

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA



“El Papel de los Lípidos de Superficie de *Nocardia brasiliensis* en el
Establecimiento del Actinomicetoma Experimental”

Tesis que presenta el
M.C.P. José Humberto Treviño Villarreal

Como requisito parcial para obtener el grado de Doctor en Ciencias
Con orientación terminal en Inmunología

Junio 2009

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 El Micetoma

1.1.1 – Definición

El micetoma o pie de Madura, es una enfermedad infecciosa crónica que afecta principalmente piel y tejido celular subcutáneo, aunque en casos avanzados la enfermedad puede extenderse a músculo e inclusive tejido óseo [1]. Se presenta inicialmente como un pequeño nódulo eritematoso indoloro localizado en el sitio de inoculación. Esta lesión, progresa crónicamente a medida que la infección se extiende por los diferentes planos de la piel hasta afectar músculo y hueso, en donde causa lesiones osteolíticas características. A medida que la infección progresa, se forman múltiples trayectos fistulosos que se abren hacia la superficie, drenando secreciones serosanguinolentas y purulentas, además de gránulos de diferentes aspectos, formas, tamaños, consistencias y colores dependiendo del agente causal. Estos granos o gránulos están constituidos por células inflamatorias y micro colonias del agente causal.

La población con mayor susceptibilidad a desarrollar micetoma es aquella que habita en zonas rurales y suburbanas, presentando una mayor predisposición la población varonil en proporción 4:1. El sitio afectado con mayor frecuencia es la extremidad inferior,

esto debido a que los pacientes caminan descalzos por la tierra, exponiendo la extremidad a los agentes causales. Otro sitio común donde se desarrolla el micetoma es la espalda, esto debido al traumatismo que ocurre en las personas que cargan leños en la espalda y cuyas astillas colonizadas penetra en la piel. Sin embargo, cabe mencionar que cualquier sitio de la economía es susceptible a desarrollar micetoma al ser inoculado con algún agente causal.

1.1.2 –Etiología del Micetoma

El micetoma se clasifica según el agente causal en eumicetoma (micetoma eumicótico) cuando es causado por hongos o en actinomicetoma (micetoma actinomicótico), cuando el agente causal es una bacteria. La distinción clínica entre ambas entidades es prácticamente imposible.

El 40% de los casos de micetomas son causados por hongos, el agente etiológico aislado con mayor frecuencia es *Madurella mycetomatis*. Sin embargo existen muchos otros hongos capaces de inducir procesos similares, entre ellos figuran: *Fusarium solani*, *Rhinoclediella atrovirens*, *Curvularia lunata*, *Madurella griseasea*, *Monosporium apioespermum*, *Leptosphaeria senegaliensis* principalmente.

Por su parte, el actinomicetoma representa el 60% de los casos de micetoma. Es causado en su mayoría por especies aerobias del orden *Actinomycetales*, principalmente por *Nocardia brasiliensis*, *Nocardia asteroides*, *Nocardia otitidis-caviarum*, *Actinomadura madurae*, *Actinomadura pelletieri*, *Streptomyces somaliensis* y *Nocardopsis dassonvillei*. Todos estos microorganismos viven como saprófitos del suelo a partir de donde penetran la

piel mediante traumatismos con objetos contaminados como astillas, espinas restos vegetales etc.

1.1.3 –Distribución geográfica del micetoma

El micetoma presenta una amplia distribución geográfica. En general, se ha reconocido que el micetoma es más común en la región comprendida entre el trópico de cáncer y el trópico de capricornio (latitud 15° sur-30° norte). Esta región, a veces denominada como el cinturón del micetoma, abarca países como Sudán, Senegal, Somalia, la región sur de la India, México, Centroamérica, países Sudamericanos como Venezuela, Colombia Brasil y Perú, en donde la incidencia del micetoma es más alta. Esta región se caracteriza por un clima que va de árido a subtropical, con una baja incidencia de lluvias durante el año y largos periodos de sequía. Se piensa, que son estas condiciones climáticas necesarias para la persistencia y sobrevivencia de los agentes causales del micetoma.

Aunque en menor frecuencia, el micetoma también ha sido reportado en países localizados fuera del cinturón del micetoma. En países de la región Europea, Estados Unidos de Norte América así como en algunos países asiáticos, el micetoma se ha observado en la clínica, aunque con mucha menor frecuencia en comparación con los países localizados dentro del cinturón del micetoma. Cabe mencionar que debido a la diferencia climática, los agentes causales aislados en dichos países son diferentes a los que se observan en los países localizados dentro del cinturón del micetoma. En países localizados entre el trópico de cáncer y el trópico de Capricornio, el micetoma se presenta con mayor frecuencia en pacientes inmunológicamente sanos. En estos países la etiología del micetoma varía según las condiciones climáticas. Por ejemplo, en la India y en África,

regiones endémicas caracterizadas un clima seco con pocas lluvias durante el año, el micetoma es causados principalmente por *Streptomyces somaliensis*, *Actinomadura madurae* y *Actinomadura pelletieri*. Por otro lado, las especies del género *Nocardia* son más comunes en zonas geográficas donde el promedio anual pluviométrico es mayor, como en la región sur de México, Venezuela y en Brasil, donde el índice pluviométrico es alto. En estos países *A. madurae* y *N. brasiliensis* son los agentes causales más frecuentes.

1.1.4 –El Micetoma en México

En México, el micetoma presenta una amplia distribución geográfica, los estados que reportan el mayor número de casos son Morelos, Jalisco, Nuevo León, San Luis Potosí, Veracruz, Guerrero, Chiapas, Querétaro, Michoacán, Puebla y Oaxaca. De los casos reportados en nuestro país, aproximadamente el 98% son actinomicóticos. De estos, el 86% de los casos son debidos a *Nocardia brasiliensis*. El resto se atribuye a distintos actinomicetos, principalmente *A. madurae*, *S. somaliensis*, *N. asteroides* y *A. pelletieri*. En un estudio realizado en Zacatepec, estado de Morelos, México, se observó que el 70% de los agricultores de caña aparentemente sanos, presentaban respuesta a las sensitinas de *N. brasiliensis*, mientras que la respuesta a las sensitinas de este microorganismo fue solo del 10% en la población no rural.

En Nuevo León, en el servicio de dermatología del hospital Universitario, se observó que el 84% de 101 casos de micetoma fueron actinomicetomas, de los cuales el 73% fue causado por *N. brasiliensis*.

1.2 El Actinomicetoma

1.2.1 –Aspectos Clínicos

Como se mencionó, la distinción clínica entre el eumicetoma y el actinomicetoma es muy difícil. Sin embargo existen algunos datos característicos que ayudan a distinguir la presencia de un actinomicetoma. En general se acepta que la evolución del actinomicetoma es de más rápida evolución, más supurativa, en algunos casos inclusive dolorosa que los eumicetomas. Sin embargo, el aspecto general de la lesión, al igual que el eumicetoma, está constituido por nódulos, fístulas, abscesos, deformidad marcada y consistencia firme y dura en el sitio afectado.

La formación de granos es un dato característico del micetoma que ayuda al diagnóstico diferencial. La necrosis en los tejidos ayuda a la expulsión de los gránulos a través de las fístulas. El aspecto de los gránulos es otro dato que puede ayudar a distinguir un actinomicetoma, ya que la característica de estos depende del agente causal.

1.2.2 – Lesión ósea en el actinomicetoma

Adicionalmente, se acepta que los microorganismos causales del actinomicetoma tienden a causar afección ósea con mayor frecuencia que los hongos. Los principales agentes inductores de lesiones óseas son *N. brasiliensis* y *A. pelletieri*. Las lesiones óseas se acompañan de datos radiológicos característicos como cavitación del hueso endóstico, erosión perióstica, formación de hueso nuevo perióstico, el cual se evidencia como

espículas corticales óseas y finalmente expansiones amorfas del hueso. La afección hacia el periostio empeora por mucho el pronóstico de la enfermedad.

1.2.3 –Patología del Actinomicetoma

Sin duda, uno de los datos histopatológicos más relevantes del actinomicetoma es la presencia de los gránulos. Estas estructuras como se ha mencionado, corresponden a colonias del agente causal. Es por esto que tienden a inducir reacciones tisulares específicas las cuales se han clasificado en tres tipos

Tipo I: El grano se observa rodeado o invadido por un intenso infiltrado de leucocitos polimorfonucleares.

Tipo II: Presencia de una capa vascular la cual contiene macrófagos, linfocitos, células plasmáticas y células gigantes multinucleadas. En las células multinucleadas se puede observar en ocasiones fragmentos del gránulo. Adicionalmente, algunas células gigantes presentan un citoplasma espumoso.

Tipo III: Formación de una lesión epitelioides.

Desde el punto de vista histológico, la lesión tisular que ocurre en el actinomicetoma se puede clasificar según sea el caso en reacciones inflamatorias agudas, respuesta inflamatoria subaguda, respuesta inflamatoria celular crónica, respuesta de tipo esclero-fibrótica o respuesta inflamatoria con cápsula fibrótica y respuesta celular inflamatoria tipo crónica.

Los ganglios linfáticos que drenan el área afectada en el actinomicetoma también son sujetos a cambios histopatológicos característicos. Es común observar la presencia de linfadenomegalia con hiperplasia de tipo reactiva, con abundante infiltración de células plasmáticas e inclusive cuerpos de Russell. Esta respuesta puede deberse a una respuesta secundaria a antígenos que drenan en el ganglio procedentes del sitio de lesión. Sin embargo, es común observar metástasis del agente causal hacia el ganglio linfático. Este fenómeno puede causar la obstrucción del drenaje linfático, causando un linfedema secundario. Este tipo de manifestaciones clínicas son más comunes en actinomicetomas secundarios a *N. brasiliensis*.

1.3 *Nocardia brasiliensis*

1.3.1. –*Nocardia brasiliensis*

Nocardia brasiliensis es el principal agente causal del actinomicetoma en México, y uno de los principales agentes causales a nivel mundial. *N. brasiliensis* es una bacteria no móvil, no esporulada, aerobia estricta, intracelular facultativa, gran positiva, parcialmente ácido-alcohol resistente, catalasa positiva, la cual se encuentra comúnmente como saprófita en el suelo. *N. brasiliensis* se agrupa, junto con otros microorganismos de importancia médica como *Mycobacterium spp.*, *Tsukamurella* y *Rhodococcus spp.*, dentro del suborden *Corynebacterineae*, una de las dos subdivisiones del orden *Actinobacteria*. Los microorganismos del suborden *Corynebacterineae* poseen ciertas características distintivas, como la ácido-alcohol resistencia, la gram positividad, la característica de ser microorganismo aerobios es intracelulares entre otros. Sin embargo, la característica más

importante de *N. brasiliensis* como *Corynebacterineae* es la presencia de una pared celular quimiotipo IV; por lo tanto, se entiende que al igual que *N. brasiliensis*, todos los *Corynebacterineae*s poseen una pared celular quimiotipo IV [2].

1.3.2 – La Pared Celular de *Nocardia brasiliensis*

Poco se sabe acerca de la constitución de la pared celular de *N. brasiliensis*. Sin embargo, esta estructura tiene importancia taxonómica ya que muchos constituyentes de membrana han sido utilizados para identificar, clasificar y distinguir microorganismos del género *Nocardia*. Los miembros del género *Nocardia spp* poseen una pared con peptidoglicano similar a la de *Mycobacterium spp* consistente en β -N-acetilglucosamil-1,4-N-ácido glucosamilmurámico [3] alternando con tetrapéptidos de L-alanina, D-glucosamina, ácido-meso-diaminopimérico y D-alanina [4]. En *Nocardia spp* la pared de peptidoglicano constituye entre el 20-25% de la pared celular en microorganismos en fase logarítmica [5]. En *Nocardia spp* el peptidoglicano se encuentra unido por un enlace fosfodiéster a la porción de galactano del esqueleto de arabinogalactano [5-7]. Así mismo, la arabinosa de la pared celular de *Nocardia sp.* se encuentra esterificada por ácidos micólicos, formando el complejo de micolil-arabino-galactano peptidoglicano [8].

Adicionalmente, el esqueleto de micolil-arabino-galactano peptidoglicano de la pared celular de *Nocardia spp* interactúa tanto covalente como no-covalentemente con diversos compuesto químicos[5, 6]. Por ejemplo, la pared celular de las *Nocardia spp* posee además de arabinosa y galactano, otros azúcares como glucosa, manosa, inositol y trehalosa [6, 9]. La trehalosa de la pared celular de *Nocardia spp* también está esterificada con 2 ácidos micólicos en posición 6,6' formando dimicolato de trehalosa (factor cuerda) [8].

1.3.3 –Inmunopatología del Actinomicetoma por *Nocardia brasiliensis*

El actinomicetoma inducido por *N. brasiliensis* es principalmente un fenómeno inmunopatológico en el cual la aberrante respuesta inflamatoria que induce ocasiona una destrucción tisular masiva que finalmente es causa de deformidad e inclusive pérdida de función. El fenómeno inflamatorio se origina desde las primeras horas de infección y se caracteriza por un infiltrado inflamatorio agudo acompañado por un extenso reclutamiento del neutrófilos y evidentes cambios vasculares. A medida que la infección tiende a la cronicidad, el infiltrado inflamatorios agudo es reemplazado por un infiltrado de tipo crónico, el cual se caracteriza por la aparición de granulomas fibrosos constituidos por macrófagos, células gigantes multinucleadas, células espumosas, células plasmáticas y linfocitos, todos ellos rodeados por una cápsula de tejido fibroso con colágena.

1.3.4 –Mecanismos de Patogenicidad y Virulencia de *Nocardia brasiliensis*

Tanto para *N. brasiliensis* como para muchos otros microorganismos intracelulares, no ha sido identificado un solo componente bacteriano determinante de la inducción de la enfermedad. Sin embargo, varios compuestos han sido propuestos como posibles factores de virulencia en *N. brasiliensis*, aunque cabe recalcar que ninguno de ellos han demostrado con certeza estar implicados o ser necesarios para el establecimiento del micetoma.

La superóxido dismutasa A de *N. brasiliensis* ha sido estudiada como posible factor de virulencia, debido a su efecto reductor de radicales reactivos de oxígeno producidos por los macrófagos [10]. Por otro lado, se hasugerido que una proteasa caseinolítica de *N.*

brasiliensis pudiera estar implicada en la inducción de las lesiones ósea que caracterizan al actinomicetoma [11].

En otras especies como *N. asteroides* se han postulado mecanismos de patogenicidad tales como la inhibición de la acidificación vesicular y la inhibición de la fusión fagolisosomal en macrófagos [12, 13]. Se ha demostrado que la DMT de *N. asteroides* participa de manera importante en la mediación de dichos efectos [14, 15].

Es difícil creer que un proceso patológico tan complejo como es el actinomicetoma dependa de un solo factor microbiano para su desarrollo. Como se ha mencionado antes, el actinomicetoma es una enfermedad inmunopatológica, y como tal, se supone que la inducción de inflamación es el determinante de patogenicidad en *N. brasiliensis* necesario para el desarrollo de la enfermedad.

1.3.5 –La Inflamación y el Actinomicetoma

La inflamación es un fenómeno celular y vascular que se induce ante la presencia de una serie de estímulos con el fin de eliminar un agente infeccioso o bien para reparar un tejido dañado. En condiciones controladas, la inflamación es benéfica, sin embargo, cuando esta se sale de control, origina una destrucción tisular masiva, tal y como se observa en el actinomicetoma.

La inflamación se origina cuando las células del sistema inmune detectan un estímulo por medio de receptores de activación celular y en respuesta, producen mediadores solubles que se encargan de modular múltiples cambios en los elementos

celulares vecinos. Estos receptores denominados receptores de reconocimiento de patrones (PRR's) reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP's) [16]. Los PAMP's, comprenden diversos compuesto químicos distribuidos ampliamente entre los microorganismos, pero por definición ausentes en las células de los organismos celulares superiores. Existe una gran variedad de PAMP's, los más representativos son el lipopolisacárido bacteriano (LPS), el ácido lipoteitóico (LT), la muramina, la LAM por mencionar algunos. La mayor parte de los PAMP's son compuesto localizados en la superficie externa de los microorganismos en donde participan en funciones esenciales para la supervivencia, colonización y metabolismo bacteriano. La localización superficial de los PAMP's los hace accesibles al reconocimiento de los PRR's de los leucocitos. En respuesta los PRR's median eventos de señalización intracelular que culminan con la expresión de productos génicos pro-inflamatorios, principalmente citocinas.

En apego a la definición, *N. brasiliensis* posee una enorme cantidad de PAMP's diferentes, la mayoría de ellos de naturales lipídica y glicolipídica. A la fecha, no se han estudiado cuáles de ellos podrían estar implicados en la patogénesis del actinomicetoma. Pese a esto, resulta interesante la idea que, debido a su abundancia, los lípidos de superficie de *N. brasiliensis* pudieran modular el proceso inflamatorio que caracteriza a la enfermedad. Limitaciones como la ausencia de moléculas de superficie aisladas e identificadas o cepas mutantes carentes de compuestos específicos han limitado el progreso en este campo de estudio. Sin embargo, el éxito en el desarrollo de nuevas medidas terapéuticas o preventivas depende del entendimiento de la fisiopatología de la enfermedad. Dada a la naturaleza inflamatoria del actinomicetoma, yo creo que los lípidos de superficie, principalmente por su abundancia, variedad y complejidad química, son los mediadores

encargados de inducir dicho fenómeno inmunológico. Es por esto, que en el presente trabajo se trata de dilucidar la contribución que estos compuestos en la inducción del actinomicetoma.

Dada el desconocimiento existente sobre los aspectos químicos, bioquímicos y estructurales de la pared celular de *N. brasiliensis*, pienso es necesario tomar como modelo a otros microorganismos relacionados pertenecientes al suborden *Corynebacterineae*, y que mejor modelo que el ampliamente estudiado género *Mycobacterium* para esto. Como *Corynebacterineae*s, ambos microorganismos presentan una pared celular quimiotipo IV y como se abordará a continuación, es evidente la gran similitud estructural y química existente entre ambos.

CAPITULO 2

ANTECEDENTES

2.1 Estructura de la pared Celular Quimiotipo IV

2.1.1 –Estructura General de la Pared Celular Quimiotipo IV

La pared celular quimiotipo IV presente en los microorganismos del suborden *Corynebacterineae*, es estructural y químicamente diferente a cualquier otra pared celular encontrada en la naturaleza. Se caracteriza por un alto contenido de lípidos de superficie, de diversas e inusuales estructuras químicas los cuales, en conjunto llegan a representar hasta el 40% del peso seco de estos microorganismos. Esta abundancia lipídica, explica muchas de las características funcionales de los microorganismos pertenecientes al suborden *Corynebacterineae*, como la alta hidrofobicidad, la impermeabilidad a nutrientes y drogas, así como la alta tendencia a formar agregados multicelulares en solución [17].

La pared celular quimiotipo IV se organiza en una serie de capas identificables mediante microscopía electrónica de transmisión, a saber, una membrana celular, una capa electro densa interna, una capa electro lúcida intermedia y una capa electro densa externa ; cada capa posee una composición química característica [2, 17]. Aunque la interpretación estructural de cada capa es especulativa, en general se acepta que la pared celular

quimiotipo IV está compuesta por una membrana celular, homóloga a la presente en otras células, rodeada de una pared celular compleja, compuesta por un esqueleto covalente de micolato, arabinosa, galactano y peptidoglicano que brinda la rigidez estructural e impermeabilidad a la pared celular. Este esqueleto celular está representado por las capas electro densa interna y electro lúcida intermedia. Adicionalmente, la pared celular quimiotipo IV posee una serie de lípidos y glicolípidos unidos no covalentemente al esqueleto de micolil-arabinogalactano peptidoglicano que en su conjunto forman una capa externa, la capa electro densa externa, análoga a la cápsula externa presente en otros microorganismos patógenos [18, 19].

2.1.2 –Membrana plasmática de la pared quimiotipo IV

La estructura y la composición química elemental de la membrana celular de la pared celular quimiotipo IV, es análoga a cualquier otra membrana biológica[20]. Está constituida principalmente por lípidos polares ensamblados a manera de bicapa fosfolípida en asociación a proteínas estructurales principalmente porinas. Los lípidos polares están formados por ácidos grasos insaturados, mono-metil ramificados de 20 o menos átomos de carbono (siendo los principales el ácido palmítico, octadecaenóico y ácido tuberculoesteárico) esterificados por grupos hidrofílicos de cabeza, principalmente derivados del ácido fosfatídico, formando así diversos fosfolípidos. Entre los principales fosfolípidos de membrana se encuentran los fosfatilinositol manósidos, el fosfatilglicerol, la cardiolipina así como otros constituyentes menores como fosfatidiletanolamina y fosfatidilinositol.

La lipoarabinomanosa (LAM), siendo un derivado del metabolismo de los fosfatidil-*myo*-inositol manósidos, se piensa está anclada covalentemente a la membrana celular, formando un puente de unión entre el esqueleto de pared celular y la membrana celular [18, 21]. La LAM está formada por un grupo fosfatidilinositol de cabeza, unido covalentemente a un esqueleto de arabinomanosa [2].

2.1.3 –El complejo micolil-arabinogalactano-peptidoglicano (mAGP)

La pared celular de los microorganismos del suborden *Corynebacterineae* consiste en un esqueleto celular compuesto por una abundante variedad de lípidos unidos covalentemente. Químicamente, la pared celular es una macromolécula formada por la interacción covalente de tres constituyentes químicos, el peptidoglicano, un esqueleto de arabino-galactano y ácidos micólicos. En conjunto, esta macromolécula forma el esqueleto de la pared celular quimiotipo IV y recibe el nombre de complejo micolil-arabinogalactano-peptidoglicano (mAGP).

El esqueleto de peptidoglicano está compuesto por unidades repetitivas de N-acetilglucosamina y ácido N-acetil murámico, entrelazados por cadenas laterales tetrapeptídicas de L-alanina, ácido *meso*-diaminopimélico, D-glutamina y D-alanina. El esqueleto de arabinogalactano es un complejo heteropolisacárido, compuesto de unidades lineales repetitivas de homogalactanofuranósidos unidos por enlaces β -glucosídicos covalentes a D-arabinosas, formando agregados de pentaarabinofuranósidos ramificados. Aproximadamente dos terceras partes de los extremos no reductores de los agregados de pentaarabinofuranosil se encuentran esterificados por ácidos micólicos.

Característicamente, los ácidos micólicos son α metilados, β hidroxilados [22]. Se han descrito 3 clases de ácidos micólicos en la pared celular de *M. tuberculosis*, el *Corynebacterineae* mejor conocido: alpha, keto y metoximicolatos. Los α -micolatos poseen 2 anillos de ciclopropano en configuración *cis* [23, 24], mientras que los keto y los metoximicolatos tan solo tienen un anillo ya sea en posición *cis* o *trans* [25]. La longitud de los ácidos micólicos varían según especie, Por ejemplo, mientras que en *Nocardia sp.* se extienden 45-60 átomos de carbono, en *Mycobacterias spp.* los ácidos micólicos miden 60-90 átomos de carbono.

2.1.4 –Lípidos asociados de la capa externa

Los ácidos micólicos se extienden perpendiculares al plano del esqueleto de arabinogalactano-peptidoglicano. En la superficie externa, los ácidos micólicos están asociados a un gran número de compuestos químicos mediante enlaces no covalentes. Dada a las características de asociación, estos compuestos unidos no covalentemente a la pared celular forman la fase extraíble de la pared celular, debido a la facilidad con la que pueden ser removidos mediante el uso de solventes polares tales como hexano, cloroformo, éter etílico, éter de petróleo entre otros. El análisis de los extractos obtenidos con dichos solventes, ha permitido la identificación de numerosos compuestos principalmente lipídicos y glicolipídicos que en la teoría actual de la estructura de la pared celular quimiotipo IV, forman la capa electro densa externa [17, 18]. Entre los principales lípidos y lipoglicanos libres asociados a la pared celular, se encuentran glicolípidos de trehalosa mono y

multiacilados, glicolípidos de trehalosa sulfatados multiacilados, dioles policétidos diacilados de cadena larga y fosfatidil-*myo*-inositol manósidos acetilados [21, 26, 27].

Entre las especies acetiladas de trehalosa más comunes se encuentran el mono y el dimicolato de trehalosa (también conocido como factor cuerda), así como los di, tri y pentaacil esterres de trehalosa [28, 29]. Por otra parte, los glicolípidos representativos dentro de las trehalosas sulfatadas multiacetiladas son los sufolípidos [30]. Existen 2 familias diferentes de dioles policétidos diacetilados, los tiocerol dimicocerotato y los glicolípidos fenólicos [31]. Por último, uno de los fosfatidilinositol manósidos (PIM) más abundantes en la pared celular quimiotipo IV es el PIM hexamansilado [27].

2.2 El Papel de la Pared Celular en la Virulencia de los *Corynebacterineae*

Recientemente se le ha dado especial interés a los lípidos de asociación de membrana por su creciente reconocimiento como participantes en la virulencia de ciertas especies de *Corynebacterineae*, especialmente *Mycobacterium* spp. Dada a su localización externa en la pared celular, los lípidos de asociación de membrana se encuentran en la interface entre el microorganismo y el sistema inmune, proveyendo la primera línea de reconocimiento para iniciar una respuesta inmune. Al ser reconocidos por receptores de reconocimiento de patrones del sistema inmune, los lípidos de asociación modulan múltiples aspectos de la virulencia, patogenicidad y progresión de la enfermedad al activar mecanismos inflamatorios o bien, modulando los mecanismos efectores del sistema inmune.

2.2.1 –El Papel del Glicolípido Fenólico en la Virulencia de *Mycobacterium tuberculosis*

Nuestro conocimiento del papel de los lípidos de superficie en la virulencia de los *Corynebacterineae* proviene principalmente de estudios con *Mycobacterium spp.* Apoyados principalmente en cepas mutantes con capacidad de virulencia atenuada, se ha logrado identificar múltiples genes relacionados con la biosíntesis de lípidos de superficie implicados en la multiplicación, persistencia y lesión tisular inducida por *Mycobacterium spp.* Por ejemplo, la mutación en el gen policétido sintasa 15 (*pks 15/1*) en la cepa clínica HN878 genera una cepa mutante carente de glicolípido fenólico (GLP) [32]. Con esta cepa fue posible esclarecer el papel del GLP en la virulencia de *M. tuberculosis*. El GLP inhibe la producción de TNF- α , IL-12, IL-6 y MCP-1 tanto en ratones como en macrófagos [32]. Consistente con este reporte, los extractos lipídicos de la cepa CDC1551 que carece de GLP induce IL-12, TNF- α así como otros mediadores importantes implicados en la activación de los fagocitos [33].

2.2.2 –El Papel del Dimicocerostato en la Virulencia de *Mycobacterium tuberculosis*

Otro grupo de compuestos químicos con actividad inmunomoduladora son los ésteres de dimicocerostato (DIM) [34]. Estudios de infección de macrófagos utilizando cepas carentes de DIM mostraron una mayor inducción de citocinas pro-inflamatorias TNF- α e IL-6 en comparación con la cepa silvestre [34]. Además de modular mecanismos efectores del sistema innato y adquirido, algunos lipoglicanos como la LAM, modulan una serie de mecanismos responsables del control y erradicación de los microorganismos, tales

como la fusión fagolisosomal, el estallido respiratorio y el tráfico vesicular en los fagocitos principalmente en macrófagos [35-38].

2.2.3 El Papel de la Dimicolato de Trehalosa en la Virulencia de *Mycobacterium tuberculosis*

Unos de los compuestos glicolipídicos mejor caracterizados por su potente actividad inductora de mediadores inflamatorios implicados en la virulencia de muchas *Mycobacterium spp.* es la dimicolato de trehalosa (DMT). La DMT induce una potente respuesta inflamatoria tanto en ratones como en macrófagos que por sí sola, puede reproducir múltiples aspectos de la enfermedad como la formación de granulomas los cuales, son prácticamente indistinguibles a los inducidos por el microorganismo completo.

La DMT es el principal constituyente de pared celular de *M. tuberculosis* extraíble con éter de petróleo [39, 40]. El tratamiento con éter de petróleo deslipidiza al bacilo sin afectar su viabilidad [41, 42]. Estudios con *M. tuberculosis* deslipidizada con éter de petróleo han demostrado la importancia de la DMT en la inducción de los granulomas inflamatorios que caracterizan la lesión, demostrando la importante participación de los mediadores pro-inflamatorios en la biogénesis de los granulomas. Por ejemplo, se ha reportado que *M. tuberculosis* deslipidizada con éter de petróleo induce una menor producción de IL-1 β , TNF- α , IL-6 y MIP-1 α en comparación con la cepa control [40, 42]. De igual forma, *M. tuberculosis* deslipidizada induce menos granulomas inflamatorios que el control [43, 44]. Se cree, que la capacidad inductora de granulomas inflamatorios se debe a la potente inducción de la DMT de las citocinas INF- γ , TNF- α , IL1- β , IL-6, IL-12

así como de NO [44-46]. Además, se ha sugerido que los linfocitos T CD3⁺, por un mecanismo dependiente de CD1, median la inducción de granulomas por la DMT [47, 48].

El papel de la DMT en la virulencia de *M. tuberculosis* ha sido demostrado también en experimentos con cepas mutantes carentes de genes implicados en la síntesis de DMT o ácidos micólicos. La cepa *fbpA* null carente de una micolil transferasa induce una mayor producción de IL-1 β , IL-2, INF- γ y NO en comparación con la cepa silvestre H37Rv [49]. Además, la ausencia de DMT atenúa la virulencia de *M. tuberculosis*, como se refleja en una reducción en la carga bacilar en pulmón y bazo [49]. Además de modular la producción de mediadores inflamatorios, la DMT modula otros aspectos de la respuesta inmune, como la maduración vesicular. La DMT inhibe la fusión vesicular dependiente de Ca⁺⁺ [15]. Por otra parte, la cepa *fbpA* null inhibe la adquisición de marcadores de maduración fagosomal, previniendo en última instancia la acidificación del fagosoma [43, 50]. Estos resultados son reforzados con la evidencia de la habilidad que poseen las nanopartículas recubiertas con DMT para prevenir la acidificación fagosomal [43].

El mecanismo por el cual la DMT induce la producción de mediadores inflamatorios implicados en la patogenia de la tuberculosis no ha sido dilucidado. Sin embargo, estudios en otras cepas de *M. tuberculosis* genéticamente modificadas han permitido apreciar la contribución que tienen los constituyentes químicos de los ácidos micólicos de la DMT en la inducción de dichos mediadores inflamatorios. Por ejemplo, el estado de ciclopropanación de los ácidos micólicos de la DMT modula la capacidad inductora de TNF- α . La cepa de *M. tuberculosis* carente de la ciclopropano sintetasa, Δ *pcaA* null, mostró una menor virulencia en comparación con la cepa silvestre al inducir una mayor producción de TNF- α [51]. De la misma forma, la inyección de DMT

proveniente de la cepa $\Delta pcaA$ null indujo menor inducción de granulomas en comparación con la DMT de la cepa control. Con este estudio se demuestra que modificaciones estructurales finas en la composición química de la DMT ejercen una importante influencia en la actividad biológica total de la molécula. En otro estudio realizado por el mismo grupo de investigadores se observó que la mutación del gen *cmaA2*, implicado en la trans-ciclopropanación tanto de keto como metoxi ácidos micólicos, incrementa la virulencia de *M. tuberculosis* al inducir un estado hiperinflamatorio caracterizado por la inducción de un mayor número de granulomas y de mayor tamaño por la cepa $\Delta cmaA2$ null en comparación con la cepa silvestre [52]. Esta hipervirulencia se relacionó con una mayor producción de TNF- α por la DMT carente de *trans*-ciclopropanación en comparación con la DMT proveniente de la cepa silvestre [52].

2.3 El Papel de los Lípidos de Superficie en la Virulencia de *Nocardia spp.*

A diferencia de microorganismos del género *Mycobacterium*, el papel de los lípidos de superficie en la virulencia de microorganismos del género *Nocardia* es menos claro. Al igual que en *M. tuberculosis*, la DMT de *N. asteroides* participa en la virulencia de este microorganismo al inhibir la fusión vesicular dependiente de Ca^{++} al mismo tiempo que bloquea la acidificación vesicular [14, 15]. Por otro lado, se ha observado que la administración de TDM de *N. asteroides* en emulsión con aceite mineral intraperitonealmente en ratones, induce un proceso tóxico letal caracterizado por desgaste y caquexia [53].

Adicionalmente a la DMT, otros compuesto lipídicos de membrana han sido implicados en la virulencia de *N. asteroides*. Está claro que *N. asteroides* en fase de crecimiento logarítmico es más virulenta que cuando se encuentra en la fase de crecimiento estacionaria [6, 7]. Estudios sobre la composición química de la pared celular de *N. asteroides*, han revelado diferencias relativas a la composición lipídica de la pared celular, específicamente en la composición de los ácidos micólicos, cuando esta se encuentra en fase logarítmica en comparación con la fase estacionaria [6, 9, 54].

Mientras que *N. asteroides* en crecimiento logarítmico posee una pared celular rica en ácido micólicos poliinsaturados, preferentemente de C₅₂, C₅₄, C₅₆, *N. asteroides* en fase de crecimiento estacionario posee predominantemente ácido micólicos saturados de C₄₉, C₅₁. Por lo tanto, parece ser que la composición relativa de ácidos micólicos en la superficie de *N. asteroides* se relaciona con la virulencia; los ácidos micólicos saturados con número de átomos de carbono impar (C₄₉, C₅₁) se relacionan con una menor virulencia. En consistencia con esta idea, una cepa de *N. asteroides* mutante, con menor virulencia en estudios de infección en ratones, mostró poseer una cantidad reducida de un micolato, el C_{54:3} mientras que poseía un incremento de micolatos C₄₉, C₅₁ y C₅₃[54].

En el caso de *N. brasiliensis*, no se ha estudiado cual es el papel de los lípidos de superficie en el establecimiento del actinomicetoma. Dada a las similitudes que presenta la lesión inducida por *N. brasiliensis* con las lesiones inducidas por microorganismos del género *Mycobacterium*, se puede pensar, que al igual que con *Mycobacterium spp.*, los lípidos de superficie de *N. brasiliensis* inducen los cambios inflamatorios que caracterizan al actinomicetoma, sin embargo, esta idea no ha sido demostrada experimentalmente.

N. brasiliensis induce un proceso granulomatoso crónico, caracterizado por un intenso proceso inflamatorio que conduce a la deformidad y destrucción del sitio afectado, denominado actinomicetoma. En el actinomicetoma, la intensa inflamación induce la formación de múltiples granulomas los cuales tienden a confluir, formando a través de sus centros necróticos, tractos o fistulas que se externalizan hacia la superficie. Clínicamente, esto se evidencia como abscesos y fistulas que drenan microcolonias del agente causal hacia el exterior.

En el actinomicetoma se producen diversos mediadores inflamatorios como IL-1 β , IL-6 y TNF- α [55]. Estas citocinas son inducidas por células del sistema inmune como macrófagos, en respuesta al reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP's) por receptores de reconocimiento de patrones (PRR's) de superficie. Debido a que, en *N. brasiliensis*, al igual que en cualquier otro *Corynebacterineae*, el 40% de la pared celular está compuesta por lípidos, es probable que los fagocitos reconozcan principalmente a los lípidos de superficie como PAMP's superficiales, y que tras dicho reconocimiento se liberen los diferentes mediadores inflamatorios que participan en la fisiopatología del actinomicetoma.

Sin embargo, actualmente se desconoce si en realidad los lípidos de superficie de *N. brasiliensis* poseen algún efecto biológico sobre el sistema inmune del huésped, y por lo tanto se desconoce si están implicados en la fisiopatología del actinomicetoma. Por lo tanto, el presente trabajo tiene como objetivo investigar, cuál es el papel de los lípidos de superficie de *N. brasiliensis* en el establecimiento del actinomicetoma.

JUSTIFICACIÓN

A la fecha, no se conoce cuál es el papel de los lípidos de *Nocardia brasiliensis* en la inducción del micetoma. Entender el papel de los lípidos de *Nocardia brasiliensis* en la inducción del micetoma nos permitirá, incrementar nuestro entendimiento sobre la génesis de la enfermedad así como sentar las bases para desarrollar nuevas estrategias de intervención tanto terapéutica como preventiva contra el micetoma.

HIPÓTESIS

Los lípidos de superficie de *Nocardia brasiliensis* son fundamentales para el establecimiento del actinomicetoma experimental.

Objetivo General

Investigar el papel de los lípidos de superficie de *Nocardia brasiliensis* en el establecimiento y desarrollo del actinomicetoma en un modelo experimental en ratones BALB/c.

Objetivos Específicos

- 1) Investigar el efecto de la deslipidización de *Nocardia brasiliensis* con éter de petróleo, en el establecimiento y desarrollo del micetoma en un modelo experimental en ratones BALB/c.
- 2) Evaluar la respuesta inmune contra *Nocardia brasiliensis* deslipidizada y contra los lípidos de *Nocardia brasiliensis* extraídos con éter de petróleo.
- 3) Investigar la capacidad inductora de protección inmunológica de *Nocardia brasiliensis* deslipidizada, contra el desarrollo del micetoma experimental en ratones BALB/c.

CAPÍTULO 3

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo de *Nocardia brasiliensis*: La cepa que utilizamos fue *N. brasiliensis* HUJEG-1 registrada en la ATCC con el número 700358. Esta cepa es mantenida en medio Sabouraud a partir del cual se propagó en infusión cerebro-corazón de la siguiente manera: Una azada correspondiente a una colonia fue suspendida en un matraz Erlenmeyer el cual fue posteriormente incubado a 37 C° por 72 hrs. Posterior al tiempo de incubación la biomasa fue lavada con solución salina estéril (s.s.e) y resuspendida también en s.s.e. Una vez resuspendida, la biomasa fue homogenizada con la ayuda de un *Dounce* hasta obtener una suspensión homogénea. Una vez homogenizada, se dejó precipitar la suspensión 10 min para eliminar agregados multicelulares grandes y se recolectó la bacteria del sobrenadante para realizar los diferentes ensayos.

Deslipidización de *Nocardia brasiliensis* con éter de petróleo: Se deslipidizó la *N. brasiliensis* presente en el sobrenadante del homogenizado bacteriano. Una vez recolectado el sobrenadante del homogenizada, este se centrifugó 2 veces a 100x g 10 min para eliminar agregados multicelulares. En cada centrifugación se recuperó el sobrenadante. Una vez que se obtuvo una suspensión unicelular, está fue extraída con éter de petróleo de la siguiente manera: Se colocaron 600 mg (peso húmedo) de bacteria en tubos cónicos de vidrio. A estos se les agregó 30 ml de éter de petróleo (Fisher scientific, puntos de fusión 35-60 C°) y

se mezcló por vortexeo vigoroso durante 5 minutos. Una vez mezclados, se centrifugó la suspensión por 5 min, se recolectó el éter en un recipiente de vidrio y la bacteria fue extraída según grupo, 3 o 5 veces más. Una vez concluido el número de extracciones, la bacteria fue lavada extensamente con s.s.e para eliminar residuos de éter y finalmente fue resuspendida en s.s.e para posteriores ensayos.

***Nocardia brasiliensis* unicelular y preparación de inóculo para infección de macrófagos:** Inclusive después de centrifugar la suspensión homogenizada dos veces 100x g existe una gran cantidad de agregados multicelulares los cuales interfieren con el conteo de unidades formadoras de colonia (UFC) necesario para ajustar los inóculos infecciosos. Es por eso que se estandarizó un método de centrifugación diferencial para obtener una suspensión unicelular en más del 95%. El método de centrifugación diferencial constó de una centrifugación a 150x g 10 min, seguido por otros 10 min a 200x g y una última centrifugación a 250x g 15 min. En cada centrifugación se recolectó el sobrenadante y al término de la última centrifugación se confirmó la unicelularidad de la suspensión mediante una tinción de Kinjoun. Para ajustar el inóculo infeccioso, los diferentes grupos tanto de *N. brasiliensis* control como *N. brasiliensis* deslipidizada, fueron sometidos a centrifugación diferencial. Posteriormente, la suspensión unicelular fue llevada a 20% con glicerol, distribuida en alícuotas de 1 ml y congelada a -70 C° hasta su uso. Se determinó la concentración de UFC por ml contando una alícuota, realizando diluciones logarítmicas y plaquenado 100 µl de cada dilución en medio sólido agar-sangre.

Determinación de viabilidad bacteriana: La viabilidad bacteriana posterior al tratamiento con éter de petróleo fue determinada por 2 diferentes métodos; determinación de UFC/masa y viabilidad por prueba de ioduro de propidio. Para la determinación de viabilidad por determinación de UFC, 1 mg de suspensión unicelular fue diluido logarítmicamente y 100µl de cada dilución fue plaqueado en agar sangre. Para la prueba de viabilidad con ioduro de propidio se utilizó el kit Bactlight live/dead (molecular probes) de acuerdo con las especificaciones del proveedor.

Microscopía electrónica: Para determinar la localización del lípido en la pared celular de *N. brasiliensis* se realizaron estudios de microscopía electrónica de transmisión con contraste por permanganato de potasio de la siguiente manera: un botón bacteriano fue fijado con permanganato de potasio al 2% por 15 min. Después de realizar lavados extensamente, el botón fue deshidratado gradualmente con isopropanol. Posteriormente fue contrastado con acetato de uranilo e incluido en epon para realizar cortes con ultramicrotomo.

Aislamiento de lípidos de *N. brasiliensis* a partir de extractos de éter de petróleo: A partir del extracto de éter de petróleo recuperado en cada extracción de *N. brasiliensis*, se realizó el aislamiento del lípido de la siguiente manera: Después de filtrar con un filtro Whatman, el extracto fue recuperado y evaporado con un rotavapor. Posteriormente, el lípido fue resuspendido en el menor volumen posible de éter etílico y ultracentrifugado a 14,000 r.p.m. por 15 min. Una vez recolectado el éter en un frasco de vidrio previamente pesado, fue evaporado con nitrógeno. De esta manera se estimó la concentración de lípido total extraído por masa de *N. brasiliensis*. El extracto lipídico fue resuspendido en isopropanol a una concentración de 1.5 mg/ml y alicuoteado en viales de 1 ml para ser guardados a -70 C°.

Cultivos celulares: Las células L-929 fueron obtenidas de la ATCC, se cultivaron en medio DMEM alto en glucosa (DIFCO) suplementado con SBF (Hyclone) al 10%, L-glutamina 2 mM/ml (Sigma-Aldrich) y penicilina, streptomycin y amfotericina como antibióticos y antimicóticos respectivamente (Sigma-Aldrich). Para la producción del medio L-condicionado, las células L-929 fueron cultivadas hasta lograr un 90% de confluencia. Posteriormente fueron despegadas con Tripsina-EDTA .025% (Sigma-Aldrich), lavadas con medio y sembradas en frasco de 75 cm² por 7 días sin ningún cambio de medio. Al término de los 7 días, el medio, notablemente ácido, fue recuperado y filtrado a través de membranas de 0.22 um (millipore), distribuido en alícuotas y congelado a -20 C° hasta su uso.

Diferenciación de macrófagos a partir de células de médula ósea: El medio de diferenciación que se empleo fue el medio DMEM-L condicionado (DMEM-L cond) el cual consiste en DMEM alto en glucosa suplementado con el sobrenadante de la línea celular L-929 al 30%, SBF al 20%, L-glutamina 2mM y antibióticos. Se diferenciaron macrófagos de médula ósea de la siguiente manera; después de disecar los músculos se cortó la pierna a nivel del acetábulo pélvico. Posteriormente se separo el fémur y la tibia, y se cortó a nivel de ambas epífisis para exponer el canal medular. Se perfundió con medio de diferenciación de macrófagos DMEM-L condicionado y se recuperaron las células de médula ósea. Después de lisar los glóbulos rojos con una solución de lisis a base de cloruro de amonio, se ajustaron las células de médula ósea a 5×10^5 /ml. y fueron sembradas en placas de Petri de poliestireno no tratadas para cultivo celular, a una concentración de 5×10^6 células por placa. Después de 2 días de cultivo a 37 C° en atmosfera de 5% de CO₂, se retiró completamente el medio y se agrego igual volumen de medio DMEM-L **cond**

fresco. Al día 6 se agregó una cantidad igual de volumen a las células y para el día 7 los macrófagos ya estaban listos.

Diferenciación de células dendríticas: Las células dendríticas fueron diferenciadas a partir de células de médula ósea, obtenidas en principio de la misma forma que las de macrófagos. Fueron sembradas también en placas de poliestireno no tratadas para cultivo celular a una concentración de 2×10^5 células de médula ósea por cm^2 de superficie en medio de diferenciación de células dendríticas que consiste en RPMI (Sigma-Aldrich) suplementado con SBF 10%, GM-CSF (PeproTech) 40 ng/ml, 2 mM de L-glutamina, antibióticos y antimicóticos. Al segundo día de cultivo se realizó un recambio total del medio para eliminar células no adherentes. A los días 4 y 6 se refrescaron las células con la mitad del medio de diferenciación de células dendríticas y para el día 7, las células dendríticas ya estaban plenamente diferenciadas.

Infección de ratones con *N. brasiliensis*: Los experimentos de infección se realizaron a partir de la suspensión de *N. brasiliensis* homogenizada de la siguiente manera; después de homogenizada, se centrifugó 2 veces $100 \times g$ y el sobrenadante fue recuperado. Una parte fue deslipidizada como se especificó y otra se dejó inalterada como control. Posteriormente se pesó la bacteria y se ajustó según el experimento a 10 mg/100ul y 20 mg/100ul de peso húmedo por grupo en s.s.e. Se infectó en el cojinete plantar con 100ul de suspensión. Posteriormente se determinó el grado de inflamación de las patas por 90 días con un Vernier y se expresó el grado de inflamación en cm^2 . Para determinar la concentración de UFC en 10 y 20 mg se realizó una curva a partir de una suspensión totalmente unicelular obtenida por centrifugación diferencial como se especifica anteriormente.

Infección de macrófagos derivados de médula ósea (BMDM): Los macrófagos fueron diferenciados por 6 días como se especificó anteriormente. Al día 7, los macrófagos fueron despegados con un scraper y contados para ajustarlos a la concentración deseada, en el volumen deseado, según el experimento. Posteriormente se sembraron en placas o cámaras y se dejaron adherir en medio de diferenciación DMEM-L condicionado por 18 hrs adicionales. Posteriormente, se retiró el medio a la mono capa y se lavó 2 veces con medio atemperado. Finalmente, se agregó el mismo volumen original de medio de infección que constó de DMEM suplementado con SBF 10%, L-glutamina 2 mM, sin antibióticos con la concentración deseada de *N. brasiliensis*.

Cinética de infección: Se sembraron BMDM a una concentración de 4×10^5 macrófagos por ml por pozo, en cámaras de permanox de 4 compartimentos (Nuc Lab-Tek slide chambers). Después de 18 horas de incubación se lavó la mono capa 2 veces con medio y se infectaron los macrófagos a una multiplicidad de 3 bacterias por macrófago (MOI 3:1). Para infectar a los macrófagos se descongeló un vial de *N. brasiliensis* previamente contado y se ajustó a 1.2×10^6 UFC por ml en medio de infección. Después de 2 hrs de incubación a 37 C° a una atmosfera de 5% de CO_2 , se retiró el medio y se lavó 2 veces con medio atemperado para eliminar la bacteria extracelular. Posteriormente se agregó nuevamente 1 ml de medio fresco y se incubaron los macrófagos por 12, 24 y 48 hrs. Al término de cada tiempo se lavó la monocapa 2 veces con s.s.e al 6%, se fijó con formalina al 3.7% en PBS pH 7.4 por 1 hora, se lavó la formalina y se tiñó la monocapa por el método de Kinyoun o con la tinción citoquímica de rojo oleoso.

Ensayo de muerte intracelular por el método de azul alamar: Debido a que in vitro, *N. brasiliensis* crece formando agregados multicelulares muy denso y grandes, es imposible

determinar UFC por plaqueo. Es por esto que utilizamos el método fluorocrómico de azul alamar para determinar UFC de *N. brasiliensis* en macrófagos infectado. Para esto se realizó una curva estándar al incubar 2, 1.8, 1.6, 1.4, 1.2, 1.0, 0.8 y 0.6×10^6 UFC en BHI con azul alamar (Invitrogen) al 10% por 24 hrs a 37 C° en rotación constante. Posteriormente, las suspensiones fueron centrifugadas 10 min a 14,000 rpm y 200ul de los sobrenadantes fueron colocados en placas de poliestireno, y se determinó la fluorescencia por pozo a una longitud de excitación de 520 nm y una longitud de emisión de 565 nm. La curva se grafico Fluorescencia/UFC y sirvió para determinar la cantidad de UFC por grupo de infección. Para determinar muerte intracelular, los macrófagos fueron sembrados en placas de 96 pozos a una concentración de 1×10^5 macrófagos por pozo y después de 18 hrs de incubación, fueron infectados a una MOI de 3:1 con cada grupo por triplicado. Después de 2 horas, las mono capa fue lavada y se agregó nuevamente los 200 ml de medio de infección. Los tiempos que se estudiaron fueron 12, 24 y 48 hrs. Al término de cada período de infección, el sobrenadante fue recolectado, y la monocapa fue lisada para liberar *Nocardia* intracelular con agua bidestilada-SDS 10%. Después de 15 min de incubación, se lisaron los macrófagos por pipeteo vigoroso y el lisado fue recuperado junto con el sobrenadante. La suspensión fue centrifugada a 14,000 rpm por 15 min, se descartó el sobrenadante, mientras que la bacteria fue resuspendida en BHI-azul alamar 10% e incubada a 37 C° por 24 hrs para después determinar fluorescencia en el medio y extrapolar dicha fluorescencia en la curva fluorescencia/UFC.

Determinación de citocinas y OXIDO NITRICO (NO) en macrófagos infectados: Para la determinación de mediadores inflamatorios y NO, 1×10^6 macrófagos fueron sembrados por pozo, por triplicado en placas de 6 pozos en un volumen de 2 ml por pozo. Después de

18 horas de incubación, se retiró el medio de cada pozo y se agregó *N.brasiliensis* a una concentración de 3×10^6 UFC en 2 ml de medio de infección. Después de 2 horas de infección, se retiró el medio y se realizaron 2 lavados con medio atemperado para retirar la bacteria no fagocitada, se agregaron nuevamente 2 ml de medio de infección, y se incubó por 12, 24 y 48 hrs los macrófagos. Al término de cada tiempo se recuperó el sobrenadante, se centrifugó a 14,000 rpm por 10 min y se guardó el sobrenadante en crio viales, los cuales fueron congelados a -70 C° hasta su análisis. La determinación de NO se realizó inmediatamente, antes de congelar los viales. La determinación se realizó por el método de Griess (Invitrogen) utilizando una curva estándar la cual fue realizada en cada medición. Del sobrenadante se determinó IL- 1β , TNF- α , CCL2, IL-6, TGF- β e INF- γ , (todos ellos de ebioscience) de acuerdo a los protocolos indicados por el proveedor.

Análisis de expresión de moléculas co-estimuladoras en BMDM y DC: Tanto los macrófagos como las células dendríticas fueron incubados en placas de 6 pozos a una concentración de 1×10^6 células por pozo en 2 ml por triplicado. La infección se realizó a una MOI 3:1 con los diferentes grupos de *N. brasiliensis*. Posterior a las 2 hrs, se lavó la mono capa y se agregaron nuevamente 2 ml de medio de infección fresco. Se dejó incubar por 12, 24 y 48 hrs, y al término de cada tiempo se retiró el medio y las células fueron despegadas, resuspendidas en 1 ml de PBS pH 7.4 .1mM y marcadas con anticuerpos anti MHCII conjugado con FITC, anti CD80 conjugado con FITC, anti CD86 conjugado con PE, anti CD40 conjugado con FITC y anti PDL-2 conjugado con FITC, anti CD11c marcada con FITC, anti CD11b marcada con FITC, anti F4/80 marcada con PE y los respectivos controles de isotipo (todos ellos de ebioscience) a una concentración de 1 ug/millón de células. Después de 15 minutos de incubación en oscuridad, se realizaron 3 lavados con

PBS pH 7.4 para posteriormente realizar el análisis con un citómetro de flujo (BD bioscience). Los resultados se expresaron como intensidad media de fluorescencia así como porcentaje de expresión celular.

Activación de BMDM y DC con INF- γ : En algunos experimentos se analizó tanto la expresión de marcadores de superficie como la inducción de mediadores en respuesta a INF- γ . Para esto, se incubaron los macrófagos o las células dendríticas en presencia de 100 U/ml de INF- γ (ebioscience), equivalentes a 1ng/ml. Después de 18 hrs, se realizó la infección de las células en presencia o ausencia nuevamente de 100 U/ml de INF- γ , y la inducción de mediadores fue estudiada.

Estimulación de BMDM y DC con lípidos extraíble de superficie de *N. brasiliensis*: La estimular a los macrófagos con los lípidos de superficie de *N. brasiliensis*, se descongeló un vial de lípidos almacenado a -70 C° en isopropanol (Sigma-Aldrich) y se calentó 10 min a 60 C° en baño María. Posteriormente se zonicó el lípido y se calentó nuevamente 10 minutos a 60 C° en baño María. Se ajustó la concentración de lípidos a 100, 10 y 1 ug/200ul en isopropanol y se calentó por última vez 10 min a 60 C° en baño María. Posteriormente se agregaron 200 μ l de cada concentración por pozo por triplicado y se dejó evaporar el isopropanol a 37 C° en la incubadora. Se utilizó como control el medio sin el lípido. Una vez evaporado durante toda la noche, se agregaron los macrófagos o las células dendríticas y se dejaron estimulando durante 18 hrs.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS

Objetivo 1.- Investigar el efecto de la deslipidización de *Nocardia brasiliensis* con éter de petróleo, en el establecimiento y desarrollo del micetoma en un modelo experimental en ratones BALB/c.

4.1.1- *N. brasiliensis* deslipidizada con éter de petróleo pierde la capacidad de inducir micetoma.

N. brasiliensis posee en su superficie una gran cantidad de constituyentes antigénicos lipídicos. Nosotros hipotetizamos que estos determinantes químicos, al ser reconocidos por los PRR's de superficie de los elementos celulares del sistema inmune, inducen un proceso inflamatorio que determina la progresión del actinomicetoma. Para probar esta idea necesitábamos un modelo de *N. brasiliensis* deslipidizada viable. Debido que no existe un modelo de *N. brasiliensis* genéticamente deslipidizada, removimos los lípidos con éter de petróleo ya que está reportado que el tratamiento de *M. tuberculosis* con éter de petróleo genera una bacilo deslipidizada carente de lípidos de superficie, especialmente DMT, pero con una viabilidad inalterada [41, 56]. Estandarizamos la técnica de deslipidización con éter de petróleo en *N. brasiliensis* y comprobamos que, en efecto, el

tratamiento de *N. brasiliensis* con éter de petróleo no modifica la viabilidad celular (figura 1).

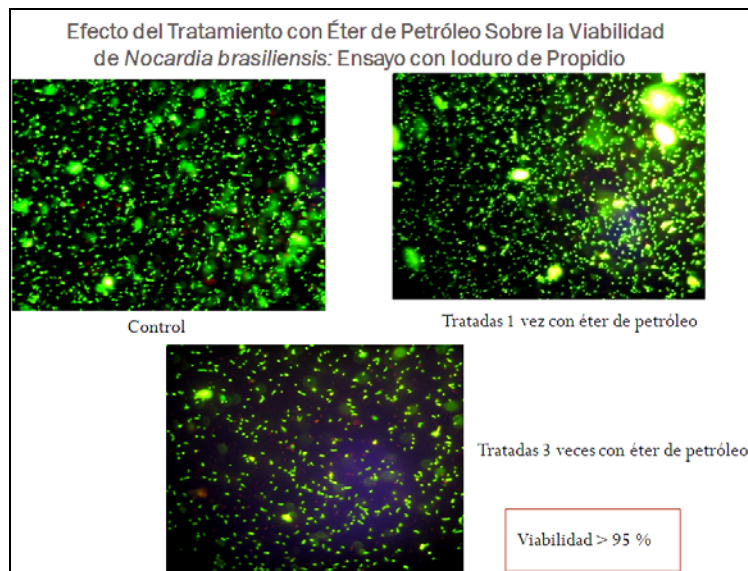


Figura 1: Efecto del tratamiento con éter de petróleo sobre la viabilidad de *N. brasiliensis*. Después de deslipidizar una y 3 veces a *N. brasiliensis*, se determinó la viabilidad celular mediante un ensayo con Ioduro de propidio. Los resultados se compararon contra el control sin deslipidizar.

Una vez demostrado que *N. brasiliensis* deslipidizada con éter de petróleo es viable, similar al control, estudiamos el efecto de la deslipidización de *N. brasiliensis* en el establecimiento del actinomicetoma experimental. Se formaron 3 grupos de estudio: un control sin deslipidizar, un grupo de *N. brasiliensis* deslipidizada una vez y un grupo de *N. brasiliensis* deslipidizada 3 veces. Se infectaron 10 ratones BALB/c por grupo en el cojinete plantar derecho con 1.28×10^8 UFC en 10mg de suspensión y se midió el grado de inflamación del cojinete plantar por 90 días. Como se observa en la figura 2, *N. brasiliensis* deslipidizada con éter de petróleo induce un menor proceso inflamatorio en comparación

con el grupo control sin deslipidizar. Esta diferencia se observa inclusive posterior a una sola extracción.

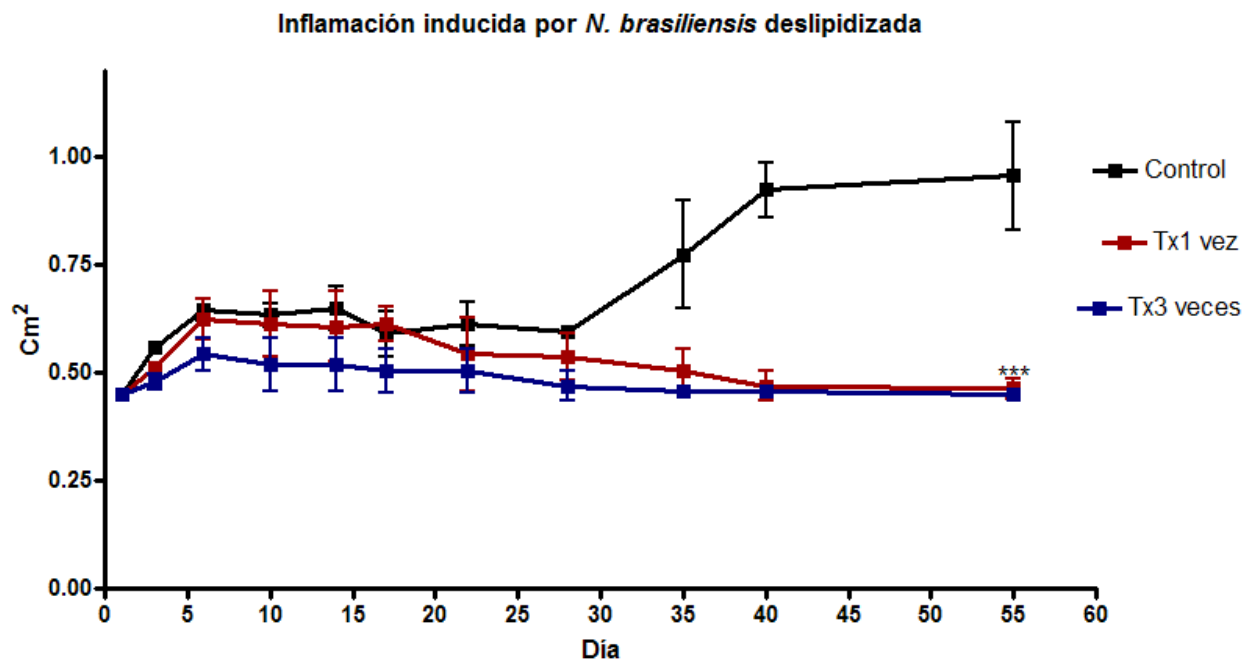


Figura 2: Efecto de la deslipidización de *N. brasiliensis* con éter petróleo sobre la intensidad del proceso inflamatorio. *N. brasiliensis* fue deslipidizada una vez, tres veces o fue dejada inalterada. Posteriormente se inocularon 10 ratones BALB/c por grupo con 1.28×10^8 UFC en 10mg de bacteria en el cojinete plantar y se midió la intensidad de la inflamación por 55 días con un Vernier. Datos expresados como cm^2 de inflamación *** $P < 0.001$, análisis por ANOVA con prueba de Tukey expresado en media +_SD.

Clínicamente, los ratones infectados con *N. brasiliensis* deslipidizada presentan menor inflamación, deformidad y edema en comparación al control (Figura 3). Esta diferencia se acentúa hacia el día 45; mientras que el grupo control presenta un micetoma franco, caracterizado por un proceso inflamatoria extenso, que deforma la extremidad, con abscesos y fistulas, los ratones infectados con *N. brasiliensis* deslipidizada presentan solo un ligero edema en el sitio en donde fueron inoculados.

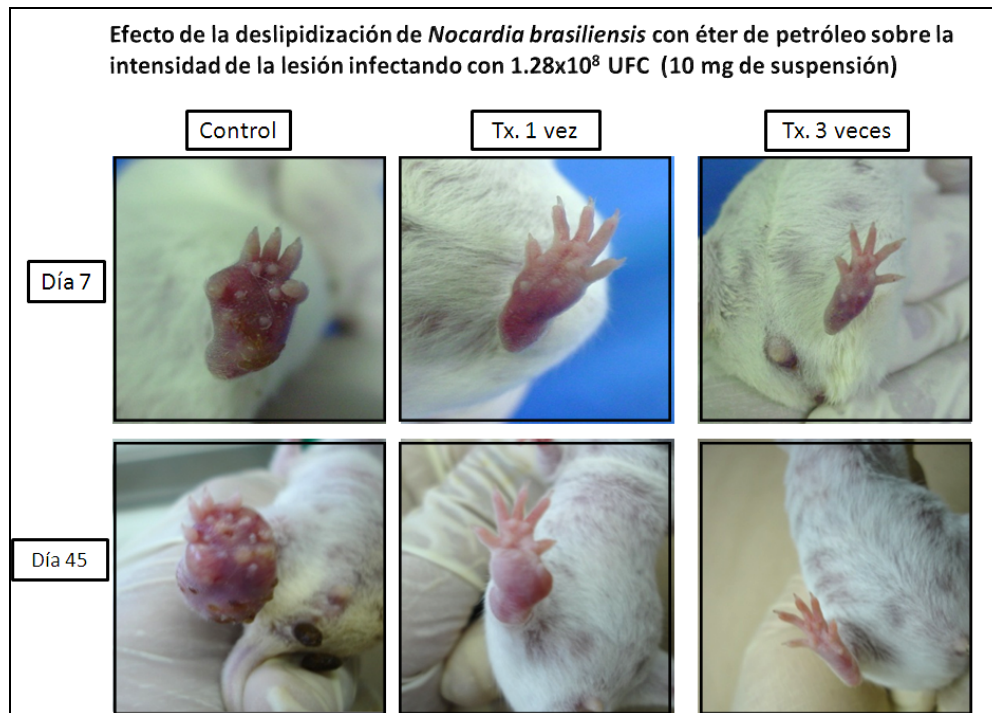


Figura 3: Efecto del tratamiento de *N. brasiliensis* con éter de petróleo sobre la inducción de inflamación en ratones BALB/c. En esta imagen se muestra clínicamente, el proceso inflamatorio desarrollado en los diferentes grupos de estudio. Desde el día 7 resulta evidente que, deslipidizando 3 veces a *N. brasiliensis* se logra disminuir importantemente el proceso inflamatorio. Hacia el día 45, la diferencia es aún más evidente. Mientras que *N. brasiliensis* sin deslipidizar induce un micetoma florido, con deformidad, fistulas y abscesos, los ratones infectados con *N. brasiliensis* deslipidizada una vez solo desarrollan un proceso inflamatorio localizado y circunscrito que por definición no es un micetoma. Por otra parte, en el grupo de ratones infectados con *N. brasiliensis* extraída 3 veces, solo se observa un ligero edema. Se muestra un ratón representativo por grupo de un total de 10.

La disminución del proceso inflamatorio se refleja con una disminución en la incidencia del actinomicetoma cuando se extraen los lípidos de superficie de *N. brasiliensis* con éter de petróleo (Figura 4).

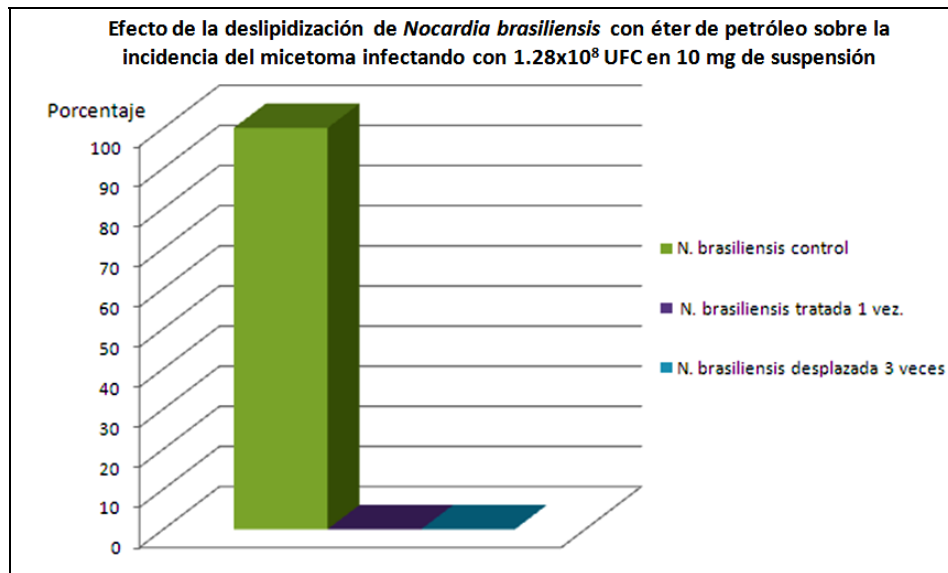


Figura 4: Efecto de la deslipidización de *N. brasiliensis* sobre la incidencia del actinomicetoma experimental en ratones BALB/c (n=10)

Estos resultados demuestran que los lípidos de superficie de *N. brasiliensis* tiene la capacidad de inducir el proceso inflamatorio que caracteriza a el actinomicetoma. Una vez demostrado esto, investigamos el mecanismo por el cual los lípidos de superficie de *N. brasiliensis* están involucrados en el desarrollo del actinomicetoma. Estudiamos los cambios morfológicos que caracterizan la deslipidización de *N. brasiliensis* con éter de petróleo, buscando indicios que nos sugieran de que manera están implicados los lípidos en la bacteria, y de qué manera esto podría afectar en la progresión de la enfermedad. Para esto comenzamos a explorar si *N. brasiliensis* se relipidiza posterior al tratamiento con éter de petróleo

4.1.2 -La deslipidización de *N. brasiliensis* con éter de petróleo es transitoria, las nuevas generaciones de bacterias forman una nueva pared celular.

Debido a que la modificación de la pared celular de *N. brasiliensis* posterior al tratamiento con éter de petróleo es química y no genética, resulta lógico pensar que las nuevas generaciones de bacterias poseen una pared celular químicamente regenerada. Para documentar esta idea realizamos experimentos de relipidización, en donde observamos que efectivamente, las nuevas generaciones de *N. brasiliensis* recuperan los lípidos de superficie. Esto se evidencia al analizar la morfología de las colonias a diferentes tiempos posterior a la extracción con éter de petróleo. A las 24 horas las diferencias entre *N. brasiliensis* deslipidizada y el control sin deslipidizar fueron más evidentes, con un amplio dominio de las colonias deslipidizadas con respecto a las no modificadas (NM). Esto se deduce a partir del aspecto morfológico ya que mientras las colonias de *N. brasiliensis* no modificadas (NM) son de color marrón, rugosas, grandes y con un centro umbilicado, las colonias de *N. brasiliensis* NM eran pequeñas, más lisas, blancas y sin umbilicación (Figura 5). Después de 48 horas, se observó una igual cantidad de colonias de apariencia deslipidizada y normales. Ya hacia las 72 horas, se apreció una mayor cantidad de colonias de aspecto normal en comparación con aquellas deslipidizada. Inclusive, era evidente que algunas colonias poseían cierta cantidad de bacterias deslipidizadas, a saber por un centro blanco liso sin umbilicación y una periferia rugosa marrón característica de las colonias de *N. brasiliensis* NM. A las 96 horas, más del 85% de las colonias de *N. brasiliensis* eran de aspecto normal. Estos resultados indican que, como era de esperarse, la deslipidización de *N. brasiliensis* posterior al tratamiento con éter de petróleo solo es transitoria, ya que las nuevas generaciones recuperan su capa lipídica, en presencia de una fuente de carbono.

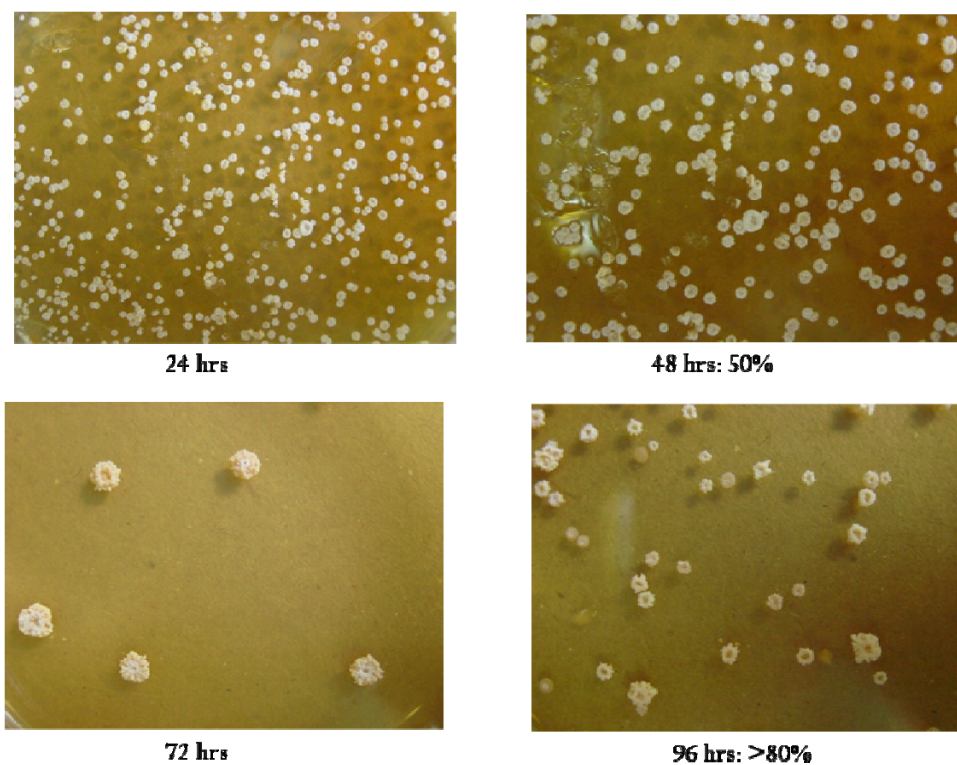


Figura 5: Relipidización de *N. brasiliensis* posterior al tratamiento con éter de petróleo. Después de deslipidizadas, 1×10^7 UFC de *N. Brasiliensis* fueron sembradas en BHI y al cabo de 24, 48, 72 y 96 horas, se tomó una alícuota de bacteria y se estrió en agar-BHI para observar la morfología de las colonias.

4.1.3 -La deslipidización de *N. brasiliensis* con éter de petróleo modifica las características tintoriales y morfológicas del microorganismo.

A continuación estudiamos algunos parámetros fenotípicos de *N. brasiliensis* posterior al tratamiento con éter de petróleo, en específico, las características tintoriales y morfológicas de la bacteria en comparación al control sin tratamiento. Cuando observamos una suspensión de *N. brasiliensis* deslipidizada y la comparamos con el control sin deslipidizar resalta una diferencia; *N. brasiliensis* deslipidiza tiende a formar menos agregados celulares en comparación con el control sin deslipidizar (Figura 6).

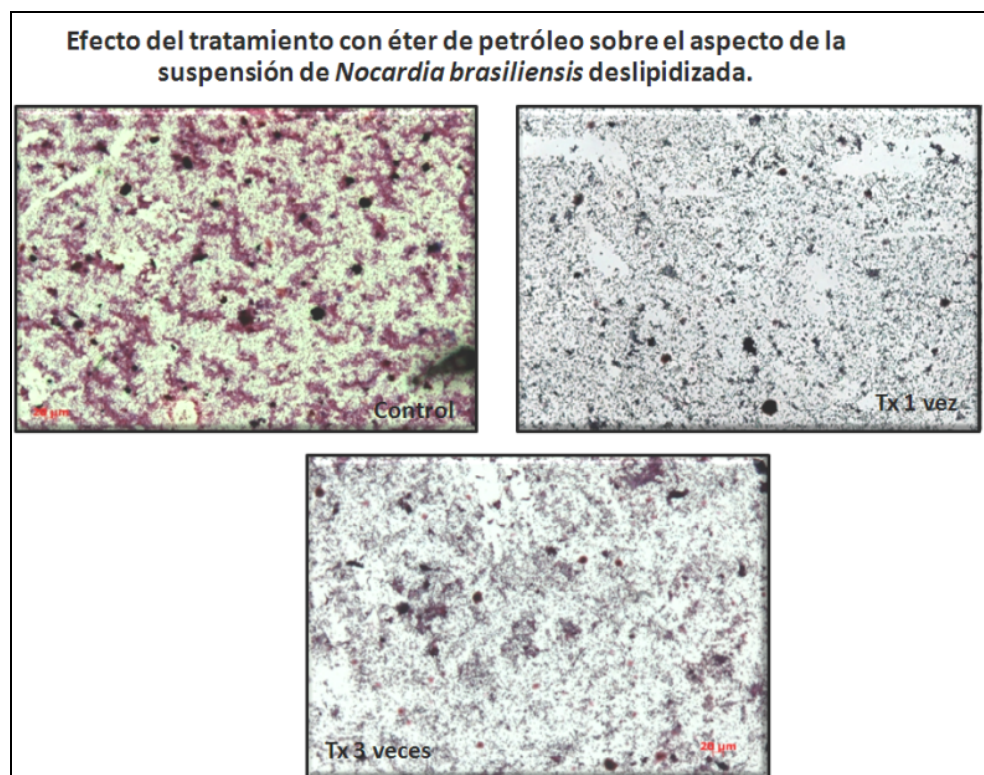


Figura 6: Efecto del tratamiento de *N. brasiliensis* con éter de petróleo sobre la morfología de la suspensión. Se puede observar que posterior a una extracción con éter de petróleo, la suspensión adquiere un aspecto más homogéneo y unicelular, con menos agregados que el control. Al deslipidizar la bacteria 3 veces, se forman más agregados que en el grupo tratado 1 vez, sin embargo, en comparación con el control, la suspensión es menos densa y más unicelular. También resulta evidente la pérdida de la ácido-alcohol resistencia posterior al tratamiento con éter de petróleo.

Como se puede observar también en la figura 6, la deslipidización de *N. brasiliensis* con éter de petróleo también ocasiona otra notable diferencia, que es la pérdida de la ácido-resistencia de la bacteria (Figura 6 y 7). Este efecto fue evidente desde la primera extracción, y no hubo mayores diferencias al deslipidizar a la bacteria 3 veces.

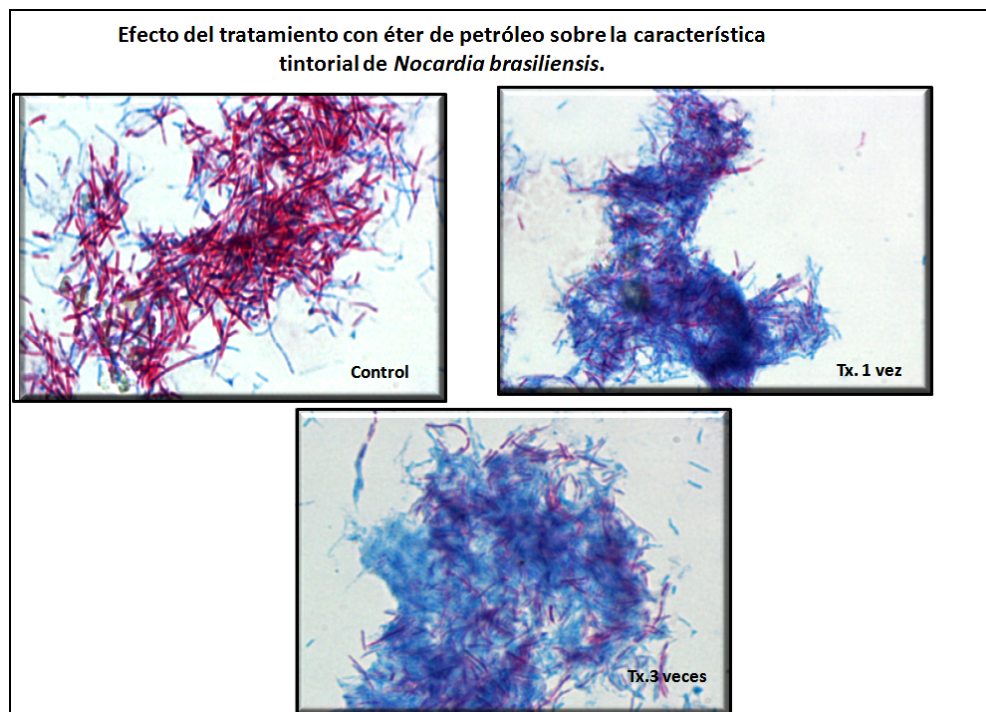


Figura 7: Tinción de Kinyoun en *N. brasiliensis* sin deslipidizar, deslipidizada una y deslipidizada 3 veces con éter de petróleo. Se puede observar que *N. brasiliensis* deslipidizada con éter de petróleo pierde la ácido-alcohol resistencia desde la primera extracción.

4.1.4 -El componente lipídico de superficie de *N. brasiliensis* extraído con éter de petróleo se localiza en la capa electro densa externa.

El hecho de que el tratamiento con éter de petróleo sobre *N. brasiliensis* modifica la ácido-alcohol resistencia así como la capacidad de agregación celular, sugiere que la localización más probable del lípido extraído es la capa electro densa externa. Para probar esta hipótesis fue necesario en primer lugar, definir la ultraestructura de la pared celular de *N. brasiliensis*. Como se observa en la figura 8a, la pared celular de *N. brasiliensis* posee la misma organización ultraestructural en capas descrita para los microorganismos del

suborden *Corynebacterineae*. En esta fotomicrografía por microscopía electrónica de transmisión se puede apreciar una capa electro densa interna, seguida por una capa electro lúcida intermedia y finalmente una capa electro densa externa más gruesa. Esta organización en capas bien definida se altera completamente posterior al tratamiento con éter de petróleo (Figura 8b). En esta circunstancia, la capa más alterada es la externa que corresponde a la capa electro densa externa. Se puede observar áreas de extracción en la pared, lo que sugiere que, el componente químico presente en la capa electro densa externa es el que se está removiendo de *N. brasiliensis* con el éter de petróleo.

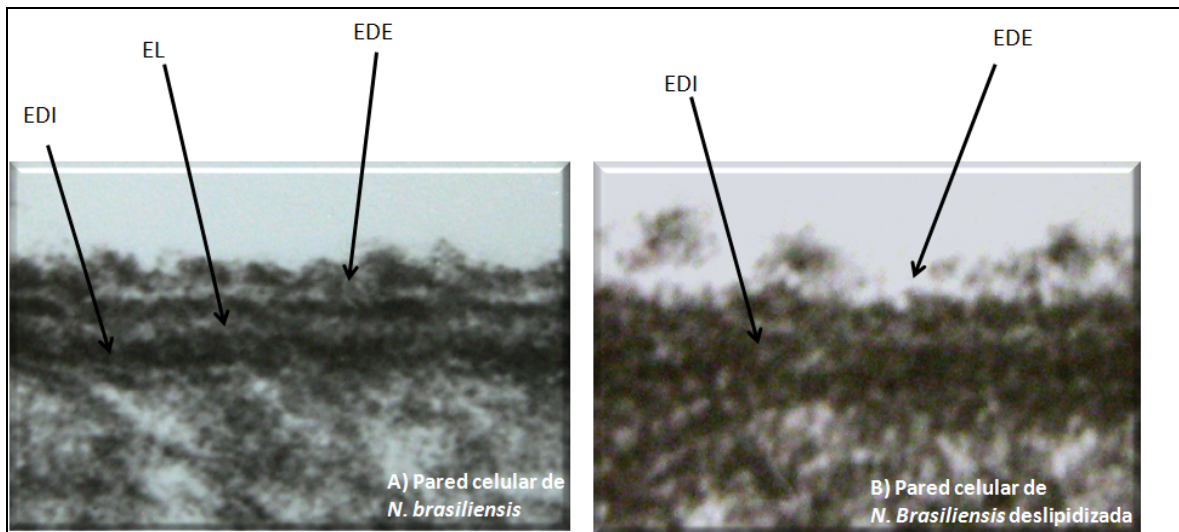


Figura 8: **A)** Fotomicrografía electrónica de transmisión de la pared celular de *N. brasiliensis* sin deslipidizar. Se observa la disposición ultraestructural en capas, con una capa electro densa interna, una capa electro lúcida intermedia y una capa electro densa externa, tal y como se describe para los microorganismos del suborden *Corynebacterineae*. **B)** Fotomicrografía electrónica de transmisión de la pared celular de *N. brasiliensis* deslipidizada con éter de petróleo. Se puede observar que la disposición organizada en capas de la pared celular se pierde posterior al tratamiento con éter de petróleo. La capa electro densa externa es la más alterada, sufriendo áreas de extracción total en algunos puntos. EDI: electro densa interna, EL: electro lúcida, EDE: electro densa externa.

4.1.5 –Caracterización parcial del compuesto lipídico extraído de la pared celular de *Nocardia brasiliensis* con éter de petróleo.

Si bien en *M. tuberculosis* se sabe que el tratamiento con éter de petróleo extrae principalmente DMT, la evidencia que obtuvimos en los experimentos previos como la pérdida de la ácido alcohol resistencia y la disgregación celular apuntan a otro compuesto distinto como el que se extrae de *N. brasiliensis* con éter de petróleo.

En primera instancia hipotetizamos que el compuesto extraído de la pared celular podría ser un keto o metoximicolato. Para averiguarlo, realizamos en primera instancia la tinción citoquímica con rojo neutro, ya que esta descrito que esta sustancia tiende a unirse covalentemente a los ácido micólicos oxigenados, tiñendo de rojo a las bacterias. Como se observa en la figura 9, *N. brasiliensis* deslipidizada adquirió el colorante inclusive al someter a la bacteria hasta a 10 extracciones.

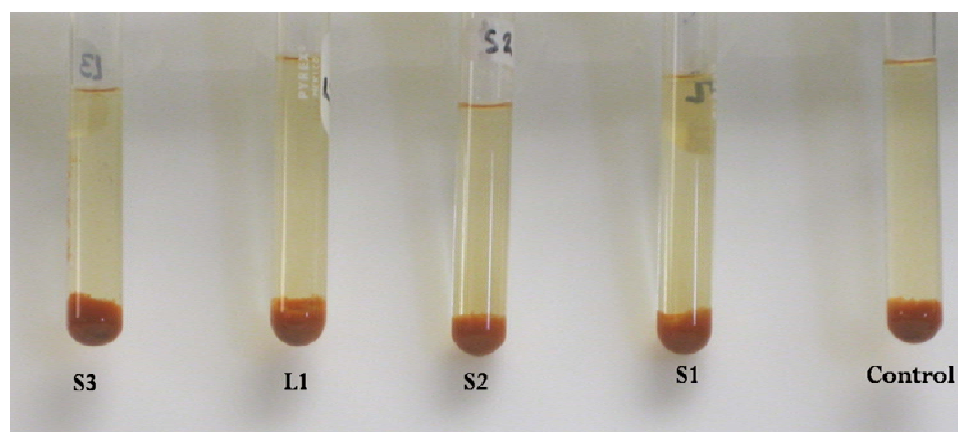


Figura 9: Tinción citoquímica de *N. brasiliensis* deslipidizada con rojo neutro. La bacteria fue sometida a distintos tiempos de extracción y su capacidad para retener el rojo neutro fue analizada. S3, 15 extracciones de 5 minutos, L1, 10 extracciones de 5 minutos, S2, cinco extracciones de 10 minutos, S1, tres extracciones de 10 minutos, control, bacteria sin deslipidizar.

Este resultado sugiere que otra clase de ácidos micólicos distintos a los oxigenados son los que se están removiendo con éter de petróleo. Para obtener datos más concretos aislamos el material lipídico del solvente, y este, fue posteriormente analizado en una cromatografía de capa fina. Probamos dos distintas condiciones de elución, una utilizando etanol-cloroformo (9:1) para compuestos ligeramente polares y otra utilizando éter de petróleo para compuestos apolares. La cromatografía para compuesto apolares fue revelada con ácido molibdofosfórico (para revelar lípidos) y con orcinol (para azúcares). Como se observa en la figura 10a, solo se observan algunos pocos compuestos en el cromatograma corrido con metanol-cloroformo. El compuesto que se presenta en abundancia, muestra una tinción mixta para lípidos y azúcares por lo que podría tratarse de DMT. Por otro lado, cuando el extracto se corrió utilizando éter de petróleo para eluir, llama la atención la presencia de un compuesto único altamente apolar (Figura 10b).

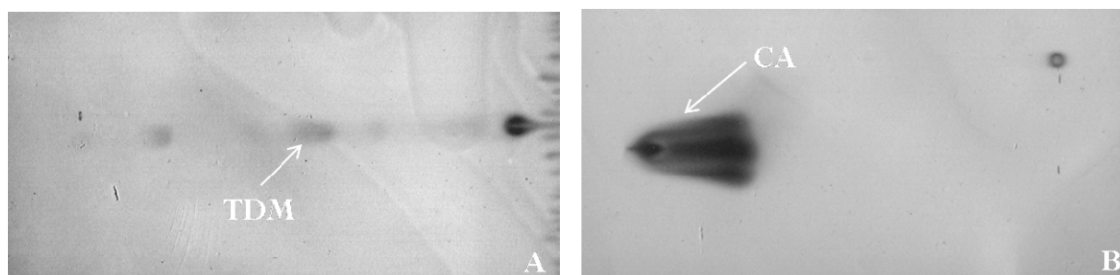


Figura 10: Cromatografía plana en sílica del 60 del material extraído con éter de petróleo de *N. brasiliensis*. A) Se corrió la cromatografía utilizando metanol-cloroformo como eluyentes, la flecha indica TDM puesto que el compuesto se tiñó tanto para lípidos como para azúcares. B) Cromatografía utilizando éter de petróleo como eluyente. CA denota un compuesto mayoritario altamente apolar.

Nos llamó la atención el compuesto mayoritario apolar identificado en la cromatografía plana. Para analizarlo, el compuesto fue purificado de la sílica gel 60 por

cromatografía líquida utilizando éter de petróleo como eluyente. Posteriormente, el compuesto se analizó por ESI-TOF-MS (electrospray ionisation-time of flight-mass spectrometry). Los resultados mostraron que el compuesto apolar presentó una $[M+H]^+$ iónica a m/z 663.45 (Figura 11).

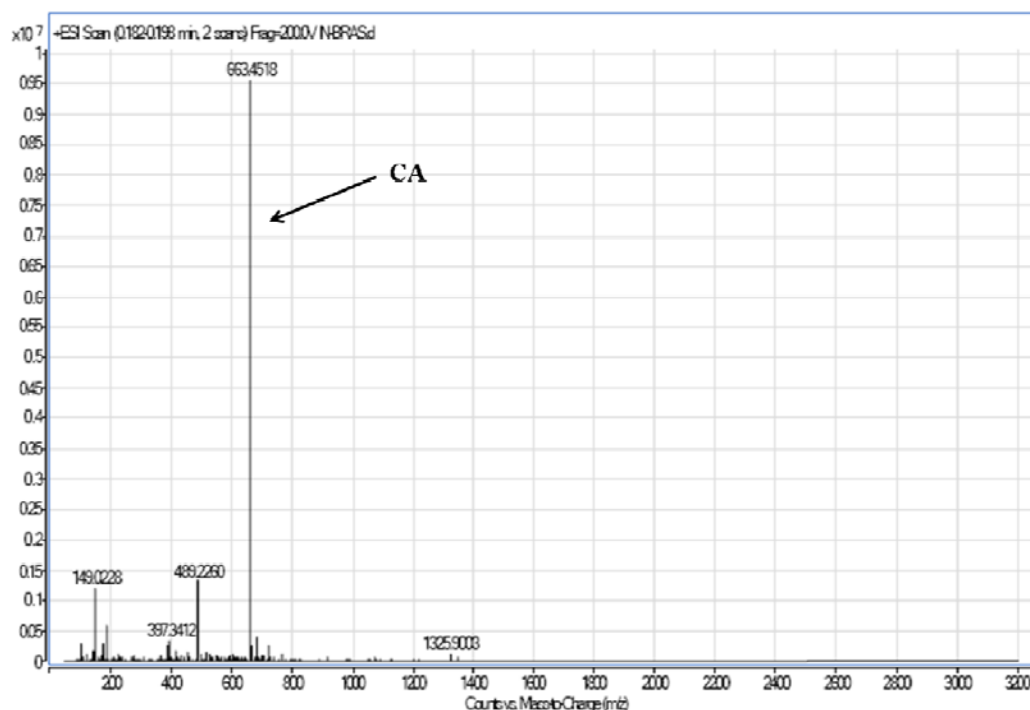


Figura 11: Espectro de masas del compuesto apolar (CA) aislado de la silica gel por cromatografía líquida. Se observa un pico correspondiente al compuesto apolar mayoritario con una $[M+H]^+$ iónica de m/z 663.3.

Los resultados que arrojan los experimentos realizados hasta ahora, confirman la implicación de los lípidos de superficie de *N. brasiliensis* en el desarrollo del actinomicetoma experimental. Por otra parte, los estudios microbiológicos sugieren que los lípidos extraídos de *N. brasiliensis* con éter de petróleo se localizan en la capa electro densa externa en donde media la agregación bacteriana, además que confieren la ácido-alcohol

resistencia a la bacteria. Adicionalmente, identificamos un compuesto apolar mayoritario como el presunto compuesto implicado en la virulencia.

Sin embargo, hasta ahora nuestros experimentos no arrojan indicios sobre el mecanismo por el cual los lípidos de superficie de *N. brasiliensis* extraídos con éter de petróleo participan en el desarrollo del actinomicetoma. Es por esto que extendimos nuestro estudio con experimentos de infección de macrófagos *in vitro*, debido al crucial papel que tienen estas células en la respuesta inmune contra este tipo de microorganismos.

Objetivo 2: Evaluar la respuesta inmune contra *Nocardia brasiliensis* deslipidizada y contra los lípidos de *Nocardia brasiliensis* extraídos con éter de petróleo.

4.2.1 - Los lípidos de superficie de *N. brasiliensis* modulan la producción de mediadores pro-inflamatorios en macrófagos derivados de médula ósea.

El primer dato significativo obtenido a partir de los experimentos infección, fue una reducción en la inflamación inducida por *N. brasiliensis* deslipidizada en comparación con el control sin deslipidizar. Pensamos, que la disminución del proceso inflamatorio se debía a una reducción en la inducción de mediadores inflamatorios por *N. brasiliensis* deslipidizada en comparación con el control sin deslipidizar. Para comprobar esta hipótesis, realizamos experimentos de infección de macrófagos derivados de médula ósea (BMDM) con *N. brasiliensis* deslipidizada y *N. brasiliensis* NM, y determinamos la producción de

las citocinas IL-1 β , IL-6, TNF- α , TGF- β e INF- γ en los sobrenadantes de los cultivos celulares por ELISA.

Como se puede observar en la figura 12, no se observó producción de IL-1 β en ningún grupo de estudio durante las primeras 24 horas. La producción de IL- β ocurrió a las 48 horas tanto en macrófagos infectados con *N. brasiliensis* deslipidizada como con *N. brasiliensis* sin deslipidizar, sin embargo la producción fue significativamente mayor en el grupo infectado con *N. brasiliensis* sin deslipidizar en comparación con *N. brasiliensis* deslipidizada ($p < 0.001$).

Al analizar la producción de IL-6, observamos que *N. brasiliensis* NM induce altos niveles de IL-6 en macrófagos derivados de médula ósea. La producción de IL-6 se observó desde las 12 horas, con un incremento progresivo alcanzando su máxima concentración a las 48 horas. Por el contrario, *N. brasiliensis* deslipidizada mostró ser un pobre inductor de IL-6. La concentración de esta citocina fue muy baja durante las primeras 24 horas post-infección, con un ligero incremento hacia las 48 horas. En todos los tiempos de estudios, la concentración de IL-6 inducida por *N. brasiliensis* deslipidizada en macrófagos derivados de médula ósea, fue por mucho menor en comparación con *N. brasiliensis* NM type ($p < .001$ en todos los tiempos).

También determinamos la producción de la quimiocina CCL-2 por macrófagos derivados de médula ósea en respuesta a *N. brasiliensis* deslipidizada y *N. brasiliensis* NM. Observamos que en todos los grupos de estudio se alcanzó una máxima concentración de CCL-2 durante las primeras 12 horas post- infección. Posteriormente, la concentración de CCL-2 fue disminuyendo en todos los grupos, hasta alcanzar su menor concentración a las

48 horas. Al comparar la producción de CCL-2 en macrófagos infectados con *N. brasiliensis* NM contra macrófagos infectados con *N. brasiliensis* deslipidizada, observamos que en todo momento, la producción de CCL-2 fue menor en los macrófagos infectados con *N. brasiliensis* deslipidizada ($p < .001$ en todos los tiempos).

Adicionalmente determinamos la producción de TNF- α en macrófagos infectados con *N. brasiliensis* deslipidizada y en macrófagos infectados con *N. brasiliensis* NM. Observamos que durante las primeras 12 horas post-infección no existe diferencia alguna en los niveles de TNF- α inducidos por los diferentes grupos de estudio. Posteriormente, a la 24 horas, observamos que *N. brasiliensis* deslipidizada induce una producción de TNF- α significativamente mayor que *N. brasiliensis* sin deslipidizar ($p < 0.01$). Esta diferencia desaparece a las 48 horas cuando la producción de TNF- α se equilibra en los dos grupos de estudio.

La producción de TGF- β también fue determinada, observamos en el control de macrófagos sin infectar, una producción basal de TGF- β que se mantiene constante durante todo el tiempo de estudio. De la misma manera, los macrófagos infectados con *N. brasiliensis* deslipidizada producen TGF- β a concentraciones similares a las del control sin infectar, sin variaciones significativas durante los diferentes tiempos de estudio. Por el contrario, *N. brasiliensis* NM induce un incremento sostenido de TGF- β el cual fue estadísticamente significativo con respecto al control y al grupo infectado con *N. brasiliensis* deslipidizada a las 12 horas y a las 48 hora ($P < 0.05$ y 0.01 respectivamente).

Por último determinamos la producción de INF- γ inducida por *N. brasiliensis* NM y deslipidizada en macrófagos derivados de médula ósea. De manera interesante, observamos

que solamente *N. brasiliensis* deslipidizada fue capaz de inducir la producción de INF- γ a las 48 horas.

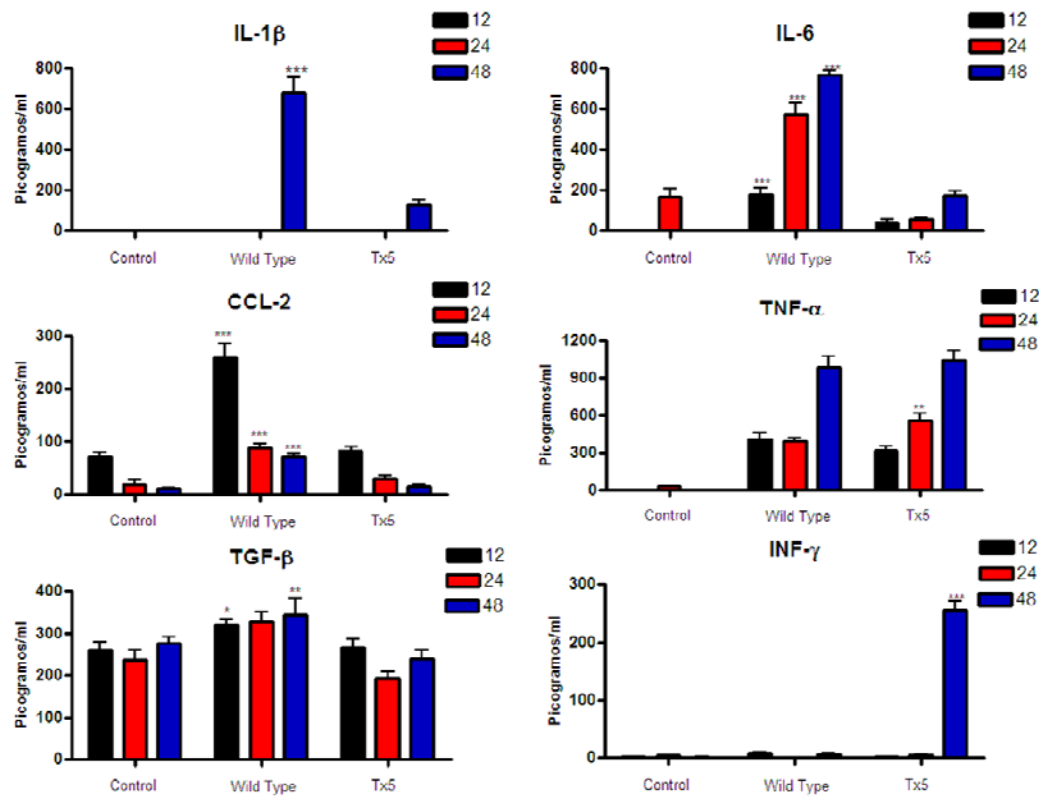


Figura 12: Producción de citocinas en macrófagos derivados de médula ósea infectados con *N. brasiliensis* deslipidizada y *N. brasiliensis* NM. 1×10^6 macrófagos fueron infectados a una MOI de 3:1 con los diferentes grupos de estudio. En los respectivos tiempos se recuperó el sobrenadante, y las citocinas indicadas fueron determinadas por ELISA. * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001. Análisis con ANOVA y prueba de análisis múltiple de Bonferroni, datos expresados en media +_SD.

Estos resultado son consistentes con nuestra hipótesis que los lípidos de superficie de *N. brasiliensis* inducen la producción de los mediadores inflamatorios implicados en el desarrollo del actinomicetoma. Sin embargo, nuestros experimentos fueron realizados en

macrófagos, y no significa que ejerzan esta misma función en otros tipos celulares. Es por esto que no cuestionamos si los lípidos de superficie de *N. brasiliensis* son capaces de inducir la producción de mediadores inflamatorios en otros tipos celulares además de macrófagos. Decidimos contestar nuestra pregunta estudiando el efecto inductor de mediadores inflamatorios en células dendríticas (DC) debido a la importante labor que tienen estas células, no solo para generar un proceso inflamatorio, si no para dar inicio a una serie de procesos que están implicados en la activación de la respuesta inmune adquirida. Realizamos experimentos de infección de DC con *N. brasiliensis* NM y *N. brasiliensis* deslipidizada, y analizamos la producción de IL-1 β , TNF- α , TGF- β , CCL-2 e IL-6.

No observamos producción de CCL-2 por las DC en respuesta a *N. brasiliensis*, por su parte, las DC produjeron IL-1 β en respuesta a *N. brasiliensis*. Esta producción ocurrió, de manera análoga a lo observado en macrófagos, hasta las 48 horas post infección, con una mayor producción de este mediador en las DC infectadas con *N. brasiliensis* NM, en comparación con *N. brasiliensis* deslipidizada ($P < 0.001$ a las 48 horas, Figura 13).

De la misma manera observamos una producción de IL-6 por las DC en ambos grupos de estudio. En las DC infectadas con *N. brasiliensis* NM se observó un patrón de producción caracterizado por un pico a las 12 horas, seguido de una reducción en la producción a las 24 horas, y otro pico de producción máximo a las 48 horas. Por su parte, el patrón de producción de IL-6 en macrófagos infectados con *N. brasiliensis* deslipidizada fue diferente en comparación con el control sin deslipidizar, con una producción inicial de IL-6, seguida por un pico máximo de producción a las 24 horas, y una disminución posteriormente a las 48 horas, a concentraciones semejantes a las encontradas a las 12 horas post- infección. Resulta interesante que no hubo diferencia significativa entre la

concentración de IL-6 a las 12 horas entre los 2 grupos de estudio, sin embargo, observamos un incremento en la producción de IL-6 en DC infectadas con *N. brasiliensis* deslipidizada a las 24 horas, en comparación con el control sin deslipidizar. Posteriormente, a las 48 horas, observamos una mayor producción de IL-6 en DC infectadas con *N. brasiliensis* NM, en comparación con *N. brasiliensis* deslipidizada ($p < 0.001$).

N. brasiliensis NM también indujo la expresión de TGF- β en DC. Esta producción se observó desde las primeras 12 horas post-infección, y continuó posteriormente con un leve descenso a las 24 horas para volver a incrementarse a la máxima concentración observada a las 48 horas. Por su parte, *N. brasiliensis* deslipidizada no indujo producción de TGF- β en las primeras 24 horas. A las 48 horas, se observó producción de TGF- β , aunque a niveles muy inferiores a los inducidos por *N. brasiliensis* NM ($P < 0.001$).

La producción de TNF- α también fue analizada, *N. brasiliensis* NM indujo un pico de producción de TNF- α a las 12, seguido por una disminución en la producción. Posteriormente a las 48 horas se volvió a incrementar la producción a la máxima concentración. Este mismo patrón de producción se observó en el control sin infectar y en DC infectadas con *N. brasiliensis* deslipidizada, sin embargo, la concentración en este grupo fue por mucho, menor en comparación con *N. brasiliensis* NM.

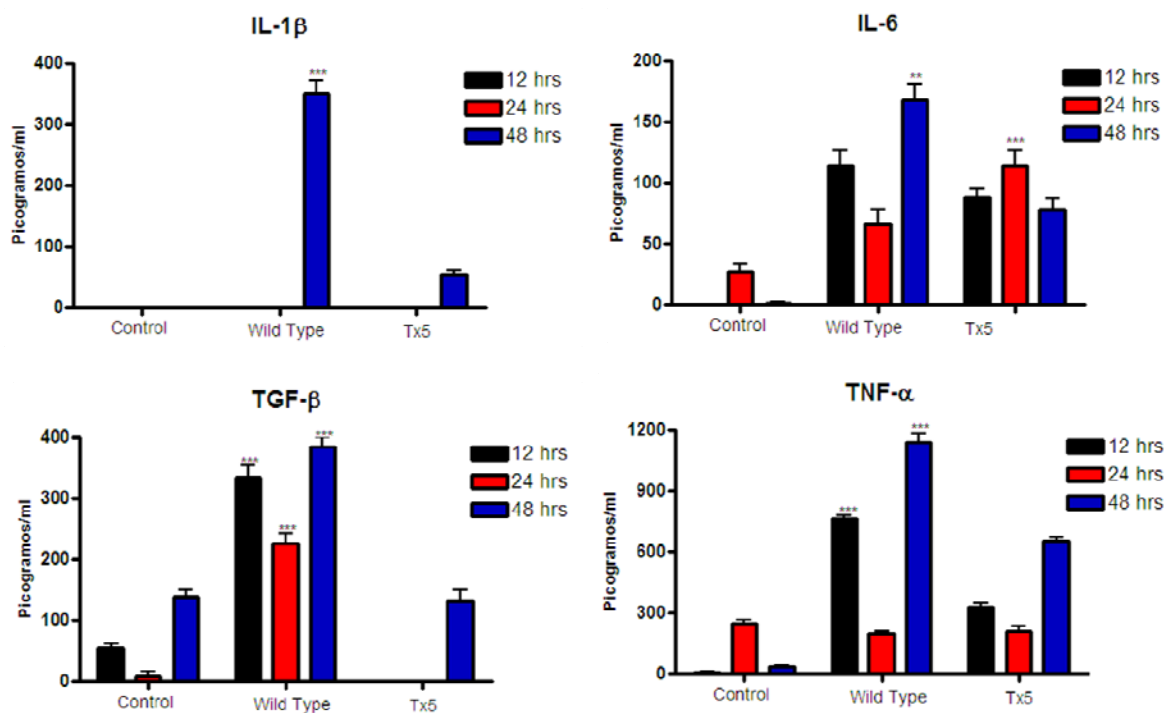


Figura 13: Inducción de mediadores inflamatorios en DC, por *N. brasiliensis* y *N. brasiliensis* deslipidizada. 1×10^6 DC fueron infectadas a una MOI de 3:1 con los diferentes grupos de estudio. En los respectivos tiempos se recuperó el sobrenadante, y las citocinas indicadas fueron determinadas por ELISA. *** P < 0.001. Análisis con ANOVA y prueba de análisis múltiple de Bonferroni, datos expresados en media + $_{SD}$.

4.2.2 -Los lípidos de superficie de *N. brasiliensis* modulan la inducción de los mediadores inflamatorios en células dendríticas.

Los experimentos de infección de macrófagos y DC fueron consistentes en el hecho que *N. brasiliensis* NM induce una mayor producción de mediadores inflamatorios que *N. brasiliensis* deslipidizada. Este resultado fortaleció nuestra hipótesis que los lípidos de superficie de *N. brasiliensis* son los principales mediadores inflamatorios en el actinomicetoma. De ser esto cierto, pensamos que los lípidos de superficie de *N. brasiliensis* de manera independiente, bastarán para inducir la síntesis de mediadores pro-inflamatorios, a concentraciones semejantes a las inducidas por la bacteria completa.

Probamos esta hipótesis con experimentos de estimulación de macrófagos con diversas concentraciones de lípidos y determinamos la concentración de citocinas en los sobrenadantes por ELISA.

Observamos que los lípidos de superficie de *N. brasiliensis* inducen la expresión de IL-1 β e IL-6 en macrófagos derivados de médulas ósea, con una máxima inducción a 10 μ g y 1 μ g de lípidos respectivamente (Figura 14). Interesantemente, observamos que al incrementar la concentración de lípidos a 100 μ g se inhibe la producción de ambas citocinas.

Los lípidos de superficie también mostraron ser buenos inductores de la quimiocina CCL-2. De manera análoga a lo observado en los experimentos de infección, se observó una máxima producción de CCL-2 a las 12 horas, disminuyendo gradualmente hasta las 48 horas. La inducción de CCL-2 fue directamente proporcional a la concentración de lípidos utilizados, así que, la máxima concentración se observó al estimular con 100 μ g de lípidos de superficie.

Los lípidos de superficie también indujeron la producción de TNF- α . En todos los grupos de estudio se observó un incremento gradual en la producción de TNF- α . La producción fue inversamente proporcional a la concentración de lípidos, observando la mayor producción con 1 μ g de lípidos de superficie y la menor producción al estimular con 100 μ g.

Al igual que en los experimentos de infección, observamos una inducción de TGF- β por los lípidos de superficie de *N. brasiliensis*. Esta inducción fue mayor al estimular con 100 μ g, sin existir diferencia con respecto al control al estimular con 10 μ g o u 1 μ g.

La producción de INF- γ inducida por los lípidos de superficie de *N. brasiliensis* fue muy pobre, observándose la mayor producción a las 48 horas con 10 μ g de lípidos.

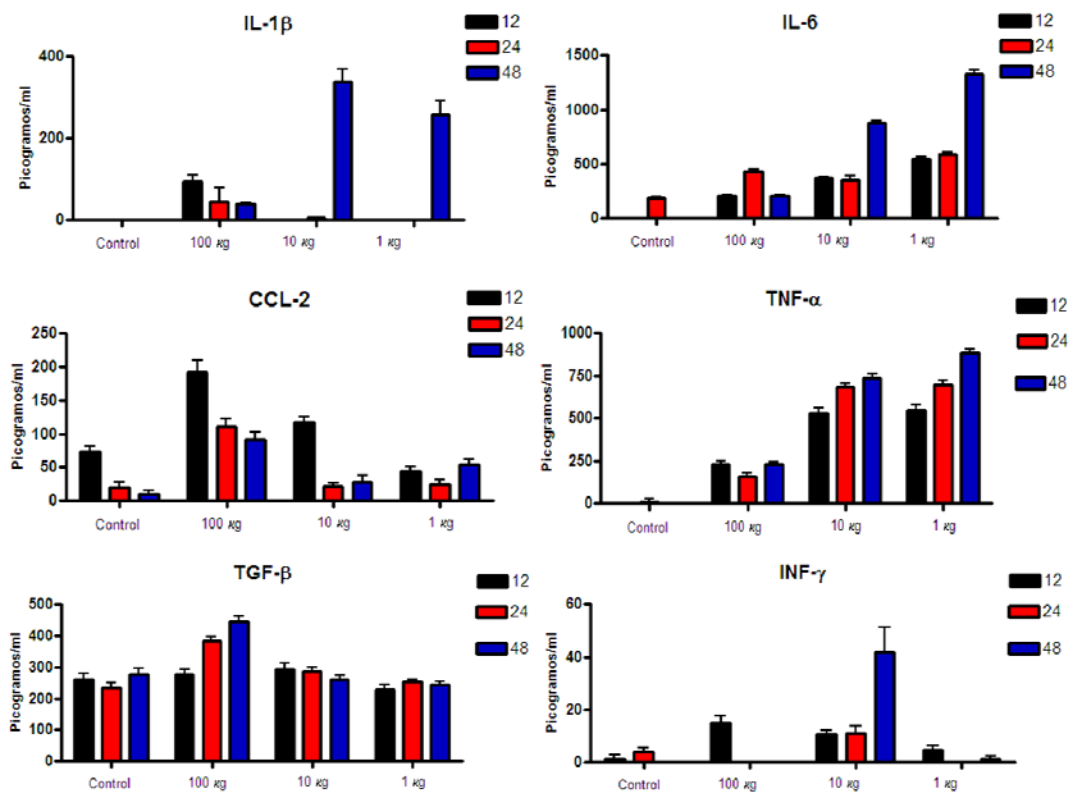


Figura 14: Inducción de citocinas inflamatorias por los lípidos de superficie de *N. brasiliensis* en macrófagos derivados de médula ósea. Se estimularon 1×10^6 BMDM con diferentes concentraciones de lípidos de superficie de *N. brasiliensis* aislados a partir de los extractos de éter de petróleo. Después de diferentes intervalos de tiempos, los sobrenadantes fueron recolectados para determinar la concentración de los diferentes mediadores inflamatorios por ELISA. Datos expresados en media \pm SD.

De igual forma, estudiamos la inducción de mediadores inflamatorios en respuesta a los lípidos de superficie de DC (Figura 15). Observamos una inducción de IL-1 β directamente proporcional a la concentración de lípidos. Por otro lado, observamos que los lípidos de superficie de *N. brasiliensis* son buenos inductores de IL-6. La mayor variación

se observó a las 12 horas de estimulación, con una mayor producción de este mediador con 100 μg . Posteriormente, hacia las 48 horas, la producción de IL-6 prácticamente no varió en con las diferentes concentraciones que estudiamos.

La producción de TGF- β mostró tener una cinética similar a la observada en macrófagos, ya que de manera interesante, se observó una inducción de esta citocina, directamente proporcional a la concentración de los lípidos. Al estimular con 100 μg fue cuando se observó una mayor producción de TGF- β . La producción no varió entre los diferentes tiempos de estudio, durante todo el experimento se observó una producción elevada de TGF- β . Por su parte, al estimular con 10 μg observamos una menor producción, sin embargo, esta se mantuvo relativamente constante durante el tiempo se estudio. Cuando estimulamos con 1 μg observamos una producción muy reducida de TGF- β que tan solo duró 24 horas, ya hacia las 48 horas no pudimos detectar esta citocina en los sobrenadantes de los cultivos de DC.

Por último analizamos la expresión de TNF- α en DC. Observamos una producción de esta citocina desde las 12 horas post infección. Observamos que en las DC estimuladas con 10 y 1 μg se indujo una mayor expresión de TNF- α en comparación con 100 μg . Esta producción fue progresiva en todos los grupos, alcanzando la máxima concentración a las 48 horas de estimulación.

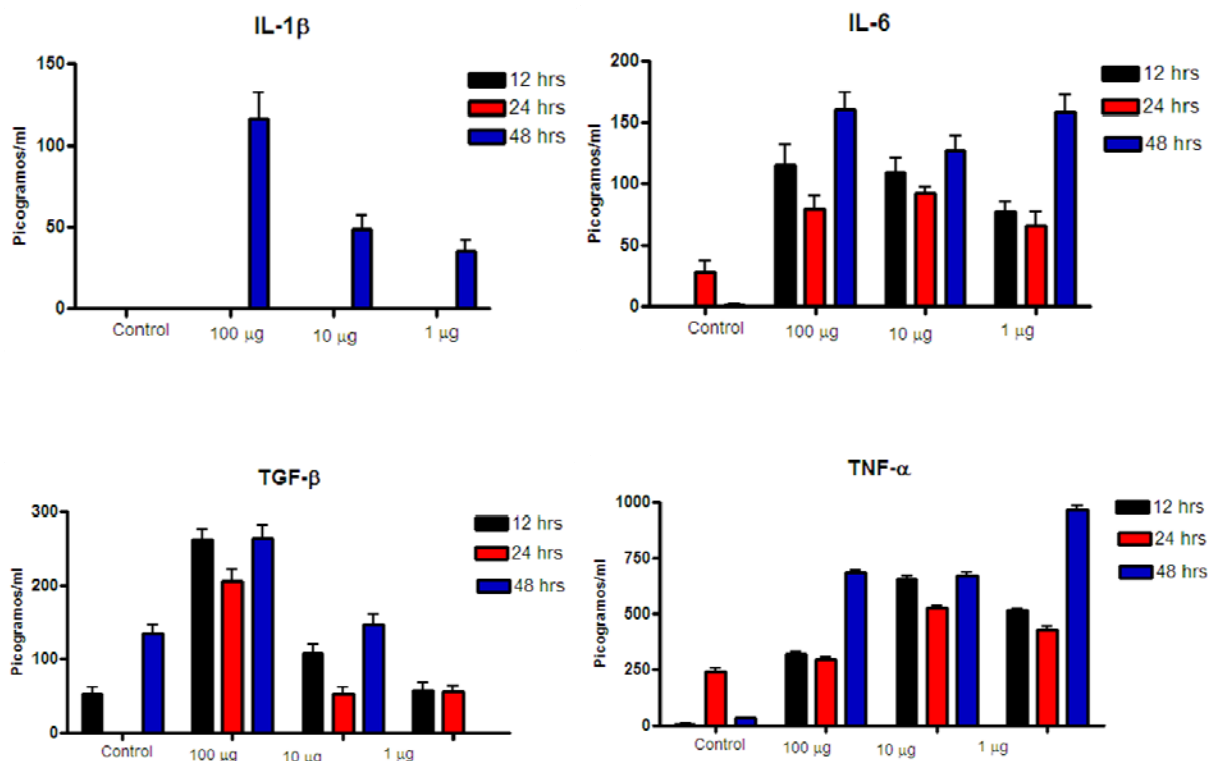


Figura 15: Inducción de citocinas inflamatorias por los lípidos de superficie de *N. brasiliensis* en DC. Se estimularon 1×10^6 DC con diferentes concentraciones de lípidos de superficie de *N. brasiliensis* aislados a partir de los extractos de éter de petróleo. Después de diferentes intervalos de tiempos, los sobrenadantes fueron recolectados para determinar la concentración de los diferentes mediadores inflamatorios por ELISA. Datos expresados en media + \pm SD.

La inducción de citocinas inflamatorias por los lípidos de superficie de *N. brasiliensis* explica porque se induce una menor respuesta inflamatoria durante la infección por *N. brasiliensis* deslipidizada. Sin embargo, esto no explica totalmente el porqué no se indujo micetoma. Observamos que a medida que *N. brasiliensis* se reproduce, las nuevas generaciones poseen una pared celular restablecida. En teoría, estas nuevas generaciones poseen la capacidad de inducir inflamación nuevamente, por lo que solo observaríamos la disminución del proceso inflamatorio de manera transitoria. Es por esto que pensamos que la respuesta inmune contra *N. brasiliensis* deslipidizada debe ser de algún modo más eficaz

para disminuir la carga bacteriana en comparación con *N. brasiliensis* NM de manera que antes de restablecerse la pared celular, el sistema inmune ha reducido la concentración de bacterias al punto que no se produce enfermedad. Es por esto decidimos realizar experimento de infección *in vitro* en principio con macrófagos, ya que estas células juegan un papel crucial en la respuesta contra microorganismos intracelulares.

4.2.3 –Análisis de la respuesta de los macrófagos derivados médula ósea contra *N. brasiliensis* deslipidizada.

N. brasiliensis ingresa al organismo humano principalmente por inoculación traumática. Una vez en los tejidos, los macrófagos tisulares constituyen la primera línea de defensa contra *N. brasiliensis*. Los macrófagos participan en la respuesta inmune contra *N. brasiliensis* de varias manera; 1) destruyendo al microorganismo mediante fagocitosis y muerte celular dependiente de intermediarios reactivos de oxígeno y nitrógeno, 2) iniciando una serie de procesos de activación celular que desencadenan un proceso inflamatorio que recluta otros elementos celulares en el sitio de lesión y 3) mediante la presentación de antígenos a los linfocitos T CD4⁺. Dada la importante labor de los macrófagos en la respuesta inmune contra *N. brasiliensis*, decidimos estudiar la respuesta *in vitro* de los macrófagos contra *N. brasiliensis* y *N. brasiliensis* deslipidizada con éter de petróleo.

Iniciamos nuestro estudio con una cinética de infección, utilizando macrófagos derivados de médula ósea (BMDM) dada a la homogeneidad de la población. Realizamos una cinética de infección a una multiplicidad de 3:1 y después de varios tiempos analizamos la morfología de los macrófagos para ganar indicios sobre la respuesta inmune contra *N. brasiliensis*. Como se observa en la figura 16, la respuesta de los macrófagos contra *N. brasiliensis* deslipidizada es diferente en comparación a la cepa de referencia.

Mientras que *N. brasiliensis* sin deslipidizar tiende a romper la membrana celular de los macrófagos, extendiéndose por la mono capa en forma de agregados multicelulares, *N. brasiliensis* deslipidizada es retenida con mayor avidez por los BMDM.

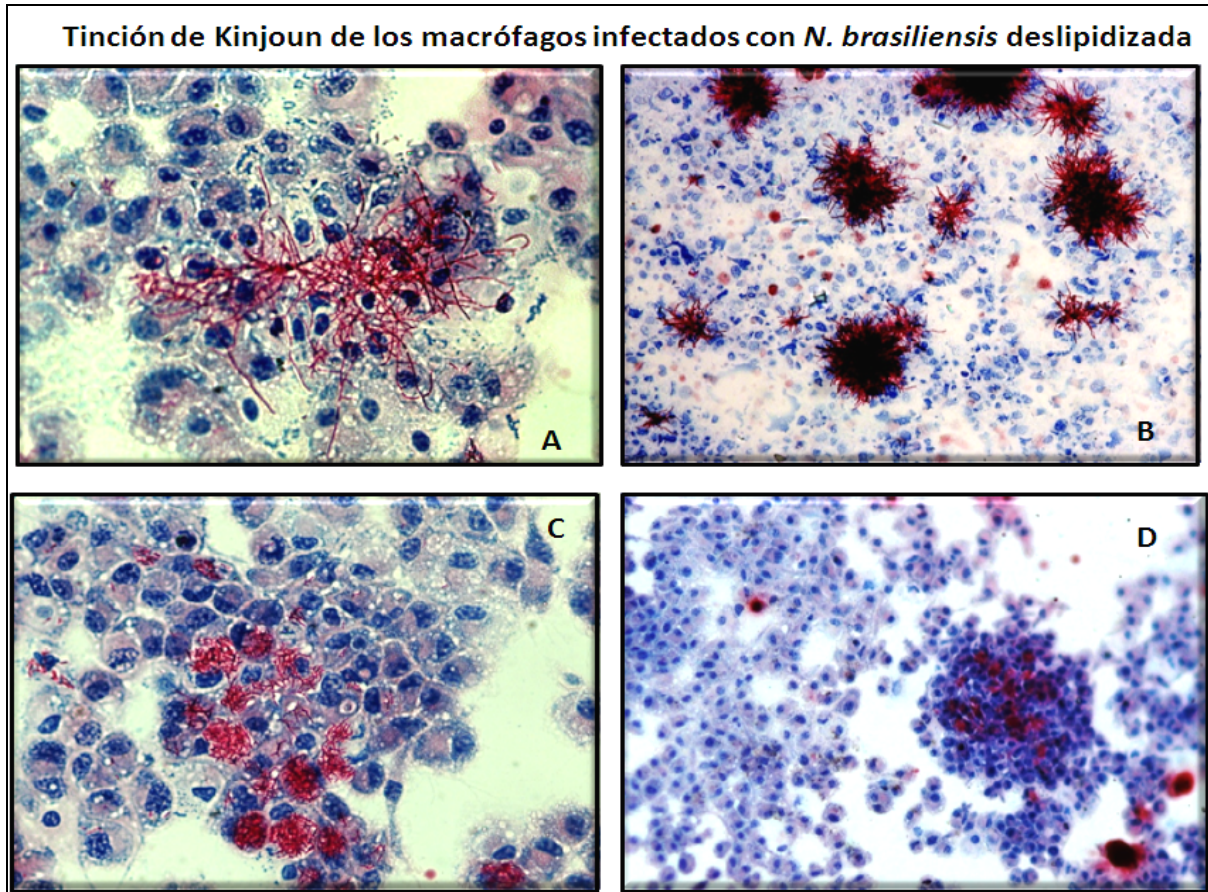


Figura 16: Tinción de Kinjoun en BMDM infectados con *N. brasiliensis* y *N. brasiliensis* deslipidizada. A) control 12 hrs, B) control 24 hrs, C) Tx3 veces 12 hrs, D) Tx3 24 hrs.

Otra diferencia notoria fue la tendencia de *N. brasiliensis* deslipidizada a inducir fusiones celulares y células multinucleadas gigantes en mayor número que *N. brasiliensis* sin deslipidizar como se demuestra en la figura 17.

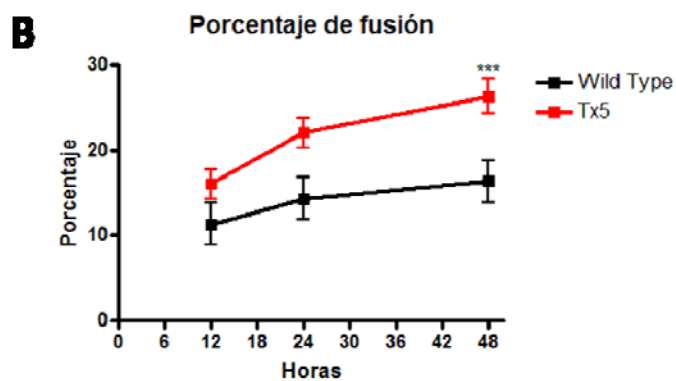
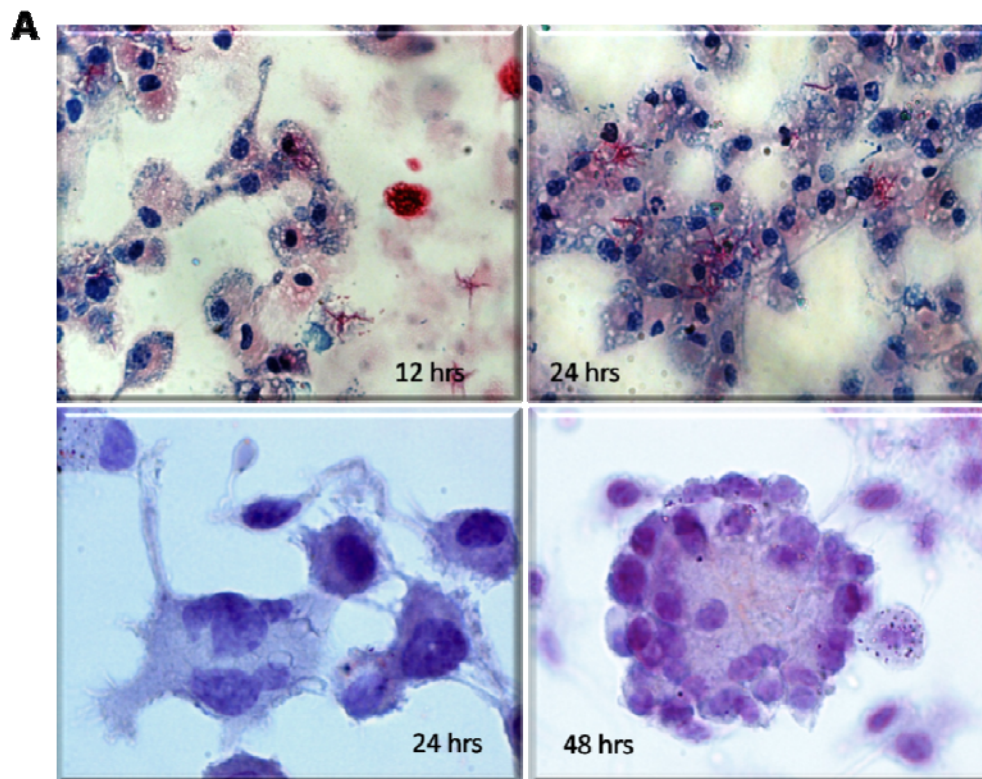


Figura 17: Fusión celular inducida por *N. brasiliensis* deslipidizada. A) Se observan las fusiones celulares inducidas por *N. brasiliensis* deslipidizada a los diferentes tiempos. A partir de las 12 horas las fusiones celulares son evidentes. Posteriormente, se forman agregados gigantes los cuales a las 48 horas toman aspectos de granulomas con células multinucleadas. B) La inducción de fusiones celulares es mayor en macrófagos infectados con *N. brasiliensis* deslipidizada en comparación con el control sin deslipidizar ($p < 0.01$). Análisis con ANOVA y análisis múltiple de Bonferroni, datos expresados en media \pm SD.

Observamos que después de las 24 horas post infección, los macrófagos se organizaban en estructuras multicelulares que hacia las 48 horas daban el aspecto de granulomas semejantes a los que se observan en la infección in vivo por *N. brasiliensis* (Figura 17 b). Dentro de estas organizaciones tipo granulomas, se identificaron algunas células de aspecto espumoso, tal y como se observa en los granulomas por *N. brasiliensis*. Para demostrar si en realidad se trataban de células espumosas, realizamos una tinción con rojo oleoso.

Observamos la presencia de células espumosas en los diferentes grupos que estudiamos. Como se observa en la figura 18a, las células espumosas se forman a partir de los macrófagos en respuesta a *N. brasiliensis* o a los mediadores que se producen en respuesta a las infección. Esto se piensa por la observación de que los lípidos de superficie de *N. brasiliensis* por si solos son capaces de inducir la inducción de células espumosas (Figura 18b). A las 24 horas, las células espumosas comenzaron a fusionarse, es así que se observó la presencia de células grandes, incluso multinucleadas en este tiempo. A las 48 horas, se observaron agregados multinucleares que inclusive se encontraban dentro de las estructuras semejantes a granulomas, tal y como se había observado en los experimentos de infección previos. La máxima inducción de células espumosas se observó a las 12 horas post infección.

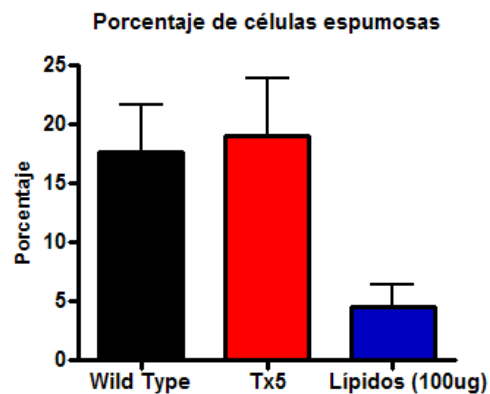
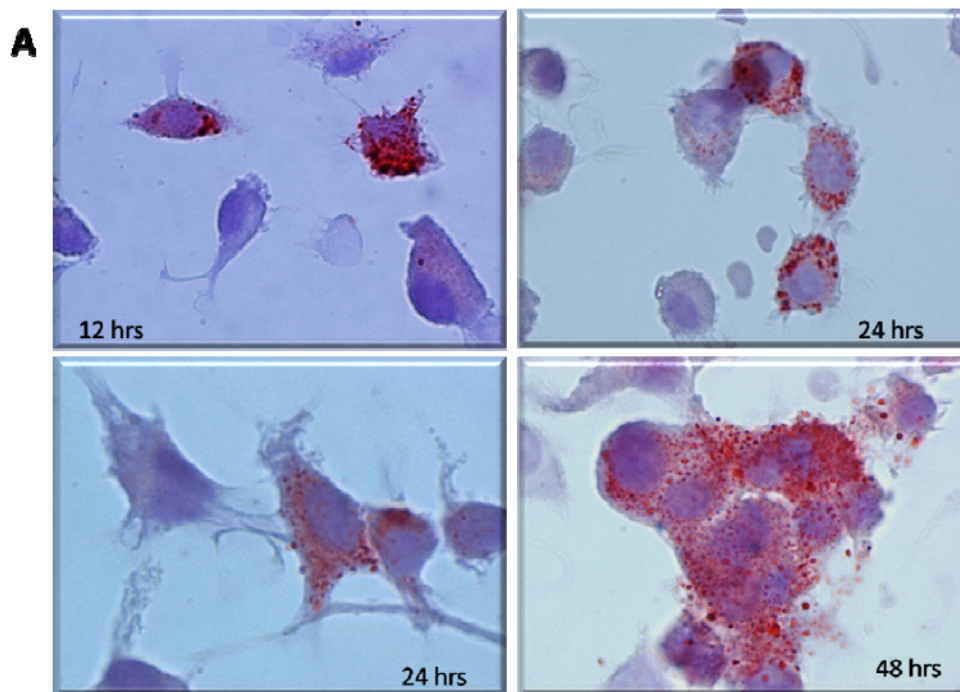


Figura 18: Inducción de células espumosas por *N. brasiliensis*. A) Tinción de rojo oleoso que demuestra la diferenciación de macrófagos a macrófagos espumosos in vitro. Se observa que a medida que transcurre el tiempo de infección se incrementa el tamaño y el número de células multinucleadas así como de agregados multicelulares espumosos. A las 48 horas se puede observar la presencia de agregados semejantes a granulomas, con un gran número de células espumosas en su interior. B) No hubo diferencia en el porcentaje de inducción de células espumosas entre *N. brasiliensis* y *N. brasiliensis* deslipidizada. Aunque en menor número, los lípidos aislados de *N. brasiliensis* fueron capaces de inducir la formación de células espumosas.

4.2.4 -Los lípidos de superficie de *N. brasiliensis* inhiben la fagocitosis bacteriana en macrófagos derivados de médula ósea.

El hecho que *N. brasiliensis* deslipidizada fuera retenida con mayor avidez por los BMDM, sugería una diferencia en la capacidad en que los macrófagos fagocitaban a *N. brasiliensis* deslipidizada, así como una mayor eficacia para contener el crecimiento intracelular del microorganismo. Para demostrar si había una diferencia en la capacidad fagocítica de los macrófagos ante *N. brasiliensis* deslipidizada, se realizó un ensayo de fagocitosis en el cual se observó que, en efecto, los lípidos de superficie de *N. brasiliensis* inhiben la fagocitosis por los BMDM (Figura 19).

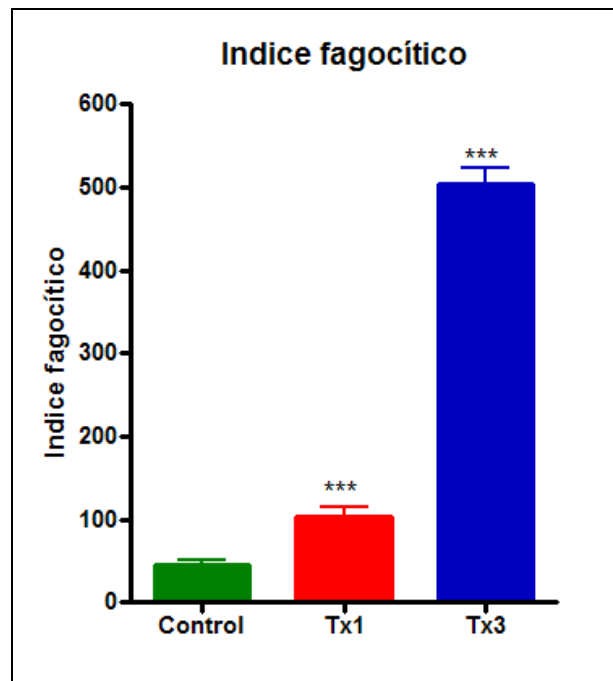


Figura 19: Índice fagocítico en BMDM infectados con *N. brasiliensis*, *N. brasiliensis* deslipidizada una y tres veces con éter de petróleo. Los BMDM fueron infectados a una MOI 10:1 con cada grupo. Al término de 30 min, la monocapa fue lavada extensamente para eliminar la *Nocardia* no fagocitada y fue posteriormente teñida por el método de Kinjoun. El índice fagocítico se determinó multiplicando el porcentaje de macrófagos con *N. brasiliensis* por el promedio de *Nocardia* dentro de los macrófagos. Los datos fueron analizados con ANOVA y prueba de Bunferroni, P significativa < 0.001 con respecto al control.

4.2.5 -los lípidos de superficie de *N. brasiliensis* modulan la respuesta efectora de los macrófagos dependiente de INF- γ .

Resulta claro a partir de los experimentos de infección de macrófagos, que *N. brasiliensis* deslipidizada es contenida con mayor eficacia que *N. brasiliensis* sin deslipidizar. Mientras que *N. brasiliensis* deslipidizada permanece en el citoplasma con avidez, *N. brasiliensis* NM destruye la membrana celular extendiéndose fuera de la monocapa formando agregados celulares densos difíciles de fagocitar y destruir. Esto sugiere que, además de inhibir la fagocitosis como ya se demostró, los lípidos de superficie de *N. brasiliensis* son capaces de inhibir los mecanismos microbicidas de los macrófagos. Para probar esta hipótesis, se realizaron experimentos de muerte intracelular (MIC) con *N. brasiliensis* control y *N. brasiliensis* deslipidizada. En primera instancia se realizó un ensayo de MIC con *N. brasiliensis* control, *N. brasiliensis* deslipidizada 3 veces y *N. brasiliensis* deslipidizada 5 veces. Como se observa en la figura 20, y en congruencia con lo observado en los ensayos in vivo, las cuentas de *N. brasiliensis* deslipidizada fueron menores en comparación del control a las 48 hrs (figura 20).

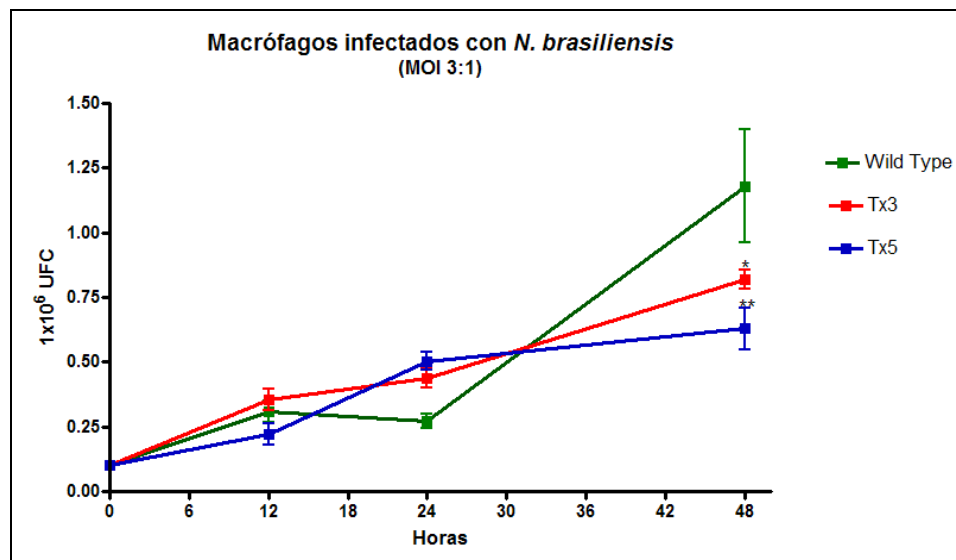


Figura 20: Ensayo de MIC por el método de azul alamar. Se infectaron macrófagos con los diferentes grupos por triplicado y a las 12, 24 y 48 hrs se analizó la concentración de UFC tanto en el sobrenadante como dentro de los macrófagos. Se observa una reducción significativa en la concentración de UFC en macrófagos infectados con *N. deslipidizada* en comparación con el control sin deslipidizar (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$). Análisis por ANOVA con prueba de Tukey expresado en media +_SD.

En este experimento, la capacidad microbicida intrínseca de los macrófagos fue suficiente para controlar la infección por *N. brasiliensis deslipidizada* en comparación con *N. brasiliensis* control. Sin embargo, la capacidad microbicida de los macrófagos se incrementa en respuesta a estímulos adicionales, específicamente el $\text{INF-}\gamma$ producido por linfocitos T CD4^+ . El $\text{INF-}\gamma$ incrementa los mecanismos microbicidas de los macrófagos al inducir la síntesis de NO. Es por esto que decidimos estudiar la actividad microbicida de los macrófagos contra *N. brasiliensis* y *N. brasiliensis* deslipidizada en respuesta al $\text{INF-}\gamma$.

En respuesta al $\text{INF-}\gamma$ los macrófagos controlan aún con mayor eficacia la infección por *N. brasiliensis* deslipidizada en comparación con el control (Figura 21).

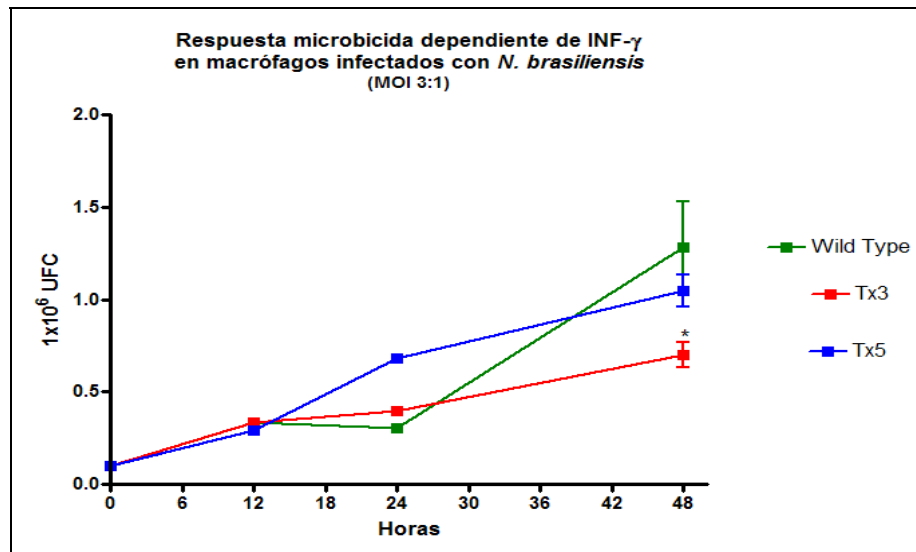


Figura 21: Experimento de MIC en macrófagos estimulados con INF- γ e infectados con *N. brasiliensis* control y *N. brasiliensis* deslipidizada con éter de petróleo 3 y 5 veces. Los macrófagos fueron estimulados por 18 hrs con 100U/ml de INF- γ recombinante. Posteriormente, se lavó el medio y se infectaron los macrófagos en presencia de INF- γ adicional. Al término de los diferentes tiempos se determinó la concentración de UFC por el método de azul alamar. Se observa una reducción en el número de UFC en los macrófagos infectados con *N. brasiliensis* deslipidizada 3 veces (* P < 0.01 con respecto control sin deslipidizar). Análisis por ANOVA con prueba de Bunferroni, datos expresados como media \pm SD.

Para confirmar si el efecto microbicida de los macrófagos en respuesta a INF- γ era dependiente de la inducción de NO, determinamos la producción de NO en macrófagos estimulados con INF- γ e infectados con *N. brasiliensis* control, deslipidizada tres y cinco veces con éter de petróleo. Observamos que en la primeras 24 horas, *N. brasiliensis* control inhibe la inducción de NO dependiente de INF- γ en comparación con los macrófagos infectados con *N. brasiliensis* deslipidizada (Figura 22). Este efecto se revirtió hacia las 48 hrs. El hecho *N. brasiliensis* NM inhibe la producción de NO hacia las 24 hrs sugiere que la inhibición temprana de NO favorece el crecimiento bacteriano de manera que, ya hacia las 48, el incremento subsecuente de NO es incapaz de contener la replicación intracelular bacteriana.

A diferencia con el control, *N. brasiliensis* deslipidizada induce un incremento progresivo de NO que favorece el control de la replicación bacteriana, reflejándose como una menor concentración en las cuentas de UFC hacia las 48 hrs (Figura 22).

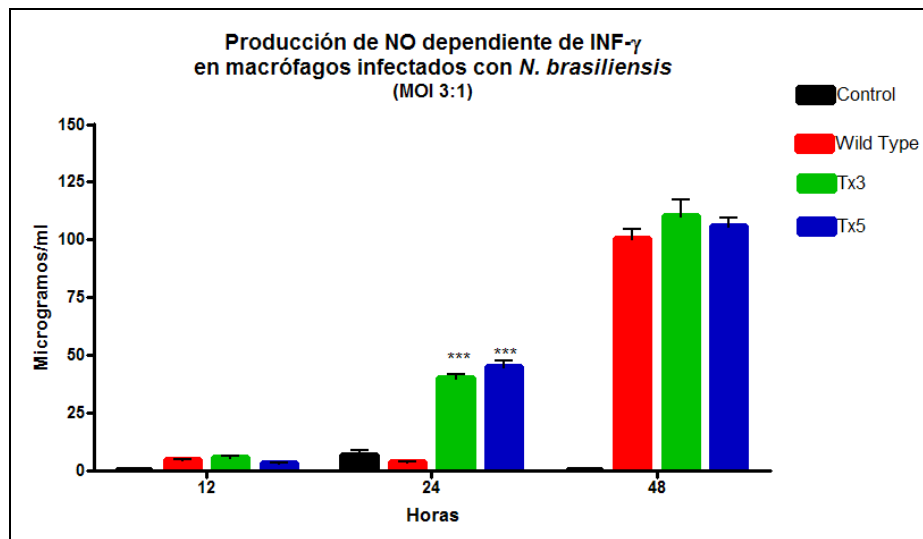


Figura 22: Ensayo de producción de NO en respuesta a INF- γ . Los macrófagos fueron estimulados con INF- γ por 18 hrs. Al término de dicho tiempo, el medio fue removido y los macrófagos fueron infectados por triplicado con los diferentes grupos de *N. brasiliensis* en presencia de INF- γ . El NO fue determinado por reacción de Griess a partir de los sobrenadantes en los tiempos indicados. Se observa una inhibición en la producción de NO en *N. brasiliensis* NM a las 12 hrs ($P < 0.001$). Análisis por ANOVA con prueba de Bunferroni. Datos expresados como media +_ SD.

Debido a que la inhibición del NO solo se observó en los macrófagos infectados con *N. brasiliensis* control, pensamos que los lípidos de superficie extraídos con éter de petróleo eran los responsable de mediar dicha inhibición. Para probar esta hipótesis, realizamos experimentos de inhibición de producción de NO con los lípidos de superficie extraídos con éter de petróleo. Para esto, estimulamos macrófagos con INF- γ en presencia o ausencia de lípidos de superficie de *N. brasiliensis* en varias concentración. Posteriormente

determinamos la producción de NO dependiente de INF- γ para ver si los lípidos de superficie de *N. brasiliensis* eran los encargados de mediar tal inhibición.

Encontramos que al incrementar la concentración de lípidos extraíbles con éter de petróleo se inhibía la producción de NO en respuesta al INF- γ (Figura 23). Concentraciones de 100ug por pozo inhibían totalmente la producción de NO a las 48 hrs, mientras que a medida que los macrófagos eran estimulados con concentraciones gradualmente menores, la producción de NO se revertía.

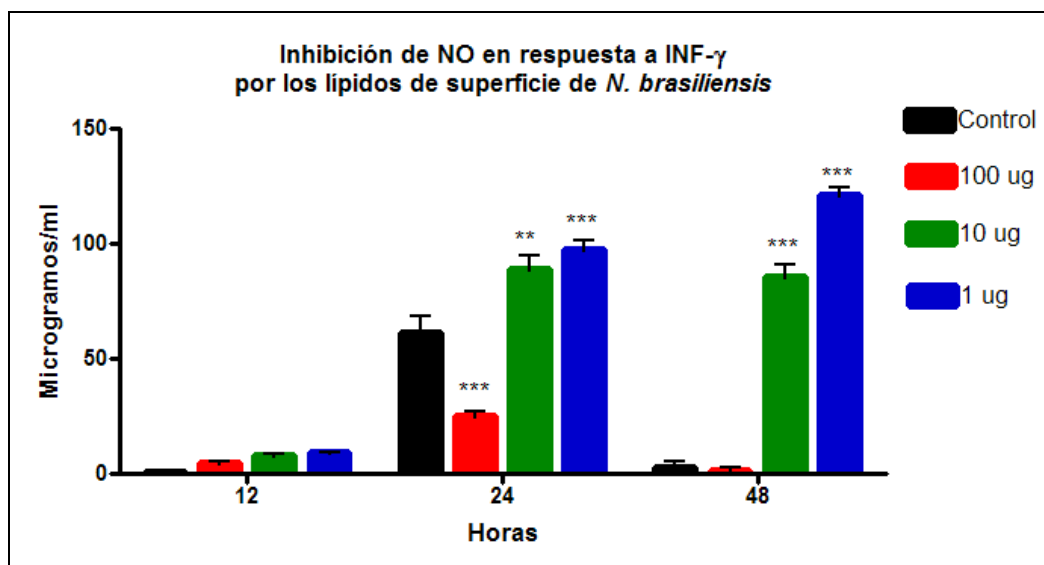


Figura 23: Ensayo de inhibición de NO dependiente de INF- γ por los lípidos de superficie de *N. brasiliensis* extraídos con éter de petróleo. Se estimularon BMDM con varias concentraciones de lípidos en presencia de INF- γ . Al término de los diferentes tiempos se determinó la producción de NO por reacción de Griess. Se observa una inhibición en la producción de NO con 100ug de lípidos ($P < 0.001$ con respecto al control). Por el contrario, a medida que se disminuye la concentración de lípidos el efecto inhibitor de los lípidos se revierte siendo más evidente a las 48 hrs (** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ con respecto al control y a 100 ug). Análisis con ANOVA y prueba de Bunferroni. Datos expresados en media \pm SD.

Los resultados recabados hasta ahora, indicaban que la reducción en las cuentas de UFC en macrófagos infectados con *N. brasiliensis* deslipidizada con respecto al control, se debía a una mayor producción de NO en respuesta al INF- γ . Aunado al efecto inhibitorio de NO mediado por los lípidos de superficie de *N. brasiliensis*, estos resultados sugerían que los lípidos de superficie de *N. brasiliensis* suprimen la producción de NO dependiente de INF- γ en macrófagos como un mecanismo de persistencia intracelular. De ser esta idea correcta, pensamos que, la estimulación de macrófagos con lípidos de superficie de *N. brasiliensis* suprimiría la producción de NO dependiente de INF- γ , lo cual, afectaría la reducción en la cuentas de UFC de *N. brasiliensis* deslipidizada que ya se había observado. Para probar esta hipótesis, repetimos los experimentos de inhibición de NO en macrófagos estimulados con lípidos de superficie de *N. brasiliensis* e INF- γ , pero esta vez, después del período de estimulación infectamos a los macrófagos con *N. brasiliensis* deslipidizada y *N. brasiliensis* NM. Después de varios tiempos analizamos la concentración de UFC y comparamos los resultados con controles de macrófagos infectados con *N. brasiliensis* NM y deslipidizada pero sin estimulación con lípidos de superficie. Los resultados demostraron que los la estimulación de macrófagos con lípidos de superficie de *N. brasiliensis* revierte el efecto microbicida sobre *N. brasiliensis* deslipidizada (Figura 24).

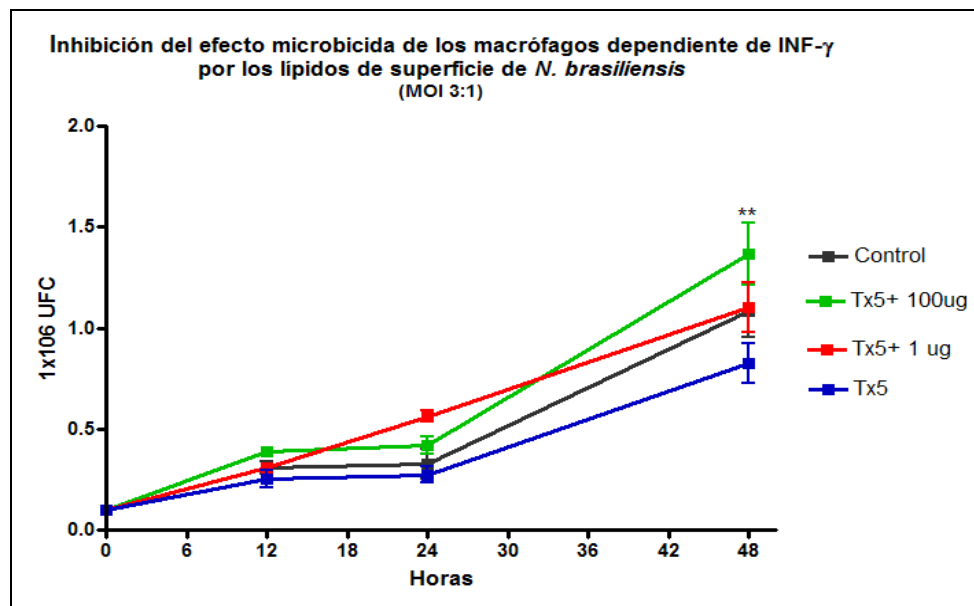


Figura 24: Estudio de inhibición de macrófagos con lípidos de superficie de *N. brasiliensis*. Se estimularon BMDM con 100ug y 1ug de lípidos en presencia de INF- γ por 18 hrs. Posteriormente los macrófagos fueron infectados con *N. brasiliensis* deslipidizada y la cuentas de UFC se determinaron a los tiempos indicados. Como controles se usaron macrófagos sin estímulo lipídico infectados con *N. brasiliensis* NM y *N. brasiliensis* deslipidizada. Se observa que la eficacia microbicida de los macrófagos ante *N. brasiliensis* deslipidizada se afecta al estimularlos con los lípidos de superficie. ** P < .001, análisis con ANOVA y prueba de Bunferroni, datos expresados como media +_ SD.

Al estimular con 100ug de lípidos, los macrófagos pierden la capacidad de controlar la infección por *N. brasiliensis* deslipidiza. En este experimento, la estimulación con 100 μ g de lípidos de superficie incremento las cuentas de *N. brasiliensis* deslipidizada inclusive por encima del control sin deslipidizar. Al estimular a los macrófagos con 1ug de lípidos, el efecto inhibitor disminuyo, regresando las cuentas de UFC casi a los niveles del control. Por otro lado, y como ya habíamos observado, los macrófagos sin estímulo lipídico estimulados con INF- γ controlan el crecimiento bacteriano con mayor eficacia que control.

Se determinó la producción de NO en los diferentes grupos, y se observó una correlación entre las cuentas de UFC y la producción de NO (Figura 25), a mayor reducción

de las cuentas, mayor producción de NO. Nuevamente, se comprobó que los lípidos de superficie de *N. brasiliensis* inhiben la producción de NO dependiente de INF- γ , correlacionándose este efecto con una menor reducción en las cuentas de UFC.

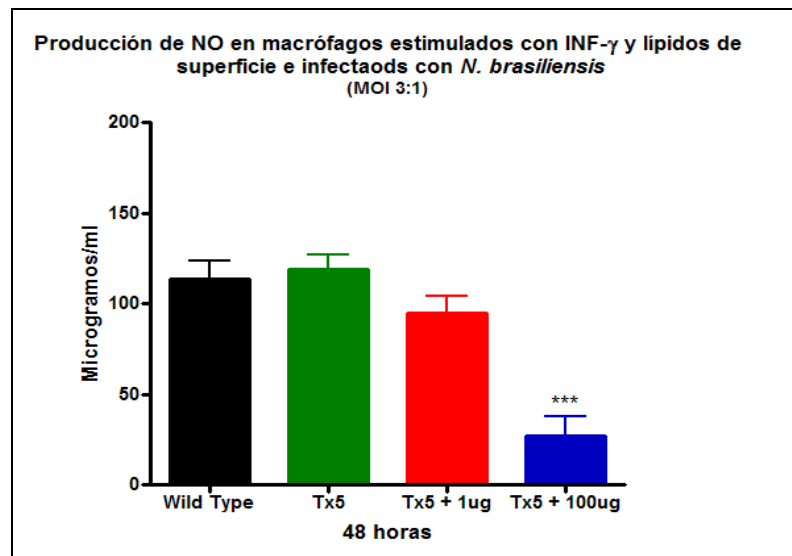


Figura 25: Inhibición de NO dependiente de INF- γ en macrófagos estimulados con lípidos de superficie de *N. brasiliensis*. Se estimularon BMDM con 100ug y 1ug de lípidos en presencia de INF- γ por 18 hrs. Posteriormente los macrófagos fueron infectados con *N. brasiliensis* deslipidizada y la producción de NO se determinó a las 48 hrs. Se observa una disminución en la producción de NO dependiente de INF- γ a medida que se incrementa la concentración de lípidos ($P < .0001$ con respecto al control y a Tx5). Análisis por ANOVA y prueba de Bonferroni. Datos expresados como media \pm SD.

4.2.6 -Los lípidos de superficie de *N. brasiliensis* modulan la expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad así como de moléculas co-estimuladoras de linfocitos T en macrófagos derivados de médula ósea.

Los resultados de los experimentos anteriores mostraron que los lípidos de superficie de *N. brasiliensis* inhiben la producción de NO dependiente de INF- γ . Sin embargo, el INF- γ modula otros aspectos esenciales de la respuesta inmune mediada por los macrófagos; principalmente la expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) y de moléculas co-estimuladoras de linfocitos T como CD80,

CD86, CD40. Debido a que los lípidos de superficie de *N. brasiliensis* inhiben el mecanismo inductor de NO mediado por INF- γ , nos preguntamos si también, los lípidos de superficie de *N. brasiliensis* modulaban la expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad tipo II (MHC II) y moléculas co estimuladoras CD80, CD86 y CD40.

Para contestar esta pregunta, determinamos la expresión de MHC-II dependiente de INF- γ en macrófagos sin infectar (control), macrófagos infectados con *N. brasiliensis* control, *N. brasiliensis* deslipidizada y macrófagos estimulados con lípidos de superficie de *N. brasiliensis*. Como se puede observar en la figura 26, *N. brasiliensis* NM indujo una menor expresión de MHC-II en comparación con el grupo control estimulado con INF- γ (Figura 26). Por su parte, la deslipidización de *N. brasiliensis* restableció la expresión de MHC-II, inclusive por encima del control positivo. En consistencia con estos resultado, los lípidos de superficie de *N. brasiliensis* disminuyen la expresión de MHC-II dependiente de INF- γ de una forma dosis dependiente, ya que, como se puede observar, la estimulación con 100 μ g indujo una expresión de MHC-II menor que el control positivo y que *N. brasiliensis* deslipidizada. Por su parte, 10ug tan solo indujeron una disminución significativa con respecto al control.

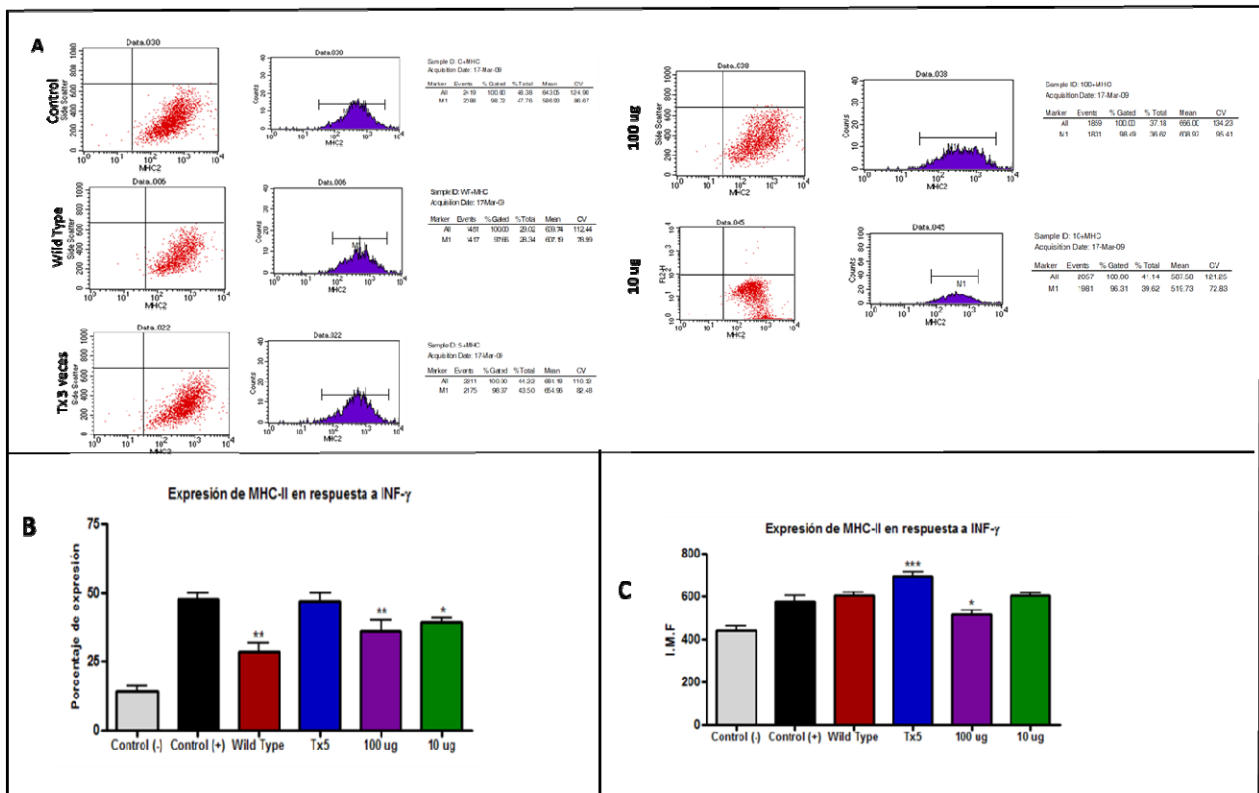


Figura 26: Expresión de MHC II dependiente de INF- γ en macrófagos infectados con *N. brasiliensis*. Se estimularon 1×10^6 macrófagos con INF- γ por 18 hrs en presencia o en ausencia de lípidos de superficie (100ug y 10 ug). Posteriormente se infectaron con *N. brasiliensis* y *N. brasiliensis* deslipidizada y a las 24 hrs se analizó la expresión de MHC II por citometría de flujo. A) Histograma de expresión de porcentaje e intensidad media de fluorescencia (IMF) de MHC-II en macrófagos infectados con *N. brasiliensis* control, deslipidizada y control sin infectar. Se observa una menor expresión de MHC-II en los macrófagos infectados con *N. brasiliensis* control y estimulados con lípidos en comparación con *N. brasiliensis* deslipidizada. B y C) Porcentaje e IMF de expresión de MHC-II en macrófagos infectados con *N. brasiliensis* control, deslipidizada y control sin infectar. Se observa una disminución en el porcentaje de expresión de MHC-II en los grupos infectado con *N. brasiliensis* control, estimulados con 100ug y 10ug de lípidos de superficie con respecto al control y a *N. brasiliensis* deslipidizada. Este efecto se observó también al analizar la intensidad media de fluorescencia. * $P < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Análisis con ANOVA y prueba de Bunferroni para múltiples parámetros y prueba de Dunnett para comparación de múltiples datos contra el control. Datos expresados en media \pm SD.

En otro experimento diferente, se analizó el efecto de los lípidos de superficie de *N. brasiliensis* en la modulación de la expresión de las moléculas co-estimuladoras CD80 CD86, CD40 y PDL-2, dependiente de INF- γ . Como se observa en la figura 27, los lípidos de superficie de *N. brasiliensis* modulan la expresión dependiente de INF- γ de CD86 y CD40.

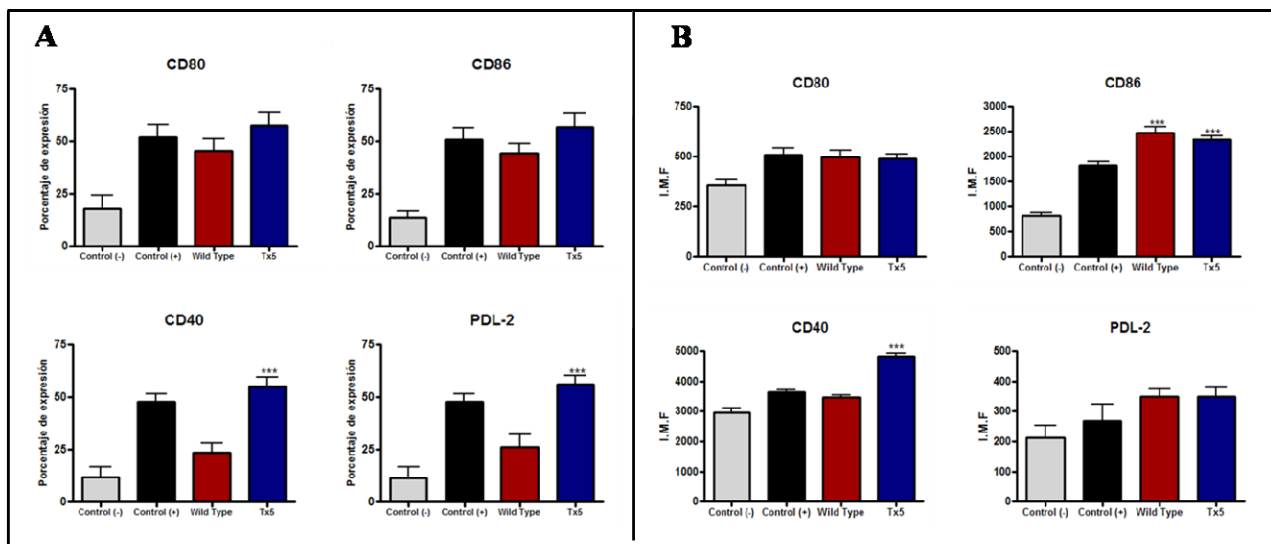


Figura 27: Inducción de moléculas co-estimuladoras de linfocitos T por $\text{INF-}\gamma$ en macrófagos infectados con *N. brasiliensis* control y *N. brasiliensis* deslipidizada. 1×10^6 BMDM fueron estimulados con $\text{INF-}\gamma$ por 18 horas para después ser infectados con *N. brasiliensis* control y *N. brasiliensis* deslipidizada por 24 horas en presencia de $\text{INF-}\gamma$. Posteriormente la expresión de CD80, CD86, CD40 y PDL-2 fue determinada por citometría de flujo. Como es de esperar, el $\text{INF-}\gamma$ induce la expresión de todas las moléculas co-estimuladoras estudiadas. En comparación con el control positivo, no hubo diferencia en la expresión de CD80 y PDL-2 en los diferentes grupos de estudio. La mayor diferencia se observó en la expresión de CD86 y CD40; tanto *N. brasiliensis* control como deslipidizada indujeron una mayor expresión de CD86 en comparación con el control positivo ($p < 0.001$), por su parte, *N. brasiliensis* deslipidizada indujo una mayor expresión de CD40 que *N. brasiliensis* control y que el control ($P < 0.001$). A, Porcentaje de células, B, Intensidad media de fluorescencia. Datos analizados como porcentaje de expresión e intensidad media de fluorescencia, análisis estadístico con ANOVA y prueba de Bonferroni, datos expresados en media \pm SD.

4.2.7 -Los lípidos de superficie de *N. brasiliensis* modulan la expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad así como de moléculas co-estimuladoras de linfocitos T en células dendríticas.

Los datos recabados en los experimentos de expresión de moléculas involucradas en la presentación de antígenos por macrófagos indican que, los lípidos de superficie de *N. brasiliensis* modulan la expresión de MHC-II y CD40 dependiente de $\text{INF-}\gamma$. La significancia biológica de este fenómeno resulta de una menor eficacia de activación de linfocitos T por los macrófagos. Sin embargo, la principal célula presentadora de antígenos son las células dendríticas, es por esto que nos preguntamos si, al igual que con los

macrófagos, los lípidos de superficie poseen la capacidad de modular la expresión de moléculas presentadoras de antígenos en células dendríticas. Para esto, reproducimos los experimentos de infección pero ahora en células dendríticas, y la expresión de moléculas co-estimuladoras y de MHC-II fue analizada por citometría de flujo. En un primer experimento, infectamos células dendríticas con *N. brasiliensis* y *N. brasiliensis* deslipidizada sin el estímulo del INF- γ ya que no se ha reportado que esta citocina sea esencial para modular la expresión de MHC-II en células dendríticas. Observamos que *N. brasiliensis* deslipidizada indujo una expresión mayor, estadísticamente significativa de MHC-II con respecto al control y con respecto a *N. brasiliensis* deslipidizada (Figura 28), lo que sugiere que, al igual que como ocurre con los macrófagos, los lípidos de superficie de *N. brasiliensis* inhiben la expresión de MHC-II. Posteriormente, analizamos el efecto que tiene el INF- γ en la inducción de MHC-II en DC. Así que después de estimular células dendríticas con INF- γ e infectarlas con los diferentes grupos de estudio, analizamos la expresión de MHC-II por citometría de flujo.

Observamos que, como se ha reportado, no hay una diferencia estadísticamente significativa entre la expresión de MHC-II en DC estimuladas con INF- γ en comparación con las DC no estimuladas. Sin embargo, nuevamente se observó que la expresión de MHC-II en DC infectadas con *N. brasiliensis* deslipidizada fue mayor en comparación el grupo infectado con *N. brasiliensis* NM.

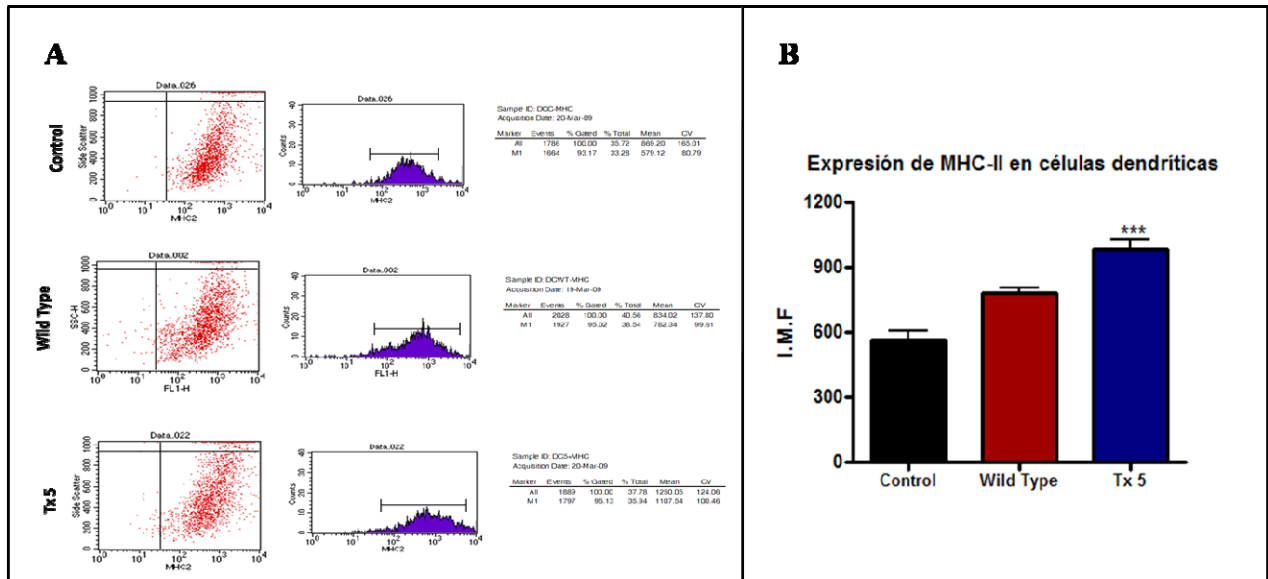


Figura 28: Expresión de MHC-II en DC infectadas con *N. brasiliensis* y *N. brasiliensis* deslipidizada. 1×10^6 DC fueron infectadas por 24 horas con *N. brasiliensis* y *N. brasiliensis* deslipidizada, el control no fue infectado. Posteriormente se analizó la expresión de MHC-II por citometría de flujo. Se observa una mayor expresión de MHC-II por *N. brasiliensis* deslipidizada en comparación con *N. brasiliensis* NM. *** $P < 0.001$, análisis con ANOVA y prueba de Dunnet, datos expresados como intensidad media de fluorescencia + \pm SD.

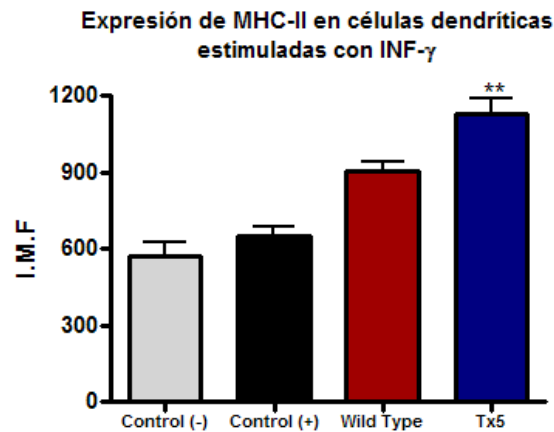


Figura 29: Expresión de MHC-II en DC estimuladas con INF- γ e infectadas con *N. brasiliensis* y *N. brasiliensis* deslipidizada. 1×10^6 DC fueron estimuladas con INF- γ por 18hrs e infectadas por 24 horas con *N. brasiliensis* y *N. brasiliensis* deslipidizada. Posteriormente se analizó la expresión de MHC-II por citometría de flujo. No se observó diferencia estadísticamente significativa en la expresión de MHC-II inducida por INF- γ en comparación con el grupo control sin estimular. Sin embargo, el incremento en la expresión de MHC-II inducido por *N. brasiliensis* deslipidizada en comparación con el control y con el grupo infectado con *N. brasiliensis* NM fue estadísticamente significativo (** $P < 0.01$). Análisis con ANOVA y prueba de Bunferroni, datos expresados en intensidad media de fluorescencia +_SD.

Posteriormente analizamos la expresión de moléculas co-estimuladoras de linfocitos T, específicamente CD80, CD86, CD40 y PDL-2 en células dendríticas infectadas con *N. brasiliensis* y *N. brasiliensis* deslipidizada. En este experimento no estimulamos con INF- γ debido a nuestra observación que este mediador no induce una mayor expresión al menos de MHC-II. De manera análoga a lo observado en macrófagos, *N. brasiliensis* deslipidizada incremento la expresión de CD40 y CD80, en comparación con el control y con *N. brasiliensis* sin deslipidizar (Figura 30).

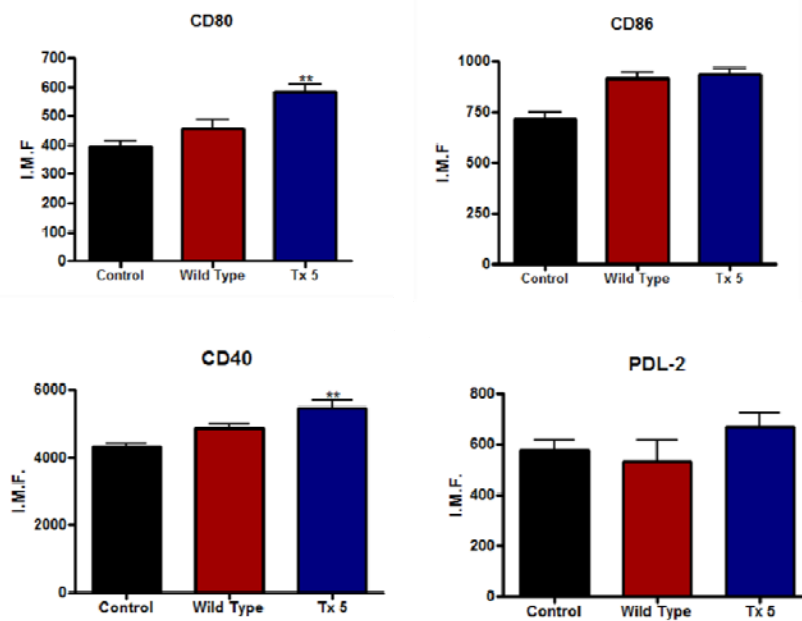


Figura 31: Expresión de moléculas co-estimuladoras de linfocitos T en DC infectadas con *N. brasiliensis* y *N. brasiliensis* deslipidizada. 1×10^6 DC fueron infectadas con *N. brasiliensis*, *N. brasiliensis* deslipidizada 5 veces o fueron dejados sin infectar. Posteriormente, al las 24 hrs, la expresión de las moléculas co-estimuladoras fue analizada por citometría de flujo. Se observa un incremento en la expresión de CD40 y CD80 en DC infectadas con *N. brasiliensis* deslipidizada en comparación con el control sin infectar y con las DC infectadas con *N. brasiliensis* NM. Análisis por ANOVA y prueba de Bunferroni, ** $P < 0.01$, datos expresados en intensidad media de fluorescencia \pm SD.

Objetivo 3: Investigar la capacidad inductora de protección inmunológica de *Nocardia brasiliensis* deslipidizada, contra el desarrollo del micetoma experimental en ratones BALB/c.

4.3.1 –*Nocardia brasiliensis* deslipidizada induce protección parcial contra el actinomicetoma experimental.

Los resultados anteriores demostraron la propiedad de los lípidos de superficie de *N. brasiliensis* en la inhibición de la expresión de MHC-II y moléculas co-estimuladoras de linfocitos T. La implicación de este hallazgo radica en la inhabilitación de la función presentadora de antígenos tanto de los macrófagos como de las células dendríticas hacia los linfocitos T. In vivo, este fenómeno se traduce como una incapacidad para montar respuesta celulares de linfocitos T, lo cual repercute en la generación de memoria inmunológica.

Si los hallazgos encontrados in vitro se reproduce de la misma manera in vivo, en teoría, al eliminar el estímulo inhibitorio de los lípidos, los macrófagos y las células dendríticas serán capaces de montar una respuesta celular, con la consiguiente generación de memoria inmunológica contra *N. brasiliensis*. Para probar esta idea, decidimos realizar experimentos de protección utilizando como inmunógeno a *N. brasiliensis* deslipidizada.

Como se observa en la figura 32, la inmunización de ratones BALB/c con *N. brasiliensis* deslipidizada confiere una protección parcial contra el desarrollo del

actinomicetoma experimental. En este experimento se utilizaron como controles a *N. brasiliensis* muerta por calor y el vehículo de inmunización, solución salina estéril.

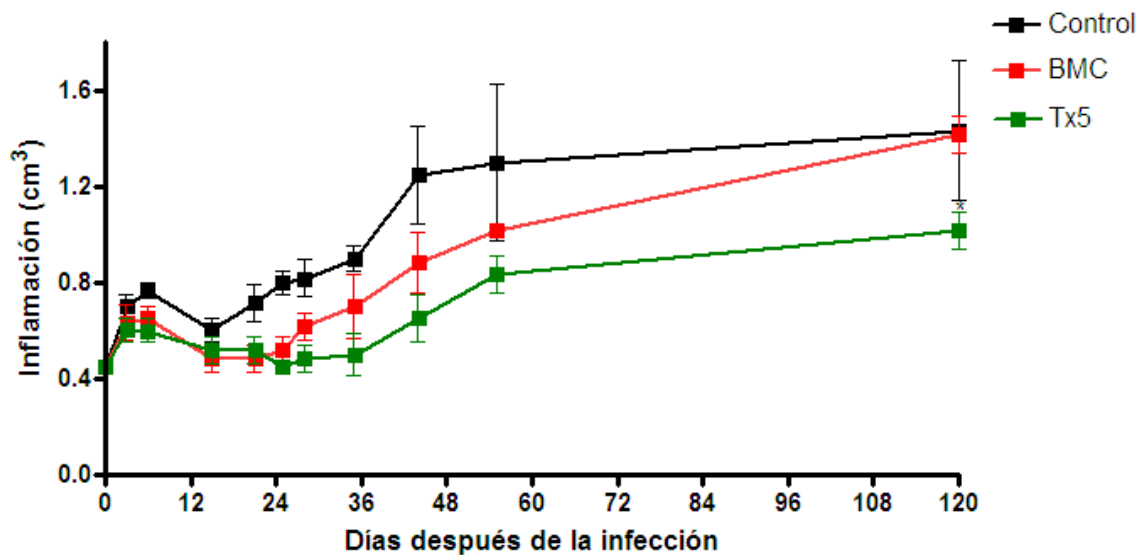


Figura 32: Efecto de la inmunización con *N. brasiliensis* deslipidizada, sobre la inducción del actinomicetoma experimental. 10 ratones BALB/c por grupo fueron inmunizados con solución salina (control), 500 μg de *N. brasiliensis* muerta por calor (BMC) o 500 μg de *N. brasiliensis* deslipidizada (Tx5), y al día 45 post-inmunización se retaron con 1.28×10^8 UFC de *N. brasiliensis* NM. Se observa una diferencia significativa en la intensidad del proceso inflamatorio (* $P < 0.05$) en los ratones infectados con *N. brasiliensis* deslipidizada.

Como ya está descrito, al inmunizar ratones con bacteria muerta por calor se retrasa la aparición del actinomicetoma. En nuestro experimento, este grupo desarrolló micetoma después del día 90. Por su parte, los ratones inmunizados con *N. brasiliensis* deslipidizada desarrollaron un proceso inflamatorio menos agresivo en comparación con los grupos controles.

Al analizar clínicamente la lesión producida por *N. brasiliensis* en cada uno de los grupos, pudimos observar que, mientras de los grupos inmunizados con solución salina y bacterias muertas por calor mostraron un micetoma franco, con la presencia de fistulas, abscesos, edema y deformación, los ratones inmunizados con *N. brasiliensis* deslipidizada mostraron un micetoma pequeño, sin una deformación marcada (Figura 33).



Figura 33: Protección inducida por *N. brasiliensis* deslipidizada contra el actinomicetoma experimental.

CAPÍTULO 5

DISCUSIÓN

La importancia de los lípidos de superficie en la virulencia de microorganismos relacionados al género *Nocardia*, ha sido demostrada principalmente en *Mycobacterium spp* [32, 49, 51]. En el caso específico de *N. brasiliensis*, desconocíamos si los lípidos de superficie están involucrados en el desarrollo del actinomicetoma. Para averiguarlo, realizamos experimentos de infección en ratones con *N. brasiliensis* deslipidizada con éter de petróleo ya que observamos, tal y como estaba descrito, que de esta forma no se altera la viabilidad bacteriana [41, 57]. Demostramos que la deslipidización de *N. brasiliensis* con éter de petróleo modifica la capacidad inductora del actinomicetoma. Este hecho se reflejó en varios parámetros de la enfermedad específicamente en la inducción de inflamación y la incidencia de la enfermedad.

Como está descrito, *N. brasiliensis* NM indujo un proceso inflamatorio progresivo con un pico inflamatorio máximo a los 7 días y otro más acentuado a los 21 días el cual se perpetuó hasta la aparición del actinomicetoma. Por su parte, *N. brasiliensis* deslipidizada indujo un proceso inflamatorio autolimitado, de menor intensidad, caracterizado por pico inflamatorio máximo al día 7 el cual fue cediendo paulatinamente hasta su desaparición alrededor del día 21. Esta diferencia en la capacidad inductora de inflamación se reflejó una ausencia de actinomicetoma en los grupos infectados con *N. brasiliensis* deslipidizada.

La incapacidad de *N. brasiliensis* deslipidizada para inducir inflamación de la misma intensidad que el control sin deslipidizar, demuestra la importante participación de los lípidos de superficie en la inducción de la inflamación que caracteriza al actinomicetoma. Así mismo, apoya la idea del origen inflamatorio de esta enfermedad. En conclusión podemos decir que el tratamiento con éter de petróleo disminuye la virulencia de *N. brasiliensis*.

En congruencia con nuestros resultados, la pérdida de la virulencia posterior al tratamiento con éter de petróleo ha sido reportada en algunas especies de *Mycobacterium* [40, 58, 59]. En ellas se ha observado que la pérdida de la virulencia también se debe a una disminución en la capacidad inductora de inflamación [42, 60, 61]. En estos microorganismos, el principal compuesto aislado con éter de petróleo es la DMT, un glicolípido conocido por su potente actividad inflamatoria y granulotomagénica [40, 42]. En especies de *Mycobacterium tuberculosis*, *bovis* y *BCG*, la pérdida de la virulencia posterior al tratamiento con éter de petróleo, se debe a la extracción de DMT, por lo que se reduce la inflamación y el daño tisular. Es por esto que una posibilidad es que el compuesto extraído de la superficie de *N. brasiliensis* con éter de petróleo sea DMT.

Sin embargo, y pese a la similitud filogenética que tienen, *N. brasiliensis* es diferente en muchos aspectos a *Mycobacterium spp.*, por lo que es probable que se trate de otros compuestos. Por ejemplo, a diferencia de *N. brasiliensis*, algunas *Mycobacterium spp.* tienden a formar cordones bacterianos. Esta propiedad depende precisamente de la DMT la cual, dada a su localización en la capa externa de la pared celular, media la interacción no covalente con otros compuestos químicos de la pared celular de las bacterias vecinas, induciendo la organización de cordones bacterianos [2]. Esta propiedad de formar cordones

bacterianos se pierden después del tratamiento con éter de petróleo y se relaciona con una disminución en la virulencia de la bacteria [56, 58, 62, 63]. De la misma manera que la DMT de *Mycobacterium spp.*, el compuesto que se extrae de *N. brasiliensis* con éter de petróleo se localiza en la capa electro densa externa. Sin embargo, y a diferencia de *Mycobacterium spp.*, en *N. brasiliensis*, el lípido de superficie media la agregación bacteriana y no la formación de cordones.

Al analizar la suspensión bacteriana posterior al tratamiento con éter de petróleo, notamos que, mientras *N. brasiliensis* NM forma agregados bacterianos densos y compactos que llegan a medir hasta 200 μm de diámetro, *N. brasiliensis* deslipidizada forma una suspensión más homogénea y unicelular desde la primera extracción, sin diferencia notable al incrementar el número de extracciones. Si al igual que en *Mycobacterium spp.* lo que se remueve de la pared de *N. brasiliensis* es DMT, los ácidos micólicos expuestos tenderían a formar agregados más grandes dada a la alta hidrofobicidad que se generaría en la pared, en lugar de la disgregación celular que observamos. Es por esto que probablemente, el tratamiento con éter de petróleo remueve compuestos altamente apolares, como micolatos o ácidos micólicos, dejando en la superficie otros compuesto con mayor polaridad como glicolípidos y glicoproteínas que son los que median la solvatación de la pared para suspender unicelularmente a *N. brasiliensis*.

Otro dato que apunta hacia la naturaleza apolar del compuesto extraído de la pared celular de *N. brasiliensis*, es la pérdida de la ácido-alcohol resistencia posterior al tratamiento con éter de petróleo. En *Mycobacterium spp.* no se ha reportado la pérdida de las propiedades tintoriales de la bacteria posterior al tratamiento con éter de petróleo [58, 59]. Esto se explica porque la ácido-alcohol resistencia es conferida por compuesto

lipídicos, principalmente micolatos y ácidos micólicos altamente apolares, los cuales forman una barrera de impermeabilidad que dificulta la adquisición de compuestos como la fucsina básica, al mismo tiempo que favorece su retención posterior al tratamiento con ácidos y alcoholes. Debido a que en *Mycobacterium spp.* el éter de petróleo remueve DMT y no micolatos, no se pierde la ácido alcohol resistencia. En el caso de *N. brasiliensis*, la pérdida de la ácido-alcohol resistencia se podría explicar por la extracción de compuestos apolares como ácidos micólicos u otros micolatos y no DMT. La identificación del compuesto extraído de la pared celular de *N. brasiliensis* con éter de petróleo es un área de actual investigación en nuestro laboratorio.

La pérdida de la ácido-alcohol resistencia en *N. brasiliensis* puede interpretarse como un indicador fenotípico de avirulencia. Esta asociación ha sido descrita en cepas de *M. tuberculosis* deficientes en la síntesis de ácidos micólicos como las cepas $\Delta phoP$ y $\Delta KasB$ [64, 65]. El gen *KasB* de *M. tuberculosis* codifica a una β -ketoacil-acil sintetasa implicada en la elongación de los meromicolatos de la pared celular [66]. La cepa $\Delta KasB$ carece de keto y metoxi micolatos, además de poseer micolatos de cadena corta así como una disminución en la síntesis de DMT [65]. Fenotípicamente, esta cepa pierde la capacidad de formar cordones bacterianos así como pierde la propiedad de ácido-alcohol resistencia. En ratones, la cepa $\Delta KasB$ se encuentra severamente atenuada, con una capacidad de latencia prolongada a muy bajas concentraciones bacterianas en los tejidos [65]. Esta atenuación se asocia con la pérdida de inducción de inflamación ante la ausencia de lípidos de superficie. Por esto, se considera que los micolatos son los principales componentes de *M. tuberculosis* implicados en la inducción de inflamación, así como los

encargados de mediar la ácido-alcohol resistencia de la bacteria. En consistencia con estos reportes, nuestros resultados asocian a la pérdida de la ácido-alcohol resistencia de *N. brasiliensis*, con una disminución en la inducción de inflamación así como con un menor grado de agregación celular, lo que conllevan a una reducción virulencia.

La relación entre la agregación celular y la virulencia de *N. brasiliensis* puede explicarse si consideramos que los grandes agregados bacterianos que inducen los lípidos de superficie, que llegan a medir hasta 200 μm , son imposibles de fagocitar por los macrófagos y neutrófilos. Asociado a la capacidad pro-inflamatoria intrínseca de los lípidos, los agregados bacterianos inducen el reclutamiento celular tan intenso que caracteriza al micetoma. Inclusive, suena lógico pensar que estos macroagregados bacterianos son los que salen de las fistulas clínicamente como gránulos durante el actinomicetoma (Figura 34).

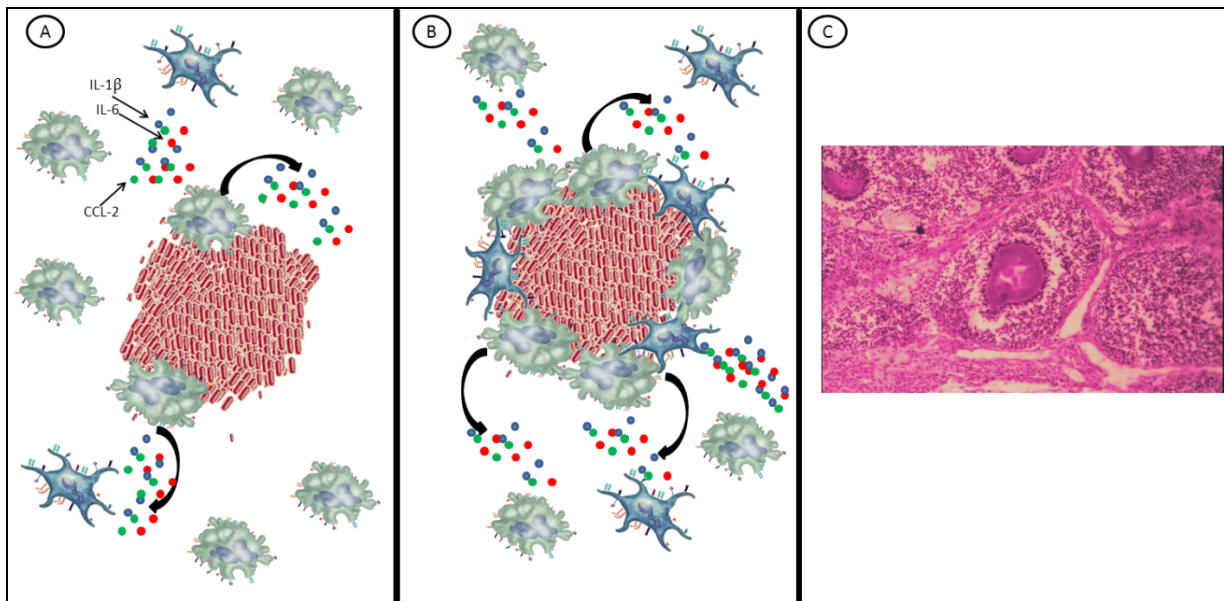


Figura 34: Esquema en donde se propone el modelo del mecanismo por el cual se forman los granulomas característicos en el actinomicetoma. A) *N. brasiliensis*, por medio de los lípidos de superficie, induce la formación de macroagregados bacteriano los cuales llegan a medir inclusive 200 μm de diámetro. Los fagocitos reconocen a los PAMP's de superficie de *N. brasiliensis*, con el objetivo de fagocitar a la bacteria, sin embargo, al estar esta agregada, imposibilita este proceso, lo cual favorece únicamente la inducción de mediadores inflamatorios por los fagocitos. En respuesta a dicho estímulo inflamatorio, numerosos macrófagos y polimorfonucleares son reclutados hacia el sitio de lesión (B). Dicho reclutamiento hace que las células atraídas rodeen a los agregados que histopatológicamente se observan como gránulos (C). Este proceso induce una perpetuación crónica del proceso inflamatorio.

Para confirmar la implicación de los lípidos de superficie de *N. brasiliensis* en la inducción de la inflamación que caracteriza al actinomicetoma, determinamos la producción de citocinas inflamatorias en macrófagos derivados de médula ósea así como en células dendríticas. Observamos que *N. brasiliensis* NM induce altas concentraciones de IL-1 β , IL-6 y de la quimiocina CCL-2.

La IL-1 β y la IL-6 son citocinas inflamatorias implicadas en la activación endotelial y la trans migración celular. Su expresión por BMDM se correlaciona con la alta celularidad presente en el sitio de infección por *N. brasiliensis*. Además de su importante implicación

en el reclutamiento de elementos celulares en el sitio de lesión, estas 2 citocinas inducen la producción de otros mediadores inflamatorios como IL-1 β , TNF- α e IL-6 en células endoteliales y fagocitos, induciendo una amplificación de la cascada inflamatoria [67]. Adicionalmente, estas citocinas inducen la expresión de metaloproteasas de matriz implicadas en la remodelación tisular, que en exceso, pueden causar daño a los tejidos, tal y como se observa en el actinomicetoma [67]. Por su parte, CCL-2 induce la quimio atracción y activación de macrófagos a los sitios de lesión. La activación inducida por CCL-2 se manifiesta por la producción de proteasas de matriz así como de intermediarios reactivos tóxicos para los tejidos [68].

La observación de que *N. brasiliensis* deslipidizada indujo una expresión significativamente menor de estos mediadores inflamatorios en comparación con el control sin deslipidizar, apoya la idea del papel de los lípidos de superficie en la inducción de estos mediadores. Cuando estimulamos a los macrófagos con los lípidos de superficie observamos que por sí solos, los lípidos de superficie fueron un estímulo eficaz para reproducir el patrón de citocinas inflamatorias inducido por la bacteria completa. En ausencia de lípidos de superficie, la producción de citocinas inflamatorias es menor en comparación con el control sin deslipidizar, lo que ocasiona un menor infiltrado inflamatorio y una menor destrucción tisular mediada por la activación de las células reclutadas en el sitio de lesión. Estas observaciones se correlacionan con las manifestaciones clínicas de la infección por *N. brasiliensis* deslipidizada.

Cuando analizamos la expresión de los mismos mediadores inflamatorios en DC, no percatamos que, con excepción de CCL-2, se repite el mismo fenómeno, ya que *N. brasiliensis* deslipidizada indujo una menor producción de citocinas en comparación con el

control sin deslipidizar, y los lípidos de superficie fueron capaces de estimular la producción de los medidores inflamatorios a concentraciones similares a las observada por la bacteria completa.

El TNF- α es un mediador de gran importancia, no solo por su papel en la respuesta inflamatoria, sino además, por su implicación en la activación de los mecanismos efectores de la respuesta de linfocitos T cooperadores tipo 1. La producción de TNF- α se correlaciona con una mejor respuesta inmune contra microorganismos intracelulares, tal y como queda evidenciada en ratones transgénicos carentes de TNF- α o de su receptor, o recientemente con el incremento en el riesgo a desarrollar tuberculosis en paciente en tratamiento con inhibidores biológicos de TNF- α [69-72].

En estudios con aislados clínicos de *M. tuberculosis* se ha observado, que las cepas menos virulentas poseen una mayor capacidad de inducción de TNF- α en comparación con los aislados clínicos hipervirulentos, como la cepa Beijing [32, 73]. Esta inhibición en la producción de TNF- α se relacionó la presencia del glicolípido fenólico de pared celular en las cepas hipervirulentas [32]. Mediante la disrupción de la policétido sintasa se logró atenuar la virulencia de la cepa Beijing, y dicha atenuación se correlacionó con un incremento en la producción de TNF- α y de IL-12 por la cepa mutante.

En nuestros estudios demostramos que *N. brasiliensis* NM induce una menor producción de TNF- α durante las primeras 24 horas post infección en comparación con *N. brasiliensis* deslipidizada. Esta inhibición se revirtió a las 48 horas, sin embargo, es posible que este lapso inhibitorio sea suficiente para alterar la respuesta inmune que en condiciones de estimulación constante ocurriría. Cuando realizamos los experimentos de estimulación

con lípidos de superficie de *N. brasiliensis*, nos percatamos que a medida que incrementábamos la concentración de lípidos, disminuía la producción de TNF- α .

TNF- α es necesario para mediar la producción de IL-12 por los macrófagos, así como para inducir en cooperación con INF- γ la síntesis de NO. Al inhibir la producción de TNF- α , *N. brasiliensis* bloquea el desarrollo de una respuesta celular Th1, necesaria para el control del bacilo. Es así que un posible mecanismo de virulencia de *N. brasiliensis* sea la inhibición de la respuesta celular Th1. En consistencia con esta idea se encuentra el hallazgo de un incremento en la producción de TGF- β en respuesta a *N. brasiliensis* y a los lípidos de superficie de *N. brasiliensis*. El TGF- β es una citocina inmunoreguladora implicada en la diferenciación de linfocitos Th0 a Treg [74]. A diferencia de los linfocitos Th1 implicados en el control de microorganismos intracelulares, los linfocitos Treg inducen la producción de IL-10 y TGF- β , citocinas que suprimen la respuesta inmune celular mediada por T [75]. El hecho que los lípidos de *N. brasiliensis* de manera aislada induzcan la producción de TGF- β al mismo tiempo que inhiben la producción de TNF- α , habla de un mecanismo de inhibición de la respuesta inmune en la que no solo bloquean la actividad de los linfocitos Th1, sino que además, los suprimen, al inducir la diferenciación de linfocitos Treg.

La producción de TGF- β fue más pronunciada en DC que en BMDM. Mientras que *N. brasiliensis* NM indujo una importante producción de TGF- β , *N. brasiliensis* deslipidizada no fue capaz de producir TGF- β en la primeras 24 horas para posteriormente inducir una pobre producción a las 48 horas. Al estimular DC con lípidos observamos una gran producción de TGF- β con 100 μ g, mientras que al estimular con 1 μ g no fue posible detectar TGF- β en los sobrenadantes. La implicación de esta observación se extiende a la

importante función de las DC para inducir las respuesta celulares mediadas por T. La DC después de activarse, migran al ganglio linfático en donde presentan los antígenos a los linfocitos T. Este estímulo, aunado a la producción de citocinas favorece la diferenciación de una respuesta de T a otra. De esta manera, en presencia de IL-12, los linfocitos T expresan T bet y se diferencian a Th1. Por otro lado, en presencia de IL-4, los linfocitos T expresan GATA3 y se diferencian a Th2 [76-78]. En presencia de TGF- β los linfocitos T expresan Foxp3 y se diferencian a Treg [79]. Es posible que la inducción de TGF- β por los lípidos de *N. brasiliensis*, hagan que al entrar en contacto con los linfocitos T en el ganglio linfático, las DC induzcan una diferenciación hacia Treg. Por su parte una respuesta de tipo Treg generaría un ambiente anti inflamatorio, propicio para el establecimiento crónico de la infección (Figura 35).

En *M. leprae* se observado que los lípidos de superficie poseen un efecto antiinflamatorio que induce la inhibición de proliferación de linfocitos ante mitógenos policlonales. Este efecto supresor de linfocitos T puede guardar correlación con lo que nosotros estamos observando. Si analizamos el actinomicetoma, podemos observar que en esencia guarda muchas similitudes con la lepra, aún más que con la tuberculosis. Ambas enfermedades son locales, afectan preferentemente a piel, son crónicas, se caracterizan por lesiones granulomatosas, indoloras, deformantes y nunca se sistematizan. Es probable que en ambas enfermedades, los lípidos de superficie alteren la respuesta inmune celular, induciendo una respuesta supresora crónica caracterizada por la inducción de linfocitos Treg, sin embargo, esta hipótesis necesita ser probada experimentalmente.

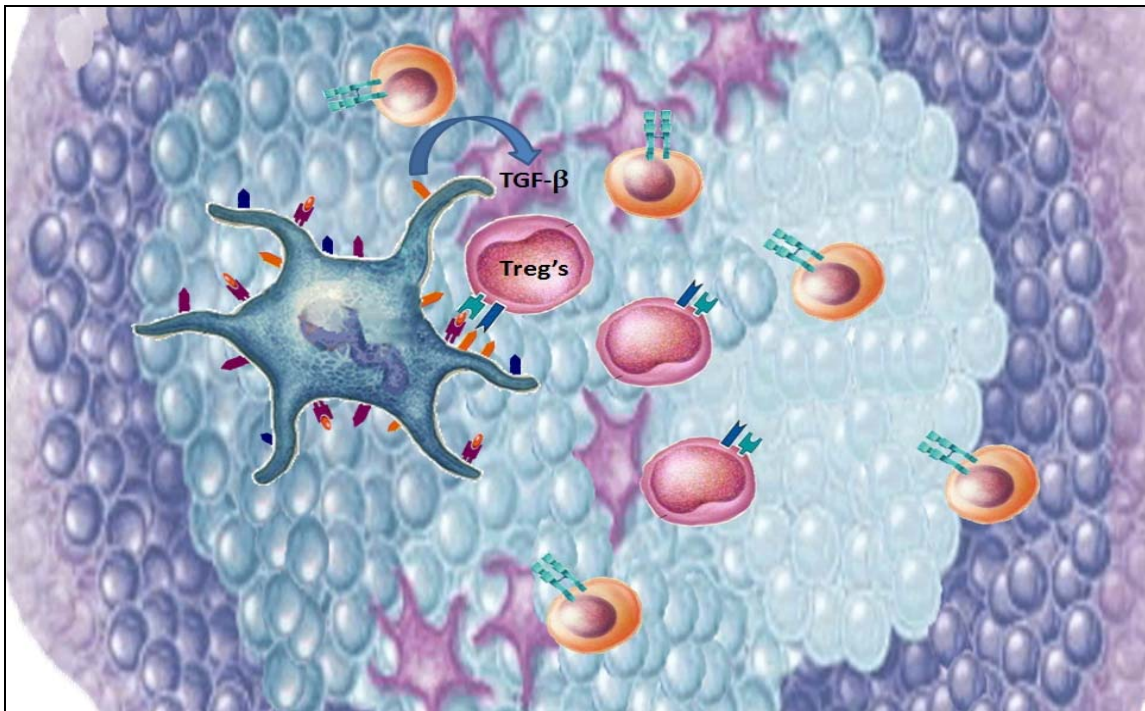


Figura 35: Modelo en el que se indica la hipotética inducción de Treg's por DC's estimuladas por los lípidos de superficie de *N. brasiliensis*. En presencia de los lípidos de superficie de *N. brasiliensis*, las DC's migran al ganglio linfático en donde presentarán antígenos bacterianos a linfocitos Th0. El efecto inductor de TGF- β de los lípidos sobre las DC's hará que en respuesta a esta citocina, los linfocitos Th0 se diferencien a Treg's dada la inducción de Foxp3 de TGF- β .

Para entender mejor el papel de los lípidos de superficie de *N. brasiliensis* en el desarrollo del actinomicetoma, extendimos nuestros estudios con experimentos *in vitro* de infección de macrófagos derivados de médula ósea (BMDM). Realizamos una cinética de la infección por *N. brasiliensis* deslipidizada, en donde se evidenciaron diferencias importantes con respecto al control sin deslipidizar.

En primera instancia observamos que *in vitro*, los macrófagos adquieren organizaciones celulares semejantes a las que se observan en la lesiones *in vivo*. Fue evidente el desarrollo de organizaciones semejantes a granulomas, con un gran número de células multinucleadas e inclusive células espumosas. La presencia de células espumosas

fue muy significativa ya que existe solo un reporte que documenta la diferenciación in vitro de estas células. La diferenciación de células espumosas fue evidente principalmente a las 12 horas post infección y se observó en todos los grupos de estudio, inclusive en los macrófagos estimulados con los lípidos de superficie de *N. brasiliensis*.

Se ha descrito que las células espumosas se forman in vitro en respuesta a la hipoxia tisular. Debido a que nuestras condiciones experimentales no fueron hipóxicas, podemos concluir que al menos in vitro, la saturación de oxígeno no es un factor implicado en la inducción de células espumosas. El hecho que *N. brasiliensis* deslipidizada indujera la diferenciación de células espumosas, de iguales proporciones a *N. brasiliensis* NM, sugiere que, al menos los lípidos de superficie extraído con éter de petróleo no son los causantes de dicha diferenciación. Al estimular a los macrófagos con lípidos observamos una diferenciación a células espumosas, aunque de menor magnitud que por el bacilo completo. Esto apunta a un papel de los mediadores inflamatorios en la inducción de células espumosas.

La influencia de los mediadores inflamatorios sobre macrófagos modula otros aspectos de la inmunobiología de estas células. Pudimos observar, que al deslipidizar a *N. brasiliensis* se incrementó el grado de fusión celular, a casi el doble que el control sin deslipidizar, aunque la relevancia de esta observación no está clara.

Un dato relevante fue la observación de incremento en la capacidad fagocítica de los macrófagos infectados con *N. brasiliensis* deslipidizada en comparación con el control sin deslipidizar. Esta diferencia fue más notable al incrementar el número de extracciones con éter de petróleo; *N. brasiliensis* extraída una vez fue fagocitada casi el doble que el control

sin deslipidizar, mientras que *N. brasiliensis* deslipidizada 3 veces fue fagocitada 4 veces más que *N. brasiliensis* deslipidizada una vez, lo esto sugiere que los lípidos de superficie inhiben la fagocitosis por BMDM. Esta inhibición no se debe a la formación de agregados bacterianos por los lípidos de superficie, puesto que de ser esta la causa, hubiéramos observado una disminución en la agregación bacteriana proporcional al número de extracciones con éter de petróleo, de la misma forma que el incremento en la fagocitosis fue proporcional al número de extracciones con éter de petróleo. No hubo diferencia alguna en la agregación bacteriana al deslipidizar una o tres veces a *N. brasiliensis*.

Posteriormente observamos que después de fagocitada, *N. brasiliensis* NM comienza a multiplicarse en el citoplasma de los BMDM y hacia las 12 horas, el crecimiento intracelular es tal, que múltiples agregados multicelulares rompían la membrana celular de los BMDM extendiéndose hacia el exterior de las células. A las 48 hrs se observaron numerosas colonias de *N. brasiliensis* en forma de agregados multicelulares densos que invadían totalmente la monocapa. En contraste, la infección por *N. brasiliensis* deslipidizada fue en apariencia menos agresiva. A las 12 horas se observaron macrófagos repletos de bacterias, con menos entramados multicelulares externos. A las 48 horas se observaron algunas colonias de características similares a las formadas por *N. brasiliensis* NM aunque con menor invasión y destrucción de la monocapa.

Los patógenos intracelulares ingresan a las células para replicarse y sobrevivir utilizando estrategias de persistencia como la inhibición de la fusión fagolisosomal. Por su parte los microorganismos extracelulares utilizan estrategias que les permiten escapar de la fagocitosis para evitar así ser destruidos por los mecanismos microbicidas de los fagocitos profesionales. Clásicamente, los actinomicetos han sido clasificados como

microorganismos intracelulares. En el caso de *Mycobacterium* spp. esto es correcto. *M. tuberculosis* posee múltiples mecanismos que le permiten persistir dentro de los macrófagos, teniendo períodos extracelulares muy cortos, sobre todo en la fase infectiva de la enfermedad cuando causan destrucción completa de los tejidos. Debido a esto, no se ha descrito mecanismo alguno de evasión de la fagocitosis en *Mycobacterium* spp. Si este es el mismo caso, no tiene sentido que *N. brasiliensis* utilice los lípidos de superficie para evitar ser fagocitado. Los resultados de los experimentos de fagocitosis con *N. brasiliensis* demuestran que los lípidos de superficie extraídos con éter de petróleo inhiben la fagocitosis en BMDM. Debido a que la inhibición disminuyó a medida que se incrementó el número de extracciones, es probable que la deslipidización elimine proporcional al número de extracciones, compuestos que ocultan patrones moleculares reconocidos por los receptores de reconocimiento de patrones en la superficie de los BMDM. Este tipo de inhibición de la fagocitosis está descrito en microorganismos extracelulares encapsulados o bien en microorganismos intracelulares con sistemas de secreción tipo III como *Yersinia* spp [80]. Es probable que los lípidos de la capa electro densa externa de *N. brasiliensis* funcionen a manera de cápsula externa inhibiendo la fagocitosis.

De ser esto cierto, es momento de replantearnos si *N. brasiliensis* es en realidad un microorganismo intracelular en el sentido estricto de la palabra. Los experimentos de infección in vitro mostraron una tendencia de *N. brasiliensis* a crecer dentro de los macrófagos y salir en forma de agregados extracelulares. A las 48 hrs es notoria la predominancia extracelular de la bacteria, cosa que no se observa con microorganismos de género *Mycobacterium* spp. De igual forma, en el actinomicetoma se observan macrocolonias extracelulares de *N. brasiliensis* rodeadas por macrófagos, neutrófilos y

células mononucleares formando granulomas. Este cuadro es por mucho, más frecuente, que encontrar bacterias en el interior de las células. Esto nos hace pensar, que el curso intracelular de *N. brasiliensis* dentro de los macrófagos es solo parte de la respuesta natural del macrófago para eliminar al microorganismo, y no un mecanismo de evasión inmune y persistencia bacteriana como ocurre con otros actinomicetos. En otras especies de *Nocardia* como *N. asteroides*, no se observa un patrón de localización extracelular predominantemente, esto explica porque difícilmente inducen micetoma. A diferencia de otros microorganismos del género *Nocardia*, los hongos inductores de micetoma crecen en los tejidos de manera similar a *N. brasiliensis*, formando agregados multicelular grandes difíciles de eliminar. Es por esto que posible que en realidad, *N. brasiliensis* se comporte más como un hongo que como un actinomiceto.

Independientemente de si *N. brasiliensis* es intracelular facultativo u obligado estricto, un hecho indiscutible es que parte de su ciclo infeccioso transcurre dentro de los macrófagos, ya que este elemento celular es determinante en la respuesta inmune contra *N. brasiliensis*. Es por esto que estudiamos la respuesta de los macrófagos contra *N. brasiliensis* deslipidizada, encontrando que es más susceptible a los mecanismos microbicidas en comparación con el control sin deslipidizar. Cuando infectamos macrófagos sin estímulo alguno, observamos una reducción de más del 50% en la cuentas de *N. brasiliensis* deslipidizada en comparación con el control sin deslipidizar. Esta diferencia fue aún más significativa al estimular a los macrófagos con INF- γ .

El INF- γ induce la activación de los macrófagos al inducir la expresión de la óxido nítrico sintetasa inducible (NOS2 o iNOS), la cual media la oxidación del nitrógeno del grupo guanidino de la L-arginina para formar NO y L-citrulina [81]. Adicionalmente, el

INF- γ incrementa la transcripción de genes implicados en la presentación de antígenos como MHC-II, CD80, CD86 y CD40 [82]. Se ha observado que el INF- γ incrementa la resistencia contra infecciones por microorganismos intracelulares como *Toxoplasma spp*, *Leishmania spp*, *Tripanosoma spp* o *Mycobacterium spp*. al inducir la producción de NO [83-86]. En nuestros experimentos observamos una mayor producción de NO en las primeras 24 horas de infección de macrófagos con *N. brasiliensis* deslipidizada en comparación con el control sin deslipidizar. Adicionalmente, observamos que la estimulación de los macrófagos con los lípidos de superficie de *N. brasiliensis* inhiben la inducción de NO en respuesta al INF- γ de manera dosis dependientes ya que con 100 μ g de lípidos se bloqueo por completo la producción de NO.

La inhibición de la inducción de iNOS en respuesta al INF- γ como mecanismo de virulencia, ha sido reportada en varios microorganismos. Se sabe que *Leishmania spp*, *Mycobacterium spp* y *Tripanosoma spp* inhiben la producción de NO dependiente de iNOS en macrófagos estimulados con INF- γ [87-90]. Diversos determinantes de superficie han sido implicados en la mediación de la inhibición, dentro de los que destacan la lipoarabinomanosa y los fosfo-myo-inositoles mono y di acetilados de *M. tuberculosis*, el lipofosfoglicano de *Leishmania spp* entre otros [89, 90]. El mecanismo por el cual median esta inhibición no se conoce del todo, sin embargo, se ha observado, por ejemplo para el caso de *Leishmania spp* y *Tripanosoma spp*, la activación de fosfo-protein-fosforilasas como la SHP-1 [91, 92] las cuales desfosforilan a JAK1, JAK2 y STAT1 [91, 93], moléculas implicadas en la señalización del receptor de INF- γ . Por este mecanismo se bloquea la señalización del receptor de INF- γ , evitando así la activación de IRF-1 con la consecuente inhibición de la transcripción de iNOS [94, 95].

Adicionalmente se ha descrito la activación de SOCS-1 y SOCS-3 por *Leishmania donovani* y por la DMT de *M. tuberculosis* [50, 96, 97]. Los miembros de la familia de supresores de la señalización de citocinas, SOCS, fungen como inhibidores y moléculas reguladoras al desfosforilar a los miembros de la vía de señalización JAK/STAT, bloqueando de esta manera la señalización dependiente de INF- γ [98].

Es probable que en el caso de *N. brasiliensis*, los lípidos de superficie inhiben en algún nivel las vías de señalización de INF- γ tal y como se ha descrito en las especies anteriormente mencionadas. Sin embargo, y pese a que nuestro estudio no se extendió al nivel de señalización intracelular, obtuvimos resultados que nos brindan una idea del mecanismo implicado en la inhibición de la producción de NO por los lípidos de superficie de *N. brasiliensis*. Observamos que los lípidos de *N. brasiliensis* suprimen la producción de TNF- α en macrófagos y DC, mientras que por otro lado inducen la producción de TGF- β en estos dos tipos celulares. El TNF- α es una citocinas que media varios aspectos de la cascada inflamatoria. Adicionalmente, el TNF- α posee la capacidad de sinergizar la inducción de iNOS con el INF- γ en macrófagos [84, 99]. Se ha visto que al inhibir la producción del TNF- α disminuye la producción de NO dependiente de INF- γ [100, 101]. Son varios los microorganismos que inhiben la producción de TNF- α como mecanismo de virulencia. En los modelos de infección con *Leishmania donovani*, *M. tuberculosis* o *Trypanosoma cruzi* se ha observado que la inhibición de TNF- α depende de la inducción de TGF- β por los microorganismos [102-106]. Nosotros observamos una disminución de TNF- α proporcional a la producción de TGF- β en respuesta a *N. brasiliensis* NM así como a los lípidos de superficie. En macrófagos infectados con *N. brasiliensis* NM se observó la máxima producción de TGF- β a las 24 horas, mismo tiempo en el que se observó la menor

producción de TNF- α . De igual forma, la máxima inhibición de NO en macrófagos infectados con *N. brasiliensis* NM ocurrió a las 24 horas. Esto sugiere un mecanismo en el cual los lípidos de superficie de *N. brasiliensis* indujeron durante las primeras 24 horas TGF- β , el cual a su vez inhibió la producción de TNF- α . Al disminuir la concentración de TNF- α , se perdió el efecto sinérgico de inducción de NO de TNF- α e INF- γ , por lo que disminuyó la producción de NO en las primeras 24 horas. Posteriormente, observamos una ligera reducción en los niveles de TGF- β a las 48 horas, lo cual se tradujo en un incremento de TNF- α y por consiguiente de NO. Sin embargo, los bajos valores de NO en las primeras 24 horas permitieron la proliferación de *N. brasiliensis* de tal manera que ya hacia las 48 horas fue imposible controlar la infección, aún con concentraciones de NO comparables a los producidos por *N. brasiliensis* deslipidizada. Por su parte, *N. brasiliensis* deslipidizada no indujo niveles apreciables de TGF- β , especialmente en DC. Esto se tradujo en una producción constante de TNF- α y por consiguiente de NO a lo largo del proceso infeccioso, lo cual se tradujo como un mejor control de la infección en comparación con el control sin deslipidizar.

El TGF- β inhibe la proliferación de linfocitos B y T al mismo tiempo que la activación de macrófagos dependiente de INF- γ [107, 108]. Este efecto inhibitor ocurre por dos mecanismos, uno directo el cual implica la inactivación de kinasas de las vías JAK/STAT dependientes de INF- γ , inactivación de IRF1, así como la inactivación de PI3K, Akt y p38 [107]. El otro mecanismo es el indirecto en el cual, TGF- β inhibe la producción de citocinas críticas de la respuesta inmune como TNF- α [109, 110]. Se ha observado que TGF- β inhibe la traducción del mRNA de TNF- α [111], así como la producción de INF- γ dependiente de IL-12 en linfocitos T y células asesinas naturales [112]. Esto se ha descrito

a partir de la observación del incremento en la producción de $\text{INF-}\gamma$ en macrófagos incubados con anticuerpos anti-TGF- β [113, 114]. Al no haber TNF- α se pierde la sinergia con $\text{INF-}\gamma$, disminuyendo la expresión de iNOS y disminuyendo la producción de NO lo cual facilita la supervivencia bacteriana. Es por esto que los resultados indican que los lípidos de superficie de *N. brasiliensis* inducen la producción de TGF- β la cual a su vez inhibe la producción de TNF- α al mismo tiempo que inactiva la señalización del receptor de $\text{INF-}\gamma$, lo cual en conjunto, facilita la supervivencia bacteriana (Figura 36).

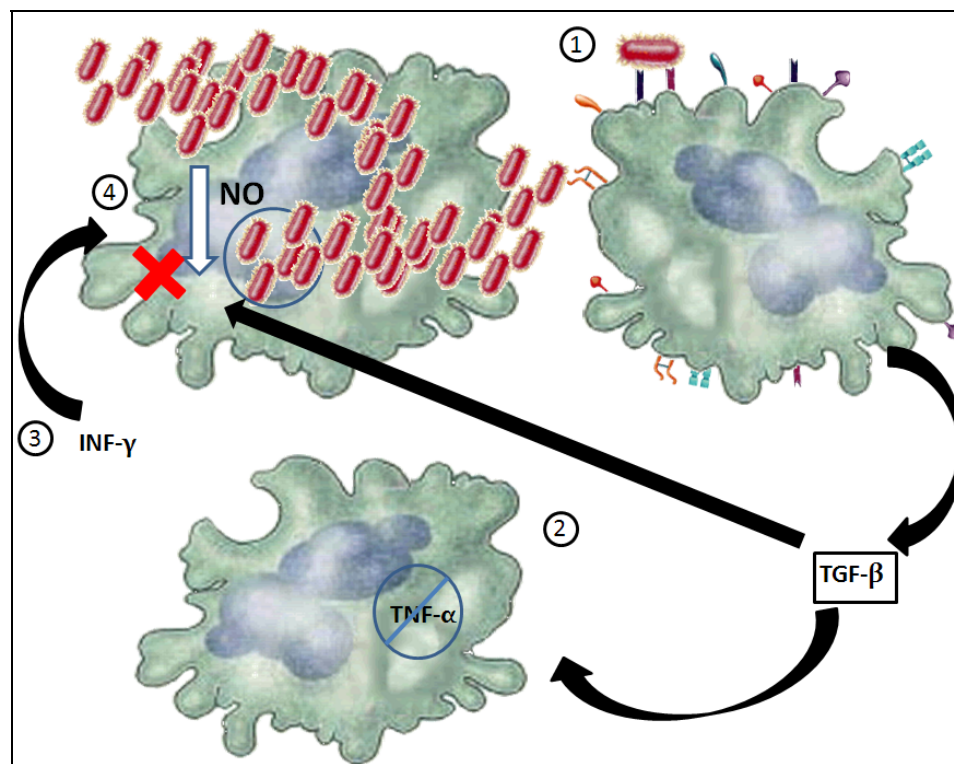


Figura 36: Modelo hipotético del mecanismo de inhibición de NO dependiente de $\text{INF-}\gamma$ por los lípidos de superficie de *N. brasiliensis*. 1) Los lípidos de superficie de *N. brasiliensis* inducen la producción de TGF- β en los macrófagos. En consecuencia, el TGF- β inhibe paracrinamente la producción de TNF- α en las células vecinas (2). La ausencia del sinergismo TNF- α - $\text{INF-}\gamma$ disminuye la producción de NO en los macrófagos (3), sin embargo, esta inhibición es aún más pronunciada debido a que el TGF- β inhibe la cascada de señalización del receptor del $\text{INF-}\gamma$ (4). En consecuencia, la inhibición del NO favorece la persistencia bacteriana.

Otro mecanismo de inactivación de macrófagos y de DC mediado por TGF- β es la disminución de la expresión de moléculas presentadoras de antígeno y co estimuladoras de linfocitos T [107]. En esencia nosotros pudimos observar que los lípidos de superficie de *N. brasiliensis* inhiben la expresión de MHC-II así como de moléculas co estimuladoras como CD80, CD86 y CD40 tanto en DC como en macrófagos. Este hallazgo se correlaciona con los hallazgos encontrados en otros microorganismos intracelulares entre los que destacan *Mycobacterium spp*, *Leishmania spp* y *Tripanosoma spp* en los que se ha encontrado una disminución en la expresión de MHC-II y moléculas co estimuladoras [115-117]. En ellos diversos determinantes químicos se han implicado en la inhibición de la expresión de MHC-II como la DMT y la 19 KDa de *M. tuberculosis* y los lipofosfoglicanos de *Leishmania spp* [96, 115, 118]. En estos microorganismos se han implicado varios mecanismos de inhibición de MHC-II, entre los que destacan la inducción de SOCS-3 [96] y la inactivación por desfosforilación de STAT1 y IRF1 así como la inactivación de CIITA [119-121]. Sin embargo, creemos que, al menos para nuestro modelo de infección con *N. brasiliensis*, la inducción de TGF- β puede explicar, al igual que con la inhibición de NO, la inhibición de MHC-II y moléculas co estimuladoras.

El TGF- β induce una inactivación en DC y macrófagos caracterizado por la reducción en la expresión de MHC-II y moléculas co-estimuladoras [122]. En DC se ha visto que el TGF- β induce un fenotipo inmaduro el cual está mediado por la inhibición en la transcripción del transactivador de clase II (CIITA) en un mecanismo dependiente de Smad3 [123]. De esta forma, el TGF- β inhibe la expresión de MHC-II en DC estimuladas con LPS, TNF- α e INF- γ . En macrófagos, el TGF- β inhibe la transcripción de CIITA dependiente de INF- γ por un mecanismo también dependiente de Smad3 [124].

La implicación de la disminución de MHC-II por *N. brasiliensis* consiste en una disminución en la activación de linfocitos T CD4. Ya que estas células tienen una participación crucial en la resistencia contra infecciones mediadas por microorganismos intracelulares, la disminución en la expresión de MHC-II inhibe la activación de linfocitos T necesaria para la contención de la infección. Así mismo la inhibición en la expresión de moléculas co estimuladoras afecta la respuesta inmune al reducir la eficacia con la que se genera la respuesta celular. Uno de los sistemas que mostró afectarse con mayor fuerza, fue el mecanismo CD40/CD40L. Se ha observado que este sistema es necesario para la inducción de iNOS al incrementar la producción de INF- γ en los linfocitos T [125]. Se ha observado que la alterarse la señalización vía CD40, se afecta in vivo la producción de iNOS en macrófagos de manera T dependiente. Es por esto que la reducción en la expresión de MHC-II así como de moléculas co estimuladoras resulta un mecanismo interesante de inhibición bacteriana por *N. brasiliensis* (Figura 37).

Al considerar que los lípidos de superficie inhiben la presentación de antígeno además del desarrollo de una respuesta Th1 mediante la inducción de TGF- β , podemos suponer que al retirar dicho estímulo se consigue despertar una respuesta inmune efectiva y protectora contra el actinomicetoma. Esta idea se probó mediante ensayos de protección con *N. brasiliensis* deslipidizada, en donde se observó que *N. brasiliensis* deslipidizada confiere protección parcial total contra el desarrollo del actinomicetoma experimental. Cabe recordar que en estos ensayos se probó una sola inmunización con 500 μg , dosis tal vez su óptima para el desarrollo de una respuesta inmune protectora efectiva. Adicionalmente la bacteria se relipidiza in vivo, por lo que resulta probable que, al reaparecer el estímulo inhibitorio, el desarrollo de la respuesta inmune protectora se merma.

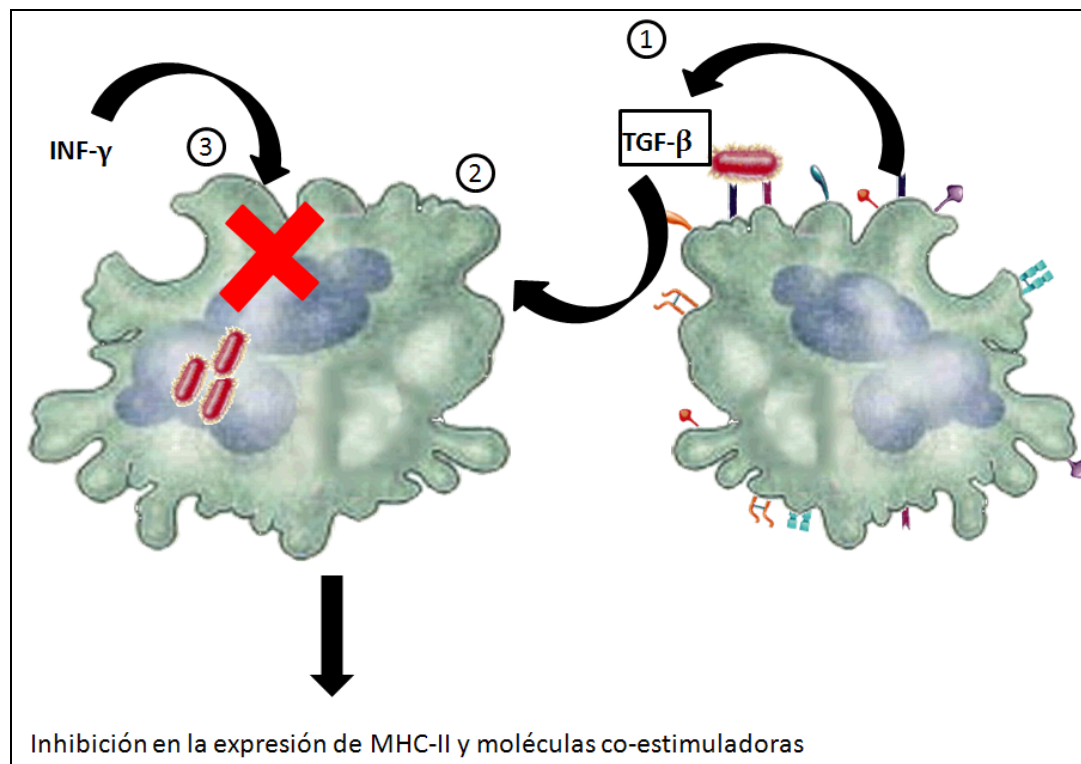


Figura 37: Modelo hipotético desarrollado para explicar el mecanismo de inhibición de la expresión de moléculas MHC-II y co-estimuladoras de linfocitos T por los lípidos de superficie de *N. brasiliensis*. 1) Los lípidos de superficie de *N. brasiliensis* inducen la producción de TGF- β por los macrófagos y DC's. En consecuencia, el TGF- β inhibe la cascada de señalización del receptor de INF- γ lo cual inhibe la expresión de moléculas MHC-II y co-estimuladoras de linfocitos T dependiente de INF- γ .

Es necesario por lo tanto desarrollar una cepa de *N. brasiliensis* genéticamente deslipidizada para lograr una estimulación constante de la respuesta inmune con fines vacunológicos. El presente trabajo aporta la noción de las características que dicha cepa debe tener, para poder entonces desarrollar estratégicamente una vacuna efectiva contra el actinomicetoma, basándose en el principio de deslipidización, dado que a partir de ahora se sabe la capacidad de los lípidos para suprimir la presentación de antígeno y la activación del macrófagos.

CAPÍTULO 6

CONCLUSIONES

- 1) Los lípidos de superficie de *N. brasiliensis* son fundamentales para el desarrollo del actinomicetoma experimental
- 2) Los lípidos de superficie de *N. brasiliensis* median el desarrollo del actinomicetoma principalmente a inducir la producción de los mediadores inflamatorios IL-1, IL-6 y CCL-2
- 3) Los lípidos de superficie de *N. brasiliensis* median la agregación bacteriana, fenómeno que participa en la virulencia de la bacteria al imposibilitar la fagocitosis por los macrófagos.
- 4) El principal lípido identificado fue un micolato altamente apolar de 663.4 *m/z*.
- 5) Los lípidos de superficie de *N. brasiliensis* inhiben la fagocitosis bacteriana por los macrófagos.
- 6) Los lípidos de superficie de *N. brasiliensis* inhiben la producción de NO dependiente de INF- γ al inducir la producción de TGF- β .
- 7) Los lípidos de superficie de *N. brasiliensis* inhiben la expresión de moléculas MHC-II y co-estimuladoras de linfocitos T dependiente de INF- γ al inducir la producción de TGF- β .
- 8) *N. brasiliensis* deslipidizada confiere protección parcial contra el desarrollo del actinomicetoma experimental.

REFERENCIAS

1. Welsh, O., L. Vera-Cabrera, and M.C. Salinas-Carmona, *Mycetoma*. Clin Dermatol, 2007. **25**(2): p. 195-202.
2. Brennan, P.J. and H. Nikaido, *The envelope of mycobacteria*. Annu Rev Biochem, 1995. **64**: p. 29-63.
3. Azuma, I., et al., *Occurrence of N-glycolylmuramic acid in bacterial cell walls. A preliminary survey*. Biochim Biophys Acta, 1970. **208**(3): p. 444-51.
4. Azuma, I., et al., *Partial chemical characterization of the cell wall of Nocardia asteroides strain 131*. Jpn J Microbiol, 1973. **17**(2): p. 154-9.
5. Beaman, B.L., A.L. Bourgeois, and S.E. Moring, *Cell wall modification resulting from in vitro induction of L-phase variants of Nocardia asteroides*. J Bacteriol, 1981. **148**(2): p. 600-9.
6. Beaman, B.L., *Structural and biochemical alterations of Nocardia asteroides cell walls during its growth cycle*. J Bacteriol, 1975. **123**(3): p. 1235-53.
7. Beaman, B.L. and S.E. Moring, *Relationship among cell wall composition, stage of growth, and virulence of Nocardia asteroides GUH-2*. Infect Immun, 1988. **56**(3): p. 557-63.
8. Cummins, C.S., *Chemical and antigenic studies on cell walls of mycobacteria, corynebacteria, and nocardias*. Am Rev Respir Dis, 1965. **92**(6): p. 63-72.
9. Beaman, B.L. and L. Bourgeois, *Variations in properties of Nocardia asteroides resulting from growth in the cell wall-deficient state*. J Clin Microbiol, 1981. **14**(5): p. 574-8.
10. Revol, A., et al., *Expression of Nocardia brasiliensis superoxide dismutase during the early infection of murine peritoneal macrophages*. Can J Microbiol, 2006. **52**(12): p. 1255-60.
11. Licon-Trillo, A., M. Angeles Castro-Corona, and M.C. Salinas-Carmona, *Immunogenicity and biophysical properties of a Nocardia brasiliensis protease involved in pathogenesis of mycetoma*. FEMS Immunol Med Microbiol, 2003. **37**(1): p. 37-44.

12. Beaman, L., M. Paliescheskey, and B.L. Beaman, *Acid phosphatase stimulation of the growth of Nocardia asteroides and its possible relationship to the modification of lysosomal enzymes in macrophages*. *Infect Immun*, 1988. **56**(6): p. 1652-4.
13. Black, C.M., et al., *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): p. 117-24.
14. Crowe, L.M., et al., *Interaction of cord factor (alpha, alpha'-trehalose-6,6'-dimycolate) with phospholipids*. *Biochim Biophys Acta*, 1994. **1194**(1): p. 53-60.
15. Spargo, B.J., et al., *Cord factor (alpha, alpha'-trehalose 6,6'-dimycolate) inhibits fusion between phospholipid vesicles*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991. **88**(3): p. 737-40.
16. Janeway, C.A., Jr., *Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology*. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 1989. **54 Pt 1**: p. 1-13.
17. Daffe, M. and P. Draper, *The envelope layers of mycobacteria with reference to their pathogenicity*. *Adv Microb Physiol*, 1998. **39**: p. 131-203.
18. Ortalo-Magne, A., et al., *Molecular composition of the outermost capsular material of the tubercle bacillus*. *Microbiology*, 1995. **141 (Pt 7)**: p. 1609-20.
19. Daffe, M., P.J. Brennan, and M. McNeil, *Predominant structural features of the cell wall arabinogalactan of Mycobacterium tuberculosis as revealed through characterization of oligoglycosyl alditol fragments by gas chromatography/mass spectrometry and by 1H and 13C NMR analyses*. *J Biol Chem*, 1990. **265**(12): p. 6734-43.
20. Silva, M.T. and P.M. Macedo, *Electron microscopic study of Mycobacterium leprae membrane*. *Int J Lepr Other Mycobact Dis*, 1983. **51**(2): p. 219-24.
21. Ortalo-Magne, A., et al., *Identification of the surface-exposed lipids on the cell envelopes of Mycobacterium tuberculosis and other mycobacterial species*. *J Bacteriol*, 1996. **178**(2): p. 456-61.
22. Asselineau, J. and E. Lederer, *Structure of the mycolic acids of Mycobacteria*. *Nature*, 1950. **166**(4227): p. 782-3.
23. George, K.M., et al., *The biosynthesis of cyclopropanated mycolic acids in Mycobacterium tuberculosis. Identification and functional analysis of CMAS-2*. *J Biol Chem*, 1995. **270**(45): p. 27292-8.
24. Yuan, Y., et al., *Identification of a gene involved in the biosynthesis of cyclopropanated mycolic acids in Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. **92**(14): p. 6630-4.

25. Barry, C.E., 3rd, et al., *Mycolic acids: structure, biosynthesis and physiological functions*. Prog Lipid Res, 1998. **37**(2-3): p. 143-79.
26. Brennan, P.J., *Structure, function, and biogenesis of the cell wall of Mycobacterium tuberculosis*. Tuberculosis (Edinb), 2003. **83**(1-3): p. 91-7.
27. Khoo, K.H., et al., *Structural definition of acylated phosphatidylinositol mannosides from Mycobacterium tuberculosis: definition of a common anchor for lipomannan and lipoarabinomannan*. Glycobiology, 1995. **5**(1): p. 117-27.
28. Besra, G.S., et al., *Structural elucidation of a novel family of acyltrehaloses from Mycobacterium tuberculosis*. Biochemistry, 1992. **31**(40): p. 9832-7.
29. Daffe, M., et al., *Polyphthienoyl trehalose, glycolipids specific for virulent strains of the tubercle bacillus*. Eur J Biochem, 1988. **172**(3): p. 579-84.
30. Goren, M.B., *Mycobacterial sulfolipids: spontaneous desulfation*. Lipids, 1971. **6**(1): p. 40-6.
31. Onwueme, K.C., et al., *The dimycocerosate ester polyketide virulence factors of mycobacteria*. Prog Lipid Res, 2005. **44**(5): p. 259-302.
32. Reed, M.B., et al., *A glycolipid of hypervirulent tuberculosis strains that inhibits the innate immune response*. Nature, 2004. **431**(7004): p. 84-7.
33. Manca, C., et al., *Differential monocyte activation underlies strain-specific Mycobacterium tuberculosis pathogenesis*. Infect Immun, 2004. **72**(9): p. 5511-4.
34. Rousseau, C., et al., *Production of phthiocerol dimycocerosates protects Mycobacterium tuberculosis from the cidal activity of reactive nitrogen intermediates produced by macrophages and modulates the early immune response to infection*. Cell Microbiol, 2004. **6**(3): p. 277-87.
35. Malik, Z.A., et al., *Cutting edge: Mycobacterium tuberculosis blocks Ca²⁺ signaling and phagosome maturation in human macrophages via specific inhibition of sphingosine kinase*. J Immunol, 2003. **170**(6): p. 2811-5.
36. Malik, Z.A., G.M. Denning, and D.J. Kusner, *Inhibition of Ca(2+) signaling by Mycobacterium tuberculosis is associated with reduced phagosome-lysosome fusion and increased survival within human macrophages*. J Exp Med, 2000. **191**(2): p. 287-302.
37. Malik, Z.A., S.S. Iyer, and D.J. Kusner, *Mycobacterium tuberculosis phagosomes exhibit altered calmodulin-dependent signal transduction: contribution to inhibition of phagosome-lysosome fusion and intracellular survival in human macrophages*. J Immunol, 2001. **166**(5): p. 3392-401.

38. Vergne, I., et al., *Mechanism of phagolysosome biogenesis block by viable Mycobacterium tuberculosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(11): p. 4033-8.
39. Bloch, H., E. Sorkin, and H. Erlenmeyer, *A toxic lipid component of the tubercle bacillus (cord factor). I. Isolation from petroleum ether extracts of young bacterial cultures*. Am Rev Tuberc, 1953. **67**(5): p. 629-43.
40. Silva, C.L., S.M. Ekizlerian, and R.A. Fazioli, *Role of cord factor in the modulation of infection caused by mycobacteria*. Am J Pathol, 1985. **118**(2): p. 238-47.
41. Noll, H. and H. Bloch, *Studies on the chemistry of the cord factor of Mycobacterium tuberculosis*. J Biol Chem, 1955. **214**(1): p. 251-65.
42. Indrigo, J., R.L. Hunter, Jr., and J.K. Actor, *Influence of trehalose 6,6'-dimycolate (TDM) during mycobacterial infection of bone marrow macrophages*. Microbiology, 2002. **148**(Pt 7): p. 1991-8.
43. Indrigo, J., R.L. Hunter, Jr., and J.K. Actor, *Cord factor trehalose 6,6'-dimycolate (TDM) mediates trafficking events during mycobacterial infection of murine macrophages*. Microbiology, 2003. **149**(Pt 8): p. 2049-59.
44. Hunter, R.L., et al., *Trehalose 6,6'-dimycolate and lipid in the pathogenesis of caseating granulomas of tuberculosis in mice*. Am J Pathol, 2006. **168**(4): p. 1249-61.
45. Hunter, R.L., C. Jagannath, and J.K. Actor, *Pathology of postprimary tuberculosis in humans and mice: contradiction of long-held beliefs*. Tuberculosis (Edinb), 2007. **87**(4): p. 267-78.
46. Hunter, R.L., et al., *Multiple roles of cord factor in the pathogenesis of primary, secondary, and cavitory tuberculosis, including a revised description of the pathology of secondary disease*. Ann Clin Lab Sci, 2006. **36**(4): p. 371-86.
47. Actor, J.K., et al., *Dysregulated response to mycobacterial cord factor trehalose-6,6'-dimycolate in CD1D^{-/-} mice*. J Interferon Cytokine Res, 2001. **21**(12): p. 1089-96.
48. Guidry, T.V., et al., *Failure of CD1D^{-/-} mice to elicit hypersensitive granulomas to mycobacterial cord factor trehalose 6,6'-dimycolate*. J Interferon Cytokine Res, 2004. **24**(6): p. 362-71.
49. Copenhaver, R.H., et al., *A mutant of Mycobacterium tuberculosis H37Rv that lacks expression of antigen 85A is attenuated in mice but retains vaccinogenic potential*. Infect Immun, 2004. **72**(12): p. 7084-95.

50. Katti, M.K., et al., *The Delta fbpA mutant derived from Mycobacterium tuberculosis H37Rv has an enhanced susceptibility to intracellular antimicrobial oxidative mechanisms, undergoes limited phagosome maturation and activates macrophages and dendritic cells.* Cell Microbiol, 2008. **10**(6): p. 1286-303.
51. Rao, V., et al., *Mycobacterium tuberculosis controls host innate immune activation through cyclopropane modification of a glycolipid effector molecule.* J Exp Med, 2005. **201**(4): p. 535-43.
52. Rao, V., et al., *Trans-cyclopropanation of mycolic acids on trehalose dimycolate suppresses Mycobacterium tuberculosis -induced inflammation and virulence.* J Clin Invest, 2006. **116**(6): p. 1660-7.
53. Ionedá, T., et al., *Composition and toxicity of diethyl ether soluble lipids from Nocardia asteroides GUH-2 and Nocardia asteroides 10905.* Chem Phys Lipids, 1993. **65**(3): p. 171-8.
54. Beaman, B.L., S.E. Moring, and T. Ionedá, *Effect of growth stage on mycolic acid structure in cell walls of Nocardia asteroides GUH-2.* J Bacteriol, 1988. **170**(3): p. 1137-42.
55. Solis-Soto, J.M., et al., *In situ detection and distribution of inflammatory cytokines during the course of infection with Nocardia brasiliensis.* Histol Histopathol, 2008. **23**(5): p. 573-81.
56. Noll, H., et al., *The chemical structure of the cord factor of Mycobacterium tuberculosis.* Biochim Biophys Acta, 1956. **20**(2): p. 299-309.
57. Bloch, H., et al., *Constituents of a toxic-lipid obtained from Mycobacterium tuberculosis.* Biochim Biophys Acta, 1957. **23**(2): p. 312-21.
58. Bloch, H., *A component of tubercle bacilli concerned with their virulence.* Bull N Y Acad Med, 1950. **26**(7): p. 506-7.
59. Bloch, H., *Studies on the virulence of tubercle bacilli; the relationship of the physiological state of the organisms to their pathogenicity.* J Exp Med, 1950. **92**(6): p. 507-26.
60. Silva, C.L., et al., *Cord factor is associated with the maintenance of the chronic inflammatory reaction caused by mycobacteria.* J Gen Microbiol, 1986. **132**(8): p. 2161-5.
61. Silva, C.L. and N.T. Foss, *Inflammation induced by a glycolipid fraction from Mycobacterium leprae.* Braz J Med Biol Res, 1989. **22**(3): p. 327-39.

62. Glickman, M.S., *The mmaA2 gene of Mycobacterium tuberculosis encodes the distal cyclopropane synthase of the alpha-mycolic acid*. J Biol Chem, 2003. **278**(10): p. 7844-9.
63. Glickman, M.S., J.S. Cox, and W.R. Jacobs, Jr., *A novel mycolic acid cyclopropane synthetase is required for cording, persistence, and virulence of Mycobacterium tuberculosis*. Mol Cell, 2000. **5**(4): p. 717-27.
64. Walters, S.B., et al., *The Mycobacterium tuberculosis PhoPR two-component system regulates genes essential for virulence and complex lipid biosynthesis*. Mol Microbiol, 2006. **60**(2): p. 312-30.
65. Bhatt, A., et al., *Deletion of kasB in Mycobacterium tuberculosis causes loss of acid-fastness and subclinical latent tuberculosis in immunocompetent mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(12): p. 5157-62.
66. Schaeffer, M.L., et al., *Purification and biochemical characterization of the Mycobacterium tuberculosis beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthases KasA and KasB*. J Biol Chem, 2001. **276**(50): p. 47029-37.
67. Daheshia, M. and J.Q. Yao, *The interleukin 1beta pathway in the pathogenesis of osteoarthritis*. J Rheumatol, 2008. **35**(12): p. 2306-12.
68. Karlmark, K.R., et al., *Chemokine-directed immune cell infiltration in acute and chronic liver disease*. Expert Rev Gastroenterol Hepatol, 2008. **2**(2): p. 233-42.
69. Wallis, R.S., *Reactivation of latent tuberculosis by TNF blockade: the role of interferon gamma*. J Investig Dermatol Symp Proc, 2007. **12**(1): p. 16-21.
70. Jacobs, M., et al., *Reactivation of tuberculosis by tumor necrosis factor neutralization*. Eur Cytokine Netw, 2007. **18**(1): p. 5-13.
71. Jacobs, M., et al., *Tumor necrosis factor is critical to control tuberculosis infection*. Microbes Infect, 2007. **9**(5): p. 623-8.
72. Wallis, R.S., *Mycobacterial disease attributable to tumor necrosis factor-alpha blockers*. Clin Infect Dis, 2008. **47**(12): p. 1603-5; author reply 1605-6.
73. Tsenova, L., et al., *Virulence of selected Mycobacterium tuberculosis clinical isolates in the rabbit model of meningitis is dependent on phenolic glycolipid produced by the bacilli*. J Infect Dis, 2005. **192**(1): p. 98-106.
74. Taylor, A.W., *Review of the activation of TGF-beta in immunity*. J Leukoc Biol, 2009. **85**(1): p. 29-33.

75. Nakamura, K., et al., *TGF-beta 1 plays an important role in the mechanism of CD4+CD25+ regulatory T cell activity in both humans and mice*. J Immunol, 2004. **172**(2): p. 834-42.
76. O'Garra, A. and N. Arai, *The molecular basis of T helper 1 and T helper 2 cell differentiation*. Trends Cell Biol, 2000. **10**(12): p. 542-50.
77. Bowen, H., et al., *Control of cytokine gene transcription in Th1 and Th2 cells*. Clin Exp Allergy, 2008. **38**(9): p. 1422-31.
78. Murphy, K.M. and S.L. Reiner, *The lineage decisions of helper T cells*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(12): p. 933-44.
79. Horwitz, D.A., S.G. Zheng, and J.D. Gray, *Natural and TGF-beta-induced Foxp3(+)/CD4(+)/CD25(+) regulatory T cells are not mirror images of each other*. Trends Immunol, 2008. **29**(9): p. 429-35.
80. Flannagan, R.S., G. Cosio, and S. Grinstein, *Antimicrobial mechanisms of phagocytes and bacterial evasion strategies*. Nat Rev Microbiol, 2009. **7**(5): p. 355-66.
81. MacMicking, J., Q.W. Xie, and C. Nathan, *Nitric oxide and macrophage function*. Annu Rev Immunol, 1997. **15**: p. 323-50.
82. Kaufmann, S.H. and U.E. Schaible, *Antigen presentation and recognition in bacterial infections*. Curr Opin Immunol, 2005. **17**(1): p. 79-87.
83. Chan, J., et al., *Killing of virulent Mycobacterium tuberculosis by reactive nitrogen intermediates produced by activated murine macrophages*. J Exp Med, 1992. **175**(4): p. 1111-22.
84. Green, S.J., et al., *Nitric oxide: cytokine-regulation of nitric oxide in host resistance to intracellular pathogens*. Immunol Lett, 1994. **43**(1-2): p. 87-94.
85. Green, S.J., et al., *Leishmania major amastigotes initiate the L-arginine-dependent killing mechanism in IFN-gamma-stimulated macrophages by induction of tumor necrosis factor-alpha*. J Immunol, 1990. **145**(12): p. 4290-7.
86. Nathan, C. and M.U. Shiloh, *Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(16): p. 8841-8.
87. Ding, A., et al., *Macrophage deactivating factor and transforming growth factors-beta 1 -beta 2 and -beta 3 inhibit induction of macrophage nitrogen oxide synthesis by IFN-gamma*. J Immunol, 1990. **145**(3): p. 940-4.

88. Proudfoot, L., et al., *Regulation of the expression of nitric oxide synthase and leishmanicidal activity by glycoconjugates of Leishmania lipophosphoglycan in murine macrophages*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(20): p. 10984-9.
89. Proudfoot, L., C.A. O'Donnell, and F.Y. Liew, *Glycoinositolphospholipids of Leishmania major inhibit nitric oxide synthesis and reduce leishmanicidal activity in murine macrophages*. Eur J Immunol, 1995. **25**(3): p. 745-50.
90. Doz, E., et al., *Acylation determines the toll-like receptor (TLR)-dependent positive versus TLR2-, mannose receptor-, and SIGNRI-independent negative regulation of pro-inflammatory cytokines by mycobacterial lipomannan*. J Biol Chem, 2007. **282**(36): p. 26014-25.
91. Blanchette, J., et al., *Leishmania-induced increases in activation of macrophage SHP-1 tyrosine phosphatase are associated with impaired IFN-gamma-triggered JAK2 activation*. Eur J Immunol, 1999. **29**(11): p. 3737-44.
92. Olivier, M., et al., *Modulation of interferon-gamma-induced macrophage activation by phosphotyrosine phosphatases inhibition. Effect on murine Leishmaniasis progression*. J Biol Chem, 1998. **273**(22): p. 13944-9.
93. Nandan, D. and N.E. Reiner, *Attenuation of gamma interferon-induced tyrosine phosphorylation in mononuclear phagocytes infected with Leishmania donovani: selective inhibition of signaling through Janus kinases and Stat1*. Infect Immun, 1995. **63**(11): p. 4495-500.
94. Kamijo, R., et al., *Requirement for transcription factor IRF-1 in NO synthase induction in macrophages*. Science, 1994. **263**(5153): p. 1612-5.
95. Kamijo, R., et al., *Generation of nitric oxide and clearance of interferon-gamma after BCG infection are impaired in mice that lack the interferon-gamma receptor*. J Inflamm, 1995. **46**(1): p. 23-31.
96. Kan-Sutton, C., C. Jagannath, and R.L. Hunter, Jr., *Trehalose 6,6'-dimycolate on the surface of Mycobacterium tuberculosis modulates surface marker expression for antigen presentation and costimulation in murine macrophages*. Microbes Infect, 2009. **11**(1): p. 40-8.
97. Bertholet, S., et al., *Leishmania donovani-induced expression of suppressor of cytokine signaling 3 in human macrophages: a novel mechanism for intracellular parasite suppression of activation*. Infect Immun, 2003. **71**(4): p. 2095-101.
98. Matsumoto, A., et al., *CIS, a cytokine inducible SH2 protein, is a target of the JAK-STAT5 pathway and modulates STAT5 activation*. Blood, 1997. **89**(9): p. 3148-54.

99. Green, S.J., C.A. Nacy, and M.S. Meltzer, *Cytokine-induced synthesis of nitrogen oxides in macrophages: a protective host response to Leishmania and other intracellular pathogens*. *J Leukoc Biol*, 1991. **50**(1): p. 93-103.
100. Drapier, J.C., J. Wietzerbin, and J.B. Hibbs, Jr., *Interferon-gamma and tumor necrosis factor induce the L-arginine-dependent cytotoxic effector mechanism in murine macrophages*. *Eur J Immunol*, 1988. **18**(10): p. 1587-92.
101. Cox, G.W., et al., *Tumor necrosis factor-alpha-dependent production of reactive nitrogen intermediates mediates IFN-gamma plus IL-2-induced murine macrophage tumoricidal activity*. *J Immunol*, 1992. **149**(10): p. 3290-6.
102. Silva, J.S., D.R. Twardzik, and S.G. Reed, *Regulation of Trypanosoma cruzi infections in vitro and in vivo by transforming growth factor beta (TGF-beta)*. *J Exp Med*, 1991. **174**(3): p. 539-45.
103. Langermans, J.A., et al., *Transforming growth factor-beta suppresses interferon-gamma-induced toxoplasmastatic activity in murine macrophages by inhibition of tumour necrosis factor-alpha production*. *Parasite Immunol*, 2001. **23**(4): p. 169-75.
104. Dahl, K.E., et al., *Selective induction of transforming growth factor beta in human monocytes by lipoarabinomannan of Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun*, 1996. **64**(2): p. 399-405.
105. Zhang, Y., et al., *Mechanisms of stimulation of interleukin-1 beta and tumor necrosis factor-alpha by Mycobacterium tuberculosis components*. *J Clin Invest*, 1993. **91**(5): p. 2076-83.
106. Nelson, B.J., et al., *Differential susceptibility of activated macrophage cytotoxic effector reactions to the suppressive effects of transforming growth factor-beta 1*. *J Immunol*, 1991. **146**(6): p. 1849-57.
107. Li, M.O., et al., *Transforming growth factor-beta regulation of immune responses*. *Annu Rev Immunol*, 2006. **24**: p. 99-146.
108. Tsunawaki, S., et al., *Deactivation of macrophages by transforming growth factor-beta*. *Nature*, 1988. **334**(6179): p. 260-2.
109. Chantry, D., et al., *Modulation of cytokine production by transforming growth factor-beta*. *J Immunol*, 1989. **142**(12): p. 4295-300.
110. Musso, T., et al., *Transforming growth factor beta downregulates interleukin-1 (IL-1)-induced IL-6 production by human monocytes*. *Blood*, 1990. **76**(12): p. 2466-9.
111. Bogdan, C., et al., *Contrasting mechanisms for suppression of macrophage cytokine release by transforming growth factor-beta and interleukin-10*. *J Biol Chem*, 1992. **267**(32): p. 23301-8.

112. Kaye, P.M. and G.J. Bancroft, *Leishmania donovani* infection in scid mice: lack of tissue response and in vivo macrophage activation correlates with failure to trigger natural killer cell-derived gamma interferon production in vitro. *Infect Immun*, 1992. **60**(10): p. 4335-42.
113. Bellone, G., et al., *Regulation of NK cell functions by TGF-beta 1*. *J Immunol*, 1995. **155**(3): p. 1066-73.
114. Hunter, C.A., et al., *Transforming growth factor-beta inhibits interleukin-12-induced production of interferon-gamma by natural killer cells: a role for transforming growth factor-beta in the regulation of T cell-independent resistance to Toxoplasma gondii*. *Eur J Immunol*, 1995. **25**(4): p. 994-1000.
115. Olivier, M., D.J. Gregory, and G. Forget, *Subversion mechanisms by which Leishmania parasites can escape the host immune response: a signaling point of view*. *Clinical Microbiology Reviews*, 2005. **18**(2): p. 293-+.
116. Fulton, S.A., et al., *Inhibition of major histocompatibility complex II expression and antigen processing in murine alveolar macrophages by Mycobacterium bovis BCG and the 19-kilodalton mycobacterial lipoprotein*. *Infection and Immunity*, 2004. **72**(4): p. 2101-2110.
117. De Almeida, M.C., S.A. Cardoso, and M. Barral-Netto, *Leishmania (Leishmania) chagasi* infection alters the expression of cell adhesion and costimulatory molecules on human monocyte and macrophage. *International Journal for Parasitology*, 2003. **33**(2): p. 153-162.
118. Gehring, A.J., et al., *The Mycobacterium tuberculosis 19-kilodalton lipoprotein inhibits gamma interferon-regulated HLA-DR and Fc gamma R1 on human macrophages through toll-like receptor 2*. *Infection and Immunity*, 2003. **71**(8): p. 4487-4497.
119. Pennini, M.E., et al., *Mycobacterium tuberculosis (Mtb) 19-kDa lipoprotein inhibits IFN-gamma-induced chromatin remodeling at CIITA promoter IV by TLR2- and MAPK-dependent signaling*. *Journal of Leukocyte Biology*, 2005: p. 21-22.
120. Pennini, M.E., et al., *CCAAT/enhancer-binding protein beta and delta binding to CIITA promoters is associated with the inhibition of CIITA expression in response to Mycobacterium tuberculosis 19-kDa lipoprotein*. *Journal of Immunology*, 2007. **179**(10): p. 6910-6918.
121. Pennini, M.E., et al., *Mycobacterium tuberculosis 19-kDa lipoprotein inhibits IFN-gamma-induced chromatin remodeling of MHC2TA by TLR2 and MAPK signaling*. *Journal of Immunology*, 2006. **176**(7): p. 4323-4330.

122. Geissmann, F., et al., *TGF-beta 1 prevents the noncognate maturation of human dendritic Langerhans cells*. J Immunol, 1999. **162**(8): p. 4567-75.
123. Dong, Y., et al., *The Smad3 protein is involved in TGF-beta inhibition of class II transactivator and class II MHC expression*. J Immunol, 2001. **167**(1): p. 311-9.
124. Nandan, D. and N.E. Reiner, *TGF-beta attenuates the class II transactivator and reveals an accessory pathway of IFN-gamma action*. J Immunol, 1997. **158**(3): p. 1095-101.
125. Soong, L., et al., *Disruption of CD40-CD40 ligand interactions results in an enhanced susceptibility to Leishmania amazonensis infection*. Immunity, 1996. **4**(3): p. 263-73.