

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA



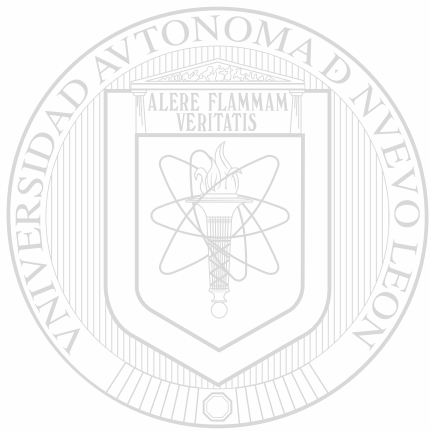
EFECTO DE MEDIADORES INMUNOLOGICOS EN LA
PRODUCCION DE CITOCINAS POR MACROFAGOS
INFECTADOS CON *Nocardia brasiliensis*

Por

M. en C. JUAN MANUEL ZUÑIGA DE JESUS

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

Octubre 2004



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

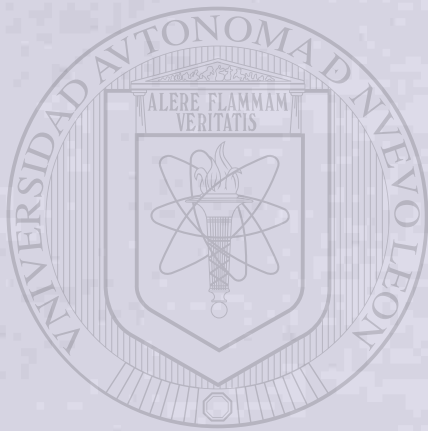
UNL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

TD
QR185
.8
.M3
Z8
2004
c.1



1080118369



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

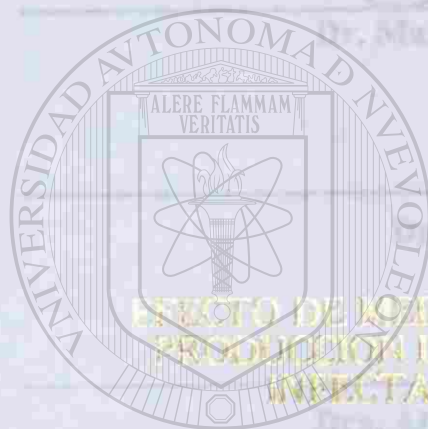
®

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA

PRODUCCIÓN DE CITOCINAS POR MACRÓFAGOS

INFECTADOS CON *Mycobacterium tuberculosis*

Aprobación de Tesis:



EFEECTO DE MEDIADORES INMUNOLÓGICOS EN LA
PRODUCCIÓN DE CITOCINAS POR MACRÓFAGOS
INFECTADOS CON *Mycobacterium tuberculosis*

UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Por



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

M. en C. IDAN MANUEL ESTEBAN DE JESÚS

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

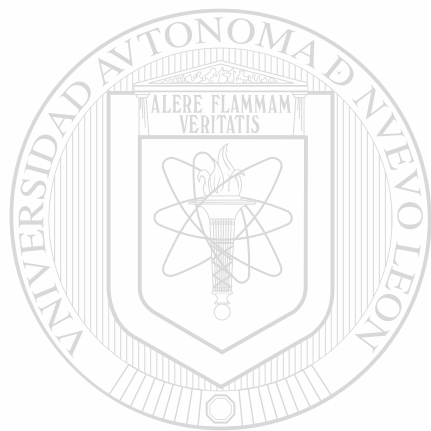
Dr. Dionicio A. Gutarra Delgado

Subdirector de Investigación y Estudios de Posgrado

Octubre 2004



TD
QR 185
. 8
. M3
Z8
2004



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



**EFFECTO DE MEDIADORES INMUNOLÓGICOS EN LA
PRODUCCIÓN DE CITOCINAS POR MACRÓFAGOS
INFECTADOS CON *Nocardia brasiliensis***

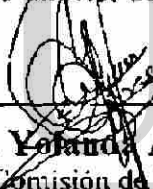
Aprobación de Tesis:



Dr. Mario César Salinas Carmona
Director de Tesis



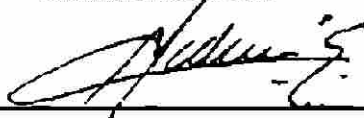
Dra. Iris Estrada García
Co-director de Tesis



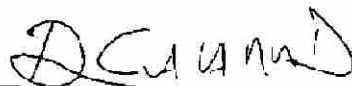
Dra. Alma Yolanda Arce Mendoza
Comisión de Tesis



Dra. Agnes Revol de Mendoza
Comisión de Tesis



Dr. Carlos E. Medina de la Garza
Comisión de Tesis



Dr. Dionicio A. Galarza Delgado
Subdirector de Investigación y Estudios de Postgrado

LUGAR DE TRABAJO

Este trabajo se realizó en el Departamento de *Inmunología* de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León y en el Laboratorio de *Inmunología* del Instituto Politécnico Nacional de la Ciudad de México, bajo la dirección del Dr. Mario César Salinas Carmona y co-dirección de la Dra. Iris Estrada García.

Se agradece el financiamiento otorgado para la realización de este proyecto a las siguientes instituciones:

PAICYT UANL Proyecto SA 593-01

PAICYT UANL Proyecto SA 668-02

Finalmente expreso agradecimientos a CONACYT por la beca-crédito[®] otorgada, así como a la Facultad de Medicina por todo su valioso apoyo.

DEDICATORIA

Este es tan sólo un ínfimo tributo de amor paterno para ti Tea, por darme día y noche esa fuerza espiritual y perseverancia para construir mis sueños y sobreponerme a las adversidades.



A Milena Avonedro, porque enriqueciste mi mundo con tus maravillosos escritos y esa semilla espiritual que crece en mí.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Con amor para mi bebita Milena Andrea, quien en honor a su predecesora de nombre, desde muy temprana edad muestra ya su firmeza de carácter e inconformidad contra lo establecido.

AGRADECIMIENTOS

A mi madre Ana María de Jesús Briones por su infinito amor materno y fe en mi capacidad para llevar a cabo mis metas; a mi hermana Ma. Margarita Zúñiga de Jesús por su incondicional e infinito apoyo y confidencialidad otorgados a mi persona y sin los cuales mi vida cotidiana y académica nunca hubieran adquirido la seguridad que ahora les caracteriza.

Gracias al Dr. Mario César Salinas Carmona por su dirección, consejos y, no en último lugar, por permitirme expresar mi propio estilo y opinión en la escritura de la tesis.

Mi gratitud a la Dra. Iris Estrada por ser una excelente maestra y co-directora; más aún, le estoy agradecido por haber sido afortunado de robarle un poquito de su afable y jovial atención que tanto la caracteriza!!!

Mi amor sincero a mi compañera Jacqueline Cadena Sarmiento por todo el apoyo invaluable para concluir este trabajo, y también por su estoicismo mostrado frente a mi difícil carácter en los momentos más críticos (que no fueron pocos!)

Agradezco mucho a las personas que me alentaron en forma sincera durante mi recorrido hacia el Doctorado. Mi humilde, pero enorme gratitud para el Q.B.P. Andrés Mendiola y el MC Adrián Rosas, quienes fueron un gran apoyo moral, logístico y "estadístico" para la elaboración de esta tesis. Gracias sinceras a Francisco Moreno Esparza, por su calor humano mostrado en todo momento hacia mi persona.

Expreso a la Dra. Herminia Martínez Rodríguez, secretaria académica de Subdirección y Estudios de Postgrado de la Facultad de Medicina, mi más sincero y profundo agradecimiento por sus consejos, apoyo humano y académico que fui afortunado en recibir en momentos complicados y decisivos, brindándome una gran bocanada de aliento positivo y fe.

Mi gratitud completa para Sergio y Diana Cárdenas Cadena por su apoyo[®] "pedagógico", sin el cual no hubiera logrado concluir este trabajo.

Un agradecimiento muy especial al Profesor Cesáreo Guzmán Flores, quien a mi llegada a México en 1998 era director de la Facultad de Agronomía de la UANL y brindó su apoyo y confianza a un desconocido búlgaro-mexicano; gracias por sus palabras de aliento y amistad sincera. Desde luego, mi reconocimiento a la intervención casi "divina" de mi hermano Gustavo Zúñiga para lograr establecer contacto con Cesáreo!!!

Gracias a los miembros de mi comisión de tesis, maestros, y compañeros de Postgrado que, a través de sus consejos y críticas constructivas, contribuyeron a mejorar la calidad de mi trabajo.

Pido disculpas por no mencionarlos personalmente a cada uno, pero Ustedes saben muy bien que son tantas personas a las que debo un "granito" de este enorme trabajo físico, anímico y aún moral por la convicción de llevar a su término "algo" que no sólo deseaba tanto hacer, sino que también sentía poder realizarlo con calidad. Espero no haberlos defraudado!!!

ÍNDICE

CONTENIDO	PÁGINA
Portada	I
Aprobación de tesis	II
Lugar de trabajo	III
Dedicatoria	IV
Agradecimientos	V
Índice de contenido	VI
Índice de figuras	IX
Índice de tablas	XI
Abreviaturas y simbología	XII
Resumen	XVI
1. ANTECEDENTES	1
1.1 Unicelularidad o Multicelularidad ~ lucha y unidad dialéctica de contrarios	1
1.2 Respuesta inmune innata y adquirida	3
1.3 Heterogeneidad y renovación de macrófagos	4
1.4 Moléculas CD y TLR	5
1.5 Fagocitosis	7
1.6 Rutas de internación de partículas	7
1.6.1 Vías de internación de Mtb en macrófagos	8
1.6.2 Vías de entrada de otros microparásitos intracelulares	9
1.7 Adhesión	10
1.8 Receptores para el componente Fc de la inmunoglobulina G	10
1.8.1 FcγRs activadores	11
1.8.2 FcγRs inhibidores	12
1.9 Inmunoglobulinas intravenosas	13
1.10 Maduración del fagosoma	15
1.11 Inhibición de la maduración fagolisosomal	15
1.12 Citocinas	17
1.13 Citocinas proinflamatorias	19
1.13.1 Interleucina-1	20
1.13.2 Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF-α)	21
1.14 Citocinas anti-inflamatorias	23
Interleucina-10	23
1.15 Granulomas	24
1.15.1 Formación de granulomas – un fenómeno multifactorial	26
A. Factor cuerda	26
B. IFN-γ	27
C. IL-10	27
D. Células T	28
1.16 Macrófagos activados en forma alternativa	28
1.17 <i>Nocardia brasiliensis</i>	32
1.18 Hipótesis	37

1.19	Objetivo General	37
1.20	Objetivos Específicos	37
2.	MATERIAL Y MÉTODOS	38
2.1	Estrategia general	38
2.2	Ratones	38
2.3	Preparación de las dosis infectantes de <i>N. brasiliensis</i> HUJEG-1 en diferentes etapas de crecimiento	38
2.3.1	<i>Nocardia brasiliensis</i> en etapa de crecimiento logarítmica	40
2.3.2	<i>Nocardia brasiliensis</i> en etapa de crecimiento estacionaria	40
2.4	Reto/infección de macrófagos	40
2.4.1	Obtención, purificación de macrófagos peritoneales no inducidos y su infección con <i>N. brasiliensis</i>	40
2.4.2	Viabilidad celular	41
2.4.3	Tinción de esterasa no específica y fagocitosis	41
2.4.4	Enfrentamiento entre nocardias opsonizadas y macrófagos	42
2.4.4.1	Nocardias opsonizadas con anticuerpos policlonales anti- <i>N. brasiliensis</i>	42
2.4.4.2	Nocardias opsonizadas con anticuerpos monoclonales anti-P61	42
2.4.5	Pretratamiento de macrófagos con anticuerpos policlonales anti- <i>N. brasiliensis</i>	43
2.5	Electroforesis en condiciones nativas, sin SDS ni β -ME, del extracto celular de <i>N. brasiliensis</i>	43
2.6	Tinción de Coomassie	44
2.7	Inmunoelctrotransferencia (IET) del extracto celular crudo de <i>N. brasiliensis</i> y revelado con sobrenadante de hibridomas o suero anti- <i>Nocardia</i>	44
2.8	Muestreo de cultivos macrofágicos	45
2.9	Reacción de Transcripción Reversa con Reacción en Cadena de Polimerasa (RT-PCR)	45
2.10	Análisis estadístico	46
3.	RESULTADOS	47
3.1	Reto de macrófagos con <i>N. brasiliensis</i>	54
3.1.1	IL-12	54
3.1.2	IFN- γ	68
3.1.3	TNF- α	69
3.1.4	IL-10	71
3.1.5	IL-1	73
3.2	Efecto de anticuerpo monoclonales y policlonales anti- <i>Nocardia</i> sobre la producción de citocinas macrofágicas	74
3.2.1	Pretratamiento de macrófagos con anticuerpos policlonales anti- <i>Nocardia</i>	74
3.2.2	<i>N. brasiliensis</i> opsonizada con anticuerpos monoclonales anti-P61	83
3.2.3	<i>N. brasiliensis</i> opsonizada con anticuerpos policlonales anti- <i>Nocardia</i>	87

4. DISCUSIÓN	91
4.1 Fase virulenta y avirulenta de microorganismos	91
4.2 Efectos de la dosis bacteriana	92
4.3 Tiempos cortos de experimentación	93
4.4 IL-12 e IFN- γ	96
4.5 TNF- α	101
4.6 IL-1 β	108
4.7 IL-10	110
4.8 Efecto de anticuerpos anti- <i>Nocardia brasiliensis</i> sobre la producción de citocinas macrofágicas	116
5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	123
5.1 Conclusiones	124
5.2 Perspectivas	125
TABLAS	126
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	131
APÉNDICES	154
APÉNDICE A.- Técnicas	154
APÉNDICE B.- Evaluación estadística de M ϕ s no infectados vs células infectadas con nocardias en fase exponencial o estacionaria	158
APÉNDICE C.- Evaluación estadística de M ϕ s infectados con diferentes dosis de <i>N. brasiliensis</i>	159
APÉNDICE D.- Evaluación estadística de M ϕ s infectados con nocardias en fase log vs estacionaria	160
APÉNDICE E.- Evaluación estadística de M ϕ s pretratados con anticuerpos anti- <i>Nocardia</i>	161

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Unidad de fenómenos biológicos a través de la aplicación de algoritmos comunes.....	2
2. Algunos fenómenos biológicos en los que intervienen citocinas como moléculas reguladoras decisivas.....	18
3. Competencia entre las enzimas Sintasa de Oxido Nítrico y Arginasa en el metabolismo de L-arginina.....	29
4. Estrategia general experimental.....	39
5. Macrófagos peritoneales no inducidos cultivados <i>in vitro</i> en ausencia de suero. Microscopía de luz con contraste de fase.....	47
6. Prueba de funcionalidad fagocítica de macrófagos peritoneales no inducidos. Microscopía de luz con contraste de fase.....	48
7. Positividad de macrófagos peritoneales para tinción de esterasa no específica. Microscopía de luz.....	49
8. PAGE del extracto celular de <i>Nocardia brasiliensis</i>	49
9A Inmunoelctrotransferencia del extracto celular de <i>N. brasiliensis</i>	50
9B Patrón electroforético de ARN total aislado de macrófagos peritoneales de ratón BALB/c.....	50
10. Titulación de $[Mg^{2+}]$ para las condiciones de PCR usando cebadores para β -actina.....	51
11. RT-PCR de ARNs mensajeros para citocinas en macrófagos peritoneales infectados con <i>N. brasiliensis</i>	52
12. Expresión relativa de ARNm para IL-10 a través de RT-PCR y su traducción proteica (secreción) por M ϕ s infectados con una dosis alta de <i>N. brasiliensis</i> en fase estacionaria.....	53
13. Secreción y transcripción de IL-12 por M ϕ s peritoneales de ratón BALB/c expuestos a <i>N. brasiliensis</i> en fase estacionaria.....	55
14. Secreción y transcripción de IFN- γ por M ϕ s peritoneales de ratón BALB/c expuestos a <i>N. brasiliensis</i> en fase estacionaria.....	56
15. Secreción y transcripción de IL-12 por M ϕ s peritoneales de ratón BALB/c expuestos a <i>N. brasiliensis</i> en fase exponencial.....	58
16. Secreción y transcripción de IL-1 β por M ϕ s peritoneales de ratón BALB/c expuestos a <i>N. brasiliensis</i> en fase estacionaria.....	59
17. Secreción y transcripción de IL-1 β por M ϕ s peritoneales de ratón BALB/c expuestos a <i>N. brasiliensis</i> en fase exponencial.....	60
18. Secreción y transcripción de IL-10 por M ϕ s peritoneales de ratón BALB/c expuestos a <i>N. brasiliensis</i> en fase estacionaria.....	61
19. Secreción y transcripción de IL-10 por M ϕ s peritoneales de ratón BALB/c expuestos a <i>N. brasiliensis</i> en fase exponencial.....	62
20. Secreción y transcripción de TNF- α por M ϕ s peritoneales de ratón BALB/c expuestos a <i>N. brasiliensis</i> en fase estacionaria.....	63
21. Secreción y transcripción de TNF- α por M ϕ s peritoneales de ratón BALB/c expuestos a <i>N. brasiliensis</i> en fase exponencial.....	64

22. Secreción y transcripción de IFN- γ por M ϕ s peritoneales de ratón BALB/c expuestos a <i>N. brasiliensis</i> en fase exponencial.....	65
23. Producción de citocinas por M ϕ s peritoneales pretratados con Acs policlonales anti- <i>N. brasiliensis</i> e infectados con una dosis media.....	75
24. Producción de citocinas por M ϕ s peritoneales pretratados con Acs policlonales anti- <i>N. brasiliensis</i> e infectados con una dosis alta.....	76
25. Transcripción de IL-12 e IFN- γ en M ϕ s peritoneales de ratón BALB/c expuestos a <i>N. brasiliensis</i> opsonizada con Ac monoclonal anti-P61.....	77
26. Transcripción de TNF- α e IL-1 β en M ϕ s peritoneales de ratón BALB/c expuestos a <i>N. brasiliensis</i> opsonizada con Ac monoclonal anti-P61.....	78
27. Transcripción de IL-10 en M ϕ s peritoneales de ratón BALB/c expuestos a <i>N. brasiliensis</i> opsonizada con Ac monoclonal anti-P61.....	79
28. Transcripción de IL-12 e IFN- γ en M ϕ s peritoneales de ratón BALB/c expuestos a <i>N. brasiliensis</i> opsonizada con Acs policlonales anti- <i>N. brasiliensis</i>	80
29. Transcripción de TNF- α e IL-1 β en M ϕ s peritoneales de ratón BALB/c expuestos a <i>N. brasiliensis</i> opsonizada con Acs policlonales anti- <i>N. brasiliensis</i>	81
30. Transcripción de IL-10 en M ϕ s peritoneales de ratón BALB/c expuestos a <i>N. brasiliensis</i> opsonizada con Acs policlonales anti- <i>N. brasiliensis</i>	82
31. Secreción de IL-12 por M ϕ s peritoneales de ratón BALB/c expuestos a <i>N. brasiliensis</i> * opsonizada con Ac monoclonal anti-P61.....	83
32. Secreción de IFN- γ y TNF- α por M ϕ s peritoneales de ratón BALB/c expuestos a <i>N. brasiliensis</i> opsonizada con Ac monoclonal anti-P61.....	84
33. Secreción de IL-1 β e IL-10 por M ϕ s peritoneales de ratón BALB/c expuestos a <i>N. brasiliensis</i> opsonizada con Ac monoclonal anti-P61.....	85
34. Secreción de IL-12 e IFN- γ por M ϕ s peritoneales de ratón BALB/c expuestos a <i>N. brasiliensis</i> opsonizada con Acs policlonales anti- <i>N. brasiliensis</i>	88
35. Secreción de TNF- α e IL-1 β por M ϕ s peritoneales de ratón BALB/c expuestos a <i>N. brasiliensis</i> opsonizada con Acs policlonales anti- <i>N. brasiliensis</i>	89
36. Secreción de IL-10 por M ϕ s peritoneales de ratón BALB/c expuestos a <i>N. brasiliensis</i> opsonizada con Acs policlonales anti- <i>N. brasiliensis</i>	90
37. Escenario hipotético de infección de M ϕ s con una dosis infecciosa inicial baja de <i>N. brasiliensis</i> en fase de crecimiento exponencial (virulenta).....	121
38. Efecto hipotético de complejos inmunes <i>N. brasiliensis</i> -acs. anti- <i>Nocardia</i> sobre la producción de citocinas macrofágicas.....	122

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1. Producción de citocinas por macrófagos infectados con diferentes dosis de <i>N. brasiliensis</i> en fase de crecimiento estacionaria.....	127
2. Producción de citocinas por macrófagos infectados con diferentes dosis de <i>N. brasiliensis</i> en fase exponencial.....	128
3. Producción de citocinas por macrófagos expuestos a complejos inmunes <i>N. brasiliensis</i> -anticuerpos anti-P61.....	129
4. Producción de citocinas por macrófagos expuestos a complejos inmunes <i>N. brasiliensis</i> -anticuerpos anti- <i>Nocardia</i>	130
5. Producción de citocinas por macrófagos pretratados con anticuerpos policlonales anti- <i>Nocardia</i>	131



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS.

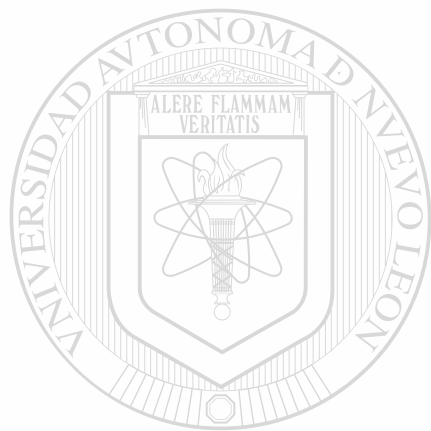
ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

%	Por ciento
α	Alfa
β	Beta
γ	Gamma
κB	Proteína inhibidora del factor NF κ B
aa	Aminoácidos
Ac(s)	Anticuerpo(s)
ADCC	Citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos
ADN	Ácido desoxirribonucleico
APCs	Célula(s) Presentadora(s) de Antígenos
ARNr	Ácido ribonucleico ribosomal
ASB	Albúmina Sérica Bovina
AMPc	Monofosfato de adenosina cíclico
Aprox.	Aproximadamente
Arg-1	Arginasa 1
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido desoxirribonucleico mensajero
ASHS	Antígeno soluble de huevos de Schistosoma
ATCC	Colección americana de cultivos tipo
BCG	Bacilo de Calmette-Guérin
BCR	Receptor de célula B
BHI	Medio infusión cerebro-corazón
bp	Pares de bases
C	Componente del complemento
C-C	Quimiocinas beta con residuos de cisteína-cisteína
CD	Grupo de diferenciación
CI _s	Complejos inmunes
CGM	Célula gigante multinucleada
Con-A	Concanavalina A
Conc.	Concentración
CR	Receptor de complemento
C-X-C	Quimiocinas alfa con residuos cisterna-X-cisteína, donde X es cualquier aminoácido
DAG	Diacilglicerol
DEPC	Dietilpírocarbonato
DMT	Dimicolato de trehalosa
E	Eritrocitos
ELISA	Prueba de inmunoabsorción ligada a enzimas
et al.	Y colaboradores
FasL	Ligando de Fas
Fc	Fragmento Fc de inmunoglobulinas
FHA	Fitohemaglutinina

g	Gravedad
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos
GPLs	Glucopéptidolípidos
H₂O₂	Peróxido de oxígeno
hIL	Interleucina humana
IVIG	Inmunoglobulina(s) intravenosa(s)
HLA	Antígeno leucocitario humano
HUJEG-1	Hospital Universitario José Eleuterio González
i.v.	Intravenoso
ICAM-1	Molécula de adhesión intercelular 1
IFN	Interferón
Igs(s)	Inmunoglobulina(s)
IL	Interleucina
IL-ra	Antagonista del receptor de IL-1
IP10	Proteína inducible de interferón γ
IP₃	1,4,5-trifosfato de inositol
ITAM	Motivo de activación basado en inmunoreceptor de tirosina
ITIM	Motivo de inhibición basada en inmunoreceptor de tirosina
IVIG	Inmunoglobulinas intravenosas
Kb	Kilobases
K_D	Coefficiente de disociación
kDa	Kilodaltones
KO	Knockout
LAM	Lipoarabinomanano
I.F.A	Antígeno relacionado con la función leucocitaria
LHG	Lisozima de huevo de gallina
LIF	Factor inhibidor de leucemia
Log	Logaritmo; logarítmico(a)
LPS	Lipopolisacárido
LT	Leucotrieno
M	Moles
MHC	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
Mϕ	Macrófago
M-2	Macrófago activado Tipo 2
MAB(s)	Anticuerpo(s) monoclonal(es)
Mac-1	Integrina CD11b/CD18
ManLAM	Lipoarabinomanano-manosa
MCP-1	Proteína quimioattractante de monocitos 1
M-CSF	Factor estimulante de colonias de macrófagos
MDMs	Macrófagos derivados de monocitos
mIL	Interleucina de ratón
MIP	Proteína inflamatoria de macrófagos
ml	Mililitro
MMLVRT	Transcriptasa reversa del virus Moloney de la leucemia murina
MOI	Multiplicidad de infección
MR	Receptor para manosa

N	Normalidad
NADPH	Fosfato de dinucleótido de adenina nicotinamida reducido
NF-κB	Factor nuclear κB
ng	Nanogramo
NK	Célula asesina natural
NO	Óxido nítrico
NOS2	Óxido nítrico sintasa 2
O ₂	Oxígeno
O ₂ ⁻	Anión superóxido
PAF	Factor activador de plaquetas
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PAMP	Patrones Moleculares Asociados a Patógenos
PBMC	Células mononucleares de sangre periférica
PCR	Reacción en Cadena de Polimerasa
pg	Picogramo
PG	Prostaglandina
pH	-log[H ⁺] Potencial de hidrógeno
p.i.	Postinfección
pl	Punto isoelectrico
PI3K	Fosfatidilinositol 3(OH)-cinasa
PIM	Manosida de fosfatidilinositol
PIP ₂	Fosfatidilinositol-(4,5)-bifosfato
PIP ₃	1,4,5-trifosfato de inositol
PPD	Derivado proteínico purificado de tuberculina
PtdIns[3]P	Fosfatidilinositol-3-fosfato
PTK	Proteína tirosina cinasa
R	Receptor
Raf	Cinasa Raf
RANTES	Quimioquina regulada bajo activación, normalmente expresada y secretada por células T
rpm	Revoluciones por minuto
RIA	Radioinmunoanálisis
RNI	Compuestos reactivos del nitrógeno
ROI	Compuestos reactivos del oxígeno
RT-PCR	Transcripción inversa conjugada con la reacción en cadena de polimerasa
s.c.	Subcutáneo(a)
SCID	Inmunodeficiencia Severa Combinada
SEB	Enterotoxina estafilocócica B
SH2	Región 2 de homología de Src
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
SOCS	Supresores de la señalización mediada por citocinas
SOD	Superóxido dismutasa
Sp-A	Proteína surfactante pulmonar A
SR	Receptor soluble
Stat	Transductores de la señal y activadores de transcripción
TCR	Receptor de célula T

TGF- β	Factor de transformador del crecimiento
Th0	Linfocito T precursor
Th1	Linfocito T cooperador de tipo 1
Th2	Linfocito T cooperador de tipo 2
TLR	Receptor tipo Toll
TNF	Factor de Necrosis Tumoral
U	Unidades
UFC	Unidades formadoras de colonias
VCAM-1	Molécula de adhesión celular vascular 1
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana
VSR	Virus Síncitial Respiratorio



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

RESUMEN

Juan Manuel Zúñiga de Jesús

Fecha de Graduación: Octubre, 2004

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Medicina

Título del Estudio: **EFFECTO DE MEDIADORES INMUNOLÓGICOS EN LA PRODUCCIÓN DE CITOCINAS POR MACRÓFAGOS INFECTADOS CON *Nocardia brasiliensis***

Número de páginas: 161

Candidato para el grado de Doctorado en Ciencias con especialidad en Inmunología

Área de Estudio: Inmunología

Propósito y Método del Estudio: Las citocinas son glicoproteínas con funciones inmunológicas fundamentales, que se producen en forma dinámica durante la interacción macrófago-parásito, reflejando así el balance neto del proceso infeccioso. En el presente trabajo se analizó la secreción *in vitro* de citocinas por el macrófago con la técnica de ELISA y la presencia de sus respectivos ARN-mensajeros por medio de RT-PCR, en respuesta a diversas dosis de *Nocardia brasiliensis* ATCC 700358 en fase de crecimiento exponencial (virulenta) o estacionaria (avirulenta), así como en presencia de anticuerpos anti-*N. brasiliensis*.

Contribuciones y Conclusiones: Estos resultados determinaron el efecto de la combinación de dos parámetros de *N. brasiliensis* sobre la producción de citocinas macrófagicas *in vitro*, así como sobre la expresión relativa de sus ARNs celulares mensajeros. Se evidenció un efecto diferencial de *N. brasiliensis* ATCC 700358 con respecto a la secreción de citocinas, ya que, a diferencia de la fase de crecimiento estacionaria (avirulenta), la fase exponencial (virulenta) en su dosis baja es excelente inductor de IL-10. Por otro lado, evidenciamos un singular efecto inhibitorio del microorganismo en ambas fases de crecimiento sobre la producción de TNF- α , aunque éste fue más perceptible para la fase exponencial. Además, la dosis baja de nocardias en ambas fases de crecimiento y en cualquiera de las tres dosis utilizadas en nuestros experimentos, resulta ser un pobre inductor de las citocinas estudiadas. Por último, la supresión de secreción de citocinas macrófagicas y sus respectivos ARNs mensajeros por complejos *N. brasiliensis*-acs. anti-*Nocardia* pudiera ser una explicación parcial al ya descrito efecto inocuo o aún deletéreo de anticuerpos anti-*Nocardia* durante el proceso infeccioso.

FIRMA DEL ASESOR:



CAPÍTULO 1. ANTECEDENTES

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

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

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

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

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

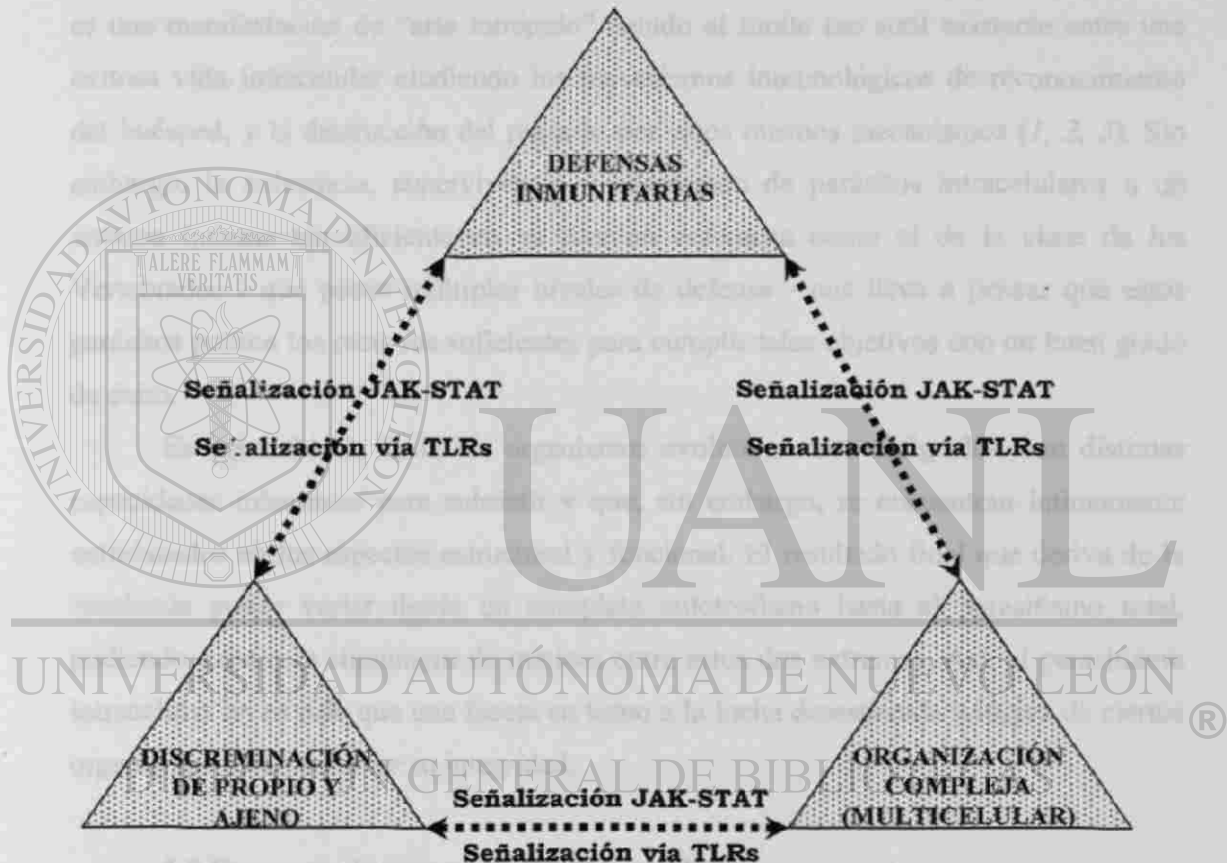


Figura 1. Unidad de fenómenos biológicos a través de la aplicación de algoritmos comunes.

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

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

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

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

1.2 Respuesta inmune innata y adquirida.

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

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

1.3 Heterogeneidad y renovación de macrófagos.

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

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

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

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

1.4 Moléculas CD1 y TLR.

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

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

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

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

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

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

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

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

1.5 Fagocitosis.

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

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

1.6 Rutas de internación de partículas.

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

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

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

1.6.1 Vías de internación de Mtb en macrófagos.

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

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

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

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

1.6.2 Vías de entrada de otros microparásitos intracelulares.

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

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

1.7 Adhesión.

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

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

1.8 Receptores para el componente Fc de la inmunoglobulina G.

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

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

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

1.8.1 FcγRs activadores.

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

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

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

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

1.8.2 Fc γ Rs inhibidores.

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

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

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

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

1.9 Inmunoglobulinas intravenosas.

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

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

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

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

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

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

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

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

1.10 Maduración del fagosoma.

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

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

1.11 Inhibición de la maduración fagolisosomal.

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

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

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

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

1.12 Citocinas.

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

Es un hecho que estas proteínas son parte de uno de los sistemas más complejos y eficaces, dotado con capacidad para dirigir y modular un gran número de fenómenos biológicos celulares, tales como activación, diferenciación, movimiento, crecimiento, colonización, muerte programada (apoptosis), coordinación del eje neuroendocrino-inmunológico, etc. (Figura 2). En adición, la patobiología que acompaña a procesos infecciosos ocasionados por microorganismos patógenos como *Mycobacterium*, *Listeria*, *Trypanosoma*, *Shigella*, *Leishmania* (100), *Plasmodium* (101), es frecuentemente correlacionada con la presencia, exceso de expresión o supresión de ciertas citocinas [por ejemplo IL-1 α , IL-1 β (102, 103), IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IFN- γ , TNF- α , TGF- β , etc].



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

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

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

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

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

1.13 Citocinas proinflamatorias.

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

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

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

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

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

1.13.1 Interleucina-1.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

1.14 Citocinas anti-inflamatorias.

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

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

Interleucina-10.

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

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

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

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

1.15 Granulomas.

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

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

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

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

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

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

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

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

1.15.1 Formación de granulomas – un fenómeno multifactorial.

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

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

A. Factor cuerda.

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

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

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

B. IFN- γ .

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

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

C. IL-10.

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

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

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

D. Células T.

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

1.16 Macrófagos activados en forma alternativa.

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

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

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

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

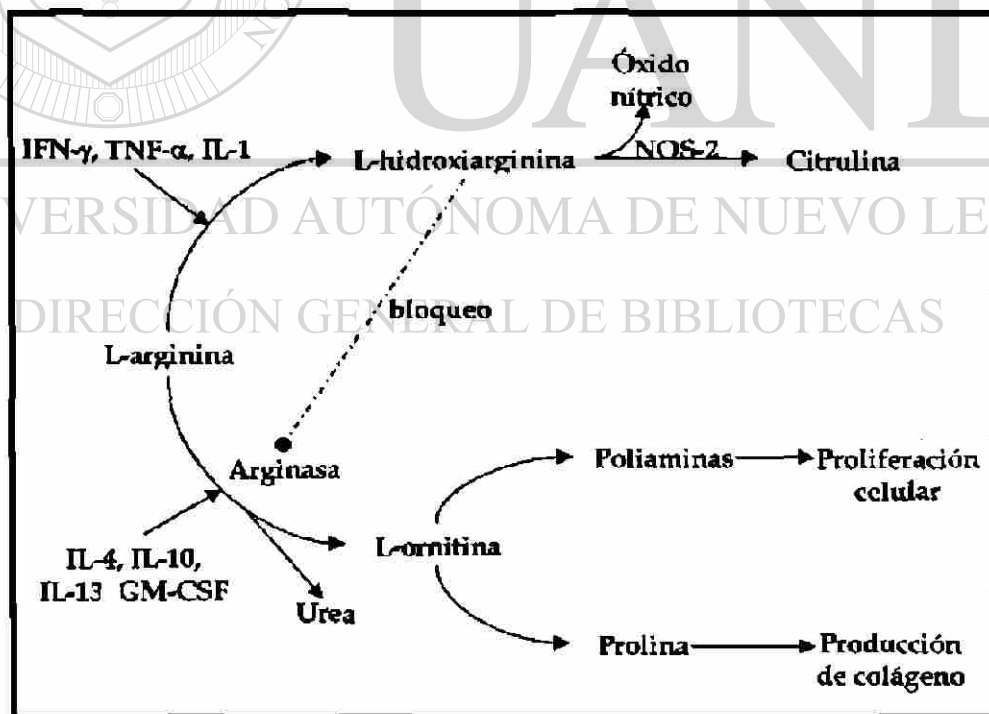


Figura 3. Competencia entre las enzimas Sintasa de Oxido Nítrico y Arginasa en el metabolismo de L-arginina (*J Immunol.* 2001;167(11):6533-44).

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

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

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

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

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

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

1.17. *Nocardia brasiliensis*.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

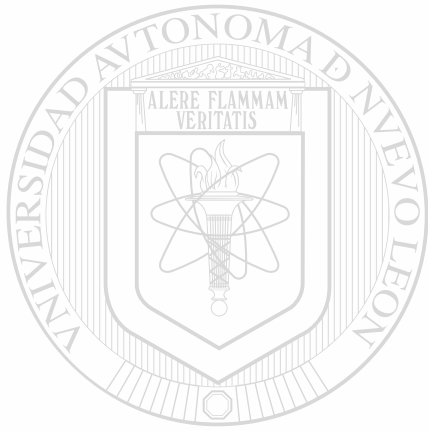
Distintos investigadores han analizado uno u otro factor de virulencia en *Nocardia*, y en verdad, los resultados conducen a una posible correlación entre el grado de patogenicidad y diversos factores como el contenido de catalasa y superóxido dismutasa, la habilidad de evitar la fusión entre fagosoma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

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

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

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

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



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

1.18 Hipótesis:

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

1.19 Objetivo General:

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

1.20 Objetivos Específicos:

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

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

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

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

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

CAPÍTULO 2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Estrategia general.

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

2.2 Ratoncs.

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

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

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

ESTRATEGIA GENERAL

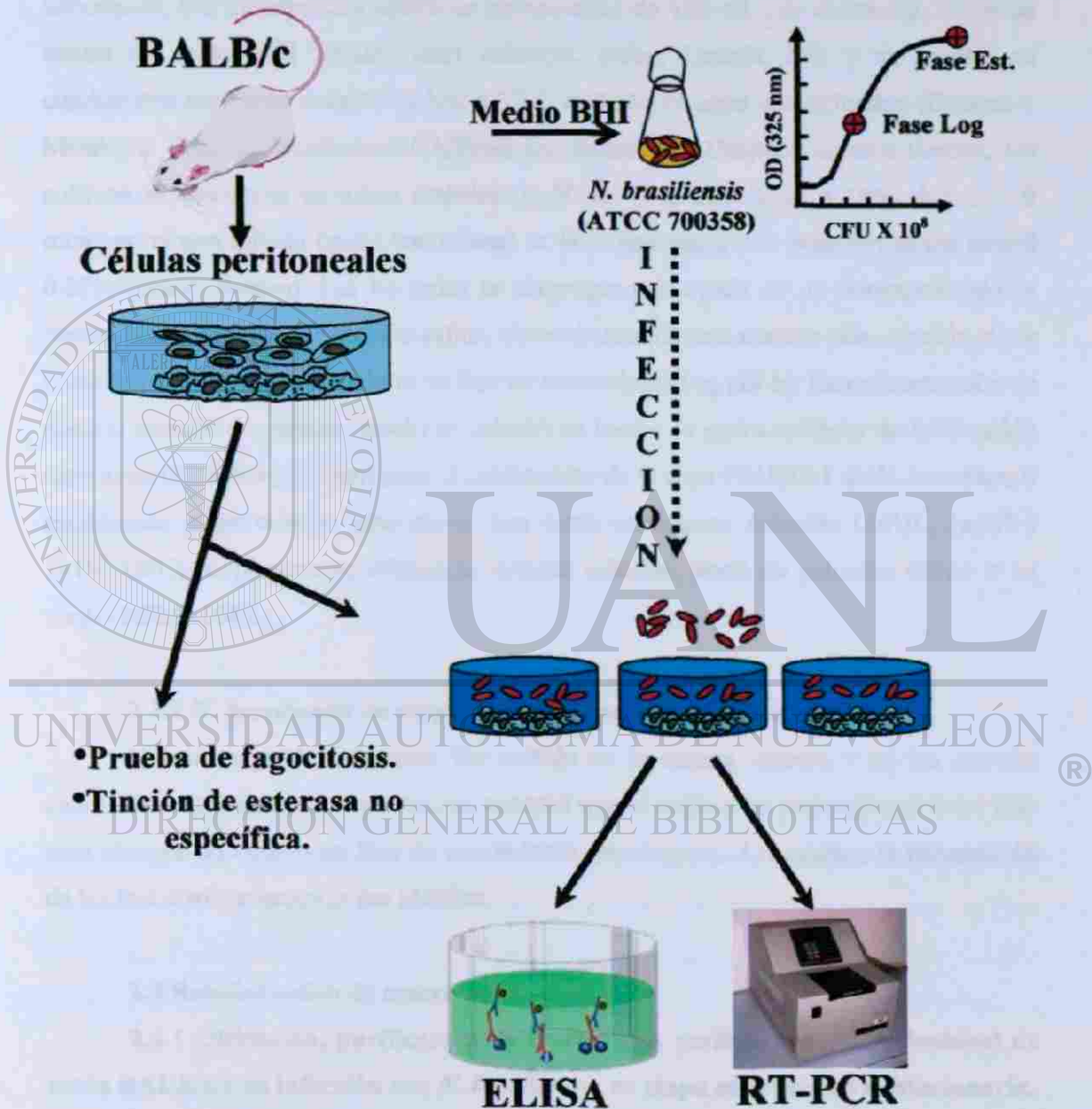


Figura 4. Estrategia general aplicada en la realización de los objetivos.

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

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

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

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

2.4 Reto/infección de macrófagos.

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

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

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

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

2.4.2 Viabilidad celular.

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

2.4.3 Tinción de esterasa no específica y fagocitosis.

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

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

2.4.4 Enfrentamiento entre nocardias opsonizadas y macrófagos.

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

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

2.4.4.2 Nocardias opsonizadas con anticuerpos monoclonales anti-P61

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

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

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

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

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

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

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

2.6 Tinción de Coomassie.

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

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

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

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

2.8 Muestreo de cultivos macrófagos.

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

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

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

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

2.10 Análisis estadístico.

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

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

CAPÍTULO 3. RESULTADOS

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

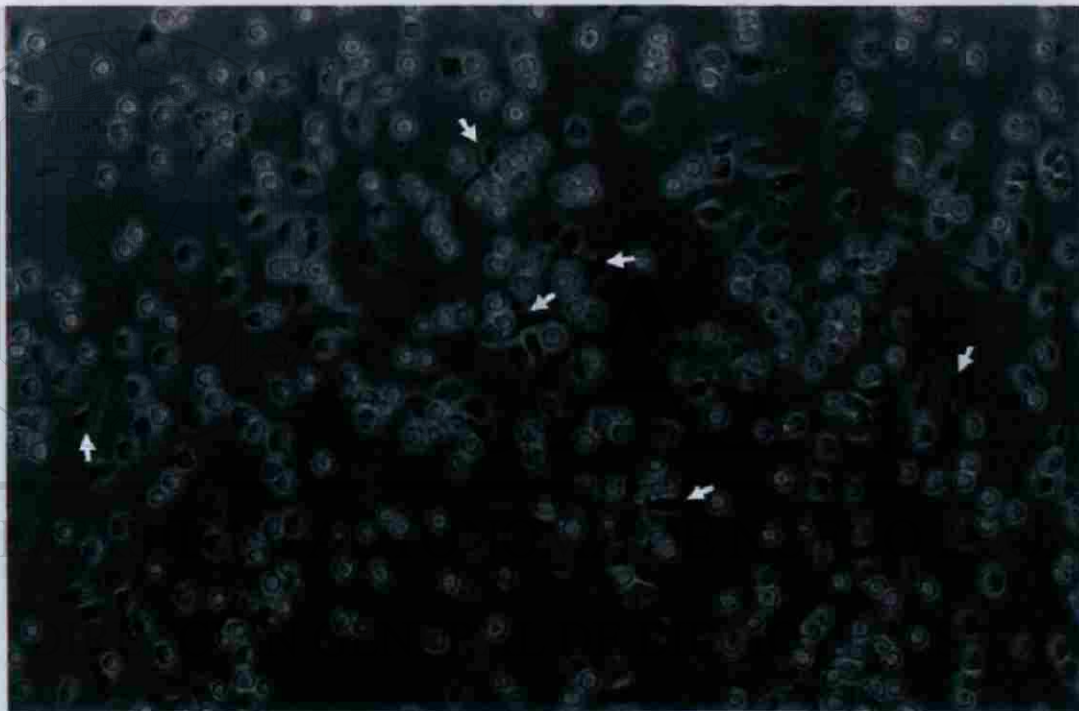


Figura 5. Macrófagos peritoneales no inducidos cultivados *in vitro* en ausencia de suero. Las flechas muestran algunos Mφs que han adquirido una morfología típica estelada. Microscopía de luz con contraste de fase. 200X.

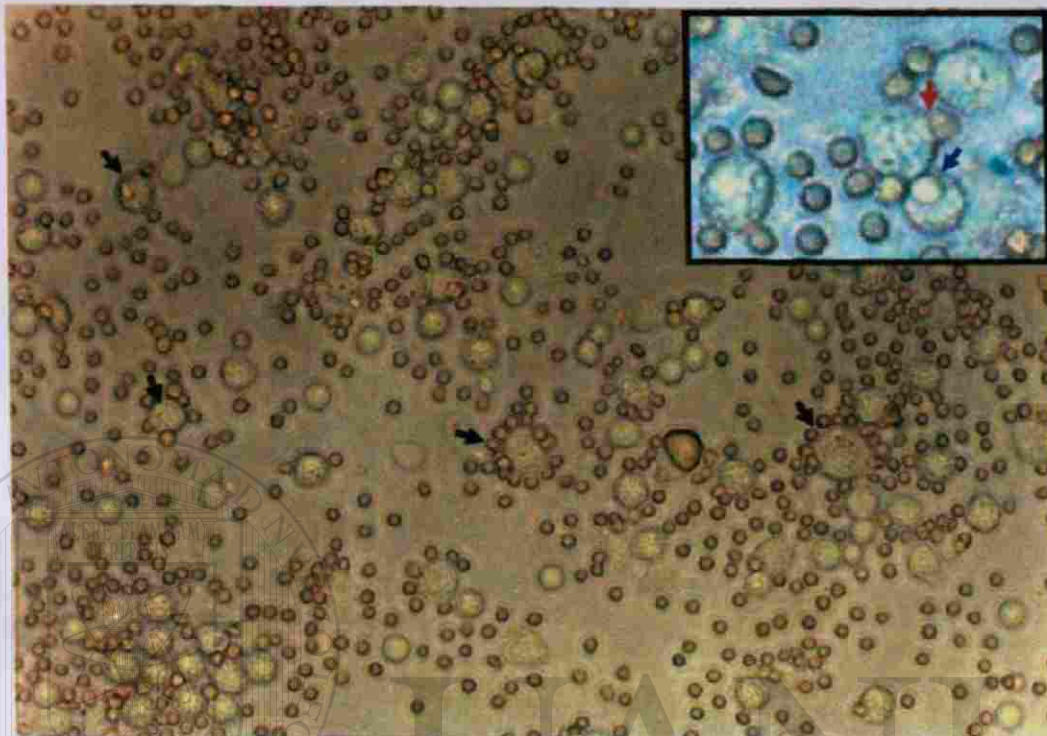


Figura 6. Prueba de funcionalidad fagocítica de macrófagos peritoneales con eritrocitos de carnero sensibilizados. Flechas negras – formación de rosetas. Recuadro: flecha roja – proceso de internación de eritrocito; flecha azul – eritrocito internado. Microscopía de luz con contraste de fase. 400X.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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

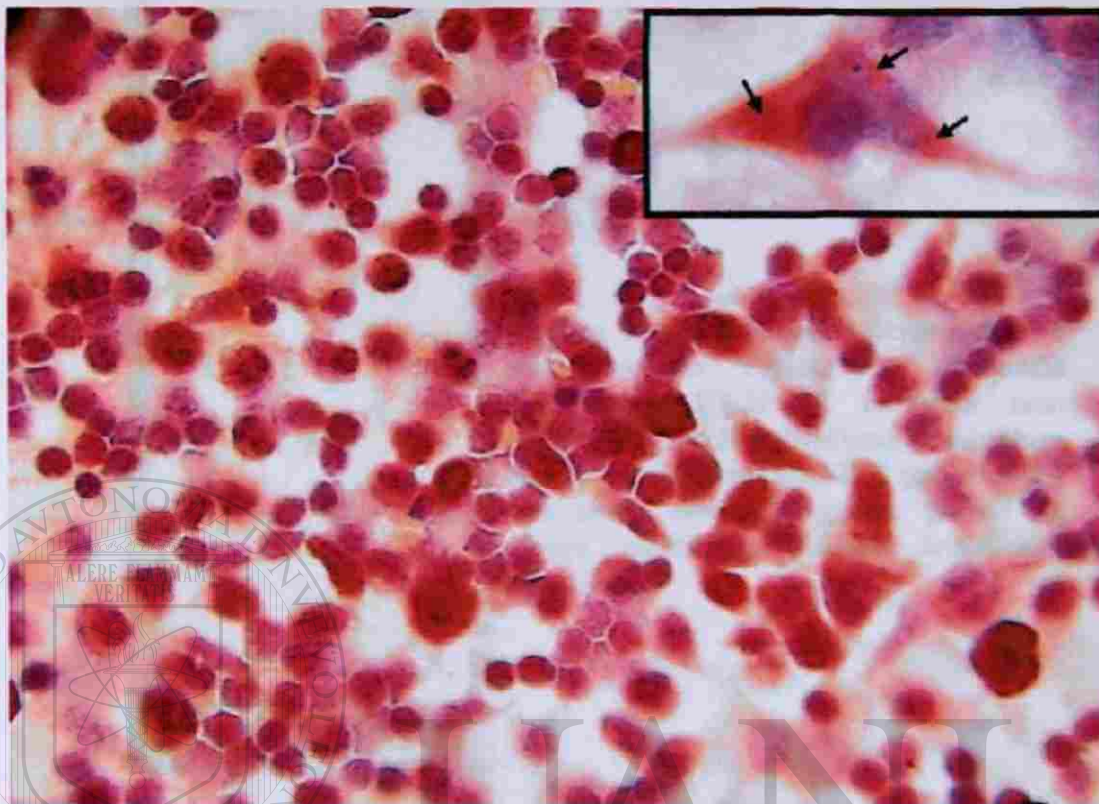


Figura 7. Positividad de macrófagos peritoneales para tinción de esterasa no específica. **Recuadro:** La flechas indican áreas positivas de una célula macrofágica con morfología típica estelada. Microscopía de luz, 100X inmersión.

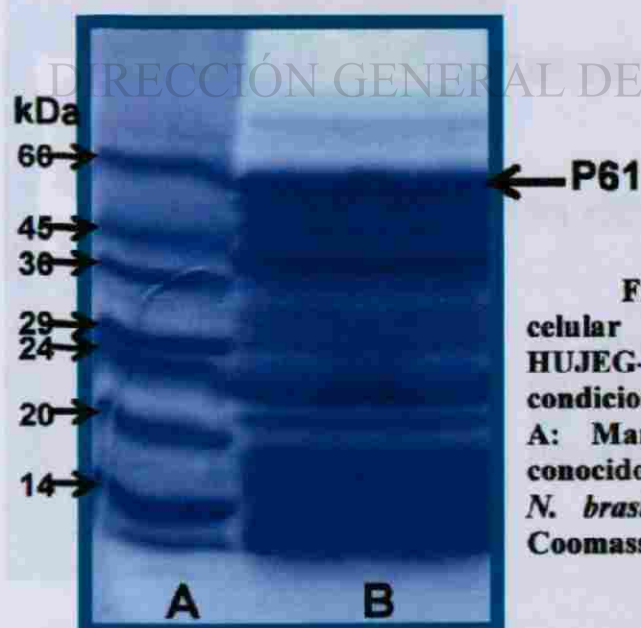


Figura 8. PAGE del extracto celular de *Nocardia brasiliensis* HUJEG-1 en gradiente de 8.75-18% en condiciones no desnaturalizantes. Carril A: Marcadores de peso molecular conocido. Carril B: Extracto celular de *N. brasiliensis*. Tinción con azul de Coomassie R-250.

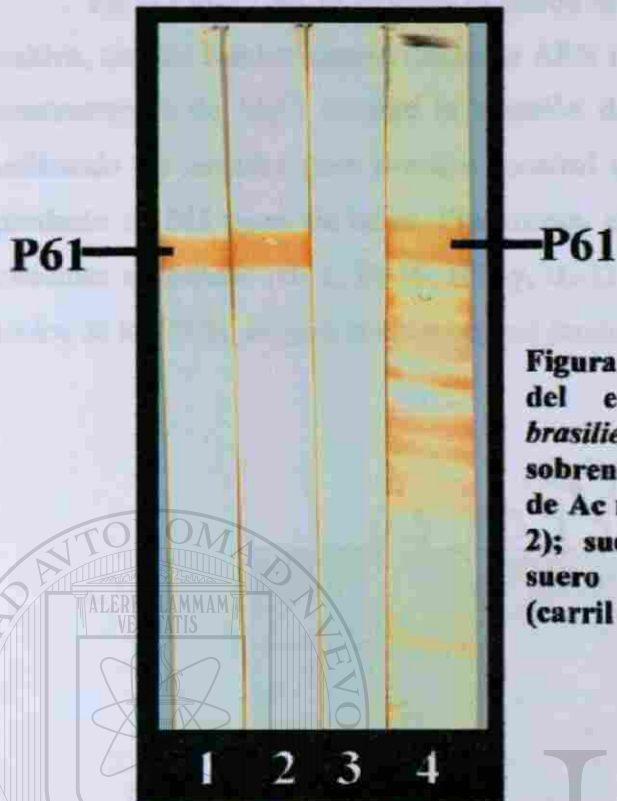


Figura 9A. Inmunolectrotransferencia del extracto celular de *Nocardia brasiliensis* HUJEG-1 revelada con: sobrenadante de hibridoma productora de Ac monoclonal anti-P61 (carriles 1 y 2); suero control negativo (carril 3); suero policlonal anti-*N. brasiliensis* (carril 4).



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

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

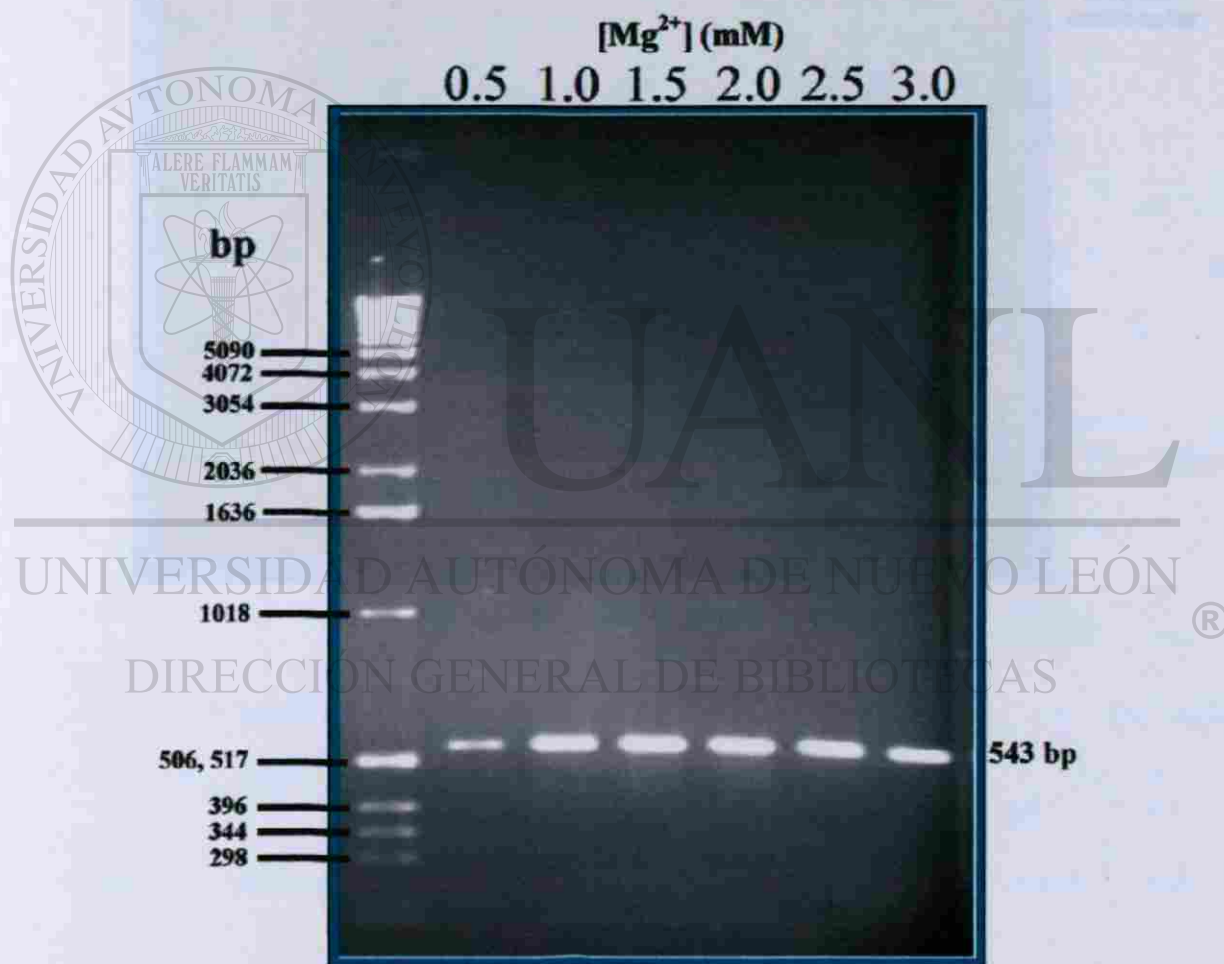


Figura 10. Titulación de $[Mg^{2+}]$ para las condiciones de PCR usando cebadores para β -actina (543 bp).

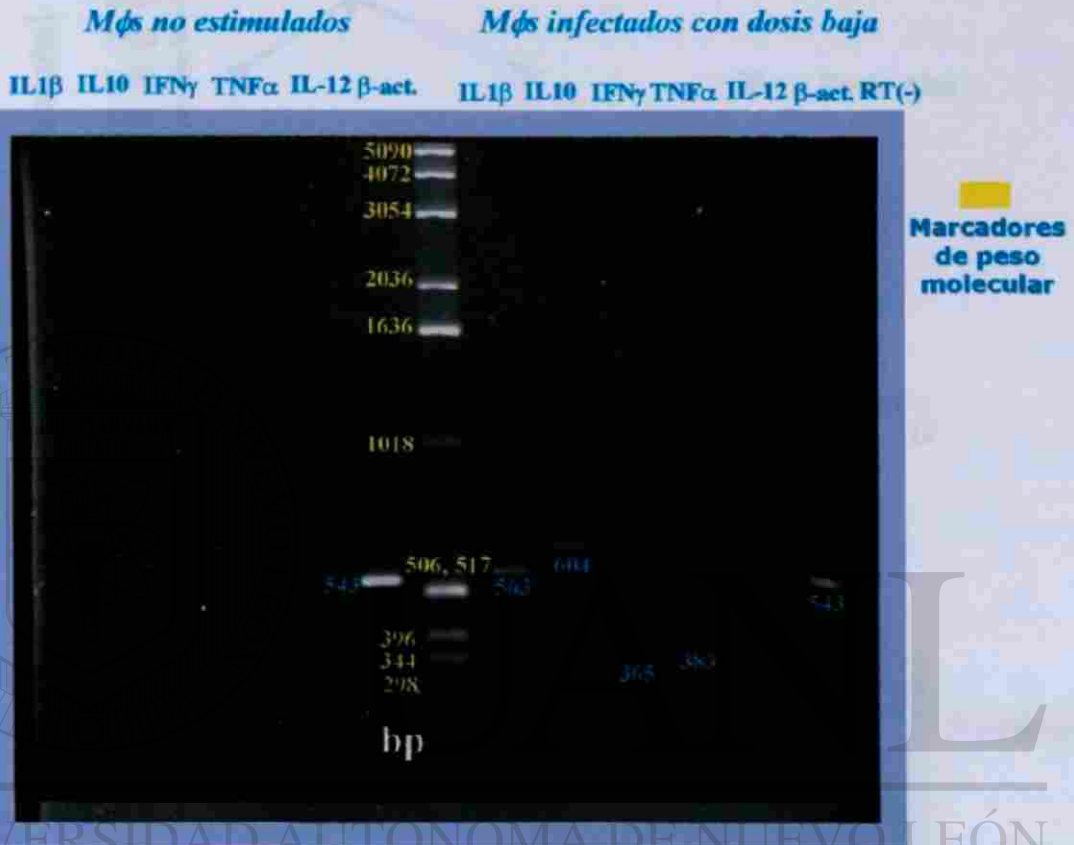


Figura 11. RT-PCR de ARNs mensajeros para las citocinas IL-1 β , IL-10, IFN- γ , TNF- α e IL-12 en macrófagos peritoneales infectados con *N. brasiliensis* (relación 10 nocardias: 1 M ϕ).

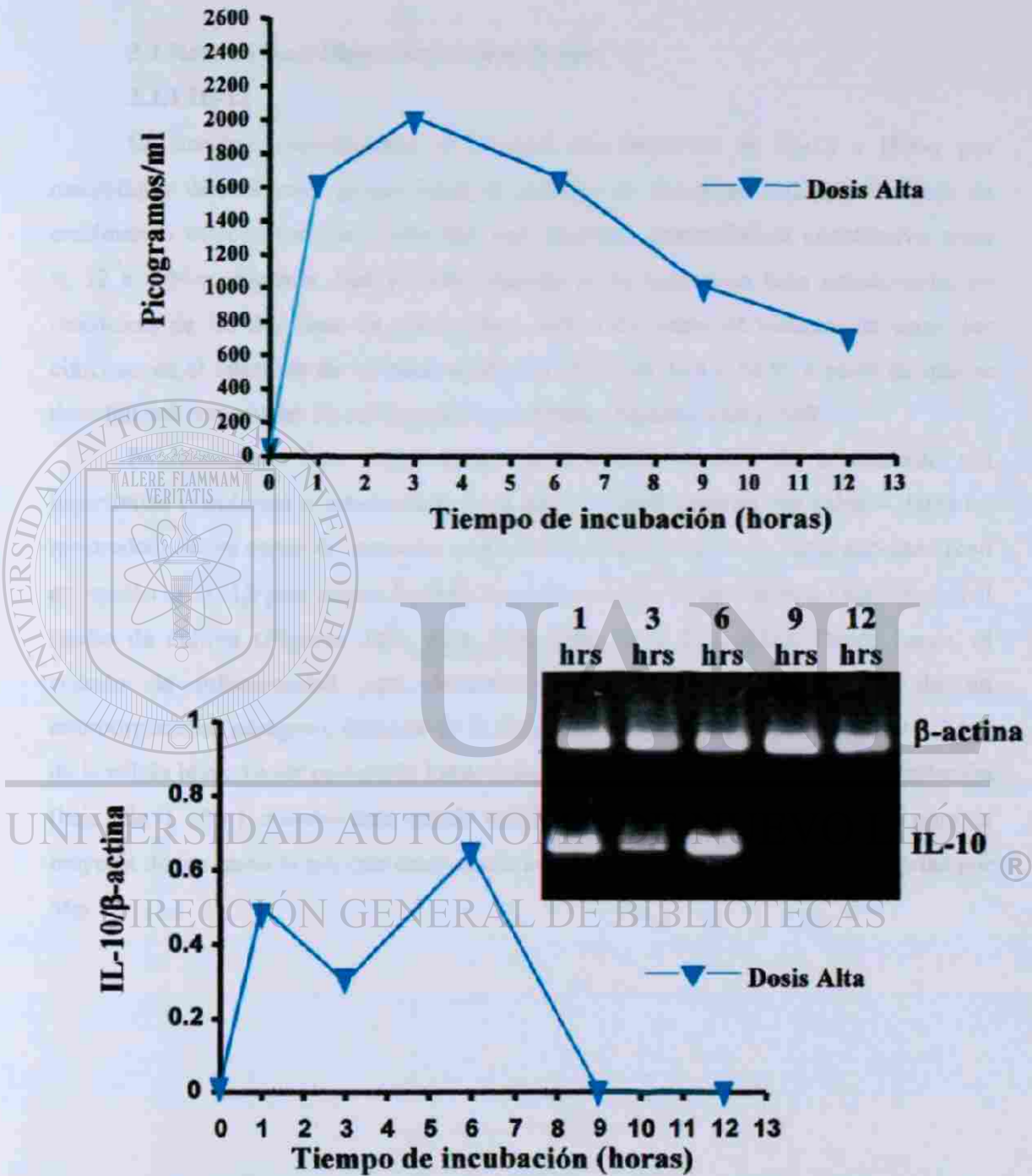


Figura 12. Expresión relativa de ARNm para IL-10 a través de RT-PCR y su traducción proteica (secreción) por Mφs infectados con una dosis alta de *N. brasiliensis* en fase estacionaria.

3.1 Reto de macrófagos con *N. brasiliensis*.

3.1.1 IL-12

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

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

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

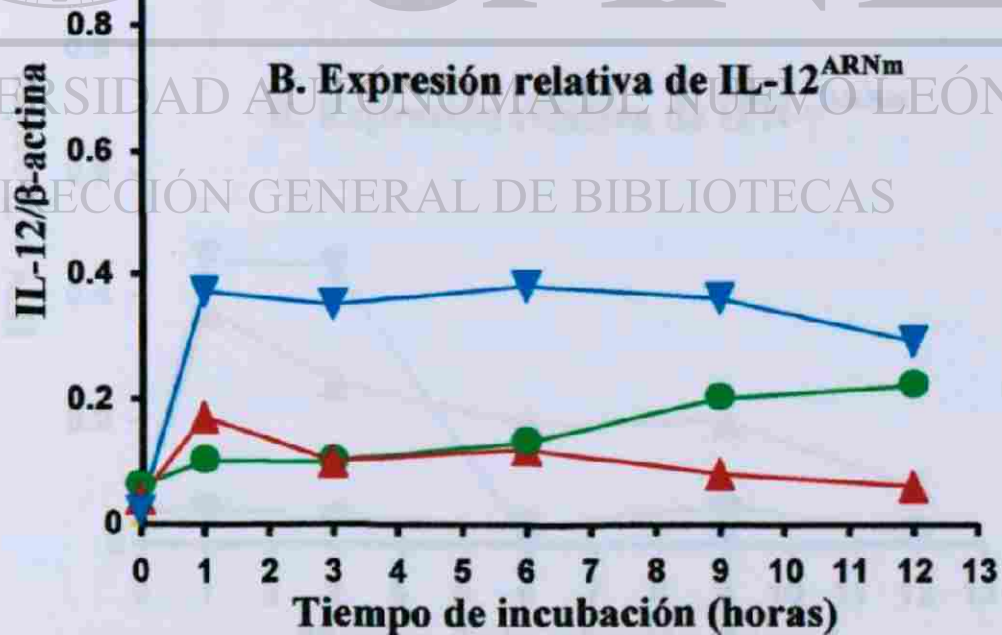
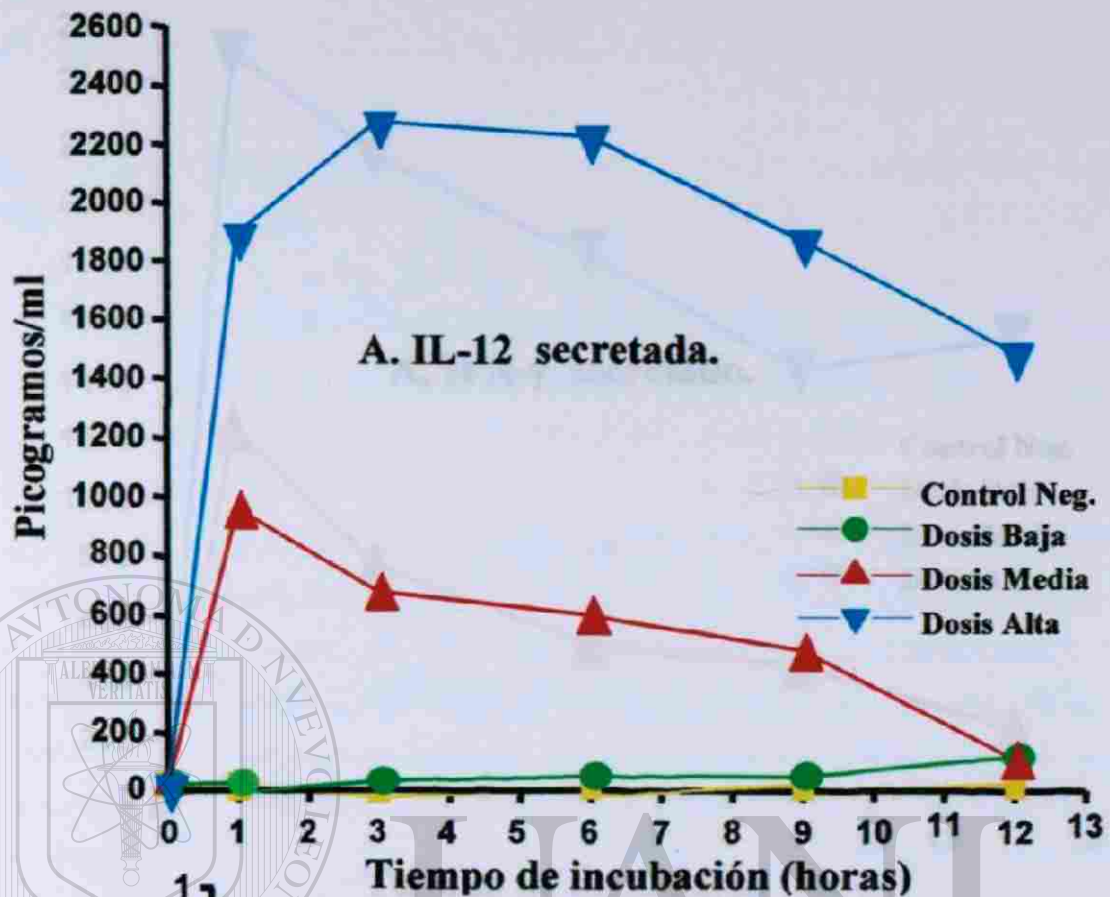


Figura 13. Secreción (A) y transcripción (B) de IL-12 por Mφs peritoneales de ratón BALB/c expuestos a *N. brasiliensis* en fase estacionaria.

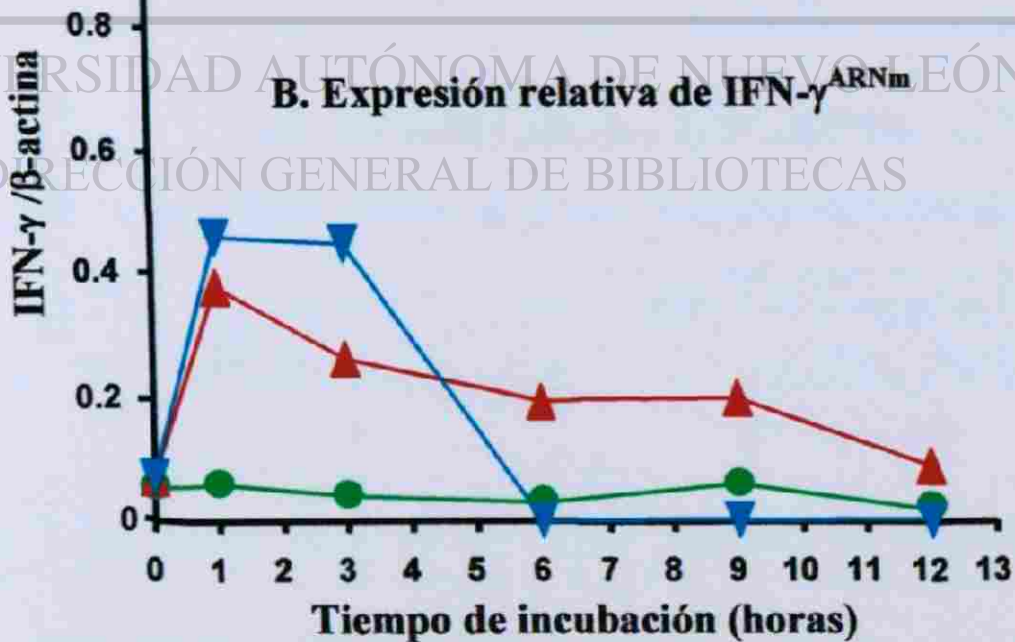
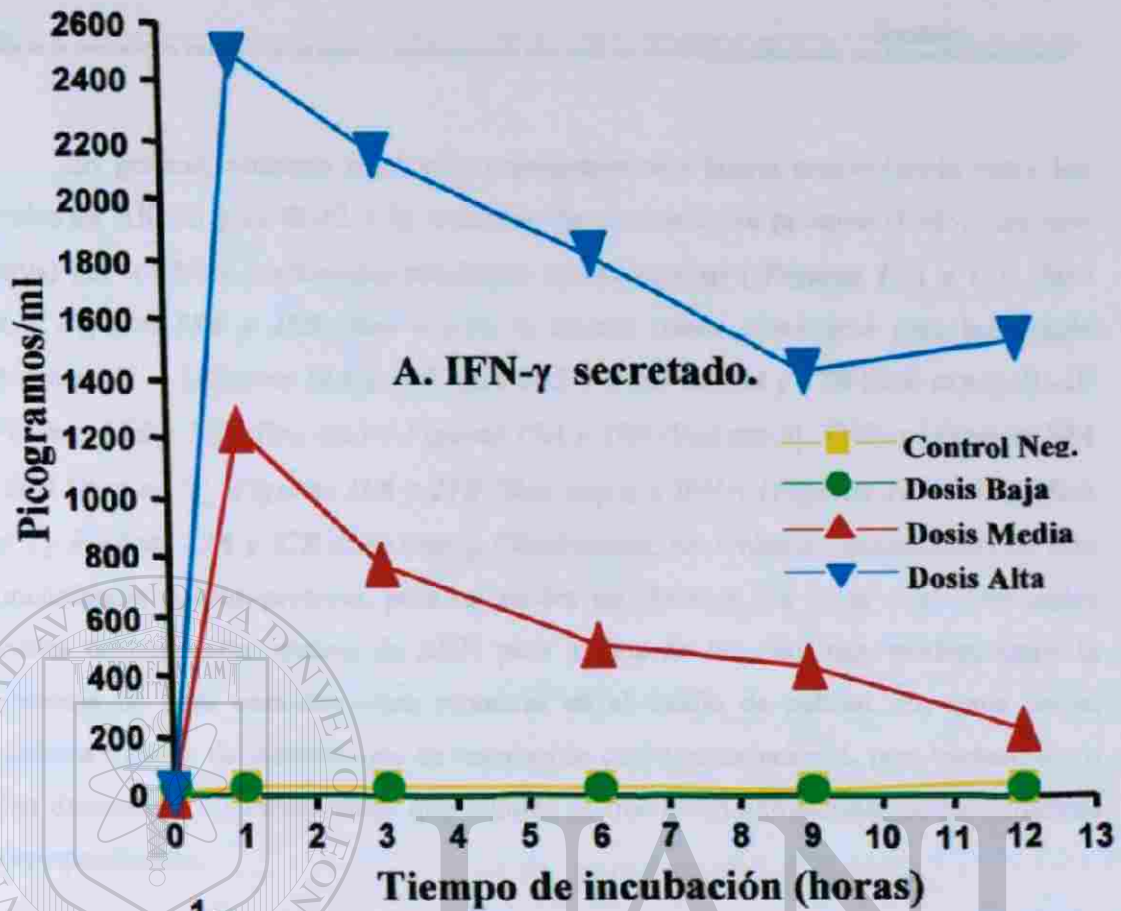
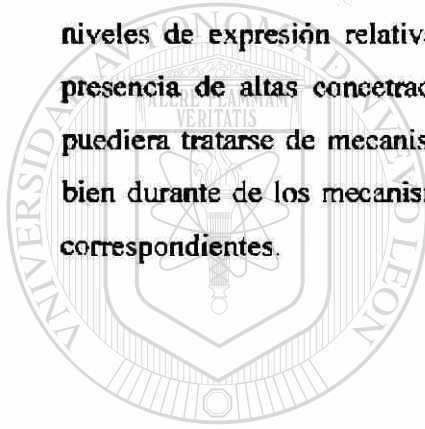


Figura 14. Secreción (A) y transcripción (B) de IFN- γ por M ϕ s peritoneales de ratón BALB/c expuestos a *N. brasiliensis* en fase estacionaria.

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



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

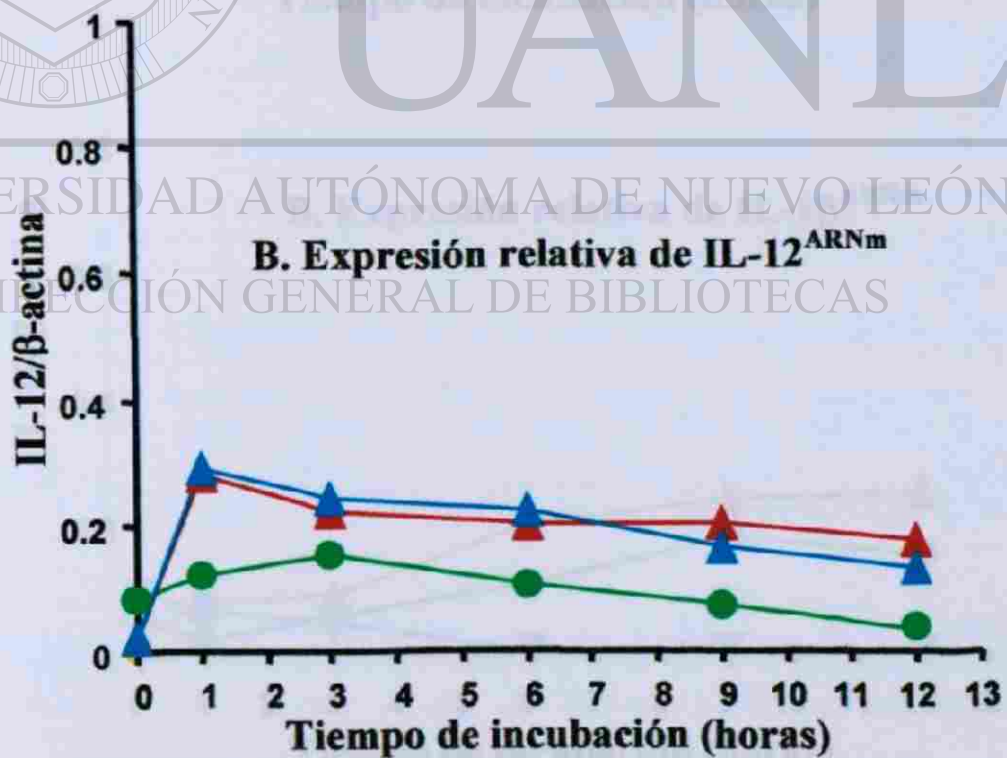
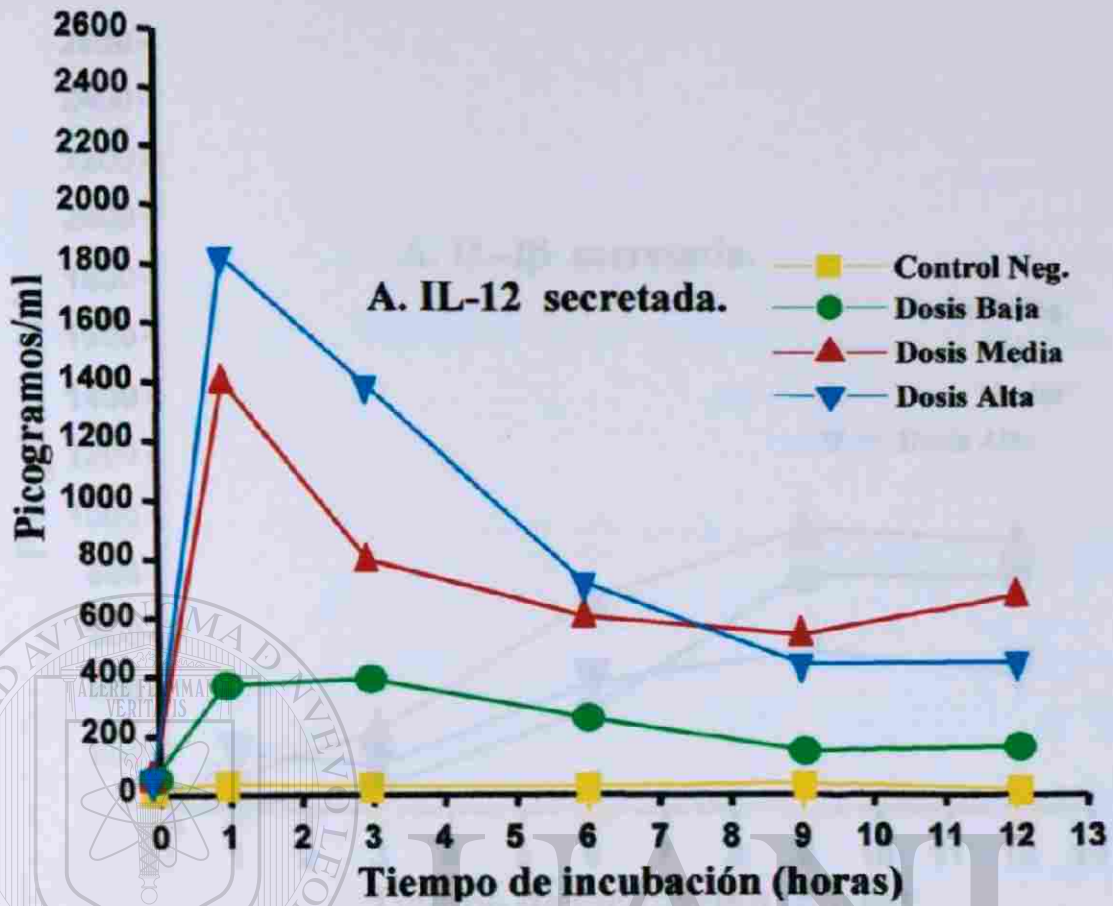


Figura 15. Secreción (A) y transcripción (B) de IL-12 por Mφs peritoneales de ratón BALB/c expuestos a *N. brasiliensis* en fase exponencial.

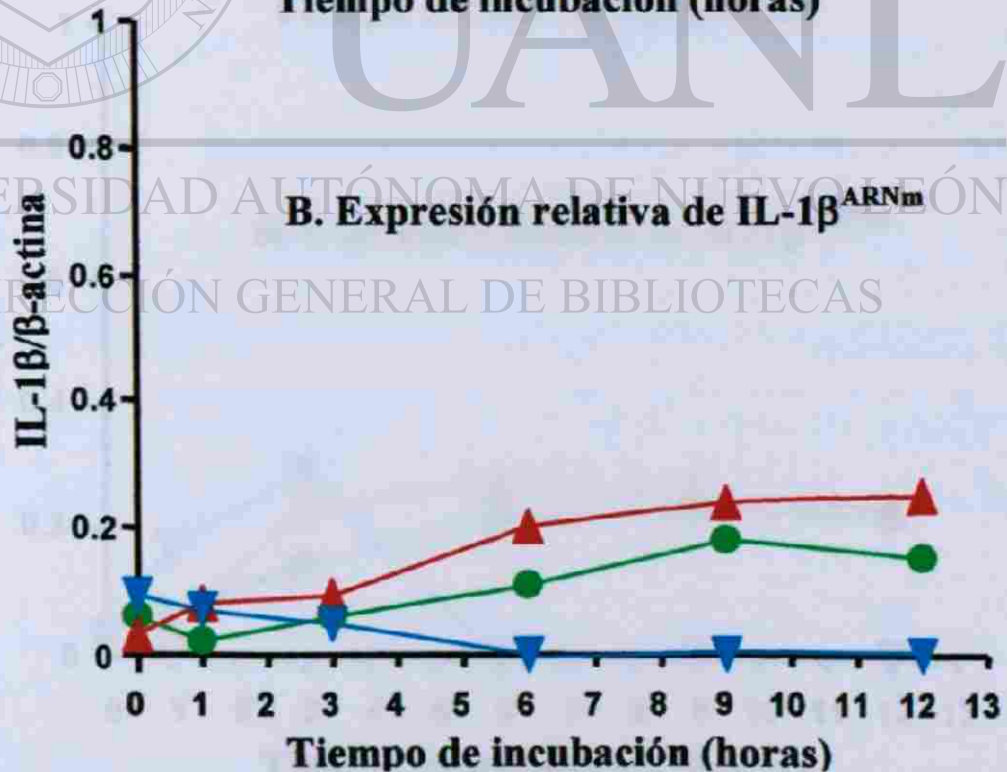
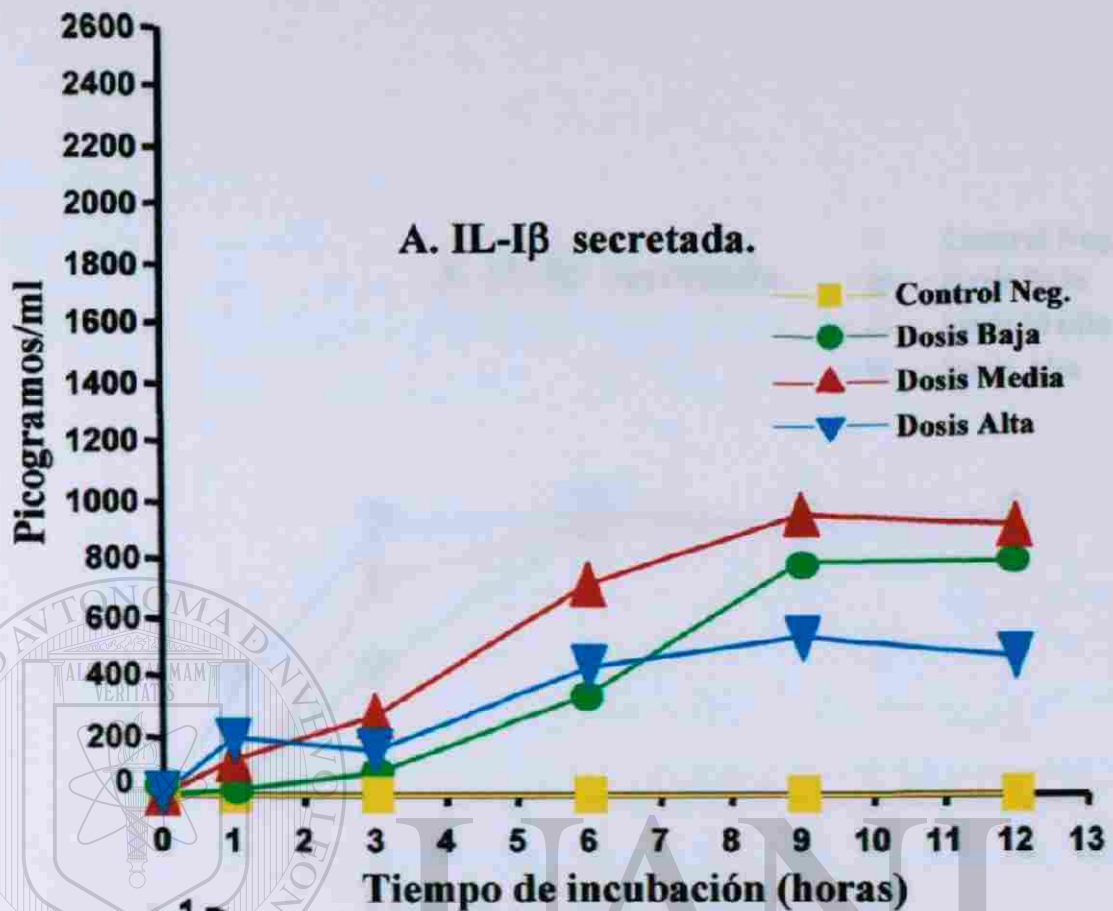


Figura 16. Secreción (A) y transcripción (B) de IL-1 β por M ϕ s peritoneales de ratón BALB/c expuestos a *N. brasiliensis* en fase estacionaria.

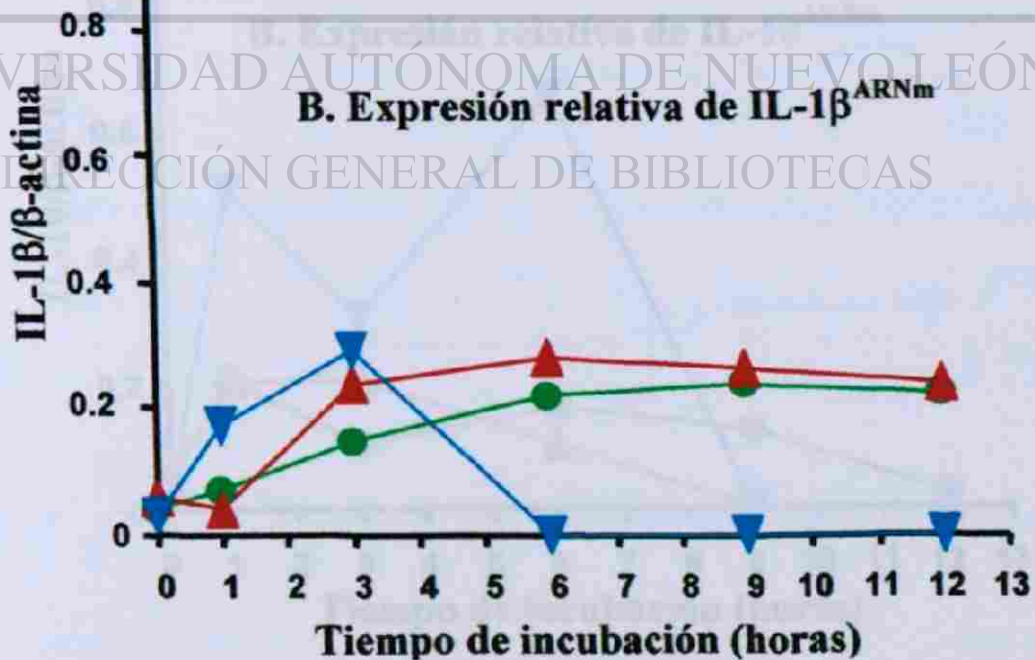
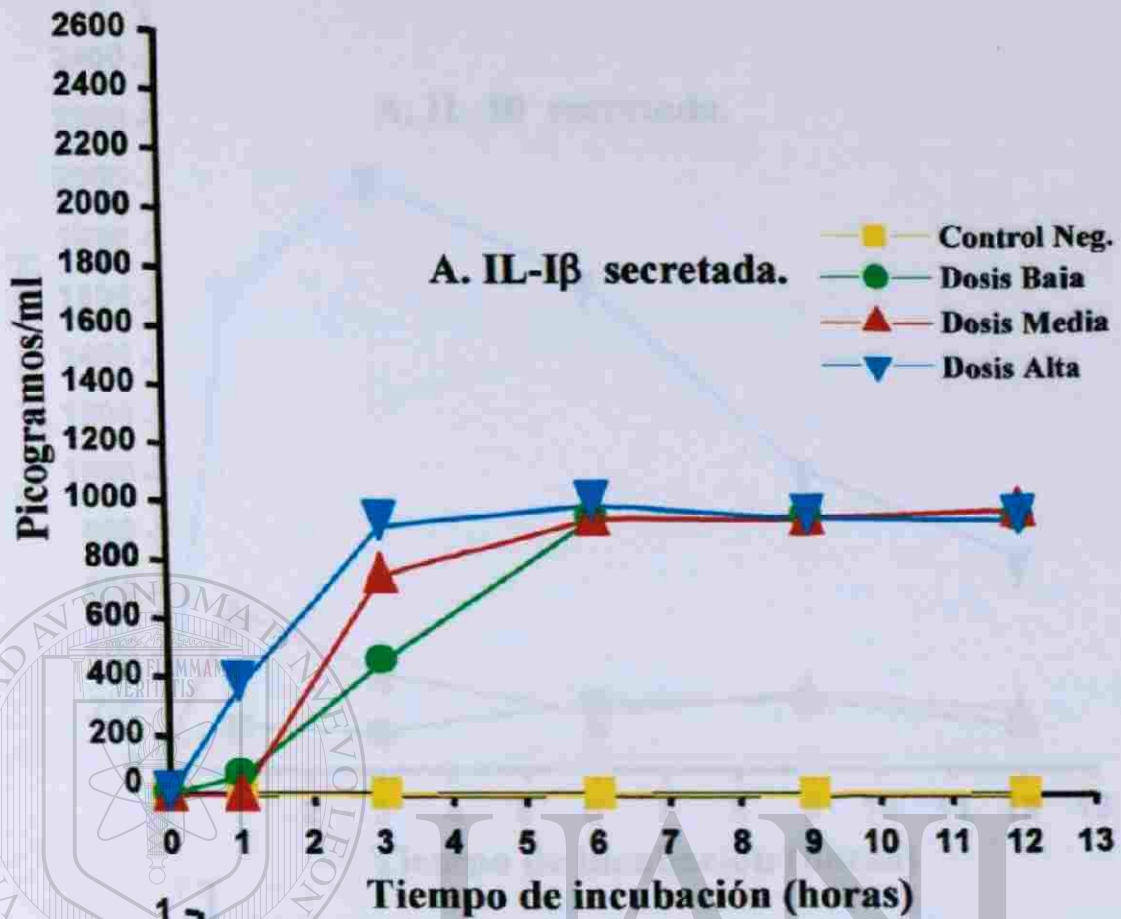


Figura 17. Secreción (A) y transcripción (B) de IL-1 β por M ϕ s peritoneales de ratón BALB/c expuestos a *N. brasiliensis* en fase exponencial.

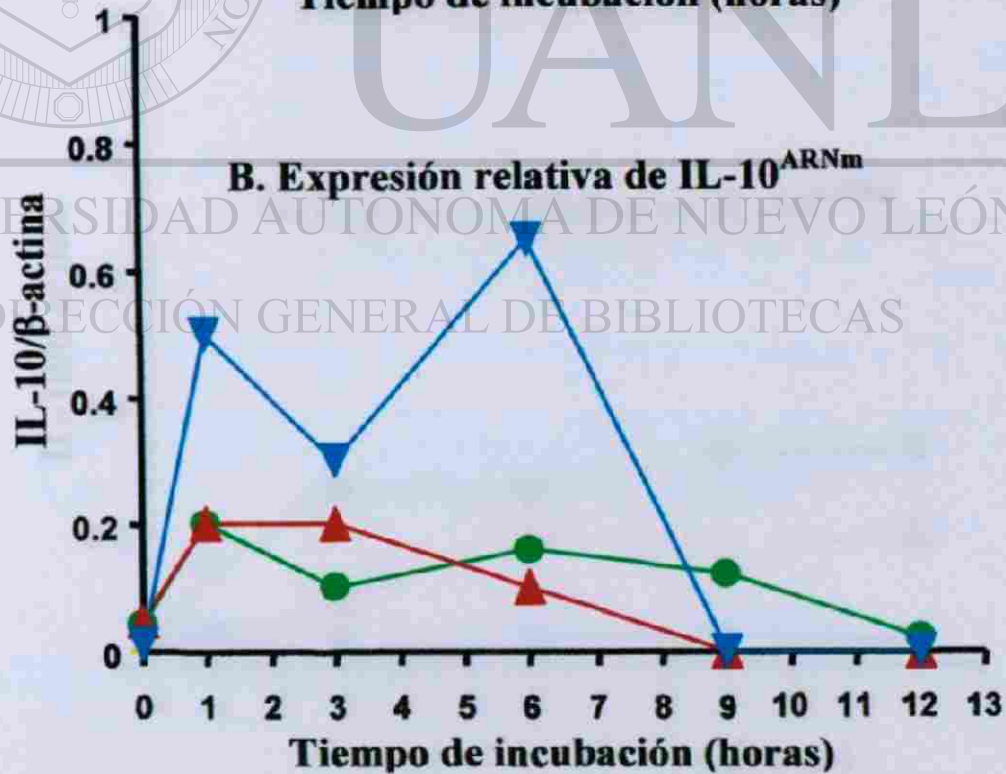
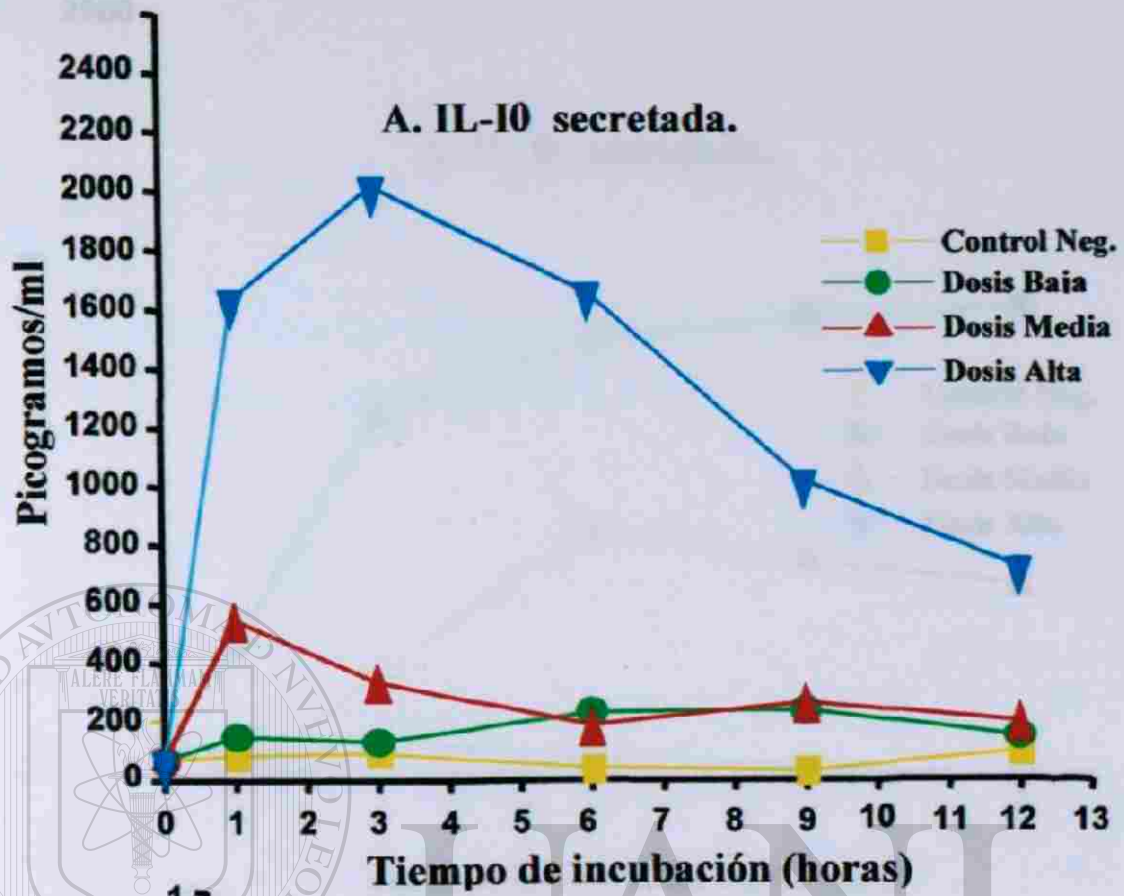


Figura 18. Secreción (A) y transcripción (B) de IL-10 por Mφs peritoneales de ratón BALB/c expuestos a *N. brasiliensis* en fase estacionaria.

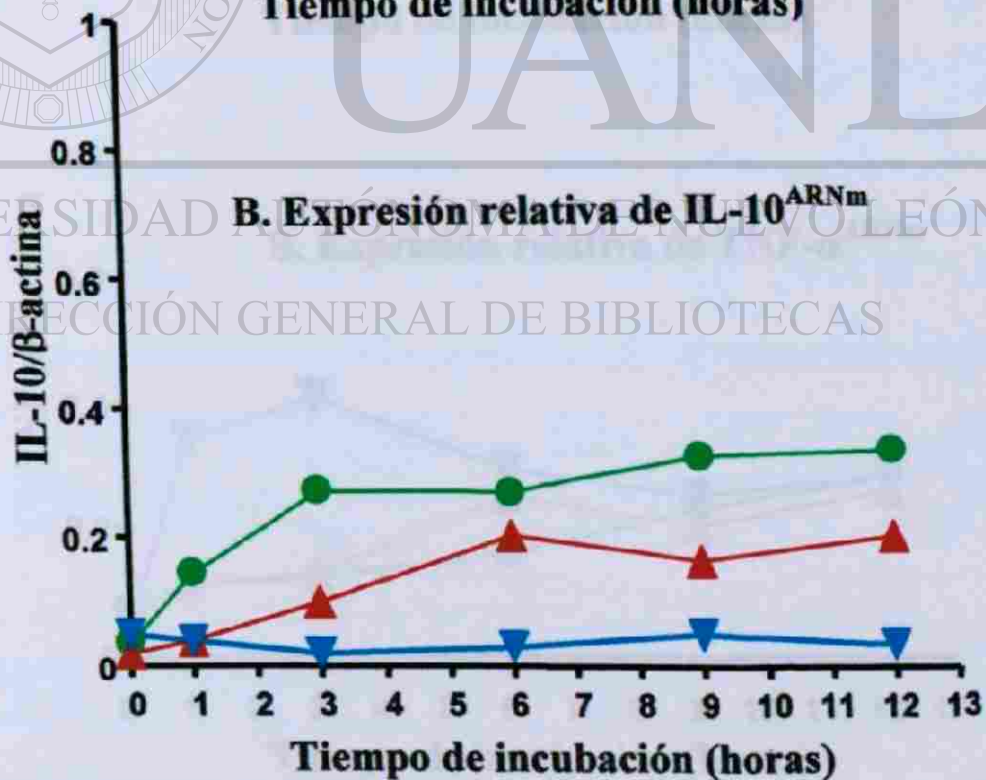
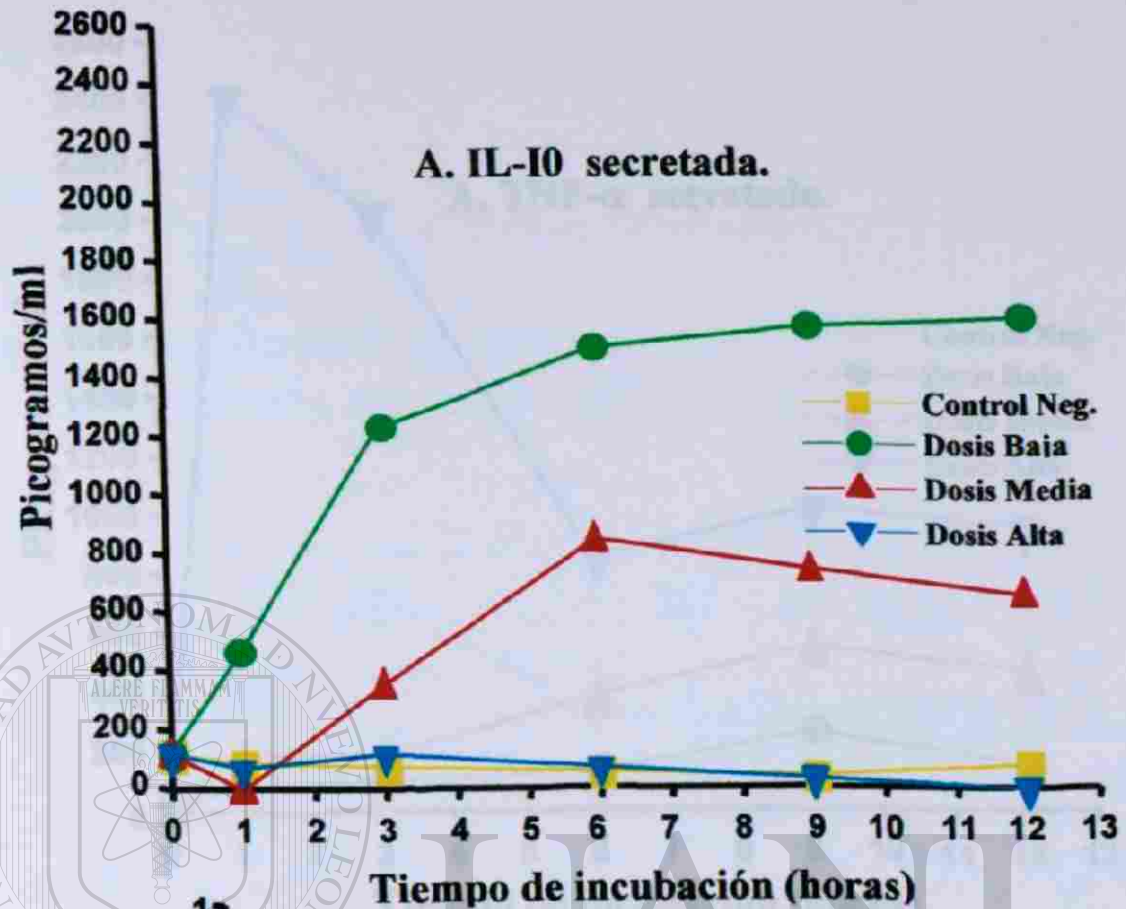


Figura 19. Secreción (A) y transcripción (B) de IL-10 por Mφs peritoneales de ratón BALB/c expuestos a *N. brasiliensis* en fase exponencial.

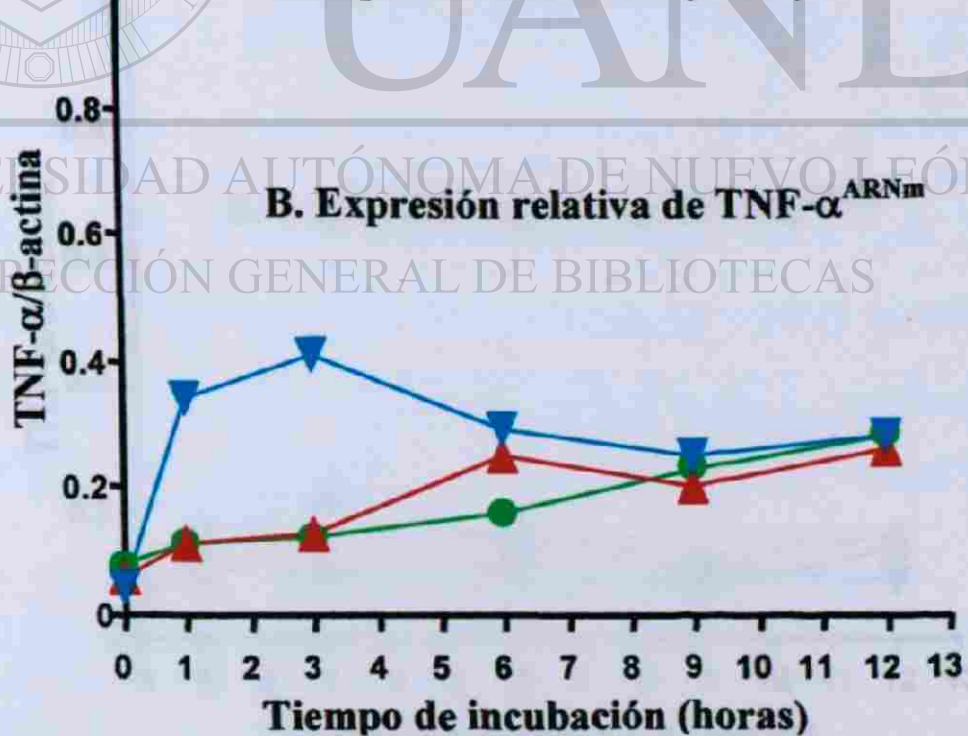
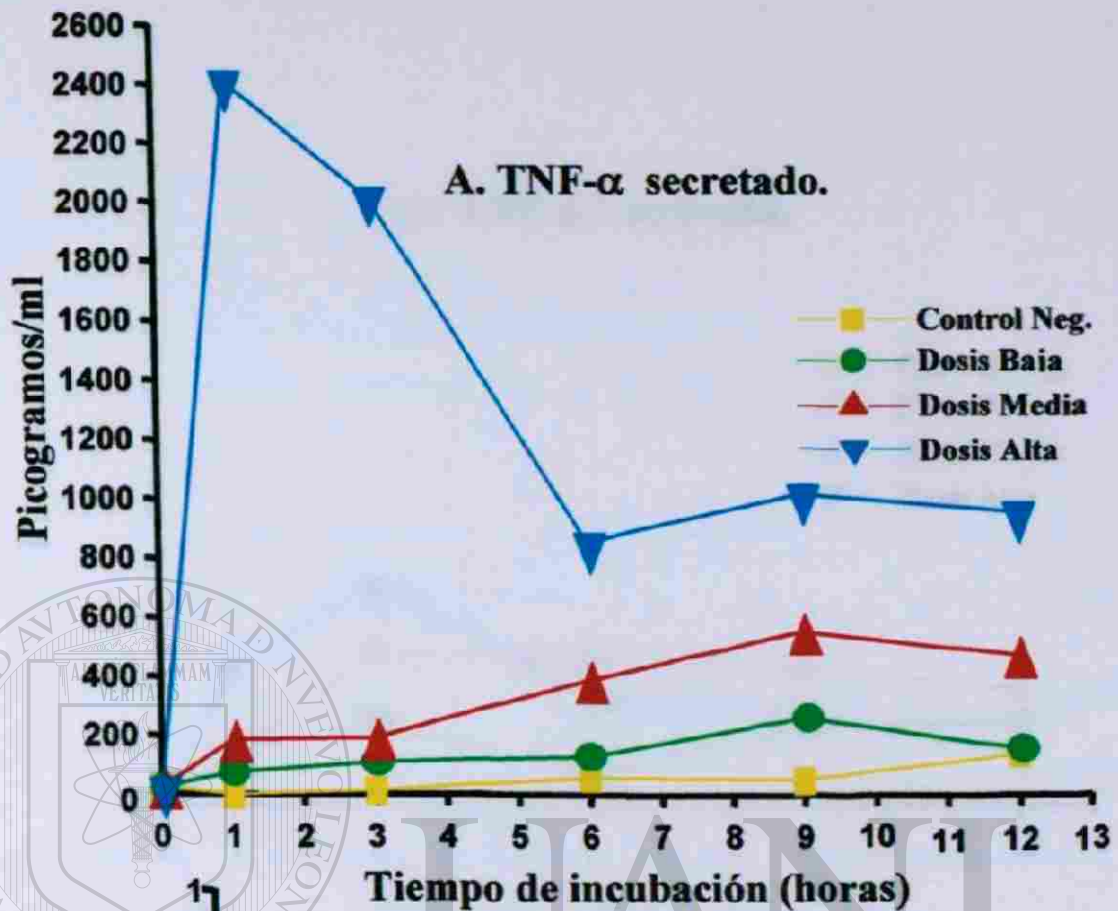


Figura 20. Secreción (A) y transcripción (B) de TNF- α por M ϕ s peritoneales de ratón BALB/c expuestos a *N. brasiliensis* en fase estacionaria.

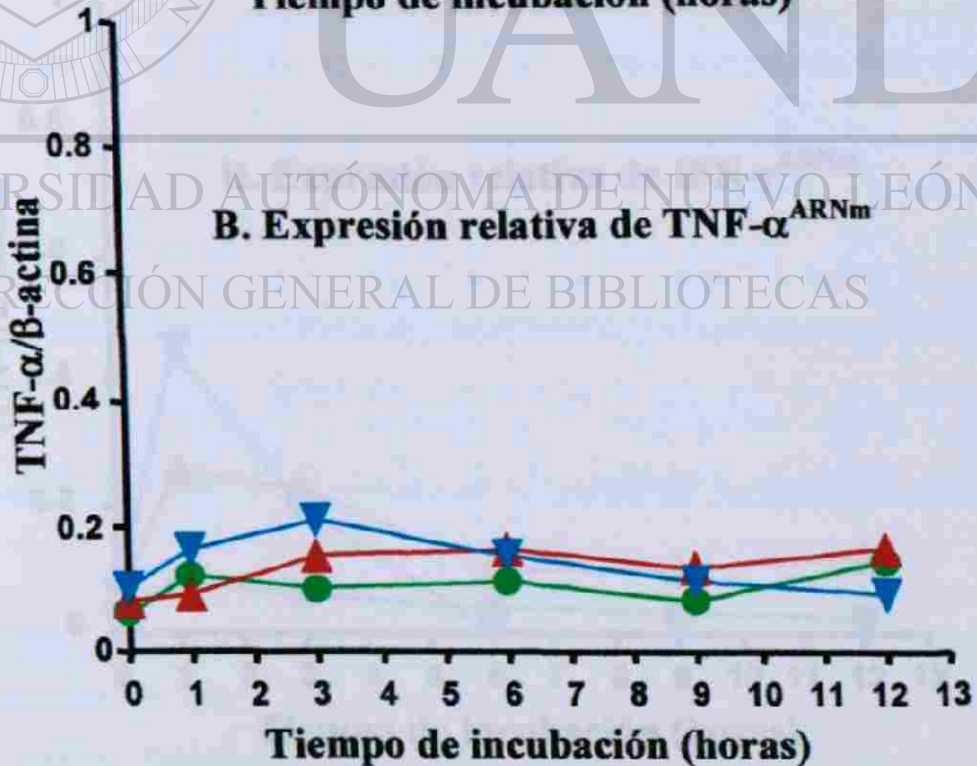
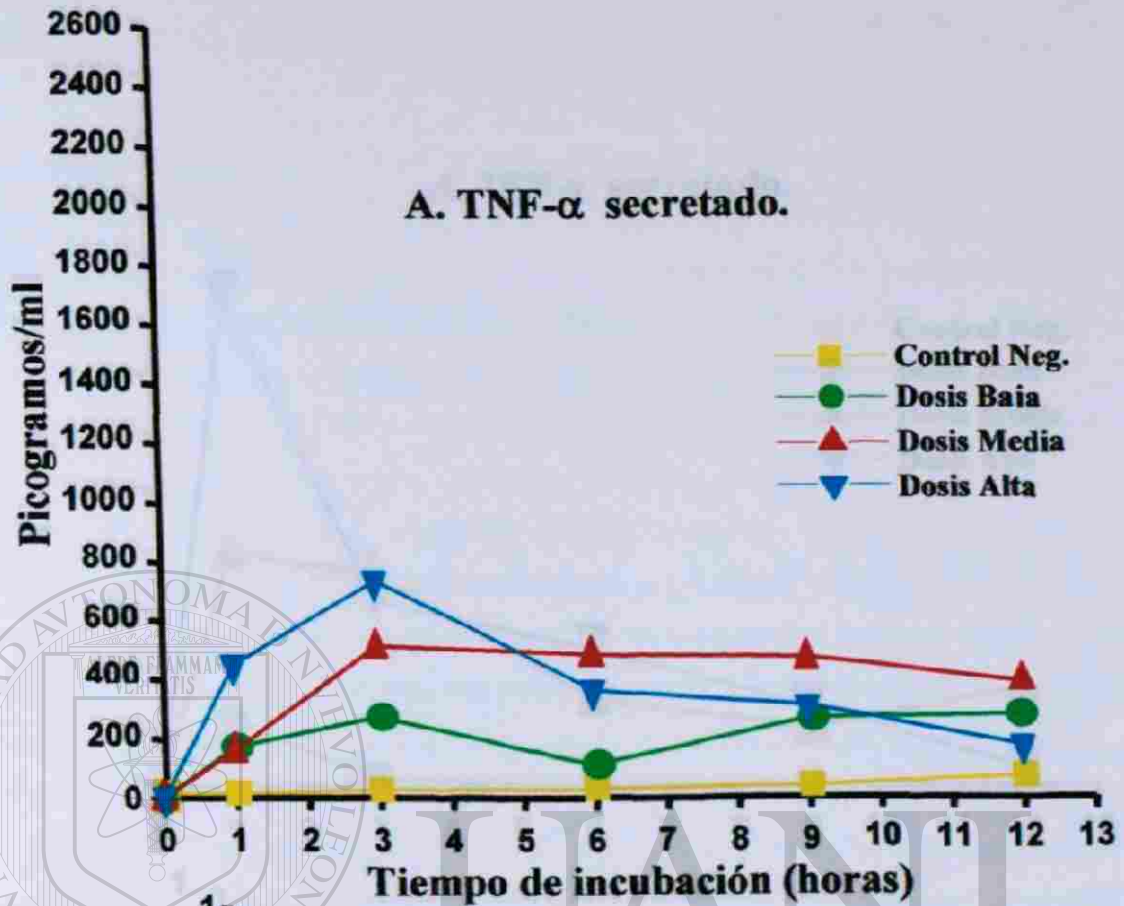


Figura 21. Secreción (A) y transcripción (B) de TNF- α por M ϕ s peritoneales de ratón BALB/c expuestos a *N. brasiliensis* en fase exponencial.

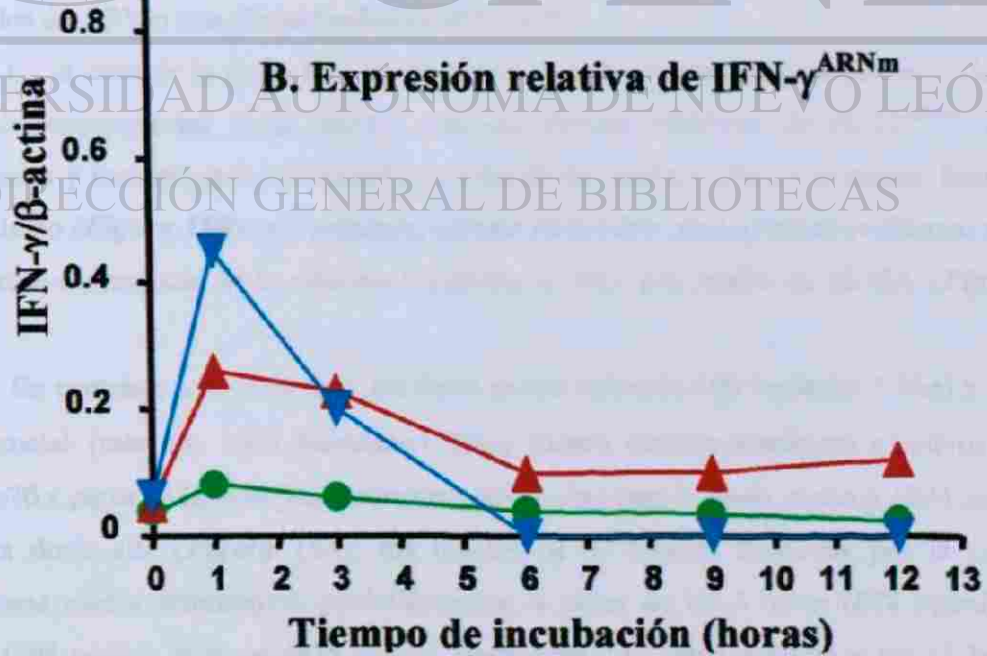
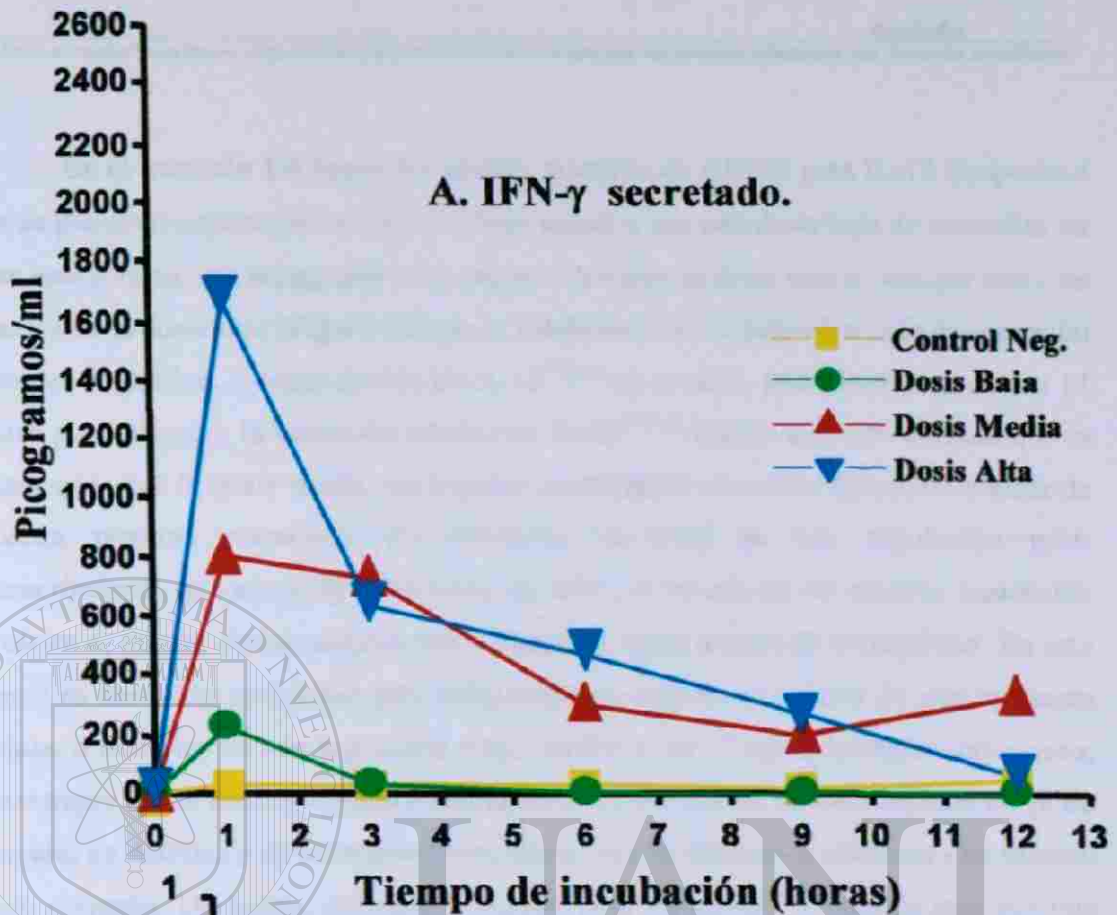


Figura 22. Secreción (A) y transcripción (B) de IFN- γ por M ϕ s peritoneales de ratón BALB/c expuestos a *N. brasiliensis* en fase exponencial.

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

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

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

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

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

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

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

3.1.2 IFN- γ

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

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

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

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

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

3.1.3 TNF- α

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

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

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

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

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

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

3.1.4 IL-10

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

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

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

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

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

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

3.1.5 IL-1

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

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

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

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

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

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

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

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

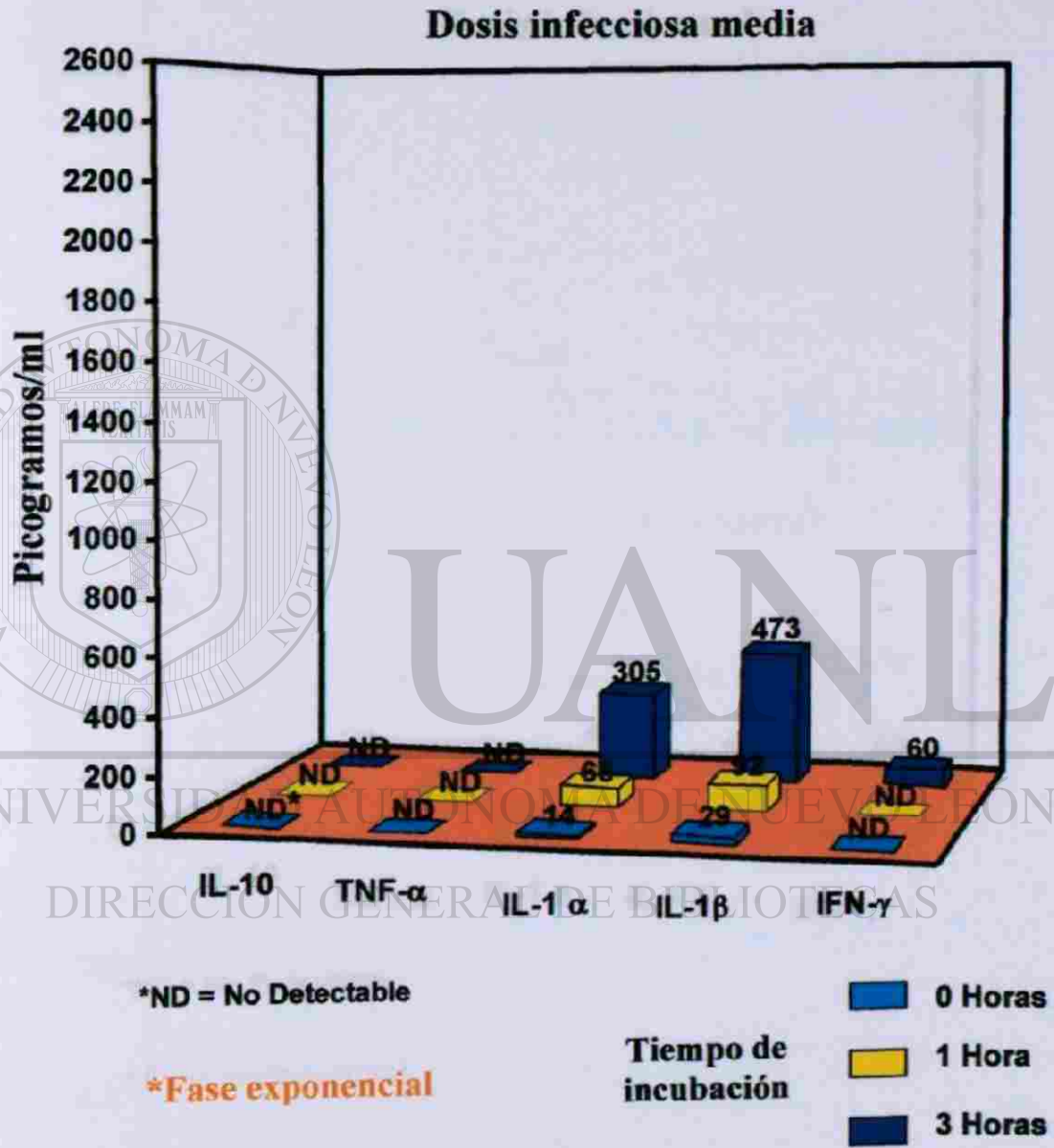


Figura 23. Producción de citocinas por M ϕ s peritoneales pretratados con Acs policlonales anti-*N. brasiliensis*.*

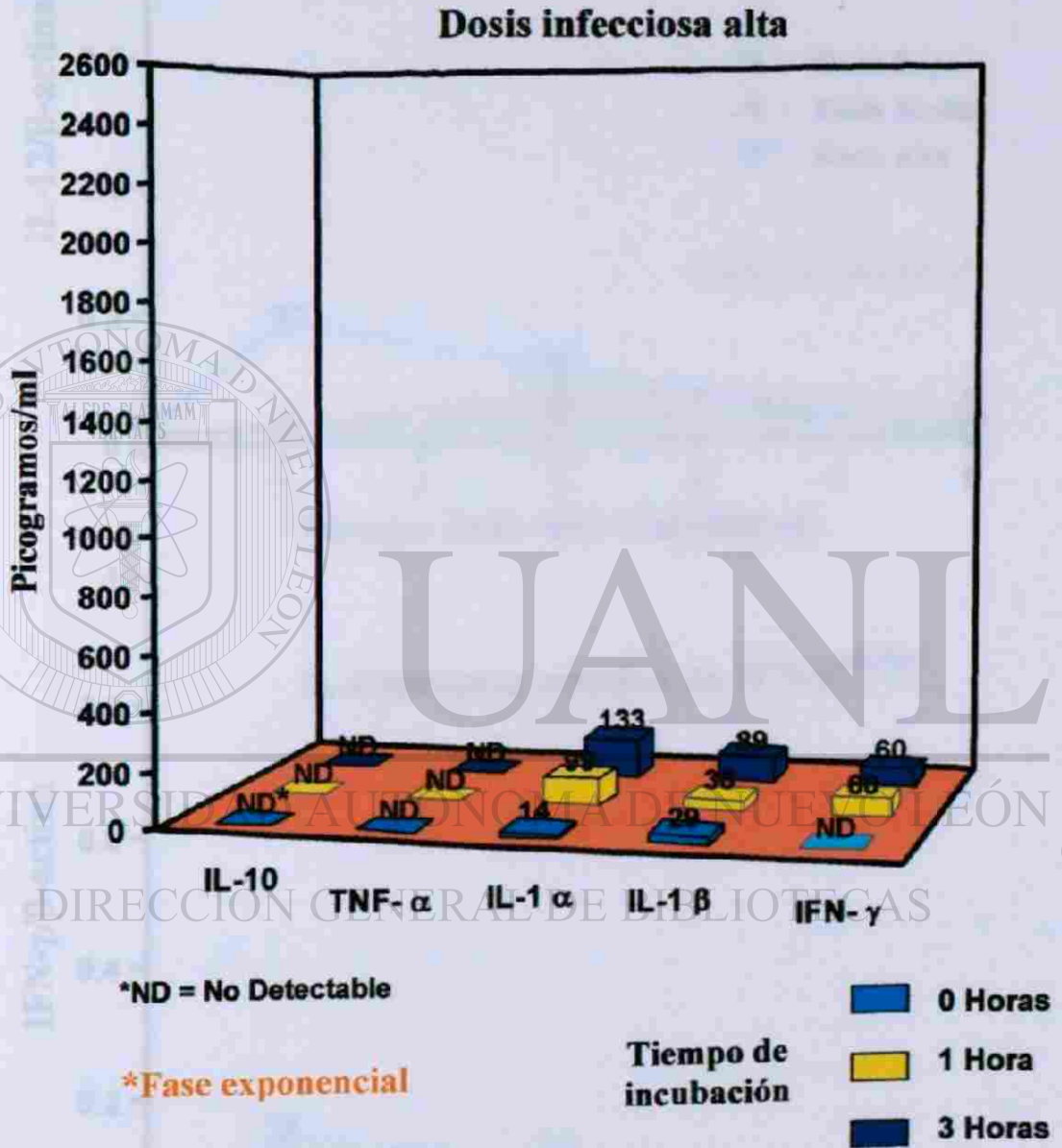


Figura 24. Producción de citocinas por M ϕ s peritoneales pretratados con Acs policlonales anti-*N. brasiliensis**.

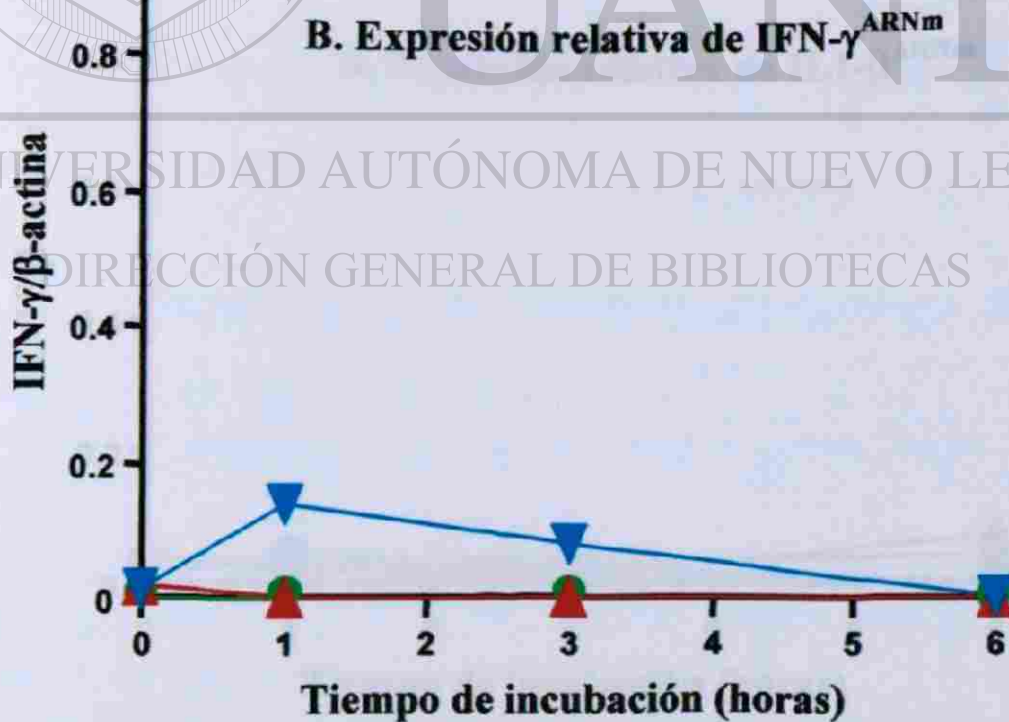
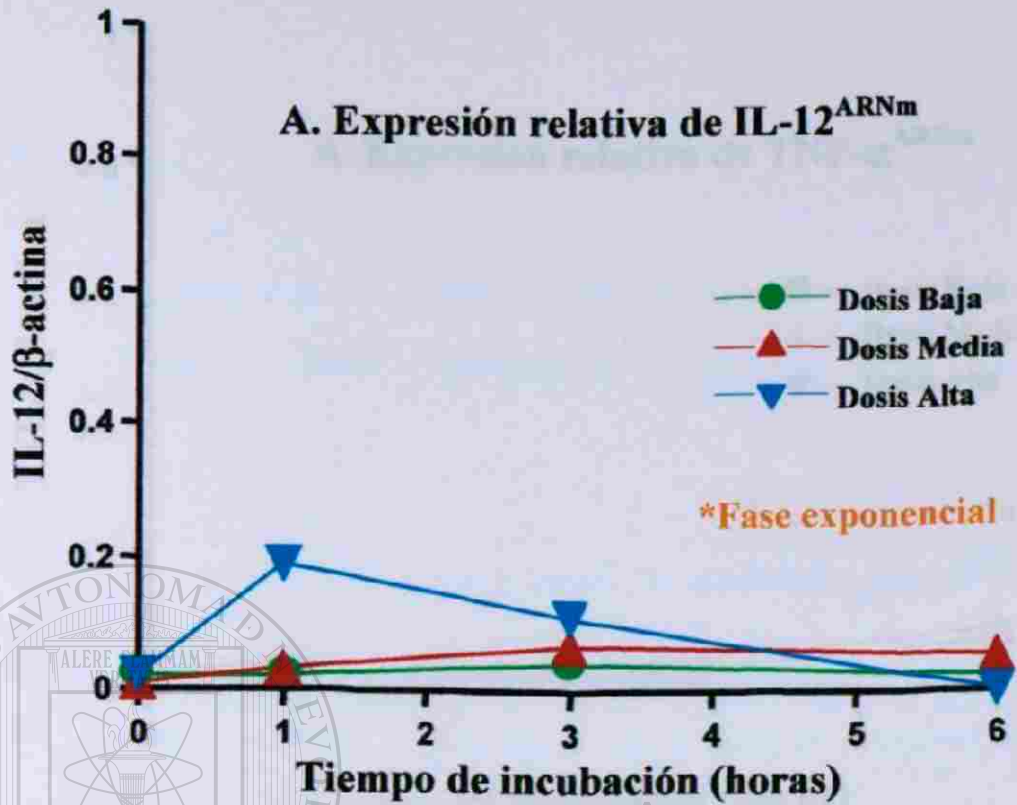


Figura 25. Transcripción de IL-12 (A) e IFN- γ (B) en M ϕ s peritoneales de ratón BALB/c expuestos a *N. brasiliensis** opsonizada con Ac monoclonal anti-P61.

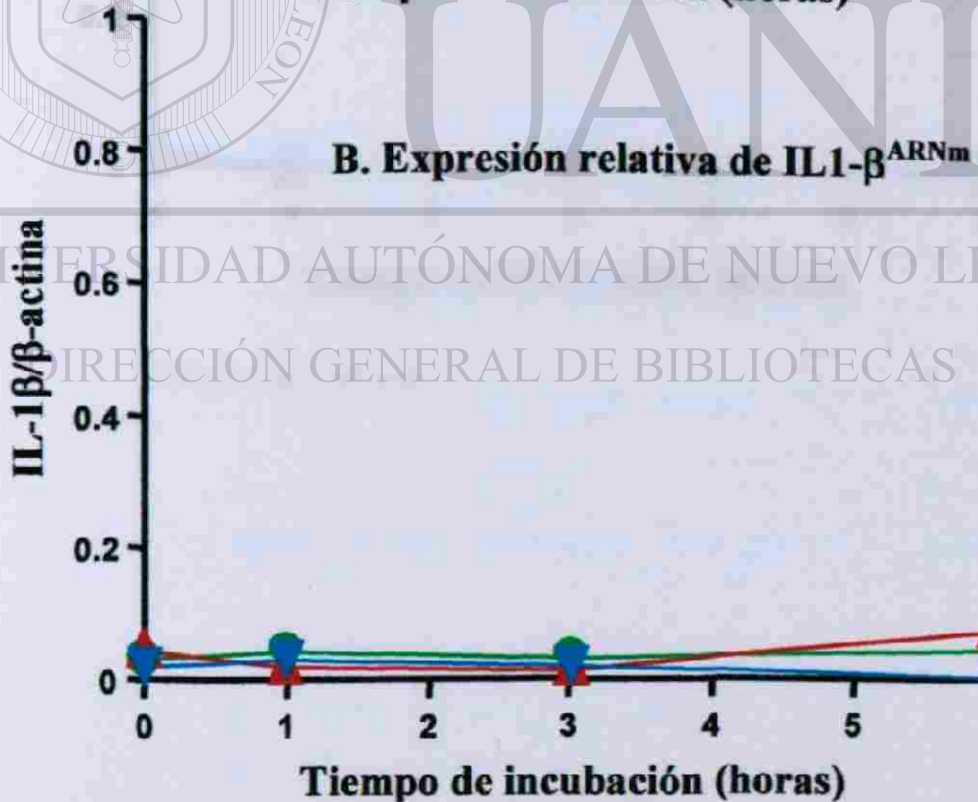
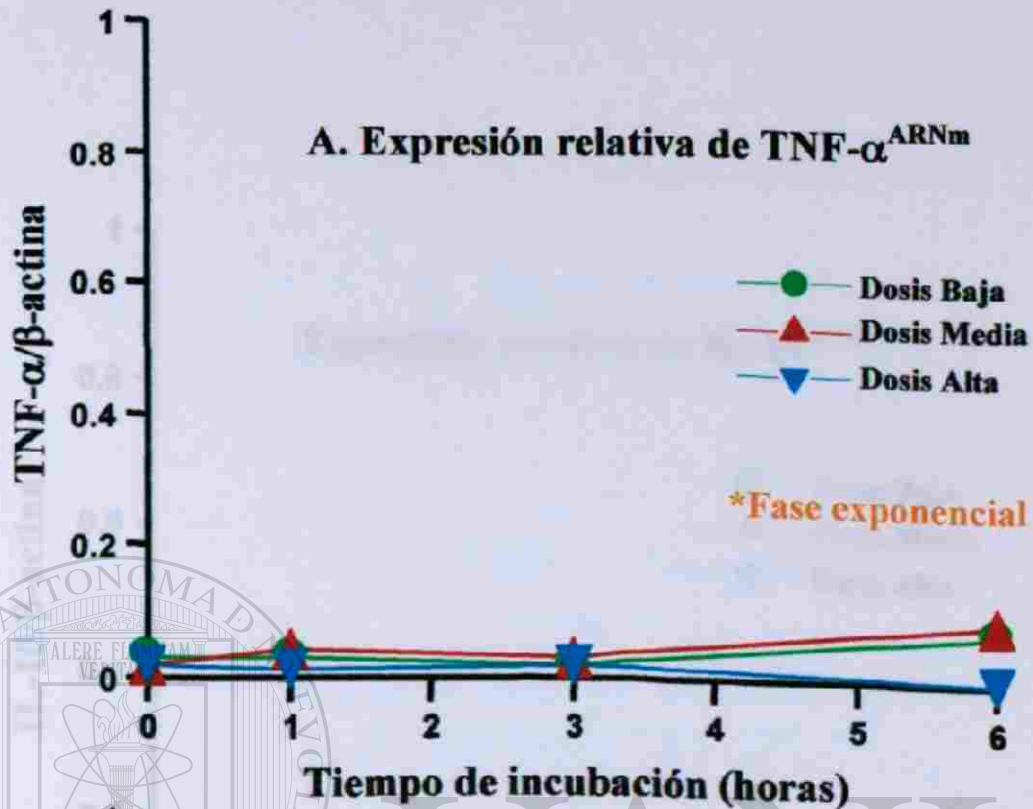
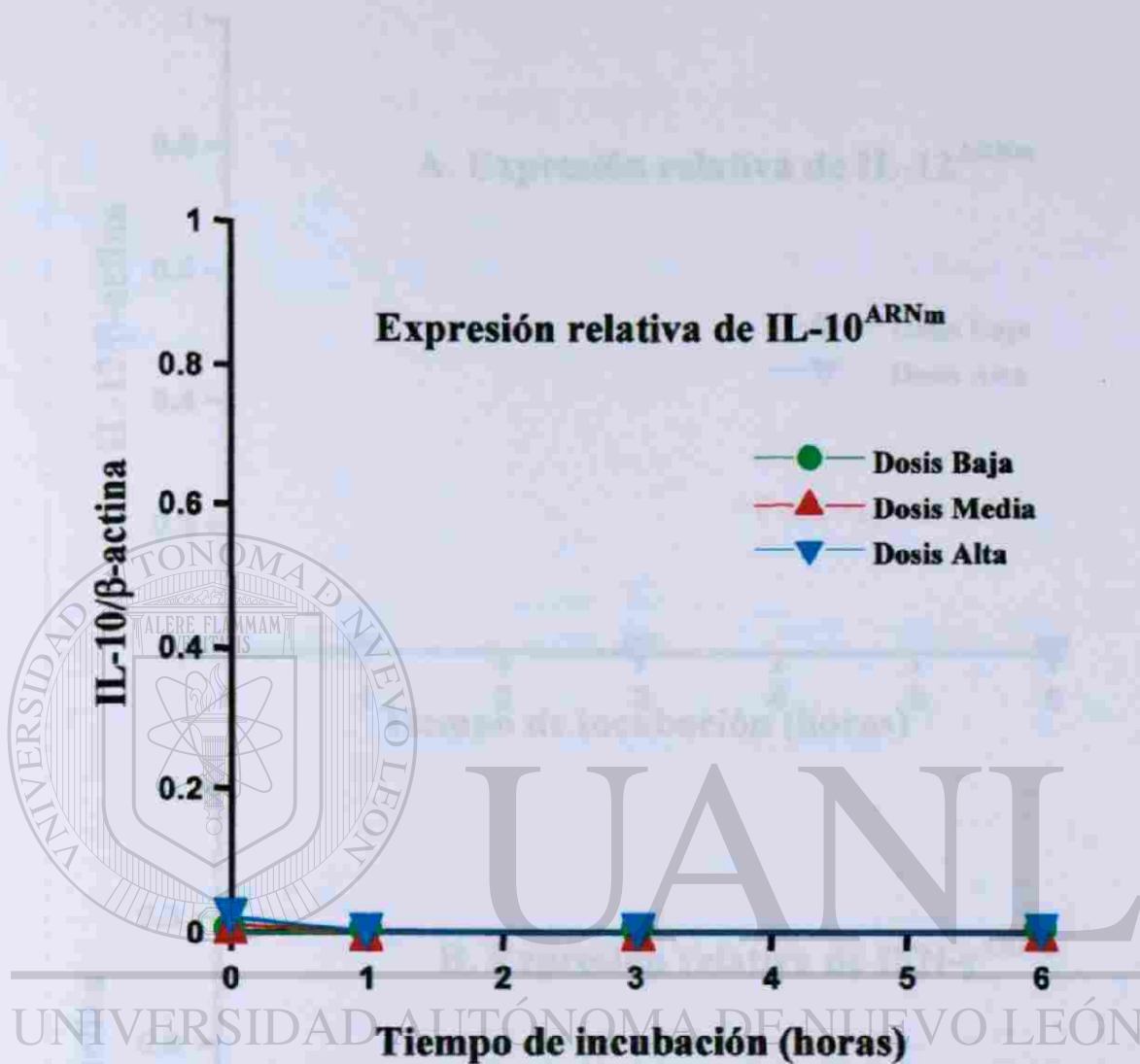


Figura 26. Transcripción de TNF- α (A) e IL-1 β (B) en M ϕ s peritoneales de ratón BALB/c expuestos a *N. brasiliensis** opsonizada con Ac monoclonal anti-P61.



* Fase exponencial

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

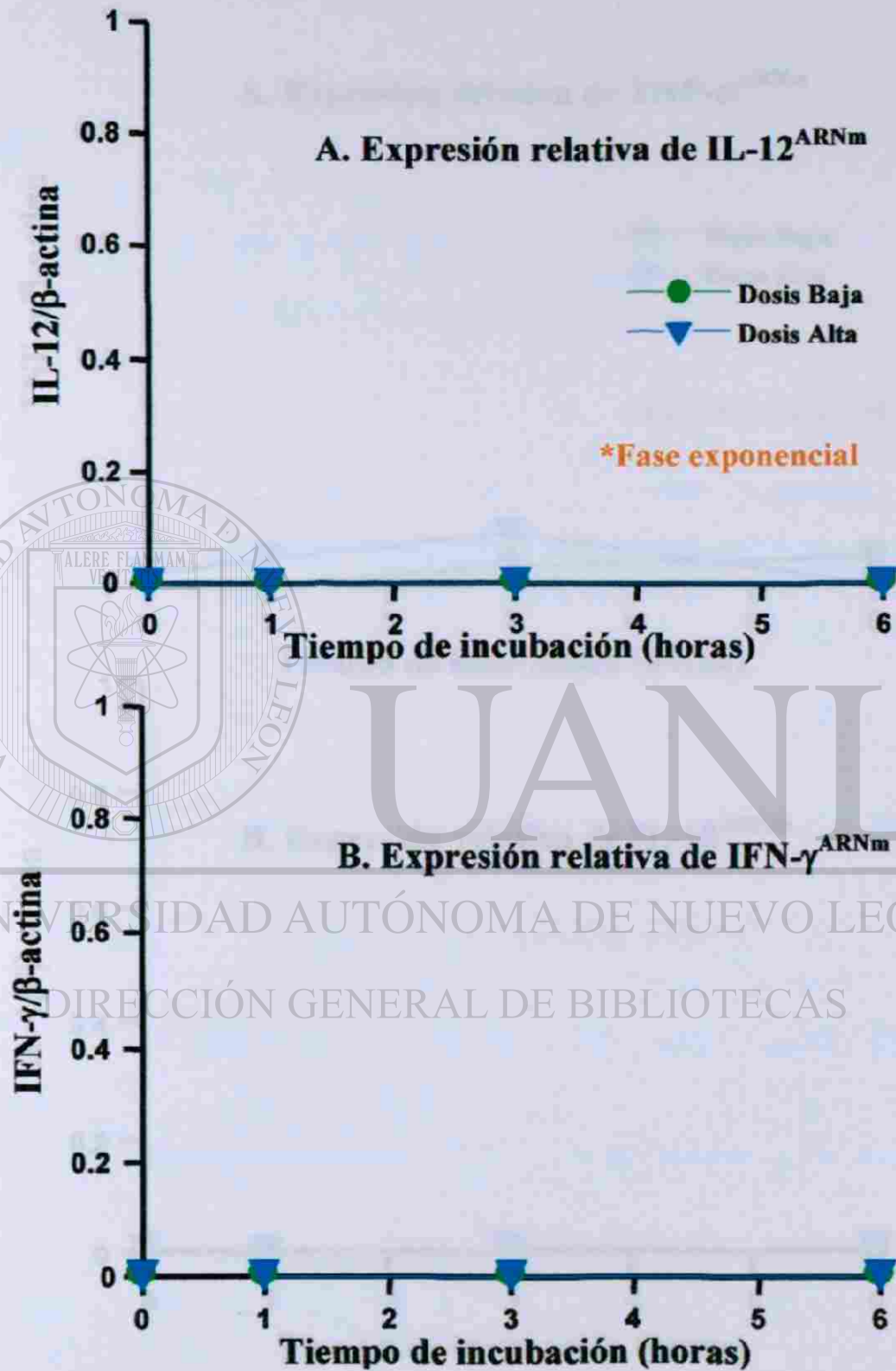


Figura 28. Transcripción de IL-12 (A) e IFN- γ (B) en M ϕ s peritoneales de ratón BALB/c expuestos a *N. brasiliensis** opsonizada con Acs policlonales anti-*N. brasiliensis*.

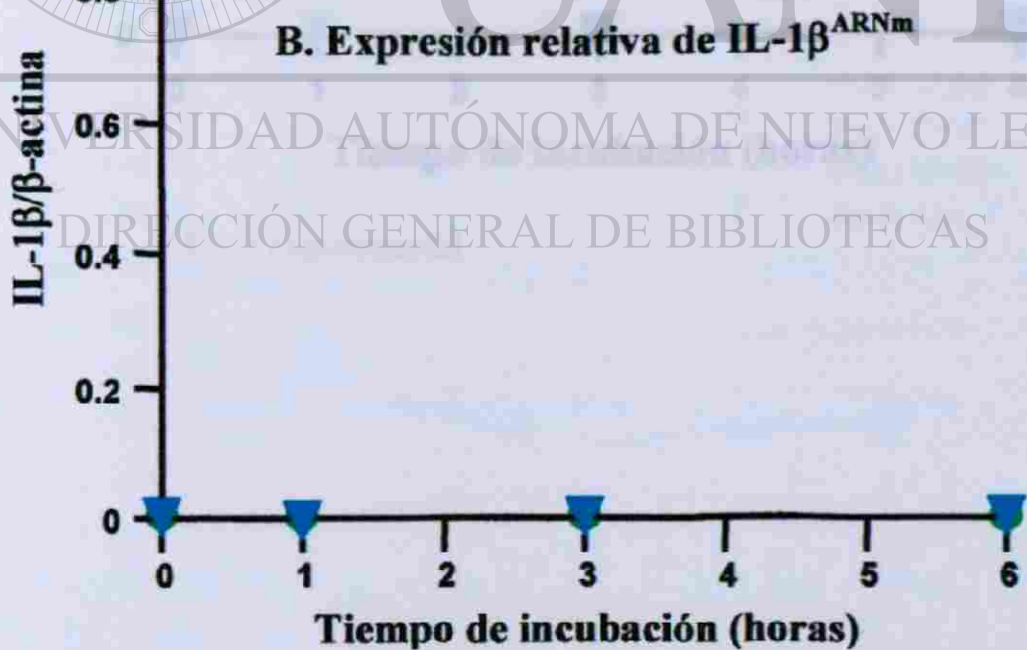
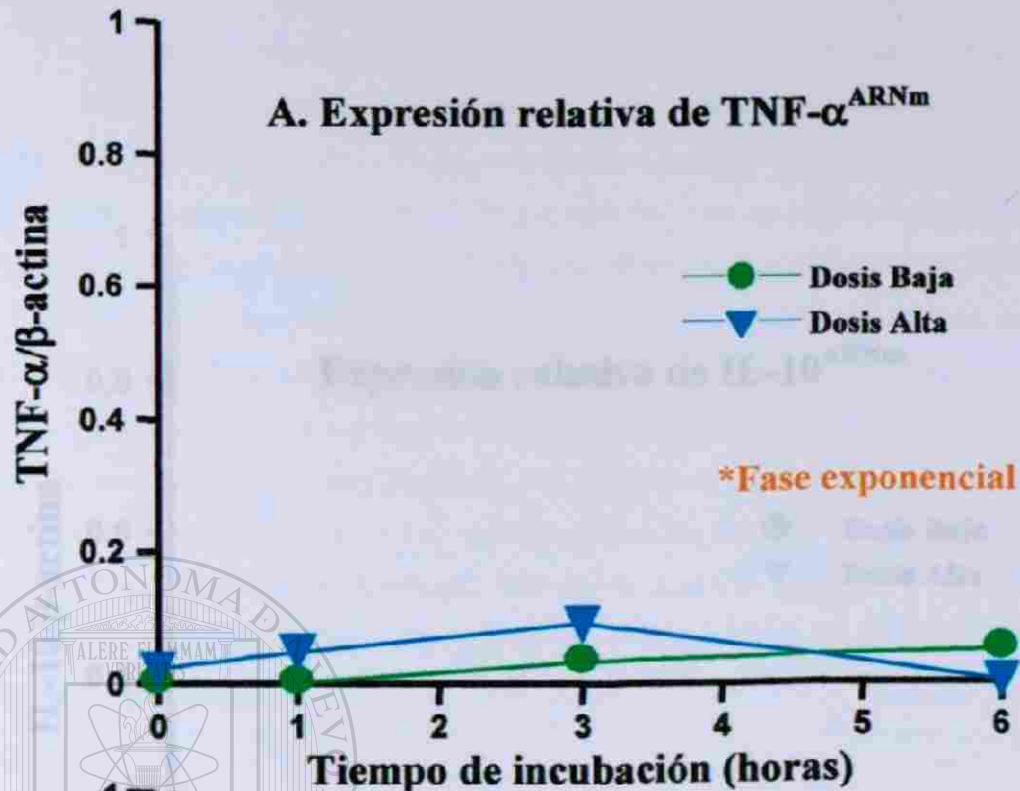


Figura 29. Transcripción de $\text{TNF-}\alpha$ (A) e $\text{IL-1}\beta$ (B) en Mφs peritoneales de ratón BALB/c expuestos a *N. brasiliensis** osonizada con Acs policlonales anti-*N. brasiliensis*.

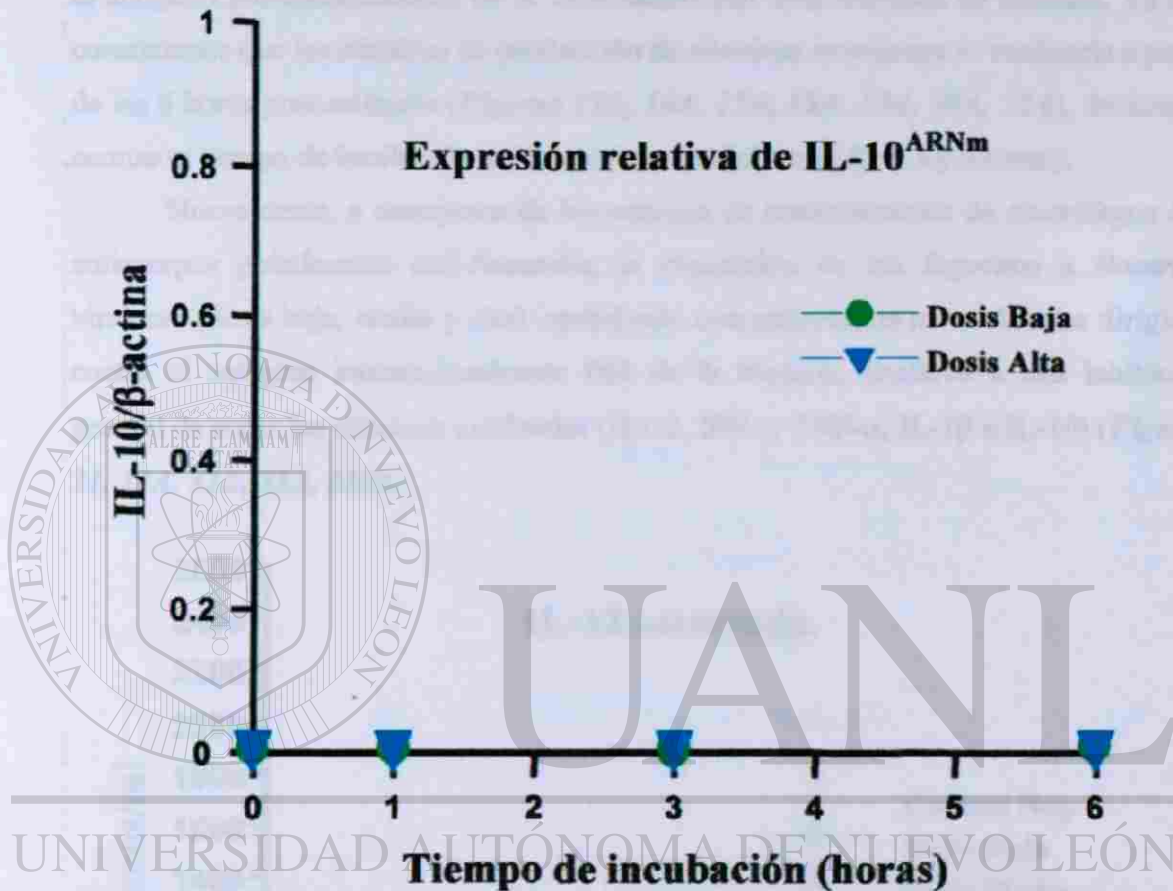


Figura 30. Transcripción de IL-10 en Mφs peritoneales de ratón BALB/c expuestos a *N. brasiliensis** opsonizada con Acs policlonales anti-*N. brasiliensis*.

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

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

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

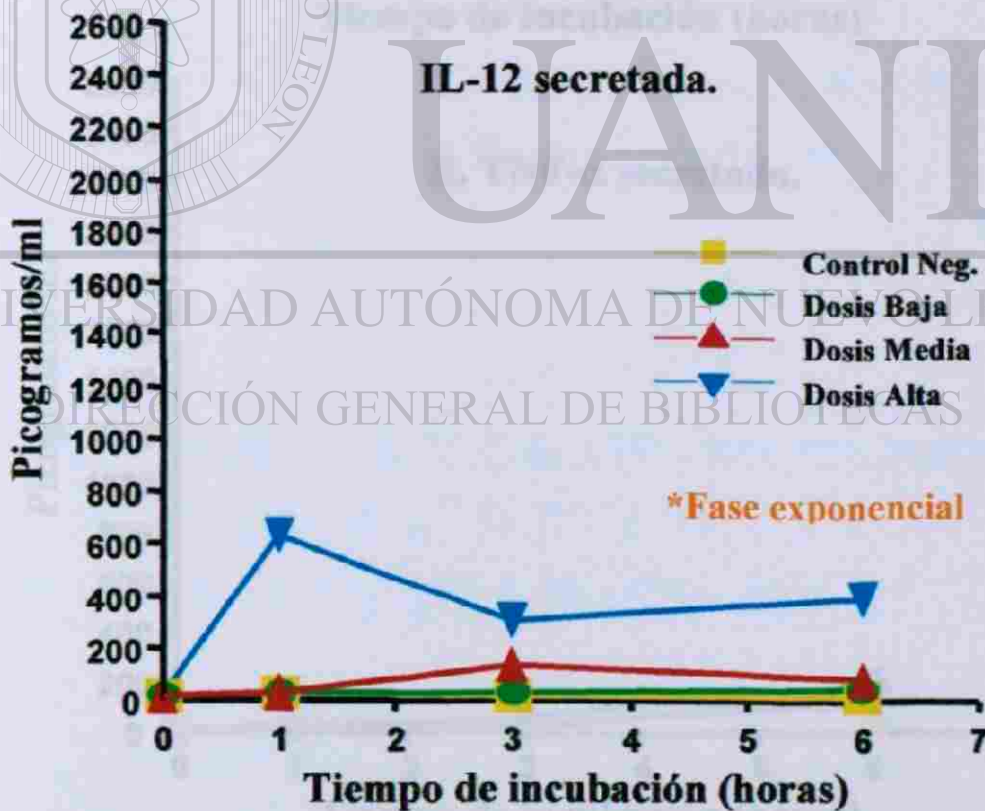


Figura 31. Secreción de IL-12 por M ϕ s peritoneales de ratón BALB/c expuestos a *N. brasiliensis** opsonizada con Ac monoclonal anti-P61.

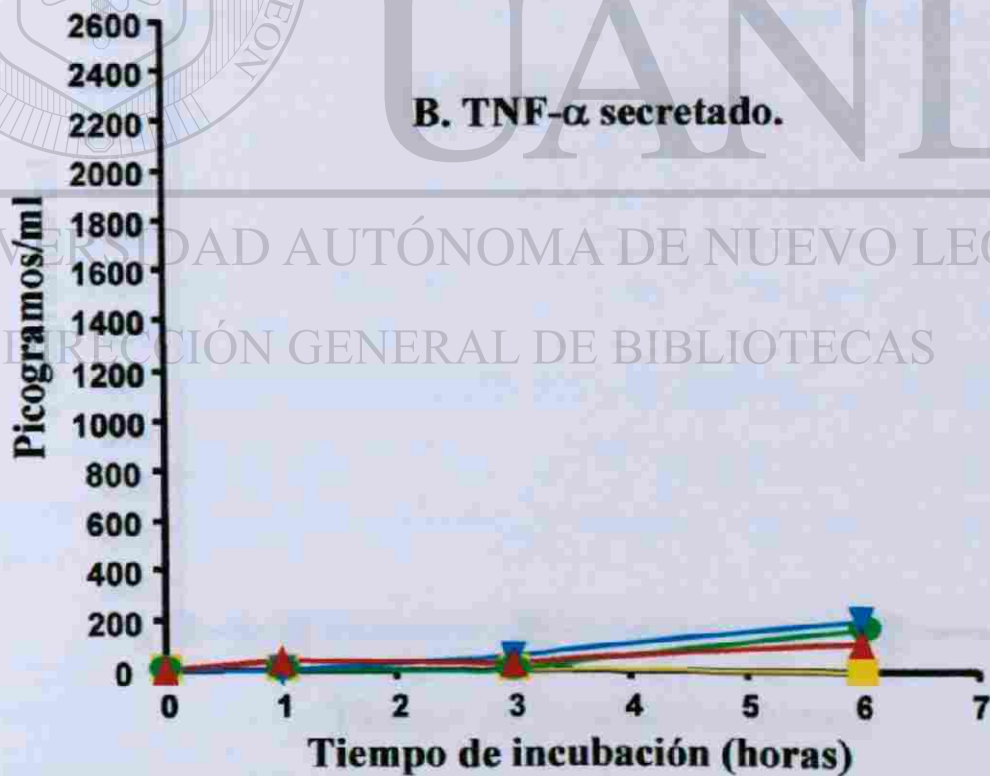
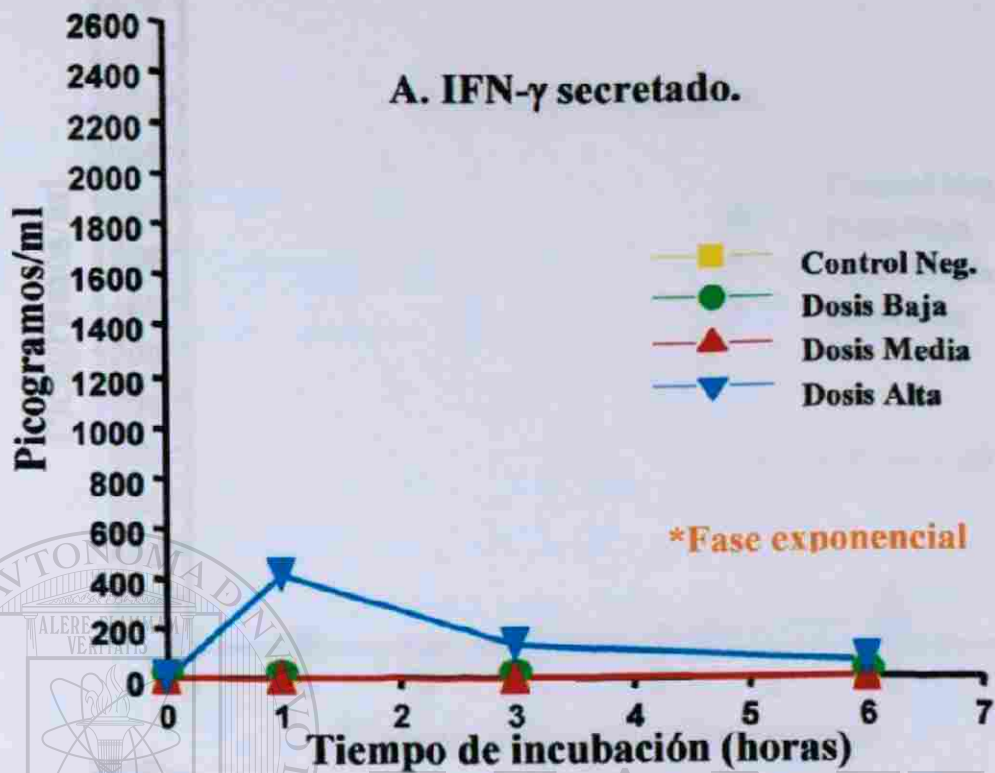


Figura 32. Secreción de IFN- γ (A) y TNF- α (B) por M ϕ s peritoneales de ratón BALB/c expuestos a *N. brasiliensis** opsonizada con Ac monoclonal anti-P61.

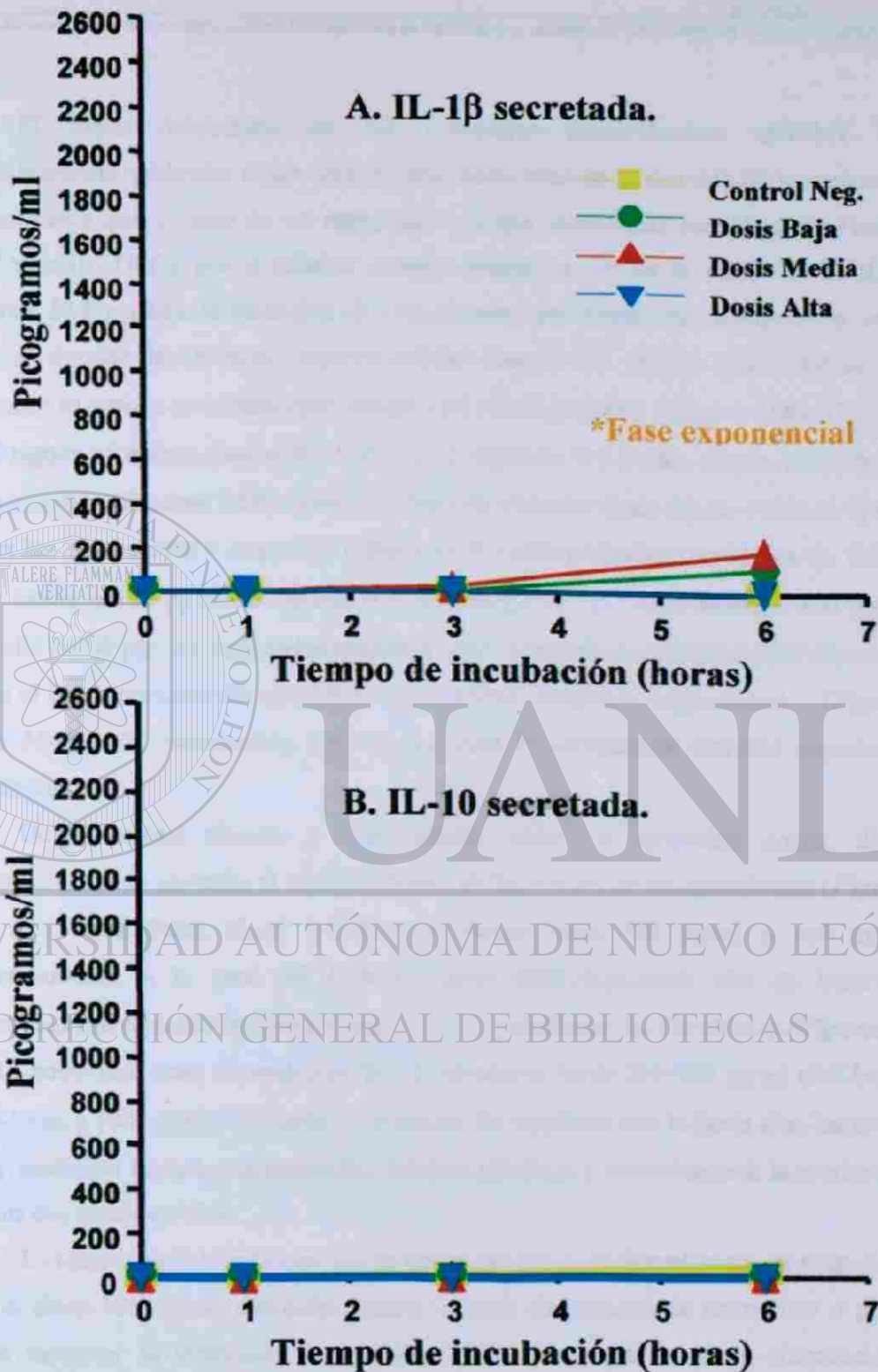


Figura 33. Secreción de IL-1 β (A) e IL-10 (B) por M ϕ s peritoneales de ratón BALB/c expuestos a *N. brasiliensis** opsonizada con Ac monoclonal anti-P61.

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

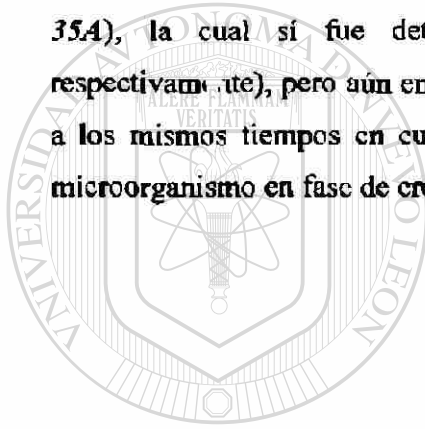
De la misma manera y aún cuando, como se menciona arriba, distan sustancialmente de asemejar el efecto inductor de las nocardias no opsonizadas (*Figuras 13A, 14A, 15A, 26A*), IL-12 e IFN- γ se elevan hasta 560 pg/ml y 400 pg/ml, respectivamente, a la hora del enfrentamiento macrófago-dosis alta de bacterias,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

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

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

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

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



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

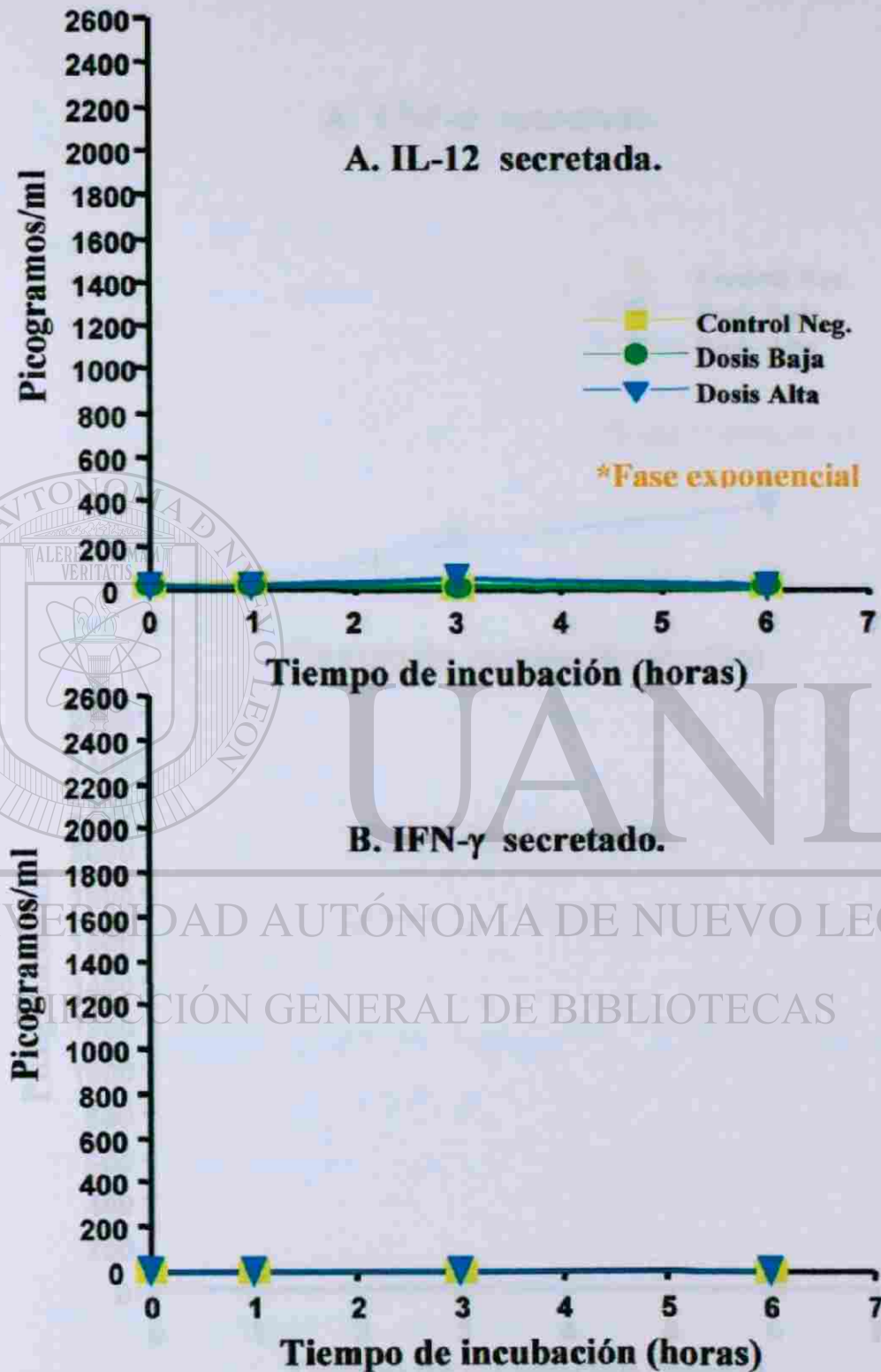


Figura 34. Secreción de IL-12 (A) e IFN- γ (B) por M ϕ s peritoneales de ratón BALB/c expuestos a *N. brasiliensis** opsonizada con Acs policlonales anti-*N. brasiliensis*.

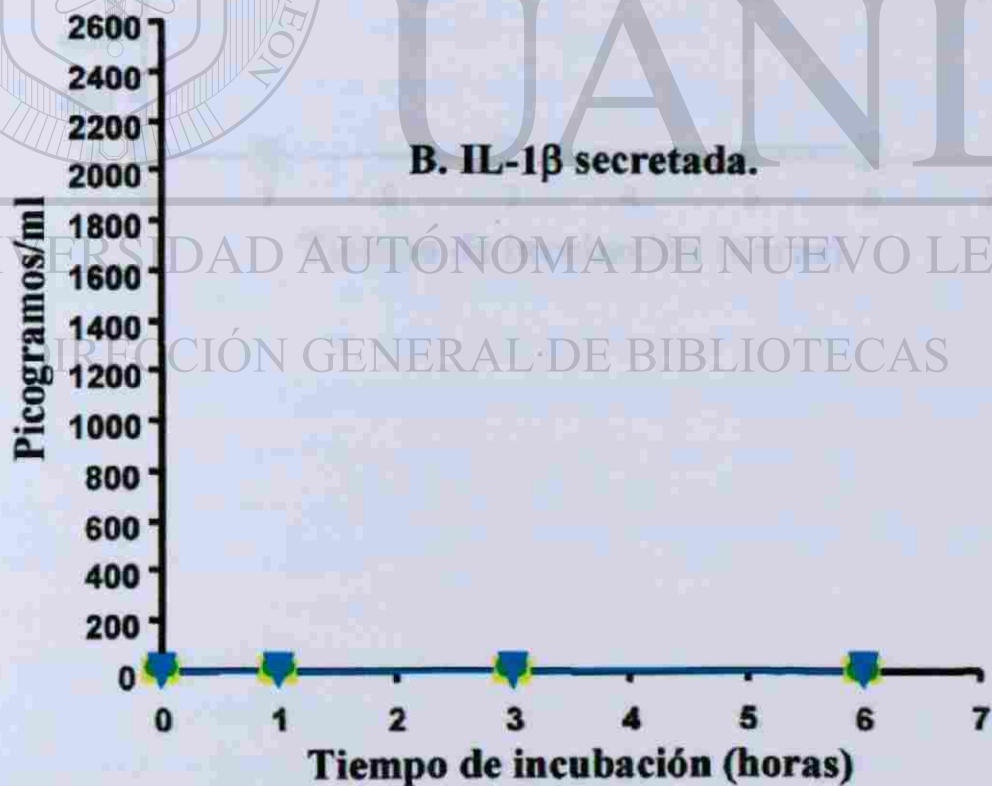
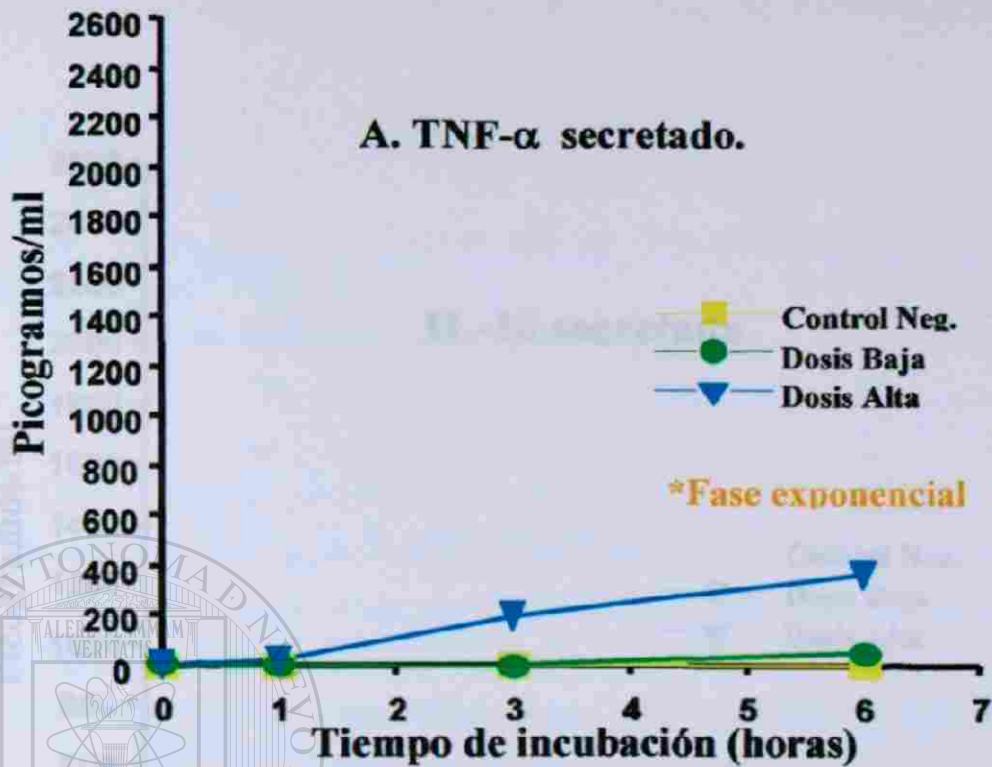


Figura 35. Secreción de TNF- α (A) e IL1- β (B) por M ϕ s peritoneales de ratón BALB/c expuestos a *N. brasiliensis* opsonizada con Acs policlonales anti-*N. brasiliensis*.



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

CAPÍTULO 4. DISCUSIÓN

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

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

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

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

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

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

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

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

4.2 Efectos de la dosis bacteriana.

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

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

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

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

4.3 Tiempos cortos de experimentación.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

4.4 IL-12 e IFN- γ

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Shibuya *et al.* (205) deducen que las células NK son la principal fuente temprana de IFN- γ en ratones C57BL/6-IL-10^{tm¹Ca⁺} (knockout para IL-10), a pesar que en ningún momento del artículo se menciona acerca de la capacidad alguna por M ϕ s para producir esta citocina. En el mismo tenor, infecciones *in vivo* llevadas a cabo con *Bacillus abortus* (206), *Candida albicans* y *C. brucei* (207), Gram positivas y Gram negativas (7 especies de cada grupo) (208), *L. monocytogenes* (208) y *M. tuberculosis* (209) se basan en el análisis *ex-vivo* de tejidos o fracciones tisulares con alto grado de heterogeneidad celular como lo son células mononucleares de sangre periférica, bazo, y combinaciones mixtas de M ϕ s con linfocitos T, con el fin de inferir el origen del IFN- γ secretado al medio de cultivo. En todos los casos, el análisis de los diseños experimentales e idea integral expuesta en el texto introductorio y discusión, vislumbra una tácita, aunque no siempre directa, aseveración que involucra exclusivamente a células NK y T (CD4⁺ o CD8⁺) en la producción de IFN- γ , el cual ahora sí actúa sobre las células macrofágicas.

M ϕ s alveolares (de ratones C57BL/6), infectados con BCG (0.5x10⁶ UFC por vía intra-traqueal) y estimulados posteriormente *ex-vivo* con PPD o LPS, producen cantidades considerables de interferón gamma, no así el caso de M ϕ s pleurales aislados de ratones knockout para IL-12 (IL-12^{-/-}) con el mismo fondo genético (209). En este estudio, en ausencia de IL-12, una cepa atenuada de *M. bovis* (relación 50 micobacterias:1 M ϕ) fue incapaz de inducir la secreción de IFN- γ por M ϕ s alveolares vírgenes (de la cepa C57BL/6). Munder *et al.* (210) demostraron que el IFN- γ endógeno producido por M ϕ s derivados de médula ósea (cepa de ratón AKR/N) tratados con una combinación de IL-12 e IL-18, posee actividad biológica al ser capaz de inducir, en forma autócrina, la actividad de iNOS. Salins *et al.* (211), por su parte, observaron una correlación entre la multiplicación intracelular de *L. pneumophila* en M ϕ s inducidos (con tioglicolato), y la expresión de IFN- γ ^{ARNm} y su posterior traducción a proteína.

No obstante que en la mayoría de las infecciones causadas por microparásitos intracelulares la presencia de IFN- γ se asocia a la estructuración de una respuesta inmune celular benéfica para el huésped, algunos antecedentes sustentan la hipótesis controversial que los M ϕ s están involucrados como efectores centrales en la inhibición de la respuesta blastogénica de células T a mitógenos y antígenos durante la infección originada por *Trypanosoma brucei* – tripanosomiasis africana (212). Este papel supresivo de M ϕ s, a través de la producción de IFN- γ , es secundado por los estudios de Darji *et al.* (213), en el que muestran que células de hibridoma macrofágicas 2C11-12P infectadas con *T. brucei* (relación 100 parásitos:1M ϕ) actúan en el entorno local, secretando IFN- γ (y probablemente otros factores solubles) para inhibir las respuestas proliferativas de células T CD4⁺ y T CD8⁺; simultáneamente el interferón inmune de procedencia macrofágica obra sobre células T CD8⁺ para provocar, con la ayuda sinérgica de TNF- α , ahora una hiperproducción del IFN- γ “inmunosupresor”. Por su parte, Baetselier *et al.* (10) inoculan por vía intraperitoneal *T. brucei* (2x10³ parásitos) en ratones BALB/c y evidencian que durante las fases temprana y tardía de la infección *in vivo*, los M ϕ s inducidos adquieren un fenotipo funcional Th1, el cual se ajusta al bloqueo de la activación *ex-vivo* de células T por mitógeno, superantígeno o antígeno. Hertz *et al.* (214) contribuyen a la controversia en torno al papel del IFN- γ en la inhibición causada durante tripanosomiasis (africana), al presentar una correlación inversa entre la producción de IFN- γ *in vivo* en ratones infectados con *T. brucei rhodesiense* (1x10⁵ tripanosomas/ ratón *via i.p.*) y el crecimiento del parásito; sin embargo, este último grupo de investigadores subraya que la fuente primaria del IFN- γ producido durante la respuesta inmune a los antígenos del parásito son explícitamente células T CD4⁺, TCR- $\alpha\beta$, MHC-restringidas.

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

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

4.5 TNF- α

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

4.6 IL-1 β

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

4.7 IL-10

Interleucina-10 o factor inhibidor de síntesis de citocinas, fue descrito inicialmente como una molécula proteínica secretada por células Th2 de ratón y que inhibe la activación de células Th1, así como también su proliferación (263).

Actualmente sabemos que esta molécula representa un excelente regulador negativo de fenómenos inmunológicos.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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

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

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

CIs IgG-OVA administrados en el momento de desafío con *L. monocytogenes*, causan en ratones A/J y CBA/J un estado transitorio de susceptibilidad a la infección por éste parásito intracelular, asociado a la supresión de la respuesta inmune celular y al bloqueo de la expresión de moléculas Ia (equivalente al MHC II en el humano) sobre macrófagos *in vivo* (323, 324). *In vitro*, CIs – IgG-DNP₃₄ASB, IgG-DNP-KLH o IgG-FITC₃ASB – adheridos, pero no solubles, inhiben la inducción de moléculas codificadas por loci H2 (I-A, I-E y K) sobre macrófagos tratados (“primed”) con IFN-γ y posteriormente estimulados con *L. monocytogenes* muerta por calor; la inhibición involucra la presencia del componente Fc de inmunoglobulinas, mas no la porción F(ab')₂ y es independiente de células T. En contraste a la disminución de expresión de glicoproteínas I-A^K, la citotoxicidad antitumoral (hacia la línea celular P-815) de macrófagos peritoneales (inducidos y pretratados con la combinación IFN-γ + LPS) es potenciada por los CIs – un efecto asociado probablemente al aumento de TNF-α (324).

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

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

por células macrofágicas activadas con IFN- γ + LPS. Además, se requiere la ligación de Fc γ R en conjunto con una señal coestimuladora (como por ej. productos bacterianos) para que se realice la máxima liberación de IL-10 por macrófagos infectados con amastigotes (127).

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

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

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

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

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

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

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

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

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

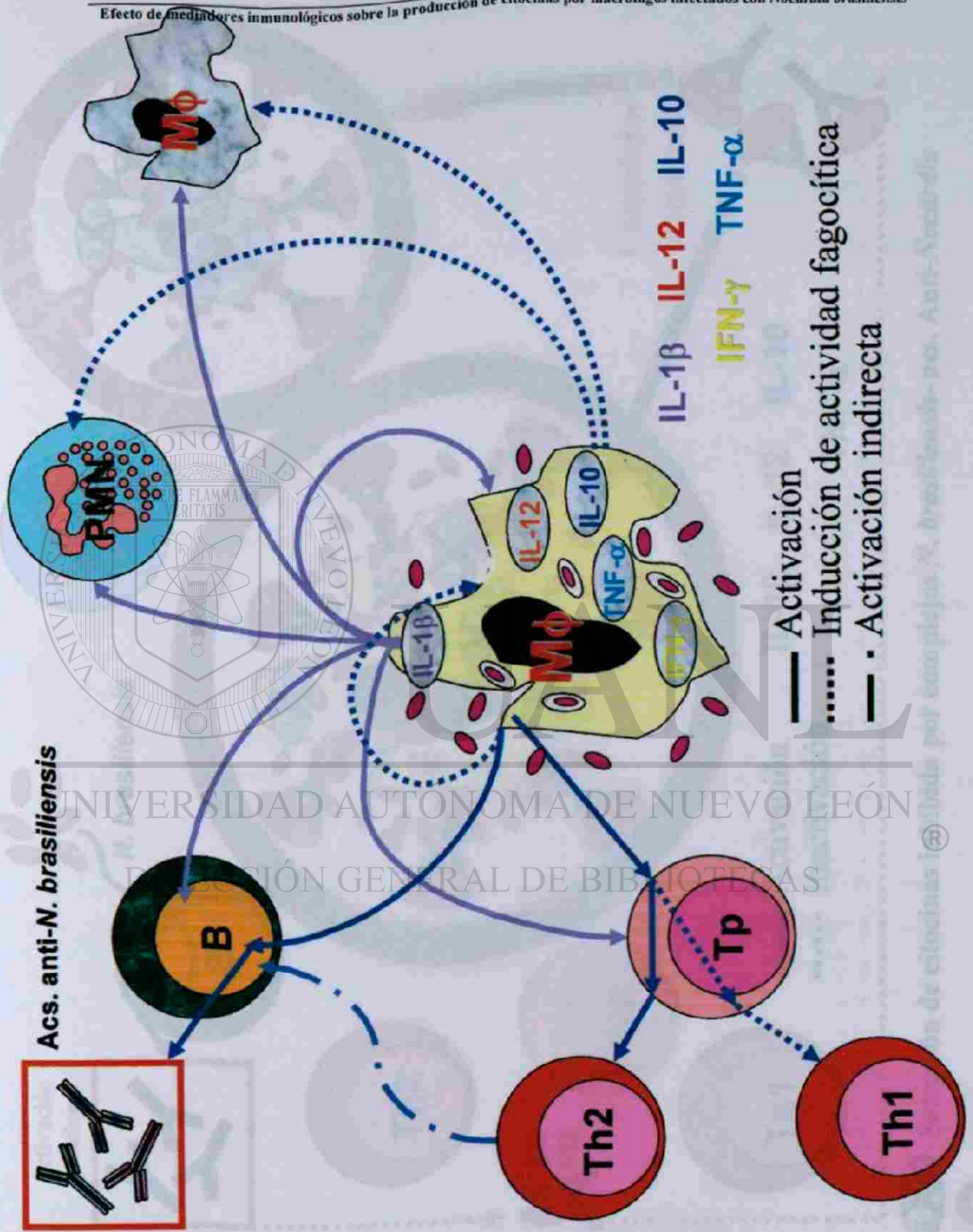


Figura 37. Escenario hipotético de infección de M ϕ s con una dosis infecciosa inicial baja de *N. brasiliensis* en fase de crecimiento exponencial (virulenta).

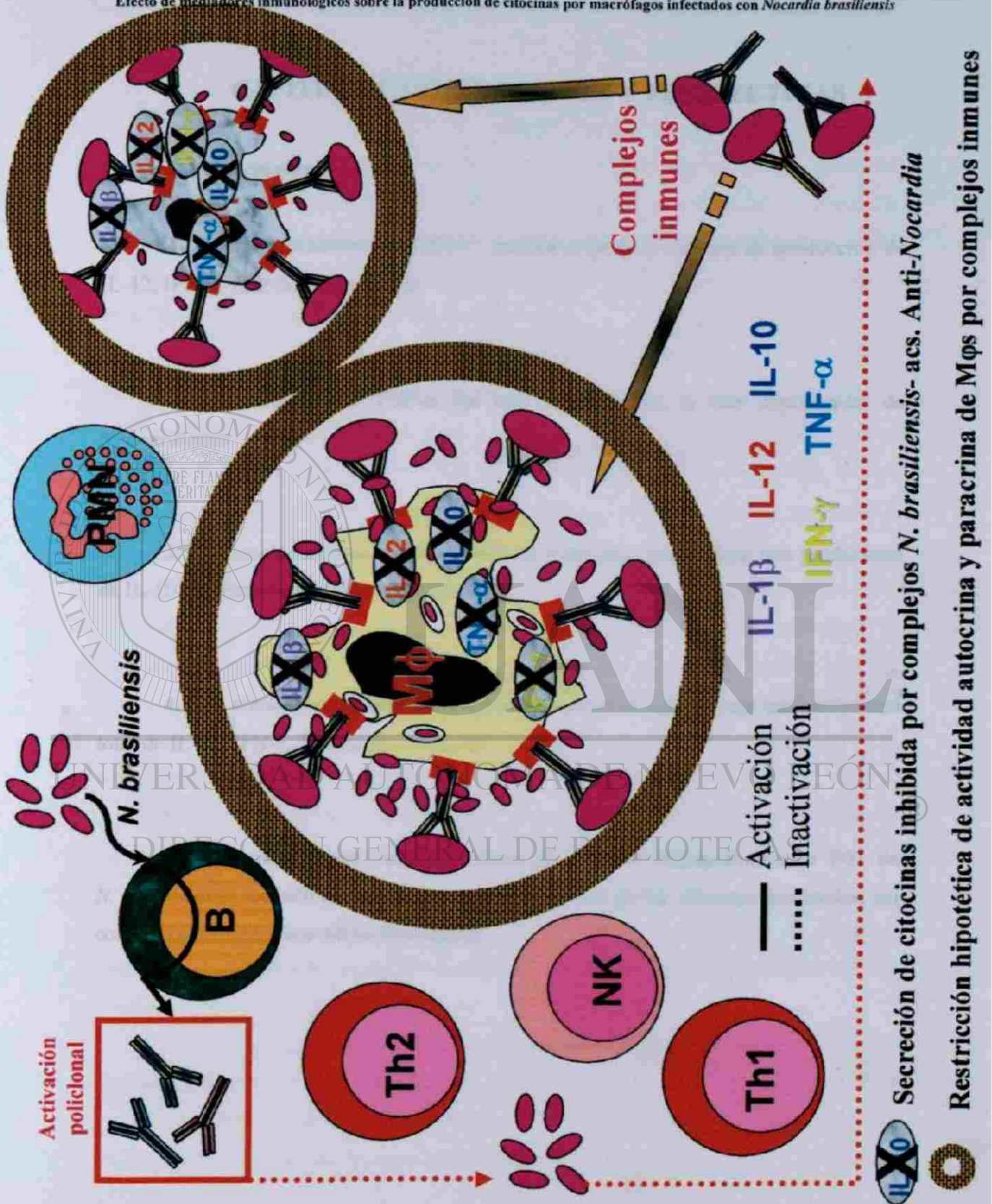


Figura 38. Efecto hipotético de complejos inmunes *N. brasiliensis*-acs. anti-*Nocardia* sobre la producción de citocinas macrofágicas.

CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

5.1 Conclusiones.

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

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

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

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

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

5.2 Perspectivas.

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

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

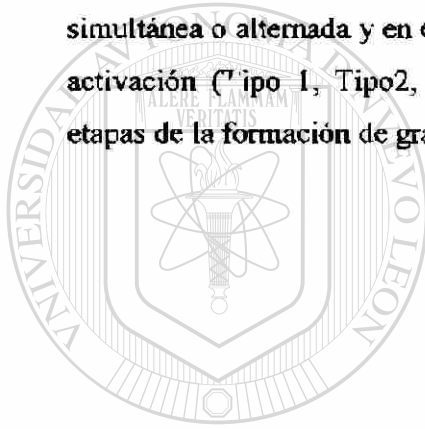
Uno de los resultados más excepcionales fue el hecho que la exposición de macrófagos a anticuerpos anti-*N. brasiliensis* acota la producción de las 5 citocinas a niveles ínfimos sin importar el tamaño del inóculo bacteriano. En adición, cuando el factor variable es la dosis, pero la concentración de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

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

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

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

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



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

TABLA I

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

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

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

TABLA II

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

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

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

TABLA III

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

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

^aDS - Desviación estándar.

^bUFC - Unidades Formadoras de Colonia.

^cMφ - Macrófago.

TABLA IV

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

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

^a DS – Desviación estándar.

^b UFC – Unidades Formadoras de Colonia.

^c Mφ - Macrófago.

TABLA V

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

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

^a DS = Desviación estándar.

^b UFC – Unidades Formadoras de Colonia.

^c Mφ - Macrófago.

BIBLIOGRAFÍA

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

- inflammatory activities of tumor necrosis factor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(23):13806-11.
242. Underhill DM, Ozinsky A, Smith KD, Aderem A. Toll-like receptor-2 mediates mycobacteria-induced proinflammatory signaling in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999; 96(25): 14459-63.
243. Tsuji S, Matsumoto M, Takeuchi O, Akira S, Azuma I, Hayashi A, Toyoshima K, Seya T. Maturation of human dendritic cells by cell wall skeleton of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin: involvement of toll-like receptors. *Infect Immun.* 2000;68(12):6883-90.
244. Trevejo JM, Marino MW, Philpott N, Josien R, Richards EC, Elkou KB, Falck-Pedersen E. TNF-alpha-dependent maturation of local dendritic cells is critical for activating the adaptive immune response to virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 200;98(21):12162-7. Epub 2001 Oct 02.
245. Schroder M, Meisel C, Buhl K, Profanter N, Sievert N, Volk HD, Grutz G. Different modes of IL-10 and TGF-beta to inhibit cytokine-dependent IFN-gamma production: consequences for reversal of lipopolysaccharide desensitization. *J Immunol.* 2003;170(10):5260-7.
246. Bartlett SA, Perera PY, Vogel SN. Defective ceramide response in C3H/HeJ (Lpsd) macrophages. *J Immunol.* 1995;155(5):2303-5.
247. Murthy PK, Dennis VA, Lasater BL, Philipp MT. Interleukin-10 modulates proinflammatory cytokines in the human monocytic cell line THP-1 stimulated with *Borrelia burgdorferi* lipoproteins. *Infect Immun.* 2000;68(12):6663-9.
248. Weiss DJ, Evanson OA, Moritz A, Deng MQ, Abrahamson MS. Differential responses of bovine macrophages to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *Mycobacterium avium* subsp. *avium*. *Infect Immun.* 2002;70(10):5556-61.
249. Ma X, Sun J, Pappasavvas E, Riemann H, Robertson S, Marshall J, Bailer RT, Moore A, Donnelly RP, Trinchieri G, Montaner LJ. Inhibition of IL-12 production in human monocyte-derived macrophages by TNF. *J Immunol.* 2000;164(4):1722-9.
250. Giguere S, Prescott JF. Cytokine induction in murine macrophages infected with virulent and avirulent *Rhodococcus equi*. *Infect Immun.* 1998;66(5):1848-54.
251. McIntyre KW, Unowsky J, DeLorenzo W, Benjamin W. Enhancement of antibacterial resistance of neutropenic, bone marrow-suppressed mice by interleukin-1 alpha. *Infect Immun.* 1989;57(1):48-54.
252. Morikage T, Mizushima Y, Sakamoto K, Yano S. Prevention of fatal infections by recombinant human interleukin 1 alpha in normal and anticancer drug-treated mice. *Cancer Res.* 1990;50(7):2099-104.
253. Ogle JD, Noel JG, Balasubramaniam A, Sramkoski RM, Ogle CK, Alexander JW. Comparison of abilities of recombinant interleukin-1 alpha and -beta and noninflammatory IL-1 beta fragment 163-171 to upregulate C3b receptors (CR1) on human neutrophils and to enhance their phagocytic capacity. *Inflammation.* 1990;14(2):185-94.
254. Pike BL, Nossal GJ. Interleukin 1 can act as a B-cell growth and differentiation factor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1985;82(23):8153-7.
255. Schmidt JA, Mizel SB, Cohen D, Green I. Interleukin 1, a potential regulator of fibroblast proliferation. *J Immunol.* 1982;128(5):2177-82.

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

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

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

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

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

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

APÉNDICE A TÉCNICAS

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

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

Células por ml = total de células viables/número de cuadros contados (1mm²) x 10⁴ ml x factor(es) de dilución

Células por ml = ____ x 10⁴ x 1 x 2 = ____ células/ml

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

A. Reactivos

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

2. Mezcla de incubación

- a. 1-naftil butirato al 0.5% en éter de dimetilo
de dietilen-glicol 2ml
0.1 M regulador de fosfato, pH 6.0 20ml
1.90g NaHPO₄
12.05g KH₂PO₄/L
- b. Pararosalinina al 3% en HCl 2N 0.8 ml
Nitrato de sodio al 3%
Agitar la mezcla por 30 seg
Añadir K₂HPO₄ al 0.1M 20 ml

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

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

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

B. Procedimiento.

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

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

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

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

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

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

B. Transcripción inversa de ARNm.

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

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

Mezcla de reacción para cADN

Componente	Volumen	Concentración final
Agua-DEPC	3.8 µl	
5X [™] 1st. Strand Buffer [™]	6.0 µl	1X
dNTPs 10 mM	1.2 µl	400 µM
MMLV-RT 200 U/µl	1.0 µl	200 U/µl
DTT 100 mM	3.0 µl	10 µM

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

37°C	1 hora
95°C	5 minutos
12. Terminada la reacción agregar 70 µl de agua-DEPC para obtener un volumen final de 100 µl; de este cADN se tomarán 5 µl para hacer el PCR.
13. Mantener en congelación el cADN hasta su utilización.

C. PCR de cADN.

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

Mezcla de reacción para PCR

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

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

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

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

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

Lista de cebadores para citocinas:

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

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

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

APÉNDICE B

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

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

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

Est. = Fase de crecimiento estacionaria.

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

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

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

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

APÉNDICE C

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

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

Est. = Fase de crecimiento estacionaria.

Exp. = Fase de crecimiento exponencial.

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

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

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

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

APÉNDICE D

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

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

Est. = Fase de crecimiento estacionaria

Exp. = Fase de crecimiento exponencial.

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

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

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

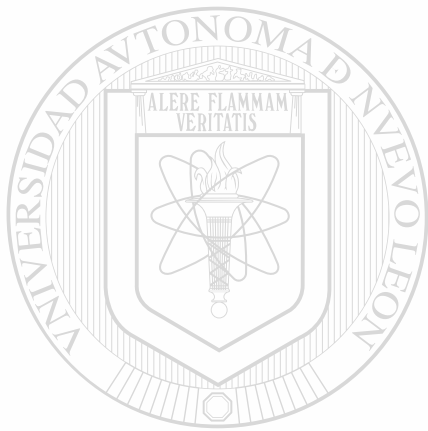
**P≤0.050*: Los valores significativos de P están en letra negrita cursiva.

APÉNDICE E

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

	CITOCINA	Tiempo de incubación (horas)			
		0	1	3	6
Dosis baja exp. Vs BEOPMab	IL-12	<i>P</i> ≤ 0.050*	<i>P</i> ≤ 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050
	IFN-γ	<i>P</i> > 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050	<i>P</i> > 0.050
	IL-10	<i>P</i> ≤ 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050
	FNT-α	<i>P</i> > 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050
	IL-1	<i>P</i> > 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050
Dosis media exp. Vs MEOPMab	IL-12	<i>P</i> ≤ 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050
	IFN-γ	<i>P</i> > 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050
	IL-10	<i>P</i> ≤ 0.050	<i>P</i> > 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050
	FNT-α	<i>P</i> > 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050
	IL-1	<i>P</i> > 0.050	<i>P</i> > 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050
Dosis alta exp. Vs AEOPMab	IL-12	<i>P</i> ≤ 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050
	IFN-γ	<i>P</i> > 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050
	IL-10	<i>P</i> ≤ 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050
	FNT-α	<i>P</i> > 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050
	IL-1	<i>P</i> > 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050
Dosis baja exp. Vs BEOPoli	IL-12	<i>P</i> ≤ 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050
	IFN-γ	<i>P</i> > 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050	<i>P</i> > 0.050
	IL-10	<i>P</i> ≤ 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050
	FNT-α	<i>P</i> > 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050
	IL-1	<i>P</i> > 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050
Dosis alta exp. Vs AEOPoli	IL-12	<i>P</i> ≤ 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050
	IFN-γ	<i>P</i> > 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050
	IL-10	<i>P</i> ≤ 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050
	FNT-α	<i>P</i> > 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050	<i>P</i> > 0.050
	IL-1	<i>P</i> > 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050
Dosis media exp. Vs MEPrePoli	IL-12	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	IFN-γ	<i>P</i> > 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050	N.D.
	IL-10	<i>P</i> ≤ 0.050	<i>P</i> > 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050	N.D.
	FNT-α	<i>P</i> ≤ 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050	N.D.
	IL-1	<i>P</i> ≤ 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050	N.D.
Dosis alta exp. Vs AEPrePoli	IL-12	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
	IFN-γ	<i>P</i> > 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050	N.D.
	IL-10	<i>P</i> ≤ 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050	N.D.
	FNT-α	<i>P</i> > 0.050	<i>P</i> > 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050	N.D.
	IL-1	<i>P</i> ≤ 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050	<i>P</i> ≤ 0.050	N.D.

N.D. = No Determinada. Exp. = Fase de crecimiento exponencial.
 BEOPMab = Dosis de *Nocardia* baja en fase de crecimiento exponencial opsonizada con MAb anti-P61.
 MEOPMab = Dosis de *Nocardia* baja en fase de crecimiento exponencial opsonizada con MAb anti-P61.
 AEOPMab = Dosis de *Nocardia* baja en fase de crecimiento exponencial opsonizada con MAb anti-P61.
 MEPrePoli = Dosis de *Nocardia* media en fase de crecimiento exponencial expuesta a Mps pretratados con acc. policlonales anti-*N. brasiliensis*.
 AEPrePoli = Dosis de *Nocardia* alta en fase de crecimiento exponencial expuesta a Mps pretratados con acc. policlonales anti-*N. brasiliensis*.
 **P* ≤ 0.050 = Los valores significativos de *F* están en letra negra cursiva.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



