

T
522

90891



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
UNIDAD XOCHIMILCO

Efecto del Factor Inhibidor de la Locomoción de Monocitos (FILM)
producido por *Entamoeba histolytica* sobre la producción de
citocinas en linfocitos T CD4+

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P R E S E N T A :

M. EN C. SARA ROJAS DOTOR

DIRECTORA DE TESIS: DRA. MA. GUADALUPE RICO ROSILLO

MÉXICO, D. F.

2005



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
UNIDAD XOCHIMILCO



Efecto del Factor Inhibidor de la Locomoción de Monocitos (FILM) producido por *Entamoeba histolytica* sobre la producción de citocinas en linfocitos T CD4+

M en C SARA ROJAS DOTOR

COMITÉ TUTORIAL:

TUTOR: DRA. MA. GUADALUPE RICO ROSILLO

ASESORES: DRA. JULIA PÉREZ RAMOS

DRA. CECILIA XIMÉNEZ GARCÍA

SINODALES: DR. JOSÉ LUÍS GÓMEZ OLIVARES

DRA. GLORIA VEGA ROBLEDO

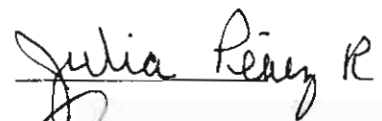
El jurado designado por las Divisiones de Ciencias Biológicas y de la Salud de las unidades Iztapalapa y Xochimilco aprobó la tesis que presentó

M en C SARA ROJAS DOTOR

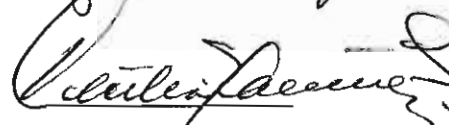
COMITÉ TUTORIAL

TUTOR DRA. MA. GUADALUPE RICO ROSILLO 

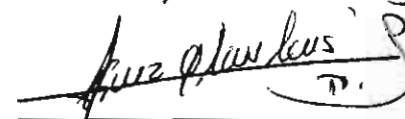
ASESORES DRA. JULIA PÉREZ RAMOS



DRA. CECILIA XIMÉNEZ GARCÍA



SINODALES DR. JOSÉ LUIS GÓMEZ OLIVARES



DRA. GLORIA BERTHA VEGA ROBLEDO



Este trabajo lo dedico con amor a mi compañero, esposo y amigo

Dr. en C. Víctor Manuel Domínguez Hernández

Por tu apoyo, por tus palabras de aliento, por tu comprensión, por infundirme siempre tranquilidad y confianza.

A los seres que AMO

Víctor David Marco Julio Leonardo Daniel Maria Teresa

A la memoria de mi Padre

Sr. Constantino Rojas García[†]

AGRADECIMIENTOS

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA,
CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA (CONACYT) y al
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL**

Por brindarme la oportunidad de realizar mis estudios de Doctorado

A la memoria del DR. ROBERTO KRETSCHMER SCHMID[†]

Por sus valiosas aportaciones al conocimiento científico y por todo el apoyo que me brindó durante la realización de este trabajo de investigación

Al Dr. FRANCISCO BLANCO-FAVELA

Por sus acertados comentarios, por transmitir sus conocimientos e impulsar el nivel académico de todos sus colaboradores.

A la Dra. JULIA PÉREZ

Por la orientación brindada en la elaboración de esta tesis, por su buena disposición, consejos y sugerencias para lograr esta meta

De manera especial agradezco a mi Directora de Tesis,

DRA. GUADALUPE RICO por ser siempre positiva, dinámica, llena de ideas y proyectos nuevos. Su apoyo y orientación han sido piezas clave en mi formación académica

A mi comité tutorial

Dra. Cecilia Ximénez García

Dr. José Luís Gómez Olivares

Dra. Gloria Vega Robledo

Por su tiempo y valiosas enseñanzas

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Inmunología de la Unidad de Investigación Médica en Inmunología del Hospital de Pediatría.

Centro Médico Nacional Siglo XXI, del Instituto Mexicano del Seguro Social.

Bajo la dirección de la Dra. Guadalupe Rico Rosillo. Esta investigación fue financiada por el Consejo Nacional de Ciencia y tecnología (CONACYT)

GRANT 38104-M.

ÍNDICE GENERAL

	Página
1. RESUMEN	1
2. ABSTRACT	2
3. INTRODUCCIÓN	3
3.1 Respuesta inflamatoria	3
3.2 Moléculas de adhesión	5
3.3 Citocinas	7
3.4 Funciones de las citocinas	9
3.5 Factores reguladores de la respuesta inmune innata	9
3.6 Factores reguladores de la respuesta inmune adaptativa	9
3.7 Factores estimuladores de la hematopoyesis	10
3.8 Receptores de citocinas	13
3.9 Respuestas tipo Th1 o Th2	14
3.10 Complemento	17
4. ANTECEDENTES	18
5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	23
6. OBJETIVOS	24
6.1 Objetivo general	24
6.2 Objetivos particulares	24
7. HIPÓTESES	24
8. MATERIAL Y MÉTODOS	25
8.1 Obtención de células mononucleares humanas	25
8.2 Aislamiento de linfocitos T CD4+ humanos	25
8.3 Pureza de los linfocitos T CD4+	26

8.4	Concentración óptima de PMA	27
8.5	Concentración óptima del FILM	27
8.6	Sistema de incubación de linfocitos T CD4+	27
8.7	Marcaje inmunofluorescente para moléculas de superficie celular y receptores de quimiocinas	28
8.8	Marcaje inmunofluorescente para citocinas intracelulares	28
8.9	Estimulación para producción de citocinas	29
8.10	Determinación de citocinas por el método de ELISA	29
	8.10 (a) Preparación de la placa	29
	8.10 (b) Protocolo para ELISA	30
8.11	Extracción en cadena de la polimerasa usando Transcripción reversa (RT)	31
8.12	PCR en tiempo Real	31
9.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	32
10.	RESULTADOS	33
11.	DISCUSIÓN	53
12.	CONCLUSIONES	57
13.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58
14.	ANEXOS	67
	14.1 Artículos Publicados y/o enviados a publicación	67

ABREVIATURAS

AHA	Absceso hepático amibiano
FILM	Factor inhibidor de la locomoción de monocitos
Da	Daltones
<i>E. histolytica</i>	<i>Entamoeba histolytica</i>
ELISA	Ensayo enzimático inmunoabsorbente
PMA	Forbol 12-miristato 13-acetato
NF-kB	Factor nuclear -kB
Cox 2	Cyclooxygenasa 2
CCR5	Receptor de quimiocinas perteneciente al grupo beta
CXCR3	Receptor de quimiocinas perteneciente al grupo delta donde X puede ser cualquier aminoácido
IL	Interleucina
IFN- γ	Interferón gamma
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-1 β	Interleucina 1 beta
PGE2	Prostaglandina 2
Met	Metionina
Gln	Glutamina
Asp	Aspargina
Ser	Serina
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
O ₂ ⁻	Anión superóxido
AMPc	Adenosin monofosfato ciclico

PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RNAm	Ácido ribonucleico mensajero
RT	Transcriptasa reversa
VCAM-1	Molécula de adhesión celular vascular
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
ICAM-1	Molécula de adhesión intercelular 1

1. RESUMEN

Entamoeba histolytica produce el **Factor Inhibidor de la Locomoción de Monocitos (FILM)**, un pentapéptido (Met-Gln-Cis-Asn-Ser) con propiedades anti-inflamatorias probadas tanto *in vitro* como *in vivo*. El FILM pudiera contribuir a la exigua inflamación tardía observada en el absceso hepático amibiano, a través de efectos que ejerce directamente sobre los monocitos (i.e. disminución de la locomoción y estallido respiratorio) o indirectamente, modulando la producción y/o expresión de citocinas involucradas en el reclutamiento de células mononucleares al foco inflamatorio tardío. En este trabajo evaluamos el efecto del FILM sobre la expresión de citocinas pro y anti-inflamatorias a nivel de gen y de proteína en linfocitos T CD4⁺ a las 24 h de incubación con RPMI, FILM, PMA, y PMA+FILM. Se encontró que el FILM incrementa la expresión del factor de activación CD69 en estas células por lo que podemos inferir que el FILM se comporta como un agente inductor/activador bajo estas condiciones experimentales. La expresión del gen y de proteínas (citocinas) IL-1 β , IFN- γ , IL-2, IL-4 e IL-10 y la co-localización con receptores de quimiocinas IL-1 β /CCR5, IFN- γ /CCR5, IL-2/CCR5, IL-4CCR4 e IL-10/CCR4 son producidos por efecto del FILM. Mientras que la producción inducida por PMA de IL-1 β , IFN- γ , fue inhibida por el FILM, la IL-2 no fue afectada por el FILM, en contraste la expresión de IL-10 fue incrementada por el FILM. El efecto inhibitor del FILM podría explicarse por dos mecanismos diferentes e independientes, inhibición de citocinas pro-inflamatorias como IL-1 β , IFN- γ , o por incremento de la expresión de la IL-10, con el aumento concomitante de los efectos supresores atribuidos a la IL-10.

2. Abstract

Entamoeba histolytica produces *Monocyte Locomotion Inhibitory Factor* (MLIF) a pentapeptide (Met-Gln-Cys-Asn-Ser) with anti-inflammatory properties tested *in vitro* and *in vivo*. MLIF could contribute to the scant late inflammatory observed in the hepatic amebic abscess through the effects that exerts directly over the monocytes (i.e. decrease of the locomotion and the respiratory burst), or indirectly by modulating the production and/or expression of the involved cytokines in the recruiting of mononuclear cells to the late anti-inflammatory cytokine expression at gene and protein levels in T CD4⁺ lymphocytes, 24 h after incubation with RPMI, MLIF, PMA, and PMA+MLIF. It was found that MLIF increases the expression of the CD69 activation factor in these cells; therefore we may assume that MLIF behaves as an inductor/activator agent under these experimental conditions. The expression of the gene and the IL-1 β , IFN- γ , IL-2, IL-4 and IL-10 proteins and co-localization with chemokine receptors IL-1 β /CCR5, IFN- γ /CCR5, IL-2/CCR5, IL-4/CCR4 and IL-10/CCR4 were produced due to MLIF. As the production induced by PMA of IL-1 β , IFN- γ , was inhibited by MLIF, IL-2 were not affected by MLIF, in contrast IL-10 expression was increased by MLIF. The inhibitory effect of MLIF could be explained by two different or independent mechanisms: 1) inhibition of pro-inflammatory cytokines as IL-1 β , IFN- γ , or 2) an increase in the IL-10 expression, with the concomitant increase of the suppressive effects attributed to IL-10

3. INTRODUCCIÓN

3.1 Respuesta Inflamatoria

La inflamación es la reacción del organismo frente a la invasión por parte de un agente infeccioso, ante un estímulo antigénico o incluso simplemente en lesiones físicas. Es una respuesta donde se produce un desplazamiento de leucocitos y moléculas plasmáticas hacia las regiones de la infección o de lesión tisular. Sus principales efectos son el aumento del flujo sanguíneo hacia la región, el aumento de la permeabilidad vascular frente a las moléculas séricas de gran tamaño (anticuerpos o inmunoglobulinas) y la migración de leucocitos a través del endotelio vascular local en dirección a la zona inflamada; la inflamación está bajo el control de las quimiocinas, los sistemas enzimáticos plasmáticos (complemento, coagulación, fibrinólisis, etc.) las citocinas y los productos de las células cebadas, las plaquetas y los leucocitos (Abbas y Lichtman, 2004, Roitt, 1998).

Las citocinas estimulan la expresión de moléculas de adhesión en las células endoteliales; estas moléculas de adhesión se unen a los leucocitos e inician su atracción hacia las zonas de infección. Los productos microbianos (péptidos con N-formilmetionil), las quimiocinas, los péptidos derivados del complemento (C5a) y los leucotrienos (B4) actúan sobre los leucocitos para estimular su migración y sus funciones microbicidas. La composición de las células que participan en los procesos inflamatorios, se modifica con el tiempo y pasa de rica en neutrófilos a rica en células mononucleares lo que refleja un cambio en la atracción de los diferentes leucocitos. Los macrófagos atraídos hacia la zona de infección se activan por productos microbianos y por el interferón gamma (IFN- γ) derivado de

los linfocitos asesinos naturales (NK) para fagocitar y dar muerte a los microorganismos (Figura 1).

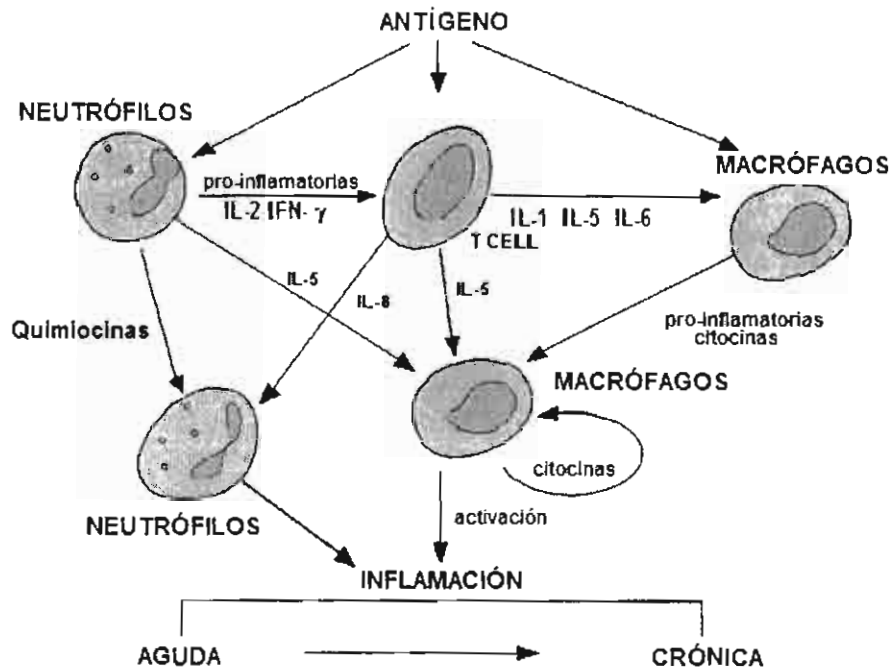


Figura 1. Las citocinas juegan un papel muy importante en el desarrollo de una respuesta inflamatoria aguda o crónica. La interleucina 1 (IL-1), IL-6, factor de necrosis tumoral alfa ($TNF\alpha$), e IL-12 entre otras así como las quimiocinas tienen efectos redundantes y pleiotropicos que juntos contribuyen a la respuesta inflamatoria. Si el antígeno es eliminado, existe apoptosis de las células inflamatorias o regreso de algunas a la circulación, si persiste el antígeno por varios días la inflamación es crónica, con la presencia de células cebadas, eosinófilos linfocitos y macrófagos la producción de anticuerpos y citocinas por estas células que muchas veces dañan el tejido. (Luscinskas y Gimbrone. Annu Rev Med. 1996; 47:413-421)

3.2 Moléculas de adhesión

Los leucocitos son atraídos desde la sangre hacia las zonas de infección mediante su unión a moléculas de adhesión, situadas en las células endoteliales y por la acción de sustancias quimiotácticas producidas en respuesta a la infección.

Las principales moléculas de adhesión que han sido identificadas sobre el endotelio para iniciar la migración celular son las selectinas E y P (lectinas que se unen a los carbohidratos del endotelio), las moléculas de adhesión intercelular (ICAM), y moléculas de adhesión de las células vasculares (VCAM). Tanto las ICAM como las VCAM pertenecen a la superfamilia del gene de las inmunoglobulinas. Otras moléculas de adhesión que han sido identificadas sobre la membrana de los linfocitos son las integrinas (receptores para ICAM, VCAM) y las L-selectinas. Una vez que la célula ha abandonado el torrente sanguíneo, su migración es dirigida por quimiocinas (quimioattractantes) pequeñas glicoproteínas (8-14 kDa) a los sitios de infección promoviendo el estado inflamatorio (Niederlova, 1999, Sinigaglia y D'Ambrosio, 2000) (figura 2).

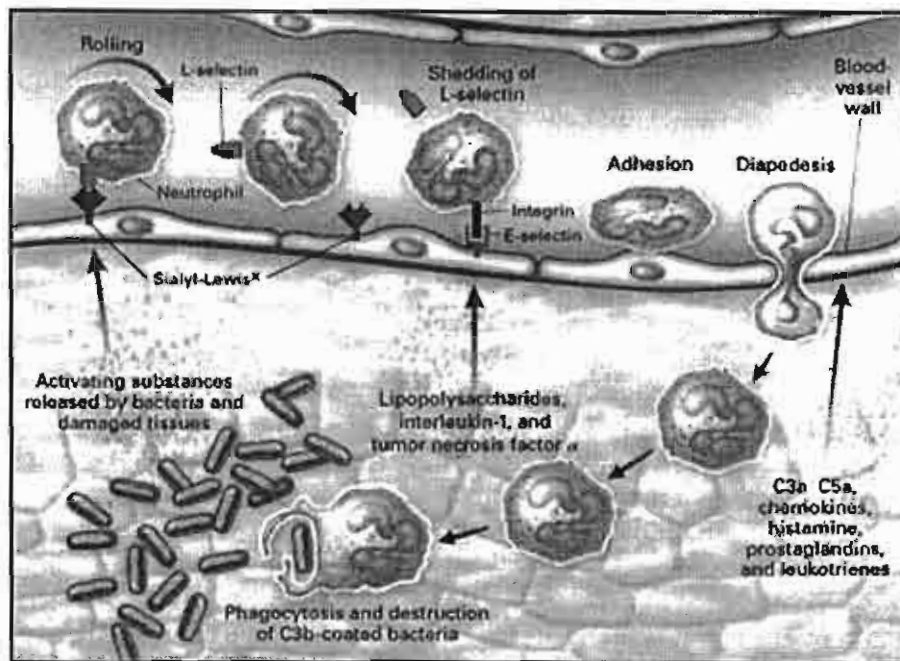


Figura 2. En las zonas de infección, los macrófagos que se han encontrado con microorganismos sintetizan citocinas (como TNF e IL-1) que activan a las células endoteliales de las venulas cercanas para que produzcan selectinas, ligandos de integrinas y quimiocinas. Las selectinas median la unión débil y el rodamiento de los leucocitos sanguíneos, como los neutrófilos, sobre el endotelio, las integrinas intervienen en la adhesión firme de los neutrófilos y las quimiocinas aumentan la afinidad de las integrinas y estimulan la migración de las células a través del endotelio hacia los lugares de infección. Abbas y col. Ed. Elsevier 2004. p-281

Las quimiocinas son polipéptidos pequeños que activan y dirigen la migración de monocitos, neutrófilos, eosinófilos y linfocitos T activados del torrente sanguíneo a los sitios de infección. Regulan efectos pro inflamatorios por unión a receptores específicos pertenecientes a la super familia de siete dominios alfa transmembrana acoplados a la proteína G (proteínas fijadoras de trifosfato de guanosina trimérico GTP (proteína G) y estos pueden también ser expresados como marcadores de subpoblaciones Th1/Th2 (Mosmann y Fong, 1989). En células Th1 son expresados CCR5 y CXCR3, los marcadores CCR4 y CCR8 en

células Th2 (Sallusto y col., 1998). Se ha demostrado que varios receptores de quimiocinas inflamatorias como CCR1, CCR2, CCR3, CCR5 y CXCR3 son poco expresadas después del disparo del receptor de células T (TCR) en células Th1/Th2. En contraste CCR7, CCR4 y CCR8 son sobre-expresadas con la activación del TCR, estos cambios en la expresión del receptor de quimiocinas pueden servir para modificar la conducta migratoria de células Th activadas y establecer la jerarquía de acción entre los distintos receptores de quimiocinas (Loetscher y col., 1998, Zingoni y col., 1998).

Las citocinas son los principales mediadores de la inflamación de muchas patologías como artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, asma y alergias (Ruschpler y Stiehl, 2002, Ivashkiv, 2003, D'ambrosio y col., 2003, D'ambrosio, 2002). La defensa del huésped contra patógenos infecciosos es altamente mediado por mecanismos dependientes de inmunidad humoral o celular. Cada mecanismo preferentemente actúa contra patógenos intra o extracelulares, virus o helmintos. Estas repuestas de defensa del huésped son estrictamente reguladas por citocinas que secretan las poblaciones T cooperadoras Th1 y Th2 (Kawakami, 2002).

3.3 Citocinas

Las citocinas son polipéptidos de bajo peso molecular o glucoproteínas que regulan numerosas funciones celulares y permiten señales autócrinas (una citocina particular puede unirse a receptores de la membrana de la misma célula que la secreta), parácrinas (puede unirse a receptores de células blanco cercana a las células que la producen) y endócrinas (en pocos casos también puede unirse a

receptores de células blanco en lugares distantes del cuerpo), contribuyen al lenguaje químico que regula el desarrollo y reparación de tejidos, hematopoyesis, inflamación y la respuesta inmune específica y no específica. Éstas actúan sobre muchos blancos celulares (pleiotropismo) y frecuentemente afectan la acción de otras citocinas de una manera aditiva, sinérgica o antagónica (Kubi, 2001).

A pesar de que son muchas y muy diversas las proteínas que se designan como citocinas, comparten ciertas propiedades que les permiten agruparse como tales, dentro de estas se encuentran las siguientes: a) se producen durante la fase efectora de la inmunidad específica o inespecífica, desencadenan mecanismos inflamatorios y los regulan; b) su secreción es autolimitada y de poca duración; c) muchas citocinas individuales pueden producirse por diversos tipos celulares; d) actúan sobre distintas células u órganos blanco; e) pueden tener diferentes efectos sobre una misma célula blanco; f) varias citocinas pueden tener el mismo efecto sobre la misma célula (redundante); g) pueden influir sobre la síntesis y efectos de otras citocinas; h) sus efectos se inician cuando son captadas por un receptor específico en la membrana de las células blanco; i) la expresión de sus receptores es regulada por diversas señales incluyendo a otras citocinas la mayoría de las respuestas a citocinas implica biosíntesis de novo de ácido ribonucleico mensajero (ARNm) y proteínas; j) para muchas células blanco, las citocinas actúan como factores de crecimiento (Vilches y Parham, 2002, Alexander, 2002).

3.4 Funciones de las citocinas

Las citocinas se pueden dividir en tres grandes grupos funcionales. Las que participan en la respuesta inmune innata, los que participan en la respuesta inmune adaptativa y factores estimuladores de la hematopoyesis.

3.5 Factores reguladores de la respuesta inmune innata

Los factores reguladores de la respuesta innata son las citocinas como IL-1, IL-2 e IFN- γ . Son producidos principalmente por células mononucleares en respuesta a agentes infecciosos. Los productos bacterianos como lipopolisacáridos (LPS) y los víricos como el ARN bicatenario, estimulan directamente a los macrófagos para que secreten citocinas. La mayoría de los miembros de este grupo de citocinas actúan sobre las células endoteliales para que expresen receptores de superficie como las selectinas o integrinas que son reconocidos por los leucocitos para ser retenidos por las células endoteliales y acudir a los sitios donde se encuentra el agente extraño y permiten estimular y regular las reacciones inflamatorias agudas contra los microorganismos (tabla 1).

3.6 Factores reguladores de la respuesta inmune adaptativa

Son sintetizados por linfocitos T en respuesta al reconocimiento específico de antígenos extraños. Estas citocinas atraen, activan y regulan a linfocitos T y a

otras células especializadas como los fagocitos mononucleares, los neutrófilos y los eosinófilos para eliminar antígenos en la fase efectora (tabla 1)

3.7 Factores estimuladores de la hematopoyesis

Estos factores son producidos por células del estroma, médula ósea, los leucocitos y otras células, son los encargados de estimular el crecimiento y la diferenciación de las células inmaduras. En general las citocinas de la inmunidad innata y adaptativa son producidas por diferentes poblaciones celulares que actúan en diferentes células blanco (Tabla 1).

TABLA 1

CITOCINAS DE LA INMUNIDAD INNATA Y ADAPTATIVA

CARACTERÍSTICAS	INMUNIDAD INNATA	INMUNIDAD ADAPTATIVA
Citocinas	TNF- α , IL-1, IL-12, *IFN- γ	IL-2, IL-4, IFN- γ
Principal fuente celular	macrófagos, células NK	linfocitos T
Principales funciones fisiológicas	mediadores de la inmunidad innata e inflamación (local y sistémica)	mediadores de la inmunidad adaptativa, regulación de crecimiento de linfocitos y diferenciación y activación de células efectoras, macrófagos, células cebas
Cantidades producidas	detectable en suero	no detectable en suero
Efectos locales o sistémicos	ambos	solo locales
Enfermedad	choque séptico (sistémico)	inflamación (local) granulomatosa
Inhibidores	corticoesteroides	ciclosporina

IL interleucinas, IFN- γ interferón gamma, TNF factor de necrosis tumoral

*El IFN- γ es importante tanto en la inmunidad innata como en la adaptativa

Las citocinas también han sido clasificadas en función de su respuesta biológica, o de acuerdo al receptor que se unen. De acuerdo a su función biológica se clasifican en citocinas pro-inflamatorias como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), interleucina 1 beta (IL-1 β), interleucina 6 (IL-6), y las anti-inflamatorias interleucina 10 (IL-10), interleucina 4 (IL-4), interleucina 13 (IL-13) entre otras.

El TNF es la citocina primaria en la respuesta inflamatoria, existen dos formas con un 50% de homología: TNF- α y TNF- β el TNF- α es producido por monocitos/macrófagos, fibroblastos, células B y células T; esta citocina promueve la inflamación al inducir la producción de IL-1 e IL-6.

La IL-1 es una citocina pro-inflamatoria prototipo, mediadora de la inflamación, ya que en general inicia y/o incrementa una gran variedad de genes que se expresan durante la inflamación, particularmente de otras citocinas como IL-6 y TNF- α . La familia de la IL-1 está constituida por tres miembros, dos de los cuales (IL-1 α e IL-1 β) son potentes activadores de las células. El tercer miembro de esta familia es el receptor antagonista del IL-1Ra, que es el antagonista natural del efecto inducido por la IL-1. Esta citocina es clave en la respuesta del organismo contra la invasión de microorganismos, inflamación, reacciones inmunológicas y daño a tejidos. Es producida por macrófagos, células endoteliales y células T que han sido activadas.

La IL-6 es una citocina secundaria en la respuesta inflamatoria y muestra propiedades tanto pro-inflamatorias como anti-inflamatorias y es producida por células T, monocitos/macrófagos, células endoteliales, células de la glía y

astrocitos. La expresión de IL-6 es regulada positivamente por la IL-1 así como por el TNF- α , de esta manera IL-6 inhibe la producción y secreción de la IL-1 y el TNF- α . De tal forma que la IL-6 es considerada como un mediador importante de las reacciones de fase aguda.

La IL-10 es un inhibidor de la activación de los linfocitos T y de la secreción de IL-12 (estímulo crítico para la secreción de IFN- γ , e inductor de las reacciones inmunitarias innatas y celulares frente a los microorganismos intracelulares). Los ratones que no producen IL-10 presentan una inflamación excesiva, probablemente como consecuencia de una activación incontrolada de células inflamatorias.

La IL-4 es un potente inductor del desarrollo de células Th2 y simultáneamente un poderoso inhibidor del desarrollo de células Th1, estimula el cambio de isotipo en linfocitos B a ciertas clases de inmunoglobulinas sobre todo la IgE e inhibidor de la activación de macrófagos inducida por IFN- γ .

La IL-13 inhibe la activación de macrófagos, antagonista principal de IFN- γ , estimula la producción de moco por las células epiteliales pulmonares y puede intervenir en patologías como el asma (Lingnau y col., 1998, De Groote y col., 1992, Koos, 2000).

El IFN- γ es una citocina especial porque participa tanto en la inmunidad innata como en la adaptativa. Su función principal radica en interferir en las infecciones

víricas y aumentan la actividad de los linfocitos T citotóxicos contra las células infectadas por el virus, aumentan la expresión de moléculas MHC clase I y II e inhibe la proliferación de células Th2. (Baron y col., 1991).

La IL-2 es una potente citocina inmunoreguladora producida por células T en respuesta a un antígeno o estimulación mitogénica. La señalización IL-2/IL-2R es requerida para la proliferación y otras funciones fundamentales que son esenciales para la respuesta inmune. La IL-2 estimula el crecimiento y diferenciación de células B, células NK, células asesinas activadas por linfocitos, monocitos, macrófagos, y oligodendrocitos. Frecuentemente la IL-2 es usada para aumentar la respuesta inmune de pacientes en el tratamiento de esclerosis múltiple y enfermedades infecciosas (Nelson y Willerford, 1998).

3.8 Receptores de citocinas

Las citocinas regulan sus acciones por unión a receptores de alta afinidad como los miembros de la súper familia de las inmunoglobulinas; clase I y II, receptores para el factor de necrosis tumoral, (TNF), receptores α helicoidales de siete proteínas transmembrana (receptores que cruzan 7 veces la membrana celular). Los receptores se encuentran acoplados a proteínas G, o algunos receptores tienen actividad de tirosín cinasa. La interacción ligando receptor trae como consecuencia la activación de factores de transcripción como el JAK/STAT. Los diferentes receptores de citocinas están compuestos de cadenas que se unen a citocinas específicas (cadena alfa) y que se asocian mediante enlaces no covalentes a subunidades productoras de señales que comparten receptores de

diferentes citocinas (TNF, IL-1, quimiocinas). La figura 3 muestra receptores de citocinas de cada grupo.

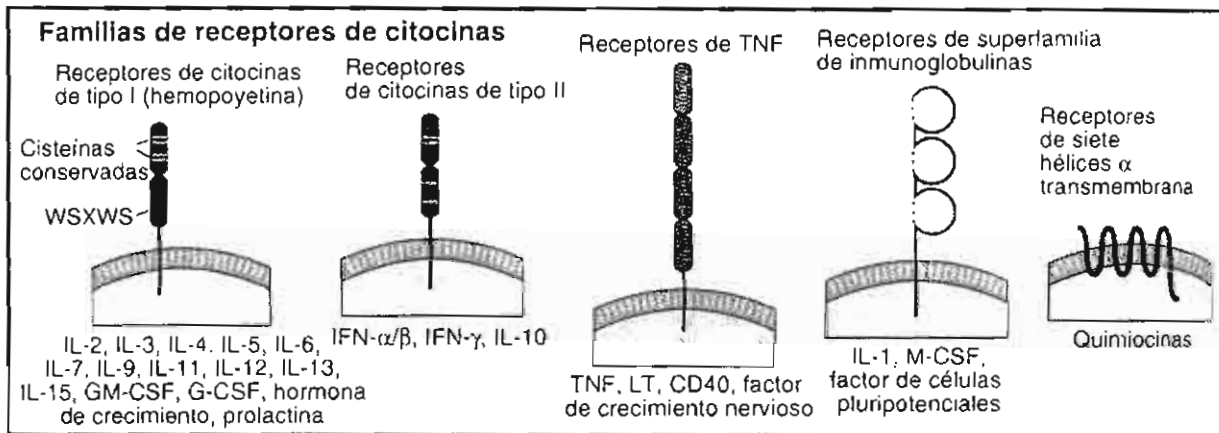


Figura 3. Receptores de las diferentes familias de citocinas se clasifican en función de los dominios extracelulares conservados. Se muestran las citocinas u otros ligandos que se unen a cada familia de receptores. (WSXWS: triptófano-serina-X triptófano-serina). (Abbas y Lichtman. Cellular and molecular immunology, 5ta edición Elsevier 2004 p-248).

3.9 Respuestas tipo Th1 o Th2

Si los antígenos extraños logran invadir el organismo desencadenan una respuesta celular, tipo Th1 TCD4 que será predominante y producirá linfocinas capaces de reclutar a células fagocíticas al lugar de infección e inflamación y de activarlas para potenciar su acción (factor activador de macrófagos (MAF), factor inhibidor de la migración (MIF) (Griffiths G, 1995). Este proceso de reclutamiento celular es crucial para la defensa del organismo contra virus, hongos y otros microorganismos con replicación intracelular. Las células Th1 pueden también activar a los linfocitos T CD8⁺ citotóxicos para actuar directamente en la destrucción de las células infectadas por patógenos intracelulares. De la misma manera a través del mecanismo de defensa celular se producen células de

memoria que completan su diferenciación ante un nuevo contacto con el mismo agente patógeno, iniciándose una respuesta de memoria, y en consecuencia una respuesta más intensa.

Desde el punto de vista de su participación en mecanismos de daño tisular, las citocinas que participan en la inmunidad natural conducen a las células efectoras de la inflamación, a reaccionar en forma inespecífica en respuesta hacia un antígeno, con participación mínima o nula de anticuerpos específicos. Las células T que producen este tipo de respuestas, se conocen como células T del tipo Th1, y se distinguen de la tipo Th2 porque estas últimas producen primordialmente las citocinas que regulan la inflamación con especificidad inmunológica, en la que participan los anticuerpos como los principales protagonistas. En el caso de una respuesta inmunológica se activan ambos tipos de células pero tiende a existir predominio de una de las dos formas de respuesta, ya que uno y otro tipo de células producen citocinas que mutuamente pueden inhibir sus funciones (citocinas tipo Th1 como el IFN- γ inhibe a la IL-10 citocina Th2 y viceversa). Cuando se pierde el balance entre la actividad de uno y otro tipo de células, estos circuitos inhibitorios determinan que exista predominio franco de uno de los dos tipos de respuesta (figura 4).

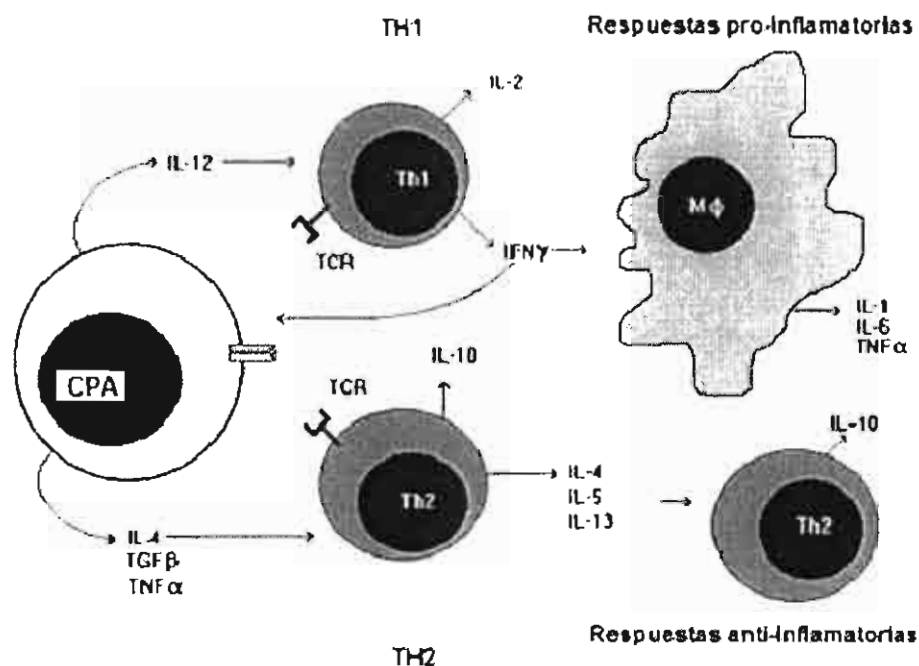


Figura 4. Las células presentadoras de antígeno (CPA) establecen comunicación con dos tipos de células T cooperadoras las células Th1 y las Th2. Las primeras producen las citocinas que son responsables de los fenómenos inflamatorios como IFN- γ , TNF- α e IL-2. Las células Th2 producen citocinas involucradas en la producción de anticuerpos. El balance de la activación de unas y otras, mantenido por el IFN- γ y la IL-10 determina la forma de expresión de respuesta inmune. Ramírez y Ruiz-Arguellez. *Inmunopatología*. Ed Intersistemas, Libro 2, parte C 1996. p-8)

Estas proteínas regulan procesos como el crecimiento, activación celular, inflamación, respuesta inmune, reparación tisular y fibrosis (Shimada y Terano, 1998, Ishihara y col., 1996).

Recientemente se ha visto que la acción combinada de cuatro citocinas (IFN γ , TNF- α , IL-2 e IL-6) determina la activación de la mayoría de los linfocitos T periféricos al promover una elevación sostenida de Ca²⁺ intracelular por medio de dos caminos de señalización independientes (Martino y col., 1998, Nelson, 1998).

La interleucina 10 es una citocina reguladora la cual inhibe la presentación del antígeno y la subsecuente producción de citocinas anti-inflamatorias (Li y He, 2004, Moore y col., 2001). Las células Th1 son consideradas esencialmente pro-inflamatorias y las Th2 depresoras de la inflamación. Sin embargo, las células Th2 también sintetizan citocinas que dirigen a las células B hacia su diferenciación, promoviendo así la producción de anticuerpos por el complemento.

3.10 Complemento

El complemento consta de varias proteínas plasmáticas (inmunoglobulinas Ig o anticuerpos) los microorganismos activan a las células a producir estos anticuerpos. El reconocimiento de los microorganismos por el complemento se da en tres formas. La vía clásica, denominada así porque se descubrió en primer lugar, usa una proteína plasmática llamada C1 para detectar anticuerpos IgM, IgG1 o IgG3 unidos a la superficie de un microorganismo o de otra estructura. La vía alterna, se activa por el reconocimiento directo de ciertas estructuras de la superficie de los microorganismos y por ello forma parte de la inmunidad innata. La vía de la lectina se activa por una proteína plasmática llamada lectina fijadora de manosa (MBL), que reconoce los residuos de manosa terminales situados en las glucoproteínas y glucolípidos microbianos. El sistema del complemento activado desencadena la síntesis de C3b y culmina con la producción de péptidos que estimulan la inflamación C5a y C9 polimerizado que forma el complejo de ataque a la membrana (Tomilson, 1993).

La principal función de la inmunidad celular es activar a los macrófagos para destruir a los microorganismos intracelulares, por otro lado, muchos microorganismos intracelulares que penetran en la sangre activan a proteínas del complemento circulantes, lo que a su vez incrementa la producción de anticuerpos por los linfocitos B. Esta respuesta inmunitaria humoral sirve para eliminar microorganismos extracelulares. Por lo tanto, la cooperación entre la inmunidad innata y adaptativa es bidireccional, de modo que cada una se apoya en los componentes de la otra para optimizar la defensa del huésped frente a las infecciones.

4. ANTECEDENTES

La ausencia o escasez de reacción inflamatoria tardía en las lesiones necróticas avanzadas de la amibiasis invasora causada por *E. histolytica* fue descrita por Councilman y Lafleur en 1891. Igualmente sorprendente, y quizá relacionada con esta escasa inflamación tardía, es la regeneración perfecta, sin cicatrización de los órganos afectados (por ejemplo hígado o piel) que se observa en estos pacientes después de un tratamiento médico exitoso (Pérez-Tamayo, 1986). Por otra parte, y usando principalmente modelos animales de absceso hepático amibiano experimental (AHAE) se ha documentado una intensa reacción inflamatoria temprana (aguda) que incluye algunos linfocitos, polimorfonucleares eosinófilos (PMNe) en íntimo contacto con el parásito invasor (Tsutsumi, 1994).

Trabajos realizados en nuestro laboratorio en la última década mostraron que el sobrenadante de cultivos axénicos de *E. histolytica* contiene un factor termoestable, el cual fue purificado y caracterizado por medio de cromatografía de

alta resolución (HPLC) y espectrofotometría de masas (MS-MS) complementado por el método de Edman (Edman y Begg, 1967), lo que reveló un pentapéptido con peso molecular de 583 Daltones y se estableció la secuencia de aminoácidos (Met – Gln – Cis - Asn - Ser) figura 5.

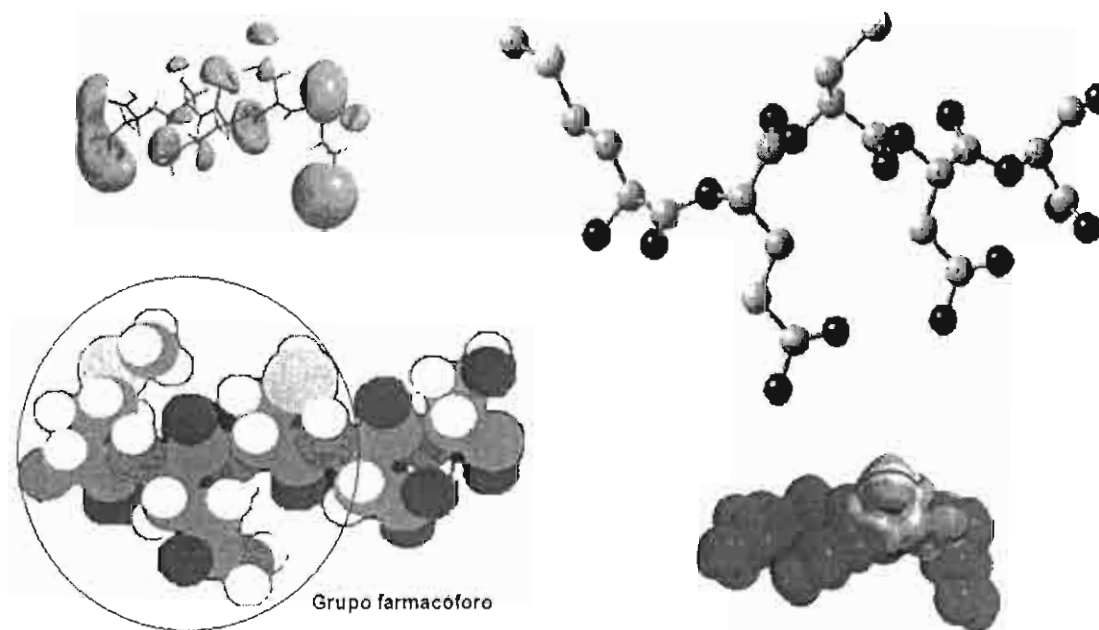


Figura 5. Estructura molecular del Factor Inhibidor de la Locomoción de Monocitos (Met-Gln-Cis-Asn-Ser). Sitio activo o farmacóforo (Cis-Asp-Ser) (Sánchez J. Rev. Mex. Cienc. Farmacéuticas 2003; 34-56)

Es posible, que este pequeño pentapéptido provenga de un péptido más grande o de una proteína sintetizados por la amiba, los que son luego degradados por proteasas presentes en el citoplasma. El material lisado de amibas, lavado y procesado según el método de Aley (Aley y col.,1980), mantiene la actividad

inhibitoria, lo que sugiere que el FILM (factor inhibidor de la locomoción de monocitos) es producido por las amibas a través de síntesis *de novo* y no se debe a un complejo proceso de ingestión-degradación-regurgitación de un producto presente en el medio axénico (Rico y col., 1997). El FILM además posee propiedades anti-inflamatorias poderosas a la vez que selectivas: *in vitro* (estudios con cámaras de Boyden) este péptido inhibe la locomoción (aleatoria, quimiocinética y quimiotáctica hacia diversos atractantes como, C5a-desArg, linfocina quimiotáctica o factor quimiotáctico de linfocitos (LDCF)) de fagocitos mononucleares (FM) de sangre periférica humana normal, pero no la de polimorfonucleares neutrófilos de la misma sangre (Kretschmer y col., 1985). Este factor también deprime *in vitro* el estallido respiratorio (medido por quimioluminiscencia) de monocitos y neutrófilos activados con zimosán (Rico y col., 1992) y la producción de óxido nítrico en fagocitos mononucleares y polimorfonucleares neutrófilos humanos (Rico y col., 2003). Tales efectos no se acompañan de cambios en la modulación de CD43 (un ligando crítico en la actividad inicial de los fagocitos), en la membrana de éstas células, ni afecta la viabilidad de los fagocitos (Kretschmer y col., 1985, Rico y col., 1992). En contraste el FILM no afecta ni la locomoción, ni el estallido respiratorio de PMNe humanos activados con zimosán (Rico y col., 1998). *In vivo* el FILM demora el arribo de leucocitos mononucleares en cámaras de Rebeck aplicadas a la piel de voluntarios humanos sanos (Kretschmer y col., 1985), y también inhibe la hipersensibilidad retardada cutánea por contacto al 1-cloro-2-4-dinitrobenzenceno (DNCB) en cobayos (Giménez-Scherer y col., 1997) y abate la expresión de las moléculas de adhesión VLA-4 en monocitos y VCAM-1 en el epitelio vascular

(Giménez-Scherer y col., 2000). Se desconocen los mecanismos precisos que emplea el FILM para causar los efectos biológicos descritos. Interactúa con los leucocitos humanos a través de un receptor de superficie que contiene manosa, (Kretschmer y col., 1991) y provoca un aumento en el número de microtúbulos pericentriolares, así como en la concentración de AMPc citoplásmico, sin disminución concomitante de GMPc (Rico y col., 1995). Resulta conveniente estudiar si el FILM causa estos efectos actuando directamente sobre los leucocitos – como lo sugieren los estudios *in vitro* – o si lo hacen perturbando la delicada red de factores pro y anti inflamatorios como lo sugieren los complejos resultados *in vivo*, o probablemente una combinación regulada de ambos. Entre los agentes pro-inflamatorios endógenos se cuentan por una parte las quimocinas (citocinas quimiotácticas) y sus receptores y por otra las interleucinas pro/anti-inflamatorias. Se puede inferir que el FILM pudiera contribuir a la exigua inflamación tardía observada en el AHA, a través de efectos que ejerce directamente sobre los monocitos (i.e. disminución de la locomoción y estallido respiratorio) pero también indirectamente, modulando la producción y/o expresión de citocinas (quimocinas y sus receptores) involucradas en el reclutamiento de células mononucleares al foco inflamatorio tardío. Las citocinas que se relacionan con la inmunidad celular y la inflamación, son las denominadas Th₁ (por ejemplo IL1 β , IL-2, INF γ) en tanto que las citocinas involucradas con la inmunidad humoral o anti-inflamatorias se clasifican como Th₂ (por ejemplo IL-4 e IL-10). En la inflamación los leucocitos están regulados por la compleja red de citocinas Th1 y Th2, derivadas de linfocitos T cooperadores. Por ello también resulta de interés evaluar el efecto que

podiera tener el FILM sobre la activación de los linfocitos Th1/Th2 y sobre la producción de citocinas por estas células.

5. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El FILM posee propiedades anti-inflamatorias selectivas sobre los leucocitos (inhibición de la locomoción y de la explosión metabólica). Los monocitos y los eosinófilos pueden destruir *in vitro* trofozoitos de *Entamoeba histolytica* invasora lo cual les confiere un importante papel en la defensa contra la amibiasis. Una de las principales células productoras de numerosas citocinas son los linfocitos T, particularmente los T CD4+ cooperadores, las citocinas son sustancias activas que interfieren de forma muy importante regulando el proceso inflamatorio. Los efectos del FILM sobre la inflamación podrían estar causados por un efecto directo sobre las células efectoras como lo sugieren los estudios *in vitro*, pero también indirectamente a través de su efecto sobre la red de citocinas.

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo General

Identificar posibles mecanismos anti-inflamatorios producidos por el FILM asociados a la red de citocinas (Th1/Th2)

6.2 Objetivos particulares

- Demostrar el efecto del FILM sobre la producción de citocinas pro y anti-inflamatorias en linfocitos T CD4+
- Determinar la concentración de PMA necesaria para inducir la activación de los linfocitos T
- Determinar la concentración del FILM necesaria para producir un efecto en la expresión de citocinas por medio de una curva dosis-respuesta
- Determinar la activación de los linfocitos T CD4+ por medio del marcador CD69
- Medir las citocinas intracelulares
- Medir las citocinas intracelulares co-localizadas a receptores de quimiocinas
- Determinar la expresión de los genes de las citocinas alteradas
- Determinar la expresión de las citocinas a nivel de proteína

7. Hipótesis

El FILM afecta la producción de citocinas pro-inflamatorias Th1 y no afecta la producción de citocinas anti-inflamatorias Th2, lo que contribuye a la atípica inflamación observada en el absceso hepático amibiano, sobre todo en su exiguo aspecto tardío.



8. MATERIAL Y MÉTODOS

FILM : Factor Inhibidor de la Locomoción de monocitos

Se sintetizó la secuencia que codifica al FILM en American Peptide Co. Inc. Sunnyvale, CA. EEUU con una pureza > al 96%.

8.1 Obtención de células mononucleares humanas

Las muestras de sangre fueron generosamente proporcionadas por el Químico José de la Luz Romero Preciado del Banco de Sangre del Centro Medico Nacional SIGLO XXI Instituto Mexicano Seguro Social.

Las células mononucleares se obtuvieron en condiciones de esterilidad, a partir de sangre periférica humana de voluntarios adultos sanos en ayuno. La muestra (50 ml) se diluyó en buffer de fosfatos (PBS) 1:1 v/v y se colocó sobre un gradiente de Ficoll-hypaque (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) en tubos de 10 ml estériles (Falcon Oxnard, CA., EEUU), se centrifugó a 400 x g durante 30 min. a 22 °C, las células de la interfase fueron recuperadas (Böyum,1968). Se determinó la viabilidad por el método de exclusión con azul tripano.

8.2 Aislamiento de Linfocitos T CD4+

Se utilizó un estuche comercial para la purificación de células T CD4 + humanas (MACS[®] Reagents, Kit isolation, Human cell T CD4+). De las células mononucleares obtenidas del gradiente Ficoll-Hypaque (150×10^6), se colocó 1×10^7 células en tubos de polipropileno estériles, después de centrifugarlas, el botón celular se resuspendió en 80 μ l de buffer (PBS-albúmina-EDTA) más 20 μ l

de cóctel de anticuerpos monoclonales CD8, CD11b, CD16, CD19, CD36 y CD56 se incubó 10 minutos a 4 °C. Para eliminar las células diferentes a CD4+ como son monocitos, plaquetas, basófilos, células B, células NK, células dendríticas y células T citotóxicas se realizó el marcaje magnético con 20 µl de MACS anti-hapteno y microperlas por 1×10^7 células totales, se incubó 15 minutos a 4 °C. Las células marcadas magnéticamente se eliminaron reteniéndolas en una columna MACS LS/VS+ con adaptador plus VS+ colocado a un separador magnético Midi Macs®. La fracción enriquecida de células T CD4+ pasó libremente a través de la columna y se recolectó en un tubo estéril hasta su uso.

8.3 Pureza de los linfocitos T CD4+

La pureza de los linfocitos T CD4+ se analizó en un citómetro de flujo. El equipo mide y analiza las propiedades ópticas de células individuales que pasan a través de un rayo láser. Dependiendo de como interactúan las células con el rayo láser, el citómetro mide cinco parámetros para cada célula: Tamaño (*forward scatter*, FCS), complejidad (*side scatter*, SSC) y tres emisiones de fluorescencia (FL-1, FL-2 y FL-3). Un sistema óptico-electrónico convierte las señales de voltaje, la cual es traducida en un valor digital el que se almacena en una computadora, los datos son posteriormente recuperados y analizados con el software "Win MDI 2.8" que agrupa la información de diferentes células en gráficos estadísticos, los cuales analizan parámetros individuales (histogramas) o dos parámetros a la vez (gráficas de puntos, densidad o contornos). Para nuestro estudio, los linfocitos purificados se analizaron en una gráfica de puntos de FCS vs SSC marcando la

región correspondiente a los linfocitos, excluyendo a detritus y células muertas. En una gráfica de puntos ("*dot plot*") se compensaron las fluorescencias con anticuerpos anti CD3-FITC y anti CD4-PE (marcadores para linfocitos T CD4+). Las muestras problema (10,000 eventos) se adquirieron bajo estas condiciones.

8.4 Concentración óptima de forbol miristato acetato (PMA)

Para conocer la concentración adecuada de PMA se realizó una curva dosis respuesta, se utilizó 5×10^5 células T CD4+ incubadas por 24 horas, se probó diferentes concentraciones de PMA 10, 20 y 50 ng/ml, evaluando el marcador de activación CD-69 por citometría de flujo.

8.5 Concentración óptima del factor inhibidor de la locomoción de los monocitos (FILM)

Se realizó una curva dosis respuesta para conocer la concentración óptima del FILM. Se usó 5×10^5 células T CD4+ incubadas por 24 horas, a diferentes concentraciones de FILM 10, 20 y 50 $\mu\text{g/ml}$, evaluando el marcador de activación CD69.

8.6 Sistema de incubación de linfocitos T CD4+

Se incubó 5×10^5 linfocitos/pozo por 24 horas: linfocitos + RPMI, linfocitos + FILM (50 $\mu\text{g/pozo}$), linfocitos + PMA 50 ng/pozo y linfocitos + PMA+FILM. En medio RPMI 1640 1X (Gibco BRL) suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10%, 100 U/ml de penicilina, 100 U/ml de glutamina, 100 U/ml de estreptomicina, 2

mg/100 ml de gentamicina y piruvato de sodio al 1 % a 37°C, en atmósfera húmeda de CO₂ al 5%.

8.7 Marcaje inmunofluorescente para moléculas de superficie celular y receptores de quimiocinas

Después del tiempo de incubación los linfocitos T CD4⁺ se cosecharon y se lavaron con buffer PBS-Albumina- EDTA, se marcó con anticuerpos anti CD3, CD4 CXCR3, CCR5, CCR4, CCR8, conjugados a un fluorocromo (FITC o PE), se utilizó IgG1 de ratón como control de isotipo, se incubó 20 minutos a 4 °C en oscuridad, se lavó y fijó con 35 µl p-formaldehído al 1%. Se analizó cada una de las muestras en un citómetro de flujo (FACSort Becton Dickson & CO Mountain View, CA, EEUU) y posteriormente con un programa "Win MDi 2.8".

8.8 Marcaje inmunofluorescente para citocinas intracelulares

Se cultivó linfocitos CD4⁺ en placas de 24 pozos a una concentración de 5x10⁵ linfocitos/pozo en presencia de PMA o FILM durante 18 horas, al término se agregó brefeldina A 1 µg/ml (inhibidor del transporte de proteínas), se incubaron 6 horas más, se cosechó y lavó con Perm/Wash (BD Pharmingen, San Diego, CA, EEUU). Se marcó con los anticuerpos de superficie ya mencionados acoplados a un fluorocromo (PE, FITC), se incubó 20 min. a 4 °C en oscuridad al término se lavó y agregó 100 µl de solución Cytofix/Citoperm, (para fijar y permeabilizar la membrana) (BD Pharmingen, San Diego, CA, EEUU) se incubó 20 min. a 4 °C en oscuridad, se marcó con 10 µl de anti IL-1β, anti-IL-2, anti IFN-γ , anti IL-4 y anti

IL-10 acopladas a FITC o PE se incubó 20 min. a 4 °C en oscuridad se lavó y se fijó con 35 µl de p-formaldehído al 1%, se analizó por citometría de flujo 10,000 eventos

8.9 Estimulación para producción de citocinas

Se colocó 5×10^5 linfocitos T CD4+/ pozo, se estimuló para la producción de citocinas con PMA 50 ng/ml (Sigma Chemical Co), con o sin FILM 50 µg/pozo por 24 horas en una cámara húmeda 5% de CO₂. Después de la incubación, los sobrenadantes se cosecharon, se centrifugaron 200 g por 10 min. y se alicuotaron tubos eppendorf con 200 µl de los sobrenadantes. Se almacenaron a -70° C hasta la determinación de las citocinas.

8.10 Determinación de citocinas por el método de ELISA

Para las determinaciones proteicas de las citocinas IL-1 β, IL-2, IFN-γ, IL-4, IL-5, IL-6, e IL-10 se utilizó el método de ensayos enzimático inmunoabsorbente (ELISA). Se utilizaron equipos comerciales, siguiendo los protocolos sugeridos por el fabricante (Biosource Intl. Inc., CA, PeproTech México, Veracruz México). Existen distintas variaciones de ELISA pero la versión más utilizada es el análisis en sándwich.

8.11 Preparación de la placa

Se diluyó el anticuerpo de captura con PBS a una concentración de 0.25 µg/ml. Inmediatamente, se agregó 100 µl en cada pozo de la placa de ELISA, se selló la placa e incubó toda la noche (12h) a temperatura ambiente. Se Aspiró y lavó la placa 4 veces usando 300 µl de buffer de lavado (Tween-20 0.05% en PBS) por

pozo. Se agregó 300 µl de buffer de bloqueo (BSA 1% en PBS) en cada pozo. Se incubó por lo menos 1 hora a temperatura ambiente. Se aspiró y lavó la placa 4 veces.

8.12 Protocolo para ELISA

Se diluyó el estándar de 2 ng/ml en el diluyente cero, se agregó 100 µl del estándar o muestras en cada pozo por duplicado. Se incubó a temperatura ambiente por 2 horas. Se aspiró y lavó la placa 4 veces. Se diluyó el anticuerpo de detección en diluyente cero a una concentración de 0.5 µg/ml. Inmediatamente se agregó 100 µl por pozo. Se incubó a temperatura ambiente por 2 horas. Se aspiró y lavó la placa 4 veces. Se diluyó la avidina peroxidasa (Sigma Chemical Co, St. Louis MO) 1:2000 en diluyente. Se agregó 100 µl por pozo. Se incubó 30 minutos a temperatura ambiente. Se aspiró y lavó la placa 4 veces. Se agregó 100 µl de solución sustrato (Sigma Chemical Co, St. Louis MO) a cada pozo, se incubó a temperatura ambiente para el desarrollo del color, y la absorbancia se leyó a 405 nm.

8.13 Extracción de RNA

2×10^6 linfocitos T CD4+ incubados con RPMI o FILM por 24 h se les extrajo el RNA total usando la técnica de Trizol. Al paquete celular se le adicionó 1 ml de Trizol (Gibco BRL Life Technologies, Grand Island, NY) y 0.2 ml de cloroformo (Sigma Chemical Co., St. Louis MO) al 100%, la fase acuosa se mezcló con cloroformo: isoamílico 24:1 (Sigma), y posteriormente con 500 µl de isopropanol (Sigma) frío al 100%, se incubó 30 min a -20°C, se lavó la pastilla con 500 µl de

etanol (Sigma) frío al 75% en agua DEPC, se eliminó el etanol. Se cuantificó, usando un espectrofotómetro a 260/280 nm (Biophotometer eppendorf) y se verificó su integridad en gel de agarosa al 1.5%, se alicuotó, secó y guardó a -70 °C, hasta su uso.

8.14 Reacción en cadena de la polimerasa usando transcripción reversa (RT)

Para la RT se mezcló 1 µg de RNA total con 1 µl de oligo- dT (12-18-mer, GibcoBRL) (500 µg/ml), diluido con 11 µl agua tratada con DEPC (dietil pirocarbonato), se calentó a 70°C/10min., se adicionó 200 U de transcriptasa reversa Superscript™ (Gibco). Buffer first strand 1 X y una mezcla de 0.5 mM de dNTPs (Promega, Co., Madison, WI). La mezcla se incubó a temperatura ambiente por 10 min., seguida por incubación a 37°C por 2 horas. La enzima fue inactivada por calentamiento a 80°C por 10 min, el cDNA resultante fue almacenado a -20°C hasta su uso. Los oligos fueron diseñados usando el programa OLIGO análisis de oligonucleótidos versión 4.0 versión libre de Linux disponible en AnnHyb for Linux (GNU general Public License) (<http://bioinformatics.org/annhyb/index.php3>).

8.15 PCR en tiempo real

Para el PCR en tiempo real se realizó una curva estándar para el gen blanco (IL-1β, IL-10, IL-4 e IFN-γ unidos al fluorocromo-FAM) (AB Applied Biosystems, Foster, California EEUU) y para el gen constitutivo (HPRT-unido al fluorocromo-VIC) (AB Applied Biosystems). Se preparó la mezcla de reacción empleando las

sondas de hidrólisis Taq. Man (AB Applied Biosystems), 1.5 μ l para el gen blanco y 1.5 μ l para el gen constitutivo, 15 μ l de Master Mix (AB Applied Biosystems) y 6 μ l agua DPC, volumen final 26 μ l. Se adicionaron 2 μ l de cDNA y 24 μ l de la mezcla de reacción antes preparada, se homogenizó y se colocó en la placa. Cada tratamiento se analizó por triplicado en placas de 96 pozos (AB Applied Biosystems) con un software ABI primus 7700 y con Excel.

9. Análisis estadístico

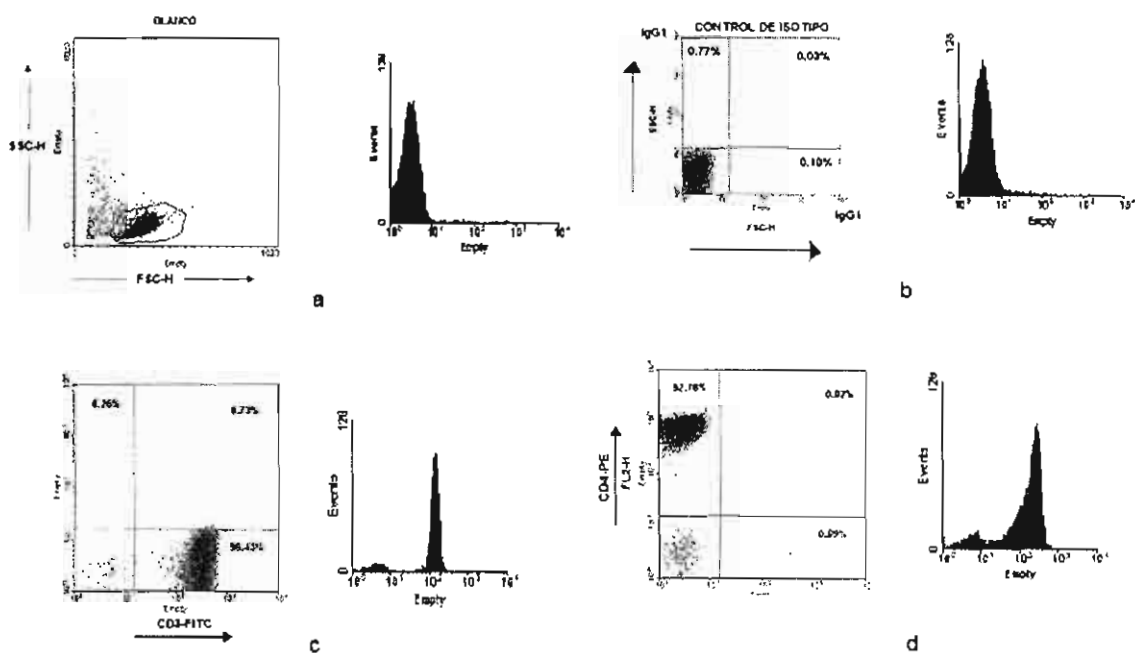
Todos los experimentos se realizaron por duplicado.

Se realizó un análisis de varianza (ANOVA). Cuando las varianzas fueron homogéneas, los datos se analizaron por la prueba de T Student no pareada; por el contrario si las varianzas fueron heterogéneas se utilizó la prueba de U de Mann-Whitney

10. RESULTADOS

10.1 Pureza de los linfocitos T

Por citometría de flujo se evaluó la pureza de la población de linfocitos T CD4⁺. La pureza de las células marcadas con ficoeritrina (PE) fue de 92% y para las marcadas con isotiocianato de fluoresceína (FITC) fue de 96%. Las muestras a probar se adquirieron bajo estas condiciones figura 6.



La Figura 6. Muestra tinciones sencillas en linfocitos T CD4⁺ obtenidas de individuos sanos y analizadas por citometría de flujo. El eje de las X muestra la tinción con isotiocianato de fluoroceína (FITC) y el de las Y tinciones para ficoeritrina (PE) a) Autofluorescencia, b) control de isotipo, tinción con anticuerpos IgG1-FITC de ratón, c) tinción para subpoblaciones de linfocitos CD3 acoplados a FITC, d) Tinción para subpoblaciones CD4 acoplados a PE. Todas las tinciones sencillas muestran su representación en forma de histograma y son un ejemplo de 6 experimentos \pm el error estándar

10.2 Curva dosis respuesta para PMA

Para encontrar la concentración óptima de PMA se tomó para su evaluación la expresión de las dobles positivas para CXCR-3/CD69 (CXCR3 es un receptor de quimiocinas que solo se expresa en células activadas).

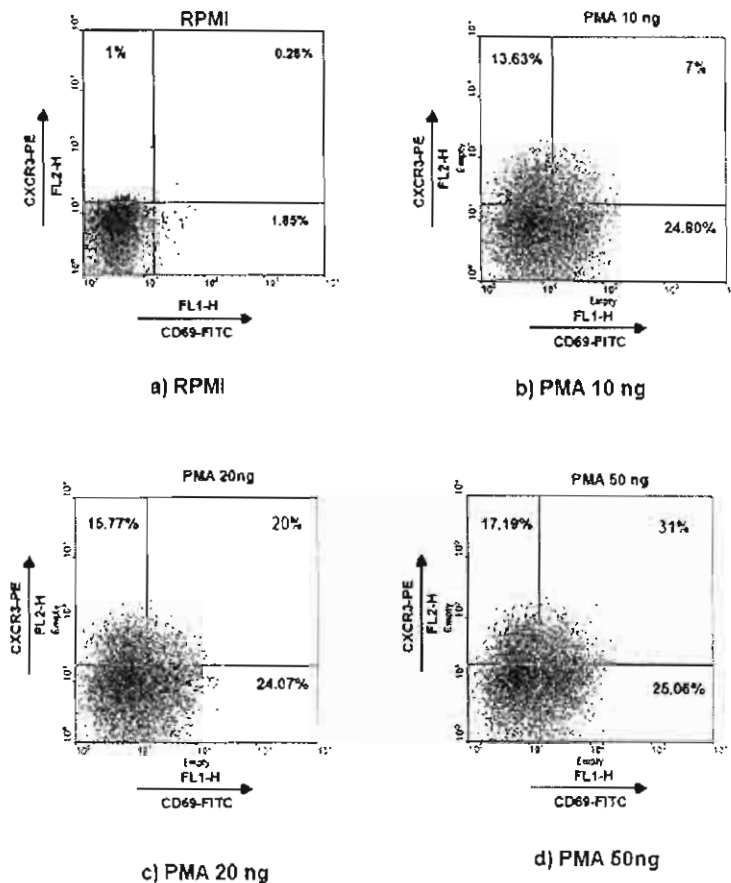


Figura 7. Se evaluó el porcentaje de la expresión del receptor de quimiocinas CXCR3 en linfocitos T CD4⁺ activados con diferentes concentraciones de PMA a) sin estímulo, 0.28% de las células expresaron el receptor de quimiocinas CXCR3, b,c,d,) linfocitos T CD4⁺ estimulados con PMA 10, 20 y 50 ng/ml las células expresaron el receptor de quimiocinas CXCR3 en 7, 20 y 31% respectivamente. La mejor concentración la obtuvimos con 50 ng/ml.

10.3 Curva dosis respuesta para el FILM

Para conocer la concentración óptima del FILM se colocó 500×10^5 linfocitos T CD4+ en placas de 24 pozos y se incubó por 24 h. con diferentes concentraciones del FILM (10, 20 y 50 $\mu\text{g/ml}$). Con 10 $\mu\text{g/ml}$ se encontró la respuesta más baja en la expresión de CXCR3 (5%), y la óptima fue con 50 $\mu\text{g/ml}$ (38%). Como lo muestra la figura 10.

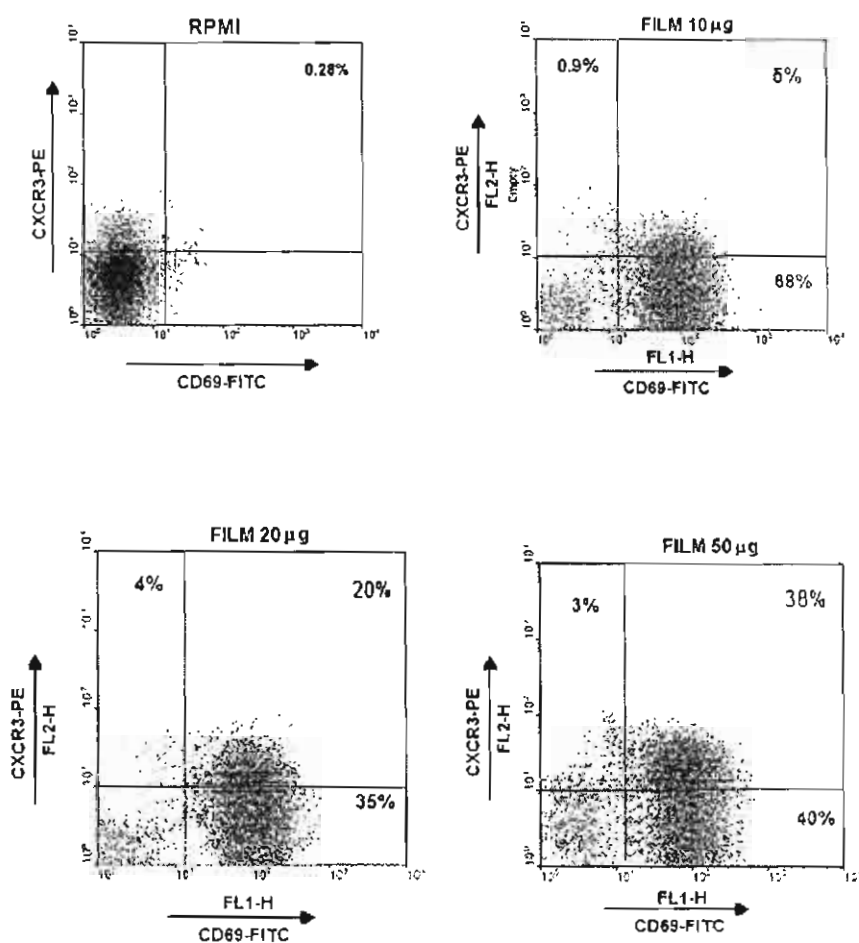


Figura 8. Curva dosis-respuesta para FILM. Se evaluó el porcentaje de la expresión del receptor de quimiocinas CXCR3 en linfocitos T CD4+ activados con RPMI y FILM a diferentes concentraciones 10, 20 y 50 $\mu\text{g/ml}$. La concentración óptima encontrada fue de 50 $\mu\text{g/ml}$ que corresponde a 8.6×10^{-5} M.

10.4 Determinación de CD69 en las membranas de linfocitos T CD4+

El marcador de activación CD69 en los linfocitos T CD4+ fue expresado constitutivamente en promedio 0.7%, mientras que el FILM indujo su expresión en un 28 % y PMA 65% hubo diferencias significativas entre los grupos de $p < 0.002$ figura 9.

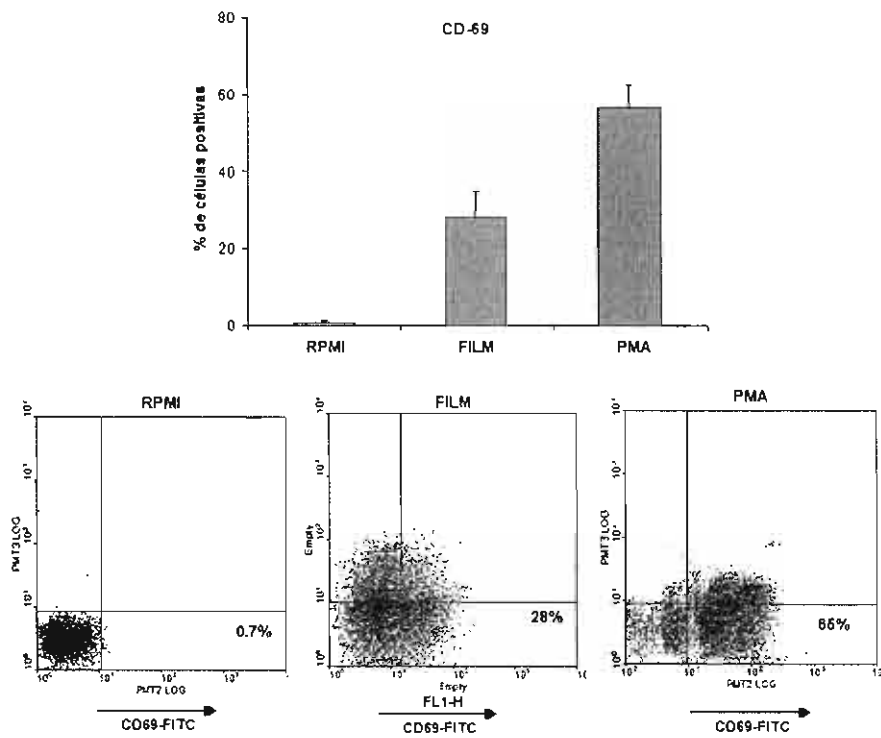


Figura 9. El porcentaje de células que expresaron el marcador de activación CD69 se determinó por citometría de flujo. Los datos representan el promedio de seis experimentos \pm el error estándar. Las gráficas de puntos es un representativo con FILM y sin FILM (RPMI). Las diferencias fueron tomadas como significativas cuando $p < 0.05$. RPMI (basal).

10.5 Expresión de receptores de quimiocinas CCR4, CCR5 y CCR4/CCR5

La expresión constitutiva promedio de los receptores de quimiocinas CCR4 y CCR5 fue de 10 y 14% respectivamente. La expresión inducida por FILM fue de 18 y 25% respectivamente, encontrando una diferencia significativa para CCR5 $p < 0.04$. La co-localización de CCR4/CCR5 en células CD4+ sin estimular fue de 7.2% y la expresión inducida por el FILM fue de 71%. La diferencia entre ambos fue de $p < 0.007$ figura 10.

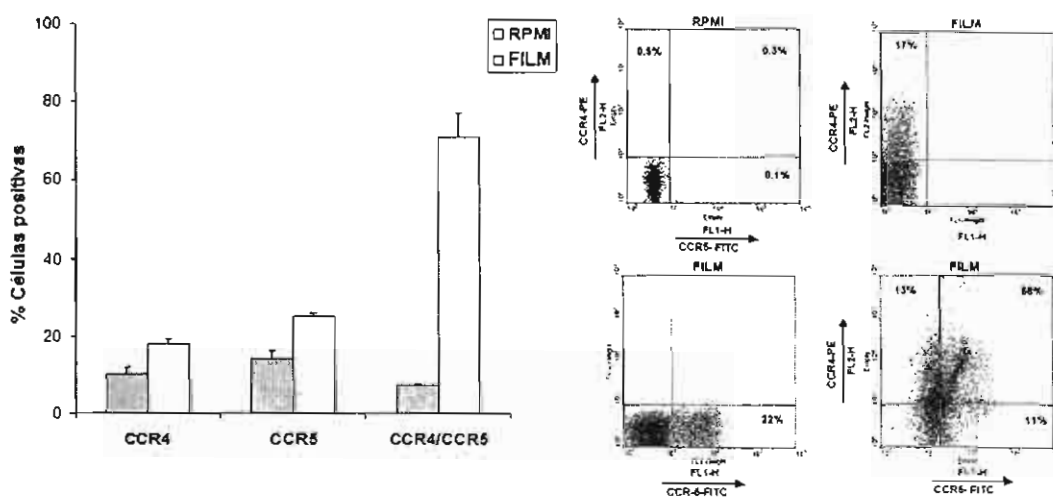


Figura 10 Expresión y co-expresión de receptores de quimiocinas CCR4, CCR5 y CCR4/CCR5 en 5×10^6 linfocitos T CD4+ aisladas de sangre periférica humana, inducidas por el FILM después de 24 h. de incubación. Las gráficas de barras representan el promedio de seis experimentos \pm el error estándar. Las gráficas de puntos son un representativo de los 6 experimentos similares. CCR4 ns, CCR5 $p < 0.04$, CCR4/CCR5 $p < 0.007$.

10.6 Expresión de citocinas intracelulares

La producción de IL-1 β producida por los linfocitos T CD4+ fue de 3% para RPMI, FILM 24%, PMA 69% y PMA+FILM 57%. Hubo una diferencia significativa entre RPMI vs FILM $p < 0.002$, no hubo diferencias significativas entre PMA y PMA+FILM figura 11.

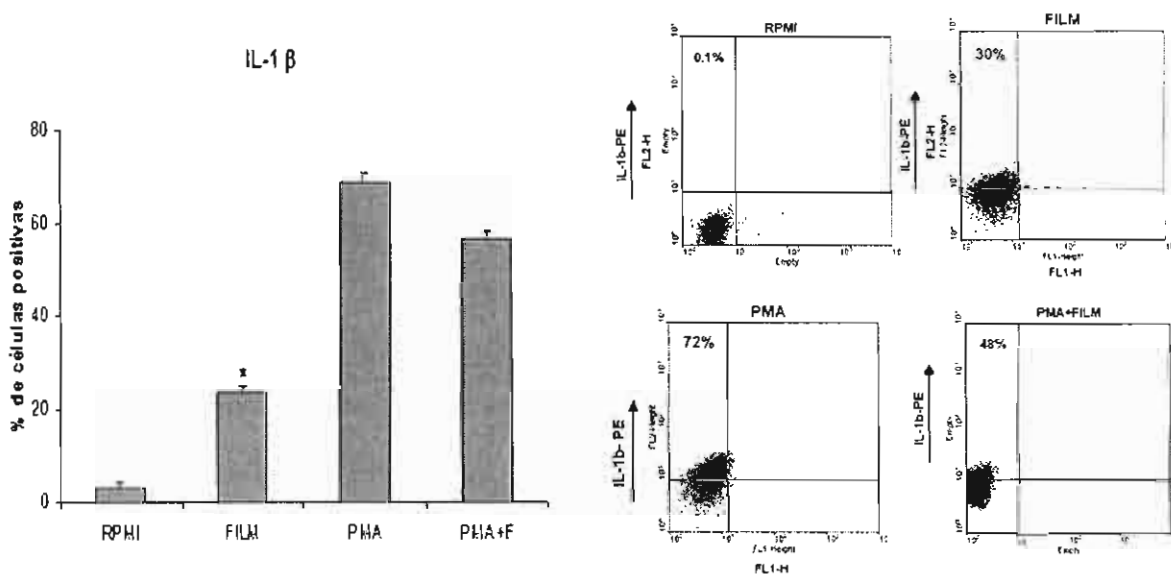


Figura 11. Efecto del FILM sobre la expresión de IL-1 β en células CD4+ Los valores representan el promedio de 6 experimentos \pm el error estándar. La gráfica de puntos o "Dot plot" es un representativo de seis experimentos adicionales.

10.7 Expresión de IFN- γ en linfocitos T CD4+

La producción de IFN- γ producida por los linfocitos T CD4+ fue de: RPMI 3%, FILM 10%, PMA 22% y PMA+FILM 4%. Hubo diferencias significativas entre RPMI vs FILM de $p < 0.002$ y de PMA vs PMA+FILM $p < 0.002$ figura 12.

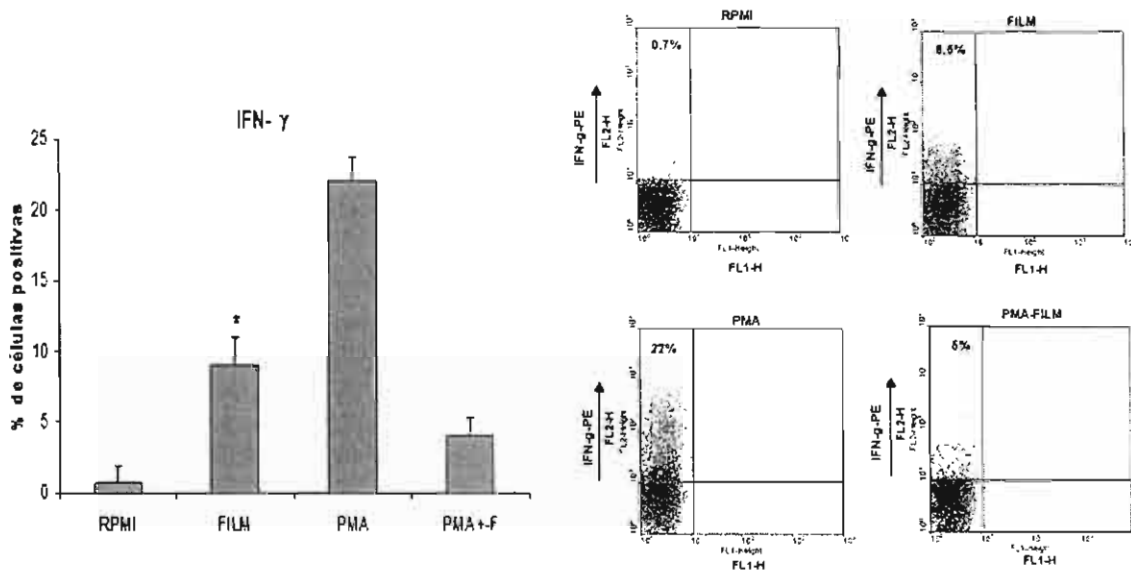


Figura 12. Efecto del FILM sobre la expresión de IFN- γ en células CD4. Los valores representan el promedio de seis experimentos \pm el error estándar. Resultados similares fueron obtenidos en 6 experimentos adicionales. La gráfica de puntos o "Dot plot" es un representativo de seis experimentos adicionales.

10.8 Expresión de IL-2 en linfocitos T CD4+

La producción de IL-2 fue de: RPMI 6%, FILM 31%, PMA 52% y PMA+FILM 41%. Hubo diferencias significativas entre RPMI vs FILM $p < 0.002$ y PMA+FILM $p < 0.002$ figura 13.

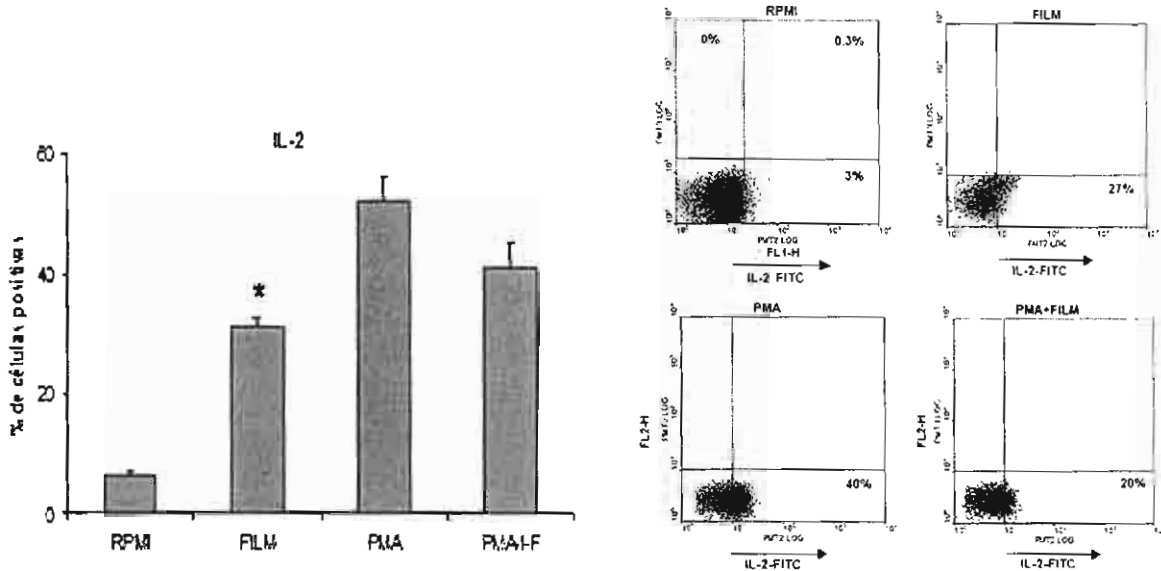


Figura 13. Efecto del FILM sobre la expresión de IL-2 en células CD4+. Los valores representan el promedio de seis experimentos \pm el error estándar. La gráfica de puntos o "Dot plot" es un representativo de seis experimentos adicionales.

10.9 Expresión de IL-4 en linfocitos T CD4+

La producción de IL-4 fue de: RPMI 4%, FILM 28%, PMA 46% y PMA+FILM 41%. Hubo diferencias significativas solo entre RPMI vs FILM $p < 0.002$ (Figura 14)

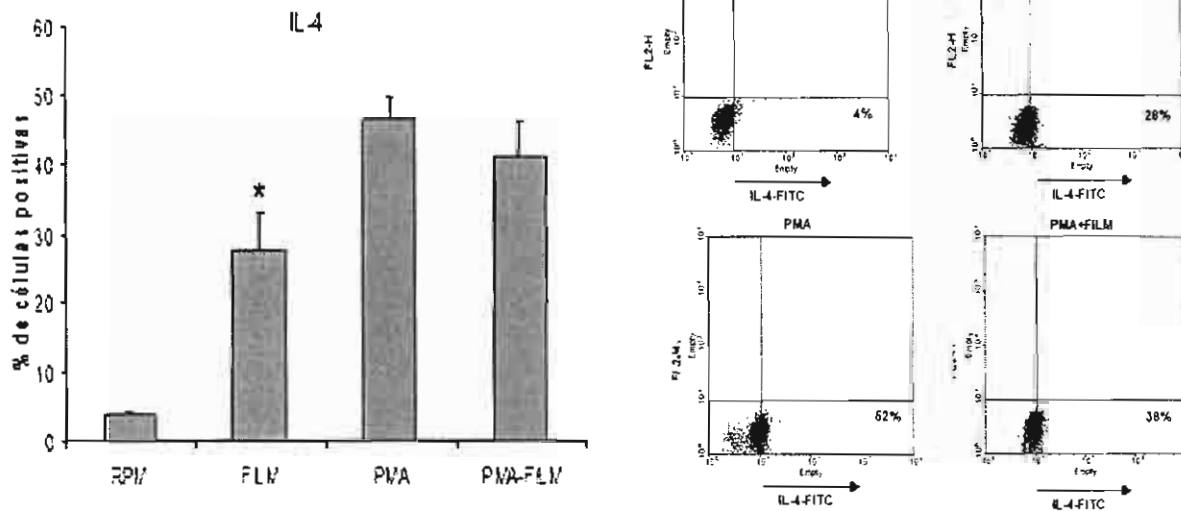


Figura 14. Efecto del FILM sobre la expresión de IL-4 en células CD4+. Los valores representan el promedio de seis experimentos \pm el error estándar. La gráfica de puntos o "Dot plot" es un representativo de seis experimentos adicionales.

10.10 Expresión de IL-10 en linfocitos T CD4+

La producción de IL-10 fue de: RPMI 1%, FILM 16%, PMA 32% y PMA+FILM 36%. Hubo diferencias significativas entre RPMI vs FILM $p < 0.002$ entre PMA y PMA+FILM las diferencias no fueron significativas Figura 15.

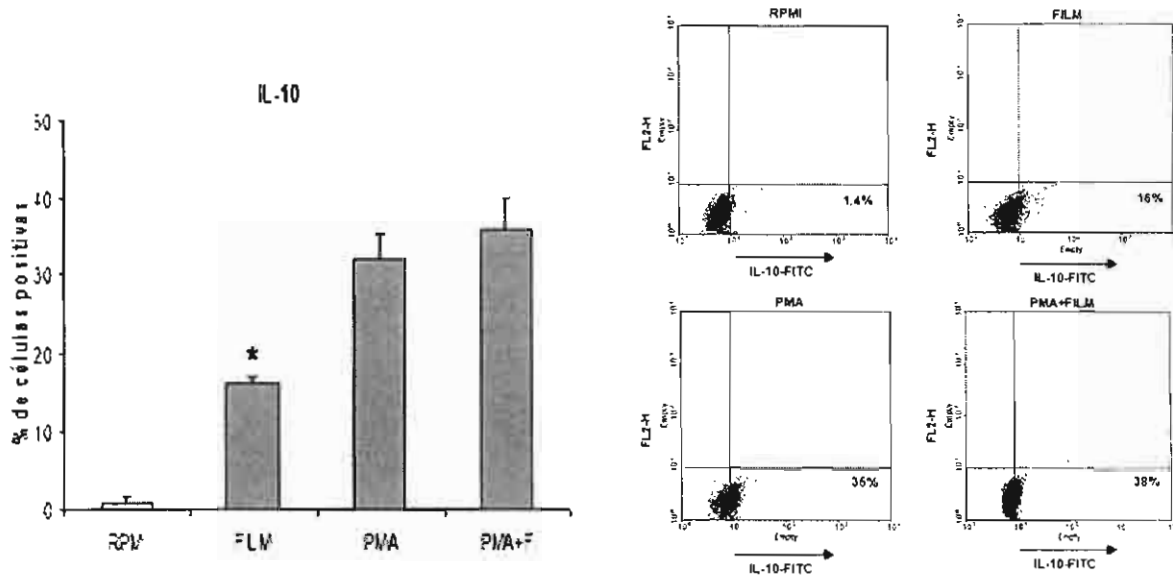


Figura 15. Efecto del FILM sobre la expresión de IL-10 en células CD4+. Los valores representan el promedio de seis experimentos \pm el error estándar. La gráfica de puntos o "Dot plot" es un representativo de seis experimentos adicionales.

10.11 Expresión de citocinas pro y anti-inflamatorias. La figura 16 muestra que el IFN- γ fue inhibido significativamente por efecto del FILM * $p < 0.002$.

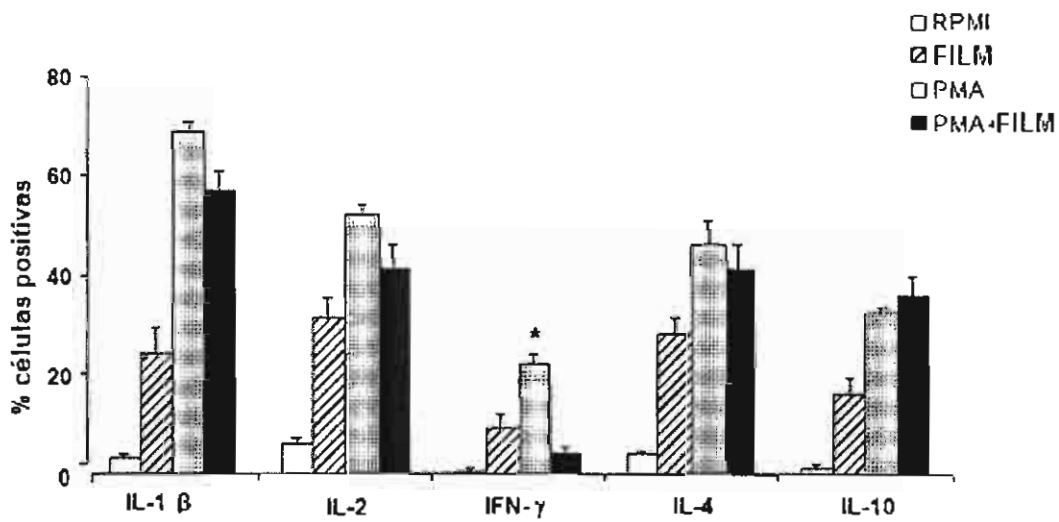


Figura 16. Efecto del FILM sobre la expresión *constitutiva* (RPMI), *inducida* (PMA), y con PMA+FILM, después de 24 h de incubación de 5×10^5 linfocitos T CD4+. La gráfica muestra la media \pm el error estándar (n=6). Los valores representan el porcentaje de las células positivas para cada una de las citocinas y la *p cuando la inhibición fue estadísticamente significativa.

10.12 Expresión de IL-1 β /CCR5 en linfocitos T CD4+

La producción de IL-1 β /CCR5 fue de: RPMI 2%, FILM 15%, PMA 24% y PMA+FILM 13 %. Hubo diferencias significativas entre RPMI vs FILM $p < 0.002$ entre PMA y PMA+FILM $p < 0.05$ Figura 17.

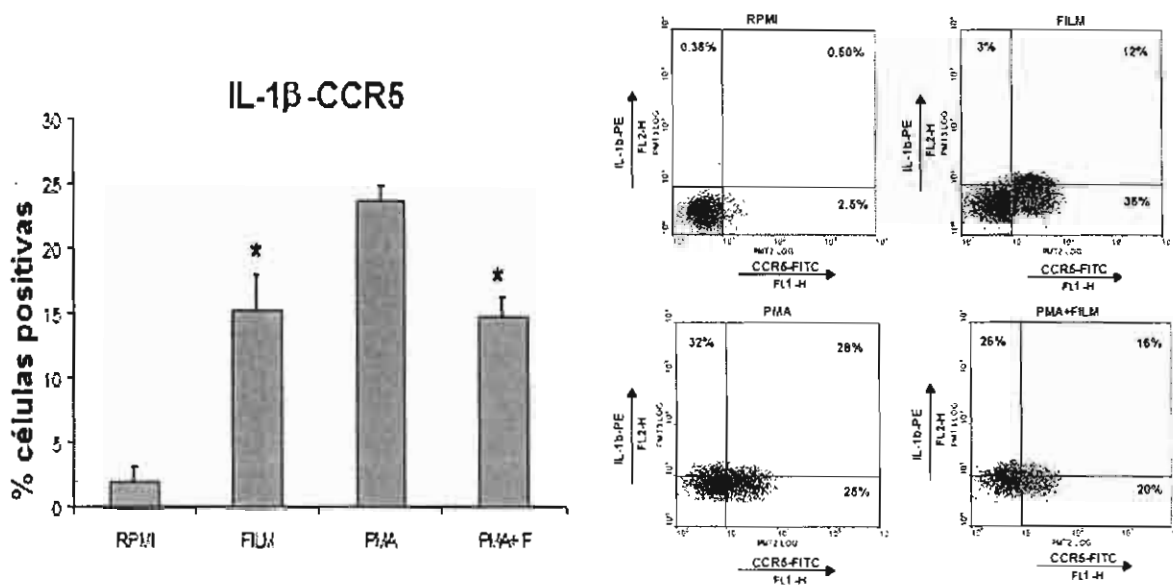


Figura 17. Efecto del FILM sobre la expresión de IL-1 β /CCR5. Los valores representan el promedio de seis experimentos \pm el error estándar. La gráfica de puntos o "Dot plot" es un representativo de seis experimentos adicionales.

10.13 Expresión de IFN- γ /CCR5 en linfocitos T CD4+

La producción de IFN- γ /CCR5 fue de: RPMI 2%, FILM 16%, PMA 24% y PMA+FILM 12%. Hubo diferencias significativas entre RPMI vs FILM $p < 0.002$ entre PMA y PMA+FILM $p < 0.002$ Figura 18.

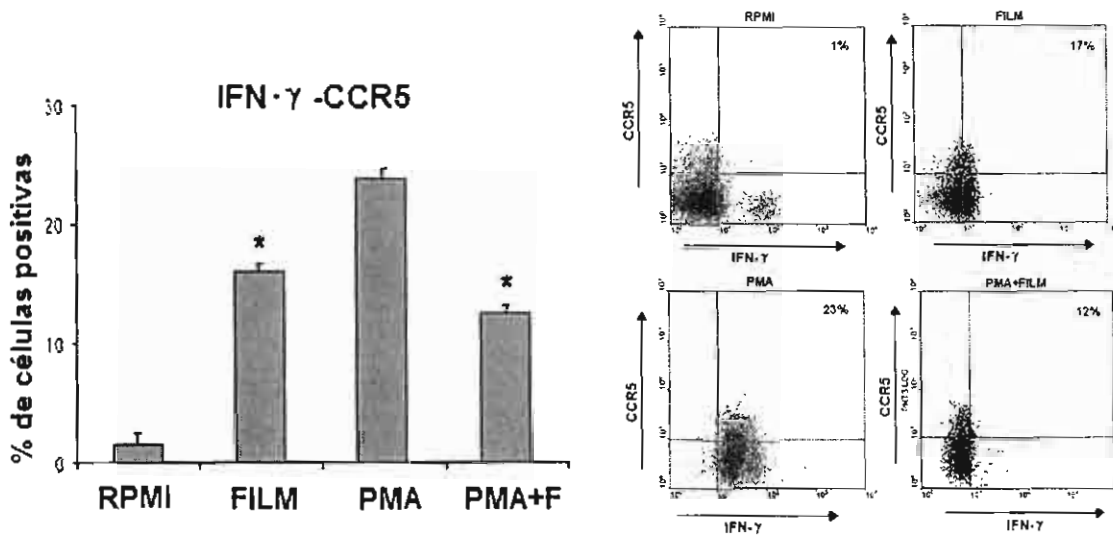


Figura 18. Efecto del FILM sobre la expresión de IFN- γ /CCR5. Los valores representan el promedio de seis experimentos \pm el error estándar. La gráfica de puntos o "Dot plot" es un representativo de seis experimentos adicionales.

10.14 Expresión de IL-2/CCR5 en linfocitos T CD4+

La producción de IL-2/CCR5 fue de: RPMI 2%, FILM 21%, PMA 28% y PMA+FILM 19%. Hubo diferencias significativas entre RPMI vs FILM $p < 0.002$ entre PMA y PMA+FILM no hubo diferencias significativas Figura 19.

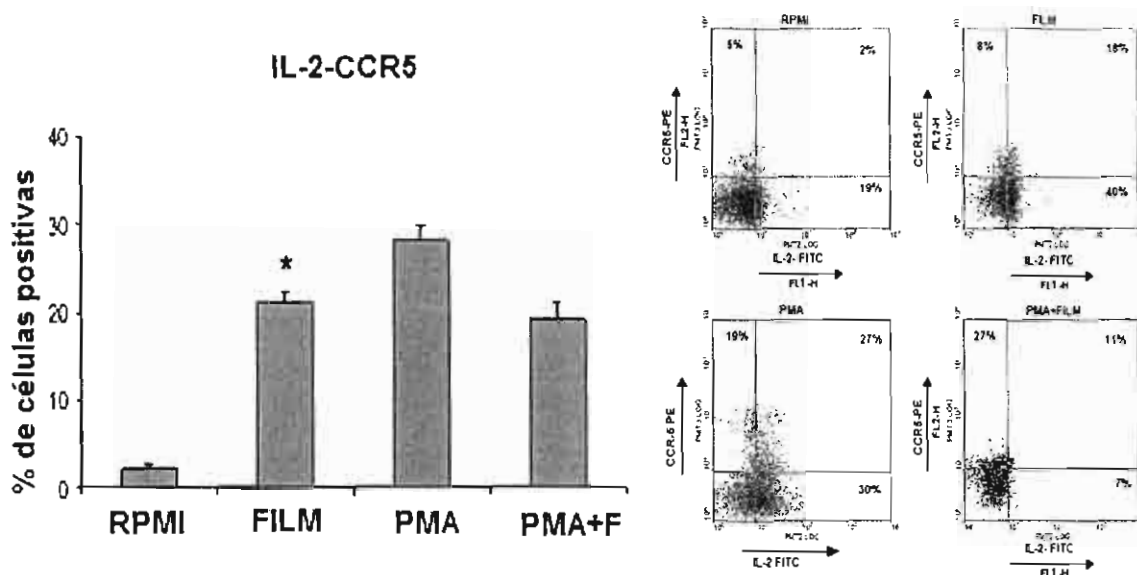


Figura 19. Efecto del FILM sobre la expresión de IL-2/CCR5. Los valores representan el promedio de seis experimentos \pm el error estándar. La gráfica de puntos o "Dot plot" es un representativo de seis experimentos adicionales.

10.15 Expresión de IL-4/CCR4 en linfocitos T CD4+

La producción de IL-4/CCR4 fue de: RPMI 3%, FILM 18%, PMA 32% y PMA+FILM 29%. Hubo diferencias significativas entre RPMI vs FILM $p < 0.002$ entre PMA y PMA+FILM no hubo diferencias significativas Figura 20.

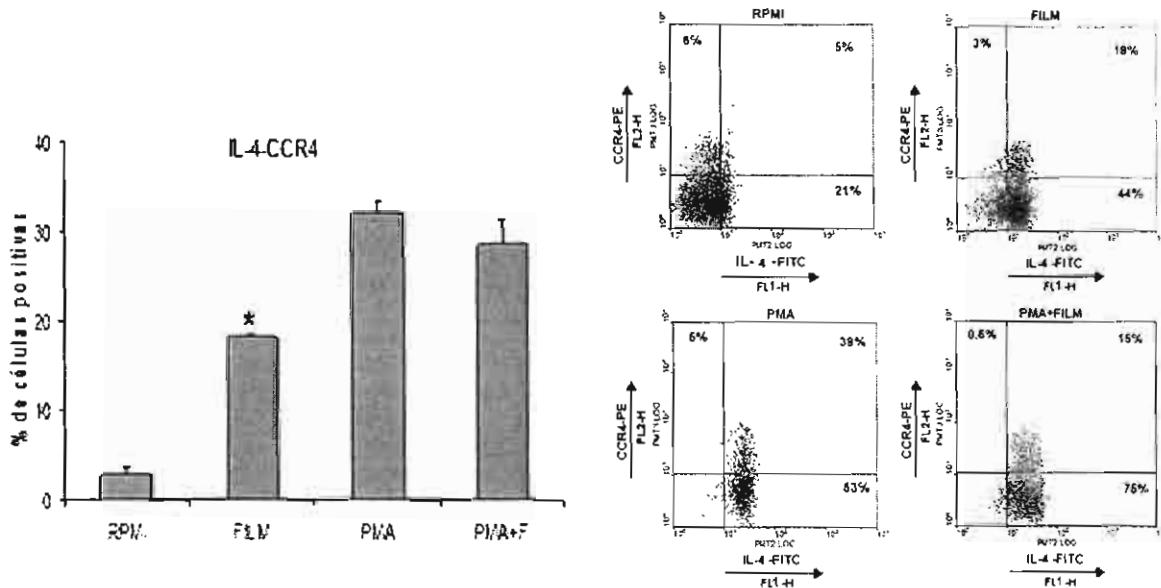


Figura 20. Expresión de citocinas por linfocitos T CD4+. Efecto del FILM sobre la expresión de IL-4/CCR4. Los valores representan el promedio de seis experimentos \pm el error estándar.

10.16 Expresión de IL-10/CCR4 en linfocitos T CD4+

La producción de IL-10/CCR4 fue de: RPMI 1%, FILM 16%, PMA 31% y PMA+FILM 31%. Hubo diferencias significativas entre RPMI vs FILM $p < 0.002$ entre PMA y PMA+FILM no hubo diferencias significativas. Figura 21.

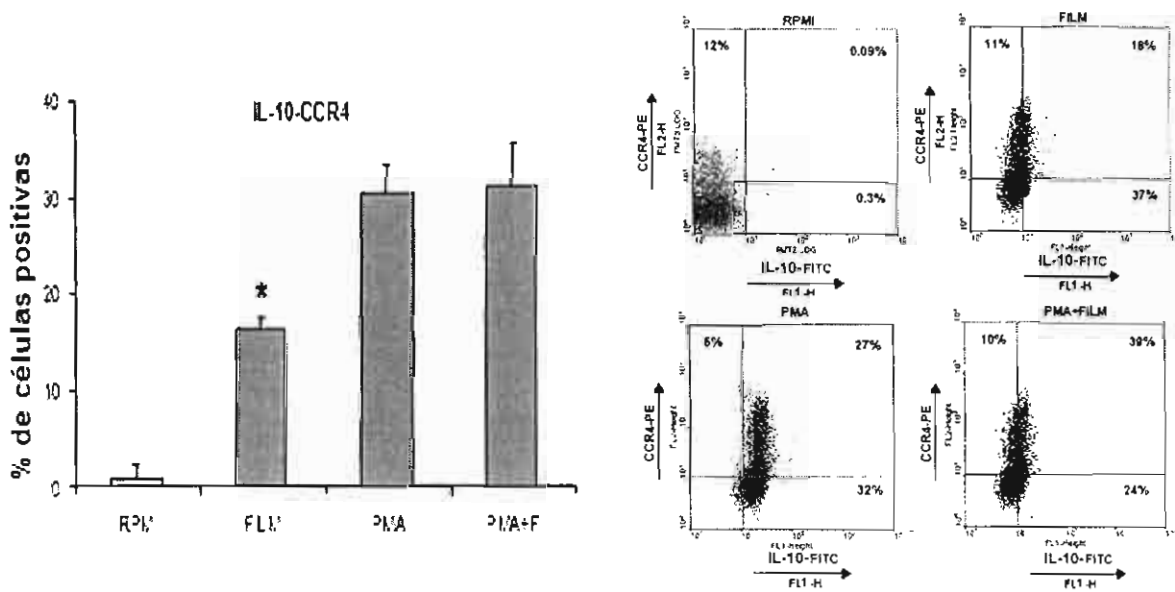


Figura 21. Expresión de citocinas por linfocitos T CD4. Los valores representan el promedio de seis experimentos \pm el error estándar. La gráfica de puntos o "dot plot" es un representativo de seis experimentos adicionales.

10.17 Expresión de citocinas pro y anti inflamatorias co-localizadas con receptores de quimiocinas.

La figura 22 muestra que la IL-1 β /CCR5 e IFN- γ /CCR5 fueron inhibidas significativamente por efecto del FILM

* $p \leq 0.05$ ** $p \leq 0.002$.

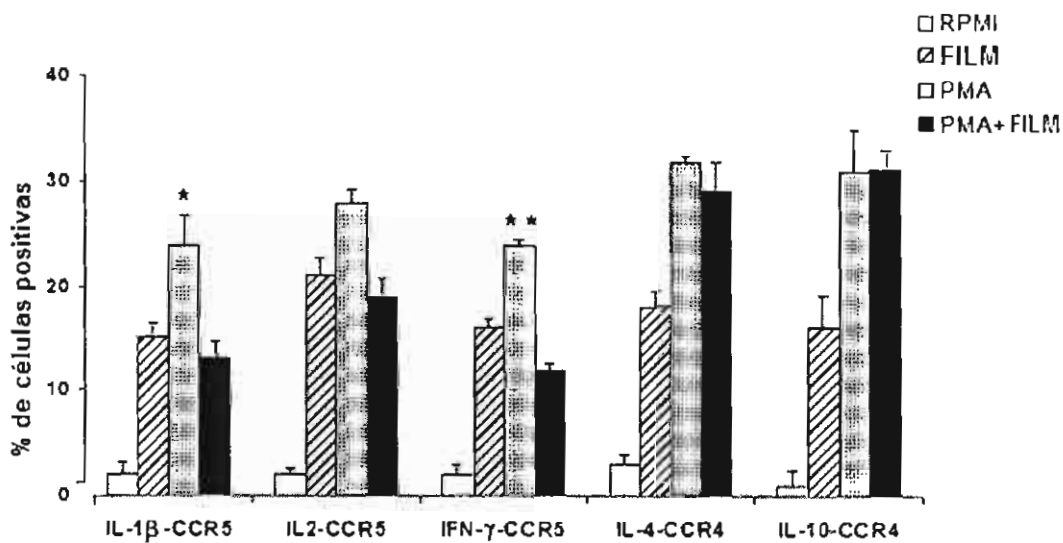


Figura 22. Expresión de citocinas pro/anti-inflamatorias co-localizadas con receptores de quimiocinas después de 24 h de incubación con RPMI, FILM, PMA y PMA+FILM en células T CD4+. La gráfica muestra la media \pm el error estándar (n=6). Los valores representan el porcentaje de las células dobles positivas y la *p cuando la inhibición fue estadísticamente significativa.

10.18 PCR-TR

Por la técnica de PCR-TR se analizó la expresión relativa de los genes IL-1 β , IFN- γ , IL-4 e IL-10. La expresión inducida por el FILM para los genes fue en promedio de 2, 5, 2 y 21 veces más con respecto al gen de referencia.

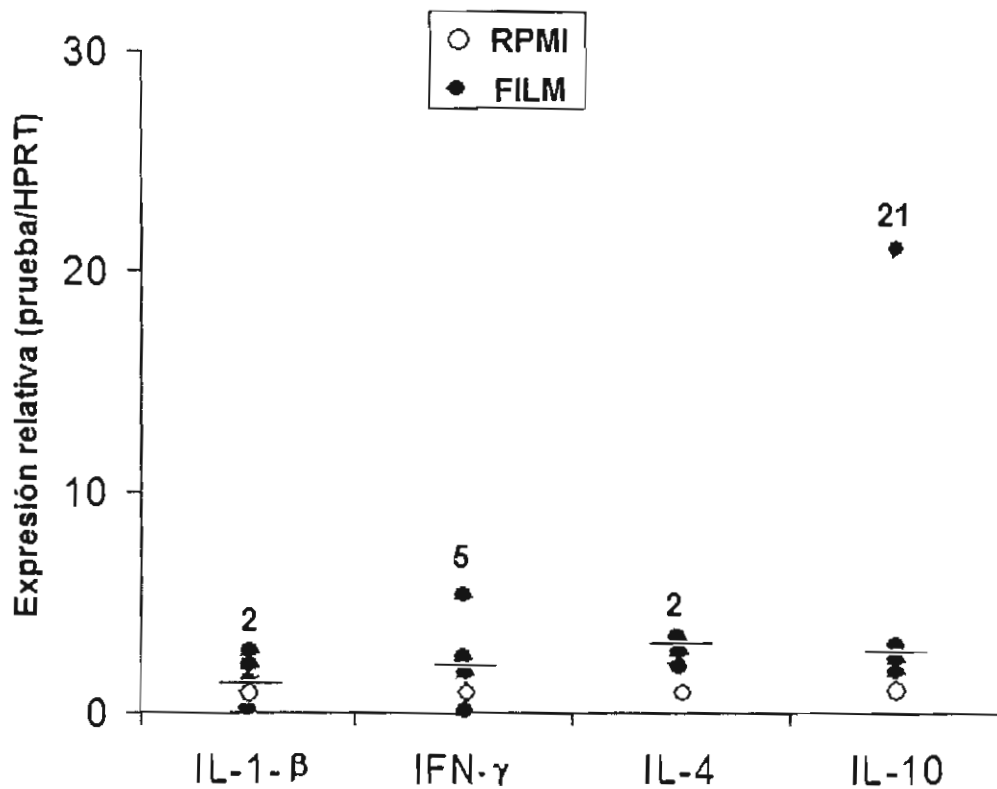


Figura 23 Expresión relativa de los genes (IL-1 β , IFN- γ , IL-4 e IL-10) inducidos por el FILM. 1×10^6 linfocitos T CD4+ purificados e incubados con o sin FILM por 24 horas, se le extrajo el RNA, y se realizó un análisis de PCR en tiempo real (PCR-TR) para detectar la expresión de transcritos para las citocinas Th1/Th2 como se muestra en material y métodos. Las barras horizontales indican la mediana de 5 determinaciones.

10.19 Determinación de citocinas por ELISA. En los sobrenadantes de los cultivos celulares se determinó la producción de citocinas IL-1 β , IL-2, IFN- γ , IL-5, IL-6 e IL-10. Para toda las citocinas se realizó una curva estándar similares a la que mostramos para IL-1 β .

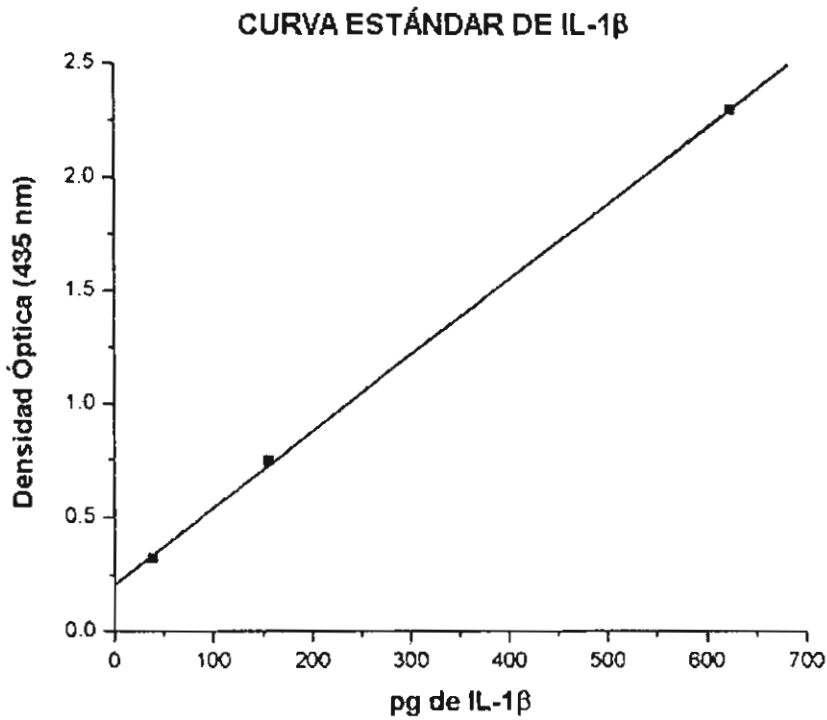


Figura 24. Curva patrón para la IL-1 β . Los resultados obtenidos de IL-1 β fueron en picogramos por ml (pg/ml) y son el promedio 16 experimentos \pm el error estándar por duplicado.

Con la técnica de ELISA encontramos que la producción constitutiva (RPMI) de citocinas IL-1 β , IL-2, IFN- γ , e IL-10 fue de 26, 18, 10, y 13 pg/ml respectivamente. La producción inducida por el FILM fue de 172, 245, 46, y 134 pg/ml respectivamente, para PMA fue de 192, 384, 84, y 326 pg/ml, Para PMA+FILM fue 76, 505, 42, y 471 pg/ml respectivamente. Se encontró inhibición por efecto del FILM para: IL-1 β ($p < 0.04$) IFN- γ ($p < 0.03$), este efecto no se observó para la IL-10 (ns) por el contrario aumento su expresión como lo muestra la tabla 2.

Tabla 2

Producción de citocinas en linfocitos TCD4+

	(pg/ml)				
	IL-1 β	IL-2	IFN- γ	IL-10	IL-4
<i>n</i> =	(16)	(20)	(22)	(13)	(11)
RPMI^a	26 \pm 5	18 \pm 9	10 \pm 3	13 \pm 5	3 \pm .03
FILM^b	172 \pm 27	245 \pm 15	46 \pm 5	134 \pm 13	4 \pm .01
PMA^c	192 \pm 29	384 \pm 20	84 \pm 6	326 \pm 10	ND
PMA + FILM^d	76 \pm 10*	505 \pm 22^{NS}	42 \pm 7**	471 \pm 8^{NS}	ND

^aRPMI (basal); ^bFactor Inhibidor de la Locomoción de los Monocitos; ^c1-phorbol-12 miristato-13 acetato; c vs d * $p < 0.04$, ** $p < 0.03$, *** $p < 0.02$, NS = no significativa, ND no determinada.

11. Discusión

Los mecanismos implicados en la evasión inmune de *E. histolytica* no son claros, uno de estos mecanismos podría ser asociado con la habilidad del parásito para modular la expresión de citocinas en el proceso inflamatorio el cual es iniciado por la expresión de citocinas pro-inflamatorias. La infección por *E. histolytica* induce un estado de supresión transitoria de la inmunidad mediada por células en los estados tempranos de la inflamación en el absceso hepático amibiano (AHA) y un sistema complejo de señalización de citocinas es disparado por la invasión del patógeno (Eckmann y col., 1993). En este trabajo mostramos el efecto del FILM (factor producido por *E. histolytica*) sobre la expresión de citocinas a nivel de gen de citocinas intracelulares y de proteína a las 24 horas. Reportes previos con ensayos de linfoproliferación, y la capacidad de reducir el azul de tetrazolium a diferentes tiempos (0, 24, 48, 72 y 96 h) activados con PMA nos indicaron que la mayor activación celular se obtenía a las 24 horas sin afectar la viabilidad celular. Como era de nuestro interés probar si el FILM era capaz de activar a los linfocitos T CD4+ medimos la expresión de CD69 en presencia o no de FILM. (CD69 es un marcador de activación de superficie expresado sobre las células T, B, y NK activadas) (Sancho y col., 2000, Testi y col., 1994). Encontramos que el FILM se comporta como un agente inductor/activador de los linfocitos T CD4+. Cuando los linfocitos T son activados adquieren funciones efectoras de acuerdo al patrón de citocinas que producen (Mosmann y Fong, 1989, Romagnani 2000). Al incubar las célula con el FILM encontramos que el FILM produjo un incremento en la expresión de citocinas pro y anti-inflamatorias (Th1/Th2) IL-1 β , IL-2, IFN- γ , IL-4 e

IL-10 en contraste cuando fueron incubadas con PMA + FILM se registro una inhibición inducida por el FILM de IL-1 β , IFN- γ sin afectar a IL-4 e IL-10 y que los genes de IL-1 β , IFN- γ , IL-4 e IL-10 son inducidos a expresarse por efecto del FILM.

Estudios en modelos de injertos heterólogos de intestino humano indican que trofozoitos de *E. histolytica* pueden iniciar una respuesta inflamatoria programada en células epiteliales del intestino humano por activación del factor de transcripción NF-kB, y estimulan la producción de mediadores inflamatorios (i.e. citocinas y/quimiocinas). La producción de IL-1 β y IL-8 por las células epiteliales causa una llegada de células inflamatorias en la mucosa intestinal lo que provoca daño del tejido. No obstante, la iniciación de la respuesta inflamatoria del intestino del huésped requiere *in vivo* el contacto entre las células intestinales y los trofozoitos amibianos vivos, las células epiteliales del intestino humano lejanas al sitio de contacto con la amiba también producen citocinas como la IL-1 que activa a las células epiteliales vecinas (Seydel y col., 1997). También se sabe que el IFN producido por macrófagos activados puede dar muerte a *E. histolytica* a través de mecanismos oxidativos y no oxidativos (Denis y col., 1989), y se ha reportado que el FILM deprime la producción de reactivos intermediarios de oxido nítrico en macrófagos y neutrófilos (Rico y col., 2003). Estudios en modelos de animales experimentales también han mostrado que *E. histolytica* modula la producción de TNF- α e IFN- γ inhibiendo la acción y función de los monocitos/macrófagos (Pérez-Tamayo, 1986). Nosotros mostramos que la producción de IFN- γ , IL-1 β fue inhibida por el FILM, pero no la IL-10 la cual mostró un incremento

significativo de su expresión. La IL-10 es una citocina reguladora la cual inhibe la presentación del antígeno y la subsecuente liberación de citocinas pro-inflamatorias incluyendo a la IL-12, IFN- γ , IL-1 β , por inhibición de mecanismos de señalización como Jack/stats o NF-kB (Riley y col., 1999). La IL-10 también inhibe algunas quimiocinas como la proteína inflamatoria de monocitos 1- α (MIP-1 α), RANTES, IL-8 y eotaxina (Chung y col., 1999), así como la expresión de la enzima inflamatoria inducible óxido nítrico sintasa (iNOS) y ciclo-oxigenasa (COX-2) en macrófagos (Ebert, 2000). Las citocinas son críticas para mantener la fisiología normal, un desequilibrio en la producción de estas proteínas puede conducir a estados patológicos de inflamación, el FILM pudiera estar regulando esta producción por aumento de la IL-10 como lo muestran nuestros resultados, probablemente a través de la modulación de NF-kB.

La activación de las células puede también cambiar la expresión de quimiocinas y sus receptores, esenciales para el reclutamiento de leucocitos en la inflamación. El receptor de quimiocinas CCR5 es expresado particularmente en células Th1, en células Th2 son altamente expresados los receptores CCR4 y CCR8 (Loetcher y col., 1998, Andrew y col., 2001, Zingoni y col., 1998, Odum y col., 1999). Además en la función efectora los linfocitos T activados adquieren diferentes capacidades migratorias, de hecho es la clave para una regulación eficiente de la respuesta inmune (Mackay, 1993). En este estudio las células expresaron IL-1 β /CCR5, IL-2/CCR5 e IFN- γ / CCR5 en presencia del FILM. Con PMA+FILM el IFN- γ /CCR5 e IL-1 β /CCR5 resultaron inhibidas por efecto del FILM. CCR5 es sobre-regulado por citocinas Th1 pero puede ser suprimido por la IL-10 (Olson y Ley, 2002).

E. histolytica puede primero producir una reacción aguda de vida corta con citocinas pro-inflamatorias como las encontradas per se en este trabajo, el cual es seguido por un patrón de señales anti-inflamatorias (aumento de IL-10 principal citocina anti-inflamatoria). La IL-10 puede también causar la paucidad inflamatoria ya bien conocida en las lesiones amibianas avanzadas (Kretschmer y col., 1985). El FILM puede incrementar PGE2 y puede contribuir a la regulación de la respuesta inmune por abatimiento de la regulación de la actividad de los macrófagos y activación de la población de los linfocitos Th2. La IL-10 suprime numerosas respuestas de macrófagos, de esta manera, el resultado de la activación de Th2 es inhibir la inflamación aguda y crónica, incluyendo reacciones de hipersensibilidad tipo tardío (DTH) (Mosmann y col., 1997). El efecto del FILM puede explicarse por dos mecanismos diferentes, primero por inhibición de citocinas pro-inflamatorias (Th1) como se ha visto con la IL-1 β e IFN- γ ambas implicadas en el camino de señalización de NF-kB el cual también es afectado por el FILM (Velázquez y Kretschmer, 2004), segundo por incremento en la expresión de IL-10 (prototipo de citocina anti-inflamatoria). El FILM puede regular un patrón de citocinas pro y anti-inflamatorio que contribuyen a la exigua inflamación que se observa en las lesiones avanzadas en la amibiasis invasora.

12. CONCLUSIONES

- El FILM inhibe la producción inducida por PMA de IFN- γ e IL-1 β (Th1)
- El FILM inhibe la expresión de IFN- γ /CCR5 e IL-1 β /CCR5 (Th1)
- El FILM no afecta la expresión inducida por PMA de IL-4/CCR4, IL-10/CCR4 (Th2)
- El FILM al inicio del proceso inflamatorio se comporta como un activador inespecífico induciendo la producción de citocinas Th1/Th2
- A medida que avanza el proceso inflamatorio la producción de citocinas Th2 aumenta de tal forma que puede inhibir a las citocinas Th1
- *Entamoeba histolytica* a través del FILM inhibe la producción de citocinas pro-inflamatorias o Th1 y aumenta la producción de citocinas anti-inflamatorias o Th2 produciendo un desequilibrio Th1 < Th2.

13. Referencias bibliográficas

- Abbas A, Lichtman A. Cellular and molecular immunology. 5th ed. Saunders Elsevier, EEUU 2004; 243-274
- Alexander WS. Suppressors of cytokine signaling (SOCS) in the immune system. *Nature Rev Immunol.* 2002; 2(6):410-416
- Aley SB, Scott WA, Cohn ZA. Plasma membrane of *Entamoeba histolytica*. *J Exp Med* 1980; 152(2): 391-404
- Andrew DP, Ruffing N, Kim CH, Miao W, Heath H, Li Y, Murphy K, Campbell JJ, Butcher EC, Wu L. C-C chemokine receptor 4 expression defines a major subset of circulating nonintestinal memory T cells of both Th1 and Th2 potential. *J Immunol.* 2001; 166(1):103-111
- Baron S, Tying SK, Fleischmann WR Jr, Coppenhaver DH, Niesel DW, Klimpel GR, Stanton GJ, Hughes TK. The interferons. Mechanisms of action and clinical applications. *JAMA.* 1991;266(10):1375-1383
- Böyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scand J Clin Lab Invest* 1968; 97 [Suppl]: 77-89
- Chung KF, Patel HJ, Fadlon EJ, Rousell J, Haddad EB, Jose PJ, Mitchell J, Belvisi M. Induction of eotaxin expression and release from human airway smooth muscle cells by IL-1beta and TNF-alpha: effects of IL-10 and corticosteroids. *Br J Pharmacol.* 1999; 127(5):1145-1150

- Councilman WT, Lafleur HA. Amoebic dysentery. Johns Hopkins Hosp Rep 1891; 2:395
- D'Ambrosio D, Panina-Bordignon P, Sinigaglia F. Chemokine receptors in inflammation: an overview. J Immunol Methods. 2003;273(1-2):3-13
- D'Ambrosio D. Role of chemokine receptors in allergic inflammation and new potential of treatment of bronchial asthma. Recenti Prog Med. 2002; 93(6):346-350
- De Groote D, Zangerle PF, Gevaert Y, Fassotte MF, Beguin Y, Noizat-Pirenne F, Pirenne J, Gathy R, Lopez M, Dehart I. Direct stimulation of cytokines (IL-1beta, TNF-alpha, IL-6, IL-2, IFN-gamma and GM-CSF) in whole blood. I. Comparison with isolated PBMC stimulation. Cytokine. 1992; 4(3):239-248
- Denis M, Chadee K. Cytokine activation of murine macrophages for in vitro killing of *Entamoeba histolytica* trophozoites. Infect Immun. 1989; 57(6):1750-1756
- Ebert EC. IL-10 enhances IL-2-induced proliferation and cytotoxicity by human intestinal lymphocytes. Clin Exp Immunol. 2000;119(3):426-432
- Eckmann L, Jung HC, Schurer-Maly C, Panja A, Morzycka-Wroblewska E, Kagnoff MF. Differential cytokine expression by human intestinal epithelial cell lines: regulated expression of interleukin 8. Gastroenterology. 1993; 105(6):1689-1697

- Edman P, Begg G. A protein sequenator. *Eur J Biochem.* 1967; 1(1):80-91
- Gimenez Scherer JA, Rico G, Fernandez-Diez J, Kretschmer RR. Inhibition of contact cutaneous delayed hypersensitivity reactions to DNBC in guinea pigs by the monocyte locomotion inhibitory factor (MLIF) produced by axenically grown *Entamoeba histolytica*. *Arch Med Res.* 1997; 28 Spec No:237-238
- Gimenez-Scherer JA, Arenas E, Diaz L, Rico G, Fernandez J, Kretschmer R. Effect of the monocyte locomotion inhibitory factor (MLIF) produced by *Entamoeba histolytica* on the expression of cell adhesion molecules (CAMs) in the skin of guinea pigs. *Arch Med Res.* 2000; 31(4 Suppl):S92-S93
- Griffiths GM. The cell biology of CTL killing. *Curr Opin Immunol.* 1995; 7(3): 343-348
- Ishihara S, Fukuda R, Fukumoto S. Cytokine gene expression in the gastric mucosa. *J Gastroenterol.* 1996; 31(4):485-490
- Ivashkiv LB. Type I interferon modulation of cellular responses to cytokines and infectious pathogens: potential role in SLE pathogenesis. *Autoimmunity.* 2003; 36(8):473-479
- Kawakami K. Interleukin-18 and host defense against infectious pathogens. *J Immunother.* 2002; 25 Suppl 1:S12-S19

- Koss K, Satsangi J, Fanning GC, Welsh KI, Jewell DP. Cytokine (TNF alpha, LT alpha and IL-10) polymorphisms in inflammatory bowel diseases and normal controls: differential effects on production and allele frequencies. *Genes Immun.* 2000; 1(3):185-190
- Kretschmer R, Collado ML, Pacheco MG, Salinas MC, Lopez-Osuna M, Lecuona M, Castro EM, Arellano J. Inhibition of human monocyte locomotion by products of axenically grown *E. histolytica*. *Parasite Immunol.* 1985; 7(5):527-543
- Kretschmer RR, Castro EM, Pacheco G, Rico G, Diaz-Guerra O, Arellano J. The role of mannose in the receptor of the monocyte locomotion inhibitory factor produced by *Entamoeba histolytica*. *Parasitol Res.* 1991;77(5):374-378
- Kuby J. *Immunology*. 4^a edición ed. Freeman EEUU 2001; 320-326
- Li M, He S. IL-10 and its related cytokines for treatment of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.* 2004; 10(5):620-625
- Lingnau K, Hoehn P, Kerdine S, Koelsch S, Neudoerfl C, Palm N, Ruede E, Schmitt E. IL-4 in combination with TGF-beta favors an alternative pathway of Th1 development independent of IL-12. *J Immunol.* 1998; 161(9):4709-4718

- Loetscher P, Ugucioni M, Bordoli L, Baggiolini M, Moser B, Chizzolini C, Dayer JM. CCR5 is characteristic of Th1 lymphocytes. *Nature*. 1998; 391(6665):344-345
- Luscinskas FW, Gimbrone MA. Endothelial-dependent mechanisms in chronic inflammatory leukocyte recruitment. *Annu Rev Med*. 1996; 47:413-421
- Mackay CR. Homing of naive, memory and effector lymphocytes. *Curr Opin Immunol*. 1993; 5(3):423-427
- Martino G, Grohovaz F, Brambilla E, Codazzi F, Consiglio A, Clementi E, Filippi M, Comi G, Grimaldi LM. Proinflammatory cytokines regulate antigen-independent T-cell activation by two separate calcium-signaling pathways in multiple sclerosis patients. *Ann Neurol*. 1998; 43(3):340-349
- 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
- Mosmann TR, Fong TA. Specific assays for cytokine production by T cells. *J Immunol Methods*. 1989; 116(2):151-158
- Mosmann TR, Li L, Hengartner H, Kagi D, Fu W, Sad S. Differentiation and functions of T cell subsets. *Ciba Found Symp*. 1997; 204:148-154
- Nelson BH, Willerford DM. Biology of the interleukin-2 receptor. *Adv Immunol*. 1998; 70:1-81

- Niederlova J, Koubek K. Chemokines and chemokine receptors. *Sb Lek.* 1999; 100(3):169-189
- Odum N, Bregenholt S, Eriksen KW, Skov S, Ryder LP, Bendtzen K, Van Neerven RJ, Overgaard A, Garred P. The CC-chemokine 5 (CCR5) is a marker of, but not essential for the development of human Th1 cells *Tissue Antigens.* 1999; 54:572-577
- Olson TS, Ley K. Chemokines and chemokine receptors in leukocyte trafficking. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2002; 283 [Review] (1):R7-R28
- Pérez-Tamayo R. Pathology of amebiasis. In: *Martinez-Palomo*, ed. *Amebiasis.* Elsevier, Amsterdam; 1986:45
- Ramírez A, Ruiz-Arguellez A. *Inmunopatología.* Ed Intersistemas Libro 2, parte C, 1996:6
- Rico G, Arellano J, Kretschmer RR. The human monocyte locomotion-inhibitory factor produced by *Entamoeba histolytica* does not inhibit the locomotion of human eosinophils. *Parasitol Res.* 1998; 84(6):522-523
- Rico G, Diaz-Guerra O, Gimenez-Scherer JA, Kretschmer RR. Effect of the monocyte locomotion inhibitory factor (MLIF) produced by *Entamoeba histolytica* upon the respiratory burst of human leukocytes. *Arch Med Res.* 1992; 23(2):157-159

- Rico G, Diaz-Guerra O, Kretschmer RR. Cyclic nucleotide changes induced in human leukocytes by a product of axenically grown *Entamoeba histolytica* that inhibits human monocyte locomotion. *Parasitol Res.* 1995; 81(2):158-162
- Rico G, Leandro E, Rojas S, Gimenez JA, Kretschmer RR. The monocyte locomotion inhibitory factor produced by *Entamoeba histolytica* inhibits induced nitric oxide production in human leukocytes. *Parasitol Res.* 2003; 90(4):264-267
- Rico G, Ximenez C, Ramos F, Kretschmer RR. Production of the monocyte locomotion inhibitory factor (MLIF) by axenically grown *Entamoeba histolytica*: synthesis or degradation? *Arch Med Res.* 1997; Suppl 28:235-236
- Riley JK, Takeda K, Akira S, Schreiber RD. Interleukin-10 receptor signaling through the JAK-STAT pathway. Requirement for two distinct receptor-derived signals for anti-inflammatory action. *J Biol Chem.* 1999; 274(23):16513-16521
- Roitt. *Immunology.* 5th ed., Mosby, London UK, 1998; 61-69
- Romagnani S. T-cell subsets (Th1 versus Th2). *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2000; 85(1):9-18

- Ruschpler P, Stiehl P. Shift in Th1 (IL-2 and IFN-gamma) and Th2 (IL-10 and IL-4) cytokine mRNA balance within two new histological main-types of rheumatoid-arthritis (RA). *Cell Mol Biol.* 2002; 48(3):285-293
- Sallusto F, Lenig D, Mackay CR, Lanzavecchia A. Flexible programs of chemokine receptor expression on human polarized T helper 1 and 2 lymphocytes. *J Exp Med.* 1998; 187(6):875-883
- Sánchez J, Soriano-Correa C, Rico G, Jiménez-Scherer J, Velásquez J & Kretschmer R. Determinación de la estructura electrónica del péptido anti-inflamatorio producido por *Entamoeba histolytica* (FILM). *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas* 2003; 34:56-61
- Sancho D, Santis AG, Alonso-Lebrero JL, Viedma F, Tejedor R, Sanchez-Madrid F. Functional analysis of ligand-binding and signal transduction domains of CD69 and CD23 C-type lectin leukocyte receptors. *J Immunol.* 2000; 165(7):3868-3875
- Seydel KB, Li E, Swanson PE, Stanley SL. Human intestinal epithelial cells produce proinflammatory cytokines in response to infection in a SCID mouse-human intestinal xenograft model of amebiasis. *Infect Immun.* 1997; 65(5):1631-1639
- Shimada T, Terano A. Chemokine expression in *Helicobacter pylori*-infected gastric mucosa. *J Gastroenterol.* 1998; 33(5):613-617
- Sinigaglia F, D'Ambrosio D. Regulation of helper T cell differentiation and

recruitment in airway inflammation. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;162(4 Pt 2):S157-S160

- Testi R, D'Ambrosio D, De Maria R, Santoni A. The CD69 receptor: a multipurpose cell-surface trigger for hematopoietic cells. *Immunol Today.* 1994; 15(10):479-483
- Tomlinson S. Complement defense mechanisms. *Curr Opin Immunol.* 1993; 5(1):83-89
- Tsutsumi V. In vivo experimental models of amebiasis. *Gac Med Mex.* 1994; 130(6): 450-453
- Velázquez JR, Kretschmer RR. *Entamoeba histolytica* a remarkable anti-inflammatory parasite. *Inmunología.* 2004; 23: 200-206
- Vilches C, Parham P. KIR: diverse, rapidly evolving receptors of innate and adaptive immunity. *Annu Rev Immunol.* 2002; 20:217-251
- Zingoni A, Soto H, Hedrick JA, Stoppacciaro A, Storlazzi CT, Sinigaglia F, D'Ambrosio D, O'Garra A, Robinson D, Rocchi M, Santoni A, Zlotnik A, Napolitano M. The chemokine receptor CCR8 is preferentially expressed in Th2 but not Th1 cells. *J Immunol.* 1998; 161(2):547-551

ANEXOS

5 Sara Rojas-Dotor · Rico Guadalupe · Julia Pérez ·
6 Juan Velázquez · Raúl Silva · Esther Morales ·
7 Roberto Kretschmer

8 **Cytokine expression in CD4⁺ cells exposed to the monocyte**
9 **locomotion inhibitory factor produced by *Entamoeba histolytica***

10 Received: 3 July 2005 / Accepted: 11 November 2005
11 © Springer-Verlag 2005

12 **Abstract** *Entamoeba histolytica* produces monocyte lo-
13 comotion inhibitory factor (MLIF), a pentapeptide with in
14 vitro and in vivo anti-inflammatory properties. MLIF may
15 interfere with leukocyte migration, disturbing the balance
16 of pro- and anti-inflammatory cytokines secreted by CD4⁺ T
17 lymphocytes. We evaluated the effect of MLIF on expres-
18 sion of pro- and anti-inflammatory cytokines in human
19 CD4⁺ T lymphocytes. Regulatory cytokines [interleukin-1
20 beta (IL-1 β), IL-2, interferon gamma (IFN- γ), IL-5, IL-6,
21 and IL-10] were studied by enzyme-linked immunosorbent
22 assay method in CD4⁺-cell supernatant fluids. Proinflam-
23 matory cytokines were produced per se by MLIF (IL-1 β ,
24 IL-2, and IFN- γ) and also anti-inflammatory cytokines (IL-5,
25 IL-6, and IL-10) with I-phorbol-12 myristate-13 acetate +
26 MLIF; the IL-1 β , IFN- γ , IL-5 and IL-6 production was
27 inhibited but not that of IL-10 which disclosed increase in
28 its expression. MLIF disturbs the pro- and anti-inflamma-
29 tory balance, and it induces inhibition of IL-1 β (principal
30 proinflammatory cytokine) and increases IL-10 (prototype
31 of an anti-inflammatory cytokine).

32 **Introduction**

33 The extracellular protozoan *Entamoeba histolytica* causes
34 an estimated 50 million cases of invasive amebiasis an-

nally worldwide, principally in the form of amebic 35
dysentery. Nonetheless, there are also occasionally serious, 36
extra-intestinal complications, the foremost being is the 37
amebic abscess of the liver. In the absence of clinical 38
intervention, amebic infection is progressive and is es- 39
timated to cause 49,000 deaths yearly (Walsh 1986). 40
Monocyte locomotion inhibitory factor (MLIF) is a heat- 41
stable pentapeptide (Met-Gln-Cys-Asn-Ser) produced by 42
E. histolytica in axenic culture (Kretschmer et al. 1985). 43
This factor displays several in vitro and in vivo anti- 44
inflammatory properties, i.e., inhibition of monocyte lo- 45
comotion and of respiratory burst in monocytes and 46
neutrophils (Rico et al. 1992), increase in pericentriolar 47
microtubules and cytoplasmatic cyclic adenosine mono- 48
phosphate (cAMP) without a concomitant decrease in cy- 49
clic guanosine monophosphate (cGMP) in target cells 50
(Rico et al. 1995), depression of 1-chloro-2-4 dinitroben- 51
zene skin hypersensitivity in guinea pigs and gerbils, and 52
delay of mononuclear leukocytes in human Rebutek skin 53
windows with inhibition of expression of adhesion mol- 54
ecules, very late activation antigen 4 and vascular cell 55
adhesion molecule, in postcapillary endothelia and mono- 56
cytes (Giménez Scherer et al. 1997, 2000). The molecular 57
mechanism of MLIF remains unclear. Multiplicity of 58
events and types of cells involved have suggested that 59
there are network actions by pro- and anti-inflammatory 60
cytokines in the human host. These cytokines are produced 61
by T cells (Th1/Th2). Th1 cells are known to activate 62
cellular immunity that results in inflammatory response, 63
whereas Th2 cells induce humoral response and suppress 64
inflammation (Romagnani 2000). T cells have the ability to 65
expand rapidly in response to specific stimuli and to 66
differentiate in effector cells that, through production of 67
soluble factors, such as cytokines and chemokines, com- 68
municate to other cells for initiation of a cascade of 69
inflammatory events (Sinigaglia and D'Ambrosio 2000). 70
We evaluated the effect of MLIF on pro- and anti- 71
inflammatory cytokine response expression in the presence 72
of MLIF in CD4⁺-cell supernatant fluids. 73

S. Rojas-Dotor (✉) · R. Guadalupe · J. Velázquez · R. Silva ·
E. Morales · R. Kretschmer
Unidad de Investigación Médica en Inmunología,
Hospital de Pediatría,
Centro Médico Nacional Siglo XXI (CMN-SXXI),
Instituto Mexicano del Seguro Social,
Mexico City, DF Mexico
e-mail: srdotor@yahoo.com.mx
Fax: +52-55-276943

J. Pérez
División de Ciencias Biológicas,
Universidad Autónoma Metropolitana,
Mexico City, DF Mexico

t1.1 **Table 1** In vitro cytokine production in CD4⁺ cells

t1.2	IL-1 β	IL-2	IFN- γ	IL-5	IL-6	IL-10	
t1.3	(16)	(20)	(22)	(12)	(14)	(13)	
t1.4	RPMI (pg/ml)	26 \pm 5	18 \pm 9	10 \pm 3	15 \pm 1	16 \pm 3	13 \pm 5
t1.5	MLIF (pg/ml)	172 \pm 27	245 \pm 15	46 \pm 5	188 \pm 31	114 \pm 16	134 \pm 13
t1.6	PMA (a) (pg/ml)	192 \pm 29	384 \pm 20	84 \pm 6	575 \pm 30	288 \pm 17	326 \pm 10
t1.7	PMA + MLIF (b) (pg/ml)	76 \pm 10*	505 \pm 22 ^{NS}	42 \pm 7**	384 \pm 22***	123 \pm 8 [†]	471 \pm 8 ^{NS}

RPMI (basal), MLIF monocyte locomotion inhibitory factor, PMA 1-phorbol-12 myristate-13 acetate, NS not significant
* p <0.04, ** p <0.03, *** p <0.02, [†] p <0.001 (a vs b)

74 **Materials and methods**

75 Thirty milliliters of venous heparinized blood was obtained
76 from healthy, nonsmoking adult volunteer donors of either
77 sex. Blood was diluted 1:2 with phosphate-buffered saline
78 (PBS; 0.15 M phosphate buffer). The peripheral blood
79 mononuclear cells (PBMCs) were obtained by Bøyum
80 method (Bøyum 1968).

81 CD4⁺ T lymphocytes were purified by negative selection
82 using MACS reagents isolation of human CD4⁺ T-cell
83 commercial kit (BD Biosciences Pharmingen, San Diego,
84 CA, USA). PBMCs (1×10^7) were placed in propylene tubes
85 with 80 μ l PBS-albumin-EDTA and 20 μ l antibody
86 cocktail (CD8, CD11b, CD16, CD19, CD36, and CD56)
87 (MACS, Miltenyl Biotec, Inc., Auburn, CA, USA) for
88 10 min at 4°C; the CD4⁺ lymphocyte obtained was 95%
89 pure. CD4⁺ T cells (5×10^5) were placed in RPMI-1640
90 medium, supplemented with 10% fetal calf serum, 2 mM
91 L-glutamine, 100 U/ml streptomycin, 5 μ g/ml gentamicin,
92 and 1 mM sodium pyruvate (Gibco Laboratories, Grand
93 Island, NY, USA) and were stimulated for 24 h in the
94 presence of 1-phorbol-12 myristate-13 acetate (PMA;
95 50 ng/ml), MLIF (50 μ g/ml), or PMA + MLIF. Controls
96 consisted of cells incubated solely in culture medium (i.e.,
97 constitutive cytokine production). MLIF (Met-Gln-Cys-
98 Asn-Ser, 96% pure) was commercially obtained (Ameri-
99 can Peptide Co., Sunnyvale, CA, USA). Optimal amounts
100 of MLIF and PMA were determined by dose-response
101 curve. Resulting supernatant fluids were assayed for a set of
102 pro- and anti-inflammatory cytokines [interleukin-1 beta
103 (IL-1 β), IL-2, interferon-gamma (IFN- γ), IL-5, IL-6, and
104 IL-10] using commercial enzyme-linked immunosorbent
105 assay kits (Beckman Coulter Immunotech, Marseille,
106 France). Quantitative data were expressed as mean and
107 standard error. Student *t* and Mann-Whitney *U* tests were
108 employed for statistical analysis; a *p* value of <0.05 was
109 considered statistically significant.

110 **Results**

111 Cells exposed to the MLIF increased in induced cytokine
112 production. IL-1 β , IL-2, IFN- γ , IL-5, IL-6, and IL-10 (172,
113 245, 46, 188, 114, and 134 pg/ml, respectively) were found
114 in cells exposed only to MLIF, and differences were
115 significant when compared with basal line constitutive

production of control (26, 18, 10, 15, 16, and 13 pg/ml,
respectively). PMA was a better cytokine inducer: in vitro,
the cytokine production model used in this study in
activated cells with PMA was statistically significant
(p <0.05). MLIF inhibited IL-1 β , IFN- γ , IL-5, and IL-6
(p <0.02) when added to PMA, however, IL-10 and IL-2
were significantly increased in its expression (471 and
505 pg/ml, respectively) (Table 1).

Discussion

Host protective immunity involves participation of both
humoral and cellular responses; however, the mechanism
involved in the immune evasion of *E. histolytica* is not
clear. One of these mechanisms could be associated with
the ability of parasites to modulate cytokine expression in
the inflammatory process, which is initiated by expression
of proinflammatory cytokines. *E. histolytica* infections in-
duce a state of transient suppression of cell-mediated im-
munity in early stages of inflammation in amebic hepatic
abscess, and a complex signaling system of cytokines is
triggered by pathogen invasion (Eckmann et al. 1993). We
have shown the effect of MLIF on cytokine expression
modulation. MLIF per se registers increased expression of
proinflammatory cytokines, IL-1 β , IL-2, IFN- γ , and anti-
inflammatory cytokines, IL-5, IL-6, and IL-10. Studies in a
human intestinal xenograft model of disease indicate that *E.*
histolytica trophozoites can initiate an inflammatory re-
sponse programmed in human intestinal epithelial cells by
activating transcription factor nuclear factor κ B (NF- κ B)
and stimulating release of inflammatory mediators. Al-
though initiation of host intestinal inflammatory response in
vivo requires contact between intestinal cells and live
amebic trophozoites, human intestinal epithelial cells distal
to a site of amebic contact also produce cytokines, con-
sistent with a role for soluble mediators, such as IL-1, in
activating neighboring epithelial cells (Seydel et al. 1997).
IFN- γ -activated macrophages can kill *E. histolytica* by
means of both oxidative and nonoxidative mechanisms
(Denis and Chadee 1989), and it appears that MLIF
depresses production of nitric oxide reactive intermediates
(Rico et al. 2003). We have shown that IL-1 β -, IFN- γ -, IL-5-,
and IL-6-induced production was inhibited for MLIF but
not that of IL-10 which disclosed significant increase in its
expression. IL-10 is a regulatory cytokine that inhibits both

159 antigen presentation and subsequent proinflammatory cy-
160 tokine release, including early increase in expression of the
161 principal proinflammatory cytokine IL-1 β .

162 IL-10 inhibits synthesis of proinflammatory cytokines
163 (IL-1 β , TNF- α , and IL-6) and of Th2-cell-derived cyto-
164 kines (IL-4 and IL-5; Staples et al. 2000). IL-10 also inhibits
165 chemokines, such as monocyte inflammatory protein 1- α
166 (MIP-1 α), T-cell expressed and secreted (RANTES), IL-8,
167 and eotaxin (Chung et al. 1999), as well as expression of
168 inflammatory enzyme inducible nitric oxide synthase and
169 cyclooxygenase (COX-2) in macrophages (Ebert 2000).
170 The exact molecular mechanism altered by the MLIF is not
171 yet defined. From previous experiments, we know that
172 MLIF acts through mannose-containing surface receptors,
173 increasing cAMP without concomitantly decreasing cGMP
174 and increasing the number of pericentriolar microtubules
175 (affecting cytoskeleton). This and the multiplicity of
176 selective actions of MLIF upon a variety of cells suggest
177 that MLIF could act by altering the network of pro- and
178 anti-inflammatory ones, consequently affecting the funda-
179 mental pathway. There is some evidence (Utrera-Barillas et
180 al. 2003), such that MLIF inhibits induced expression of
181 inflammatory proteins MIP-1 α and MIP-1 β in U-937 cells,
182 proteins regulated by NF- κ B pathway. The most abundant
183 form of NF- κ B is the heterodimer p65-p50 found in the
184 PMA-induced system. At our laboratory, study of the NF-
185 κ B system provided us with elements that support a
186 disturbing behavior of MLIF. Temporary studies showed
187 that MLIF per se induces p50 translocation, which can also
188 be explained due to the fact that MLIF induces cAMP
189 synthesis, and therefore, protein kinase A phosphoryl into
190 NF- κ B: I κ B turns into I κ B, allowing NF- κ B translocation.

191 The effect of MLIF observed in this study can be ex-
192 plained by two different mechanisms: first by inhibition of
193 proinflammatory cytokines (Th1), as it has been seen with
194 IL-1 β and IFN- γ (both are involved in the signaling
195 pathway of NF- κ B; Velázquez and Kretschmer 2004), and
196 second by increasing expression of IL-10 (the prototype
197 anti-inflammatory cytokine). MLIF can orchestrate an anti-
198 inflammation pattern of cytokines Th1<Th2 that contrib-
199 utes to the exiguous inflammation found in advanced
200 lesions of invasive amebiasis.

201 **Acknowledgements** This work was supported by a grant from the
202 Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), México
203 (no. 38104-M). Sara Rojas-Dotor, Programa de Posgrado en Ciencias
204 Biológicas UAM-XI, is the recipient of a fellowship from
205 CONACYT and IMSS México City, México. The authors are
206 grateful to laboratory technician José de la Luz Romero-Preciado for
207 the blood donation from the Mexican Institute of Social Security's
208 (IMSS) Centro Médico Nacional Siglo XXI (CMN-SXXI) Blood
209 Bank in Mexico City.

210 References

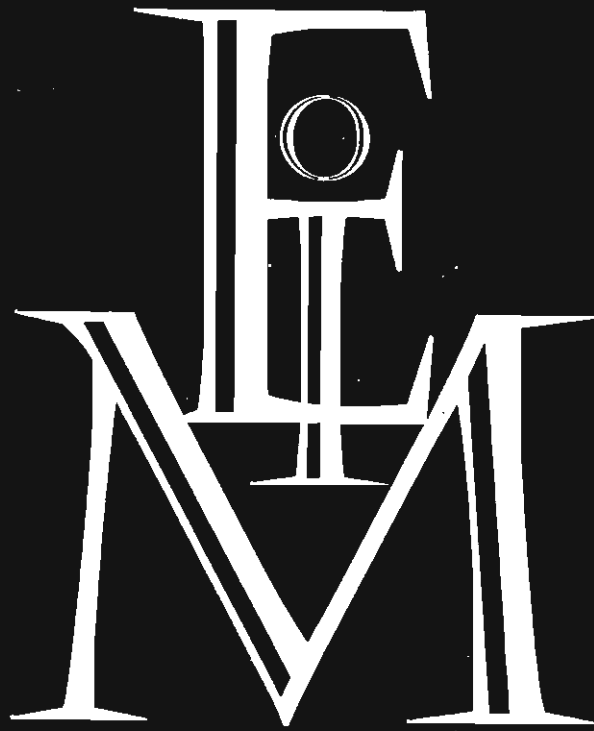
211 Böyum A (1968) Isolation of mononuclear cells and granulocytes
212 from human blood. Scand J Clin Lab Invest 97:77-89

- Chung KF, Patel HJ, Fadlon EJ, Haddad EB, Jose PJ, Mitchell J, 213
Belvisi M (1999) Induction of eotaxin expression and release 214
from human airway smooth muscle cells by IL-1 β and 215
TNF α : effects of IL-10 and corticosteroids. Br J Pharmacol 216
127(5):1145-1150 217
- Denis M, Chadee K (1989) Cytokine activation of murine macro- 218
phages for in vitro killing of *Entamoeba histolytica* tropho- 219
zoites. Infect Immun 57(6):1750-1756 220
- Ebert EC (2000) IL-10 enhances IL-2-induced proliferation and 221
cytotoxicity by human intestinal lymphocytes. Clin Exp Immunol 222
119(3):426-432 223
- Eckmann L, Jung HC, Schurer-Maly C, Panja A, Morzycka- 224
Wroblewska E, Kagnoff MF (1993) Differential cytokine 225
expression by human intestinal epithelial cell lines: regulated 226
expression of interleukin 8. Gastroenterology 105(6):1689- 227
1697 228
- Giménez Scherer JA, Arenas E, Diaz L, Rico G, Fernández J, 229
Kretschmer R (2000) Effect of the monocyte locomotion 230
inhibitory factor (MLIF) produced by *Entamoeba histolytica* on 231
the expression of cell adhesion molecules (CAMs) in the skin 232
of guinea pigs. Arch Med Res 31(4 Suppl):S92-S93 233
- Gimenez Scherer JA, Rico G, Fernández-Diez J, Kretschmer RR 234
(1997) Inhibition of contact cutaneous delayed hypersensitivity 235
reactions to DNBC in guinea pigs by the monocyte locomotion 236
inhibitory factor (MLIF) produced by axenically grown 237
Entamoeba histolytica. Arch Med Res 28:237-238 238
- Kretschmer R, Collado ML, Pacheco MG, Salinas MC, López- 239
Osuna M, Lealón M, Castro EM, Arellano J (1985) Inhibition 240
of human monocyte locomotion by products of axenically 241
grown *Entamoeba histolytica*. Parasite Immunol 7(5):527-543 242
- Rico G, Diaz-Guerra O, Giménez Scherer JA, Kretschmer RR 243
(1992) Effect of the monocyte locomotion inhibitory factor 244
(MLIF) produced by *Entamoeba histolytica* upon the respira- 245
tory burst of human leukocytes. Arch Med Res 23(2):157-159 246
- Rico G, Diaz-Guerra O, Kretschmer RR (1995) Cyclic nucleotide 247
changes induced in human leukocytes by a product of 248
axenically grown *Entamoeba histolytica* that inhibits human 249
monocyte locomotion. Parasitol Res 81(2):158-162 250
- Rico G, Leandro E, Rojas S, Giménez J, Kretschmer RR (2003) The 251
monocyte locomotion inhibitory factor produced by *Entamoeba 252
histolytica* inhibits induced nitric oxide production in human 253
leukocytes. Parasitol Res 90(4):264-267 254
- Romagnani S (2000) T-cell subsets (Th1 versus Th2). Ann Allergy 255
Asthma Immunol 85(1):9-18 256
- Seydel KB, Li E, Swanson PE, Stanley SL (1997) Human intestinal 257
epithelial cells produce proinflammatory cytokines in response 258
to infection in a SCID mouse-human intestinal xenograft 259
model of amebiasis. Infect Immun 65(5):1631-1639 260
- Sinigaglia F, D'Ambrosio D (2000) Regulation of helper T cell 261
differentiation and recruitment in airway inflammation. Am 262
J Respir Crit Care Med 162(4 Pt 2):S157-S160 263
- Staples KJ, Bergmann M, Barnes PJ, Newton R (2000) Stimulus- 264
specific inhibition of IL-5 by cAMP-elevating agents and IL-10 265
reveals differential mechanisms of action. Biochem Biophys 266
Res Commun 273(3):811-815 267
- Utrera-Barillas D, Velázquez JR, Enciso A, Muñoz-Cruz S, Rico G, 268
Curiel-Quesada E, Terán LM, Kretschmer R (2003) An anti- 269
inflammatory oligopeptide produced by *Entamoeba histolytica* 270
down-regulates the expression of pro-inflammatory chemo- 271
kines. Parasite Immunol 25:1-8 272
- Velázquez JR, Kretschmer RR (2004) *Entamoeba histolytica*, a 273
remarkable anti-inflammatory parasite. Immunologia 23:200- 274
206 275
- Walsh JA (1986) Problems in recognition and diagnosis of 276
amebiasis: estimation of the global magnitude of morbidity 277
and mortality. Rev Infect Dis 8(2):228-238 278

#2

Vol.25

abril-junio 2005



*Enfermedades Infecciosas
y Microbiología*

Órgano de la Asociación Mexicana de Infectología y Microbiología Clínica, AC,
de la Asociación Mexicana para el Estudio de las Infecciones Nosocomiales
y del Consejo Mexicano de Certificación en Infectología



www.amimc.org.mx

Revista registrada en LIACS (Literatura Latinoamericana y del Caribe de la Salud), BIBLIOMEX, CENDS, Secretaría de Salud, Subdirección de Investigación IMSS, PUIS, Periódica, Índice de Revistas Latinoamericanas en Ciencias-UNAM, EMBASE, EXCERPTA MEDICA.

ISSN-1870-1388

Citocinas e inflamación

Cytokines and inflammation

Sara Rojas Dator,
 Unidad de Investigación Médica en Inmunología,
 Hospital de Pediatría CYN Siglo XXI IMSS,
 Estudiante inscrita en el Programa de Doctorado de
 Ciencias Biológicas de la UAM

Fecha de aceptación: diciembre 2004

Resumen

La inflamación es una respuesta fisiológica a diferentes estmulos, como infecciones o daño del tejido. Durante la respuesta inflamatoria se producen diferentes mediadores de la inmunidad innata y adaptativa. Estos son producidos por las células cebadas, plaquetas, leucocitos (neutrófilos, monocitos/macrófagos, eosinófilos, basófilos) y linfocitos T.

Los linfocitos T cooperadores (Th1/Th2) son de los principales productores de los mediadores solubles llamados citocinas. Las citocinas y muchas quimiocinas juegan un papel fundamental en el desarrollo de las respuestas inflamatorias. Tienen efectos redundantes y pleiotrópicos que juntos contribuyen a regular la respuesta inflamatoria (síntesis de proteínas de fase aguda, aumento de moléculas de adhesión en el endotelio vascular, inducción de quimiocinas, activación de linfocitos T, activación de linfocitos B), que en conjunto con otros mediadores dirigen y controlan la respuesta inflamatoria.

Las citocinas juegan un papel predominante en infecciones por bacterias, virus, hongos, protozoos. La mayoría de los patógenos intracelulares (*Leishmania*) estimulan la producción de IL-12, producida por los macrófagos que activan la respuesta tipo Th1, pero en algunos casos los patógenos se comportan como inductores de respuestas tipo Th2, la cual está asociada con un aumento en la producción de IL-10 o IL-4 (infecciones bacterianas o víricas), que estimulan la producción de anticuerpos. En la inmunidad en helmintos se desencadena una respuesta Th2 donde participan activamente eosinófilos, células cebadas e inmunoglobulinas IgE.

Palabras clave: *citocinas, inmunidad innata, inmunidad adaptativa, inflamación, leucocitos, linfocitos T, enfermedades infecciosas*

Abstract

Inflammation is a physiological response to different stimulus such as infections or tissue damage. During inflammatory response, several mediators of innate and adaptive immunity are produced. They are synthesized by mast cells, platelets, leukocytes (neutrophils, monocytes/macrophages, eosinophils, basophils and T lymphocytes).

Auxiliary T lymphocytes (Th1/Th2) are the main producers of soluble mediators called cytokines. Cytokines and other chemokines play a major role in the development of inflammatory response. They have both redundant and pleiotropy effect, and they contribute to regulate inflammatory response (acute phase proteins synthesis, increase of adhesion molecules within vascular endothelium, induction of chemokines, activation of T lymphocytes, activation of B lymphocytes increase of the synthesis of immunoglobulins), which together with other mediators direct and control inflammatory response.

Cytokines play a major role for bacterial, virus, fungal and protozoan infections. Most of intracellular pathogens (*Leishmania*) stimulate IL-12 production, produced by macrophages which activates Th1 type response, but in certain cases pathogens act as Th2 type response inductors, which is associated with IL-10 or IL-4 production increase (bacterial or viral infections), which stimulates antibody production. In helminths immunity, Th2 response was triggered when eosinophils, mast cells and immunoglobulins IgE participate actively.

Keywords: *cytokines, innate immunity, adaptive immunity, inflammation, leukocytes, T lymphocytes, infection diseases*

Respuesta inflamatoria

La inflamación es la reacción del organismo frente a la invasión de un agente infeccioso, ante un estímulo antigénico o simplemente en lesiones físicas. Es una respuesta donde se produce un desplazamiento de leucocitos y moléculas plasmáticas hacia las regiones de la infección o de la lesión tisular.

Sus principales efectos son el aumento del flujo sanguíneo hacia la región, el aumento de la permeabilidad vascular frente a las moléculas séricas de gran tamaño y la migración de leucocitos a través del endotelio vascular local en dirección a la zona inflamada. La inflamación está bajo el control de las quimiocinas, los sistemas enzimáticos plasmáticos (complemento, coagulación, fibrinólisis, etc.), las citocinas y los productos de las células cebadas, las plaquetas y los leucocitos.^{1,2}

Las citocinas estimulan la expresión de moléculas de adhesión en las células endoteliales; estas moléculas de adhesión se unen a los leucocitos e inician su atracción hacia las zonas de infección. Los productos microbianos (péptidos con N-formilmetionil), las quimiocinas, los péptidos derivados del complemento (C5a) y los leucotrienos (B4) actúan sobre los leucocitos para estimular su migración y sus funciones microbicidas.

La composición de las células que participan en los procesos inflamatorios se modifica con el tiempo y pasa de rica en neutrófilos a rica en células mononucleares, lo que refleja un cambio en la atracción de los diferentes leucocitos. Los macrófagos atraídos hacia la zona de infección se activan por productos microbianos y por el IFN- γ derivado de los linfocitos NK para fagocitar y dar muerte a los microorganismos.

Moléculas de adhesión

Las principales moléculas de adhesión que han sido identificadas sobre el endotelio son las selectinas E y P, las moléculas de adhesión intercelular (ICAM) y moléculas de adhesión de las células vasculares (VCAM). Tanto las ICAM como las VCAM pertenecen a la superfamilia del gene de las inmunoglobulinas.

Otras moléculas de adhesión que han sido identificadas sobre la membrana de los linfocitos son las integrinas (receptores para ICAM, VCAM) y las L-selectinas (lectinas que se unen a los carbohidratos del endotelio). Una vez que la célula ha abandonado el torrente sanguíneo, su migración es dirigida por quimiocinas (quimioattractantes), pequeñas glicoproteínas (8-14 Kda), a los sitios de infección, promoviendo con ello el estado inflamatorio.^{3,4}

Las quimiocinas regulan efectos proinflamatorios por unión a receptores específicos pertenecientes a la superfamilia de siete receptores transmembrana acoplados a la proteína G, y éstos pueden también ser expresados como marcadores de subpoblaciones Th1/Th2.⁵ En células Th1 son expresados CCR5 y CXCR3, y los marcadores CCR4 y CCR8 en células Th2.⁶ Se ha demostrado que varios receptores de

quimiocinas inflamatorias, como CCR1, CCR2, CCR3, CCR5 Y CXCR3, son poco expresadas después del disparo del receptor de células T (RLT) en células Th1/Th2. En contraste, CCR7, CCR4 y CCR8 son sobrexpresadas con la activación del RLT. Estos cambios en la expresión del receptor de quimiocinas pueden servir para modificar la conducta migratoria de células Th activadas y para establecer la jerarquía de acción entre los distintos receptores de quimiocinas.^{7,8}

Citocinas

Las citocinas son polipéptidos de bajo peso molecular o glucoproteínas que regulan numerosas funciones celulares y permiten señales autócrinas (una citocina particular puede unirse a receptores de la membrana de la misma célula que la secreta), parácrinas (puede unirse a receptores de células blanco cercanas a las células que la producen) y endócrinas (en pocos casos también puede unirse a receptores de células blanco en lugares distantes del cuerpo); contribuyen al lenguaje químico que regula el desarrollo y reparación de tejidos, hematopoyesis, inflamación y la respuesta inmune específica y no específica. Actúan sobre muchos blancos celulares (pleiotropismo) y frecuentemente afectan la acción de otras citocinas de una manera aditiva, sinérgica o antagónica.⁹

A pesar de que son muchas y muy diversas las proteínas designadas citocinas, comparten ciertas propiedades que les permiten agruparse como tales. Entre esas propiedades se encuentran las siguientes:

- a) se producen durante la fase efectora de la inmunidad específica o inespecífica, desencadenan mecanismos inflamatorios y los regulan
- b) su secreción es autolimitada y de poca duración
- c) muchas citocinas individuales pueden producirse por diversos tipos celulares
- d) actúan sobre distintas células u órganos blanco
- e) pueden tener diferentes efectos sobre una misma célula blanco
- f) varias citocinas pueden tener el mismo efecto sobre la misma célula (redundante)
- g) pueden influir sobre la síntesis y efectos de otras citocinas
- h) sus efectos se inician cuando son captadas por un receptor específico en la membrana de las células blanco
- i) la expresión de sus receptores es regulada por diversas señales incluyendo a otras citocinas la mayoría de las repuestas a citocinas implica biosíntesis de novo de RNAm y proteínas
- j) para muchas células blanco, las citocinas actúan como factores de crecimiento.^{10,11}

Funciones de las citocinas

Las citocinas se pueden dividir en tres grandes grupos funcionales: las que participan en la respuesta inmune innata, las que participan en la respuesta inmune adaptativa y factores estimuladores de la hematopoyesis.

Factores reguladores de la respuesta inmune innata

Son producidos principalmente por células mononucleares en respuesta a agentes infecciosos. Los productos bacterianos como lipopolisacáridos (LPS) y los víricos como el ARN bicatenario estimulan directamente a los macrófagos para que secreten citocinas. La mayoría de los miembros de este grupo de citocinas actúa sobre las células endoteliales para que expresen receptores de superficie —como las selectinas o integrinas—, que son reconocidos por los leucocitos para ser retenidos por las células endoteliales y para acudir a los sitios donde se encuentra el agente extraño, y que permiten estimular y regular las reacciones inflamatorias agudas contra los microorganismos.

Factores reguladores de la respuesta inmune adaptativa

Son sintetizados por linfocitos T en respuesta al reconocimiento específico de antígenos extraños. Estas citocinas atraen, activan y regulan linfocitos T y otras células especializadas, como los fagocitos mononucleares, los neutrófilos y los eosinófilos, para eliminar antígenos en la fase efectora.

Factores estimuladores de la hematopoyesis

Son producidos por células del estroma, médula ósea, los leucocitos y otras células, y estimulan el crecimiento y la diferenciación de las células inmaduras. En general, las citocinas de la inmunidad innata y de la adaptativa son producidas por diferentes poblaciones celulares que actúan en distintas células blanco (ver Cuadro 1).

Cuadro 1

CITOCINAS DE LA INMUNIDAD INNATA Y ADAPTATIVA		
CARACTERÍSTICAS	INMUNIDAD INNATA	INMUNIDAD ADAPTATIVA
Citocinas	TNF- α , IL-1, IL-12, IFN- γ	IL-2, IL-4, IFN- γ
Principal fuente celular	macrófagos, células NK	linfocitos T
Principales funciones fisiológicas	mediadores de la inmunidad innata e inflamación (local y sistémica)	mediadores de la inmunidad adaptativa, regulación de crecimiento de linfocitos y diferenciación y activación de células efectoras, macrófagos, células cebadas
Cantidades producidas	detectable en suero	no detectable en suero
Efectos locales o sistémicos	ambos	solo locales
Enfermedad	choque séptico (sistémico)	inflamación granulomatosa (local)
Inhibidores	corticosteroides	ciclosporinas

IL=interleucinas, IFN- γ =interferón gamma; TNF=factor de necrosis tumoral
•El IFN- γ es importante tanto en la inmunidad innata como en la adaptativa

Las citocinas también han sido clasificadas en función de su respuesta biológica o de acuerdo al receptor al cual se unen. De acuerdo con su función

biológica, se clasifican en citocinas proinflamatorias —como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), interleucina 1 beta (IL-1 β), interleucina 6 (IL-6)— y antiinflamatorias, como interleucina 10 (IL-10), interleucina 4 (IL-4), interleucina 13 (IL-13), etc.

El TNF es la citocina primaria en la respuesta inflamatoria. Existen dos formas con un 50% de homología: TNF- α y TNF- β . El primero es producido por monocitos/macrófagos, fibroblastos, células B y células T; esta citocina promueve la inflamación al inducir la producción de IL-1 e IL-6.

IL-1 es una citocina proinflamatoria prototipo, mediadora de la inflamación, ya que en general inicia o incrementa una gran variedad de genes que se expresan durante la inflamación, particularmente de otras citocinas como IL-6 y TNF- α . La familia de IL-1 está constituida por tres miembros, dos de los cuales (IL-1 α e IL-1 β) son potentes activadores de las células. El tercer miembro de esta familia es el receptor antagonista de la IL-1 (IL-1Ra), el antagonista natural del efecto inducido por la IL-1; esta citocina es clave en la respuesta del organismo contra la invasión de microorganismos, inflamación, reacciones inmunológicas y daño a tejidos; es producida por macrófagos, células endoteliales y células T que han sido activadas.

IL-6 es una citocina secundaria en la respuesta inflamatoria y muestra propiedades tanto proinflamatorias como antiinflamatorias; es producida por células T, monocitos/macrófagos, células endoteliales, células de la glía y astrocitos. La expresión de IL-6 es regulada positivamente por la IL-1, así como por el TNF- α ; de esta manera, IL-6 inhibe la producción y secreción de IL-1 y TNF- α , de tal forma que IL-6 es considerada como un mediador importante de las reacciones de fase aguda.

La IL-10 es un inhibidor de la activación de los linfocitos T y de la secreción de IL-12 (estímulo crítico para la secreción de IFN- γ e inductor de las reacciones inmunitarias innatas y celulares frente a los microorganismos intracelulares). Los ratones que no producen IL-10 presentan una inflamación excesiva, probablemente como consecuencia de una activación incontrolada de células inflamatorias.

La IL-4 es un potente inductor del desarrollo de células Th2 y simultáneamente un poderoso inhibidor del desarrollo de células Th1. Estimula el cambio de isotipo en linfocitos B a ciertas clases de inmunoglobulinas, sobre todo la IgE, e inhibe la activación de macrófagos inducida por IFN- γ .

La IL-13 inhibe la activación de macrófagos, es antagonista principal de IFN- γ , estimula la producción de moco por las células epiteliales pulmonares y puede intervenir en patologías como el asma.^{12 13 14}

Receptores de citocinas

Las citocinas regulan sus acciones por unión a receptores de alta afinidad como los miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas; clase I y II, receptores para el factor de necrosis tumoral (TNF), receptores γ helicoidales de siete proteínas

transmembrana (receptores que cruzan siete veces la membrana celular). Los receptores se encuentran acoplados a proteínas G, o algunos tienen actividad de tirocincinasa. La interacción ligando-receptor trae como consecuencia la activación de factores de transcripción como el Jak/STAT. Los diferentes receptores de citocinas están compuestos de cadenas que se unen a citocinas específicas (cadena alfa) y que se asocian mediante enlaces no covalentes a subunidades productoras de señales que comparten receptores de diferentes citocinas (TNF, IL-1, quimiocinas). La Figura 1 muestra receptores de citocinas de cada grupo.

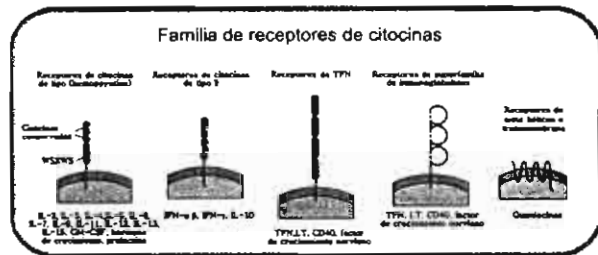


Figura 1. Receptores de las diferentes familias de citocinas: se clasifican en función de los dominios extracelulares conservados. Se muestran las citocinas u otros ligandos que se unen a cada familia de receptores. (WSXWS: triptófano-serina-X triptófano-serina).

Respuestas tipo Th1 o Th2

Si los antígenos extraños logran invadir el organismo, desencadenan una respuesta celular tipo Th1 TCD4 que será predominante y producirá linfocinas capaces de reclutar células fagocíticas al lugar de la infección e inflamación y de activarlas para potenciar su acción (factor activador de macrófagos (MAF), factor inhibidor de la migración (MIF)).¹⁵

Este proceso de reclutamiento celular es crucial para la defensa del organismo contra virus, hongos y otros microorganismos con replicación intracelular. Las células Th1 pueden también activar los linfocitos T CD8 citotóxicos para actuar directamente en la destrucción de las células infectadas por patógenos intracelulares. De la misma manera, a través del mecanismo de defensa celular se producen células de memoria que completan su diferenciación ante un nuevo contacto con el mismo agente patógeno, iniciándose así una respuesta de memoria, y en consecuencia una respuesta más intensa.

Desde el punto de vista de su participación en mecanismos de daño tisular, las citocinas que participan en la inmunidad natural conducen a las células efectoras de la inflamación a reaccionar en forma inespecífica en respuesta a un antígeno, con participación mínima o nula de anticuerpos específicos. Las células T que producen este tipo de respuesta se conocen como células T del tipo Th1 y se distinguen de la tipo Th2 porque estas últimas producen primordialmente las citocinas que regulan la inflamación con especificidad inmunológica, en la que participan los anticuerpos como protagonistas.

En el caso de una respuesta inmunológica se activan ambos tipos de célula, pero tiende a existir

predominio de una de las dos formas de respuesta, ya que uno y otro tipo de células producen citocinas que mutuamente pueden inhibir sus funciones (citocinas tipo Th1 como el IFN- γ inhiben la IL-10 citocina Th2, y viceversa). Cuando se pierde el balance entre la actividad de uno y otro tipo de células, estos circuitos inhibitorios determinan que exista predominio franco de uno de los dos tipos de respuesta (ver Figura 2). Estas proteínas regulan procesos como el crecimiento, activación celular, inflamación, respuesta inmune, reparación tisular y fibrosis.^{16, 17}

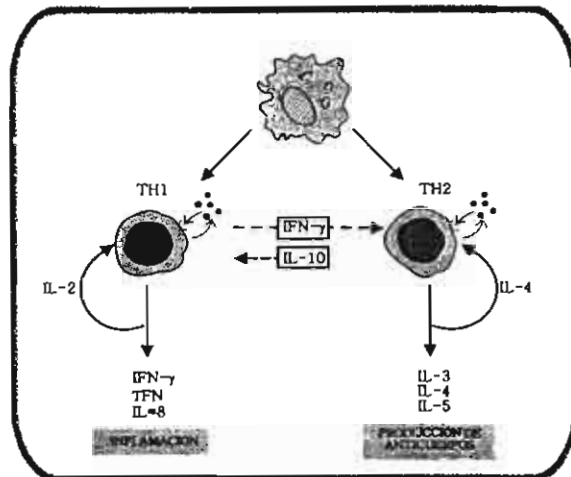


Figura 2. Las células presentadoras de antígeno (CPA) establecen comunicación con dos tipos de células T cooperadoras: las células Th1 y las Th2. Las primeras producen las citocinas responsables de los fenómenos inflamatorios, como IFN- γ , TNF- α e IL-2. Las células Th2 producen citocinas involucradas en la producción de anticuerpos. El balance de la activación de unas y otras mantenido por el IFN- γ y la IL-10, determina la forma de expresión de la respuesta inmune.

Recientemente se ha visto que la acción combinada de cuatro citocinas (IFN- γ , TNF- α , IL-2 e IL-6) determina la activación de la mayoría de los linfocitos T periféricos al promover una elevación sostenida de Ca^{2+} intracelular por medio de dos caminos de señalización independientes.^{18, 19} La interleucina 10 es una citocina reguladora que inhibe la presentación del antígeno y la subsecuente producción de citocinas antiinflamatorias.^{19, 20, 21} Las células Th1 son consideradas esencialmente proinflamatorias y las Th2 depresoras de la inflamación. Sin embargo, las células Th2 también sintetizan citocinas que dirigen las células B hacia su diferenciación, promoviendo así la producción de anticuerpos.

Complemento

El sistema del complemento consta de varias proteínas plasmáticas (inmunoglobulinas o anticuerpos Ig), que son activadas por los microorganismos y favorecen su destrucción y la inflamación. El reconocimiento de los microorganismos por el complemento se da en tres formas. La *via clásica* —denominada así porque se descubrió en primer lugar— usa una proteína plasmática llamada C1 para detectar anticuerpos IGM, IgG1 o IgG3 unidos a la superficie de un microorganismo o de otra estructura. La *via alterna* se activa por el reconocimiento directo de ciertas estructuras de la superficie de los microorganismos y por ello forma

parte de la inmunidad innata. La *vía de la lectina* se activa por una proteína plasmática llamada lectina fijadora de manosa (MBL), que reconoce los residuos de manosa terminales situados en las glucoproteínas y glucolípidos microbianos.

El sistema del complemento activado desencadena la síntesis de C3b y culmina con la producción de péptidos que amplifican la inflamación como C5a y C5a-des-Arg y por otra parte se forma el complejo de ataque a la membrana.^{2, 7, 8}

La principal función de la inmunidad celular es activar los macrófagos para destruir los microorganismos intracelulares. Por otro lado, muchos microorganismos intracelulares que penetran en la sangre activan proteínas circulantes del complemento, lo que a su vez incrementa la producción de anticuerpos por los linfocitos B. Esta respuesta inmunitaria humoral elimina microorganismos extracelulares. Por lo tanto, la cooperación entre la inmunidad innata y la adaptativa es bidireccional, de modo que cada una se apoya en los componentes de la otra para optimizar la defensa del huésped frente a las infecciones.²²

Citocinas en infecciones

Las citocinas son los principales mediadores de la inflamación de muchas patologías como artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, asma y alergias.^{23, 24, 25, 26} La defensa del huésped contra patógenos infecciosos es altamente mediada por mecanismos dependientes de inmunidad humoral o celular. Cada mecanismo actúa preferentemente contra patógenos intra o extracelulares, virus o helmintos. Estas repuestas de defensa del huésped son estrictamente reguladas por citocinas T cooperadoras Th1 y Th2.²⁷

Las bacterias extracelulares patógenas, como *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus pyogenes*, *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Clostridium tetani*, *Neisseria meningitidis*, provocan una inflamación que lleva a la destrucción del tejido en el foco de la infección; de esta forma los cocos piógenos (formadores de pus) originan diversas infecciones en el humano. Muchas de estas bacterias producen toxinas (endotoxinas o exotoxinas componentes de las paredes celulares que ejercen efectos patológicos). La endotoxina de las bacterias gramnegativas (LPS) es un potente activador de macrófagos y activa la vía alterna del complemento, lo que provoca opsonización (fagocitosis bacteriana por macrófagos). El complejo de ataque a la membrana lisa y a las bacterias, en especial las clases de *Neisseria* y los productos de degradación del complemento, participan en las respuestas inflamatorias a través de la activación de los leucocitos. Los antígenos proteicos de las bacterias extracelulares activan los linfocitos T para producir IFN- γ ; el TNF y la linfoxina desencadenan la inflamación para activar macrófagos.

Las bacterias intracelulares tienen la capacidad de sobrevivir e incluso replicarse en el interior de los fagocitos. Los fagocitos (neutrófilos, macrófagos) ingieren e intentan destruir a estos microorganismos,

pero las bacterias intracelulares resisten la degradación enzimática. Estas bacterias activan a los macrófagos a sintetizar IL-12 citocina inductora de linfocitos NK, que sintetizan IFN- γ , que a su vez activa a los macrófagos a favorecer la eliminación de las bacterias fagocitadas. Por otro lado, los linfocitos Th1 expresan ligandos de CD40 y secretan IFN- γ , moléculas que estimulan a los macrófagos a producir sustancias microbicidas como intermediarios reactivos del oxígeno, óxido nítrico y enzimas lisosómicas (infecciones por *Toxoplasma gondii*, *Leishmania major* y *Listeria monocytogenes*).^{28, 29, 30, 31, 32}

Sin embargo, la *Listeria monocytogenes* (bacteria intracelular facultativa) produce una proteína, la hemolisina, que permite que las bacterias escapen a los fagolisosomas de los macrófagos y pasen al citoplasma, donde encuentran protección frente a los mecanismos microbicidas de los macrófagos (intermediarios reactivos del oxígeno), por lo que los linfocitos T CD8+ se activan y actúan eliminando los macrófagos que contienen bacterias en su citoplasma.

En la lepra lepromatosa existen títulos elevados de anticuerpos específicos contra los antígenos de *M. leprae*, pero sus respuestas celulares son débiles. Las micobacterias proliferan en el interior de los macrófagos, dando lugar a lesiones destructivas de la piel y de los tejidos subyacentes. Por otro lado, la lepra *tuberculoide* presenta inmunidad celular potente pero sus títulos de anticuerpos son bajos. Este patrón inmunitario se refleja en el desarrollo de granulomas tuberculoideos que se forman alrededor de los fascículos nerviosos produciendo alteraciones de los nervios sensitivos. Una explicación entre ambas formas de enfermedad producida por el mismo microorganismo podría ser la existencia de distintos patrones de diferenciación de linfocitos T y de síntesis de citocinas. Estudios en pacientes con la forma tuberculoide de la enfermedad producen IFN- γ e IL-2 en las lesiones (activación de los linfocitos Th1), mientras aquellos con lepra lepromatosa sintetizan más IL-4 e IL-10 (linfocitos Th2).

Las infecciones por hongos, también llamadas micosis, son una causa importante de morbilidad y mortalidad en el ser humano. Los principales mediadores de la inmunidad innata frente a los hongos son los neutrófilos y los macrófagos. Las cepas virulentas de *Cryptococcus neoformans* inhiben la síntesis de ciertas citocinas como TNF e IL-12 por macrófagos y estimulan la producción de IL-10, que contrarresta los macrófagos. *Histoplasma capsulatum*, parásito intracelular facultativo que reside en los macrófagos, se elimina con los mismos mecanismos que son eficientes contra las bacterias intracelulares. Los linfocitos T CD4+ y CD8+ colaboran para eliminar las levaduras de *Cryptococcus neoformans*, que tienden a colonizar los pulmones y el encéfalo de pacientes inmunodeprimidos. Las infecciones por *Candida albicans* empiezan en las superficies mucosas y la inmunidad celular (respuesta TH1) evita la propagación de los hongos a los tejidos.^{33, 34}

Muchas de las infecciones por virus se asocian a la producción de IFN- γ y α , así como a la activación de células NK. RNA bicatenario producido durante el ciclo de vida viral induce la expresión de IFN- γ y α

por las células infectadas, probablemente a través de receptores tipo Toll. La función del IFN de tipo 1 consiste en inhibir la replicación de los virus tanto en las células infectadas como en las no infectadas, induciendo un estado "antivírico"; los linfocitos NK destruyen las células infectadas por distintos virus en las primeras etapas de la infección.

Los pacientes inmunodeprimidos que se infectan con el virus de la hepatitis B no manifiestan la enfermedad, sino que se convierten en portadores capaces de transmitir la infección a personas sanas. Los poxvirus codifican moléculas que se unen a varias citocinas como IFN- γ , TNF, IL-1, IL-8 y quimiocinas, y estas moléculas son secretadas por las células infectadas. Las proteínas unidas a las citocinas secretadas pueden actuar como antagonistas competitivos de estas citocinas. Algunos citomegalovirus producen una molécula homóloga a la proteína del complejo mayor de histocompatibilidad clase I y pueden competir por la unión y presentación de los antígenos peptídicos. El virus de Epstein-Barr elabora una proteína homóloga a la citocina supresora de los macrófagos IL-10, capaz de inhibir la función de estas células y la inmunidad celular.^{35, 36}

Los virus pueden infectar e inactivar las células inmunocompetentes, como pasa en el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), que sobrevive infectando y eliminando los linfocitos T CD4+, que son los reguladores esenciales de las respuestas inmunitarias frente a los antígenos proteicos.³⁷

Las infecciones parasitarias son producidas por parásitos animales como protozoos, helmintos y ectoparásitos (garrapatas, ácaros). La mayoría de los parásitos tienen ciclos vitales complejos, parte de los cuales tiene lugar en el humano o en otros vertebrados, mientras que el resto depende de huéspedes intermediarios como moscas, garrapatas o caracoles. La respuesta innata más importante frente a los protozoos es la fagocitosis, pero muchos de estos parásitos resisten este tipo de eliminación e incluso pueden replicarse en el interior de los macrófagos.³⁸

Los parásitos que viven dentro de los macrófagos son eliminados cuando las células huésped son activadas por IFN- γ . El ejemplo mejor estudiado es la *Leishmania major* en el ratón, en la cual IFN- γ se asocia claramente con la recuperación o la resistencia e IL-4 con exacerbación de la infección o susceptibilidad. De manera similar, IFN- γ se correlaciona con la inmunidad en ratones infectados con *Trypanosoma cruzi* o *Toxoplasma gondii*, a pesar de que aquí la situación no está clara. Tradicionalmente se ha aceptado que la inmunidad en helmintos involucra eosinófilos, células cebadas e inmunoglobulinas E (IgE), dependientes de las células Th2. En ratones infectados con *Trichuris muris* éste parece ser el caso, y se ha sugerido que es la respuesta protectora de las células Th2 predominante en los roedores infectados con *Nippostrongylus brasiliensis*, *Heligmosomoides polygyrus* y *Trichenella spiralis*.

La situación ha cambiado para hacerse más

complicada que esto. Ahora se sabe que, en infecciones con *Trichenella spiralis*, la respuestas de las células Th1/Th2 ocurren simultáneamente pero en distintos sitios, y que IL-10 inhibe la producción de IFN- γ , lo cual también ocurre en infecciones por *Nippostrongylus brasiliensis*. De manera global, las repuestas de las células Th2 son protectoras en infecciones de *Heligmosomoides polygyrus*, son neutrales en *Nippostrongylus brasiliensis* y bloquean las respuestas protectoras en infecciones con *Trichenella spiralis*. En *schistosomiasis*, estudios *in vitro* y modelos en rata se ha sugerido la participación de los eosinófilos e IgE, pero estudios detallados de las citocinas involucradas sugieren que, en roedores, estas células y moléculas tienen poca función protectora; no obstante, en humanos pudiera ser diferente.^{39, 40}

Las moléculas efectoras asociadas con Th1 son mayoritariamente productos de los macrófagos, intermediarios reactivos del oxígeno (ROI), del nitrógeno (RNI) y del TNF, con o sin la participación de IFN- γ . No obstante, dichas moléculas pueden ser peligrosas y se sabe que contribuyen a la patología asociada con varias infecciones parasitarias.

Referencias

1. Abbas A, Lichtman A. *Cellular and molecular immunology*. 5th ed. Saunders Elsevier, USA 2004: 243-274
2. Roitt. *Immunology*. 5th ed., Mosby, London UK, 1998; 61-9.
3. Niederlova J, Koubek K. *Chemokines and chemokine receptors*. *Sb Lek* 1999; 100 (3): 169-189
4. Sinigaglia F, D'Ambrosio D. *Regulation of helper T cell differentiation and recruitment in airway inflammation*. *Am J Resp Crit Care Med* 2000; 162: 5157-5160
5. Mosmann T and Fong T. *Specific assays for cytokine production by T cells*. *J. Immunol Meth* 1989; 116: 151-158
6. Sallusto F, Lening D, Mackay C, Lanzavecchia A. *Flexible Programs of chemokine receptor expression on human polarized T helper 1 and 2 lymphocytes*. *J Exp Med* 1998; 187-193
7. Loetscher P, Ugucioni M, Bordoli L, Baggiolini M, Moser B, Chizzolini C, Dayer JM. *CCR5 is characteristic of Th1 lymphocytes*. *Nature* 1998; 39: 344-345
8. Zingoni A, Soto H, Hedrick J et al. *Cutting Edge: The chemokine receptor CCR8 is preferentially expressed in Th2 but not Th1 cells*. *The J Immunol* 1998; 161: 547-551
9. Kubly J. *Immunology*. 4th ed. Freeman, USA 2001: 320-326
10. Vilches C, and Parhan P. *Diverse, rapidly evolving receptors of innate and adaptive immunity*. *Ann Rev Immunol* 2002; 20: 217-251
11. Alexander WS. *Suppressors of cytokine signalling (SOCS) in the immune system*. *Nature Rev Immunol* 2002; 2: 410-416
12. De Groote D, Zangerle P, Gevaert Y et al. *Direct stimulation of cytokines (IL-1 α , TNF- α , IL-6, IL-2, IFN- γ and GM-CSF) in whole blood, I. Comparison with isolated PBMC stimulation*. *Cytokine* 1992; 4: 239-248
13. Koos K, Satsangi J, Fanning G et al. *Cytokine (TNF- α , LT- α and IL-10 polymorphisms in inflammatory bowel diseases and normal controls: Differential effects on production and allele frequencies*. *Genes Immunity* 2000; 1: 185-190
14. Lingnau K, Hoehn P, Kerdine S et al. *IL-4 in combination with TGF- β favors an alternative pathway of Th1 development independent of IL-12*. *J Immunol* 1998; 161: 4709-4718
15. Griffiths G. *The cell biology of CTL killing*. *Curr Opin Immunol* 1995; 7: 343-348
16. Shimada T, Terano A. *Chemokine expression in Helicobacter pylori infected gastric mucosa*. *J Gastroenterol* 1998; 33: 613-617
17. Ishihara S, Fukuda R, Fukumoto S. *Cytokine gene expression in the gastric mucosa*. *J Gastroenterol* 1996; 31: 485-490
18. Martino G, Grohovaz F, Brambilla E et al. *Pro-inflammatory cytokines regulate antigen-independent T cell activation by two separate calcium-signaling pathways in multiple sclerosis patients*. *Ann Neurol* 1998; 43: 340-349
19. Nelson B, Willerford D. *Biology of the interleukin-2 receptor*. *Ad Immunol* 1998; 70: 1-81
20. Li M, He S. *IL-10 and related cytokines for treatment of inflammatory bowel disease*. *World J Gastroenterol* 2004; 10 (5): 620-625
21. Moore K, Malefy R de W, Coffman O, Garra A. *Interleukin-10 and Interleukin-10 receptor*. *Ann Rev Immunol* 2001; 19: 683-685
22. Tomlinson S. *Complement defense mechanisms*. *Curr Opin Immunol* 1993; 5: 83-87
23. Ruschpler P, Stiehl P. *Shift in Th1 (IL-2 and IFN- γ) and Th2 (IL-10 and IL-4) cytokine mRNA balance within two new histological main-types of rheumatoid-arthritis (RA)*. *Cell Mol Biol* 2002; 48 (3): 285-293
24. Ivashkiv L. *Type I interferon modulation of cellular responses to cytokines and infectious pathogens: Potential role in SLE pathogenesis*. *Autoimmunity*. 2003; Dec; 36 (8): 473-479
25. D'Ambrosio D, Panina-Bordignon P, Sinigaglia F. *Chemokine receptors in inflammation: An overview*. *J Immunol Meth* 2003; 273 (1-2): 3-13
26. D'Ambrosio D. *Role of chemokine receptors in allergic inflammation and new potential of treatment of bronchial asthma*. *Rec Prog Med* 2002; 93 (6): 346-350
27. Kawakami K. *Interleukin-18 and host defense against infectious pathogens*. *J Immunother* 2002; 1: S12-19
28. Raupach B and Kaufmann SHE. *Immune responses to intracellular bacteria*. *Curr Opin Immunol* 2001; 13: 417-428
29. Schaible UE, Collins HL, Kaufmann SHE. *Confrontation between intracellular bacteria and the immune system*. *Adv Immunology* 1999; 71: 267-377
30. Liew FY, Millott S, Parkinson C, Palmer RMJ, Moncada S. *Macrophage killing of Leishmania parasite in vivo is mediated by nitric oxide from L-arginine*. *J Immunology* 1990; 144: 4794-4797
31. Hayashi S, Chan CH, Gazzinelli R, Roberge FG. *Contribution of nitric oxide to the host parasite equilibrium in toxoplasmosis*. *J Immunology* 1995; 156: 1476-1481
32. Ding AH, Nathan CF, Stuehr DJ. *Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages*. *J Immunology* 1988; 141: 2407-2412
33. Romani L, Howard D. *Mechanism of resistance to fungal infections*. *Curr Opin Immunology* 1995; 7: 517-523
34. Seder RA, Gazzinelli RT. *Cytokines are critical in linking the innate and adaptive immune responses to bacterial, fungal and parasitic infection*. *Adv Inter Med* 1998; 44: 144-179
35. Spriggs MK. *One step ahead of the game: Viral immunomodulatory molecules*. *Ann Rev Immunology* 1996; 14: 101-130
36. Tortorella D, Gewurz BE, Furman MH, Schust DJ, Ploegh HL. *Viral subversion of the immune system*. *Ann Rev Immunology* 2000; 18: 861-926
37. Zinkernagel RM. *Immunology taught by viruses*. *Science* 1996; 271: 173-178
38. Power CA. *Factors that influence T helper cell response to infection*. *Curr Opin Infect* 2000; 13: 209-213
39. Turk JL, Bryceson ADM. *Immunologic phenomena in leprosy and related diseases*. *Adv Immunol* 1971; 13: 209-266
40. Cox FEG, Liew EY. *T-cell subset and cytokines in parasitic infections*. *Parasitol Today* 1992; 11: 371-374