

1 9 9 1 - B

CODIGO: 084547549

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

DIVISION DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES



IMPRESORA CENTRAL

CAMBIOS BIOQUÍMICOS EN MACROFAGOS MURINOS
ASOCIADOS CON FAGOCITOSIS: SU PAPEL EN LA INFECCION
POR EL *Mycobacterium lepraemurium*

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN BIOLOGIA

P R E S E N T A

VERONICA GABRIELA CAMARENA SERVIN

GUADALAJARA, JAL. JULIO DE 1994



D. VERÓNICA GABRIELA CAMARENA SÉRVIN

PRESENTE.

Manifiesto a usted, que con esta fecha, ha sido aprobado el tema de Tesis "CAMBIOS BIOQUÍMICOS EN MACROFAGOS MURINOS ASOCIADOS CON FOGOCITOSIS: SU PAPEL EN LA INFECCIÓN POR EL Mycobacterium lepraemurium" para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informo que ha sido aceptado como Director de dicha Tesis el Dr. Oscar Rojas Espinosa.

¡ T E N T A M E N T E
" PIENSA Y TRABAJA "

Guadalajara, Jal., 25 de Julio de 1990.

EL DIRECTOR

DR. VERÓNICA CAMARENA SÉRVIN



FACULTAD DE
CIENCIAS BIOLÓGICAS

EL SECRETARIO

AL EN C. AL. ESTEFANA SUZUKI ORDINEZ

Atte. Dr. Oscar Rojas Espinosa, Director de Tesis por el Dr. Verónica Camarena Sérvin.

ESPANOL/09/90

C. Dr. Fernando Alfaro Bustamante.
Director de la División de Ciencias Biológicas y Ambientales
de la Universidad de Guadalajara.

P R E S E N T E

Por medio de la presente, nos permitimos informar a Usted, que habiendo revisado el trabajo de tesis que realizó la pasante VERONICA GABRIELA CAMARENA SERVIN, código número 084547549 con el título "CAMBIOS BIOQUIMICOS EN MACROFAGOS MURINOS ASOCIADOS CON FAGOCITOSIS: SU PAPEL EN LA INFECCION POR EL Mycobacterium lepraemurium" consideramos que reúne los méritos necesarios para la impresión de la misma y la realización de los exámenes profesionales respectivos.

Comunicamos lo anterior para los fines a que haya lugar.

A T E N T A M E N T E

Guadalajara, Jal. a 11 de Julio de 1994

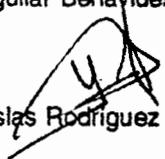
EL DIRECTOR DE TESIS

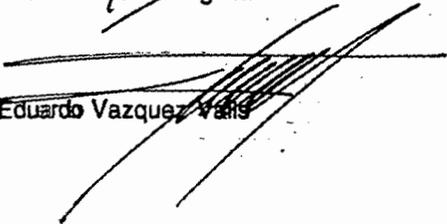

Dr. Oscar Rojas Espinosa


Dra. Iris Estrada García

SINODALES


Dr. Sergio Aguilar Benavides


Dr. Alfonso Islas Rodríguez


Dr. Eduardo Vazquez Valis

El presente trabajo se realizo en los Laboratorios de Inmunobiología II e Inmunología Molecular II de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politecnico Nacional, bajo la dirección del Dr. Oscar Rojas Espínosa y la Dra. Iris Estrada García.

**CAMBIOS BIOQUIMICOS EN MACROFAGOS
MURINOS ASOCIADOS CON FAGOCITOSIS: SU
PAPEL EN LA INFECCION POR EL *Mycobacterium
lepraemurium***

INDICE

GENERALIDADES	4
MECANISMOS BACTERICIDAS	6
Intermediarios reactivos del oxígeno	6
Oxidantes tóxicos	7
Enzimas lisosomales	8
Proteínas catiónicas	8
Acidificación del fagolisosoma	9
MECANISMOS DE PROTECCION BACTERIANA	11
Inhibición del estallido respiratorio	11
Inhibición de la fusión fagolisosomal	12
Inhibición de la acidificación	13
Escape del fagolisosoma	14
LA LEPRO MURINA COMO MODELO DE LA LEPRO HUMANA	15
HIPOTESIS	17
OBJETIVOS	18
MATERIAL Y METODOS	19
RESULTADOS	24
DISCUSION	32
CONCLUSIONES	37
RESUMEN	39
BIBLIOGRAFIA	41
APENDICE	50

ABREVIATURAS

Ab	Anticuerpo
Ag	Antígeno
BCG	<i>Mycobacterium bovis BCG</i>
C	Complemento
CEP	Células de exudado peritoneal
ConA	Concanavalina A
DNA	Acido desoxirribonucleico
GLF-1	Glicolípido fenolico-1
HBSS	Solución salina balanceada de Hanks
H ₂ O ₂	Ion hidrógeno ó hidronio
HRPO	Solución de peroxidasa - rojo fenol
IRO	Intermediarios reactivos del oxígeno
IFN-γ	Interferon gamma
Lev-C3b	Levaduras opsonizadas con complemento
MLM	<i>Mycobacterium lepraemurium</i>
MC-ConA	Medio condicionado
MN	Mononucleares
MPO	Mieloperoxidasa

MTT	Bromuro de (3-(4.5-dimetiltiazol-2-il)-2.5-difenil tetrazolio
NADPH	Nicotin adenin dinucleotido fosfato reducido
NADP	Nicotin adenin dinucleotido fosfato
O₂⁻	Anión superóxido
OH⁻	Radical hidroxil
PHA	Fitohemaglutinina
PMN	Polimorfonucleares
PBY	Medio de Youmans modificado por Proskauer y Beck
RIC	Respuesta Inmune Celular
RNA	Acido ribonucleico
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa

GENERALIDADES

El mecanismo de protección no específico más primitivo es probablemente el de la fagocitosis. Algunos organismos como las amibas y otros protozoarios dependen enteramente de este mecanismo para sobrevivir. Otras especies poco evolucionadas como los equinodermos, los celenterados, y otros, poseen células móviles, estructural y funcionalmente poco definidas (celomocitos), con actividad fagocítica^{46,47}. Mientras más se avanza en la escala filogenética, la estructura, la función y la variedad de las células fagocíticas se van haciendo más complejas. Los animales más evolucionados han desarrollado al menos dos tipos generales de células fagocíticas, los leucocitos polimorfonucleares (PMN) y los mononucleares (MN). Dentro de ambas poblaciones se reconocen subpoblaciones, no todas con igual actividad fagocítica. Los llamados fagocitos profesionales incluyen a los neutrófilos y a los macrófagos⁴⁸. Mientras los primeros pasan de la médula ósea a la circulación en un estado maduro y terminal, los macrófagos lo hacen en un estado todavía inmaduro, como monocitos. Los monocitos terminan su proceso de maduración en los tejidos, en donde se establecen recibiendo diferentes nombres según el tejido de residencia: células de Kúpffer en el hígado, macrófagos alveolares en el pulmón, células de la microglía en el sistema nervioso, macrófagos peritoneales en la cavidad abdominal, etc.

La función de estas células es la de englobar partículas incluyendo a los agentes infecciosos para posteriormente destruirlos^{3,16,49,50,64}.

El evento que inicia la actividad fagocítica es la quimiotáxis, proceso en el que las células fagocíticas son atraídas al sitio de la infección; las sustancias quimiotácticas pueden ser factores derivados del suero, como la anafilatoxina C5a, que es liberada como consecuencia de la activación del complemento (C) por

antígenos (Ag) bacterianos o por complejos antígeno-anticuerpo (Ag-Ab)^{3,49,50,53,64}. Es entonces que la célula fagocítica forma un pseudopodo para internalizar a la partícula extraña⁶⁴ formándose las vesículas fagocíticas o fagosomas, que se dirigen hacia la zona perinuclear, guiados por los microtubulos, y es en este momento cuando se activan los mecanismos microbicidas de la célula^{49,50,64}.

MECANISMOS BACTERICIDAS

Tanto los leucocitos MN (macrófagos) como los PMN (neutrófilos) destruyen a los microorganismos gracias a una combinación de enzimas y otras proteínas antibacterianas lisosomales y granulares que se asocian con los intermediarios reactivos del oxígeno (IRO).

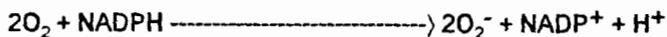
La importancia de estos mecanismos bactericidas depende del tipo de microorganismo así como del estado de activación de la célula fagocítica^{33,53}.

Dentro del potencial de los mecanismos bactericidas se incluyen los siguientes:

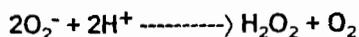
INTERMEDIARIOS REACTIVOS DEL OXIGENO

Cuando se unen las partículas que serán fagocitadas a los receptores de la membrana plasmática se inicia lo que se conoce como el "estallido respiratorio" con un incremento en la actividad de la vía metabólica de la glucosa 6-fosfato con el fin de obtener un cofactor reducido, el nicotin adenin dinucleotido fosfato (NADPH), que será el donador de electrones al oxígeno disuelto en el medio intracelular a través de la NADPH oxidasa y del flavocitocromo b_{245} , que se encuentra en la membrana del fagolisosoma para entonces dar origen al O_2^- (la línea denota la presencia de un electrón no apareado) convirtiéndolo en un radical libre:

NADPH oxidasa



dos moléculas de O_2^- interaccionan espontáneamente por una reacción de dismutación para generar una molécula de H_2O_2



el O_2^- y el H_2O_2 pueden reaccionar con muchos sustratos biológicos sinergizando su actividad bactericida. Además, a partir de estos dos metabolitos y en presencia de iones ferrosos, se produce un oxidante que es más potente, el radical hidroxilo OH^-
33,53,55,63,70.



OXIDANTES TOXICOS

La mieloperoxidasa (MPO) liberada de los granulos azurófilos del neutrófilo al fagosoma y el H_2O_2 pueden actuar sobre algunos aminoácidos para generar aldehidos que además de ser tóxicos dañan a la superficie bacteriana. A partir del H_2O_2 en presencia de la MPO y de los haluros Cl^- , Br^- ó I^- , se producen las reacciones que originan a los oxidantes tóxicos como el hipoclorito (OCl^-), el hipobromito (OBr^-), y el hipoyodito (OI^-)^{33,53,63,70}.

Los macrófagos al no poseer MPO llevan a cabo esta reacción por medio de la catalasa contenida en los peroxisomas, aunque en este caso no es tan efectiva, ya que muchas bacterias secretan catalasa por si mismas, ésto posiblemente como mecanismo de defensa^{21,33,38}.

ENZIMAS LISOSOMALES

La importancia de estas enzimas y de las que son secretadas por los macrófagos en el mecanismo bactericida, es aún incierto; pero es posible que las hidrolasas y las catepsinas estén involucradas en la digestión de la partícula, más que en el propio mecanismo bactericida³³.

La lisozima constituye aproximadamente el 2.5% de las proteínas del macrófago y puede actuar dentro del fagolisosoma o como proteína de secreción. La enzima hidroliza la pared celular bacteriana rompiendo los enlaces β -1-4 glicosídicos que unen al ácido N-acetil-murámico con la N-acetil glucosamina de la peptidoglicana de las bacterias Gram-positivas⁵³.

La lisozima puede sinergizar la acción bactericida de los componentes líticos del C, de las Igs, de las proteínas catiónicas, y del H_2O_2 asociada al ascorbato generando radicales libres^{33,53}.

PROTEINAS CATIONICAS

Estas proteínas se encuentran en los gránulos primarios o azurófilos de los neutrófilos y algunas veces en los macrófagos; son más eficientes a pH alcalino (antes de la acidificación del fagolisosoma)³³.

Las proteínas catiónicas de bajo peso son más potentes contra bacterias Gram-positivas, inhibiendo la respiración bacteriana, la síntesis de DNA, de RNA y por consiguiente de proteínas. Las de alto peso molecular inhiben la replicación de muchas especies de microorganismos Gram-negativos, incrementando la permeabilidad de la membrana a moléculas que normalmente se excluyen; además interrumpen la síntesis de macromoléculas^{36,75}.

Dentro de las proteínas catiónicas se encuentran las defensinas, su efecto microbicida tiene un gran espectro que incluye a bacterias Gram-positivas, Gram-negativas, hongos y cápsides de algunos virus. Interaccionan con moléculas de superficie con carga negativa de la célula blanco formando uniones electrostáticas (con las cabezas de los lípidos polares), se insertan formando canales reguladores de voltaje, permeabilizando la membrana celular²⁸.

ACIDIFICACION DEL FAGOSOMA

Al fusionarse la vacuola fagocítica con el lisosoma se incrementa la concentración del ion hidrógeno debido a la producción del lactato durante la glicólisis, por lo que el pH baja a un valor entre 3.0 y 6.0, dependiendo de la especie^{2,49,53,64}.

La acidificación del fagosoma facilita las reacciones microbicidas por lo menos de dos maneras:

- (a). Algunas bacterias son destruidas por ácidos orgánicos o por ácidos lipofílicos en medios ácidos.
- (b). La acidificación puede optimizar las funciones de otros sistemas enzimáticos microbicidas⁵³.

Los PMN y los MN funcionan de manera coordinada y son en general suficientes para destruir a la mayoría de los gérmenes que en un momento dado pudieran invadir al organismo.

Los PMN que son más abundantes en sangre, son la primera línea de defensa celular contra microorganismos "sencillos", saprófitos u oportunistas. Los microorganismos estructuralmente más complicados como las micobacterias patógenas para el hombre (*Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium leprae*),

resisten al efecto bactericida de los PMN (debido fundamentalmente a la corta vida de estas células) y son entonces recogidos por los macrófagos^{51,56}. Los macrófagos residentes tienen una capacidad microbicida efectiva pero limitada, la cual, sin embargo, se incrementa cuando los macrófagos se someten al efecto activador de la respuesta inmune celular (RIC)^{46,52,58}, esta activación ocurre cuando el Ag es reconocido específicamente por los linfocitos T, provocando la producción y liberación de varias linfocinas, principalmente de interferón gamma (IFN- γ), que actúan directamente sobre los macrófagos potenciando así sus mecanismos microbicidas^{2,49}. La deficiencia congénita o adquirida de la RIC impide la activación inmunológica de los macrófagos y en estas condiciones la capacidad microbicida de estas células resulta limitada^{26,59}. Es así que muchos microorganismos "estructuralmente complicados" sobreviven y se multiplican dentro de los macrófagos, causando enfermedad. Tal es el caso de la tuberculosis y de la lepra lepromatosa.

MECANISMOS DE PROTECCION BACTERIANA

En general los patógenos intracelulares facultativos pueden persistir en su célula huésped, ya que poseen mecanismos de protección como son:

- a. Inhibición del estallido respiratorio.
- b. Inhibición de la fusión fagolisosomal.
- c. Inhibición de la acidificación del fagolisosoma.
- d. Escape al citoplasma^{16,35}.

INHIBICION DEL ESTALLIDO RESPIRATORIO

Existen microorganismos que pueden sobrevivir a la fagocitosis ya sea porque no son capaces de estimular el estallido respiratorio o porque resisten a los metabolitos reactivos del oxígeno, pudiendo depender de esto su implantación y supervivencia en su célula huésped, como es el caso del *Toxoplasma gondii*, que puede sobrevivir en las células fagocíticas mononucleares, dependiendo del estado de diferenciación y/o activación de las células⁷².

También se ha visto que el *Mycobacterium leprae* no estimula la producción de los metabolitos del oxígeno, excepto cuando se utilizan altas concentraciones del bacilo, a diferencia del BCG que vivo o muerto estimula la producción de los metabolitos del oxígeno. Cuando se preincuban los bacilos de la lepra en cultivos de macrófagos no se inhibe su capacidad de responder con los cambios oxidativos correspondientes al estímulo con otros microorganismos y materiales²², esto quiere decir que la inhibición es específica para *Mycobacterium leprae*.

Se sabe que el glicolípido fenólico I (GLP-I), específico de *M. leprae*, que está presente en grandes cantidades, formando el 2% de la masa bacilar captura de alguna manera a los intermediarios reactivos del oxígeno (IRO) *in vitro*^{27,41}, siendo la fracción carbohidrato del GLP-I la que atrapa a los IRO, así mismo ocurre con la

porción carbohidrato de la lipofosfoglicana de *Leishmania donovani*, que impiden la muerte del bacilo y de la leishmania dentro del fagosoma⁹.

Otros microorganismos, como el *Mycobacterium tuberculosis*, resisten el efecto del H_2O_2 producido por los macrófagos, aunque esta resistencia no es suficiente para explicar la virulencia, puesto que la resistencia al H_2O_2 de la cepa atenuada (H37Ra) es comparable al de la cepa virulenta (H37Rv)²³. Por otro lado, la ingestión del *Mycobacterium tuberculosis* es concomitante con el desarrollo del estallido respiratorio por lo que la falla de los macrófagos para matar a esta micobacteria no puede atribuirse a la falta de fagocitosis o del estallido respiratorio³⁴.

Tanto el bacilo de la tuberculosis como el de la lepra son destruidos por el sistema de la MPO- H_2O_2 ; este mecanismo tal vez no funciona en los macrófagos debido a su bajo contenido de MPO en relación a los neutrófilos²⁴, tampoco hay diferencia en la susceptibilidad de las cepas virulentas y no virulentas del bacilo de la tuberculosis²³.

INHIBICION DE LA FUSION FAGOLISOSOMAL

Los microorganismos tienen diferentes mecanismos de supervivencia debido a que sus circunstancias intracelulares son diferentes¹².

M. tuberculosis de la cepa H37Rv, *T. gondii* y algunas clamidias en cultivos de macrófagos se muestran en la mayoría de los casos intactos dentro de los fagosomas que no se fusionaron con los lisosomas secundarios^{12,20,60,74}, en el caso de la cepa H37Rv de *M. tuberculosis* se ha visto que al adherirse a la membrana fagosomal, ésta se fragmenta y se desintegra, tal vez los responsables de bloquear la fusión fagolisosomal sean el factor cuerda y los sulfátidos (que están asociados a la superficie de las micobacterias virulentas)^{20,40}. Este efecto puede deberse al carácter polianiónico del sulfátido bacteriano que interacciona con las membranas de los

organelos, encontrándose una correlación significativa entre producción de lípidos ácidos (como los sulfátidos) y el grado de virulencia de las bacterias²⁰.

En el caso del *M.leprae* se ha encontrado que los bacilos recién aislados inhiben a la fusión fagolisosomal²⁰, pero en trabajos posteriores se ha visto que la inhibición sólo sucede en los eventos tempranos de la infección (1-4 horas), disminuyendo durante la etapa tardía (1-8 días)¹⁷.

INHIBICION DE LA ACIDIFICACION

Cuando los fagosomas no se fusionan con los lisosomas el acceso de las enzimas hidrolíticas al microorganismo parece estar limitado, provocando que la vacuola fagocítica no alcance el pH ácido de 5.0⁶⁰. Recientemente se ha demostrado por microscopía electrónica que tanto el *M. tuberculosis* como el *M. avium* se encuentran contenidos en fagosomas que revelan la presencia de un marcador en la membrana de la vacuola fagocítica (LAMP-1) el cual sugiere que hay una interacción entre los componentes fagolisomales, sin embargo, el contenido intravacuolar presenta un pH de 6.3 - 6.5, (que restringe la actividad de las hidrolasas) permitiendo la supervivencia intracelular de los bacilos; estas observaciones demostraron que el defecto no se encuentra en la interacción del endosoma con el lisosoma, sino en una protón ATP-asa que normalmente se fusiona al fagolisosoma promoviendo una bomba de protones para la acidificación de la vacuola fagocítica; que en el caso del *M. tuberculosis* y *M. avium* la protón ATP-asa no se fusiona a la vacuola ya que carecen de una proteína accesoria de 110 KD (asociada a la membrana) que es la responsable de la incorporación de la protón ATP-asa a la membrana del fagosoma⁶⁶.

ESCAPE FAGOLISOSOMAL

Una vez que los microorganismos logran inhibir la fusión fagolisosomal escapan al citoplasma, como respuesta a regulaciones genéticas que sufren al ser fagocitados por la célula huésped y facilitando así su supervivencia en el medio intracelular, específicamente en el citoplasma, tal es el caso del *M. tuberculosis* que posiblemente exprese componentes de superficie que no están presentes cuando crece extracelularmente, y que están relacionados con su capacidad de escape³⁶.

En el curso de la infección experimental con *M. leprae* en el ratón se ha visto que hay bacilos dentro y fuera del fagosoma^{13,36}. La gran mayoría de los bacilos intrafagosomales se encuentran dañados, mientras que la mayoría de los bacilos extrafagosomales están intactos. Esto demuestra que el sitio natural de multiplicación del *M. leprae* es la matriz citoplásmica de la célula huésped³⁶.

Las enfermedades causadas por micobacterias patógenas son, en general, de evolución crónica y muy difíciles de controlar por los mecanismos defensivos del huésped. Todas las micobacterias virulentas han desarrollado mecanismos de patogenicidad que aseguran su implantación y su supervivencia en los tejidos de los individuos susceptibles.

Algunos de estos mecanismos tienen que ver con la composición estructural de las micobacterias, otros con la producción de sustancias que agreden a las células del huésped o que neutralizan los efectos de los mecanismos defensivos^{16,35,36}.

El modelo de la lepra murina es una opción para estudiar los mecanismos de inmunopatogenicidad en una enfermedad micobacteriana, causada por el *Mycobacterium lepraemurium* (MLM), siendo interesante porque afecta de manera natural a los animales más comunes de laboratorio de investigación biomédica: los ratones, además la lepra de los ratones tiene mucha analogía con la lepra de los humanos y porque la lepra en ambas especies ofrece muchas alternativas de estudio que incluyen los aspectos inmunológicos y patológicos³⁰.

LA LEPRA MURINA COMO MODELO DE LA LEPRA HUMANA

A pesar de que el bacilo de la lepra humana fué el primer patógeno bacteriano identificado, todavía no se ha podido cultivar *in vitro*. Debido a esto surge la necesidad de crear un modelo experimental cuyo estudio nos acerque a la situación de la lepra humana⁴⁸. En 1960 Shepard logró transmitir de manera experimental al *M. leprae* en el cojinete plantar del ratón, pero sólo obtuvo una multiplicación limitada del bacilo⁵⁷.

Para entonces ya se conocía la lepra murina (descrita en 1902 por V. K. Stefanski) así como su estrecha relación con la lepra humana^{30,62} además de la gran similitud entre los dos agentes causales correspondientes.

El *M. lepraemurium* (MLM) a diferencia del *M. leprae* presenta una gran ventaja para el uso experimental en el ratón, ya que el MLM es un patógeno natural de la especie³⁰. Por lo que ofrece una oportunidad para estudiar mecanismos básicos en las interacciones huésped-parásito, que posteriormente se podrían extrapolar a la enfermedad humana⁷.

Ambos bacilos se comportan de manera análoga en cuanto a la forma de infectar su célula huésped, el macrófago^{36,52,58}; se localizan predominantemente en forma intracelular y no parecen ser tóxicos para el macrófago, comparten antígenos de reacción cruzada^{8,30}, son de multiplicación lenta⁶, además parecen causar una supresión inmune celular específica en su huésped natural³⁰. También muestran diferencias a nivel metabólico y de ultraestructura¹⁸, así como diferencias químicas y antigénicas²⁵, además de que su comportamiento intracelular es diferente, pues mientras el MLM se multiplica dentro de los fagolisosomas de la célula huésped¹² (al parecer la alta concentración de enzimas lisosomales facilita la multiplicación del bacilo) el *M. leprae* se multiplica en la matriz citoplásmica de la célula y no dentro de los fagolisosomas²⁹

La fagocitosis de la mayoría de las partículas ya sean infecciosas o inertes inducen cambios metabólicos oxidativos y no oxidativos en las células fagocíticas que están relacionadas con su actividad microbicida⁵⁶. Los microorganismos "simples" son destruidos por efecto de los cambios oxidativos inducidos, se ha propuesto que algunos microorganismos "complicados" pudieran ser fagocitados sin despertar los cambios oxidativos de la célula^{18,25}. Esto podría dificultar todavía más su destrucción intracelular. En el caso de la lepra este comportamiento, aunado a la deficiencia en la respuesta inmune celular (RIC), dejaría a los macrófagos en un estado de mínima eficiencia microbicida y a merced de los microorganismos infectantes.

HIPOTESIS

- 1 El *Mycobacterium lepraemurium*, como el *M. leprae*, penetra por fagocitosis a los macrófagos sin despertar los cambios metabólicos que promueven su inactivación. Por esto, en ausencia de la influencia de la respuesta inmune celular (RIC), la micobacteria se establece sin restricción y prolifera dentro de las células fagocíticas. La propiedad del *M. lepraemurium* de penetrar a las células fagocíticas "sin hacerse notar" solo ocurre cuando los microorganismos están íntegros y son viables. Su inactivación por cualquier medio, elimina esta propiedad.
- 2 Las micobacterias avirulentas para el ratón, como el BCG, el *M. avium*, y otras, penetran a los macrófagos promoviendo los cambios metabólicos responsables de la actividad bactericida de las células y son subsecuentemente eliminadas.
- 3 La pre-activación de los macrófagos por mecanismos inmunológicos los capacita para exhibir los cambios metabólicos microbicidas en respuesta a su infección por el *M. lepraemurium*. Esto podría traer como consecuencia la destrucción del microorganismo, y en el animal íntegro, el control de la enfermedad.

OBJETIVO

Estudiar el comportamiento de los macrófagos murinos ante la infección *in vitro* por el *Mycobacterium lepraemurium*, sobre la base de la hipótesis anterior.

MATERIAL Y METODOS

Obtención de macrófagos peritoneales

Varios grupos de ratones albinos, NIH, de 30g de peso, fueron inoculados intraperitonealmente con 1 ml de aceite mineral ligero (SIGMA 59675) cada uno 72 horas antes de la obtención del exudado peritoneal. El exudado peritoneal se obtuvo al inyectar 5 ml de Alsever en el peritoneo, este se agitó con el objeto de desprender la mayor cantidad de células, para después extraer el exudado con una pipeta Pasteur; el exudado peritoneal se centrifugó a 1500 rpm durante 5 min para obtener el paquete celular; éste se resuspendió en medio de cultivo RPMI 1640 (SIGMA R 6504) suplementado con 10% de CPSR-2, un sustituto de suero fetal (SIGMA C 9030). Se hizo una dilución de la suspensión en azul tripano, para hacer la cuenta de células en el microscopio con objeto de ajustarlas a una concentración conocida. Se sembraron las células en placas de cultivo de 24 pozos (NUNC, Denmark) a una concentración de 4×10^6 células por ml en cada pozo, incubándose a 37 °C en una atmósfera de 5% de CO₂, durante 24 h^{10,11}.

Medición del peróxido de hidrógeno

Se preparó una solución de peroxidasa tipo II (SIGMA P-8 250) en una solución de rojo de fenol (1 mg de peroxidasa por 10 ml de la solución, ver apéndice), en la cual se resuspendieron en forma independiente cada uno de los estimulantes. Los cultivos celulares se lavaron 2 veces con solución salina balanceada de Hanks (HBSS) sin rojo de fenol para quitar el remanente del medio de cultivo y evitar así que éste no interfiera en las lecturas colorimétricas y para retirar las células no adherentes. Los estimulantes se adicionaron a las monocapas celulares, incubándose durante 90

minutos a 37°C; la reacción se detuvo añadiendo 100 µl de NaOH 1N/ pozo. La solución colorida se leyó en un espectrofotómetro (Shimadzu) a una longitud de onda de 600 nm⁴⁹.

Medición del anión superóxido

Se preparó una solución de citocromo C tipo III (SIGMA C-2037) en HBSS sin rojo de fenol (1mg/ml) en la cual se resuspendieron en forma independiente cada uno de los estimulantes. Previamente a su adición a los cultivos éstos se lavaron 2 veces con HBSS, para retirar las células no adherentes y el medio remanente e inmediatamente se adicionaron los estímulos correspondientes a la monocapa de cultivo celular, incubándose durante 90 minutos a 37°C; para leer la absorbancia a una longitud de onda de 550 nm en un espectrofotómetro (Shimadzu)⁴⁹.

Obtención de medios condicionados a partir del cultivo de esplenocitos murinos

Se extrajo el bazo de varios ratones NIH y a partir de ellos se preparó una suspensión celular en solución de Alsever; una vez homogeneizada la suspensión celular, se lisaron los eritrocitos (tres partes del regulador de lisis por una de la suspensión celular), se centrifugó la suspensión a 1500 rpm para obtener el paquete celular y entonces se resuspendieron las células en medio AIMV (GIBCO 12055-026). Se hizo una dilución de la suspensión en azul tripano para hacer la cuenta celular antes de sembrarlas en botellas de 75 cm² a una concentración de 10×10^6 cell/ml en presencia de 5 µg de concanavalina A (ConA) (SIGMA C 5275) por ml, incubándose a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂ durante 48 horas. Al cabo de este tiempo se centrifugaron los cultivos con el objeto de remover las células y colectar los sobrenadantes libres de células.

Para eliminar la lectina de los sobrenadantes se les adicionó sephadex G-10 (SIGMA G-10-120) (10 mg/ml de sobrenadante) durante 10 minutos en hielo, recuperándose el sobrenadante libre de lectina. Este "medio condicionado" se esterilizó utilizando membranas millipore de $0.45\mu^54$.

Para comprobar que hubo activación celular se utilizó la prueba de reducción del MTT (bromuro de 3-(4.5-dimetiltiazol-2-il)-2.5-difenil tetrazolio) (SIGMA M 2128)³⁹. En cultivos celulares con 5×10^6 células/pozo se les adicionaron 50 μ l de una solución de MTT, se incubaron durante 4 horas a 37 °C, posteriormente las células se resuspendieron en el mismo medio y se centrifugaron a 1500 rpm/5 min, el sobrenadante se desecho y el botón de células se resuspendió en 1 ml de una solución 0.04N de HCl en isopropanol, dejándose toda la noche a temperatura ambiente, por último se centrifugó a 1500 rpm/10 min para leer la absorbancia a una longitud de onda de 570 nm.

Obtención de las micobacterias

Los bacilos de MLM se obtuvieron a partir de tejidos de ratones NIH infectados, por la técnica de Prabhakaran⁴⁵, que brevemente consiste en lo siguiente:

cuatro gramos de tejido infectado se homogeneiza en un Potter con 20 ml de sacarosa 0.2 M, esta suspensión se centrifuga a 1200 rpm /20 min, para eliminar los restos tisulares, 9 ml de la suspensión obtenida se estratifican sobre 12 ml de sacarosa 0.3 M, la cual se centrifuga a 6000 rpm/10 min, el sobrenadante se descarta y el botón se resuspende en 9 ml de sacarosa 0.2 M, esta a su vez se vuelve a estratificar sobre 12 ml de KCl 1.5 M centrifugándose a 6000 rpm/10 min; el último paso se repite una vez más y el botón obtenido se lava tres veces con PBS 0.01 M.

El *Mycobacterium bovis* (BCG) fué donado por el Instituto Nacional de Higiene y expandido y mantenido en el laboratorio por cultivo en medio PBY.

Una vez que se obtuvieron las micobacterias se resuspendieron en regulador de salina fosfatos y se mantuvieron en agitación para disgregar la masa bacilar, leyendose la absorbancia de la suspensión a una longitud de onda de 580 nm para interpolar el resultado de la lectura en una curva conocida; Esta curva se obtuvo al hacer diluciones de una suspensión pura de MLM, desde 1:2 hasta 1:256 en las cuales se leyeron sus absorbancias a 580 nm contra un blanco de solución salina, además cada suspensión se diluyó 1:2 con suero humano normal (esterilizado por millipore 0.45 μ) y de cada dilución se tomaron dos alícuotas de 5 μ l para realizar cuentas al microscopio, y posteriormente se calculó el número de bacilos por campo por el área total de los campos leídos, obteniendo directamente el número de bacilos por ml de la suspensión.

Visualización de la actividad de esterasa

Después de 24 horas de cultivo, las células que se obtienen del exudado peritoneal se incuban durante 30-40 minutos a temperatura ambiente con el reactivo para la tinción de esterasa⁶⁶.

Preparación de las levaduras

Las levaduras de pan (Fleischman's) se resuspendieron en solución salina para pasarlas a través de papel filtro de poro grande, con el objeto de homogeneizar su tamaño. Se esterilizaron por calor para inactivarlas, quedando entonces como "partículas inertes", se lavaron varias veces con solución salina y se hizo la cuenta celular para ajustarlas a una concentración conocida.

Las pruebas estadísticas que se aplicaron para el análisis de los resultados fue ANVA bifactorial para cuando se tienen dos o más grupos afectados por dos factores y la de Kruskal-Wallis para más de dos grupos midiendo una sola variable.

RESULTADOS

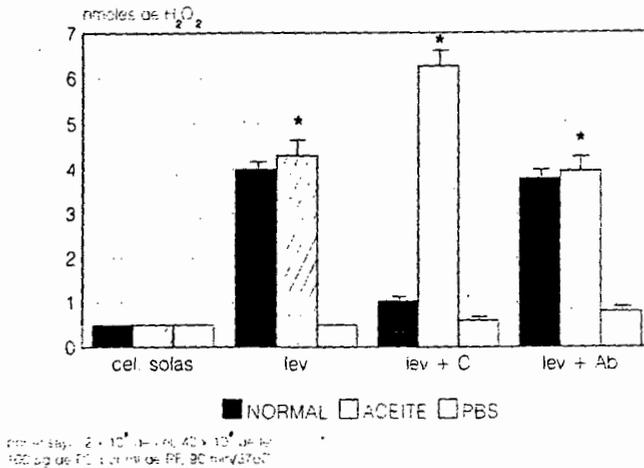
Inducción de células del exudado peritoneal (CEP).

De los tres agentes inductores utilizados (aceite mineral ligero, caldo tioglicolato, y PBS), el aceite mineral ligero dio los mejores resultados en cuanto a número de células obtenidas y en cuanto al metabolismo basal de las mismas. El aceite no indujo *per se* ninguna activación del metabolismo oxidativo de las células; lo mismo ocurrió con los otros inductores.

La respuesta oxidativa de los macrófagos estimulada por la fagocitosis de levaduras resultó más evidente y más consistente cuando se utilizaron las células inducidas con aceite; por el contrario, cuando se usaron las células inducidas con tioglicolato o con PBS, las respuestas oxidativas fueron heterogéneas o inconsistentes (Fig.1 y 2).

Fig. 1

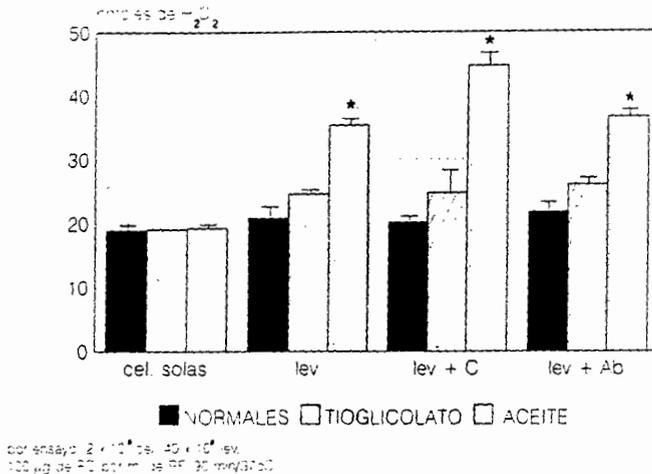
PRODUCCION DE H_2O_2 POR MACROFAGOS PERITONEALES MURINOS EN RESPUESTA AL ESTIMULO CON DIFERENTES AGENTES INDUCTORES



(* $p < 0.01$)

Fig. 2

PRODUCCION DE H_2O_2 POR MACROFAGOS PERITONEALES MURINOS EN RESPUESTA AL ESTIMULO CON DIFERENTES AGENTES INDUCTORES



(* $p < 0.01$)

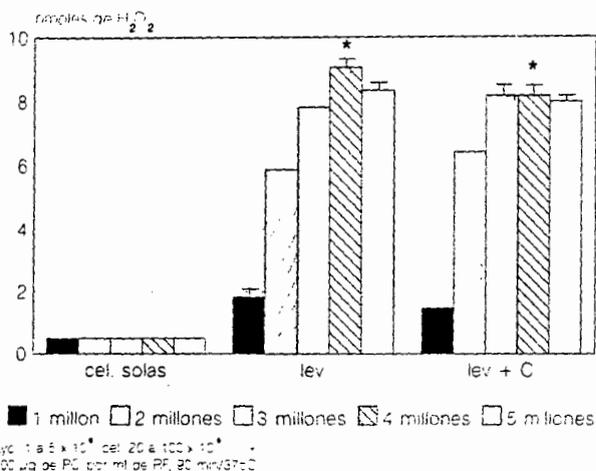
Utilizando las células inducidas con aceite, las levaduras no opsonizadas fueron tan buenos estimulantes de la respuesta oxidativa como las levaduras opsonizadas con complemento (humano) o las opsonizadas con anticuerpo (de conejo). Con base en estos resultados y tomando en cuenta que la respuesta oxidativa de otras células fagocíticas (leucocitos PMN humanos) se optimiza cuando se utilizan levaduras opsonizadas con complemento (Lev-C3b), en los experimentos subsecuentes de este estudio siempre se usaron Lev-C3b como un control positivo de la estimulación de la respuesta oxidativa.

Magnitud de la respuesta oxidativa en función del número de CEP.

Bajo las condiciones del sistema utilizado en el estudio (1 ml de medio de cultivo, 20 levaduras por célula) la mayor producción de H_2O_2 se obtuvo al trabajar con 4 millones de células; este número de células se utilizó en todos los experimentos posteriores (Fig.3)

Fig. 3

PRODUCCION DE H_2O_2 POR MACROFAGOS PERITONEALES MURINOS EN FUNCIÓN DEL NÚMERO DE CELULAS



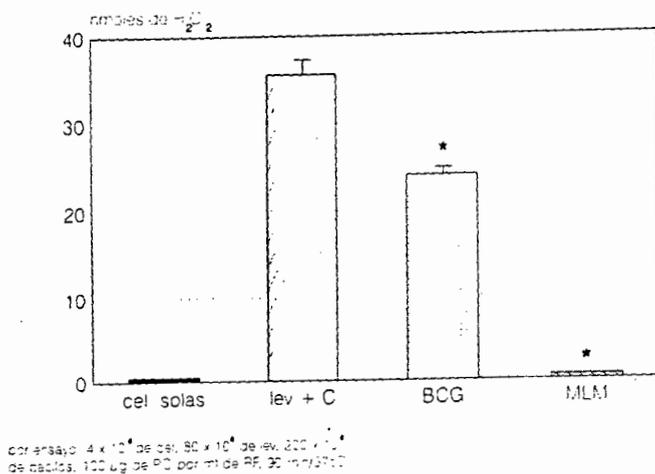
(* $p < 0.01$)

Producción de metabolitos del oxígeno (H_2O_2 y O_2^-) por las CEP estimuladas con LM y BCG.

La infección de los cultivos de CEP con BCG (viables) estimula una buena producción tanto de H_2O_2 como del anión superóxido. Por el contrario la infección de los cultivos celulares con bacilos de la lepra murina (también viables) no induce la producción de dichos metabolitos del oxígeno. Como era de esperarse, la estimulación de las células con Lev-C3b induce una buena respuesta oxidativa (Fig. 4 y 5).

Fig. 4

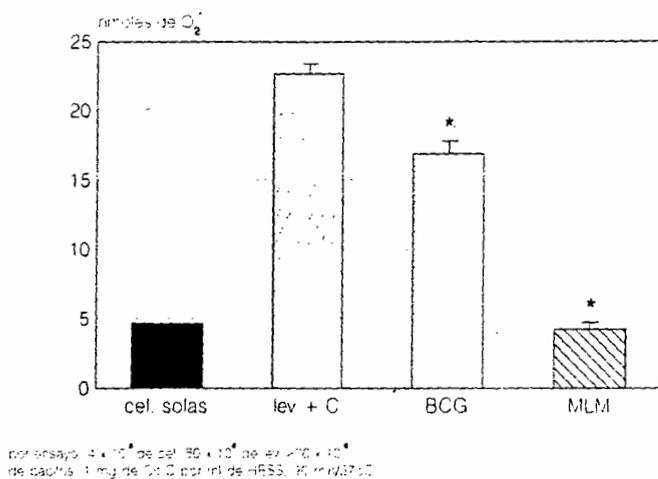
PRODUCCION DE H_2O_2 POR MACROFAGOS PERITONEALES MURINOS ESTIMULADOS CON MLM



(*p < 0.01 con respecto a células solas)

Fig. 5

PRODUCCION DE O_2 POR MACROFAGOS PERITONEALES MURINOS ESTIMULADOS CON MLM



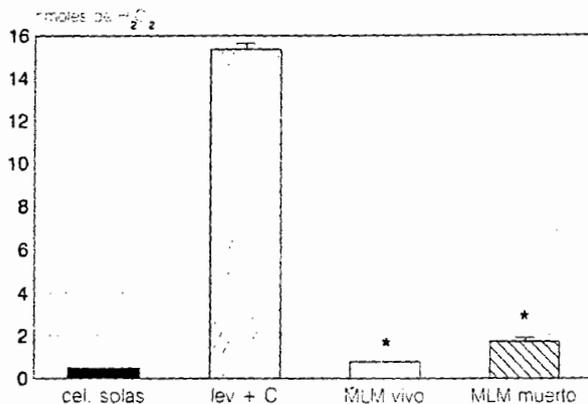
(*p < 0.01 con respecto a células solas)

Efecto de la viabilidad del MLM sobre su capacidad para estimular la respuesta oxidativa de las CEP.

La inactivación por calor del MLM no modifica la incapacidad del microorganismo para estimular los cambios oxidativos de las CEP asociados a la fagocitosis. La eficiente inducción de los cambios oxidativos por las Lev-C3b señala claramente la saludable condición de las CEP (Fig. 6 y 7).

Fig. 6

PRODUCCION DE H_2O_2 POR MACROFAGOS PERITONEALES MURINOS ESTIMULADOS CON MLM MUERTO POR CALOR

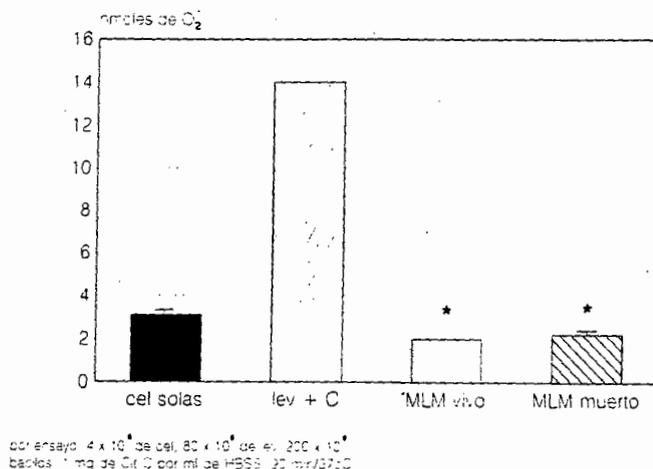


cult. en caldo 4×10^8 de lev. 10×10^8 por ml. 200×10^4 de bacilos. 100 μ g de FC por ml de RR. 90 min a 37°C

(* $p < 0.01$ con respecto a células solas).

Fig. 7

PRODUCCION DE O_2 POR MACROFAGOS PERITONEALES MURINOS ESTIMULADOS CON MLM MUERTO POR CALOR



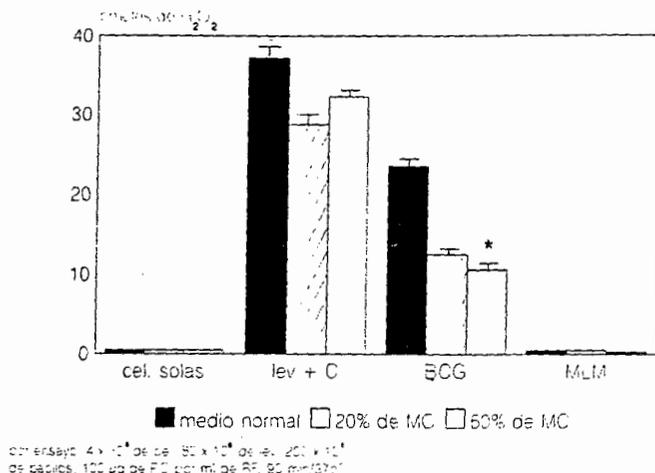
(* $p < 0.01$ con respecto a células solas).

Efecto del medio condicionado (MC-ConA) sobre la producción de H_2O_2 por la CEP infectadas *in vitro* con BCG y con MLM.

El cultivo de las CEP con 20 ó 50 % de MC-ConA por 24 horas, no modifica el comportamiento oxidativo de las células ante la estimulación con Lev-C3b y con MLM. Las Lev-C3b siguen funcionando como buenos estimulantes; el MLM no muestra capacidad estimulante alguna. Interesantemente, el cultivo de las CEP con MC-ConA abate la respuesta oxidativa de las células estimulada por el BCG y este abatimiento es más marcado a la concentración más elevada del MC-ConA (Fig. 8).

Fig. 8

EFFECTO DE MEDIOS CONDICIONADOS EN MACROFIAGOS PERITONEALES MURINOS



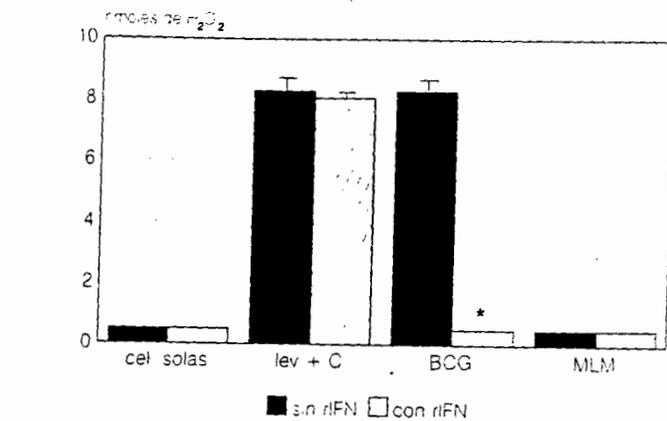
(*p < 0.001)

Efecto del interferón gamma recombinante (rIFN γ) sobre el metabolismo oxidativo de las CEP en respuesta al estímulo con Lev-C3b, PMA, BCG y MLM.

Las CEP cultivadas en presencia o en ausencia de rIFN γ responden de la misma manera ante el estímulo con Lev-C3b y MLM. Sin embargo el cultivo de las CEP en presencia del rIFN γ durante 24 h., disminuye muy considerablemente la producción de peróxido de hidrógeno estimulada con BCG (Fig. 9).

Fig. 9

PRODUCCION DE H_2O_2 POR MACROFAGOS PERITONEALES MURINOS
ACTIVADOS CON rIFN GAMMA DE RATON



con ensayo 4×10^5 de cel. 500μ de rIFN gamma 24 h
 20×10^5 de cel. 200×10^5 de células 100μ de 50μ por
ml de RR. 30 min/37°C

(* $p < 0.001$)

DISCUSION

Los resultados obtenidos en el presente estudio indican que el *Mycobacterium lepraemurium* (MLM), parásito intracelular obligado, penetra por fagocitosis a los macrófagos sin despertar los cambios oxidativos que "normalmente" acompañan al proceso fagocítico³⁶. Tales cambios oxidativos que no se producen traerían como resultado la producción de diversos intermediarios del metabolismo del oxígeno dentro de los que se encuentran el peróxido de hidrógeno, el anión superóxido, los radicales hidroxilo, el singlete de oxígeno, y probablemente algunos otros⁵³. Estos intermediarios, a excepción del peróxido de hidrógeno, son compuestos que poseen electrones no apareados y son por tanto, extremadamente reactivos. En conjunto, estos materiales han recibido diversos nombres: intermediarios reactivos del oxígeno, metabolitos del oxígeno, y radicales libres. Todos ellos son altamente tóxicos y por lo mismo resultan eficientes agentes microbicidas y citocidas. La mayoría de los microorganismos al ser fagocitados estimulan esta respuesta oxidativa (también llamada "estallido respiratorio") y en consecuencia sucumben a sus efectos tóxicos^{53,63,70}. De manera simplista así es como se elimina la mayoría de los microorganismos que son recogidos por las células fagocíticas. Sin embargo, con algunos microorganismos, sobre todo los de vida intracelular y específicamente los que parasitan y se establecen temporal o permanentemente en los macrófagos (como los patógenos de los géneros *Mycobacterium*⁵⁸, *Listeria*⁴⁴, *Nocardia*⁴, *Histoplasma*⁷³, e inclusive *Salmonella*¹⁶, y dentro de los protozoarios, *Leishmania*⁹ y *Toxoplasma*⁶⁰), la respuesta oxidativa de los fagocitos no siempre resulta un mecanismo eficiente de control. Algunos microorganismos poseen enzimas (peroxidasa, catalasa y/o superóxido dismutasa) que degradan e inactivan a los metabolitos del oxígeno, otros poseen además gruesas cubiertas lipídicas o polisacarídicas que funcionan como

corazas prácticamente impenetrables^{5,21,38,71} otros tienen en esas corazas protectoras moléculas que "atrapan" a los metabolitos e impiden sus efectos ulteriores⁹. Los parásitos intracelulares más evolucionados, aparte de tener alguna o algunas de las propiedades anteriores, han desarrollado un mecanismo de penetración que no involucra la respuesta oxidativa de las células; esto es, penetran por fagocitosis sin despertar los cambios oxidativos generadores de metabolitos tóxicos²². El bacilo de la lepra y el bacilo de la tuberculosis corresponden a este tipo de parásitos evolucionados.

Nuestros resultados en relación al *Mycobacterium lepraemurium* claramente indican que éste también es un parásito muy evolucionado en el sentido antes considerado; La infección de los macrófagos murinos derivados de las células del exudado peritoneal (CEP) por MLM no resulta en la producción ni de peróxido de hidrógeno ni del anión superóxido. Otra micobacteria, el *Mycobacterium bovis* BCG (BCG), se comporta de manera diferente al provocar en los macrófagos murinos la síntesis y liberación de cantidades elevadas de ambos metabolitos del oxígeno; en el ratón, mientras que la infección por MLM es progresiva y sistémica⁵², la infección por BCG es autolimitada⁴². El control de la infección por BCG probablemente involucra la participación de los metabolitos del oxígeno. En ausencia de los metabolitos del oxígeno los microorganismos tienen más probabilidades de sobrevivir; seguramente esta es la situación en el caso de la infección por MLM.

Existe un reporte en la literatura que indica que mientras que las micobacterias (*M. leprae*) viables son incapaces de estimular en los macrófagos humanos la respuesta oxidativa, las micobacterias inactivadas por calor o por irradiación si son capaces de hacerlo, implicando así que la viabilidad del microorganismo es un factor determinante en la estimulación de la respuesta. Nuestros resultados con MLM señalan que independientemente de su estado vital, este microorganismo es incapaz

de despertar la respuesta oxidativa en los macrófagos murinos. Este hallazgo plantea la posibilidad de que algún componente superficial del microorganismo o la estructuración superficial general del mismo estén "molecularmente" involucrados en la falta de respuesta oxidativa asociada al proceso de infección.

A partir de los experimentos pioneros de Mackaness³¹ sobre el efecto activante de la respuesta inmune celular en la función bactericida de los macrófagos, se empezaron a estudiar los posibles elementos celulares y solubles involucrados en el fenómeno. Se llegó a establecer que los linfocitos T, en respuesta a la estimulación antigénica, producían una serie de factores que mostraban diversos efectos sobre diversas células (poco tiempo después estos factores se bautizaron con el nombre de linfocinas)¹. Dentro de los factores producidos se identificaron algunos cuya células blanco eran los macrófagos, las linfocinas involucradas se designaron específicamente como MCF (macrophage chemotactic factor), MAF (macrophage activating factor), MIF (macrophage migration inhibitory factor), e INF (interferón)^{14,32,67,69}. La nomenclatura para estas y otras linfocinas en la actualidad está en desuso y aunque sus efectos biológicos se siguen reconociendo, éstos se han identificado en una serie grande de moléculas, la mayoría de ellas purificadas a homogeneidad, secuenciadas y clonadas, designadas ahora como citocinas. La única citocina que ha retenido su nombre original es el interferón, aunque su origen linfoide se ha querido remarcar llamando a esta molécula interferón gamma (IFN γ)⁶⁷. Todavía en la actualidad se acepta que el IFN γ es la citocina más importante como activadora del poder bactericida de los macrófagos¹⁵; otra citocina también reconocida como de gran importancia en la resistencia a infecciones es el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α)⁶⁸.

Una manera de inducir la producción de citocinas es la activación de las células linfoides con mitógenos del tipo de la concanavalina A (ConA) y la fitohemaglutinina

(PHA); los medios recuperados de los cultivos estimulados (medios condicionados, MC) contienen niveles medibles de la mayoría de las citocinas descritas⁵⁴. La adición de estos MC (MC-ConA) a los cultivos de macrófagos podría, en teoría, modificar su comportamiento ante diferentes estímulos. Nuestra intención al adicionar los MC-ConA a los cultivos de macrófagos fue potenciar, de alguna manera, el metabolismo oxidativo de los mismos en respuesta a su infección con MLM. Sin embargo, la adición de MC-ConA a los cultivos de macrófagos no modificó su comportamiento cuando las células se infectaron con MLM; ni los macrófagos cultivados en medio solo ni los cultivados en presencia de MC-ConA produjeron niveles medibles de peróxido de hidrógeno cuando se estimularon con MLM. Las Lev-C3b resultaron un estímulo muy eficiente de la respuesta oxidativa de las células pero ésta no fue modificada por efecto del MC-ConA a la concentración del 20% al 50%. Con el BCG, la situación fue diferente; los macrófagos cultivados en presencia de MC-ConA produjeron, consistentemente, menos cantidad de peróxido de hidrógeno que las células cultivadas en ausencia del mismo. El MC-ConA indujo un abatimiento de la respuesta oxidativa del orden del 40% (20% de MC-ConA) al 50% (50% de MC-ConA).

Dado que la citocina que nos interesaba poner en evidencia en el MC-ConA era el IFN γ , en los siguientes experimentos se recurrió al uso de interferón gamma recombinante murino. Los macrófagos cultivados durante 24 horas en presencia de rINF γ tampoco modificaron significativamente su capacidad de producción de peróxido de hidrógeno cuando se estimularon con Lev-C3b o con MLM. La respuesta oxidativa de los macrófagos cultivados en ausencia de rINF γ ante el estímulo con BCG fue similar a la respuesta inducida por las levaduras en las mismas células. Sin embargo la preincubación de los macrófagos con interferón gamma condujo, otra vez, a una depresión en la capacidad de las células para producir peróxido de hidrógeno en respuesta al estímulo con BCG. Además, el efecto inhibitorio del rINF γ fue mucho más

marcado que el observado cuando se usó el MC-ConA. Aceptando que BCG, como MLM, penetra a los macrófagos por fagocitosis utilizando los elementos de la vía endocítica: receptores, segundos mensajeros, proteínas reguladoras, protein-quinasas C (PKC), y otros, es posible que el rIFN γ pudiera interferir con la síntesis o con la expresión de alguno de estos elementos, abatiendo, de algún modo, la respuesta oxidativa de las células. Esta interferencia de la respuesta oxidativa por el rIFN γ podría operar tanto intracelularmente (considerando que sucede la endocitosis del BCG), como extracelularmente (impidiendo la endocitosis del microorganismo). Este es, sin duda, un aspecto que merece ser estudiado con mayor profundidad.

CONCLUSIONES

La resistencia del *Mycobacterium lepraemurium* (MLM) a su destrucción por los mecanismos bactericidas de los macrófagos, a parte que explica la evolución crónica pero insidiosa de la lepra murina, estimula el estudio de los mecanismos involucrados en la relación entre el parásito y su célula huésped.

Los resultados de los diversos estudios desarrollados en este trabajo indican que la cavidad peritoneal del ratón es una buena fuente de macrófagos; la inyección intraperitoneal de los animales con aceite mineral ligero triplica la cantidad de células obtenidas. Las células del exudado peritoneal (CEP) inducidas con aceite no alteran su metabolismo basal cuando menos en cuanto a la respuesta oxidativa estimulada por fagocitosis. La población celular colectada de la cavidad peritoneal de los animales, tres días después de la inyección del aceite, estuvo compuesta casi exclusivamente por células mononucleares, fagocíticas y esterasa positivas, es decir por macrófagos. En el sistema montado para medir la liberación de peróxido de hidrógeno por las CEP ante el estímulo fagocítico con levaduras se encontró que la máxima producción de H_2O_2 proporcional al número de células ocurrió cuando se usaron 4 millones de células de CEP y 80 millones de levaduras por ensayo. Las levaduras, utilizadas en una proporción de 20 levaduras por célula, resultaron un eficiente estímulo de la respuesta oxidativa; este reactivo, además de estable es barato.

Las levaduras sin opsonizar y las opsonizadas con anticuerpo o con complemento indujeron respuestas oxidativas similares, sin embargo, en el estudio siempre se usaron levaduras opsonizadas con complemento (con PMN humanos las levaduras opsonizadas con complemento estimulan mejores respuestas endocíticas y oxidativas que las levaduras sin opsonizar). Como las levaduras, el *Mycobacterium*

bovis BCG (BCG) resultó un eficiente estimulante de la respuesta oxidativa de los macrófagos murinos. Por el contrario, bajo ninguna circunstancia el MLM estimuló el metabolismo oxidativo de las células; ni el MLM vivo, ni el MLM inactivado por calor fueron capaces de inducir la liberación de peróxido de hidrógeno o de anión superóxido por los macrófagos en cultivo. La supuesta ayuda a los macrófagos conferida por los mediadores solubles de la inmunidad celular, tampoco modificó la incapacidad de estas células para exhibir el estallido respiratorio en respuesta a la infección por el MLM; ni el uso de medio condicionado (MC-ConA) ni de rIFN γ fueron efectivos en este sentido. En cambio, el tratamiento de los macrófagos con estos materiales condujo a un marcado abatimiento en su respuesta oxidativa ante el estímulo con BCG.

RESUMEN

Las células fagocíticas polimorfonucleares (PMN) y mononucleares (MN) funcionando de manera coordinada son generalmente suficientes para destruir a la mayoría de los microorganismos que en un momento dado pudieran invadir al organismo.

Los PMN debido a su corta vida no son tan eficientes como los macrófagos para eliminar a ciertos microorganismos como las micobacterias patógenas. Los macrófagos en cambio, tienen una capacidad microbicida efectiva pero al mismo tiempo limitada que puede ser incrementada por el efecto de la respuesta inmune celular (RIC). En algunas enfermedades infecciosas crónicas como la lepra, la competencia inmune celular se abate a tal grado que su actividad potenciadora de la función microbicida de los macrófagos es prácticamente nula.

Los macrófagos de ratones no inmunes responden con cambios metabólicos oxidativos y no oxidativos al estímulo con diferentes materiales; la estimulación de los macrófagos con levaduras opsonizadas con complemento y con *Mycobacterium bovis* BCG (BCG) induce los cambios oxidativos que conducen a la síntesis y liberación de peróxido de hidrógeno y de anión superóxido. Por el contrario, la estimulación de los macrófagos con el *Mycobacterium lepraemurium* (MLM) no indujo la liberación de esos metabolitos del oxígeno, y esto fué independiente de la viabilidad de los microorganismos.

Los macrófagos preincubados con medios condicionados preparados con concanavalina A (MC-ConA) y los macrófagos preincubados con interferón gamma recombinante (rIFN γ) de ratón, tampoco mostraron los cambios oxidativos en respuesta a la infección por el MLM. De hecho ni el MC-ConA ni el rIFN γ modificaron positivamente la producción de metabolitos del oxígeno en respuesta a ningún

estímulo; el metabolismo del oxígeno en los macrófagos murinos no es potenciado por el efecto de los mediadores de la RIC, sin embargo el pretratamiento de los macrófagos con MC-ConA e rIFN γ provocó una marcada reducción en la producción de peróxido de hidrógeno estimulada por el BCG.

Estos resultados indican que el MLM siendo un parásito evolucionado, posee mecanismos que evitan su reconocimiento por las células fagocíticas y penetran a éstas sin despertar los cambios oxidativos responsables de su actividad microbicida. Con esto el bacilo asegura su implantación y permanencia en las células huésped.

BIBLIOGRAFIA

1. Aarden, L. A. et. al. 1979. Revised nomenclature for antigen-nonspecific T cell proliferation and helper factors. *J. Immunol.* 123(6):2928-2929.
2. Abbas, A. K., Lichtman, A. H., Pober, J. S. 1991. Cellular and molecular immunology. W.B. Saunders Company. Harcourt Brace Jovanovich. Inc. pp. 56-57,121-125,251-253,275-277.
3. Adams, D. O., Hamilton, T. A. 1984. The cell biology of macrophage reactivation. *Ann.Rev.Immunol.* 2:283-318.
4. Beaman, L. and Beaman, B. 1992. The timing of exposure of mononuclear phagocytes to recombinant interferon γ and recombinant tumor necrosis factor α alters interactions with *Nocardia asteroides*. *J Leuk Biol.* 51:276-281.
5. Beaman, L. and Beaman B. L. 1990. Monoclonal antibodies demonstrate that superoxide dismutasa contributes to protection of *Nocardia asteroides* within the intact host. *Infect and Immun.* 58(9):3122-3128.
6. Brown, I. N., Krenzien, H. N. 1976. Systemic *Mycobacterium lepraemurium* infection in mice differences in doubling time in liver, spleen, and bone marrow, and a method for measuring the proportion of viable organisms in an inoculum. *Infect Immun.* 13:480-486.
7. Closs, O. 1975. Experimental murine leprosy: growth of *Mycobacterium lepraemurium* in C3H and C57/BL mice after footpad inoculation. *Infect. Immun.* 12(3):480-489.
8. Closs, O., Kronvall, G. 1975. Experimental murine leprosy. IX. Antibodies against *Mycobacterium lepraemurium* in C3H and C57BL mice with murine leprosy and in patients with lepromatous leprosy. *Scand. J. Immunol.* 4:735-740.

9. Chan, J., Fujiwara, T., Brennan, P. et al. 1989. Microbial glycolipids: Possible virulence factors that scavenge oxygen radicals. *Proc. Natl. Academ. Sci.* 86:2453-2457
10. Chang, Y. T. 1964. Long-term cultivation of mouse peritoneal macrophages. *J. Natl. Cancer Inst.* 22(1):19-35.
11. Chang, Y. T. 1976. Growth of macrophages obtained from various sources. *Int. J Lepr.* 44(1&2):50- 57.
12. D'Arcy Hart, P., Armstrong, A., Brown, C. A. and Draper, P. 1972. Ultrastructural study of the behavior of macrophages toward parasitic mycobacteria. *Infect Immun.* 5(5):803-807.
13. Evans, M. J., Newton, H. E. and Levy, L. 1973. Early response of mouse foot pads to *Mycobacterium leprae*. *Infect Immun.* 7(1):76-85.
14. Evans, R., Grant, C. K., Cox, H., Steele, K. and Alexander, P. 1972. Thymus-derived lymphocytes produce an immunologically specific macrophage-arming factor. *J. Exp. Med.* 136:1318-1322.
15. Farrar, M. A. and Schreiber, R. D. 1993. The molecular cell biology of interferon- γ and its receptor. *Ann. Rev. Immunol.* 11:571-611.
16. Fields, P. I., Groisman, E.A., Heffron, F. 1985. A *Salmonella* locus that controls resistance to microbicidal proteins from phagocytic cells. *Science* 243:1059-1062.
17. Frehel, C. and Rastogi, N. 1987. *Mycobacterium leprae* surface components intervene in the early phagosome-lysosome fusion inhibition event. *Infect Immun.* 55(12):2916-2921.
18. Fukunishi, Y., Okada, S., Nishiura, M., Kohsaka, K. 1982. Ultrastructural features of the multiplication of human and murine leprosy bacilli in macrophages of nude mice. *Inter J Lepr.* 50(1):68-75.

19. Godal, T., Rees, R. J. and Lamvik, J. O. 1971. Lymphocyte-mediated modification of blood-derived macrophages function *in vitro*; inhibition of growth of intracellular mycobacteria with lymphokines. *Clin. Exp. Immunol.* 8:625-637.
20. Goren, M. B., et al. 1976. Prevention of fagosome-lysosome fusion in cultured macrophages by sulfatides of *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 73:2510-2514.
21. Hillar, A., Nicholls, P. 1992. A mechanism for NADPH inhibition of catalase compound II formation. *FEBS* 314(2):179-182.
22. Holzer, T. J., Nelson, K. E., Schauf, V., Crispen, R. G. and Anderse, B. R. 1986. *Mycobacterium leprae* fails to stimulate phagocytic cell superoxide anion generation. *Infect. Immun.* 51:514-520.
23. Jackett, P. S., Aber, V. R., and Lowrie, D. B. 1978. Virulence of *Mycobacterium tuberculosis* and susceptibility to peroxidative killing systems. *J. Gen. Microbiol.* 107:273-278.
24. Klebanoff, S. J. and Shepard, CH. C. 1984. Toxic effect of the peroxidase-hydrogen peroxide-halide antimicrobial system of *Mycobacterium leprae*. *Infect Immun.* 44:534-536.
25. Kronvall, G., Closs, O., Bjune, G. 1977. Common Antigen of *Mycobacterium leprae*, *M.lepraemurium*, *M.avium*, and *M.fortuitum* in comparative studies using two different types of antisera. *Infect Immun.* 16(2):542-546.
26. Lanuois, P., Maillere, B., Dieye, A., Sarthou, J. L., Bach, M. A. 1989. Human phagocyte oxidative burst activation by BCG, *M.leprae*, and atypical mycobacteria: defective activation by *M.leprae* is not reversed by interferon γ . *Cell. Immunol.* 124:168-174.

27. Launois, P., Blum, L., Dieye, A., Millan, J., Sarthou, J. L., and Bach, M. A. 1989. Phenolic glycolipid-1 from *M. leprae* inhibits oxygen free radical production by human mononuclear cells. *Res. Immunol.* 140:847-855.
28. Lehrer, R. I., Lichtenstein, A. K., Ganz, T. 1993 DEFENSINS: Antimicrobial and cytotoxic peptides of mammalian cells. *Ann. Rev. Immunol.* 11:105-128.
29. Levy, L., Ng, H., Evans, M. J., Krahenbuhl, J. L. 1975. Susceptibility of thymectomized and irradiated mice to challenge with several organisms and the effect of dapsone on infection with *Mycobacterium leprae*. *Infect Immun.* 11(5):1122-1132.
30. Lovik, M. 1986. Experimental murine leprosy parameters and mechanisms of immunity in a mycobacterial infection. Tesis doctoral. University of Oslo, Institute for experimental medical research, Ullevål Hospital and Institute of Immunology and Rheumatology, Rikshospitalet and National Institute of Public Health, Department of Immunology and Unit for Vaccine Research and Supply. Oslo, Norway.
31. Mackaness, G. B. 1969. The influence of immunologically committed lymphoid cells on macrophage activity *in vitro*. *J. Exp. Med.* 129:973-992.
32. Mackaness, B. 1970. The monocyte in cellular immunity. *Sems. Hematol.* 7(2):1172-184.
33. Male, D., Champion, B., Cooke, A., Owen, M. 1991. Advanced Immunology. Second edition. JB Lippincott Company. Philadelphia, Gower Medical Publishing. pp. 15.9-15.11, 16.9-16.20.
34. May, M. E. and Spagnuolo, P. J. 1987. Evidence for activation of respiratory burst in the interaction of human neutrophils with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun.* 55:2304-2307.

35. McDonough, K. A., Kress, A. and Bloom, B. R. 1993. Pathogenesis of tuberculosis: interaction of *Mycobacterium tuberculosis* with macrophages. *Infect Immun.* 61(7):2763-2773.
36. Mor, N. 1983. Intracellular location of *Mycobacterium leprae* in macrophages of normal and immune-deficient mice and effect of rifampin. *Infect Immun.* 42(2):802-811.
37. Mor, N., Goren, M.B., Pabst, M.J. 1988. *Mycobacterium lepraemurium* activates macrophages but fails to trigger release of superoxide anion. *J. Immunol.* 140(11):3956-3961.
38. Morris, S.L., Nair, J., Rouse, D.A. 1992. The catalase-peroxidase of *Mycobacterium intracellulare*: nucleotide sequence analysis and expression in *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.* 138:2363-2370.
39. Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol Meth.* 65:55-61.
40. Myrvik, Q. N. et al. 1984. Disruption of phagosomal membrane of normal alveolar macrophages by the H37Rv strain of *Mycobacterium tuberculosis*. A correlate of virulence. *Amer. Rev. Resp. Dis.* 129:322-328.
41. Neill, M. A., Klebanoff, S. J. 1988. The effect of phenolic glycolipid-1 from *Mycobacterium leprae* on the antimicrobial activity of human macrophages. *J. Exp. Med.* 167:30-42.
42. Orme, I. M., Ratcliffe, M. J. H. and Collins, F. M. 1984. Acquired immunity to heavy infection with *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin and its relationship to the development of nonspecific unresponsiveness *in vitro*. *Cell. Immunol.* 88:285-296.

43. Pick, E., Mizel, D. 1981. Rapid microassays for the measurement of superoxide and hydrogen peroxide production by macrophages in culture using an automatic enzyme immunoassay reader. *J. Immunol. Meth.* 46:211-226.
44. Portnoy, D. A., Jacks, P. S. and Hinrichs, D.J. 1988. Role of hemolysin for the intracellular growth of *Listeria monocytogenes*. *J. Exp. Med.* 167:1459-1471.
45. Prabhakaranm, K., Harris, E. B., Kirchermer, W. F. 1976. Binding of C-labelled DOPA by *Mycobacterium leprae* in vitro. *Int J Lepr.* 44:58-64.
46. Ramasesh, N., Adams, L. B., Franzblau, S. G., Krahenbuhl, J. L. 1991. Effects of activated macrophages on *Mycobacterium leprae*. *Infect Immun.* 59(9):2864-2869.
47. Ratcliffe, N. A. 1985. Invertebrate immunity - a primer for the non-specialist. *Immunology leth.* 10:253-270.
48. Ress, R. J. W., Weddell, A. G. M. 1968. Experimental models for studying leprosy. *Ann. NY. Acad. Sci.* 154:214-236.
49. Roitt, I., Brostoff, J., Male, D. 1993. Immunology. Third edition. Editorial Consultant, Linda Gamlin BSc (Hans) MSc. Masby. pp. 1.9,2.17.15.15.
50. Roitt, I. 1991. Essential Immunology. Seventh edition. Blackwell Scientific Publications, Oxford. pp. 3-15,29-33.
51. Rojas-Espinosa, O. 1988. Macrophages, myeloperoxidase, and *Mycobacterium lepraemurium*. *J Leuk Biol.* 43:468-670.
52. Rojas-Espinosa, O., Vega, R., Oltra, A., Arce, P., Nuñez, A. 1988. Transitory macrophage activation in the granulomatous lesions of *Mycobacterium lepraemurium*-induced lepromatoid leprosy in the mouse. *Int J Lepr.* 56(3):428-436.

53. Root, R. K., Cohen, M. S. 1981. The microbicidal mechanisms of human neutrophils and eosinophils. *Rev Infect Diseases* 3(3):565-598.
54. Ruco, L. P., Meltzer, M.S. 1978. Macrophage activation for tumor cytotoxicity: development of macrophage cytotoxic activity requires completion of a sequence of short-lived intermediary reactions. *J. Immunol.* 121(5):2035-2042.
55. Segal, A. W., West, I., Wientjes, F., Nugent, J. H. A., Chavan, A. J., Haley, B., Garcia, R. C., Rosen, H., Scrace, G. 1992. Cytochrome b_{245} is a flavocytochrome containing FAD and the NADPH-binding site of the microbicidal oxidase of phagocytes. *Biochem. J.* 284:781-788.
56. Sharp, A. K., Benerjee, D. K. 1985. Hydrogen peroxide and superoxide production by peripheral blood monocytes in leprosy. *Clin. exp. Immunol.* 60:203-206.
57. Shepard, C. C. 1960. The experimental disease that follows the injection of human leprosy bacilli into food-pads of mice. *J. Exp. Med.* 112:445-454.
58. Sibley, L. D., Franzblau, S. G., Krahenbuhl, J. L. 1987. Intracellular fate of *Mycobacterium leprae* in normal and activated mouse macrophages. *Infect Immun.* 55(3):680-685.
59. Sibley, L. D., Krahenbuhl, J. L. 1988. Induction of unresponsiveness to gamma interferon in macrophages infected with *Mycobacterium leprae*. *Infect Immun.* 56(8):1912-1919.
60. Sibley, L. D., Weidner, E. and Krahenbuhl, J. L. 1985. Phagosome acidification blocked by intracellular *Toxoplasma gondii*. *Nature* 315:416-419.
61. Sibley, L. D., Krahenbuhl, J. L. 1987. *Mycobacterium leprae*-burdened macrophages are refractory to activation by gamma interferon. *Infect. Immun.* 55(2):446-450.

62. Silbaq, F., Mor, N., Levy, L., Bercovier, H. 1990. The disease of CBA and BALB/c mice that follows inoculation of a small number of *Mycobacterium lepraemurium* into the hind foot pad. *Int. J. Lepr.* 56(4):681-689.
63. Steinbeck, M. J., Khan, A. U., Karnovsky, M. J. 1992. Intracellular singlet oxygen generation by phagocytosing neutrophils in response to particles coated with a chemical trap. *J. Biol. Chem.* 267(19):13425-13433.
64. Stites, D. P., Stobo, J. D., Wells, J. V. 1988. Inmunología básica y clínica. Sexta edición. ed. El manual moderno S.A de C.V. México. pp. 89-107.
65. Sturgill-Koszycki, S., Schlesinger, P. H., Chakraborty, P., Haddix, P. H., Collins, H. L., Fork, A. K., Allen, R. D., Gluck, S. L., Heuser, J. and Russell, D. G. 1994. Lack of acidification in *Mycobacterium* phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton-ATPase. *Science* 263:678-681.
66. Totterman, T. H., Ranki, A. and Hayry. 1977. Expression of the acid α -naphthyl acetate esterase marker by activated and secondary T lymphocytes in man. *Scand. J. Immunol.* 6:305-310.
67. Trinchieri, G. and Perussia, B. 1985. Immune interferon: a pleiotropic lymphokine with multiple effects. *Immunol. Today.* 6(4):131-136.
68. Vassalli, P. 1992. The pathophysiology of tumor necrosis factors. *Annu. Rev. Immunol.* 10:411-452.
69. Ward, P.A., Remold, H. G. and David, J. R. 1969. Leukotactic factor produced by sensitized lymphocytes. *Science.* 163:1079-1081.
70. Weiss, S. J. 1989. Mechanisms of disease: Tissue destruction by neutrophils. *N. Engl J Med.* 320(6):365-376.
71. Wheeler, P. R. 1984. Variation of superoxide dismutase levels in extracts of *Mycobacterium leprae* from armadillo liver. *Int. J. Lepr.* 52(1):49-54.

72. Wilson, C. B., Tsai, V., Remington, J. S. 1980. Failure to trigger the oxidative metabolic burst by normal macrophages. *J. Exp. Med.* 151:328-346.
73. Wu-Hsieh, B., Zlotnik, A. and Howord, D. H. 1984. T-cell hybridoma-produced lymphokine that activate macrophage to suppress intracellular growth of *Histoplasma capsulatum*. *Infect. Immun.* 43:380-385.
74. Zeichner, S. L. 1983. Isolation and characterization of macrophage phagosomes containing infectious and heat-inactivated *Chlamydia psittaci*: two phagosomes with different intracellular behaviors. *Infect Immun.* 40(3):956-966.
75. Zeya, H. I., Spitznagel, J. K. 1966. Antimicrobial specificity of leukocyte lysosomal cationic proteins. *Science* 154:1049-1951.16.

APENDICE

NOTA: todos los pesos moleculares están calculados para reactivos anhidros.

Solución de Aisever

Glucosa ----- 20.5 g

NaCl ----- 4.2 g

Citrato de sodio ----- 8.0 g

Acido cítrico ----- 0.55 g

ajustar a 1 litro con H₂O desionizada.

Esterilizar a 10 lb/10 min.

Solución salina balanceada de Hanks (HBSS)

Glucosa ----- 1.0 g

NaCl ----- 8.0 g

KCl ----- 0.4 g

CaCl₂ ----- 0.14g

MgSO₄ ----- 0.1 g

MgCl₂ ----- 0.1 g

KH₂PO₄ ----- 0.06g

Na₂HPO₄ ----- 0.06g

Bicarbonato de sodio ----- 0.35g

pH 7.2 ajustar a 1 litro con H₂O desionizada.

Esterilizar por filtración (0.45μ).

Solución de peroxidasa rojo de fenol (HRPO)

Regulador de PO_4 pH 7.0, 10 mM

NaCl 140 mM

glucosa 5.5 mM

rojo de fenol 4 mg/100 ml

1. preparar el regulador de fosfatos

K_2HPO_4 -----1.74g

KH_2PO_4 -----1.36g

ajustar a pH 7.0 y aforar a 1 litro con H_2O desionizada.

2. disolver en el regulador:

Glucosa -----1.0 g

NaCl ----- 8.18g

Rojo de fenol ----- 0.04g

Esterilizar por filtración (0.45 μ)

3. la peroxidasa se adiciona minutos antes de utilizarla.

1 mg de peroxidasa / 10 ml de rojo fenol.

Medio de cultivo caldo tioglicolato (semisolido) (MERCK 15867)

0.75 g de polvo en 50 ml de H_2O desionizada.

Esterilizar 15 lb/15 min.

Proteosa peptona al 9% (DIFCO B 122)

4.5 g de polvo en 50 ml de H_2O desionizada.

Esterilizar 15 lb/15 min.

Medio de cultivo (RPMI) (SIGMA R 6504)

RPMI ----- 2.6 g

bicarbonato de sodio ----- 0.37g

suero CPSR-2 ----- 25 ml

aforar a 250 ml con H₂O desionizada.

Esterilizar por filtración (0.45μ).

Medio AIMV (GIBCO 12055-026)

contiene:

L-glutamina

estreptomina ----- 50 μ/ml

gentamicina ----- 10 μ/ml

Medio de Youmans modificado por Proskauer y Beck (PBY)

asparagina ----- 0.5 g

KH₂PO₄ ----- 0.5 g

K₂SO₄ ----- 0.05 g

glicerol ----- 2.0 ml

aforar a 100 ml con H₂O tridestilada

los ingredientes se disuelven en el agua en el orden descrito, asegurandose de que cada uno se disuelva por completo antes de añadir el siguiente.

el pH se ajusta a 7.0 con NaOH al 40 % y se añade

citrato de magnesio ----- 0.15 g

Esterilizar a 121°C durante 20 min.

Regulador de lisis, pH 7.4

NH_4Cl ----- 3.42 g

KHCO_3 ----- 0.4 g

Na_2EDTA ----- 0.014g

Aforar a 400 ml con H_2O desionizada.

Esterilizar 15 lb/15 min.

Azul tripano al 0.2% (SIGMA T-6146)

azul tripano ----- 0.20 g

NaCl ----- 0.85 g

disolver en H_2O desionizada y aforar a 100 ml.

Esterilizar por filtración (0.45 μ).

MTT (SIGMA M 2128)

50 mg de MTT se disuelven en 10 ml de Hanks y se filtran por 0.22 μ .

Para disolver los cristales azules formados durante la reacción se agrega una solución

0.04N de HCl en isopropanol:

33.12 μl de HCl (37% de pureza) en 9.966 ml de isopropanol.

La solución colorida se lee a una longitud de onda de 570 nm.

Tinción para esterasa

Naftol AS-D acetato (ICN Flow

102410) ----- 5 mg

Dimetil formamida ----- 0.5 ml

TRIS-HCl 0.1 M pH 7.1 ----- 50 ml

GBC fast garnet (SIGMA F-0875) -----10 mg

La mezcla se pasa por papel filtro (Whatman #1).

Incubar las monocapas celulares con esta mezcla de 30 a 40 minutos a temperatura ambiente, la reacción positiva da un color rojo.