, Brys L, Pays E, Beschin A.** Alternative versus classical macrophage activation during experimental African trypanosomiasis. *Int J Parasitol.* 2001;31(5-6):575-87. Review.
11. **Mossler DM.** The many faces of macrophage activation. *J Leukoc Biol.* 2003;73(2):209-12. Review.
12. **Tzachanis D, Berezovskaya A, Nadler LM, Boussiotis VA.** Blockade of B7/CD28 in mixed lymphocyte reaction cultures results in the generation of alternatively activated macrophages, which suppress T-cell responses. *Blood.* 2002;99(4):1465-73.
13. **Mills CD, Kincaid K, Alt JM, Heilman MJ, Hill AM.** M-1/M-2 macrophages and the T:1/Th2 paradigm. *J Immunol.* 2000;164(12):6166-73.
14. **Sweet MJ, Hume DA.** Endotoxin signal transduction in macrophages. *J Leukoc Biol.* 1996;60(1):8-26. Review.
15. **Gaasterland T, Schoolnik G, Nathan C.** Reprogramming of the macrophage transcriptome in response to interferon-gamma and *Mycobacterium tuberculosis*: signaling roles of nitric oxide synthase-2 and phagocyte oxidase. *J Exp Med.* 2001;194(8):1123-40.
16. **van Furth R.** Origin and turnover of monocytes and macrophages. *Curr Top Pathol.* 1989 79:125-150.

17. **Kennedy DW, Abkowitz JL.** Mature monocytic cells enter tissues and engraft. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(25):14944-9.
18. **Beckman EM, Porcelli SA, Morita CT, Behar SM, Furlong ST, Brenner MB.** Recognition of a lipid antigen by CD1-restricted alpha beta⁺ T cells. *Nature.* 1994;372(6507):691-4.
19. **Porcelli S, Morita CT, Brenner MB.** CD1b restricts the response of human CD4-8-T lymphocytes to a microbial antigen. *Nature.* 1992;360(6404):593-7.
20. **Sieling PA, Chatterjee D, Porcelli SA, Prigozy TI, Mazzaccaro RJ, Soriano T, Bloom BR, Brenner MB, Kronenberg M, Brennan PJ, et al.** CD1-restricted T cell recognition of microbial lipoglycan antigens. *Science.* 1995;269(5221):227-30.
21. **Jones BW, Means TK, Heldwein KA, Keen MA, Hill PJ, Belisle JT, Fenton MJ.** Different Toll-like receptor agonists induce distinct macrophage responses. *J Leukoc Biol.* 2001;69(6):1036-44.
22. **Visintin A, Mazzoni A, Spitzer JA, Segal DM.** Secreted MD-2 is a large polymeric protein that efficiently confers lipopolysaccharide sensitivity to Toll-like receptor 4. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(21):12156-61. Epub 2001 Oct 02.
23. **Wagner H.** Toll meets bacterial CpG-DNA. *Immunity.* 2001;14(5):499-502. Review.
24. **Wright SD.** Toll, a new piece in the puzzle of innate immunity. *J Exp Med.* 1999; 189(4): 605-9.
25. **Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Galanos C, Freudenberg M, Ricciardi-Castagnoli P, Layton B, Beutler B.** Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in *Tlr4* gene. *Science.* 1998;282(5396):2085-8.
26. **Hirschfeld M, Kirschning CJ, Schwandner R, Wesche H, Weis JH, Wooten RM, Weis JJ.** Cutting edge: inflammatory signaling by *Borrelia burgdorferi* lipoproteins is mediated by toll-like receptor 2. *J Immunol.* 1999;163(5):2382-6.
27. **Bauer S, Kirschning CJ, Hacker H, Redecke V, Hausmann S, Akira S, Wagner H, Lipford GB.** Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001; 98(16): 9237-42. Epub 2001 Jul 24.
28. **Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, Hawn TR, Yi EC, Goodlett DR, Eng JK, Akira S, Underhill DM, Aderem A.** The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature.* 2001;410(6832):1099-103.
29. **Takeuchi O, Kawai T, Muhlradt PF, Morr M, Radolf JD, Zychlinsky A, Takeda K, Akira S.** Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. *Int Immunol.* 2001;13(7):933-40.
30. **Lemaitre B, Reichhart JM, Hoffmann JA.** *Drosophila* host defense: differential induction of antimicrobial peptide genes after infection by various classes of microorganisms. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997; 94(26): 14614-9.
31. **Nau GJ, Schlesinger A, Richmond JF, Young RA.** Cumulative Toll-like receptor activation in human macrophages treated with whole bacteria. *J Immunol.* 2003; 170(10): 5203-9.
32. **Ozinsky A, Underhill DM, Fontenot JD, Hajjar AM, Smith KD, Wilson CB, Schroeder L, Aderem A.** The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000; 97(25): 13766-71.

33. **Takeuchi O, Hoshino K, Kawai T, Sanjo H, Takada H, Ogawa T, Takeda K, Akira S.** Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity*. 1999; 11(4): 443-51.
34. **Tauszig S, Jouanguy E, Hoffmann JA, Imler JL.** Toll-related receptors and the control of antimicrobial peptide expression in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(19):10520-5.
35. **Reiling N, Holscher C, Fehrenbach A, Kroger S, Kirschning CJ, Goyert S, Ehlers S.** Cutting edge: Toll-like receptor (TLR)2- and TLR4-mediated pathogen recognition in resistance to airborne infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol*. 2002; 169(7): 3480-4.
36. **Wooten RM, Ma Y, Yoder RA, Brown JP, Weis JH, Zachary JF, Kirschning CJ, Weis JJ.** Toll-like receptor 2 is required for innate, but not acquired, host defense to *Borrelia burgdorferi*. *J Immunol*. 2002; 168(1): 348-55.
37. **Reiling N, Blumenthal A, Flad HD, Ernst M, Ehlers S.** Mycobacteria-induced TNF-alpha and IL-10 formation by human macrophages is differentially regulated at the level of mitogen-activated protein kinase activity. *J Immunol*. 2001;167(6):3339-45.
38. **Thoma-Uszynski S, Stenger S, Takeuchi O, Ochoa MT, Engele M, Sieling PA, Barnes PF, Rollinghoff M, Bolcskei PL, Wagner M, Akira S, Norgard MV, Belisle JT, Godowski PJ, Bloom BR, Modlin RL.** Induction of direct antimicrobial activity through mammalian toll-like receptors. *Science*. 2001; 291(5508): 1544-7.
39. **May MJ, Ghosh S.** Signal transduction through NF-kappa B. *Immunol Today*. 1998;19(2):80-8. Review.
40. **Demuth A, Goebel W, Beuscher HU, Kuhn M.** Differential regulation of cytokine and cytokine receptor mRNA expression upon infection of bone marrow-derived macrophages with *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun*. 1996;64(9):3475-83.
41. **Fleming SD, Leenen PJ, Freed JH, Campbell PA.** Surface interleukin-10 inhibits listericidal activity by primary macrophages. *J Leukoc Biol*. 1999;66(6):961-7.
42. **Pieters J, Lekkovits I.** Trafficking of mycobacteria inside macrophages. *Basel Institute for Immunology*. 1997. Annual Report. p.30, publication no. 2900.
43. **Astarie-Dequcker C, N'Diaye EN, Le Cabec V, Rittig MG, Prandi J, Maridonneau-Parini I.** The mannose receptor mediates uptake of pathogenic and nonpathogenic mycobacteria and bypasses bactericidal responses in human macrophages. *Infect Immun*. 1999;67(2):469-77.
44. **Nigou J, Zelle-Rieser C, Gilleron M, Thurnher M, Puzo G.** Mannosylated lipoarabinomannans inhibit IL-12 production by human dendritic cells: evidence for a negative signal delivered through the mannose receptor. *J Immunol*. 2001;166(12):7477-85.
45. **Raveh D, Kruskal BA, Farland J, Ezekowitz RA.** Th1 and Th2 cytokines cooperate to stimulate mannose-receptor-mediated phagocytosis. *J Leukoc Biol*. 1998;64(1):108-13.
46. **Roitt IM.** The basis of immunology. In *Essential Immunology*. 1994. Blackwell Scientific, Oxford.
47. **Armstrong JA, Hart PD.** Response to cultured macrophages to *M. tuberculosis* with observations of fusion of lysosomes with phagosomes. *J Exp Med*. 1971 134:713-740.

48. **Garcia-Del Portillo F.** Pathogenic interference with host vacuolar trafficking. *Trends Microbiol.* 1999;7(12):467-9. Review.
49. **Rathman M, Barker LP, Falkow S.** The unique trafficking pattern of *Salmonella typhimurium*-containing phagosomes in murine macrophages is dependent of the mechanism of bacterial entry. *Infect Immun.* 1997 65(4):1475-1485.
50. **Butcher BA, Deukers EY.** Mechanism of entry determines the ability of *Toxoplasma gondii* to inhibit macrophage proinflammatory cytokine production. *Infect Immun.* 2002;70(9):5216-24.
51. **Drevets DA, Canono BP, Campbell PA.** Listericidal and nonlistericidal mouse macrophages differ in complement receptor type 3-mediated phagocytosis of *L. monocytogenes* and in preventing escape of the bacteria into the cytoplasm. *J Leukoc Biol.* 1992;52(1):70-9.
52. **Sturgill-Koszycki S, Schaible UE, Russell DG.** Mycobacterium-containing phagosomes are accessible to early endosomes and reflect a transitional state in normal phagosome biogenesis. *EMBO J.* 1996;15(24):6960-8.
53. **Oh YK, Swanson JA.** Different fates of phagocytosed particles after delivery into macrophage lysosomes. *J Cell Biol.* 1996;132(4):585-93.
54. **Dramsı S, Cossart P.** Intracellular pathogens and the actin cytoskeleton. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1998;14:137-66. Review.
55. **Armstrong JA, Hart PD.** Phagosome-lysosome interactions in cultured macrophages infected with virulent tubercle bacilli. Reversal of the usual nonfusion pattern and observations on bacterial survival. *J Exp Med.* 1975;142(1):1-16.
56. **Sinai A, Joiner KA.** Safe haven: the cell biology of nonfusogenic pathogen vacuoles. *Annu Rev Microbiol.* 1997;51:415-62. Review.
57. **Sturgill-Koszycki S, Schlesinger PH, Chakraborty P, Haddix PL, Collins HL, Fok AK, Allen RD, Gluck SL, Heuser J, Russell DG.** Lack of acidification in Mycobacterium phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton-ATPase. *Science.* 1994;263(5147):678-81. Erratum in: *Science* 1994;263(5152):1359.
58. **Xu S, Cooper A, Sturgill-Koszycki S, van Heyningen T, Chatterjee D, Orme I, Allen P, Russell DG.** Intracellular trafficking in Mycobacterium tuberculosis and Mycobacterium avium-infected macrophages. *J Immunol.* 1994;153(6):2568-78.
59. **Fratti RA, Backer JM, Gruenberg J, Corvera S, Deretic V.** Role of phosphatidylinositol 3-kinase and Rab5 effectors in phagosomal biogenesis and mycobacterial phagosome maturation arrest. *J Cell Biol.* 2001;154(3):631-44.
60. **Fratti RA, Vergne I, Chua J, Skidmore J, Deretic V.** Regulators of membrane trafficking and Mycobacterium tuberculosis phagosome maturation block. *Electrophoresis.* 2000;21(16):3378-85. Review.
61. **Callen JP, Kingman J.** Disseminated cutaneous *Nocardia brasiliensis* infection. *Pediatr Dermatol.* 1984;2(1):49-51.
62. **Vlahos CJ, Matter WF, Hui KY, Brown RF.** A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *J Biol Chem.* 1994;269(7):5241-8.
63. **Beatty WL, Rhoades ER, Ullrich HJ, Chatterjee D, Heuser JE, Russell DG.** Trafficking and release of mycobacterial lipids from infected macrophages. *Traffic.* 2000;1(3):235-47.

64. Zhang H, Niesel DW, Peterson JW, Klimpel GR. Lipoprotein release by bacteria: potential factor in bacterial pathogenesis. *Infect Immun*. 1998;66(11):5196-201.
65. Dijstelbloem HM, van de Winkel JG, Kallenberg CG. Inflammation in autoimmunity: receptors for IgG revisited. *Trends Immunol*. 2001;22(9):510-6. Review.
66. Rascu A, Repp R, Westerdaal NA, Kalden JR, van de Winkel JG. Clinical relevance of Fc gamma receptor polymorphisms. *Ann N Y Acad Sci*. 1997;815:282-95. Review.
67. van der Pol W, van de Winkel JG. IgG receptor polymorphisms: risk factors for disease. *Immunogenetics*. 1998;48(3):222-32. Review.
68. Ghazizadeh S, Bolen JB, Fleit HB. Physical and functional association of Src-related protein tyrosine kinases with Fc gamma RII in monocytic THP-1 cells. *J Biol Chem*. 1994;269(12):8878-84.
69. Kurosaki T. Genetic analysis of B cell antigen receptor signaling. *Annu Rev Immunol*. 1999;17:555-92. Review.
70. Weiss A, Littman DR. Signal transduction by lymphocyte antigen receptors. *Cell*. 1994;76(2):263-74. Review.
71. Ferguson KM, Lemmon MA, Schlessinger J, Sigler PB. Structure of the high affinity complex of inositol trisphosphate with a phospholipase C pleckstrin homology domain. *Cell*. 1995;83(6):1037-46.
72. Salim K, Bottomley MJ, Querfurth E, Zvelebil MJ, Gout I, Scaife R, Margolis RL, Gigg R, Smith CI, Driscoll PC, Waterfield MD, Panayotou G. Distinct specificity in the recognition of phosphoinositides by the pleckstrin homology domains of dynamin and Bruton's tyrosine kinase. *EMBO J*. 1996;15(22):6241-50.
73. Song X, Shapiro S, Goldman DL, Casadevall A, Scharff M, Lee SC. Fc gamma receptor I- and III-mediated macrophage inflammatory protein 1alpha induction in primary human and murine microglia. *Infect Immun*. 2002;70(9):5177-84.
74. Sattler M, Verma S, Byrne CH, Shrikhande G, Winkler T, Algate PA, Rohrschneider LR, Griffin JD. BCR/ABL directly inhibits expression of SHIP, an SH2-containing polyinositol-5-phosphatase involved in the regulation of hematopoiesis. *Mol Cell Biol*. 1999;19(11):7473-80.
75. Kalergis AM, Ravetch JV. Inducing tumor immunity through the selective engagement of activating Fc gamma receptors on dendritic cells. *J Exp Med*. 2002;195(12):1653-9.
76. Weinshank RL, Luster AD, Ravetch JV. Function and regulation of a murine macrophage-specific IgG Fc receptor, Fc gamma R-alpha. *J Exp Med*. 1988;167(6):1909-25.
77. Samuelsson A, Towers TL, Ravetch JV. Anti-inflammatory activity of IVIG mediated through the inhibitory Fc receptor. *Science*. 2001;291(5502):484-6.
78. Barrionuevo P, Beigier-Bompadre M, De La Barrera S, Alves-Rosa MF, Fernandez G, Palermo MS, Isturiz MA. Immune complexes (IC) down-regulate the basal and interferon-gamma-induced expression of MHC class II on human monocytes. *Clin Exp Immunol*. 2001;125(2):251-7.
79. Karlsson MC, Getahun A, Heyman B. Fc gamma RIIB in IgG-mediated suppression of antibody responses: different impact in vivo and in vitro. *J Immunol*. 2001;167(10):5558-64.

80. **Raley MJ, Lennartz MR, Loegering DJ.** A phagocytic challenge with IgG-coated erythrocytes depresses macrophage respiratory burst and phagocytic function by different mechanisms. *J Leukoc Biol.* 1999;66(5):803-8.
81. **Stangel M, Toyka KV, Gold R.** Mechanisms of high-dose intravenous immunoglobulins in demyelinating diseases. *Arch Neurol.* 1999;56(6):661-3. Review.
82. **Eze MO, Yuan L, Crawford RM, Paranaivitana CM, Hadfield TL, Bhattacharjee AK, Warren RL, Hoover DL.** Effects of opsonization and gamma interferon on growth of *Brucella melitensis* 16M in mouse peritoneal macrophages in vitro. *Infect Immun.* 2000;68(1):257-63.
83. **Sutterwala FS, Noel GJ, Clynes R, Mosser DM.** Selective suppression of interleukin-12 induction after macrophage receptor ligation. *J Exp Med.* 1997;185(11):1977-85.
84. **Sutterwala FS, Noel GJ, Salgame P, Mosser DM.** Reversal of proinflammatory responses by ligating the macrophage Fc gamma receptor type I. *J Exp Med.* 1998;188(1):217-22.
85. **Anderson CF, Mosser DM.** A novel phenotype for an activated macrophage: the type 2 activated macrophage. *J Leukoc Biol.* 2002;72(1):101-6.
86. **Anderson CF, Mosser DM.** Cutting edge: biasing immune responses by directing antigen to macrophage Fc gamma receptors. *J Immunol.* 2002;168(8):3697-701.
87. **Desmedt M, Rottiers P, Dooms H, Grooten J.** Macrophages induce cellular immunity by activating Th1 cell responses and suppressing Th2 cell responses. *J Immunol.* 1998;160:5300-8.
88. **Sutterwala FS, Mosser DM.** The taming of IL-12: suppressing the production of proinflammatory cytokines. *J Leukoc Biol.* 1999;65(5):543-51. Review.
89. **Bach EA, Aguet M, Schreiber RD.** The IFN gamma receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling. *Annu Rev Immunol.* 1997;15:563-91. Review.
90. **Fairchild KD, Hudson RG, Douglas SD, McKenzie SE, Polin RA.** Effect of gamma interferon on expression of Fc gamma receptors in monocytes of newborn infants and adults. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1996;3(4):464-9.
91. **te Velde AA, de Waal Malefijt R, Huijbens RJ, de Vries JE, Figdor CG.** IL-10 stimulates monocyte Fc gamma R surface expression and cytotoxic activity. Distinct regulation of antibody-dependent cellular cytotoxicity by IFN-gamma, IL-4, and IL-10. *J Immunol.* 1992;149(12):4048-52.
92. **Feghali CA, Wright TM.** Cytokines in acute and chronic inflammation. *Front Biosci.* 1997;2:d12-26.
93. **Arend WP, Malyak M, Guthridge CJ, Gabay C.** Interleukin-1 receptor antagonist: role in biology. *Annu Rev Immunol.* 1998;16:27-55. Review.
94. **Dinarello CA.** Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism. *Blood.* 1991;77(8):1627-52. Review.
95. **Le J, Vilcek J.** Tumor necrosis factor and interleukin 1: cytokines with multiple overlapping biological activities. *Lab Invest.* 1987;56(3):234-48. Review.
96. **Tracey KJ, Cerami A.** Tumor necrosis factor: a pleiotropic cytokine and therapeutic target. *Annu Rev Med.* 1994;45:491-503. Review.
97. **Beaman MH, Hunter CA, Remington JS.** Enhancement of intracellular replication of *Toxoplasma gondii* by IL-6. Interactions with IFN-gamma and TNF-alpha. *J Immunol.* 1994;153(10):4583-7.

98. **Borden EC, Chin P.** Interleukin-6: A cytokine with potential diagnostic and therapeutic roles. *J Lab Clin Med.* 1994 123(6):824-9.
99. **Tsuji H, Mukaida N, Harada A, Kaneko S, Matsushita E, Nakanuma Y, Tsutsui H, Okamura H, Nakanishi K, Tagawa Y, Iwakura Y, Kobayashi K, Matsushima K.** Alleviation of lipopolysaccharide-induced acute liver injury in *Propionibacterium acnes*-primed IFN-gamma-deficient mice by a concomitant reduction of TNF-alpha, IL-12, and IL-18 production. *J Immunol.* 1999;162(2):1049-55.
100. **DeKrey GK, Lima HC, Titus RG.** Analysis of the immune responses of mice to infection with *Leishmania braziliensis*. *Infect Immun.* 1998;66(2):827-9.
101. **Chong C, Bost KL, Clements JD.** Differential production of interleukin-12 mRNA by murine macrophages in response to viable or killed *Salmonella* spp. *Infect Immun.* 1996;64(4):1154-60.
102. **Jacobs P, Radzioch D, Stevenson MM.** A Th1-associated increase in tumor necrosis factor alpha expression in the spleen correlates with resistance to blood-stage malaria in mice. *Infect Immun.* 1996;64(2):535-41.
103. **Dinarello CA, Thompson RC.** Blocking IL-1: interleukin 1 receptor antagonist in vivo and in vitro. *Immunol Today.* 1991;12(11):404-10. Review.
104. **Gery I, Waksman BH.** Potentiation of the T-lymphocyte response to mitogens. II. The cellular source of potentiating mediator(s). *J Exp Med.* 1972;136(1):143-55.
105. **Bach F, Hirschhorn K, Schreiberman RR, Ripps C.** Immunological responses of human lymphocytes in vitro. *Ann N Y Acad Sci.* 1964;120:299-302.
106. **Coley WB.** The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas. With a report of ten original cases. 1893. *Clin Orthop.* 1991;(262):3-11.
107. **Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B.** An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1975;72(9):3666-70.
108. **Cerami A, Beutler B.** The role of cachectin/TNF in endotoxic shock and cachexia. *Immunol Today.* 1988;9(1):28-31. Review.
109. **Eskdale J, Gallagher G, Verweij CL, Keijsers V, Westendorp RG, Huizinga TW.** Interleukin 10 secretion in relation to human IL-10 locus haplotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(16):9465-70.
110. **Baba T, Natsuhara Y, Kaneda K, Yano I.** Granuloma formation activity and mycolic acid composition of mycobacterial cord factor. *Cell Mol Life Sci.* 1997;53(3):227-32.
111. **Hamasaki N, Isowa K, Kamada K, Terano Y, Matsumoto T, Arakawa T, Kobayashi K, Yano I.** In vivo administration of mycobacterial cord factor (Trehalose 6,6'-dimycolate) can induce lung and liver granulomas and thymic atrophy in rabbits. *Infect Immun.* 2000;68(6):3704-9.
112. **Sugawara I, Udagawa T, Hua SC, Reza-Gholizadeh M, Otomo K, Saito Y, Yamada H.** Pulmonary granulomas of guinea pigs induced by inhalation exposure of heat-treated BCG Pasteur, purified trehalose dimycolate and methyl ketomycolate. *J Med Microbiol.* 2002;51(2):131-7.
113. **Perez RL, Roman J, Roser S, Little C, Olsen M, Indrigo J, Hunter RL, Actor JK.** Cytokine message and protein expression during lung granuloma

- formation and resolution induced by the mycobacterial cord factor trehalose-6,6'-dimycolate. *J Interferon Cytokine Res.* 2000;20(9):795-804.
114. **Ichiyasu H, Suga M, Matsukawa A, Iyonaga K, Mizobe T, Takahashi T, Ando M.** Functional roles of MCP-1 in *Propionibacterium acnes*-induced, T cell-mediated pulmonary granulomatosis in rabbits. *J Leukoc Biol.* 1999; 65(4): 482-91.
115. **Hogan LH, Markofski W, Bock A, Barger B, Morrissey JD, Sandor M.** *Mycobacterium bovis* BCG-induced granuloma formation depends on gamma interferon and CD40 ligand but does not require CD28. *Infect Immun.* 2001;69(4):2596-603.
116. **Yang X, Gartner J, Zhu L, Wang S, Brunham RC.** IL-10 gene knockout mice show enhanced Th1-like protective immunity and absent granuloma formation following *Chlamydia trachomatis* lung infection. *J Immunol.* 1999;162(2):1010-7.
117. **Harraga S, Godot V, Bresson-Hadni S, Manton G, Vuitton DA.** Profile of cytokine production within the periparasitic granuloma in human alveolar echinococcosis. *Acta Trop.* 2003;85(2):231-6.
118. **Hansch HC, Smith DA, Mielke ME, Hahn H, Bancroft GJ, Ehlers S.** Mechanisms of granuloma formation in murine *Mycobacterium avium* infection: the contribution of CD4+ T cells. *Int Immunol.* 1996;8(8):1299-310.
119. **Gobert AP, Daulouede S, Lepoivre M, Boucher JL, Bouteille B, Buguet A, Cespuglio R, Veyret B, Vincendeau P.** L-Arginine availability modulates local nitric oxide production and parasite killing in experimental trypanosomiasis. *Infect Immun.* 2000;68(8):4653-7.
120. **Stein M, Keshav S, Harris N, Gordon S.** Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *J Exp Med.* 1992;176(1):287-92.
121. **Hess M, Modolell M, La Flamme AC, Schito M, Fuentes JM, Cheever AW, Pearce EJ, Wynn TA.** Differential regulation of nitric oxide synthase-2 and arginase-1 by type 1/type 2 cytokines in vivo: granulomatous pathology is shaped by the pattern of L-arginine metabolism. *J Immunol.* 2001;167(11):6533-44.
122. **Bastos KR, Alvarez JM, Marinho CR, Rizzo LV, Lima MR.** Macrophages from IL-12p40-deficient mice have a bias toward the M2 activation profile. *J Leukoc Biol.* 2002;71(2):271-8.
123. **Virgin HW 4th, Kurt-Jones EA, Wittenberg GF, Unanue ER.** Immune complex effects on murine macrophages. II. Immune complex effects on activated macrophages cytotoxicity, membrane IL 1, and antigen presentation. *J Immunol.* 1985;135(6):3744-9.
124. **Gerber JS, Mosser DM.** Reversing lipopolysaccharide toxicity by ligating the macrophage Fc gamma receptors. *J Immunol.* 2001;166(11):6861-8.
125. **Hamerman JA, Aderem A.** Functional transitions in macrophages during in vivo infection with *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin. *J Immunol.* 2001;167(4):2227-33.
126. **Hazenbos WL, Gessner JE, Hofhuis FM, Kuipers H, Meyer D, Heijnen IA, Schmidt RE, Sandor M, Capel PJ, Daeron M, van de Winkel JG, Verbeek JS.** Impaired IgG-dependent anaphylaxis and Arthus reaction in Fc gamma RIII (CD16) deficient mice. *Immunity.* 1996;5(2):181-8.

127. **Welsh O, Salinas MC, Rodriguez MR.** Mycetoma. 1994 Chapter 74. Infectious diseases, Fifth Edition.
128. **Skamene E, Schurr E, Gros P.** Infection genomics: Nramp1 as a major determinant of natural resistance to intracellular infections. *Annu Rev Med.* 1998;49:275-87.
129. **Skamene E.** Genetic control of susceptibility to infections with intracellular pathogens. *Pathol Biol (Paris).* 1998;46(9):689-92. Review.
130. **Beadles TA, Land GA, Knezek DJ.** An ultrastructural comparison of the cell envelopes of selected strains of *Nocardia asteroides* and *Nocardia brasiliensis*. *Mycopathologia.* 1980;70(1):25-32.
131. **Beaman BL, Maslan S.** Virulence of *Nocardia asteroides* during its growth cycle. *Infect Immun.* 1978;20(1):290-5.
132. **Beaman BL, Moring SE, Ionedá T.** Effect of growth stage on mycolic acid structure in cell walls of *Nocardia asteroides* GUH-2. *J Bacteriol.* 1988;170(3):1137-42.
133. **Beaman BL, Moring SE.** Relationship among cell wall composition, stage of growth, and virulence of *Nocardia asteroides* GUH-2. *Infect Immun.* 1988;56(3):557-63.
134. **Beaman BL.** Structural and biochemical alterations of *Nocardia asteroides* cell walls during its growth cycle. *J Bacteriol.* 1975;123(3):1235-53.
135. **Beaman BL.** Ultrastructural analysis of growth of *Nocardia asteroides* during invasion of the murine brain. *Infect Immun.* 1993;61(1):274-83.
136. **Black CM, Beaman BL, Donovan RM, Goldstein E.** Effect of virulent and less virulent strains of *Nocardia asteroides* on acid-phosphatase activity in alveolar and peritoneal macrophages maintained in vitro. *J Infect Dis.* 1983;148(1):117-24.
137. **Black CM, Paliescheskey M, Beaman BL, Donovan RM, Goldstein E.** Acidification of phagosomes in murine macrophages: blockage by *Nocardia asteroides*. *J Infect Dis.* 1986;154(6):952-8.
138. **Davis-Scibienski C, Beaman BL.** Interaction of *Nocardia asteroides* with rabbit alveolar macrophages: effect of growth phase and viability on phagosome-lysosome fusion. *Infect Immun.* 1980;29(1):24-9.
139. **Beaman BL, Black CM, Doughty F, Beaman L.** Role of superoxide dismutase and catalase as determinants of pathogenicity of *Nocardia asteroides*: importance in resistance to microbicidal activities of human polymorphonuclear neutrophils. *Infect Immun.* 1985;47(1):135-41.
140. **Filice GA, Beaman BL, Krick JA, Remington JS.** Effects of human neutrophils and monocytes on *Nocardia asteroides*: failure of killing despite occurrence of the oxidative metabolic burst. *J Infect Dis.* 1980;142(3):432-8.
141. **Filice GA.** Resistance of *Nocardia asteroides* to oxygen-dependent killing by neutrophils. *J Infect Dis.* 1983;148(5):861-7.
142. **Hayashi S, Masuno T, Hosoe S, Kawase I, Sakatani M, Ogura T, Kishimoto S, Yamamura Y.** Augmented production of colony-stimulating factor in C3H/HeN mice immunized with *Nocardia rubra* cell wall skeleton. *Infect Immun.* 1986;52(1):128-33.
143. **Inamura N, Nakahara K, Kuroda Y, Yamaguchi I, Aoki H, Kohsaka M.** Effect of *Nocardia rubra* cell wall skeleton on interleukin 1 production from mouse peritoneal macrophages. *Int J Immunopharmacol.* 1988;10(5):547-54.

144. **Silva CL, Gesztesi JL, Moneda T.** Trehalose mycolates from *Nocardia asteroides*, *N. farcinica*, *Gordona lentrifragmenta*, and *G. Bronchialis*. *Chem. Phys. Lipids*. 24 17-25. (1979).
145. **Chan SH, Perussia B, Gupta JW, Kobayashi M, Pospisil M, Young HA, Wolf SF, Young D, Clark SC, Trinchieri G.** Induction of interferon gamma production by natural killer cell stimulatory factor: characterization of the responder cells and synergy with other inducers. *J Exp Med*. 1991;173(4):869-79.
146. **Kobayashi M, Fitz L, Ryan M, Hewick RM, Clark SC, Chan S, Loudon R, Sherman F, Perussia B, Trinchieri G.** Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes. *J Exp Med*. 1989;170(3):827-45.
147. **Wolf SF, Temple PA, Kobayashi M, Young D, Dicig M, Lowe L, Dzialo R, Fitz L, Ferenz C, Hewick RM, et al.** Cloning of cDNA for natural killer cell stimulatory factor, a heterodimeric cytokine with multiple biologic effects on T and natural killer cells. *J Immunol*. 1991;146(9):3074-81.
148. **Flesch IE, Kaufmann SH.** Role of cytokines in tuberculosis. *Immunobiology*. 1993; 89(3-4):316-39. Review.
149. **Fiorentino DF, Zlotnik A, Vieira P, Mosmann TR, Howard M, Moore KW, O'Garra A.** IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. *J Immunol*. 1991;146(10):3444-51.
150. **Balcewicz-Sablinska MK, Gau H, Remold HG.** Interleukin 10 produced by macrophages inoculated with *Mycobacterium avium* attenuates mycobacteria-induced apoptosis by reduction of TNF-alpha activity. *J Infect Dis*. 1999;180(4):1230-7.
151. **Bost KL, Clements JD.** Intracellular *Salmonella dublin* induces substantial secretion of the 40-kilodalton subunit of interleukin-12 (IL-12) but minimal secretion of IL-12 as a 70-kilodalton protein in murine macrophages. *Infect Immun*. 1997;65(8):3186-92.
152. **Engle M, Stossel E, Castiglione K, Schwerdtner N, Wagner M, Bolcskei P, Rollinghoff M, Stenger S.** Induction of TNF in human alveolar macrophages as a potential evasion mechanism of virulent *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol*. 2002;168(3):1328-37.
153. **Fortsch D, Rollinghoff M, Stenger S.** IL-10 converts human dendritic cells into macrophage-like cells with increased antibacterial activity against virulent *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol*. 2000;165(2):978-87.
154. **Kuhn M, Goebel W.** Induction of cytokines in phagocytic mammalian cells infected with virulent and avirulent *Listeria* strains. *Infect Immun*. 1994;62(2):348-56.
155. **Leemans JC, Juffermans NP, Florquin S, van Rooijen N, Vervoordeldonk MJ, Verbon A, van Deventer SJ, van der Poll T.** Depletion of alveolar macrophages exerts protective effects in pulmonary tuberculosis in mice. *J Immunol*. 2001;166(7):4604-11.
156. **Matsunaga K, Yamaguchi H, Klein TW, Friedman H, Yamamoto Y.** *Legionella pneumophila* suppresses macrophage interleukin-12 production by activating the p42/44 mitogen-activated protein kinase cascade. *Infect Immun*. 2003;71(11):6672-5.

157. **McHugh SL, Yamamoto Y, Klein TW, Friedman H.** Murine macrophages differentially produce proinflammatory cytokines after infection with virulent vs. avirulent *Legionella pneumophila*. *J Leukoc Biol.* 2000;67(6):863-8.
158. **Park DR, Skerrett SJ.** IL-10 enhances the growth of *Legionella pneumophila* in human mononuclear phagocytes and reverses the protective effect of IFN- γ : differential responses of blood monocytes and alveolar macrophages. *J Immunol.* 1996 Sep;157(6):2528-38.
159. **Pie S, Matsiota-Bernard P, Truffa-Bachi P, Nauciel C.** Gamma interferon and interleukin-10 gene expression in innately susceptible and resistant mice during the early phase of *Salmonella typhimurium* infection. *Infect Immun.* 1996;64(3):849-54.
160. **Piedrafita D, Proudfoot L, Nikolaev AV, Xu D, Sands W, Feng GJ, Thomas E, Brewer J, Ferguson MA, Alexander J, Liew FY.** Regulation of macrophage IL-12 synthesis by *Leishmania phosphoglycans*. *Eur J Immunol.* 1999;29(1):235-44.
161. **Quiding-Jarbrink M, Smith DA, Bancroft GJ.** Production of matrix metalloproteinases in response to mycobacterial infection. *Infect Immun.* 2001;69(9):5661-70.
162. **Smith S, Liggitt D, Jeromsky E, Tan X, Skerrett SJ, Wilson CB.** Local role for tumor necrosis factor alpha in the pulmonary inflammatory response to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Infect Immun.* 2002;70(4):2082-9.
163. **Asselineau J, Laneelle G.** Mycobacterial lipids: a historical perspective. *Front Biosci.* 1998;3:E164-E174.
164. **Bernardo J, Billingslea AM, Blumenthal RL, Seetoo KF, Simons ER, Fenton MJ.** Differential responses of human mononuclear phagocytes to mycobacterial lipoarabinomannans: role of CD14 and the mannose receptor. *Infect Immun.* 1998; 66(1): 28-35.
165. **Brodskyn C, Patricio J, Oliveira R, Lobo L, Arnholdt A, Mendonca-Previato L, Barral A, Barral-Netto M.** Glycoinositolphospholipids from *Trypanosoma cruzi* interfere with macrophages and dendritic cell responses. *Infect Immun.* 2002;70(7):3736-43.
166. **Crabtree TD, Jin L, Raymond DP, Pelletier SJ, Houlgrave CW, Gleason TG, Pruett TL, Sawyer RG.** Preexposure of murine macrophages to CpG oligonucleotide results in a biphasic tumor necrosis factor alpha response to subsequent lipopolysaccharide challenge. *Infect Immun.* 2001;69(4):2123-9.
167. **Dahl KE, Shiratsuchi H, Hamilton BD, Ellner JJ, Toosi Z.** Selective induction of transforming growth factor β in human monocytes by lipoarabinomannan of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun.* 1996;64(2):399-405.
168. **de Pablo MA, Puertollano MA, Alvarez de Cienfuegos G.** Biological and clinical significance of lipids as modulators of immune system functions. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2002; 9(5): 945-50. Review.
169. **Gao JJ, Xue Q, Papasian CJ, Morrison DC.** Bacterial DNA and lipopolysaccharide induce synergistic production of TNF- α through a post-transcriptional mechanism. *J Immunol.* 2001;166(11):6855-60.
170. **Janeway CA Jr.** How the immune system works to protect the host from infection: a personal view. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001; 98(13): 7461-8. Epub 2001 Jun 05. Review.

171. **Juffermans NP, Verbon A, van Deventer SJ, van Deutekom H, Belisle JT, Ellis ME, Speelman P, van der Poll T.** Elevated chemokine concentrations in sera of human immunodeficiency virus (HIV)-seropositive and HIV-seronegative patients with tuberculosis: a possible role for mycobacterial lipoarabinomannan. *Infect Immun.* 1999; 67(8): 4295-7.
172. **Lang R, Patel D, Morris JJ, Rutschman RL, Murray PJ.** Shaping gene expression in activated and resting primary macrophages by IL-10. *J Immunol.* 2002;169(5):2253-63.
173. **Lima VM, Bonato VL, Lima KM, Dos Santos SA, Dos Santos RR, Goncalves ED, Faccioli LH, Brandao IT, Rodrigues-Junior JM, Silva CL.** Role of trehalose dimycolate in recruitment of cells and modulation of production of cytokines and NO in tuberculosis. *Infect Immun.* 2001;69(9):5305-12.
174. **MacKenzie S, Fernandez-Troy N, Espel E.** Post-transcriptional regulation of TNF- α during in vitro differentiation of human monocytes/macrophages in primary culture. *J Leukoc Biol.* 2002 71:1026-1032.
175. **Moreno C, Taverne J, Mehlert A, Bate CA, Brealey RJ, Meager A, Rook GA, Playfair JH.** Lipoarabinomannan from *Mycobacterium tuberculosis* induces the production of tumour necrosis factor from human and murine macrophages. *Clin Exp Immunol.* 1989;76(2):240-5.
176. **Neyrolles O, Gould K, Gares MP, Brett S, Janssen R, O'Gaora P, Herrmann JL, Prevost MC, Perret E, Thole JE, Young D.** Lipoprotein access to MHC class I presentation during infection of murine macrophages with live mycobacteria. *J Immunol.* 2001 Jan 1;166(1):447-57. Erratum in: *J Immunol* 2001;166(5):3622.
177. **Salkowski CA, Detore GR, Vogel SN.** Lipopolysaccharide and monophosphoryl lipid A differentially regulate interleukin-12, gamma interferon, and interleukin-10 mRNA production in murine macrophages. *Infect Immun.* 1997; 65(8): 3239-47.
178. **Williams L, Jarai G, Smith A, Finan P.** IL-10 expression profiling in human monocytes. *J Leukoc Biol.* 2002;72(4):800-9.
179. **Wilson M, Seymour R, Henderson B.** Bacterial perturbation of cytokine networks. *Infect Immun.* 1998;66(6):2401-9. Review.
180. **Yamagami H, Matsumoto T, Fujiwara N, Arakawa T, Kaneda K, Yano I, Kobayashi K.** Trehalose 6,6'-dimycolate (cord factor) of *Mycobacterium tuberculosis* induces foreign-body- and hypersensitivity-type granulomas in mice. *Infect Immun.* 2001;69(2):810-5.
181. **Beaman BL.** Interaction of *Nocardia asteroides* at different phases of growth with in vitro-maintained macrophages obtained from the lungs of normal and immunized rabbits. *Infect Immun.* 1979;26(1):355-61.
182. **Salinas-Carmona MC.** *Nocardia brasiliensis*: from microbe to human and experimental infections. *Microbes Infect.* 2000;2(11):1373-81. Review.
183. **Silva CL, Faccioli LH.** Tumor necrosis factor and macrophage activation are important in clearance of *Nocardia brasiliensis* from the livers and spleens of mice. *Infect Immun.* 1992;60(9):3566-70.
184. **Beaman L, Beaman B.** The timing of exposure of mononuclear phagocytes to recombinant interferon gamma and recombinant tumor necrosis factor alpha alters interactions with *Nocardia asteroides*. *J Leukoc Biol.* 1992;51(3):276-81.

185. **Gasser A, Most J.** Generation of multinucleated giant cells *in vitro* by culture of human monocytes with *Mycobacterium bovis* BCG in combination with cytokine-containing supernatants. *Infect Immun.* 1999;67(1):395-402.
186. **Ramachandra L, Noss E, Boom WH, Harding CV.** Processing of *Mycobacterium tuberculosis* antigen 85B involves intraphagosomal formation of peptide-major histocompatibility complex II complexes and is inhibited by live bacilli that decrease phagosome maturation. *J Exp Med.* 2001;194(10):1421-32.
187. **O'Neill LA, Dinarello CA.** The IL-1 receptor/toll-like receptor superfamily: crucial receptors for inflammation and host defense. *Immunol Today.* 2000; 21(5): 206-9.
188. **Vasselon T, Detmers PA.** Toll receptors: a central element in innate immune responses. *Infect Immun.* 2002; 70(3): 1033-41. Review.
189. **Stein-Streilein J, Sonoda KH, Faunce D, Zhang-Hoover J.** Regulation of adaptive immune responses by innate cells expressing NK markers and antigen-transporting macrophages. *J Leukoc Biol.* 2000;67(4):488-94. Review.
190. **Giacomini E, Iona E, Ferroni L, Miettinen M, Fattorini L, Orefici G, Julkunen I, Coccia EM.** Infection of human macrophages and dendritic cells with *Mycobacterium tuberculosis* induces a differential cytokine gene expression that modulates T cell response. *J Immunol.* 2001;166(12):7033-41.
191. **Flynn JL, Goldstein MM, Triebold KJ, Sypek J, Wolf S, Bloom BR.** IL-12 increases resistance of BALB/c mice to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Immunol.* 1995;155(5):2515-24.
192. **Mosser DM, Handman E.** Treatment of murine macrophages with interferon-gamma inhibits their ability to bind leishmania promastigotes. *J Leukoc Biol.* 1992;52(4):369-76.
193. **Stark GR, Kerr IM, Williams BR, Silverman RH, Schreiber RD.** How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem.* 1998;67:227-64. Review.
194. **Rook GA, Steele J, Ainsworth M, Champion BR.** Activation of macrophages to inhibit proliferation of *Mycobacterium tuberculosis*: comparison of the effects of recombinant gamma-interferon on human monocytes and murine peritoneal macrophages. *Immunology.* 1986;59(3):333-8.
195. **Schaible UE, Sturgill-Koszycki S, Schlesinger PH, Russell DG.** Cytokine activation leads to acidification and increases maturation of *Mycobacterium avium*-containing phagosomes in murine macrophages. *J Immunol.* 1998;160(3):1290-6.
196. **Xia J, Zweier JL.** Superoxide and peroxynitrite generation from inducible nitric oxide synthase in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(13):6954-8.
197. **Ting LM, Kim AC, Cattamanchi A, Ernst JD.** *Mycobacterium tuberculosis* inhibits IFN-gamma transcriptional responses without inhibiting activation of STAT1. *J Immunol.* 1999;163(7):3898-906.
198. **Manca C, Tsenova L, Bergtold A, Freeman S, Tovey M, Musser JM, Harry CE 3rd, Freedman VH, Kaplan G.** Virulence of a *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolate in mice is determined by failure to induce Th1 type immunity and is associated with induction of IFN-alpha /beta. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(10):5752-7. Epub 2001 Apr 24.
199. **Ellis TN, Beaman BL.** Murine polymorphonuclear neutrophils produce interferon- γ in response to pulmonary infection with *Nocardia asteroides*. *J Leukoc Biol.* 2002 72:373-381.

200. **Bouchonnet F, Boechat N, Bonay M, Hance AJ.** Alpha/beta interferon impairs the ability of human macrophages to control growth of *Mycobacterium bovis* BCG. *Infect Immun.* 2002;70(6):3020-5.
201. **Park AY, Hondowicz BD, Scott P.** IL-12 is required to maintain a Th1 response during *Leishmania major* infection. *J Immunol.* 2000;165(2):896-902.
202. **Marth T, Kelsall BL.** Regulation of interleukin-12 by complement receptor 3 signaling. *J Exp Med.* 1997;185(11):1987-95.
203. **Wagner D, Sangari FJ, Kim S, Petrofsky M, Bermudez LE.** *Mycobacterium avium* infection of macrophages results in progressive suppression of interleukin-12 production in vitro and in vivo. *J Leukoc Biol.* 2002;71(1):80-8.
204. **Hessle C, Andersson B, Wold AE.** Gram-positive bacteria are potent inducers of monocytic interleukin-12 (IL-12) while gram-negative bacteria preferentially stimulate IL-10 production. *Infect Immun.* 2000;68(6):3581-6.
205. **Shibuya K, Robinson D, Zonin F, Hartley SB, Macatonia SE, Somoza C, Hunter CA, Murphy KM, O'Garra A.** IL-1 alpha and TNF-alpha are required for IL-12-induced development of Th1 cells producing high levels of IFN-gamma in BALB/c but not C57BL/6 mice. *J Immunol.* 1998;160(4):1708-16.
206. **Huang L, Krieg AM, Eller N, Scott DE.** Induction and regulation of Th1-inducing cytokines by bacterial DNA, lipopolysaccharide, and heat-inactivated bacteria. *Infect Immun.* 1999;67(12):6257-63.
207. **Xiong J, Kang K, Liu L, Yushida Y, Cooper KD, Ghannoum MA.** *Candida albicans* and *Candida krusei* differentially induce human blood mononuclear cell interleukin-12 and gamma interferon production. *Infect Immun.* 2000;68(5):2464-9.
208. **Mercado R, Vijn S, Allen SE, Kerksiek K, Pilip IM, Pamer EG.** Early programming of T cell populations responding to bacterial infection. *J Immunol.* 2000;165(12):6833-9.
209. **Xing Z, Zganiacz A, Santosuosso M.** Role of IL-12 in macrophage activation during intracellular infection: IL-12 and mycobacteria synergistically release TNF-alpha and nitric oxide from macrophages via IFN-gamma induction. *J Leukoc Biol.* 2000;68(6):897-902.
210. **Munder M, Mallo M, Eichmann K, Modolell M.** Murine macrophages secrete interferon gamma upon combined stimulation with interleukin (IL)-12 and IL-18: A novel pathway of autocrine macrophage activation. *J Exp Med.* 1998;187(12):2103-8.
211. **Salinas S, Newton C, Widen R, Klein TW, Friedman H.** Differential induction of gamma interferon in *Legionella pneumophila*-infected macrophages from BALB/c and A/J mice. *Infect Immun.* 2001;69(6):3605-10.
212. **Beschin A, Brys L, Magez S, Radwanska M, De Baetselier P.** *Trypanosoma brucei* infection elicits nitric oxide-dependent and nitric oxide-independent suppressive mechanisms. *J Leukoc Biol.* 1998;63(4):429-39.
213. **Darji A, Beschin A, Sileghem M, Heremans H, Brys L, De Baetselier P.** In vitro simulation of immunosuppression caused by *Trypanosoma brucei*: active involvement of gamma interferon and tumor necrosis factor in the pathway of suppression. *Infect Immun.* 1996;64(6):1937-43.
214. **Hertz CJ, Mausfield JM.** IFN-gamma-dependent nitric oxide production is not linked to resistance in experimental African trypanosomiasis. *Cell Immunol.* 1999;192(1):24-32.

215. **Greenwell-Wild T, Vazquez N, Sim D, Schito M, Chatterjee D, Orenstein JM, Wahl SM.** Mycobacterium avium infection and modulation of human macrophage gene expression. *J Immunol.* 2002;169(11):6286-97.
216. **Brewington R, Chatterji M, Zoubine M, Miranda RN, Norimatsu M, Shnyra A.** IFN-gamma-independent autocrine cytokine regulatory mechanism in reprogramming of macrophage responses to bacterial lipopolysaccharide. *J Immunol.* 2001;167(1):392-8.
217. **Mati M, Simon SR.** Effects of gamma interferon on release of tumor necrosis factor alpha from lipopolysaccharide-tolerant human monocyte-derived macrophages. *Infect Immun.* 1992;60(9):3756-62.
218. **Khan AQ, Shen Y, Wu ZQ, Wynn TA, Snapper CM.** Endogenous pro- and anti-inflammatory cytokines differentially regulate an in vivo humoral response to *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun.* 2002;70(2):749-61.
219. **Ables GP, Takamatsu D, Noma H, El-Shazly S, Jin HK, Taniguchi T, Sekikawa K, Watanabe T.** The roles of Nramp1 and Tnfa genes in nitric oxide production and their effect on the growth of *Salmonella typhimurium* in macrophages from Nramp1 congenic and tumor necrosis factor-alpha-/- mice. *J Interferon Cytokine Res.* 2001;21(1):53-62.
220. **Eriks IS, Emerson CL.** Temporal effect of tumor necrosis factor alpha on murine macrophages infected with *Mycobacterium avium*. *Infect Immun.* 1997;65(6):2100-6.
221. **Fratazzi C, Arbeit RD, Carini C, Balcewicz-Sablinska MK, Keane J, Kornfeld H, Remold HG.** Macrophage apoptosis in mycobacterial infections. *J Leukoc Biol.* 1999;66(5):763-4. Review.
222. **Marino MW, Dunn A, Grail D, Inglese M, Noguchi Y, Richards E, Jungbluth A, Wada H, Moore M, Williamson B, Basu S, Old LJ.** Characterization of tumor necrosis factor-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(15):8093-8.
223. **Mohan VP, Scanga CA, Yu K, Scott HM, Tanaka KE, Tsang E, Tsai MM, Flynn JL, Chan J.** Effects of tumor necrosis factor alpha on host immune response in chronic persistent tuberculosis: possible role for limiting pathology. *Infect Immun.* 2001;69(3):1847-55.
224. **Sedgwick JD, Riminton DS, Cyster JG, Korner H.** Tumor necrosis factor: a master-regulator of leukocyte movement. *Immunol Today.* 2000;21(3):110-3. Review.
225. **Silva JS, Vespa GN, Cardoso MA, Aliberti JC, Cunha FQ.** Tumor necrosis factor alpha mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* infection in mice by inducing nitric oxide production in infected gamma interferon-activated macrophages. *Infect Immun.* 1995;63(12):4862-7.
226. **Balcewicz-Sablinska MK, Keane J, Kornfeld H, Remold HG.** Pathogenic *Mycobacterium tuberculosis* evades apoptosis of host macrophages by release of TNF-R2, resulting in inactivation of TNF-alpha. *J Immunol.* 1998;161(5):2636-41.
227. **Erwig LP, Kluth DC, Walsh GM, Rees AJ.** Initial cytokine exposure determines function of macrophages and renders them unresponsive to other cytokines. *J Immunol.* 1998;161(4):1983-8.
228. **Oswald IP, Wynn TA, Sher A, James SL.** Interleukin 10 inhibits macrophage microbicidal activity by blocking the endogenous production of tumor necrosis

- factor alpha required as a costimulatory factor for interferon gamma-induced activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89(18):8676-80.
229. **Feng HM, Walker DH.** Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha exert their antitickettsial effect via induction of synthesis of nitric oxide. *Am J Pathol*. 1993;143(4):1016-23.
230. **Marshall BG, Chambers MA, Wangoo A, Shaw RJ, Young DB.** Production of tumor necrosis factor and nitric oxide by macrophages infected with live and dead mycobacteria and their suppression by an interleukin-10-secreting recombinant. *Infect Immun*. 1997;65(5):1931-5.
231. **Matsuguchi T, Musikachoen T, Ogawa T, Yoshikai Y.** Gene expressions of Toll-like receptor 2, but not Toll-like receptor 4, is induced by LPS and inflammatory cytokines in mouse macrophages. *J Immunol*. 2000; 165(10): 5767-72.
232. **Wang T, Lafuse WP, Zwilling BS.** Regulation of toll-like receptor 2 expression by macrophages following *Mycobacterium avium* infection. *J Immunol*. 2000; 165(11): 6308-13.
233. **Wang Y, Wu TR, Cai S, Welte T, Chin YE.** Stat1 as a component of tumor necrosis factor alpha receptor 1-TRADD signaling complex to inhibit NF-kappaB activation. *Mol Cell Biol*. 2000;20(13):4505-12.
234. **Roach DR, Briscoe H, Baumgart K, Rathjen DA, Britton WJ.** Tumor necrosis factor (TNF) and a TNF-mimetic peptide modulate the granulomatous response to *Mycobacterium bovis* BCG infection in vivo. *Infect Immun*. 1999;67(10):5473-6.
235. **Hoffman M, Weinberg JB.** Tumor necrosis factor-alpha induces increased hydrogen peroxide production and Fc receptor expression, but not increased Ia antigen expression by peritoneal macrophages. *J Leukoc Biol*. 1987;42(6):704-7.
236. **Goncalves NS, Ghaem-Maghani M, Monteleone G, Frankel G, Dougan G, Lewis DJ, Simmons CP, MacDonald TT.** Critical role for tumor necrosis factor alpha in controlling the number of luminal pathogenic bacteria and immunopathology in infectious colitis. *Infect Immun*. 2001;69(11):6651-9.
237. **Jacobs P, Radzioch D, Stevenson MM.** In vivo regulation of nitric oxide production by tumor necrosis factor alpha and gamma interferon, but not by interleukin-4, during blood stage malaria in mice. *Infect Immun*. 1996;64(1):44-9.
238. **Magez S, Radwanska M, Beschin A, Sekikawa K, De Baetselier P.** Tumor necrosis factor alpha is a key mediator in the regulation of experimental *Trypanosoma brucei* infections. *Infect Immun*. 1999;67(6):3128-32.
239. **Sugisaki K, Dannenberg AM Jr, Abe Y, Tsuruta J, Su WJ, Said W, Feng L, Yoshimura T, Converse PJ, Mounts P.** Nonspecific and immune-specific up-regulation of cytokines in rabbit dermal tuberculous (BCG) lesions. *J Leukoc Biol*. 1998;63(4):440-50.
240. **Sarmiento AM, Appelberg R.** Relationship between virulence of *Mycobacterium avium* strains and induction of tumor necrosis factor alpha production in infected mice and in in vitro-cultured mouse macrophages. *Infect Immun*. 1995;63(10):3759-64.
241. **Hodge-Dufour J, Marino MW, Horton MR, Jungbluth A, Burdick MD, Strieter RM, Noble PW, Hunter CA, Pure E.** Inhibition of interferon gamma induced interleukin 12 production: a potential mechanism for the anti-

- inflammatory activities of tumor necrosis factor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(23):13806-11.
242. **Underhill DM, Ozinsky A, Smith KD, Aderem A.** Toll-like receptor-2 mediates mycobacteria-induced proinflammatory signaling in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999; 96(25): 14459-63.
243. **Tsuji S, Matsumoto M, Takeuchi O, Akira S, Azuma I, Hayashi A, Toyoshima K, Seya T.** Maturation of human dendritic cells by cell wall skeleton of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin: involvement of toll-like receptors. *Infect Immun.* 2000;68(12):6883-90.
244. **Trevejo JM, Marino MW, Philpott N, Josien R, Richards EC, Elkon KB, Falck-Pedersen E.** TNF-alpha -dependent maturation of local dendritic cells is critical for activating the adaptive immune response to virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(21):12162-7. Epub 2001 Oct 02.
245. **Schroder M, Meisel C, Buhl K, Profanter N, Sievert N, Volk HD, Grutz G.** Different modes of IL-10 and TGF-beta to inhibit cytokine-dependent IFN-gamma production: consequences for reversal of lipopolysaccharide desensitization. *J Immunol.* 2003;170(10):5260-7.
246. **Bartlett SA, Perera PY, Vogel SN.** Defective ceramide response in C3H/HeJ (Lpsd) macrophages. *J Immunol.* 1995;155(5):2303-5.
247. **Murthy PK, Dennis VA, Lasater BL, Philipp MT.** Interleukin-10 modulates proinflammatory cytokines in the human monocytic cell line THP-1 stimulated with *Borrelia burgdorferi* lipoproteins. *Infect Immun.* 2000;68(12):6663-9.
248. **Weiss DJ, Evanson OA, Moritz A, Deng MQ, Abrahamson MS.** Differential responses of bovine macrophages to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *Mycobacterium avium* subsp. *avium*. *Infect Immun.* 2002;70(10):5556-61.
249. **Ma X, Sun J, Papasavvas E, Riemann H, Robertson S, Marshall J, Bailer RT, Moore A, Donnelly RP, Trinchieri G, Montaner LJ.** Inhibition of IL-12 production in human monocyte-derived macrophages by TNF. *J Immunol.* 2000;164(4):1722-9.
250. **Giguere S, Prescott JF.** Cytokine induction in murine macrophages infected with virulent and avirulent *Rhodococcus equi*. *Infect Immun.* 1998;66(5):1848-54.
251. **McIntyre KW, Unowsky J, DeLorenzo W, Benjamin W.** Enhancement of antibacterial resistance of neutropenic, bone marrow-suppressed mice by interleukin-1 alpha. *Infect Immun.* 1989;57(1):48-54.
252. **Morikage T, Mizushima Y, Sakamoto K, Yano S.** Prevention of fatal infections by recombinant human interleukin 1 alpha in normal and anticancer drug-treated mice. *Cancer Res.* 1990;50(7):2099-104.
253. **Ogle JD, Noel JG, Balasubramaniam A, Sramkoski RM, Ogle CK, Alexander JW.** Comparison of abilities of recombinant interleukin-1 alpha and -beta and noninflammatory IL-1 beta fragment 163-171 to upregulate C3b receptors (CR1) on human neutrophils and to enhance their phagocytic capacity. *Inflammation.* 1990;14(2):185-94.
254. **Pike BL, Nossal GJ.** Interleukin 1 can act as a B-cell growth and differentiation factor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1985;82(23):8153-7.
255. **Schmidt JA, Mizel SB, Cohen D, Green I.** Interleukin 1, a potential regulator of fibroblast proliferation. *J Immunol.* 1982;128(5):2177-82.

256. Yamada H, Mizumo S, Horai R, Iwakura Y, Sugawara I. Protective role of interleukin-1 in mycobacterial infection in IL-1 alpha/beta double-knockout mice. *Lab Invest.* 2000;80(5):759-67.
257. Melez-Samperio P, Garcia-Martinez E, Hernandez-Garay M, Solis-Cardona M. Depletion of endogenous interleukin-10 augments interleukin-1 beta secretion by Mycobacterium bovis BCG-reactive human cells. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1997;4(2):138-41.
258. Shannon MF, Coles LS, Attema J, Diamond P. The role of architectural transcription factors in cytokine gene transcription. *J Leukoc Biol.* 2001;69(1):21-32. Review.
259. Fukao T, Frucht DM, Yap G, Gadina M, O'Shea JJ, Koyasu S. Inducible expression of Stat4 in dendritic cells and macrophages and its critical role in innate and adaptive immune responses. *J Immunol.* 2001;166(7):4446-55.
260. Hickman SP, Chan J, Salgame P. Mycobacterium tuberculosis induces differential cytokine production from dendritic cells and macrophages with divergent effects on naive T cell polarization. *J Immunol.* 2002;168(9):4636-42.
261. Suzuki K, Fukutomi Y, Matsuoka M, Torii K, Hayashi H, Takii T, Oomoto Y, Onozaki K. Differential production of interleukin 1 (IL-1), IL-6, tumor necrosis factor, and IL-1 receptor antagonist by human monocytes stimulated with Mycobacterium leprae and M. bovis BCG. *Int J Lepr Other Mycobact Dis.* 1993;61(4):609-18.
262. Sasaki H, Hou L, Belani A, Wang CY, Uchiyama T, Muller R, Stashenko P. IL-10, but not IL-4, suppresses infection-stimulated bone resorption in vivo. *J Immunol.* 2000;165(7):3626-30.
263. Shimauchi H, Ogawa T, Okuda K, Kusumoto Y, Okada H. Autoregulatory effect of interleukin-10 on proinflammatory cytokine production by Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide-tolerant human monocytes. *Infect Immun.* 1999;67(5):2153-9.
264. Cassatella MA, Gasperini S, Bovolenta C, Calzetti F, Vollebregt M, Scapini P, Marchi M, Suzuki R, Suzuki A, Yoshimura A. Interleukin-10 (IL-10) selectively enhances CIS3/SOCS3 mRNA expression in human neutrophils: evidence for an IL-10-induced pathway that is independent of STAT protein activation. *Blood.* 1999;94(8):2880-9.
265. Dalpke AH, Opper S, Zimmermann S, Heeg K. Suppressors of cytokine signaling (SOCS)-1 and SOCS-3 are induced by CpG-DNA and modulate cytokine responses in APCs. *J Immunol.* 2001;166(12):7082-9.
266. D'Amico G, Frascaroli G, Bianchi G, Transidico P, Doni A, Vecchi A, Sozzani S, Allavena P, Mantovani A. Uncoupling of inflammatory chemokine receptors by IL-10: generation of functional decoys. *Nat Immunol.* 2000;1(5):387-91.
267. D'Andrea A, Ma X, Aste-Amezaga M, Paganin C, Trinchieri G. Stimulatory and inhibitory effects of interleukin (IL)-4 and IL-13 on the production of cytokines by human peripheral blood mononuclear cells: priming for IL-12 and tumor necrosis factor alpha production. *J Exp Med.* 1995;181(2):537-46.
268. Donnelly RP, Dickensheets H, Fimbloom DS. The interleukin-10 signal transduction pathway and regulation of gene expression in mononuclear phagocytes. *J Interferon Cytokine Res.* 1999;19(6):563-73. Review.

269. **Meyaard L, Hovenkamp E, Otto SA, Miedema F.** IL-12-induced IL-10 production by human T cells as a negative feedback for IL-12-induced immune responses. *J Immunol.* 1996;156(8):2776-82.
270. **Villegas EN, Wille U, Craig L, Linsley PS, Rennick DM, Peach R, Hunter CA.** Blockade of costimulation prevents infection-induced immunopathology in interleukin-10-deficient mice. *Infect Immun.* 2000;68(5):2837-44.
271. **Ludviksson BR, Sneller MC, Chua KS, Talar-Williams C, Laugford CA, Ehrhardt RO, Fauci AS, Strober W.** Active Wegener's granulomatosis is associated with HLA-DR+ CD4+ T cells exhibiting an unbalanced Th1-type T cell cytokine pattern: reversal with IL-10. *J Immunol.* 1998;160(7):3602-9.
272. **VanBuskirk AM, Burlingham WJ, Jankowska-Gan E, Chin T, Kusaka S, Geissler F, Pelletier RP, Orosz CG.** Human allograft acceptance is associated with immune regulation. *J Clin Invest.* 2000;106(1):145-55.
273. **Asadullah K, Docke WD, Sabat RV, Volk HD, Sterry W.** The treatment of psoriasis with IL-10: rationale and review of the first clinical trials. *Expert Opin Investig Drugs.* 2000;9(1):95-102. Review.
274. **Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR.** Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med.* 1989;170(6):2081-95.
275. **Polack FP, Teng MN, Collins PL, Prince GA, Exner M, Regele H, Lirman DD, Rabold R, Hoffman SJ, Karp CL, Kleeberger SR, Wills-Karp M, Karron RA.** A role for immune complexes in enhanced respiratory syncytial virus disease. *J Exp Med.* 2002;196(6):859-65.
276. **Ghigo E, Capo C, Raoult D, Mege JL.** Interleukin-10 stimulates *Coxiella burnetii* replication in human monocytes through tumor necrosis factor down-modulation: role in microbicidal defect of Q fever. *Infect Immun.* 2001;69(4):2345-52.
277. **Denis M, Ghadirian E.** IL-10 neutralization augments mouse resistance to systemic *Mycobacterium avium* infections. *J Immunol.* 1993;151(10):5425-30.
278. **Murray PJ, Young RA.** Increased antimycobacterial immunity in interleukin-10-deficient mice. *Infect Immun.* 1999;67(6):3087-95.
279. **Boussiotis VA, Tsai EY, Yunis EJ, Thim S, Delgado JC, Dascher CC, Berezovskaya A, Rousset D, Reynes JM, Goldfeld AE.** IL-10-producing T cells suppress immune responses in anergic tuberculosis patients. *J Clin Invest.* 2000;105(9):1317-25.
280. **Zhang M, Gong J, Lin Y, Barnes PF.** Growth of virulent and avirulent *Mycobacterium tuberculosis* strains in human macrophages. *Infect Immun.* 1998;66(2):794-9.
281. **Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A.** Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol.* 2001;19:683-765. Review.
282. **Bogdan C, Vodovotz Y, Nathan C.** Macrophage deactivation by interleukin 10. *J Exp Med.* 1991;174(6):1549-55.
283. **Dokra S, Shi X, Leonard S, Wang L, Castranova V, Rojanasakul Y.** Interleukin-10-mediated inhibition of free radical generation in macrophages. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2001;280(6):L1196-202.
284. **Eigler A, Siegmund B, Emmerich U, Baumann KH, Hartmann G, Endres S.** Anti-inflammatory activities of cAMP-elevating agents: enhancement of IL-10

- synthesis and concurrent suppression of TNF production. *J Leukoc Biol.* 1998;63(1):101-7.
285. **Mendez-Samperio P, Garcia E, Vazquez A, Palma J.** Regulation of interleukin-8 by interleukin-10 and transforming growth factor beta in human monocytes infected with mycobacterium bovis. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2002;9(4):802-7.
286. **Laichalk LL, Danforth JM, Standiford TJ.** Interleukin-10 inhibits neutrophil phagocytic and bactericidal activity. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 1996;15(4):181-7.
287. **Xia CQ, Kao KJ.** Suppression of interleukin-12 production through endogenously secreted interleukin-10 in activated dendritic cells: involvement of activation of extracellular signal-regulated protein kinase. *Scand J Immunol.* 2003;58(1):23-32.
288. **Corinti S, Albanesi C, la Sala A, Pastore S, Girolomoni G.** Regulatory activity of autocrine IL-10 on dendritic cell functions. *J Immunol.* 2001;166(7):4312-8.
289. **Kishore R, Tebo JM, Kolosov M, Hamilton TA.** Cutting edge: clustered AU-rich elements are the target of IL-10-mediated mRNA destabilization in mouse macrophages. *J Immunol.* 1999;162(5):2457-61.
290. **Wagner RD, Czuprynski CJ.** Cytokine mRNA expression in livers of mice infected with *Listeria monocytogenes*. *J Leukoc Biol.* 1993;53(5):525-31.
291. **Wagner RD, Maroushek NM, Brown JF, Czuprynski CJ.** Treatment with anti-interleukin-10 monoclonal antibody enhances early resistance to but impairs complete clearance of *Listeria monocytogenes* infection in mice. *Infect Immun.* 1994;62(6):2345-53.
292. **Fenton MJ, Vermeulen MW.** Immunopathology of tuberculosis: roles of macrophages and monocytes. *Infect Immun.* 1996;64(3):683-90. Review.
293. **Lalani I, Bhol K, Ahmed AR.** Interleukin-10: biology, role in inflammation and autoimmunity. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 1997;79(6):469-83. Review. Erratum in: *Ann Allergy Asthma Immunol* 1998;80(3):A-6.
294. **Devitt A, Moffatt OD, Raykundalia C, Capra JD, Simmons DL, Gregory CD.** Human CD14 mediates recognition and phagocytosis of apoptotic cells. *Nature.* 1998;392(6675):505-9.
295. **Platt N, Suzuki H, Kurihara Y, Kodama T, Gordon S.** Role for the class A macrophage scavenger receptor in the phagocytosis of apoptotic thymocytes in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(22):12456-60.
296. **Fadok VA, Bratton DL, Guthrie L, Henson PM.** Differential effects of apoptotic versus lysed cells on macrophage production of cytokines: role of proteases. *J Immunol.* 2001;166(11):6847-54.
297. **Fadok VA, Bratton DL, Konowal A, Freed PW, Westcott JY, Henson PM.** Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *J Clin Invest.* 1998;101(4):890-8.
298. **Koppelman B, Neefjes JJ, de Vries JE, de Waal Malefyt R.** Interleukin-10 down-regulates MHC class II alphabeta peptide complexes at the plasma membrane of monocytes by affecting arrival and recycling. *Immunity.* 1997;7(6):861-71.

299. **Capsoni F, Minonzio F, Ongari AM, Carbonelli V, Galli A, Zanussi C.** IL-10 up-regulates human monocyte phagocytosis in the presence of IL-4 and IFN-gamma. *J Leukoc Biol.* 1995;58(3):351-8.
300. **Adib-Conquy M, Petit AF, Marie C, Fitting C, Cavaillon JM.** Paradoxical priming effects of IL-10 on cytokine production. *Int Immunol.* 1999;11(5):689-98.
301. **Blom AB, Radstake TR, Holthuysen AE, Sloetjes AW, Pesman GJ, Sweep FG, van de Loo FA, Joosten LA, Barrera P, van Lent PL, van den Berg WB.** Increased expression of Fc gamma receptors II and III on macrophages of rheumatoid arthritis patients results in higher production of tumor necrosis factor alpha and matrix metalloproteinase. *Arthritis Rheum.* 2003;48(4):1002-14.
302. **Kuratsaka K, Watanabe N, Kobayashi Y.** Potentiation by human serum of anti-inflammatory cytokine production by human macrophages in response to apoptotic cells. *J Leukoc Biol.* 2002 71:950-56.
303. **Nachbaur D, Herold M, Eibl B, Glassl H, Schwaighofer H, Huber C, Gachter A, Pichl M, Niederwieser D.** A comparative study of the in vitro immunomodulatory activity of human intact immunoglobulin (7S IVIG), F(ab')₂ fragments (5S IVIG) and Fc fragments. Evidence for post-transcriptional IL-2 modulation. *Immunology.* 1997;90(2):212-8.
304. **Shioji K, Kishimoto C, Sasayama S.** Fc receptor-mediated inhibitory effect of immunoglobulin therapy on autoimmune giant cell myocarditis: concomitant suppression of the expression of dendritic cells. *Circ Res.* 2001;89(6):540-6.
305. **Subrbier A, La Linn M.** Suppression of antiviral responses by antibody-dependent enhancement of macrophage infection. *Trends Immunol.* 2003;24(4):165-8. Review.
306. **Chan A, Papadimitriou C, Graf W, Toyka KV, Gold R.** Effects of polyclonal immunoglobulins and other immunomodulatory agents on microglial phagocytosis of apoptotic inflammatory T-cells. *J Neuroimmunol.* 2003;135(1-2):161-5.
307. **Debre M, Bonnet MC, Fridman WH, Carosella E, Philippe N, Reinert P, Vilmer E, Kaplan C, Teillaud JL, Griscelli C.** Infusion of Fc gamma fragments for treatment of children with acute immune thrombocytopenic purpura. *Lancet.* 1993;342(8877):945-9.
308. **Bijsterbosch MK, Klaus GG.** Crosslinking of surface immunoglobulin and Fc receptors on B lymphocytes inhibits stimulation of inositol phospholipid breakdown via the antigen receptors. *J Exp Med.* 1985;162(6):1825-36.
309. **Daeron M, Malbec O, Latour S, Espinosa E, Pina P, Fridman WH.** Regulation of tyrosine-containing activation motif-dependent cell signalling by Fc gamma RII. *Immunol Lett.* 1995;44(2-3):119-23. Review.
310. **Malbec O, Fridman WH, Daeron M.** Negative regulation of c-kit-mediated cell proliferation by Fc gamma RIIB. *J Immunol.* 1999;162(8):4424-9.
311. **Banki Z, Kacani L, Mullauer B, Wilflingseder D, Obermoser G, Niederegger H, Schennach H, Sprinzl GM, Sepp N, Erdei A, Dierich MP, Stoiber H.** Cross-linking of CD32 induces maturation of human monocyte-derived dendritic cells via NF-kappa B signaling pathway. *J Immunol.* 2003;170(8):3963-70.
312. **Bayry J, Lacroix-Desmazes S, Carbonneil C, Misra N, Donkova V, Pashov A, Chevailler A, Mouthon L, Weill B, Bruneval P, Kazatchkine MD, Kaveri**

- SV. Inhibition of maturation and function of dendritic cells by intravenous immunoglobulin. *Blood*. 2003;101(2):758-65. Epub 2002 Aug 29.
313. **Celada A.** Immune-complex inhibition of macrophage activation is not due to an interaction with the binding or processing of IFN-gamma. *Immunology*. 1988;64(2):187-92.
314. **Hanaumi K, Gray P, Suzuki T.** Fc gamma receptor-mediated suppression of gamma-interferon-induced Ia antigen expression on a murine macrophage-like cell line (P338D1). *J Immunol*. 1984;133(6):2852-6.
315. **Ravetch JV, Bolland S.** IgG Fc receptors. *Annu Rev Immunol*. 2001;19:275-90. Review.
316. **Regnault A, Lankar D, Lacabanne V, Rodriguez A, Thery C, Rescigno M, Saito T, Verbeek S, Bonnerot C, Ricciardi-Castagnoli P, Amigorena S.** Fc gamma receptor-mediated induction of dendritic cell maturation and major histocompatibility complex class I-restricted antigen presentation after immune complex internalization. *J Exp Med*. 1999;189(2):371-80.
317. **Amigorena S, Lankar D, Briken V, Gapin L, Viguier M, Bonnerot C.** Type II and III receptors for immunoglobulin G (IgG) control the presentation of different T cell epitopes from single IgG-complexed antigens. *J Exp Med*. 1998;187(4):505-15.
318. **Ravetch JV.** A full complement of receptors in immune complex diseases. *J Clin Invest*. 2002;110(12):1759-61.
319. **Nakamura A, Yuasa T, Ujike A, Ono M, Nukiwa T, Ravetch JV, Takai T.** Fc gamma receptor IIB-deficient mice develop Goodpasture's syndrome upon immunization with type IV collagen: a novel murine model for autoimmune glomerular basement membrane disease. *J Exp Med*. 2000;191(5):899-906.
320. **Clynes R, Maizes JS, Guinamard R, Ono M, Takai T, Ravetch JV.** Modulation of immune complex-induced inflammation in vivo by the coordinate expression of activation and inhibitory Fc receptors. *J Exp Med*. 1999;189(1):179-85.
321. **Yuasa T, Kubo S, Yoshino T, Ujike A, Matsumura K, Ono M, Ravetch JV, Takai T.** Deletion of fcgamma receptor IIB renders H-2(b) mice susceptible to collagen-induced arthritis. *J Exp Med*. 1999;189(1):187-94.
322. **Takai T, Ono M, Hikida M, Ohmori H, Ravetch JV.** Augmented humoral and anaphylactic responses in Fc gamma RII-deficient mice. *Nature*. 1996;379(6563):346-9.
323. **Virgin HW 4th, Unanue ER.** Suppression of the immune response to *Listeria monocytogenes*. I. Immune complexes inhibit resistance. *J Immunol*. 1984;133(1):104-9.
324. **Virgin HW 4th, Wittenberg GF, Unanue ER.** Immune complex effects on murine macrophages. I. Immune complexes suppress interferon-gamma induction of Ia expression. *J Immunol*. 1985;135(6):3735-43.
325. **Kima PE, Constant SL, Hannum L, Colmenares M, Lee KS, Haberman AM, Shlomchik MJ, McMahon-Pratt D.** Internalization of *Leishmania mexicana* complex amastigotes via the Fc receptor is required to sustain infection in murine cutaneous leishmaniasis. *J Exp Med*. 2000;191(6):1063-8.
326. **SmcL SC, Cotterell SE, Engwerda CR, Kaye PM.** B cell-deficient mice are highly resistant to *Leishmania donovani* infection, but develop neutrophil-mediated tissue pathology. *J Immunol*. 2000;164(7):3681-8.

327. **Kan^c MM, Mosser DM.** The role of IL-10 in promoting disease progression in leishmaniasis. *J Immunol.* 2001;166(2):1141-7.
328. **Rezende SA, Lambertucci JR, Goes AM.** Role of immune complexes from patients with different clinical forms of schistosomiasis in the modulation of in vitro granuloma research. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1997;92(5):683-7.
329. **Garb KS, Stavitsky AB, Olds GR, Tracy JW, Mahmoud AA.** Immune regulation in murine schistosomiasis japonica: inhibition of in vitro antigen- and mitogen-induced cellular responses by splenocyte culture supernatants and by purified fractions from serum of chronically infected mice. *J Immunol.* 1982;129(6):2752-8.
330. **Olds GR, Olveda R, Tracy JW, Mahmoud AA.** Adoptive transfer of modulation of granuloma formation and hepatosplenic disease in murine schistosomiasis japonica by serum from chronically infected animals. *J Immunol.* 1982;128(3):1391-3.
331. **Rocklin RE, Brown AP, Warren KS, Pelley RP, Houba V, Siengok TK, Ouma J, Sturrock RF, Butterworth AE.** Factors that modify the cellular-immune response in patients infected by *Schistosoma mansoni*. *J Immunol.* 1980;125(5):1916-23.
332. **Atalay R, Zimmermann A, Wagner M, Borst E, Benz C, Messerle M, Hengel H.** Identification and expression of human cytomegalovirus transcription units coding for two distinct Fcγ receptor homologs. *J Virol.* 2002 ;76(17):8596-608.
333. **Boiron P, Locci R, Goodfellow M, Gumas SA, Isik K, Kim B, McNeil MM, Salinas-Carmona MC, Shojaei H.** Nocardia, nocardiosis and mycetoma. *Med Mycol.* 1998;36 Suppl 1:26-37. Review.
334. **Salinas-Carmona MC, Castro-Corona MA, Licon-Trillo A, Boiron P, Welsh O, Nagesh S, Eisenach KD, Rendon A.** Constrictive pericarditis and recurrent mycetoma due to *Nocardia brasiliensis* in non-immunocompromised patient. *J Mycol Med.* 1997 7:47-50.
335. **Beaman BL, Maslan S.** Effect of cyclophosphamide on experimental *Nocardia asteroides* infection in mice. *Infect Immun.* 1977;16(3):995-1004.
336. **Beaman BL, Maslan S, Scates S, Rosen J.** Effect of route on inoculation on host resistance to *Nocardia*. *Infect Immun.* 1980;28(1):185-9.
337. **Rico G, Ochoa R, Oliva A, Gonzalez-Mendoza A, Walker SM, Ortiz-Ortiz L.** Enhanced resistance to *Nocardia brasiliensis* infection in mice depleted of antigen-specific B cells. *J Immunol.* 1982;129(4):1688-93.
338. **Folb PI, Jaffe R, Altmann G.** *Nocardia asteroides* and *Nocardia brasiliensis* infections in mice. *Infect Immun.* 1976;13(5):1490-6.
339. **Conde C, Mancilla R, Fresan M, Ortiz-Ortiz L.** Immunoglobulin and complement in tissues of mice infected with *Nocardia brasiliensis*. *Infect Immun.* 1983;40(3):1218-22.

APÉNDICE A TÉCNICAS

I. Determinación de viabilidad celular por medio de la exclusión de azul de tripano.

1. Transferir 0.1 ml de la suspensión celular a un tubo de 1.5 ml y añadir 0.1 ml (volumen igual) de azul de tripano al 0.4% (peso/vol).
2. Mezclar exhaustivamente.
3. Transferir con micropipeta un pequeño volumen (~20 μ l) de la muestra diluida a una de las cámaras del hematocitómetro.
4. Permita que la cámara se llene mediante acción capilar, sin permitir la formación de espacios vacíos o el sobrellenado de la cámara.
5. Enfocar las líneas cuadrículadas de la cámara usando el objetivo 10X.
6. Contar las células viables en los cuatro cuadros de las esquinas de la cámara. Las células que yacen sobre las líneas deben ser contadas sólo si están tocando las línea : superior e izquierda de cada cuadro. Las células no viables se tiñen de color azul (y no son contadas).
7. La densidad celular viable en la suspensión original se determina de acuerdo a la fórmula siguiente:

Células por ml = total de células viables/número de cuadros contados (1mm^2) x 10^4 ml x factor(es) de dilución

Células por ml = ____ x 10^4 x 1 x 2 = ____ células/ml

II. Tinción de α -uafitol butirato para esterasa monocítica no específica.

A. Reactivos

1. Fijador: vapor de formalina. Colocar un papel humedecido con formaldehído al 70% en el fondo de una cámara húmeda y cerrar herméticamente.
2. Mezcla de incubación

- | | |
|--|--------|
| a. 1-naftil butirato al 0.5% en éter de dimetilo | 2ml |
| de dietilen-glicol | |
| 0.1 M regulador de fosfato, pH 6.0 | 20ml |
| 1.90g NaHPO ₄ | |
| 12.05g KH ₂ PO ₄ /L | |
| b. Pararosalinina al 3% en HCl 2N | 0.8 ml |
| Nitrato de sodio al 3% | |
| Agitar la mezcla por 30 seg | |
| Añadir K ₂ HPO ₄ al 0.1M | 20 ml |

Combinar las soluciones *a* y *b*, ajustando el pH entre 5.8 y 6.2 con HCl o KOH y filtrar.

- | | |
|---|--------|
| c. Contrateñir con hematoxilina de Mayer | |
| Hematoxilina | 1g |
| Agua | 100 ml |
| Calentar hasta punto de ebullición y añadir 100 ml más de agua. | |

Iodato de sodio	0.2g
Sulfato de aluminio de potasio	50g
Almacenar en un frasco oscuro a temperatura ambiente y filtrar antes de usarse.	

B. Procedimiento.

1. Fijar el frotis secado al aire en vapor de formalina por 1 minuto.
2. Enjuagar bien en agua corriente.
3. Incubar en la mezcla de reacción por 10 minutos a temp. ambiente.
4. Lavar con agua corriente.
5. Contrateñir con hematoxilina de Mayer por 1-2 minutos.
6. Secar al aire y montar en Permount (Fischer Scientific Co.)

C. Resultados. La actividad enzimática está indicada por un color café oscuro.

III. RT-PCR.**A. Extracción de ARN con fenol-cloroformo para análisis por PCR.**

1. Eliminar el medio de cultivo de las células.
2. Añadir 600 µl de regulador de lisis frío y con una jeringa con aguja del 27 o 20 succionar y regresar por lo menos dos veces.

REGULADOR DE LISIS	
5 ml	Isotiocianato de guanidina 4M
250 µl	Sarcosil al 10%
125 µl	Citrato de sodio 1M
45 µl	β-Mercaptoetanol

3. Añadir a cada 500 µl de lisado que contiene el ARN que se va a purificar:
 - a) 50 µl de acetato de sodio 2M frío, agitar en vórtex 30 seg.
 - b) 500 µl de fenol ácido (pH 4.3) frío y agitar en vortex 30 seg.
 - c) 100 µl de cloroformo y agitar en vortex 1 min.
4. Dejar la muestra en hielo durante 15 minutos, agitando vigorosamente cada 5 min.
5. Centrifugar a 14,000 rpm durante 5 minutos.
6. Remover la fase acuosa con sumo cuidado para no contaminar el ARN extraído con DNA, proteínas o carbohidratos.
7. Precipitar el ARN con un volumen igual de alcohol isopropílico frío - aproximadamente 400 µl.
8. Dejar la muestra a -70°C por 1 hora o en nitrógeno líquido por 5 min

B. Transcripción inversa de ARNm.

1. Centrifugar la muestra a 11,000 g durante 10 min para concentrar el ARN.
2. Decantar el sobrenadante, con cuidado de no llevarse el precipitado (ARN).
3. Lavar con 800 µl de etanol al 80% en agua-DEPC y agitar suavemente.
4. Centrifugar a 11,000 g durante 1 min y decantar el sobrenadante y eliminar el exceso de etanol sin tocar el botón de ARN.
5. Secar en la estufa a 37°C de 10 a 15 minutos.

6. Resuspender el precipitado seco en 13 μ l de agua-DEPC, asegurándose que el precipitado se disuelva.
7. Añadir 2 μ l del "stock" de oligo dT₁₂₋₁₈ (GIBCO BRL) a una conc de 0.5 mg/ml.
8. Incubar a 65°C por 10 minutos en el termociclador.
9. Sacar y colocar en hielo 5 minutos.
10. Agregar 15 μ l de mezcla de reacción para obtener cADN (volumen final de 30 μ l). Centrifugar durante 10 seg. para mezclar todos los componentes.

Mezcla de reacción para cADN

Componente	Volumen	Concentración final
Agua-DEPC	3.8 μ l	
5X ¹ 1st. Strand Buffer ²	6.0 μ l	1X
dNTPs 10 mM	1.2 μ l	400 μ M
MMLV-RT 200 U/ μ l	1.0 μ l	200 U/ μ l
DTT 100 mM	3.0 μ l	10 μ M

11. Continuar la reacción en el termociclador con las siguientes temperaturas:

37°C	1 hora
95°C	5 minutos

12. Terminada la reacción agregar 70 μ l de agua-DEPC para obtener un volumen final de 100 μ l; de este cADN se tomarán 5 μ l para hacer el PCR.
13. Mantener en congelación el cADN hasta su utilización.

C. PCR de cADN.

1. Utilizar 5 μ l del cADN diluido y adicionar 45 μ l de la mezcla de reacción para PCR obteniendo un volumen final de 50.0 μ l.

Mezcla de reacción para PCR

Componente	Volumen	Concentración final
Agua-DEPC	35.3 μ l	
Regulador 10X PCR	5.0 μ l	1X
MgCl ₂	2.5 μ l	2.5 mM
dNTPs 10 mM	1.0 μ l	200 μ M
Iniciador 5' 20 mM	0.5 μ l	0.2 μ M
Iniciador 3' 20 mM	0.5 μ l	0.2 μ M
Taq polimerasa 5U/ml	0.2 μ l	1 U/ μ l
cADN	5.0 μ l	

2. Llevar a cabo la reacción de PCR en el termociclador con las siguientes características:

30 ciclos.....	94°C	45 seg (disociación)
	60°C	45 seg (asociación)
	72°C	90 seg (extensión)
1 ciclo	72°C	7 min (extensión final)

Nota: las condiciones de PCR para IL-12 son: [MgCl₂]= 2 mM

30 ciclos.....95°C 1 min. (disociación)
 55°C 1 min. (asociación)
 72°C 2 min. (extensión)
 1 ciclo72°C 5 min. (extensión final)

Lista de cebadores para citocinas:

Iniciador	Secuencia	bp
β-actina	Iniciador 5': GGTGGCCGCTCTAGGCACCAA-3' Iniciador 3': CTCTTTGATGTCACGCACGATTTC-3	543
IL-1β	Iniciador 5': ATGGCAACTGTTCCCTGAACTCAACT-3' Iniciador 3': CAGGACAGGTATAGATTCTTTCCTTT-3'	563
IL-10	Iniciador 5': GTAAAGGCTATTCCAACC-3' Iniciador 3': GGTTGGAATAGCATTAC-3'	604
IL-12	Iniciador 5': CAGAAGCTAACCATCTCCTGGTTTG-3' Iniciador 3': TCCGGAGTAATTTGGTGCTTCACA-3'	394
IFN-γ	Iniciador 5': TGCATCTTGGCTTTGCAGCTCTTCCTCATGGC-3' Iniciador 3': TGGACCTGTGGGTTGTTGACCTCATTGGC-3'	365
TNF-α	Iniciador 5': GTTCTATGGCCCAGACCCTCACA-3' Iniciador 3': CCATACTGGGTATATGGACCCT-3'	383

D. Corrimiento de los productos de PCR en gel de agarosa al 2%.

1. Preparar agarosa al 2% en TBE 1X.
2. Agregar a la agarosa 5µl de bromuro de etidio por cada 100 ml de azarosa (conc final de 10mg/ml).
3. Colocar la agarosa en la placa de electroforesis y dejar polimerizar por lo menos 1 hora.
4. Llenar la cámara con regulador TBE 1X. Por cada 100 ml de TBE 1X se adicionan 5 µl de bromuro de etidio.
5. Mezclar 1 µl de colorante para la muestra con 5 µl de producto del PCR y colocarla en el pozo correspondiente. Se utiliza un marcador de tamaño molecular como referencia (1 Kb DNA Ladder – GIBCO BRL), del cual se colocó 1µl/carril.

APÉNDICE B

Evaluación estadística de Mann-Whitney aplicada entre grupos control negativo (macrófagos no infectados) y células macrofágicas infectadas con diferentes dosis (baja, media y alta) en fase de crecimiento estacionaria o exponencial.

		Tiempo de incubación (horas)					
CITOCINA		0	1	3	6	9	12
Ctrl. Neg. Vs Dosis baja est	IL-12	P>0.050	P>0.050	<i>P≤0.050*</i>	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>
	IFN-γ	P>0.050	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>
	IL-10	P>0.050	<i>P≤0.050</i>	P>0.050	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>	P>0.050
	FNT-α	P>0.050	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>	P>0.050
	IL-1	P>0.050	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>
Ctrl. Neg. Vs Dosis media est.	IL-12	P>0.050	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>
	IFN-γ	P>0.050	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>
	IL-10	P>0.050	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>
	FNT-α	P>0.050	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>
	IL-1	P>0.050	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>
Ctrl. Neg. Vs Dosis alta est.	IL-12	P>0.050	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>
	IFN-γ	P>0.050	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>
	IL-10	P>0.050	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>
	FNT-α	P>0.050	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>
	IL-1	P>0.050	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>
Ctrl. Neg. Vs Dosis baja exp.	IL-12	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>
	IFN-γ	P>0.050	<i>P≤0.050</i>	P>0.050	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>
	IL-10	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>
	FNT-α	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>
	IL-1	P>0.050	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>
Ctrl. Neg. Vs Dosis media exp.	IL-12	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>
	IFN-γ	P>0.050	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>
	IL-10	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>
	FNT-α	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>
	IL-1	P>0.050	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>
Ctrl. Neg. Vs Dosis alta exp.	IL-12	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>
	IFN-γ	P>0.050	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>	P>0.050
	IL-10	<i>P≤0.050</i>	P>0.050	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>	P>0.050	<i>P≤0.050</i>
	FNT-α	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>	P>0.050
	IL-1	P>0.050	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>

Ctrl. Neg. = Control negativo - macrófagos no infectados.

Est. = Fase de crecimiento estacionaria.

Dosis baja = 1×10^7 UFC /pozo, originando una relación infecciosa 10 nocardias:1 macrófago.

Dosis media = 1×10^8 UFC/pozo, originando una relación infecciosa 100 nocardias:1 macrófago.

Dosis alta = 1×10^9 UFC/pozo, originando una relación infecciosa 1000 nocardias:1 macrófago.

****P≤0.050*** = Los valores significativos de P están en letra negra cursiva.

APÉNDICE C

Evaluación estadística de Mann-Whitney aplicada para la comparación entre macrófagos infectados con diferentes dosis de *N. brasiliensis* (baja, media y alta) en una misma fase de crecimiento.

		Tiempo de incubación (horas)						
		CITOCINA	0	1	3	6	9	12
Dosis baja est.	IL-12	P>0.050*	<i>P<0.050</i>	<i>P<0.050</i>	<i>P<0.050</i>	<i>P<0.050</i>	<i>P<0.050</i>	P>0.050
	IFN-γ	P>0.050	<i>P<0.050</i>	<i>P<0.050</i>	<i>P<0.050</i>	<i>P<0.050</i>	<i>P<0.050</i>	<i>P<0.050</i>
Vs Dosis media est.	IL-10	P>0.050	<i>P<0.050</i>	<i>P<0.050</i>	P>0.050	P>0.050	P>0.050	<i>P<0.050</i>
	FNT-α	P>0.050	<i>P<0.050</i>	<i>P<0.050</i>	<i>P<0.050</i>	<i>P<0.050</i>	<i>P<0.050</i>	<i>P<0.050</i>
Dosis baja est.	IL-1	P>0.050	<i>P<0.050</i>	<i>P<0.050</i>	<i>P<0.050</i>	<i>P<0.050</i>	<i>P<0.050</i>	<i>P<0.050</i>
	IL-12	P>0.050	<i>P<0.050</i>	<i>P<0.050</i>	<i>P<0.050</i>	<i>P<0.050</i>	<i>P<0.050</i>	<i>P<0.050</i>
Vs Dosis alta est.	IFN-γ	P>0.050	<i>P<0.050</i>	<i>P<0.050</i>	<i>P<0.050</i>	<i>P<0.050</i>	<i>P<0.050</i>	<i>P<0.050</i>
	IL-10	P>0.050	<i>P<0.050</i>	<i>P<0.050</i>	<i>P<0.050</i>	<i>P<0.050</i>	<i>P<0.050</i>	<i>P<0.050</i>
Dosis media est.	FNT-α	P>0.050	<i>P<0.050</i>	<i>P<0.050</i>	<i>P<0.050</i>	<i>P<0.050</i>	<i>P<0.050</i>	<i>P<0.050</i>
	IL-1	P>0.050	<i>P<0.050</i>	<i>P<0.050</i>	<i>P<0.050</i>	<i>P<0.050</i>	<i>P<0.050</i>	<i>P<0.050</i>
Vs Dosis alta est.	IL-12	P>0.050	<i>P<0.050</i>	<i>P<0.050</i>	<i>P<0.050</i>	<i>P<0.050</i>	<i>P<0.050</i>	<i>P<0.050</i>
	IFN-γ	P>0.050	<i>P<0.050</i>	<i>P<0.050</i>	<i>P<0.050</i>	<i>P<0.050</i>	<i>P<0.050</i>	<i>P<0.050</i>
Dosis baja exp.	IL-10	P>0.050	<i>P<0.050</i>	<i>P<0.050</i>	<i>P<0.050</i>	<i>P<0.050</i>	<i>P<0.050</i>	<i>P<0.050</i>
	FNT-α	P>0.050	P>0.050	<i>P<0.050</i>	<i>P<0.050</i>	<i>P<0.050</i>	<i>P<0.050</i>	<i>P<0.050</i>
Vs Dosis media exp.	IL-1	P>0.050	<i>P<0.050</i>	<i>P<0.050</i>	<i>P<0.050</i>	<i>P<0.050</i>	<i>P<0.050</i>	<i>P<0.050</i>
	IL-12	P>0.050	<i>P<0.050</i>	<i>P<0.050</i>	<i>P<0.050</i>	<i>P<0.050</i>	<i>P<0.050</i>	<i>P<0.050</i>
Dosis baja exp.	IFN-γ	P>0.050	<i>P<0.050</i>	<i>P<0.050</i>	<i>P<0.050</i>	<i>P<0.050</i>	<i>P<0.050</i>	<i>P<0.050</i>
	IL-10	P>0.050	<i>P<0.050</i>	<i>P<0.050</i>	<i>P<0.050</i>	<i>P<0.050</i>	<i>P<0.050</i>	<i>P<0.050</i>
Vs Dosis alta exp.	FNT-α	P>0.050	<i>P<0.050</i>	<i>P<0.050</i>	<i>P<0.050</i>	<i>P<0.050</i>	<i>P<0.050</i>	<i>P<0.050</i>
	IL-1	P>0.050	<i>P<0.050</i>	<i>P<0.050</i>	<i>P<0.050</i>	<i>P<0.050</i>	P>0.050	P>0.050
Dosis media exp.	IL-12	P>0.050	<i>P<0.050</i>	<i>P<0.050</i>	<i>P<0.050</i>	<i>P<0.050</i>	<i>P<0.050</i>	<i>P<0.050</i>
	IFN-γ	P>0.050	<i>P<0.050</i>	<i>P<0.050</i>	<i>P<0.050</i>	<i>P<0.050</i>	<i>P<0.050</i>	<i>P<0.050</i>
Vs Dosis alta exp.	IL-10	P>0.050	<i>P<0.050</i>	<i>P<0.050</i>	<i>P<0.050</i>	<i>P<0.050</i>	<i>P<0.050</i>	<i>P<0.050</i>
	FNT-α	P>0.050	<i>P<0.050</i>	<i>P<0.050</i>	<i>P<0.050</i>	<i>P<0.050</i>	<i>P<0.050</i>	<i>P<0.050</i>
Dosis media exp.	IL-1	P>0.050	<i>P<0.050</i>	<i>P<0.050</i>	<i>P<0.050</i>	<i>P<0.050</i>	P>0.050	P>0.050
	IL-12	P>0.050	<i>P<0.050</i>	<i>P<0.050</i>	<i>P<0.050</i>	<i>P<0.050</i>	<i>P<0.050</i>	<i>P<0.050</i>
Vs Dosis alta exp.	IFN-γ	P>0.050	<i>P<0.050</i>	<i>P<0.050</i>	<i>P<0.050</i>	<i>P<0.050</i>	<i>P<0.050</i>	<i>P<0.050</i>
	IL-10	P>0.050	<i>P<0.050</i>	<i>P<0.050</i>	<i>P<0.050</i>	<i>P<0.050</i>	<i>P<0.050</i>	<i>P<0.050</i>
Dosis alta exp.	FNT-α	P>0.050	<i>P<0.050</i>	<i>P<0.050</i>	<i>P<0.050</i>	<i>P<0.050</i>	<i>P<0.050</i>	<i>P<0.050</i>
	IL-1	P>0.050	<i>P<0.050</i>	<i>P<0.050</i>	<i>P<0.050</i>	<i>P<0.050</i>	P>0.050	P>0.050

Est. = Fase de crecimiento estacionaria.

Exp. = Fase de crecimiento exponencial.

Dosis baja = 1x10⁷ UFC/pozo, originando una relación infecciosa 10 nocardias:1 macrófago.

Dosis media = 1x10⁸ UFC/pozo, originando una relación infecciosa 100 nocardias:1 macrófago.

Dosis alta = 1x10⁹ UFC/pozo, originando una relación infecciosa 1000 nocardias:1 macrófago.

**P<0.050* = Los valores significativos de P están en letra negra cursiva.

APÉNDICE D

Evaluación estadística de Mann-Whitney aplicada entre grupos de macrófagos infectados con diferentes dosis (baja, media y alta) en fase de crecimiento estacionaria o exponencial.

		Tiempo de incubación (horas)					
		CITOCINA	0	1	3	6	9
Dosis baja est. Vs Dosis baja exp.	IL-12	P>0.050	P>0.050	<i>P≤0.050*</i>	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>
	IFN-γ	P>0.050	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>	P>0.050	P>0.050	P>0.050
	IL-10	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>
	FNT-α	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>	P>0.050	P>0.050	<i>P≤0.050</i>
	IL-1	P>0.050	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>
Dosis media est. Vs Dosis media exp.	IL-12	P>0.050	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>
	IFN-γ	P>0.050	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>
	IL-10	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>
	FNT-α	<i>P≤0.050</i>	P>0.050	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>	P>0.050
	IL-1	P>0.050	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>	P>0.050	<i>P≤0.050</i>
Dosis alta est. Vs Dosis alta exp.	IL-12	P>0.050	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>
	IFN-γ	P>0.050	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>
	IL-10	P>0.050	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>
	FNT-α	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>
	IL-1	P>0.050	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>	<i>P≤0.050</i>

Est. = Fase de crecimiento estacionaria.

Exp. = Fase de crecimiento exponencial.

Dosis baja = 1×10^7 UFC/pozo, originando una relación infecciosa 10 nocardias:1 macrófago.

Dosis media = 1×10^8 UFC/pozo, originando una relación infecciosa 100 nocardias:1 macrófago.

Dosis alta = 1×10^9 UFC/pozo, originando una relación infecciosa 1000 nocardias:1 macrófago.

****P≤0.050*** : Los valores significativos de P están en letra negra cursiva.

APÉNDICE E

Evaluación estadística de Mann-Whitney aplicada entre grupos de macrófagos infectados con la fase exponencial de *N. brasiliensis*, células macrofágicas enfrentadas a nocardias opsonizadas con anticuerpos y macrófagos pretratados con anticuerpos policlonales anti-*Nocardia*.

		Tiempo de incubación (horas)			
		CITOCINA	0	1	3
Dosis baja exp. Vs BEOPMab	IL-12	<i>P</i> ≤ 0.050*	<i>P</i> ≤ 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050
	IFN-γ	<i>P</i> > 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050	<i>P</i> > 0.050
	IL-10	<i>P</i> ≤ 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050
	FNT-α	<i>P</i> > 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050
	IL-1	<i>P</i> > 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050
Dosis media exp. Vs MEOPMab	IL-12	<i>P</i> ≤ 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050
	IFN-γ	<i>P</i> > 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050
	IL-10	<i>P</i> ≤ 0.050	<i>P</i> > 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050
	FNT-α	<i>P</i> > 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050
	IL-1	<i>P</i> > 0.050	<i>P</i> > 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050
Dosis alta exp. Vs AEOPMab	IL-12	<i>P</i> ≤ 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050
	IFN-γ	<i>P</i> > 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050
	IL-10	<i>P</i> ≤ 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050
	FNT-α	<i>P</i> > 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050
	IL-1	<i>P</i> > 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050
Dosis baja exp. Vs BEOPoli	IL-12	<i>P</i> ≤ 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050
	IFN-γ	<i>P</i> > 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050	<i>P</i> > 0.050
	IL-10	<i>P</i> ≤ 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050
	FNT-α	<i>P</i> > 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050
	IL-1	<i>P</i> > 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050
Dosis alta exp. Vs AEOPoli	IL-12	<i>P</i> ≤ 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050
	IFN-γ	<i>P</i> > 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050
	IL-10	<i>P</i> ≤ 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050
	FNT-α	<i>P</i> > 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050	<i>P</i> > 0.050
	IL-1	<i>P</i> > 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050
Dosis media exp. Vs MEPrePoli	IL-12	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	IFN-γ	<i>P</i> > 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050	N.D.
	IL-10	<i>P</i> ≤ 0.050	<i>P</i> > 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050	N.D.
	FNT-α	<i>P</i> ≤ 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050	N.D.
	IL-1	<i>P</i> ≤ 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050	N.D.
Dosis alta exp. Vs AEPrePoli	IL-12	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	IFN-γ	<i>P</i> > 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050	N.D.
	IL-10	<i>P</i> ≤ 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050	N.D.
	FNT-α	<i>P</i> > 0.050	<i>P</i> > 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050	N.D.
	IL-1	<i>P</i> ≤ 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050	N.D.

N.D. = No Determinada. Exp. = Fase de crecimiento exponencial.

BEOPMab = Dosis de *Nocardia* baja en fase de crecimiento exponencial opsonizada con MAb anti-P61.

MEOPMab = Dosis de *Nocardia* baja en fase de crecimiento exponencial opsonizada con MAb anti-P61.

AEOPMab = Dosis de *Nocardia* baja en fase de crecimiento exponencial opsonizada con MAb anti-P61.

MEPrePoli = Dosis de *Nocardia* media en fase de crecimiento exponencial expuesta a Mφs pretratados con acc. policlonales anti-*N. brasiliensis*.

AEPrePoli = Dosis de *Nocardia* alta en fase de crecimiento exponencial expuesta a Mφs pretratados con acc. policlonales anti-*N. brasiliensis*.

**P* ≤ 0.050 = Los valores significativos de *P* están en letra negra cursiva.



