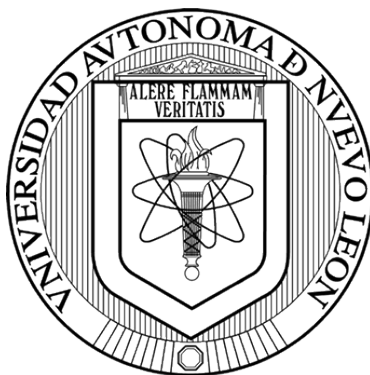


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**ESTUDIO DE LA FORMACIÓN DE LAS CÉLULAS ESPUMOSAS EN EL
ACTINOMICETOMA EXPERIMENTAL INDUCIDO POR
Nocardia brasiliensis.**

Por

ELISABETH DIVERA ALIDA CATHARINA MEESTER

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

Monterrey, Nuevo León, Diciembre 2012

ESTUDIO DE LA FORMACIÓN DE LAS CÉLULAS ESPUMOSAS EN EL
ACTINOMICETOMA EXPERIMENTAL INDUCIDO POR
Nocardia brasiliensis.

Aprobación de la Tesis:



DR. MARIO CÉSAR SALINAS CARMONA
Director de Tesis



DR. ADRIÁN GEOVANNI ROSAS TARACO
Co-director de Tesis



DRA. LUZ ISABEL PÉREZ RIVERA
Comisión de Tesis



DR. JULIO SEPÚLVEDA SAAVEDRA
Comisión de Tesis



DR. BRUNO ALFONSO ESCALANTE ACOSTA
Comisión de Tesis



DR. GERARDO ENRIQUE MUÑOZ MALDONADO
Subdirector de Estudios de Posgrado

**ESTUDIO DE LA FORMACIÓN DE LAS CÉLULAS ESPUMOSAS EN EL
ACTINOMICETOMA EXPERIMENTAL INDUCIDO POR
Nocardia brasiliensis.**

Presentado por: Elisabeth Divera Alidad Catharina Meester

Este trabajo se realizó en el Departamento de Inmunología de la Facultad de Medicina y Hospital Universitario de la Universidad Autónoma de Nuevo León , bajo la dirección del Dr. Mario César Salinas Carmona y la co-dirección del Dr. Adrián Geovanni Rosas Taraco, con el apoyo de CONACYT (SEP Ciencias Básicas 2008 – 99149).

DEDICATORIA

A mi familia.

*Rétame y lucharemos
Ayúdame y brillaremos*

AGRADECIMIENTOS

MUCHAS GRACIAS A:

Dra. Herminia, agradezco muchísimo lo que Ud. ha hecho para mí. Me ha enseñado enfrentar procesos difíciles con confianza, una actitud positiva y una sonrisa. Le admiro como científica y como persona.

Dr. Mario César Salinas Carmona, por haberme dado la oportunidad de realizar un sueño guardado por años y haberme apoyado en momentos críticos. También por regañarme cuando no me exigí suficiente. Las clases más hermosas fueron cuando Ud. enseñó lo que le apasiona.

Dr. Adrián Geovanni Rosas Taraco, por haber sido el principal guía y apoyo en el proyecto de investigación. Estás hecho de SNI 3.

Dra. Luz Isabel Pérez Rivera y Dra. Anna Velia Vázquez Marmolejo, por su apoyo mental en ratos difíciles y unos cursos memorables en los cuales el conocimiento fue transferido casi tan natural como unos padres que enseñan a sus hijos.

QFB Patricia Alejandra Gallegos, por su ayuda con la parte microbiológica y facilitarme tantas cosas que te volviste una de los principales pilares de apoyo durante mis estudios de doctorado.

M.C. Viktor Romero, Dr. Juan Carlos Segoviano Ramírez, y Dr. Julio Sepúlveda por su excelente trabajo en la parte histológica del proyecto.

Dr. Francisco Hernández, por funcionar como psicólogo personal en el inicio difícil. Tu manera tranquila de afrontar contratiempos y tu disposición enorme de ayudar a la gente fueron una gran lección. Espero que recibas lo que mereces.

Sr. Reynaldo Rodríguez por cuidar bien a los ratoncillos, tan importante en mi proyecto.

Dra. Alma Yolanda Arce Mendoza, Dr. Ernesto Torres López, Dr. Carlos Medina y Dra. Ángeles Castro, porque siempre tenían tiempo para atender mis dudas y estaban dispuestos para aconsejarme. También a los demás maestr@s del posgrado, he aprendido mucho de Uds.

M.C. Pilar del Carmen Claudio San Román, MVZ Heidi Giselle Rodríguez González, Dr. Humberto Treviño, Dra. María Rocha, Dra. Lourdes González, Dr. Igor Medina, y otros compañeros del Posgrado en Ciencias de la Facultad, actuales y del pasado, por su amistad. Espero que me perdonen mi actitud crítica para que prevalezca la amistad y el apoyo mutuo más allá del posgrado.

QFB Andrés Mendiola por facilitar amablemente equipo y a reactivos para el proyecto o prácticas de los cursos.

Todo lo demás personal del departamento de Inmunología, Diana, Wendy, Alberto, Abraham, Paty, Lizy, Brenda, Lupita, Gloria, Isary, Franky, Alejandro; su trabajo hice que fluyeron las cosas.

Los estudiantes, (pre)becarios y de servicio social o tesis, que se encargaron de un ambiente jovial y alegre en el departamento.

El departamento de Hematología por permitir el uso del citómetro.

Uniparts, por el préstamo del magneto, y en especial a la QPB Cecilia Martínez por su trato cooperativo y amable. ¡Gracias!

CONACYT, por el apoyo financiero del proyecto, SEP-CB-2008-99149, y la beca de manutención, 229067.

Emilia Solís, por ser la mejor mamá sustituta para Nikita y Max. Sin ti no podría haberme ido tranquilamente tantas horas de casa. Sin duda fuiste el apoyo principal en este proyecto. Igual agradezco mucho al abuelito, Don Manuel Solís Guerrero, por siempre poder contar con Ud. cuando fue necesario.

De Faculteit van Aard- en Levenswetenschappen van de Vrije Universiteit in Amsterdam, voor de goede wetenschappelijke opleiding die ik daar genoot. In speciaal wil ik Dr. B. Oudega, Dr. J. van Minnen, en Marja Ramkema bedanken. Verder heb ik mooie herinneringen aan 'onze' biologenclub. En natuurlijk neem jij, Leonie, een heel speciale plaats in. Het was een mooie tijd, waar ik graag aan terug denk.

Mijn familia in Nederland, pappa, mamma, Mariska, Ad, Marije, Tamara, Denise, Jan, Pauline, Corine, broer Jan, Claudia, Dick, Kim, Anouk, Britt, Cor, Ruud en Natalie; hoewel ik ver weg ben en we elkaar te weinig zien of spreken weet ik dat ik immer en altijd op jullie steun kan rekenen, en dat vertrouwen gaf en geeft me de moed om risico's te nemen. Jullie zijn heel belangrijk voor me.

Nikita y Max, ustedes son el más apreciado regalo de mi vida. Aguantaron muy bien mi poca presencia. Espero que Uds. también busquen realizar sus sueños.

Manuel, mi gran amor, por dar sentido a mi vida.

CONTENIDO

Capítulo		Página
	LISTA DE FIGURAS.	xii
	LISTA DE TABLAS.. . . .	xiii
	ABREVIATURAS.	xiv
	RESUMEN.	xviii
1	INTRODUCCIÓN.	1
1.1	El actinomicetoma por <i>Nocardia brasiliensis</i>	1
1.1.1	<i>Nocardia brasiliensis</i>	1
1.1.1.1	De saprófito a patógeno facultativo.	1
1.1.1.2	Taxonomía e identificación.	1
1.1.1.3	Factores de virulencia.	4
1.1.2	Actinomicetoma.	6
1.1.3	Modelo experimental del actinomicetoma.	8
1.2	El sistema inmune.	9
1.2.1	Organización y función.	9
1.2.2	Macrófagos y células dendríticas.	13
1.2.2.1	Tipos de macrófagos.	16
1.2.2.2	Tipos de células dendríticas.	17

1.2.3	Citocinas.	19
1.2.3.1	M-CSF y GM-CSF.	20
1.2.3.2	IL-4 e IL-13.	24
1.3	Células espumosas.	25
1.3.1	Células espumosas en enfermedades humanas.	25
1.3.2	Células espumosas en el actinomicetoma experimental.	27
1.3.3	Posibles precursores de las células espumosas.	27
1.3.4	Proceso de conversión en células espumosas.. . . .	28
2	JUSTIFICACIÓN.	31
3	HIPÓTESIS.	32
4	OBJETIVOS.. . . .	33
4.1	Objetivo general.	33
4.2	Objetivos específicos.	33
5	MATERIAL Y MÉTODOS.. . . .	35
5.1	Reactivos y su preparación.	35
5.1.1	Factores de diferenciación.	36
5.1.2	Anticuerpos para citometría de flujo.	37
5.1.3	Primers.	37
5.1.4	Kits de Ensayos por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA).	39

5.2	Material biológico vivo.	39
5.2.1	Animales de experimentación.	39
5.2.2	Células bacterianas.	40
5.2.3	Infección de ratones y obtención de biopsias.	40
5.2.4	Obtención de macrófagos derivados de la médula ósea (MDMO).	42
5.2.5	Obtención de células dendríticas derivados de la médula ósea (DCDMO).	43
5.2.6	Marcaje de MDMO y DCDMO con CFSE.	44
5.2.7	Inmunotipificación de MDMO y DCDMO por citometría de flujo.	45
5.2.8	Prueba de fagocitosis.	46
5.2.9	Transferencia adoptiva.	47
5.3	Manipulación de las biopsias.	48
5.3.1	Preparación histológica.	48
5.3.2	Tinción de lípidos neutros.	48
5.3.3	Extracción del RNA.	49
5.3.4	Retrotranscripción.	51
5.3.5	RT-PCR semi-cuantitativa (qPCR) por SYBRGreen.	51
5.3.6	RT-PCR semi-cuantitativa por Taqman.	52
5.3.7	Cuantificación de proteínas por Bradford.	53

5.3.8	ELISA.	54
5.4	Análisis estadística..	55
6	RESULTADOS.	56
6.1	Precusores de las células espumosas. .	56
6.1.1	Generación de posibles precusores singénicos y marcaje. .	56
6.1.1.1	CFSE no afecta al fenotipo ni la funcionalidad de MDMO. .	56
6.1.1.2	Depleción de células contaminantes del cultivo de DCDMO..	60
6.2	Transferencia adoptiva de macrófagos y DC marcados. .	61
6.2.1	Rastreo de las células transferidas en el actinomicetoma. .	61
6.2.2	Macrófagos y DC marcados en el anillo fibroso y acumularon gotas lipídicas.	63
6.3	Factores en el microambiente involucrados en la posible diferenciación de precusores de células espumosas..	65
6.3.1	Niveles de expresión relativa de los transcritos de las citocinas.	65
6.3.1.1	Validación y optimización del PCR con primer SYBRGreen.	65
6.3.1.2	La expresión relativa <i>in situ</i> de IL-13 y GM-CSF aumenta durante la infección con Nb.	67
6.3.2	Cuantificación de las citocinas <i>in situ</i>	71
6.3.2.1	M-CSF aumenta en la inflamación crónica.	71
6.3.3	Niveles de expresión relativa de marcadores de macrófagos M1 y M2.	72
6.3.3.1	Los marcadores de macrófagos M2 demuestran un perfil de expresión opuesto.	72

7	DISCUSIÓN.	75
8	CONCLUSIONES.	88
9	PERSPECTIVAS.	89
10	REFERENCIAS.	90
	APÉNDICES.	103
	RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO.. . . .	109

LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1. Control de la DC sobre la respuesta inmune adaptativa.	13
FIGURA 2. Importancia del M-CSF y GM-CSF en la generación y activación de los diferentes tipos de macrófagos y DC.	23
FIGURA 3. El marcaje con CFSE no altera la morfología de los MDMO.	57
FIGURA 4. El marcaje con CFSE no altera el fenotipo de los MDMO.	58
FIGURA 5. La capacidad de fagocitosis es intacta en los MDMO CFSE+.	59
FIGURA 6. Células (semi-)adherentes derivadas de la médula ósea, cultivadas con GM-CSF e IL-4.	60
FIGURA 7. DC depletadas de macrófagos F4/80+.	61
FIGURA 8. Macrófagos y DC se convierten en células espumosas.	64
FIGURA 9. Especificidad y eficiencia de los ensayos de RT-PCR con detección por el sistema SYBRGreen.	66
FIGURA 10. Resultados de los RT-PCR de las citocinas.	69
FIGURA 11. Los transcritos <i>in situ</i> de IL-13 y <i>csf2</i> /GM-CSF aumentan más de 100x durante la infección con Nb.	70
FIGURA 12. Cuantificación de citocinas <i>in situ</i> .	72
FIGURA 13. Aumento de la expresión relativa de <i>nos2</i> (marcador M1) y <i>chi3l3</i> (marcador M2), pero disminución de <i>retnla</i> (marcador M2).	74

LISTA DE TABLAS

		Página
TABLA 1.	Factores de virulencia del grupo Corinebacteria, Micobacteria y Nocardia.	4
TABLA 2.	Características de los anticuerpos utilizados en la inmunotipificación de macrófagos y DC por citometría de flujo.	37
TABLA 3.	Lista de primers y/o sondas empleados en la PCR en tiempo real (RT-PCR).	38
TABLA 4.	Especificación de los kits de ELISA.	39
TABLA 5.	Medios de diferenciación.	44
TABLA 6.	Preparación de la curva estándar y muestras en la prueba Bradford.	53
TABLA 7.	El marcaje con CFSE no altera significativamente el perfil de marcadores de MDMO.	58
TABLA 8.	Condiciones de la transferencia adoptiva exitosa.	62

ABREVIATURAS

ASB	albúmina sérica bovina
ATCC	inglés: "American Type Culture Collection"
BHI	infusión cerebro corazón
CD	cluster de diferenciación
cDC	DC convencional
cDNA	ácido desoxirribonucleico complementario
CFSE	sucinimidil ester de carboxifluoresceina
<i>chi3L3</i>	inglés "chitinase-like 3 ligand 3"; gen murino que codifica YM1
CPA	células presentadores de antígenos
cRPMI	medio de cultivo completo, compuesto de RPMI1640, 10% SBF-IC, y las antibioticas penicilina (100 U/mL) y estreptomycin (100 µg/mL)
<i>csf1</i>	inglés: "Colony Stimulating Factor 1"; gen murino que codifica el M-CSF
<i>csf2</i>	gen murino que codifica el GM-CSF
Ct	ciclo umbral
d	día
DC	célula dendrítica
DCDMO	DC derivados de la médula ósea
DEPC	dietilpirocarbonato
DMSO	dimetil sulfóxido

DO	densidad óptica
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
ELISA	Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas
ER	expresión relativa, calculada con la fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$
FIZZ1	Encontrado en zona inflamatoria (ingles: 'Found in Inflammatory Zone')
<i>g</i>	fuerza centrifugal relativa
GAPDH	gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa
GM-CSF	factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos
h	hora
H ₂ O	agua pura
IFN- γ	interferón gamma
Ig	inmunoglobulina
IL	interleucina
iNOS	sintasa de óxido nítrico inducible
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenoso
kDa	kilo Dalton
LAM	lipoarabinomanosa
M	molar
M1	macrófago activado clásicamente (pro-inflamatorio y microbicida)
M2	macrófago activado alternativamente (anti-inflamatorio y curativo)
M-CSF	factor estimulante de colonias de macrófagos
MDMO	macrófagos derivados de la médula ósea
MHC	complejo mayor de histocompatibilidad

min.	minuto
Mφ	macrófago
Nb	<i>Nocardia brasiliensis</i>
NK	células asesinos naturales
<i>nos2</i>	gen murino que codifica el iNOS
NT	“non-template” control
P	valor P; la probabilidad de obtener cierto valor extremo suponiendo que la hipótesis nula sea cierta.
PAMP	patrones moleculares asociados a patógenos
PBS	Solución salina amortiguado por fosfatos
pDC	DC plasmática
PGE2	prostaglandina E2
PMN	polimorfonucleares o neutrófilos
PRR	receptores que reconocen PAMPs
r	radio
<i>r</i>	coeficiente de correlación de Pearson
<i>retnla</i>	ingles: ‘resistin-like ligand alfa’; gen murino que codifica el FIZZ1
RNA	ácido ribonucléico
SBF-IC	suero bovino fetal inactivado por calor
sc	subcutáneo
SS	solución salina
STAT	intermediador de señalización y factor de transcripción
TDM	trehalosa dimicolato
TGF-β	factor de crecimiento transformador beta

Th	linfocitos T cooperadores
Th1	Th tipo 1, asociados con la respuesta inmune celular
Th17	Th que producen IL-17, asociado con la inflamación crónica
Th2	Th tipo 2, asociados con la respuesta inmune humoral
TipDC	DC que produce TNF- α e iNOS
TLR	receptores tipo Toll
TMB	tetrametil benzidina
TNF- α	factor de necrosis tumoral alfa
Treg	linfocitos T reguladores

RESUMEN

Elisabeth Divera Alida Catharina Meester
Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Medicina

Obtención del Grado: Diciembre, 2012

Título del Estudio:

ESTUDIO DE LA FORMACIÓN DE LAS CÉLULAS ESPUMOSAS EN EL ACTINOMICETOMA EXPERIMENTAL INDUCIDO POR *Nocardia brasiliensis*.

Número de páginas: 109

Candidata para el grado de Doctorado en Ciencias
con Orientación en Inmunología

Área de estudio: Inmunología

Propósito y Método del Estudio: Las células espumosas están presentes en varias enfermedades infecciosas como malaria, dengue, y tuberculosis, las cuales siguen siendo problemas de salud mundial. Aunque se desconoce el papel exacto de las células espumosas, parecen ser aprovechadas por los diferentes patógenos para sobrevivir. Un estudio de la patogénesis centrándose en la formación de estas células podría brindar conocimiento valioso para diseñar nuevos métodos de tratamiento. En este proyecto se estudió el linaje y los factores del microambiente involucrados en la formación de las células espumosas en el actinomicetoma experimental inducido por *Nocardia brasiliensis*. Se llevó a cabo la generación de macrófagos y células dendríticas singénicos, los cuales fueron marcados con un fluorocromo vital para rastrear éstas células después de la transferencia adoptiva en el actinomicetoma experimental, además de verificar su diferenciación en células espumosas. Por otro lado, se evaluó la expresión relativa ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) *in situ* de los marcadores de la activación clásica o alternativa de los macrófagos, así como de las citocinas involucradas en la polarización de los macrófagos, a partir de RNA aislado de las biopsias tomadas durante el desarrollo de la infección.

Contribuciones y conclusiones: El aumento en la expresión de GM-CSF es consistente con el aumento en la expresión del marcador de la activación microbicida *nos2/iNOS* y comprueba la activación de la respuesta inmune celular contra el patógeno intracelular. El aumento en la expresión de la interleucina 13 podría ser responsable de la 1) fibrosis; 2) estimulación alternativa de los macrófagos, la cual concuerda con el incremento en la expresión del *chi3l3/Ym1*, y 3) –junto con GM-CSF– la polarización a células dendríticas. La expresión contrastante de los dos marcadores de la activación alternativa, (*chi3l3/Ym1* aumentó, mientras que *retna/FIZZ1* disminuyó) demuestra una regulación independiente. Para el estudio del linaje, se optimizó el método de la generación de los macrófagos y células dendríticas derivados de la médula ósea de ratones singénicos, así como, su marcaje, sin alterar significativamente el fenotipo y la funcionalidad. Se demostró que ambas células, los macrófagos y las células dendríticas, se diferencian en células espumosas en el actinomicetoma experimental.



Dr. Mario César Salinas Carmona
Director de Tesis



Dr. Adrián Geovanni Rosas Taraco
Co-director de Tesis

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 El actinomicetoma por *Nocardia brasiliensis*

1.1.1 *Nocardia brasiliensis*

1.1.1.1 De saprófito a patógeno facultativo

Nocardia brasiliensis (Nb) es un saprófito que juega un papel importante en la degradación y reciclaje de material orgánico en el suelo¹. El bacilo se encuentra distribuido geográficamente entre los trópicos de Capricornio y Cáncer, entre las latitudes 15° sur y 30° norte en áreas caracterizadas con un clima biestacional con un periodo de lluvia de mayo a octubre y un periodo de sequía de noviembre a abril². Nb es un patógeno facultativo, que entra al cuerpo humano por inoculación accidental. La infección induce una inflamación que puede resolver la infección o causar un actinomicetoma caracterizado por una inflamación crónica de la piel y tejidos subyacentes³.

1.1.1.2 Taxonomía e identificación

Previo a las pruebas bioquímicas, Nb fue clasificada como un hongo por sus hifas aéreas. Sin embargo, la ausencia de quitina y la presencia de una pared

celular con peptidoglicano y lípidos la clasifican indudablemente dentro del reino de las bacterias⁴. Nb pertenece a la clase de las actinobacterias, las cuales se caracterizan por un alto contenido de los nucleótidos G y C (60-70%) y una inserción de aproximadamente 100 nucleótidos entre las hélices 54 y 55 de la unidad 23S ribosomal^{5, 6}.

La filogenia de Nb es la siguiente:

Dominio: eubacteria

Reino: bacterias

Filo: bacteria

Clase: actinobacteriae; **Subclase:** actinobacteridae

Orden: actinomicetales; **Suborden:** corinebacterineae

Familia: Nocardiaceae

Género: *Nocardia* **Especie:** *brasiliensis*

Los géneros de Corinebacteria, Micobacteria, Nocardia y Rodococcus forman un grupo supergenérico, el grupo CMN, por compartir 13 proteínas de asignatura⁷ y una pared celular particular tipo IV⁸. La pared celular se caracteriza por ácidos grasos típicos, ramificados, hidroxilizados y con ciclopropano en su cola apolar, conocidos como micolatos. Existe una variabilidad considerable con respecto a la longitud de las ácidos micólicos entre los diferentes taxones: eumicolatos largos en micobacteria (C₆₀₋₉₀), nocardomicolatos intermedios (C₄₄₋₆₀)

y corinomicolatos cortos (C₂₂₋₃₈). Los micolatos de *Nocardia* difieren en tamaño y saturación según la fase de crecimiento⁹. Los ácidos micólicos son esterificados a grupos arabinosa del polisacárido arabinogalactano, que a su vez está unido al peptidoglicano por una unión fosfodiéster entre un grupo arabinosa y un aminoácido del peptidoglicano quimiotipo IV, formando así un complejo peptidoglicano-arabinogalactano-micolato similar a lo encontrado en micobacterias¹⁰. La pared celular de *Nocardia*, similar a la de las micobacterias, contiene lipoarabinomanana (LAM), pero es único en contener meso-diaminopimelato¹.

Las características morfológicas y bioquímicas para identificar Nb son su crecimiento en forma de hifas que pueden fragmentarse en bastones de 0.5-1.2 µm, sus colonias onduladas y amarillentas en cultivo de agar infusión cerebro/corazón que crecen en 1 semana, mientras que en cultivo líquido llega a formar un bio-película flotante y suele estar en fase estacionaria en 3 días, teniendo un ciclo de multiplicación de 6 horas. El bacilo es aerobio obligatorio, Gram positivo y ácido resistente (en la tinción de Ziehl-Neelsen o en la adaptación de Kinyoun), ya que la capa exterior de micolatos inhibe la liberación del colorante. Al perder estos lípidos también se pierde la tinción¹¹. Las especies del género *Nocardia* son identificadas a través de pruebas microbiológicas, bioquímicas (como la capacidad de degradar caseína, tirosina, xantina o hipoxantina)¹², y la susceptibilidad a antibióticos¹³. Nb tiene actividad caseinolítica¹, debido a una proteasa de peso molecular (PM) de 39-42 kDa, presente tanto en el extracto celular de *N. brasiliensis* (ATCC 700358) como en el filtrado de cultivo⁴.

1.1.1.3 Factores de virulencia

Los componentes de la pared celular que *Nocardia* comparte con micobacterias patógenas y proteínas secretadas forman los principales factores de virulencia¹⁴ (Tabla 1).

Tabla 1. Factores de virulencia del grupo *Corinebacteria*, *Micobacteria* y *Nocardia*.

Componente bacteriano/ parte defensa afectada	<i>Micolatos</i>	<i>LAM</i>	<i>Enzimas</i>	<i>Exosomas</i>	<i>Proteínas de secreción vía ESX</i>	Referencia
Detención de maduración del fagosoma	+	+		+		15, 16, 17, 18, 19,
Inactivación de radicales bactericidas		+	+	+		19, 20, 21,
Inmunosupresión o inmunomodulador	+	+		+		15, 22, 23, 24, 25,
gFormación de poros en la membrana celular					+	26, 27, 28,
Formación de un granuloma	+	+				29, 30, 31, 32,

Nb es un patógeno intracelular que es internalizado a la célula vía fagocitosis donde es contenido en un fagosoma. Nb podría contener componentes inhibitorios de la fusión del endofagosoma con el lisosoma, similar a *Mycobacterium tuberculosis*³³. Los micolatos, especialmente el trehalosa-dimicolato (TDM) como el LAM de la pared celular, han sido asociados con la inhibición de la maduración del fagosoma¹⁶⁻¹⁸. La bacteria se establece en un

endosoma atrapado en su fase temprana de acidez moderada, aprovechando el receptor/transportador de transferrina en el endosoma para que lo provea del hierro necesario para su supervivencia¹⁸.

Glucolípidos complejos de la pared celular, como LAM, y las enzimas superóxido dismutasa y catalasa (p61) eliminan los radicales de oxígeno y nitrógeno producidos por las células fagocíticas,^{4, 10, 20, 21} protegiendo a las bacterias contra este sistema de defensa del hospedero.

Adicionalmente, el LAM tiene efectos inmunosupresores al inducir la producción de interleucina (IL) 10 vía el receptor DC-SIGN²² e inhibir la activación de macrófagos mediado por interferón gamma (IFN- γ)¹⁵. La señalización del IFN- γ es igualmente suprimido por bacterias viables o muertas. Los sulfolípidos han sido reportados como inmunomoduladores²⁴.

Los lípidos liberados vía exosomas pueden afectar la respuesta inmune del hospedero de varias maneras como a) insertarse en la membrana celular, b) entrecruzar las dos capas disminuyendo su fluidez y por ende la movilidad, y c) interferir con las funciones normales de la membrana celular como el control de permeabilidad, el transporte controlado de moléculas y la señalización¹⁹.

Estudios *in vitro* demuestran que Nb es capaz de multiplicarse dentro de la célula hospedera formando hifas que traspasan la membrana celular³⁴. Nb debe de disponer de un sistema que permita que sus hifas crucen la membrana celular sin lisis la célula hospedera. En el caso de las micobacterias se ha descrito que la

proteína ESAT-6 y su sistema de secreción ESX1 forman poros en membranas facilitando el escape de patógenos^{26,27,28}.

La formación del granuloma, antes considerada el mecanismo del hospedero para contener y limitar la infección, se contempla recientemente como una estrategia del bacilo para rápidamente establecerse en el hospedero en la fase temprana de inmunidad innata de la infección³². El TDM *cis*-ciclopropanado sólo induce la formación del granuloma³⁰ y tiene un amplio espectro de efectos inmunomoduladores al inducir un gran número de quimiocinas (CCL-2, CCL-3, interleucina (IL-8)) y citocinas (factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), IL-12, IFN- γ , IL-4, IL-6, IL-10)^{29, 31}, que en conjunto tienen a la vez efectos inflamatorios e inmunosupresores, lo cual parece contradictorio pero bien el bacilo aplica ambos para su supervivencia.

1.1.2 Actinomicetoma

El veterinario Edmond Nocard fue el primero en describir una linfadenitis purulenta bovina y aislar el patógeno en 1888. Un año después el patógeno fue caracterizado como *Nocardia farcinica* por Trevisan⁶. Las especies patógenas más comúnmente registradas en la clínica como responsables del actinomicetoma son *N. asteroides*, *Nb* y *N. otitidiscaviarum*⁸. A diferencia de *N. asteroides*, que causa un actinomicetoma pulmonar con fácil diseminación, especialmente hacia el cerebro, en pacientes inmunocomprometidos, el actinomicetoma dermatológico

inducido por Nb tiende a ser localizada y ocurrir en pacientes inmunocompetentes⁴. Los micetomas están clasificados de acuerdo al agente etiológico que lo causa, por lo tanto, los eumicetomas son aquellos inducidos por hongos, mientras que los actinomicetomas son causados por bacterias³, como es el caso de Nb. La inflamación inicial en la infección por Nb tiende a ser indolora pasando desapercibido por el paciente. Sin embargo, si el sistema inmune del paciente no resuelve la infección se desarrolla una inflamación crónica conocido como actinomicetoma. La inflamación crónica causa un cuadro clínico característico con nódulos, abscesos y fístulas por donde se drenan colonias de bacterias con serosidades sanguinolentas, además de una deformidad de la región afectada de consistencia firme³⁵.

Los estudios histopatológicos demuestran que en la inflamación aguda inducida por Nb, se encuentran abundantes polimorfonucleares y pocos macrófagos. Los granos se observan en posición central en el microabsceso delimitado por un anillo fibroso³. Durante la inflamación crónica se observan granulomas con microabscesos multiloculares, compuestos de un grano central rodeado de un infiltrado de leucocitos (polimorfonucleares, macrófagos y linfocitos) con células espumosas grandes (en ocasiones multinucleadas) en la periferia y delimitado por tejido fibroso. Alrededor del microabsceso también es posible encontrar células cebadas^{4, 36}.

1.1.3 Modelo experimental del actinomicetoma

En nuestro laboratorio, Salinas y col. establecieron un modelo experimental al inocular 10^6 unidades formadoras de colonias de Nb en el cojinete plantar izquierdo del ratón BALB/c induciendo una lesión histopatológicamente idéntica a la lesión humana³⁷. Estudios inmunohistoquímicos en el modelo experimental^{36, 38} demostraron la presencia de citocinas proinflamatorias (TNF- α , IL-1 β) en la epidermis durante la inflamación inicial. En la dermis también se encontraron éstas citocinas, pero adicionalmente el IFN- γ , especialmente después del día 3 de la infección. En el microambiente del actinomicetoma establecido están presentes una variedad de citocinas, especialmente el IL-6. El TNF- α , una citocina típica de la inflamación, está expresada por células en la dermis afectada, pero estaba ausente en los microabscesos. La inmunoreactividad para las citocinas de la respuesta inmune celular, IL-12 e IFN- γ , se observa en la periferia del microabsceso. Los linfocitos y algunos macrófagos que rodean el grano bacteriano son inmunoreactivos para IL-4. La IL-4 no sólo es una citocina de la respuesta inmune humoral, pero también un inmunomodulador e induce la activación alternativa de macrófagos y la multinucleación de estos³⁹. Dentro del actinomicetoma, también se encuentran las citocinas inmunosupresoras como la IL-10 y el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β). La inoculación *in vitro* de macrófagos con Nb induce una disminución de la expresión de TNF- α acompañado de un incremento en la expresión de TGF- β , la cual se repite cuando

los macrófagos son estimulados solamente con una fracción lipídica del patógeno³⁴.

Nb induce primordialmente una respuesta inmune celular detectable por IFN- γ en el suero⁴⁰ e *in situ*⁴¹. El IFN- γ activa los mecanismos efectores en macrófagos como la maduración del fagolisosoma y la inducción de enzimas microbidas como el sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS) y el complejo de NADPH oxidasa, las cuales generan radicales de oxígeno y nitrógeno que destruyen al patógeno¹⁸. Durante la infección por Nb, también se induce una respuesta inmune humoral. Los antígenos p24 y p61 (una catalasa) son inmunodominantes, mientras que el antígeno p38 (la proteasa caseínolítica) no los es. La inmunización pasiva con suero hiperinmune no confiere protección, lo que indica la escasa importancia de la respuesta IgG. Contrario a ello, la IgM específica sí confiere protección parcial⁴². Nb es capaz de inducir una inflamación crónica a pesar de que el hospedero afronta a la invasión por Nb con una combinación de una respuesta celular y humoral.

1.2 El sistema inmune

1.2.1 Organización y función

La mayoría de los organismos cuentan con mecanismos de defensa contra agentes invasores, incluso los procariontes secretan una variedad de sustancias contra sus competidores, como lo hacen muchas especies del género

Streptomyces y estas sustancias son aprovechadas en la clínica como antibióticos⁴³. Durante la evolución del sistema de defensa se presentaron primero sustancias secretadas y después células fagocíticas⁴⁴ que reconocen a patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP), ajeno a lo propio mediante receptores para estos PAMP (PRR), como los receptores tipo Toll (TLR), dando origen al sistema inmune innato, el cual es constante en su manera de ofrecer protección contra patógenos. El sistema inmune adaptativo o adquirido, definido por la presencia de anticuerpos y receptores de los linfocitos T específicos empezó a desarrollarse en los vertebrados^{44, 45}.

El sistema inmune humano se puede dividir funcionalmente en el sistema inmune innato y el sistema inmune adaptativo, ambos están compuestos de un componente humoral (es decir: sustancias secretadas) y otro celular. El componente humoral del sistema inmune innato incluye defensinas, lisosima, complemento, cininas y citocinas proinflamatorias, como el TNF- α , IL-1 β e IL-6. El componente celular está constituido por los neutrófilos/ polimorfonucleares (PMN), monocitos/macrófagos, células dendríticas (DC, por sus siglas en ingles), células asesinos naturales (NK, por sus siglas en inglés 'Natural Killer cells'), eosinófilos, basófilos y células cebadas. La fase aguda de la respuesta inmune innata se le denomina inflamación, la cual es caracterizada por edema, rubor, calor y dolor. Además, la respuesta inmune innata activa la respuesta inmune adaptativa a través de las células presentadoras de antígeno (CPA) y lleva a cabo importantes acciones efectoras de la respuesta inmune adaptativa.

Por otra parte, la respuesta inmune adaptativa se desarrolló para ofrecer una protección extendida contra patógenos que escaparon de la respuesta inmune innata. La respuesta inmune adaptativa reconoce patógenos de manera específica, además de desarrollar memoria, la cual permita activar el sistema inmune más rápido en infecciones posteriores por el mismo patógeno/antígeno. Los elementos celulares del sistema inmune adaptativo son los linfocitos T y B, mientras que los anticuerpos o Ig, secretados por células B diferenciadas a células plasmáticas, forman la parte humoral.

Las DC son células fagocíticas del sistema inmune innato con el fin principal de fungir como centinelas del sistema inmune adaptativo, presentando antígenos a las células T vírgenes en ganglios linfáticos y en esta interacción controlar el tipo de respuesta inmune a generar. La respuesta inmune adaptativa resultante depende del tipo de antígeno presentado, así se puede activar una respuesta inmune celular, humoral o tolerante (fig.1). Generalmente, los patógenos intracelulares (ej. los virus y Nb) inducen una respuesta inmune celular. Los antígenos intracelulares son presentados en el complejo mayor de histocompatibilidad tipo I y activan las linfocitos T citotóxicos (Tc). Si son presentados en el complejo mayor de histocompatibilidad tipo II⁴⁶, en un ambiente de IL-12, inducen la polarización de linfocitos T cooperadores vírgenes (Th) a linfocitos Th1. Los linfocitos Th1 se caracterizan por la producción de las citocinas IL-2, IFN- γ y linfoxina/TNF- β . La IL-2 induce la proliferación de los linfocitos y el IFN- γ estimula las funciones efectoras de los macrófagos, conocido como

activación clásica. Por otro lado, los antígenos de los patógenos extracelulares son presentados vía el complejo de histocompatibilidad mayor tipo II y, en combinación con moléculas co-estimuladoras como el cluster de diferenciación (CD) 40 y la IL-4, promueven la polarización de los linfocitos Th a Th2. Los Th2 se caracterizan por secretar las citocinas IL-4, IL-5 e IL-13, las cuales inducen la activación, expansión clonal y diferenciación de las células B generando células B de memoria y células plasmáticas productoras de anticuerpos tipo IgG e IgE. Además, las DC presentan antígenos propios y ambientales inofensivos para generar tolerancia específica por medio de la estimulación de células T reguladoras (Treg) específicas, las cuales producen TGF- β e IL-10, que modulan o inhiben la respuesta inmune celular o humoral⁴⁷. La diferenciación de las células Th a Th17 no parece ser regulada por DC sino por la presencia de las citocinas pleiotrópicas TGF- β e IL-6⁴⁸. Los linfocitos Th17 se caracterizan por la secreción del IL-17A, que es responsable de la inflamación crónica como en alergias y enfermedades autoinmunes⁴⁹.

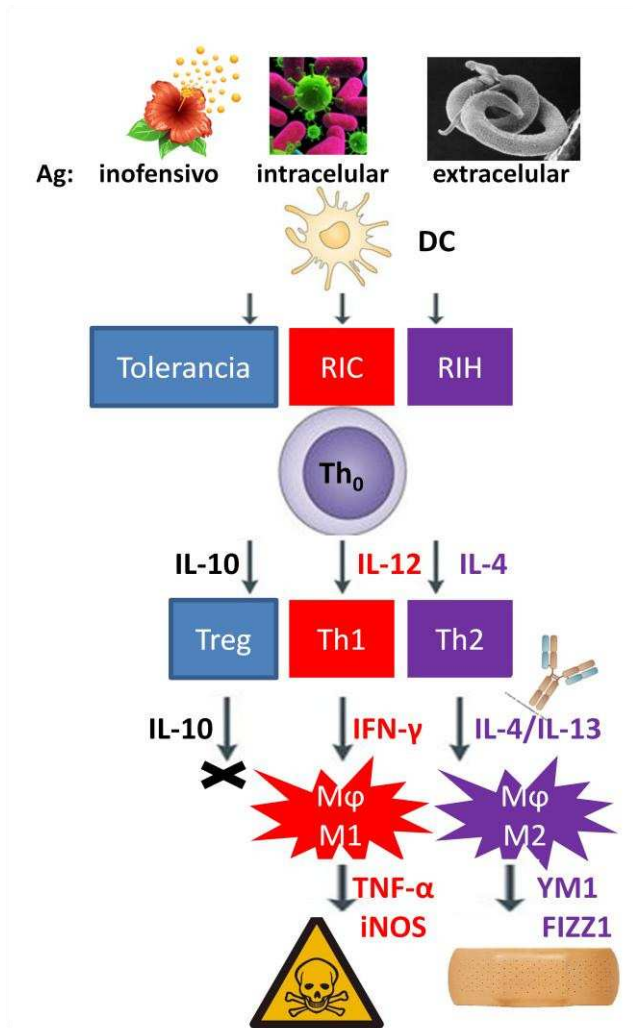


Figura 1. Control de la DC sobre la respuesta inmune adaptativa.

Ag = antígeno, DC = célula dendrítica, FIZZ1 = 'found in inflammatory zone', IFN- γ = interferón gamma, IL = interleucina, iNOS = sintasa de óxido nítrico inducible, M ϕ = macrófago, RIC = respuesta inmune celular, RIH = RI humoral, Th₀ = linfocito T cooperador virgen, TNF- α = factor de necrosis tumoral alfa.

1.2.2 Macrófagos y células dendríticas

La primera célula aceptada como componente del sistema inmune fue el macrófago y fue sugerido por el zoólogo ruso Mechnikov en 1884. Basado en sus

observaciones de la fagocitosis por células de invertebrados marinos propuso su "teoría fagocítica (celular) de la inmunidad", lo cual fue un cambio radical en una época donde la inmunología humoral acaparaba la atención⁵⁰. En la actualidad se aprecia que el macrófago tiene un amplio espectro de funciones tanto como parte del sistema inmune innato como en el mantenimiento de la homeostasis. Entre sus funciones se encuentran:

- a) Eliminar células dañadas, cuerpos apoptóticos, material orgánico extracelular obsoleto y secuestrar material inorgánico indigerible.
- b) Internalizar antígenos y presentarlos al sistema inmune adaptativo para su activación.
- c) Inducir la muerte intracelular de patógenos y mecanismos citotóxicos como célula efectora de la inmunidad celular adaptativa.
- d) Producir y secretar sustancias bioactivas y citocinas que regulan a otras células⁵¹.

Para llevar a cabo estas funciones, el macrófago dispone de una gran variedad de receptores superficiales e intracelulares para reconocer patrones moleculares de patógenos o patógenos opsonizados por complemento o inmunoglobulinas, señales de peligro endógeno, etcétera. El macrófago cuenta con un sistema microbicida (inducible) de radicales de oxígeno y nitrógenos para causar la muerte intracelular de patógenos internalizados. También tiene abundantes lisosomas llenos de enzimas hidrolíticas para digerir los restos de patógenos y demás material internalizado. Los marcadores comúnmente usados

para identificar macrófagos son: a) el Mac-1/CR3, conformado por el CD18 y el CD11b/ITGAM; b) el receptor de basurero de lípidos CD68 (equivalente a macrosialina en ratones; y c) en ratones, el F4/80⁵², un receptor tipo manosa, entre otros. Los macrófagos se localizan estratégicamente en el tejido conectivo de casi todos los órganos. En el campo de la inmunología, el tejido conectivo de órganos no linfoides se llama periferia; los macrófagos periféricos derivan de monocitos que circulan en la corriente sanguínea. La morfología del macrófago puede variar dependiendo de su localización y el macrófago es conocido con diferentes nombres en diferentes órganos, tales como: osteoclasto en el hueso, célula de Kupffer en el hígado, célula mesangial en el riñón, microglia en el cerebro, y macrófago alveolar o célula de polvo en el pulmón. Sin embargo, la célula de Langerhans (epidermis) ya no se considera un macrófago, sino una DC especial⁵³.

Las DCs fueron reportadas por primero vez en 1973 por Steinman⁵⁴ al encontrar entre las células no linfoides del bazo unas células con dendritas que se distinguieron de los macrófagos en varios aspectos: a) su morfología con abundantes dendritas, b) su menor capacidad fagocítica, y c) la escasez de lisosomas tan característica de los macrófagos. Más tarde se descubrió que las formas inmaduras de éstas células tenían dendritas menos desarrolladas, pero que eran células con mayor capacidad fagocítica, y que su función principal era ser la célula presentadora de antígeno por excelencia, que inicia y regula el tipo de respuesta inmune adaptativa (tolerante, celular o humoral) interactuando con

células T vírgenes, mientras que las otras CPA estimulan los blastos de una clona de linfocitos T inducida previamente por las DC⁵⁵.

En la homeostasis, las DCs se desarrollan desde un linaje de pre-cDC en la médula ósea, pero durante la inflamación también se pueden diferenciar desde los monocitos⁵⁶. Igual a los macrófagos, las DC tienen todo un panel de receptores para reconocer patrones moleculares de patógenos, pero tienen más receptores tipo C lectina como CD205/DEC-205, DC-SIGN y Langerin, entre otros, los cuales reconocen grupos de carbohidratos en glucoproteínas y glucolípidos y son usados por investigadores como marcadores de las DC^{57, 58}. CD205 es un lectina tipo C que funciona como receptor de endocitosis, de lo cual no se conoce su ligando aunque se ha sugerido que sea importante en procesos de apoptosis y necrosis. Cuando la internalización de un ligando vía CD205 no va acompañado de otra señal de daño o de un ambiente pro-inflamatorio induce la tolerancia⁵⁷. CD11c/ITGAX se une al CD18 para formar el receptor CR4 cuyo ligando es el C3b inactivado. Muchos investigadores emplean al CD11c como marcador para la identificación de DC a pesar de no ser exclusivo para las DC ya que sí se expresa en mayor cantidad en la superficie de las DC⁵⁹.

1.2.2.1 Tipos de macrófagos

Los macrófagos son células sumamente flexibles que pueden asumir un amplio abanico de funciones. La función de los macrófagos es determinada por el tipo de señal que se encuentre en el ambiente del monocito recién reclutado⁶⁰ o del macrófago^{61, 62}, y su polarización es reversible^{61, 62}. Se han identificado tres

tipos principales de activación de los macrófagos⁶³⁻⁶⁵: 1) El factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) induce la polarización a macrófagos residentes, éstos limpian el ambiente interno de un organismo de manera anti-inflamatoria durante la homeostasis. 2) El IFN- γ causa la activación clásica del macrófago, conocido como M1, se induce la expresión de citocinas pro-inflamatorias y de la enzima iNOS, que cataliza la formación del producto altamente microbicida óxido nítrico. 3) Las citocinas Th2 como IL-4 e IL-13 causan la activación alternativa del macrófago M2. El macrófago M2 es anti-inflamatorio (TNF- α e iNOS⁻) y remodelador al promover la cicatrización de heridas. Marcadores de los macrófagos M2 murinos son el Ym1 y el FIZZ1⁶⁶. Ym1 es codificado por el gen *chi3l3*, perteneciente a la familia de las quitinasas, pero Ym1 carece del sitio activo y no se conoce su función⁶⁷. El FIZZ1 (por sus siglas en inglés 'Found-in-Inflammatory-Zone) es codificado por el gen resistin-like alfa (*retnla*), y similar al Ym1 se encuentra en inflamaciones tipo 2⁶⁸, que involucran Th2, sin conocer su función exacta, aunque parece jugar un papel en la disminución de la inflamación⁶⁹.

1.2.2.2 Tipos de células dendríticas

En la homeostasis existen dos tipos principales de células dendríticas que se distinguen por su morfología y fenotipo, localización y función principal^{55, 70, 71}. El primer grupo lo forman las DC convencionales (cDC), cuyo papel principal es la regulación de la respuesta inmune adaptativa como fue descrito previamente. Las cDC son subclasificadas en DC residentes de los órganos linfoides y DC

migratorias. Las DC residentes de los órganos linfoides se encuentran en los ganglios linfoides, el bazo y el timo; son CD103- y subgrupos pueden ser CD4+ o CD8+. Estas últimas son conocidas por su capacidad de presentación cruzada, es decir pueden presentar antígenos internalizados con el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC)-I y estimular respuestas citotóxicas vía Tc-CD8+. Las DC migratorias vigilan los tejidos periféricos y una vez activadas migran a los ganglios linfáticos, pero no se encuentran en el bazo. Las DC migratorias se dividen en DC CD11b+ (DC intersticiales o dermales) presentes en los tejidos conectivos y DC CD103+ (DC de las epitelias intestinales). CD103+ es una integrina cuyo ligando es el E-cadherina de las células epiteliales. Las células de Langerhans en la epidermis también migran a ganglios linfáticos para presentar antígeno, sin embargo, se originan de un precursor mielo-monocítico presente durante el desarrollo embrionario temprano, cuya progenie se genera como resultado de un estallido proliferativo un poco después del nacimiento y después se mantiene por autorrenovación durante la homeostasis, aunque pueden derivarse también de monocitos sanguíneos⁷².

El segundo grupo está formado por las DC plasmáticas (pDC), que son distribuidos ampliamente, pero se encuentran especialmente en la sangre. Normalmente, las pDC expresan B220 y se caracterizan por secretar rápidamente grandes cantidades de interferones tipo I en reacción a infecciones virales⁷⁰.

En condiciones inflamatorias se forman DC derivados de monocitos/DC mieloides en respuesta al factor estimulante de colonias de granulocitos y

macrófagos (GM-CSF) o ligandos del TLR4, como el lipopolisacárido o bacterias gram-negativas. Las DC derivadas de monocitos pueden adquirir una capacidad potente como células presentadora de antígenos, incluyendo la presentación cruzada⁷⁰ o volverse fuertemente microbicida como TipDC (por sus siglas en inglés: TNF- α and iNOS producing DC^{73, 74}).

1.2.3 Citocinas

Las citocinas son glicoproteínas de bajo peso molecular (6-70 kDa) sintetizadas *de novo* que tiene una función autocrina, paracrina o endocrina en la comunicación entre leucocitos u otras células como epitelocitos, fibroblastos, etc. Las citocinas sirven como factores de crecimiento y diferenciación durante hematopoyesis, y como inductores de la proliferación, activación o inhibición de leucocitos u otras células. Estas moléculas suelen tener efectos pleiotrópicos dependiendo de su concentración, la célula receptora y sinergia con o interferencia de otras citocinas. Las principales clases de citocinas son⁷⁵: a) Las quimiocinas, como su nombre lo indica, atraen leucocitos a los sitios de inflamación. Se clasifican según las posiciones de las cisteínas en C, CC, CXC, y CX3C (Abbas); b) Los factores de crecimiento de colonias (CSF) para granulocitos (G-CSF), macrófagos (M-CSF) y granulocitos y macrófagos (GM-CSF); c) los interferones, los cuales se caracterizan por su efecto anti-viral (IFN- α , IFN- β , IFN- γ e IFN- λ /IL-28/IL-29; y d) Las interleucinas (IL), que son subclasificadas según su función principal en: 1) pro-inflamatorias (IL-1, IL-6 y TNF- α); 2) mediadores de la

respuesta inmune celular vía Th1 (IL-2, IL-12, IL-18 e IFN- γ); 3) mediadores de la respuesta inmune humoral vía Th2 (IL-4, IL-5, IL-13, IL-25, IL-31, IL-33); y 4) anti-inflamatorias o reguladores (IL-10, IL-4 y TGF- β). A continuación se profundiza en algunas citocinas que juegan un papel importante en la diferenciación de monocitos/macrófagos y la activación clásica/proinflamatoria o alternativa/anti-inflamatoria.

1.2.3.1 M-CSF y GM-CSF

M-CSF/*csf-1* es una proteína homodimérica y se presenta en tres isoformas biológicamente activas: 1) una de la superficie celular que atraviesa la membrana celular, 2) una forma secretada que se une a glucosaminoglucanos, importante para erupción dental y el desarrollo óseo, y 3) otra forma secretada libre importante para la supervivencia de (precursores) de monocitos y macrófagos⁷⁶. Una mutación en *csf-1*, conocido como *op/op*, causa osteopetrosis y animales sin dientes por falta de osteoclastos funcionales. Además, afecta el desarrollo de la placenta y puede ser causa de infertilidad⁷⁷. M-CSF genera macrófagos tipo residente durante homeostasis o tipo M2/anti-inflamatoria durante la inflamación⁷⁸. Sin embargo, ratones M-CSF^{-/-} son capaces de generar macrófagos, aunque en cantidades significativamente menores a los producidos por los ratones silvestres, debido a rutas hematopoyéticas esplénicas compensatorias⁷⁹. A pesar de que M-CSF es asociado con macrófagos residentes o anti-inflamatorios, recientemente se reportó que el receptor de M-CSF es requerido para el desarrollo de TipDC

proinflamatorias⁸⁰. El gen que codifica para el receptor de M-CSF, CSF-1R/c-fms, es considerado un proto-oncogene.

GM-CSF fue descubierto como un estimulador de macrófagos y granulocitos de células hematopoyéticas en los años setentas del siglo pasado⁸¹. Inicialmente, se asumió que GM-CSF tenía un papel clave en la generación de los diferentes células del linaje mieloide, incluyendo eritrocitos y megacariocitos⁸², debido a que su receptor es ampliamente expresado por células hematopoyéticas. Sin embargo, aún con la deficiencia de GM-CSF o su receptor, se generan células mieloides, indicando que existen rutas alternativas⁷⁹. Actualmente, se piensa que GM-CSF promueva la mielopoyesis urgente y la generación de monocitos y granulocitos en la médula ósea durante la infección, así como su supervivencia y activación funcional en el sitio de la lesión⁸³, además, es un factor importante en la diferenciación en DC a partir de monocitos o células de la médula ósea⁸⁴. GM-CSF dirige células hematopoyéticas hacia el linaje mieloide y sólo se genera el linaje linfoide cuando las células precursoras no expresan el receptor de GM-CSF (GM-CSFR)⁸². GM-CSF tiene un papel especial en el pulmón durante la homeostasis donde activa a los macrófagos para que catabolicen surfactante⁸⁵. Esto explica por qué la primera fuente rica en GM-CSF fue el medio de cultivo de células pulmonares⁸⁶. El GM-CSF ha sido asociado con un estado pro-inflamatorio⁷⁸, citotóxico⁸¹ y microbicida⁸⁷ con efectos como el aumento de expresión de TLRs⁸⁸, fagocitosis, supervivencia propia, producción de radicales óxidos y citotoxicidad dependiente

de anticuerpos y contra parásitos⁸¹. Diferentes mecanismos permiten los efectos pleiotrópicos de GM-CSF. Un mecanismo es la fosforilación diferencial del receptor de GM-CSF según la concentración de GM-CSF; Una concentración menor a 10 pM sólo asegura supervivencia, mientras a una concentración mayor ocurre proliferación⁸⁹. También importa la fase de maduración de la célula diana y su densidad de receptores GM-CSF. Por ejemplo, células hematopoyéticas estimulados con GM-CSF se diferencian en células con un fenotipo característico de las TipDC⁹⁰, mientras que las DC maduras, que no expresan el GM-CSFR, se convierten en TipDC por estimulación vía el receptor de M-CSF⁸⁰. Cuando las células diana son monocitos, el GM-CSF puede inducir la expresión de una proteína que proteolisa el receptor de M-CSF y por lo tanto inhibe la diferenciación en macrófagos favoreciendo la aparición de DC⁹¹.

Las citocinas pro-inflamatorias TNF- α e IL-1 α inducen la expresión de GM-CSF local por linfocitos T activados, células cebadas, endotelios, fibroblastos y keratinocitos durante la inflamación^{92, 93}. La expresión de GM-CSF suele ser inducido y temporal; El mRNA de GM-CSF tiene una secuencia en la región no-traducido del extremo 3' que asegura que el mRNA se degrade rápidamente y la proteína tiene una vida media en el suero muy corto de 6-10 min⁸¹. Células que tienen receptores para GM-CSF incluyen neutrófilos, macrófagos y granulocitos, sin embargo, las células inmaduras suelen tener más receptores que las células maduras⁸¹.

GM-CSF se usa en la clínica para tratar neutropenia después de un trasplante autólogo de médula ósea, después de la quimioterapia en pacientes de cáncer y en pacientes con el síndrome de inmunodeficiencia adquirida⁹⁴. También se utiliza para diferenciar monocitos de la sangre en DC en terapias de leucoferesis en procesos de vacunación experimental con DC activadas⁹⁵. La fig. 2 integra la importancia de M-CSF y GM-CSF en la formación y activación de los diferentes tipos de macrófagos y DC.

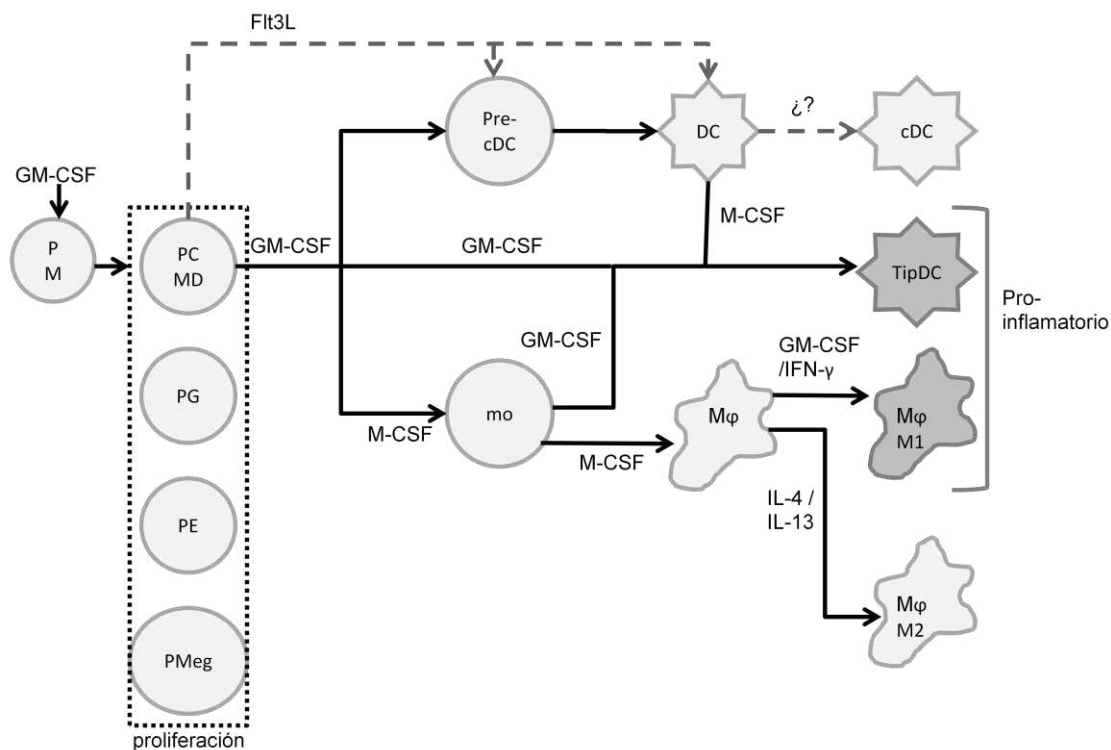


Figura 2. Importancia del M-CSF y GM-CSF en la generación y activación de los diferentes tipos de macrófagos y DC. El GM-CSF es un citocina de hematopoyesis en inflamación o infección dedicada a generar los precursores de los diferentes linajes mieloides y la maduración de fagocitas proinflamatorias como macrófagos M1, TipDC (y neutrófilos, no incluido en la imagen); en homeostasis el FIt3L está encargado de la formación de las DC. cDC = DC convencionales, PM = precursor multipotente, PCMD = precursor en común de macrófagos y DC, PG = precursor de granulocitos, PE = precursor de eritrocitos, PMeg = precursor de megacariocitos, pre-cDC = precursor de cDC, mo = monocito, Mφ = macrófago.

1.2.3.2 IL-4 e IL-13

Como se mencionó anteriormente, ambas citocinas son mediadoras de la respuesta Th2 y tienen muchos efectos en común. Tras la unión a alguna isoforma del receptor, ambos señalizan vía los intermediarios intracelulares de señalización y factores de transcripción STAT6 o STAT3 y pueden inducir un cambio de isotipo IgE en células B, sin embargo, también hay algunas diferencias. Por ejemplo, 1) la IL-4 e IL-13 tienen diferentes afinidades para las isoformas del receptor, y 2) la IL-4 se produce principalmente en los órganos linfáticos y se detecta primero en la sangre, mientras que la IL-13 es producida por más tipos de células, es detectada principalmente en la periferia, durante más tiempo y en cantidades mayores⁹⁶. En un modelo de infección de criptococcosis cerebral, no se detectó IL-4 *in situ*, pero sí el IL-13⁹⁷. En modelos de alergias, como asma, la IL-13 tiene efectos locales tales como la estimulación de la contracción de músculo liso y la secreción de moco por el epitelio respiratorio⁹⁸. En infecciones por helmintos, la IL-13 ha sido relacionada con la fibrosis dependiente^{99, 100} o independiente¹⁰¹ de TGF- β . IL-13 también inhibe la producción de óxido nítrico y favorece la activación alternativa de macrófago, debilitando la inmunidad celular¹⁰². Por otra parte, la IL-13 puede inducir la producción de inmunomoduladores lipídicos^{103, 104} como la prostaglandina E2 (PGE2). La PGE2 es un inmunomodulador lipídico potente pero ambivalente, es pro-inflamatorio y requerido para que las DC maduren y sean respondedoras a quimiocinas, sin embargo, en combinación con la señalización de TLRs puede promover la tolerancia¹⁰⁵.

1.3 Células espumosas

Las células espumosas son células que han acumulado lípidos en su citoplasma en forma de gotas lipídicas. Recientemente, fue actualizado el concepto de estas estructuras de unas simples acumulaciones de lípidos a organelos complejos, dinámicos y organizados. La gota lipídica está compuesta de varios lípidos neutros delimitada por una monocapa de lípidos anfipáticos con la cual están asociadas varias proteínas anfipáticas que estabilizan la gota lipídica o que permiten su degradación o interacción con otros organelos. Los lípidos neutros pueden diferir de una gota a otra depende del origen y la función de la gota lipídica. Las proteínas de la familia PAT (perilipinas, adipofilina, TIP47, entre otras) son comúnmente asociadas a las gotas lipídicas y por lo tanto usadas como marcadores de las gotas lipídicas¹⁰⁶⁻¹⁰⁸.

1.3.1 Células espumosas en enfermedades humanas

Las células espumosas se forman cuando el metabolismo lipídico está alterado. Se pueden distinguir tres orígenes principales de las células espumosas:

- 1) Las enfermedades lisosómicas, caracterizadas por la deficiencia de ciertas enzimas involucradas en la degradación de lípidos. Los lípidos no degradables se acumulan dentro de los lisosomas, por lo cual las gotas lipídicas suelen estar rodeados por la membrana del lisosoma. Los macrófagos espumosos son típicos de la enfermedad de Niemann-Pick, pero también han sido observados en algunos

casos de Gaucher¹⁰⁹; 2) Las enfermedades metabólicas o aterosclerosis, en las cuales las células internalizan el exceso extracelular de lípidos (oxidados) para almacenarlos temporalmente hasta que pueden ser liberados cuando disminuye el nivel de lípidos extracelulares. Cuando los niveles de lípidos extracelulares no bajan, las células se vuelven espumosas para siempre y son características desde la fase inicial de aterosclerosis¹¹⁰; 3) Las enfermedades infecciosas, definidas por la presencia de un patógeno. Entre los cuatro grupos principales de patógenos (virus, bacterias, hongos y parásitos) se encuentran patógenos que causan infecciones que van acompañadas de la presencia de células espumosas^{111, 112}. Aunque falta por definir el papel exacto de estas células, en cada una de las infecciones, existen evidencias de que los patógenos aprovechan de varias formas los lípidos en estas células. Los virus de la hepatitis C y del dengue utilizan las gotas lipídicas como centros de ensamble^{113, 114}, los parásitos las utilizan como materia prima y/o para generar inmunomoduladores lipídicos que por su tipo o su cantidad suprimen la respuesta inmune¹¹⁵. En el caso de la tuberculosis y la lepra, los patógenos causantes se establecen dentro de las células espumosas¹¹⁶⁻¹¹⁸; en el caso de la lepra, estas células son características de la forma más grave de la enfermedad¹¹⁹ en donde ocurre una desviación de la respuesta inmune celular adecuada hacia una respuesta inmune humoral inapropiada.

1.3.2 Células espumosas en el actinomicetoma experimental

Las células espumosas son detectables desde el día tres de la infección con Nb, en plena inflamación aguda. Se mantienen durante la resolución de la inflamación aguda para aumentar en número y tamaño durante la fase crónica de la infección. Las células espumosas se encuentran asociadas con el anillo fibroso de un microabsceso y son CD64+, CD68+, CD11c+, CD40+, e IL-12+, pero TNF- α ³⁸. La ausencia de TNF- α es compatible con los macrófagos M2, sin embargo, la presencia de IL-12 no lo es. La expresión de los marcadores de superficie no permite identificar las células espumosas como macrófagos o DC ya que los marcadores no son exclusivos y adicionalmente su expresión puede depender del tipo de activación.

1.3.3 Posibles precursores de las células espumosas

Los macrófagos han sido considerados como los precursores de las células espumosas en diversas enfermedades, como en la aterosclerosis¹²⁰ y la tuberculosis¹²¹. Paulson y colaboradores reportaron que en aterosclerosis también las DC acumulan lípidos¹²². Estudios en un modelo de tuberculosis también han reportado la presencia de los "macrófagos espumosos", aunque éstos mostraron un perfil de marcadores de superficie propio de DC¹²³. Otros autores usan terminología como "macrófago CD205+"¹²⁴ o "DC CD68+"¹²⁵ para lidiar con combinaciones poco usuales. En los estudios mencionados, los investigadores identifican las células según su inmunoreactividad para marcadores tipo CD o

similar, así el CD68 o F4/80 se consideran marcadores propios de macrófagos (murinos), mientras CD11c y CD205 lo son de DC. Sin embargo, es importante estar consciente que un marcador tiene una función biológica, independiente de su uso científico como marcador. Una célula lo expresa según su fase de desarrollo, su función, su activación, etc. Los marcadores fueron asociados principalmente con las células mencionadas, pero sin ser exclusivos para cualquiera de ellas. Por ejemplo, desde sus inicios se reportó que el CD205 también es expresado por macrófagos estimulados con tioglicolato¹²⁶. Por lo anterior, confiarse en los marcadores para la identificación de una célula es una práctica riesgosa. Aún falta por elucidar si el precursor de la célula espumosa es un macrófago o una DC.

Adicionalmente, existen los subtipos de macrófagos y DC pro- y anti-inflamatorios, correspondientes a macrófagos M1 versus M2, y TipDC versus cDC, respectivamente. Cualquiera de estas células son posibles precursores de las células espumosas.

1.3.4 Proceso de conversión en células espumosas

La transformación a célula espumosa depende del proceso que causó la conversión. En enfermedades lisosómicas es por la acumulación de lípidos no degradables dentro del lisosoma.

En la aterosclerosis el mecanismo de homeostasis de distribución de colesterol es alterado. Ocurre un aumento de internalización de lipoproteínas de baja densidad debido a un aumento de los receptores de internalización de lípidos

como CD36, CD68 y SR-A, cuya expresión se incrementó por la presencia de las citocinas pro-inflamatorias TNF- α e IFN- γ ¹²⁷, mientras que disminuye la expulsión de colesterol por una disminución en la expresión de los transportadores ABCA-1 y ABCG-1. A la vez, ocurre una mayor esterificación y almacenamiento de colesterol¹²⁸.

En el caso de enfermedades infecciosas no hay un exceso de lípidos que rompen la homeostasis del metabolismo lipídico. El cambio del metabolismo lipídico puede formar parte de la respuesta inmune como la generación de inmunomoduladores lipídicos como prostaglandinas y leucotrienos desde los ácidos araquidónicos liberados de las membranas. Algunos patógenos interfieren con este proceso para modular la respuesta inmune^{115, 129, 130}. En lesiones de tuberculosis experimental, las células espumosas resultaron altamente inmunoreactivas para PGE2^{131, 132}. Es difícil de imaginar la acumulación lipídica, en grandes cantidades en las células espumosas, desde las membranas. Un análisis bioquímico de los lípidos presentes en la parte caseosa de las lesiones de tuberculosis comprobó la abundancia de colesterol (esterificado), triacilglicerides y otros especies lipídicos que sugieren un origen de lipoproteínas de baja densidad¹³³. Autores que habían estudiado la formación de células espumosas en la lepra reportaron la posible participación de receptores como TLR-2 y dectina-1 en la acumulación de gotas lipídicas^{134, 135}, pero en otras infecciones la interacción con estos receptores no resulta en la acumulación de gotas lipídicas.

Las micobacterias patogénicas tienen paredes celulares con abundantes cantidades de lípidos inusuales para eucariotas. Las gotas lipídicas podrían ser restos indigeribles de estos lípidos, sin embargo, hay evidencia que los lípidos acumulados se originan del hospedero y no del bacilo^{116, 133}. Las micobacterias parecen interferir con el metabolismo lipídico de una célula. *M. leprae*, viva no muerta, suprime la expresión de la lipasa sensible a hormona, una enzima central en la lipólisis y la movilización de lípidos, mientras que aumenta la expresión de perilipina, proteína que estabiliza las gotas lipídicas, manteniendo así las reservas lipídicas intracelulares¹¹⁸. En un modelo experimental de tuberculosis en ratones, se reportó que el equilibrio entre GM-CSF y M-CSF juega un papel importante en la formación de las células espumosas. Las células espumosas ocurrían naturalmente en un ambiente con altos niveles de GM-CSF, pero un tratamiento con M-CSF causó la desaparición las células espumosas¹³⁶.

Por lo anterior, aún no está claro el origen de las células espumosas ni los factores ambientales que intervienen en su aparición en diversas enfermedades infecciosas.

CAPÍTULO 2

JUSTIFICACIÓN

Las células espumosas están presentes en varias enfermedades infecciosas como malaria, dengue y tuberculosis, las cuales siguen siendo problemas de salud mundial, ya sea por la falta o la ineficiencia de las vacunas, así como, por la aparición de nuevas cepas de patógenos resistentes a los tratamientos farmacológicos. En la búsqueda de nuevas opciones de prevención o tratamiento es importante estudiar la inmunopatogénesis de éstas enfermedades.

Aunque se desconoce el papel exacto de las células espumosas, parecen ser aprovechadas para poder persistir dentro del hospedero.

Un estudio del linaje y los factores que podrían favorecer la formación de las células espumosas en enfermedades infecciosas generará una caracterización más profunda de éstas células para el diseño de nuevos métodos de tratamiento.

CAPÍTULO 3

HIPÓTESIS

Los macrófagos y los factores que causan su polarización favorecen la formación de células espumosas en el modelo experimental de actinomicetoma inducido por *Nocardia brasiliensis*.

CAPÍTULO 4

OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Determinar el linaje y los factores involucrados en la formación de las células espumosas en el actinomicetoma experimental inducido por *Nocardia brasiliensis*.

4.2 Objetivos específicos

1. Determinar el linaje de las células espumosas.
 - a. Generar macrófagos y células dendríticas derivados de la médula ósea de ratones singénicos y marcarlos sin alterar su fenotipo ni su funcionalidad.
 - b. Rastrear el destino de los macrófagos y células dendríticas marcados después de una transferencia en el actinomicetoma experimental.
2. Evaluar el tipo de microambiente, pro-inflamatorio y/o anti-inflamatorio, en la lesión.
 - a. Comparar los niveles de expresión de las citocinas IL-4, IL-13, M-CSF, y GM-CSF en la lesión durante su desarrollo.

- b. Comparar los niveles de expresión de los marcadores de los macrófagos M1 y M2 en la lesión durante su desarrollo.

CAPÍTULO 5

MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Reactivos y su preparación

Para preparar el reactivo de Bradford se disolvió 100 mg de Azul de Coomassie G-250 (Sigma-Aldrich, B1131) en 50 mL 95% etanol, se añadió 100 mL 85% ácido fosfórico (Productos Químicos de Monterrey) y se aforó a 1L con agua pura (H₂O). Se filtró con un filtro Whatman y se guardó protegido de la luz.

El RPMI incompleto (iRPMI) consistía de RPMI 1640 (Sigma)/25mM HEPES/24 mM bicarbonato para cultivo celular (todos de Sigma) y antibióticos (penicilina 50-100 U/mL, Sigma; estreptomycin 50-100 µg/mL, Sigma P0781), y fue complementado con 10% suero bovino fetal (SBF; Cellgro, catno. 35-010-CV) (cRPMI). Para obtener macrófagos y DC derivados de la médula ósea, el complemento fue inactivado por calor (30 min. 56°C) (SBF-IC).

Un stock de 10 mM del succinimidil éster de carboxifluoresceína (CFSE por sus siglas en inglés, Molecular Probes, Invitrogen, V12883) en dimetil sulfóxido (DMSO) fue almacenada a -20°C. El stock de CFSE fue diluido en una solución salina amortiguador de fosfato 10 mM, pH 7.3 (PBS) a la concentración final deseada y atemperada a 37°C antes de su uso. El CFSE permite rastrear las células durante lapsos de incluso 8 semanas¹³⁷.

5.1.1 Factores de diferenciación

El factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) está presente en medio condicionado por la línea de fibroblastos de ratón L929 (LCM, por sus siglas en inglés: "L929 conditioned medium"^{138, 139}). LCM fue recuperado de un cultivo celular de L929 con 3-7 días de confluencia sin cambios de medio. El LCM fue filtrado (0.22 μm) antes de realizar alícuotas de 40 mL las cuales fueron mantenidas a -20°C hasta su uso. La línea celular se almacenó en medio cRPMI/5% DMSO a -80°C , después de un proceso de congelamiento lento con los siguientes pasos: 30 min. a 4°C , mínimo 1 hora (h) a -20°C . El proceso de descongelación fue rápido en un baño a 37°C , seguido por 2 lavados en iRPMI (500 x *g* durante 7-10 min). La línea fue cultivada en cRPMI.

El factor GM-CSF recombinante de ratón (rGM-CSF, Peprotech no. 315-03) y la IL-4 recombinante de ratón (rIL-4, Peprotech no. 214-14) fueron disueltos en PBS como 100x stocks (de 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) según las indicaciones del proveedor; alícuotas de 500 μL fueron almacenados a -80°C .

5.1.2 Anticuerpos para citometría de flujo

Para la inmunotipificación de los macrófagos y DC se emplearon una serie de anticuerpos conjugados con fluorocromos específicos para CD11b, CD11c, F4/80 y CD205 (tabla 2).

Tabla 2. Características de los anticuerpos utilizados en la inmunotipificación de macrófagos y DC por citometría de flujo.

Anti-antígeno	Conjugado*	Origen, isótipo	clona	Proveedor	No. de cat.
Anti-ratón CD11b	APC	Rata, IgG2b	M1/70	eBioscience	17-0112
Anti-ratón CD11c	PE	Hámster, IgG	N418	eBioscience	12-0114
Anti-ratón F4/80	PE	Rata, IgG2a	BM8	eBioscience	12-4801
Anti-ratón CD205	APC	Rata, IgG2a	205yekta	eBioscience	17-2051
Control isotipo	PE	Rata, IgG2a		Caltag	R2a04
Control isotipo	PE	Rata, IgG2b		Caltag	R2b04
Control isotipo	PE	Hámster IgG		Caltag	HM04

* APC = alofocianina, $\lambda_{ex/em}$: 633/660 nm; PE = ficoeritrina, $\lambda_{ex/em}$: 488/575 nm.

5.1.3 Primers

Los primers tipo Taqman y su sonda conjugada con FAM fueron obtenidos de Applied Biosystems. Los primers tipos SYBRGreen fueron diseñados con el software de Beacon Designer versión 7.9, para lo cual se introdujeron los números de acceso (NM_) o de identificación de genes (GI:) de *csf1*/M-CSF, *csf2*/GM-CSF, IL-4, IL-13, y gliceraldehído-3-fosfato dehidrogenasa (GAPDH) de ratón para

recuperar la secuencia. Dentro del programa, se efectuó un escaneo de BLAST y de estructuras secundarias antes de emplear la herramienta de diseño de primers para experimentos con SYBRGreen o para evaluar primers reportados en la literatura. Los primers seleccionados fueron analizados para determinar su especificidad mediante la herramienta de 'nucleotide blast' del NCBI y comprados de AlphaDNA (Quebec, Canada). Se analizaron los primers diseñados mediante la amplificación de los DNA complementarios (cDNA) de los genes blancos para los que fueron específicos, así como, se analizó 1) la temperatura óptima (T_{opt}) de amplificación, 2) la especificidad (mediante la curva de disociación), y 3) la eficiencia (mediante una curva estándar y aplicando la fórmula de eficiencia, $E = 10^{-1/\text{pendiente} - 1}$) (tabla 3).

Tabla 3. Lista de primers y/o sondas empleados en la PCR en tiempo real (RT-PCR).

<i>Gen/Protein</i>	No. de acceso (ncbi)	forward primer' 5'→3'	'reverse primer' 5'→3'	Tamaño amplicon	Temp. óptima
<i>Chi3l3/Ym1</i>	NM_009892	AB*: Mm00657889-mH:FAM		90	60
<i>csf1/M-CSF</i>	NM_007778	CCAGTCTCACCTACCATA	GCATCAGAACAAGTTGGA	105	58
<i>csf2/GM-CSF</i>	NM_009969	ATTCCACAACCTCAGGTAG	TACACAGTTAGAGGAAATGA	75	60
<i>gapdh/GAPDH</i>	NM_008084	AB: Mm03302249_g1:FAM		107	60
IL-4	NM_021283	AB: Mm00445259_m1:FAM		79	60
IL-13	NM_008355	GTAGCCCACTTTATAACA	GTCTCTCCTCATTAGAAG	77	57
<i>nos2/iNOS</i>	NM_010972	AB: Mm00440502_m1:FAM		66	60
<i>retnlα/FIZZ1/Relmα</i>	NM_020509	AB: Mm00445109_m1:FAM		86	60

AB* = Applied Biosystems

<http://bioinfo.appliedbiosystems.com/genome-database/gene-expression.html>

5.1.4 Kits de Ensayos por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA)

La determinación de citocinas y factores estimuladores de colonias se realizó por la técnica de ELISA doble sándwich empleando kits comerciales, tabla 4.

Tabla 4. Especificación de los kits de ELISA

Kit	Proveedor	No. de catálogo
Murine M-CSF ELISA development kit	Peprotech	900-K245
READY-SET-GO! Mouse GM-CSF	eBioscience	88-7334-22
READY-SET-GO! Mouse IL-4	eBioscience	88-7044-22
READY-SET-GO! Mouse IL-13	eBioscience	88-7137-22

5.2 Material biológico vivo

5.2.1 Animales de experimentación

Los ratones BALB/c fueron mantenidos en el bioterio del departamento de Inmunología de la Facultad de Medicina bajo condiciones controladas con agua y alimentos para roedores (Purina) *ad libitum*. Se respetaron las normas éticas y de investigación establecidas por el Comité Institucional y referidas en la NOM 062-200-1999. El Comité Bioético de la Facultad de Medicina aprobó el protocolo con el nr. IN 10-003.

5.2.2 Células bacterianas

La cepa bacteriana *Nocardia brasiliensis* (ATCC 700358; Nb) se conservó a -80°C en 2% leche descremada en polvo (Skim Milk Powder OXOID)/0.85% solución salina estéril (NaCl de Baker; SS) o en 40% glicerol/infusión cerebro corazón (BHI, por sus siglas en inglés, OXOID). En caso de haber sido almacenada con leche, la masa bacteriana fue lavada 2-3 veces con 40 mL SS centrifugando en cada ocasión a 1600 x g durante 10 min. y después fue resuspendida en su volumen original en SS. Se inocularon 3 matraces (de 250 mL) con 50 mL de BHI, previamente esterilizados, con las alícuotas bacterianas de 2 viales. Nb fue cultivado durante 3 días a 37°C hasta su fase log de crecimiento. Al cosechar Nb, primero se descartó el medio de cultivo y después se lavó la película bacteriana con 40 mL SS y centrifugando a 1600 x g durante 10 min. La masa bacteriana fue resuspendida en 10 mL SS y homogeneizada con Potter (Wheaton) o Dounce. El homogenizado se dejó reposar 10-15 min. a temperatura ambiente y se recuperó el 'sobrenadante' con una jeringa de 1 mL (Sensimedical) con una aguja de 18G (rosa).

5.2.3 Infección de ratones y obtención de biopsias

Los ratones hembras BALB/c de 8-11 semanas de edad fueron inyectadas con 100 µL del homogenizado bacteriana de Nb (peso húmedo 70-90 mg equivalente a 1 millón unidades formadores de colonias) con una jeringa de insulina (aguja 27G) en el cojinete plantar de la pata izquierda trasera del roedor.

Se monitoreó el desarrollo de la inflamación o del actinomicetoma midiendo la longitud, anchura y grosor de la pata y se calculó el volumen con la fórmula del elipsoide ($4/3\pi r_1 r_2 r_3$; r = radio; Apéndice A). Para experimentos del microambiente, los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical y se tomaron biopsias del cojinete plantar (n=5) a los siguientes puntos en el tiempo: 0, 0.5, 1, 3, 7, 15, 30, y 60 días (d). La mitad de una biopsia fue colocada en 1 mL PBS, pH 7.3, para la detección de proteínas, y la otra mitad en 1 mL de Trizol (Invitrogen, catno. 15596-018), para la extracción del ácido ribonucleico (RNA), y guardada a 0°C. Sólo en el caso del día 0, el cojinete plantar izquierdo fue aprovechado completamente para experimentos de expresión génica, mientras que el cojinete plantar derecho fue aprovechado para la cuantificación de proteínas. Las muestras recolectadas fueron homogeneizadas con un TissueTearer (Biospec Products Inc. Modelo 985370-395) en posición 10-15 durante 2-3 min. a 0-4°C. En el caso de un homogeneizado en Trizol se incubó después 15-20 min a temperatura ambiente y posteriormente fueron almacenadas a -80°C hasta su uso. Entre cada muestra se lavó el equipo con 70% etanol y agua destilada. De las muestras en PBS se tomó una alícuota de 30 µL para la determinación de proteínas totales por Bradford (Apéndice B). Las muestras fueron normalizadas a una concentración protéica de 1 mg/mL en PBS y se realizaron alícuotas (de 220-250 µL) que fueron guardadas a -80°C hasta su uso.

Para los estudios de linaje de células espumosas se tomaron biopsias del cojinete plantar infectado y del bazo a los días 1, 3 o 7 después de la transferencia

de células marcadas ($n = 3-5$), las cuales fueron fijadas inmediatamente en 10% formalina¹⁴⁰.

5.2.4 Obtención de macrófagos derivados de la médula ósea (MDMO).

Los ratones BALB/c de 6 semanas en adelante fueron sacrificados por dislocación cervical y semi-esterilizados con etanol al 70%. En condiciones semi-estériles (trabajando cerca de un mechero, pasando pinzas y tijeras por la flama, uso de 70% etanol en el manejo de equipo y ratón), la piel de las patas traseras fue eliminada, el ligamento sobre la rodilla cortado y las articulaciones de rodilla, tobillo y cadera fueron luxadas. Los fémures y tibias fueron recuperados y guardados en 5 mL iRPMI. Dentro de una campana de flujo y utilizando equipo estéril se cortaron los epífisis de los huesos, los cuales fueron perfundidos con iRPMI utilizando una jeringa de insulina, para recolectar y juntas las médulas óseas en un caja de Petri de 4 cm de diámetro. Después de homogeneizar por pipeteo, y lavar con iRPMI (400 x *g*, 8-10 min.), una muestra de la suspensión celular fue diluido 1:10 con 2% ácido acético/PBS y contado en un hemocitómetro. Se cosechó entre $28-60 \times 10^6$ células/ratón. Las células de la médula ósea fueron sembradas a una densidad de ca. 1×10^5 células/cm² con 0.125-0.2 mL medio de cultivo/cm² en cajas Petri de 10 cm. de diámetro (Corning 430293), equivalente a 8-10 millones de células/10 mL/placa Petri) suplementado con su medio de diferenciación apropiado (vea tabla 5). La mitad del medio de cultivo fue reemplazado cada segundo o tercer día hasta su diferenciación (6 días). Las

células fueron cosechadas en frío (10-20 min. encima de geles fríos) y con ayuda de escrapers (Corning-Costar 3010). Después de homogeneizar las células por pipeteo, y lavarlas en PBS (400 x *g*, 8-10 min.), se tomó una muestra que fue diluía 1:2 con 0.4% azul de tripano/PBS para el conteo celular.

5.2.5 Obtención de células dendríticas derivados de la médula ósea (DCDMO).

El proceso es similar a la generación de macrófagos derivados de la médula ósea con las siguientes observaciones y modificaciones. 1) Antes de sembrar las células de la médula ósea se aplicó un hemólisis: a 0.5 ml suspensión celular se añadió 5 mL amortiguador de lisis 1x (=0.8% NH₄Cl/0.08% NaHCO₃/0.04% EDTA en H₂O) y se agitó gentilmente durante 10 min. a temperatura ambiente. Para detener la hemólisis se añadió 5 mL de iRPMI frío y se lavó dos veces con iRPMI (400 x *g*, 8-10 min. a 4°C). 2) Durante la diferenciación con el medio para la diferenciación en DC, especificado en la tabla 5, se forman neutrófilos y macrófagos aparte de las DC¹⁴¹. Para eliminar los neutrófilos consta un par de lavados con PBS antes de la cosecha o el marcaje, ya que son células en suspensión. Para eliminar los macrófagos se aplicó una depleción magnética después de la cosecha. Se concentró la suspensión celular en 100-200 µL y se incubó con anti-F4/80 conjugado con biotina (clona BM8, eBioscience, catno. 13-4801-81), diluido 1:100 en cRPMI, durante 15 min. a temperatura ambiente más 30 min. a 4°C. Después de lavar 2 veces con 2 mL PBS (400 x *g*, 4°C) se eliminó

todo el sobrenadante, se resuspendieron las células en 90 μ L de "label buffer" (2 mM EDTA/PBS pH 7.2, desgasificado), se añadió 10 μ L de la suspensión de perlas magnéticas conjugados con streptavidina (Miltenyi Biotec, catno. 130-048-101), y se incubó durante 15 min. a 4°C en la oscuridad. Se lavó la suspensión celular dos veces con el "label buffer" (300 x g, 10 min.) y se resuspendieron las células en un volumen final de 500 μ L de buffer de separación (= 0.5% w/v albúmina sérica bovina/"label buffer") desgasificado. Se pasó la suspensión celular por una columna MS (Miltenyi Biotec, catno. 130-042-201) que atrapa las células marcadas con las perlas magnéticas mientras que las DC fueron recolectadas en 2 mL buffer de separación. Los macrófagos F4/80+ fueron eluidos por fuerza cinética y recolectadas en 1 ml buffer de separación.

Tabla 5. Medios de diferenciación

Base	suplementado:	
	Para macrófagos (MDMO)	Para DC (DCDMO)
cRPMI (como especificada en la sección 5.1) + suero bovino fetal inactivado por calor (56°C, 30 min.)	30% LCM (vea arriba)	20 ng/mL rmGM-CSF 20 ng/mL rmIL-4

5.2.6 Marcaje de MDMO y DCDMO con CFSE.

Las células fueron cargadas con CFSE según las instrucciones del proveedor (Molecular Probes, cat.no. V12883). A partir de un stock de CFSE a 10 mM en DMSO, se diluyó hasta la concentración deseada (2-50 μ M) en PBS pre-ambientado. Primeramente las células fueron lavadas con PBS y después

incubadas durante 15 min. a 37°C con la solución CFSE para que el reactivo ingresará a la célula. Posteriormente, se realizaron dos lavados con PBS o iRPMI frío para eliminar el reactivo no incorporado y las células fueron re-cultivadas con cRPMI para activar el CFSE, que consiste en la desacetilación y unión a proteínas intracelulares lo cual también genera el fluoróforo. En caso de que las células (semi)adherentes se hubiesen desprendidas durante la incubación con CFSE se lavó por medio de centrifugación (400 x g, 8 min.). Las células marcadas se cultivaron 1 día con cRPMI para que las células pudieron recuperar su morfología típica, la cual fue verificada antes de la cosecha.

5.2.7 Inmunofenotipificación de MDMO y DCDMO por citometría de flujo

En tubos para citometría de flujo (Falcon 352058) se colocó 50 µL de la suspensión celular (0.5-1x10⁶ células/cRPMI) en cada uno, seguido de una incubación con suero hiperinmune de ratón (que había sido inmunizado con Nb muerto por calor: 1:50, 10 min. temperatura ambiente) para bloquear los receptores Fc. Posteriormente, se añadió 50 µL de una de las siguientes soluciones 2x de anticuerpos específicos o de control, diluidos en cRPMI:

- a) CD11b-APC (1:150) + CD11c-PE (1:40);
- b) F4/80-PE (1:80) + CD205-APC (1:625);
- c) anticuerpos control de isotipo (1:100), y
- d) el control sin tinción.

Las muestras fueron incubadas durante 15 min. a temperatura ambiente más 30 min. a 4 °C. Después de 3 lavados con 2 mL PBS frío (400 x g, 10 min.), las células fueron resuspendidas en 500 µL PBS. En caso necesario, fueron fijadas, ya sea en 0.37% formaldehído/PBS a 4°C en la oscuridad hasta su lectura o por 10 min. en 3.7% formaldehído/PBS a temperatura ambiente seguidos de 3 lavados con PBS y otra vez resuspendidas en 500 µL PBS y almacenadas a 4°C en la oscuridad hasta su lectura. De cada muestra, por lo menos 10,000 células fueron analizadas en un FACS-Calibur (BD, San José CA del Servicio de Hematología) o un FACS-Canto II (BD, San José CA del Servicio de Hematología o CIDCS) por un experto en citometría de flujo (Dr. A.G. Rosas-Taraco). La fluorescencia inespecífica fue establecida con la muestra control sin tinción y se determinaron las células positivas para cada marcador celular estudiado.

5.2.8 Prueba de fagocitosis

Los macrófagos fueron sembrados a 1×10^5 células/cm² y se incubaron 4-24 horas a 37°C, para que se adherieran a la placa. Se añadieron microesferas de Látex carboxiladas de 2 µm (Polysciences catno. 18327, Warrington, PA, USA) en una razón de 10-30 microesferas/célula y se incubó de 1-4 h a 37°C. El proceso de fagocitosis fue detenido por la adición de 2-3 volúmenes de PBS frío y se realizaron lavados para eliminar microesferas libres. Opcionalmente, se fijaron las células con 10% formalina o metanol absoluto en frío (10 min.). Se contaron 100 células por duplicado y se determinó el porcentaje de células que habían

internalizado partículas de Látex. El experimento se repitió en dos ocasiones. Para determinar una diferencia significativa entre la capacidad fagocítica de los macrófagos marcados y los controles se aplicó una prueba T de Student; un valor $P < 0.05$ fue considerado como significativo.

5.2.9 Transferencia adoptiva

Se generó una suspensión celular de 2×10^5 - 10×10^6 células (MDMO o DCDMO marcados con CFSE)/mL en PBS; 100 μ L de esta suspensión (equivalente a 2×10^4 - 1×10^6 células) fue inyectado con una jeringa de insulina en ratones hembra BALB/c en los siguientes sitios:

- a) Subcutáneamente en el cojinete plantar izquierdo trasero (o sea el lugar de la lesión de actinomicetoma;
- b) intravenosa (i.v.) en la vena caudal, o
- c) intraperitoneal (i.p.).

Los tiempos experimentados para la transferencia fueron:

- a) 4 h antes de infectar;
- b) 4h después de infectar;
- c) día 15 de la infección;
- d) día 30 de la infección, y
- e) día 50-60 de la infección.

Las células sobrantes fueron re-cultivadas para verificar la recuperación de su morfología típica y su capacidad fagocítica y así comprobar que las células transferidas estaban en buena condición.

5.3 Manipulación de las biopsias

5.3.1 Preparación histológica

Las biopsias fijadas en 10% formalina¹⁴⁰ (8-24 h) fueron lavadas 3 veces en PBS (pH7.3; cada lavado \geq 2 h), y guardadas en 30% sucrosa (Sigma no. S0389)/PBS a 4°C durante al menos 1 día¹⁴², antes de ser incluidas en OCT (Tissue Tek 4583) y congeladas a -20°C procurando la oscuridad a través de todo el proceso. Se realizaron cortes de criostato de 10 μ m (realizado por el Mtro. Viktor Romero en el departamento de Histología de la Fac. de Medicina de la UANL) a diferentes profundidades de la biopsia, los cuales fueron recolectados en un portaobjeto cubierto con Polysine (Thermo Scientific, catno. P4981-001) por triplicado e inmediatamente mantenidos en oscuridad antes de su almacenamiento a -20°C hasta su uso.

5.3.2 Tinción de lípidos neutros

Para la tinción de los lípidos de las gotas lipídicas, se aplicó el fluoróculo Rojo de Nilo(Molecular Probes, N1142, Eugene, Oregon, USA)¹⁴³. Un stock de 1 mg/mL en metanol (Sigma), mantenido a 4°C en oscuridad, fue diluido 1:3,333 en

PBS pH 7.3. Los cortes fueron incubados con la solución de Rojo de Nilo (300 ng/mL) durante 15 min. a temperatura ambiente. Posteriormente, las laminillas fueron lavados 2-3 veces con PBS, montadas en Vectashield con DAPI (Vector Laboratories, catno. H-1200) y selladas con esmalte transparente. Las laminillas fueron analizadas en un microscopio confocal LSM700 o LSM710 (Zeiss) controlado por software Zen2011 (Zeiss), ambos manejados por un experto (Dr. Juan Carlos Segoviana-Ramírez, CIDICS). Para la visualización de los componentes teñidos con los diferentes fluoróforos se emplearon las siguientes ondas de longitud:

- a) Núcleos fueron teñidos con diamino-2-fenilindole (DAPI): $\lambda_{Ex/Em} = 360/458-531$ nm;
- b) Células transferidas fueron marcadas con CFSE: $\lambda_{Ex/Em} = 488/490-569$ nm, y
- c) Gotas lipídicas fueron teñidos con Rojo de Nilo: $\lambda_{Ex/Em} = 591/594-692$ nm o de manera alternativa $\lambda_{Ex/Em} = 514/528$ nm ¹⁴³.

5.3.3 Extracción del RNA

A partir del homogeneizado en Trizol (1 mL) se extrajo el RNA adicionando 0.2 mL de cloroformo (Sigma, catno. E7023), se agitó vigorosamente por inversión manual por 15 s, se incubó al menos 3 minutos a temperatura ambiente y finalmente se centrifugó a 11,000 x *g* por 15 min. a 4°C. La fase acuosa fue trasladada a un microtubo limpio y los ácidos nucleicos fueron precipitados por adición de 0.5 mL isopropanol (Sigma, catno. I9516) frío, se invirtió el microtubo 10

veces y se incubó durante 10 min. a temperatura ambiente, para continuar con una centrifugación a 11,000 x *g* por 10 min. a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se lavó la pastilla con 1 mL de 70% etanol/H₂O pura tratada con dietilpicrocarbonato (H₂O-DEPC), se mezcló con el Vortex y se centrifugó a 7400 x *g* por 5 min. a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se dejó evaporar el resto del etanol a temperatura ambiente (aproximadamente 20-25 min.) hasta que la pastilla resultó semi-seca. Para eliminar el DNA, se disolvió la pastilla en 5-7 µL H₂O-DEPC y se incubó con 1 µL del amortiguador de DNasa 10x más 2-4 µL de DNasa (Promega catno. M6101), generando un volumen final de 10 µL, durante 30 min. a 37°C. La reacción fue detenida al añadir 1 µL solución 'DNase-STOP' (Promega) con una incubación a 65°C por 10 min. Para eliminar los reactivos del tratamiento con DNasa se repitió la extracción adicionando 1 mL de Trizol, se mezcló con un Vortex y se incubó 5 min. a temperatura ambiente para después repetir la extracción de RNA según lo descrito anteriormente, pero en ésta ocasión, después de evaporar el etanol, se disolvió la pastilla de RNA en 32 µL H₂O-DEPC. Se determinó la concentración y pureza del RNA total mediante espectrofotometría (BioRad SmartSpec) realizando diluciones 1:100 en Tris/EDTA (10 mM/1mM, pH 8.0; TE) y esta solución fungió como blanco. La concentración del RNA en ng/µL fue estimado multiplicando la densidad óptica (DO) a 260 nm por 40 y la factor de dilución. Como criterio de pureza, se exigió una razón $DO_{260/280} \geq 1.7$ (Apéndice C). Las muestras fueron almacenadas a -80°C hasta su uso.

5.3.4 Retrotranscripción

A partir del RNA total extraído de las biopsias obtenidas a los diferentes tiempos, se realizó el procedimiento para obtener cDNA. Primeramente, se desnaturalizaron las sondas tipo hexámeros al azar y las muestras de RNA total durante 5 min. a 70°C en un bloque térmico (Labnet) y después, éstas fueron mantenidas en hielo. Se preparó la mezcla de transcripción: 4 µL amortiguador 5x, 2 µL de un stock 10x de ditiotreitól (conc. final 10 mM), 2.5 µL de una solución de desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTP; conc. final 10 mM, Epicentre D08104), 2 µL solución de sondas al azar (previamente desnaturalizada; conc. final 10 ng/µL; Invitrogen no. 48190-011), 2 µg de RNA (previamente desnaturalizado) y H₂O-DEPC hasta un volumen de 19 µL, para al final añadir 1 µL de la enzima (M-MLV-RT: Invitrogen no. 28025-013). La retrotranscripción se llevó a cabo en un termociclador (PTC200, MJ Research) con el esquema: 1h 37°C, 15 min. 70°C, 1 min. 4° C. Se determinó la concentración y pureza del cDNA mediante espectrofotometría (BioRad SmartSpec) realizando diluciones 1:100 en TE. La concentración del cDNA en ng/µL fue estimado multiplicando la DO₂₆₀ por 50 y la factor de dilución. Como criterio de pureza, se exigió una razón DO_{260/280} ≥ 1.7; Apéndice D). Las muestras fueron almacenadas a -20°C hasta su uso.

5.3.5 RT-PCR semi-cuantitativa (qPCR) por SYBRGreen

Por duplicado, se mezcló 500 ng de cDNA con 5 pmol (1 µL) de cada stock de primer de 5µM, 10 µL IQTM SYBRGreen Supermix 2x (BioRad, catno. 170-

8880), y H₂O-DEPC hasta un volumen final de 20 µL. Las reacciones de PCR fueron llevados a cabo en un termociclador CFX96 (BioRad, Hercules, CA). Las condiciones de amplificación fueron: 50°C 10 min., 90°C 3min., y 40 ciclos de 90°C 30 s, y T_{óptima}°C 30 s (vea tabla 3). Para la curva de disociación se aumentó la temperatura de 65°C a 95°C con intervalos de 0.5°C durante 5 s y una lectura en cada paso. En experimentos preliminares se comprobaron: 1) la capacidad de amplificación de los primers; 2) su especificidad por medio de la curva de disociación probando diferentes temperaturas de alineamiento/amplificación y concentraciones de los primers; y 3) su eficiencia (E) mediante una curva estándar con diluciones en base de log₁₀ del cDNA, considerando que una eficiencia de 100% genera un factor de amplificación igual a 2). El ciclo umbral (Ct, por sus siglas en inglés) del gen de interés fue normalizado con el Ct del gen de referencia (GAPDH) para obtener el ΔCt de cada muestra individual. Posteriormente, se determinó el ΔΔCt (ΔCt de la muestra de día 0 o de la primera con una señal detectable - ΔCt muestra de los días posteriores) y la expresión relativa (ER) fue calculada empleando el método de Livak con la fórmula de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ¹⁴⁴.

5.3.6 RT-PCR semi-cuantitativa por Taqman

Por duplicado, se mezcló 500 ng de la solución de cDNA con 0.5 µL de la solución con primers y sonda específicos 20x (Taqman; especificaciones en sección reactivos) –utilizándola como 40x-, 10 µL del 2x IQTM Supermix (BioRad cat.170-8862) y H₂O-DEPC generando un volumen final de 20 µL. El programa del

termociclador fue según las indicaciones del proveedor: 50°C 2 min, 95°C 10 min, y 40 repeticiones de 95°C 15 s y 60°C 1 min (Applied Biosystems). La expresión génica relativa fue calculada como se describió en la sección anterior.

5.3.7 Cuantificación de proteínas por Bradford

Se utilizó una curva estándar generado desde una solución de albúmina sérica bovina (ASB, Serologicals 81-003-07). Una solución stock de ASB (1 mg/mL) fue diluido 1:50 en H₂O destilada. Se realizaron 5 estándares y un blanco como especificado en la tabla 6.

Tabla 6. Preparación de la curva estándar y muestras en la prueba Bradford

ASB (µg/mL)	ASB 1:50 (µL)	H ₂ O (µL)	Reactivo Bradford* (µL)
0	-	200	200
2	20	180	
6	60	140	
10	100	100	
14	140	60	
18	180	20	
Dilución muestras	Muestra (µL)	H ₂ O (µL)	Reactivo Bradford (µL)
1:10	10 (de muestra original)	90	200
1:100	20 (de 1:10)	180	
1:500	4 (de 1:10)	196	
1:1000	2 (de 1:10)	198	

* Reactivo de Bradford (vea sección 5.1 reactivos y su preparación)

Después de añadir la solución de Bradford se agitó fuertemente y se transfirieron 150 µL a pocillos de una placa de poliestireno (Costar) por duplicado. La placa fue

leída en un lector de placas a DO_{595} (iMark MicroPlate Reader + Microplate Software Manager 6, BioRad) antes de pasar 30 min.

5.3.8 ELISA

Se cuantificaron las citocinas a partir de las muestras homogeneizadas en PBS y normalizados a 1 mg proteína/mL por medio de diferentes kits de ELISA según las indicaciones de los proveedores (M-CSF: Peprotech no. 900-K245; GM-CSF, IL-4 e IL-13; Ready-Set-Go eBioscience cat.no. 88-7334-22, 88-7044-22, 88-7137-22. respectivamente). En breve, los pocillos fueron cubiertos con el anticuerpo de captura durante toda la noche, bloqueados con una solución protéica (1 h), y después se incubó con 100 μ L de las muestras o las diluciones 1:2 de la serie estándar por duplicado (2h), seguido por una incubación de 1-2h con el anticuerpo de detección conjugado con biotina y por el complejo avidina-peroxidasa de rábano con lavados (5 x 250-300 μ L de PBS/0.1% Tween 20 (Sigma P1379) entre cada paso. Al final se añadió 100 μ L del sustrato más el cromógeno. Cuando el cromógeno fue tetrametilbenzidina (TMB) (en el caso de los ELISAs ebioscience), se detuvo la reacción con 50 μ L 1M ácido sulfúrico y se leyó a DO_{450} (iMark MicroPlate Reader + Microplate Software Manager 6, BioRad). Cuando el cromógeno fue el ácido sulfónico de azino-di-etilbenziazolina (ABTS), se realizó un monitoreo de la placa a DO_{415} cada 5 min., asegurando que el DO_{415} del estándar 0 no sobrepasase 0.2 unidades ni el DO_{415} del estándar mayor a 1.2 unidades. Se calculó la concentración de la citocina en una muestra después de

promediar los valores de los duplicados y por intrapolación de la curva estándar de cada placa.

5.4 Análisis estadístico

En las pruebas de Bradford y ELISA, para cuantificar proteínas por medio de la intrapolación de las rectas de las curvas estándar, se exigió un $r^2 \geq 0.99$.

Para correlacionar la inflamación con la expresión relativa de los marcadores y citocinas, o éstos entre sí, se determinó el coeficiente de correlación de Pearson (r) de los medias de los variables. Considerando que se analizó material biológico con un $n = 5$ y amplia variabilidad, un $-0.7 < r < 0.7$ fue interpretado como una correlación fuerte.

La prueba T de Student fue empleada para comparar dos grupos con distribución normal.

La prueba de ANOVA con prueba posterior de Tukey se utilizó para la comparación múltiple de grupos con distribución paramétrico. Mientras la prueba Kruskal-Wallis en combinación con la prueba de Comparaciones Múltiples de Dunn fue usada para analizar diferencias significativas entre grupos que no tenían una distribución normal.

En todas las pruebas estadísticas, se consideró un $P < 0.05$ como valor significativo.

CAPÍTULO 6

RESULTADOS

6.1 Precursores de las células espumosas

6.1.1 Generación de posibles precursores singénicos y marcaje

6.1.1.1 CFSE no afecta el fenotipo ni la funcionalidad de MDMO

Las células de la médula ósea cultivados con 30% LCM se diferenciaron en macrófagos vírgenes en 5-6 días. En la figura 3 se puede observar como las células hematopoyéticas redondas y flotantes de la médula ósea se convirtieron en células adheridas con una morfología típica de macrófagos. La incubación con CFSE a concentraciones igual o mayor a 10 μM no afectó la viabilidad y la morfología de las células sobrevivientes, las cuales se volvieron más redondas. Incubaciones con CFSE a una concentración menor (2 μM) sólo causó un efecto temporal en la morfología de las células, recuperando su morfología típica al día siguiente del marcaje (fig. 3E y F).

El CFSE a 2 μM tampoco afectó la expresión de marcadores de superficie. A grandes rasgos, los macrófagos marcados con CFSE tenían el mismo perfil de expresión de los marcadores de superficie como los que no eran marcados: positivos para el CD11b (parte de la integrina alfa M o Mac-1), CD11c (parte de la

integrina alfa X o p150, 95) y el F4/80 (un receptor de manosa para macrófagos murinos), pero negativos para el marcador de un subclase de células dendríticas el CD205/DEC-205 (fig. 4; tabla 7). Al comparar los macrófagos marcados con CFSE con los controles se nota que no sólo se incrementa la señal en el canal del FITC/CFSE sino también en el canal de la ficoeritrina (PE) (fig. 4D), ya que la señal fuerte del CFSE influye en la detección de la señal de la ficoeritrina. Este fenómeno explica la mayor intensidad en los señales de CD11b y F4/80 en los células marcados con CFSE y que fueron detectados con ficoeritrina. Tomando este artefacto de la técnica en cuenta se puede considerar que el perfil de marcadores no se ve afectado por el marcaje con CFSE.

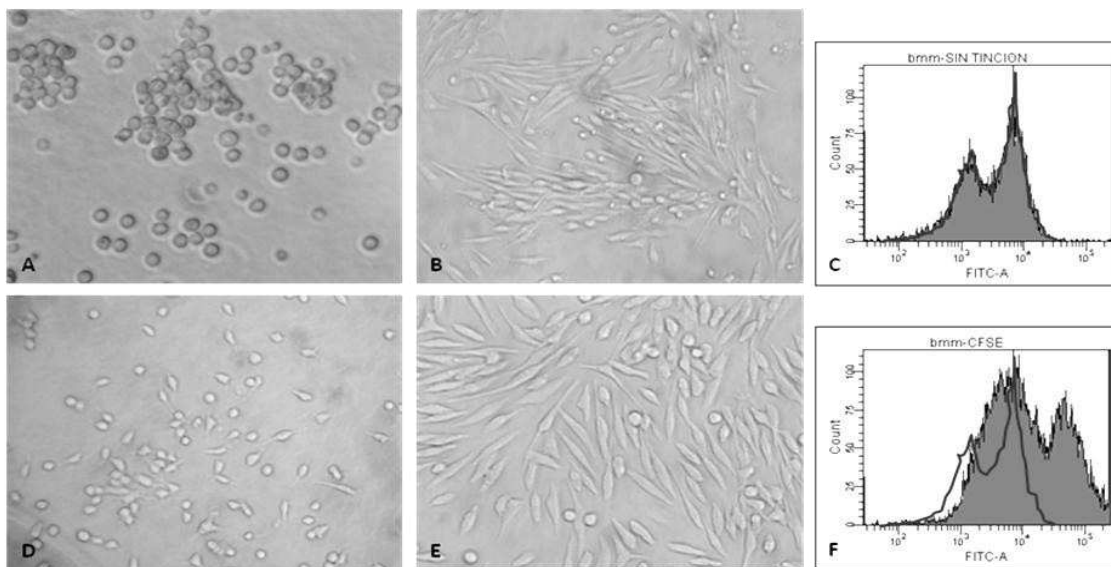


Figura 3. El marcaje con CFSE no altera la morfología de los MDMO.

Las células hematopoyéticas de la médula ósea en cultivo (A, día 0) con 30% LCMse diferencian en 6-7 días en macrófagos (MDMO) (B). Durante la incubación con el CFSE no metabolizado las células cambian temporalmente de morfología (D), pero recuperan su morfología una vez metabolizado intracelular (E). El marcaje exitoso con CFSE es comprobable con un aumento en el canal FITC durante citometría de flujo en el canal FITC (F) en comparación con el control (C).

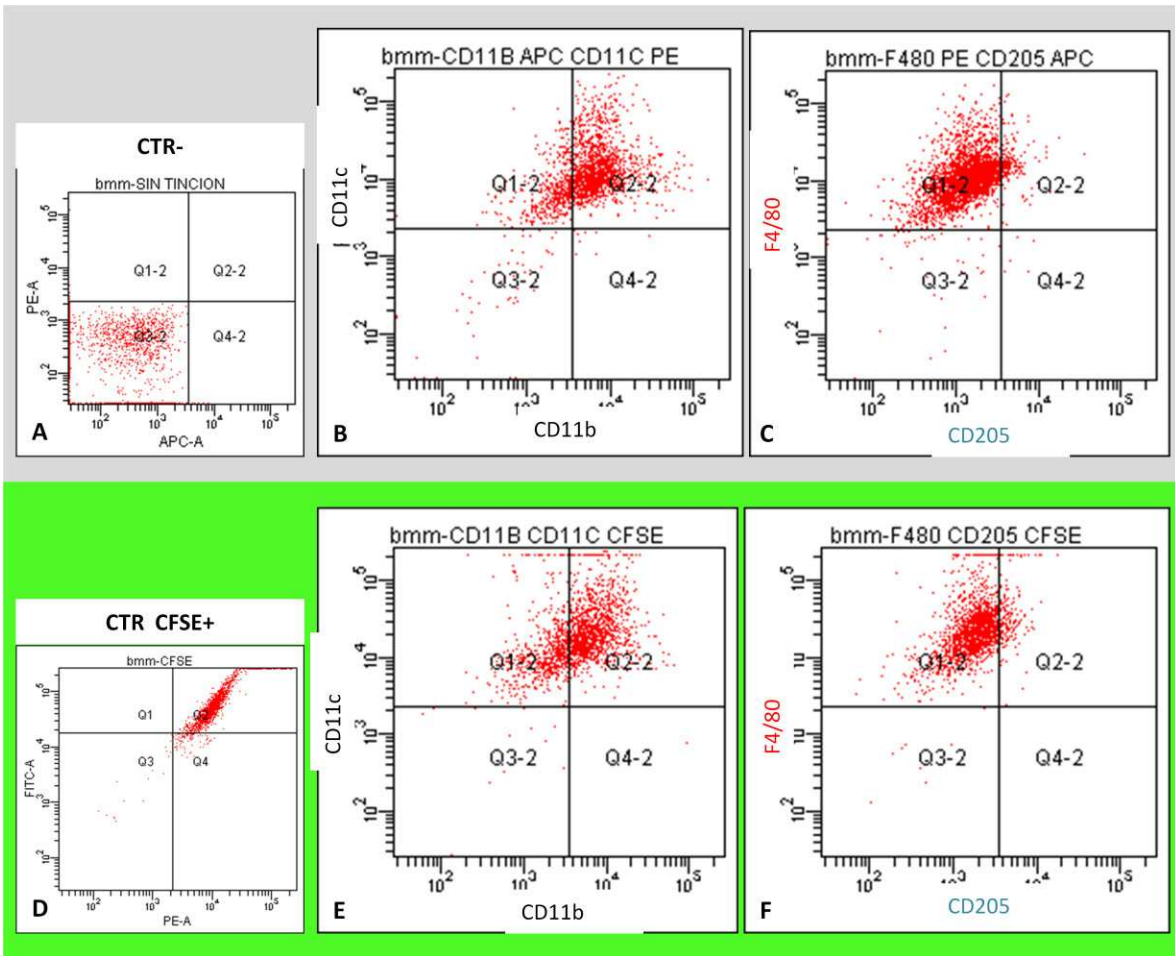


Figura 4. El marcaje con CFSE no altera el fenotipo de los MDMO. Los MDMO, menos el control (CTR), fueron incubados con una mezcla de anticuerpos conjugados con APC o PE además de un suero hiperinmune de ratón. Los MDMO sin marcaje (A, B, y C) y los MDMO marcados con CFSE (D, E, y F) fueron inmunoreactivos con anticuerpos típicos para macrófagos como el CD11b-APC, el CD11c-PE y el F4/80-PE, pero mucho menos con el CD205-APC, típico de DC.

Tabla 7. El marcaje con CFSE no altera significativamente el perfil de marcadores de MDMO.

	% MDMO inmunoreactivos para un marcador:			
CD	CD11b-APC	CD11c-PE	F4/80-PE	CD205-APC
MDMO CFSE-	73.0	97.0	98.5	6.0
MDMO CFSE+	67.3	99.2	99.5	12.0

El índice de fagocitosis no fue afectado por el marcaje con 2 μ M CFSE (fig. 5). En la figura 5 se observa que la gran mayoría de los macrófagos están llenos con partículas de Látex. El índice de fagocitosis de los macrófagos CFSE+ fue de 0.96 (\pm 0.03) versus los controles 0.975 (\pm 0.02). La diferencia no es significativa ($P = 0.363$).

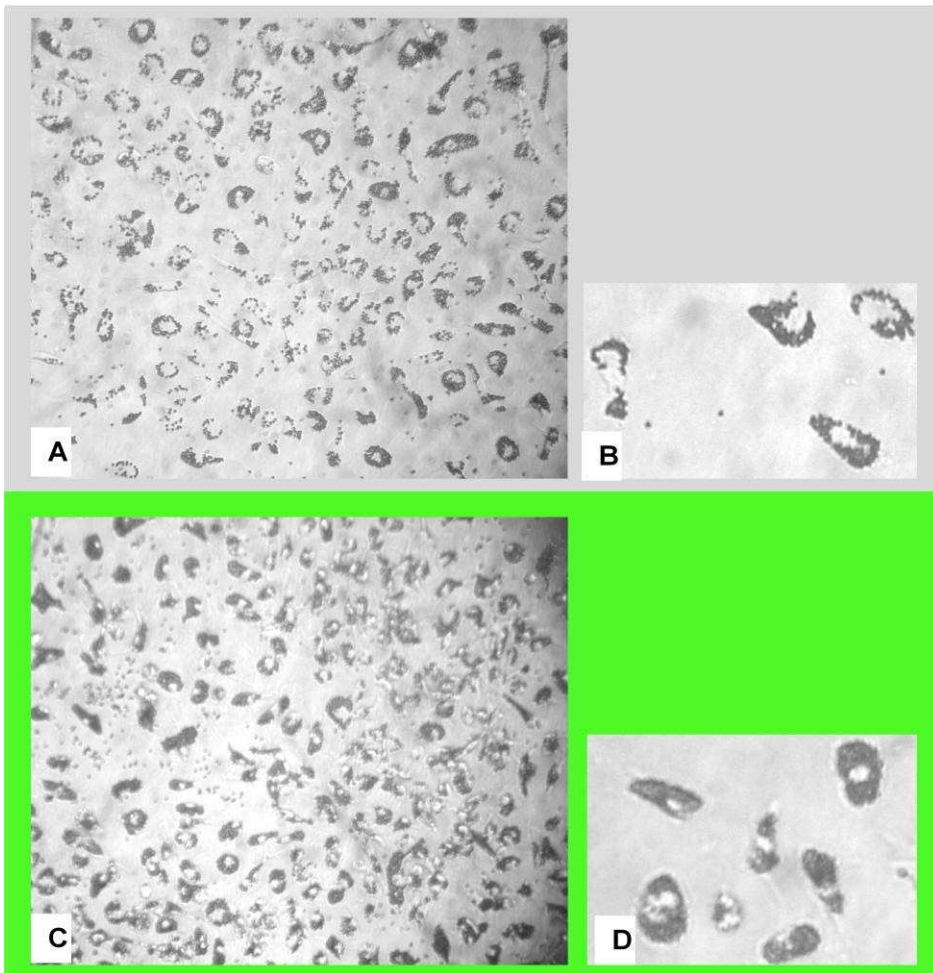


Figura 5. La capacidad de fagocitosis es intacta en los MDMO CFSE+.

Los macrófagos control (A y B) y los CFSE+ (C y D) fueron incubados con partículas de Látex con una razón partícula:M ϕ de 30:1 durante 3 h. Fotomicrografías panorámicas A y C: 100x; fotomicrografías de un detalla B y D: 200x + zoom digital.

6.1.1.2 Depleción de células contaminantes del cultivo de DCDMO

La diferenciación de DCDMO con GM-CSF e IL-4 genera una mezcla de 3 células: a) las DC semi-adherentes, b) macrófagos adherentes, y c) neutrófilos en suspensión¹⁴¹ (fig. 6A). Para eliminar los neutrófilos es suficiente cambiar el medio y/o hacer lavados con PBS. La depleción de macrófagos se logró por uso de un anticuerpo anti-F4/80 biotinilado y partículas magnetizadas conjugadas con estreptavidina. La figura 7 ilustra que la fracción DC fue depletada de macrófagos F4/80+. El marcaje con CFSE (fig. 6D), según la optimización comprobada en macrófagos (vea sección anterior), causó una disminución en la adherencia de DC (fig. 5C).

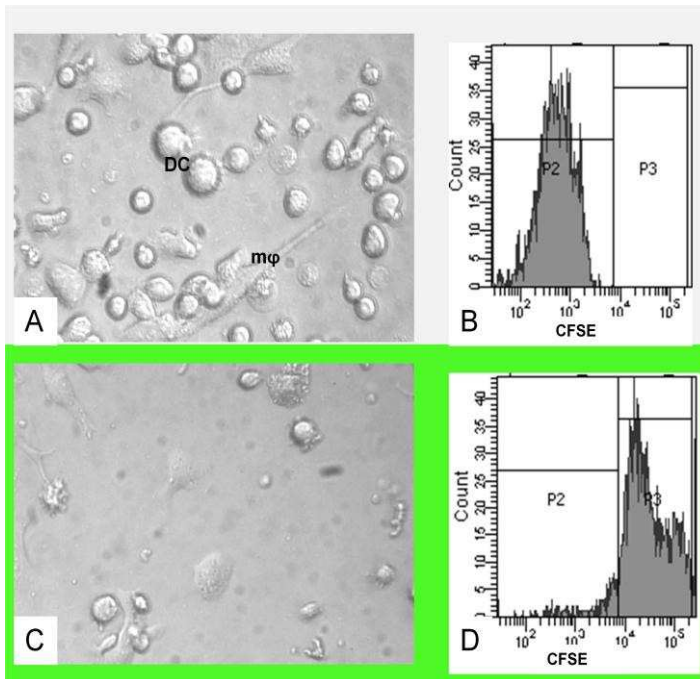


Figura 6. Células (semi-)adherentes derivadas de la médula ósea, cultivadas con GM-CSF e IL-4. A y B, Control sin CFSE (leído en el canal del FITC) a 5 días. DC = célula dendrítica inmadura, mφ = macrófago. C y D, marcado con CFSE.

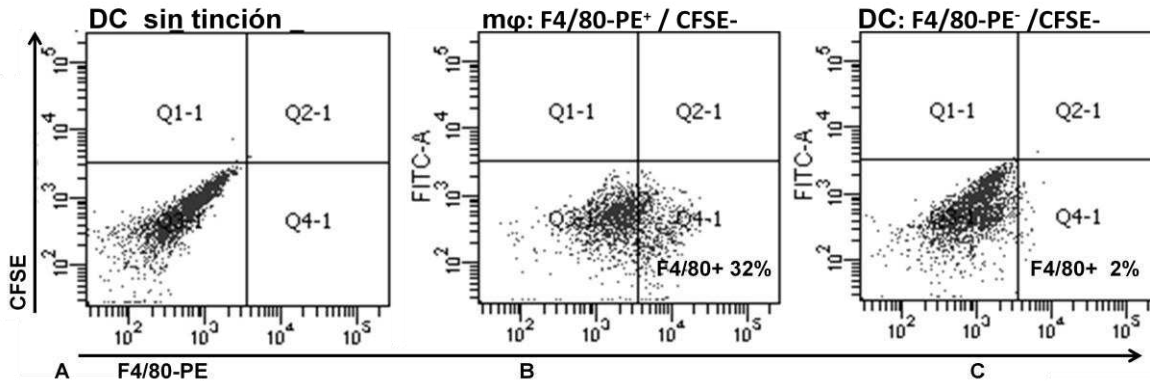


Figura 7. DC depletadas de macrófagos F4/80⁺. DC CFSE⁻ sin tinción por marcadores (A) fueron separados en B) una fracción de macrófagos (F4/80⁺) y C) una fracción libre de macrófagos.

6.2 Transferencia adoptiva de macrófagos y DC marcados

6.2.1 Rastreo de las células transferidas en el actinomicetoma

Para la optimización de la técnica de la transferencia adoptiva se emplearon los MDMO por ser más fáciles de generar. En cuanto al sitio de transferencia, resultó imposible encontrar células marcadas en la lesión después de transferencias por vía i.p. o i.v. Esto no fue sorprendente al considerar que probablemente la mayoría de las células transferidas son atrapadas en órganos como el bazo, el hígado u otros tejidos. Por lo anterior, la transferencia in situ tiene la ventaja de requerir menos células. En cuanto al momento de la transferencia, resultó exitoso transferir las células marcadas en una lesión de 15-50 días. Las primeras transferencias se realizaron el mismo día de la infección con Nb ya sea 4

h antes o después, pero no se pudo rastrear las células en las biopsias tomadas a 3, 7 o 15 días después de la transferencia. Una transferencia a lesiones igual o mayor de 60 días puede ser exitosa pero está la posibilidad de perder células al momento de transferir debido a las fistulas con aperturas hasta la superficie que se han formado en la lesión con cicatrización. La tabla 8 resume las condiciones empleadas en transferencias adoptivas donde se obtuvieron los mejores resultados.

Tabla 8. Condiciones de la transferencia adoptiva exitosa.

Variable	Descripción
Marcaje CFSE	Concentración de CFSE a 1-2 μ M, con cambios a las instrucciones del proveedor (vea discusión sección 4.1.2). Cosecha al día siguiente.
Lugar de transferencia	En la lesión, es decir en el cojinete planta izquierdo trasero (infectado).
Cantidad de células	5×10^4 – 5×10^5 células viables en 100 μ L de PBS.
Momento de la transferencia	15-50 días después de la infección.
Momento de la biopsia	3-7 días después de la transferencia.
Medida de control	Resembrar células sobrantes para verificar al día siguiente su morfología típica y/o su funcionalidad (con una prueba de fagocitosis).

6.2.2 Macrófagos y DC marcados en el anillo fibroso y acumularon gotas lipídicas

Los macrófagos y DC que habían sido transferidos en una infección de 30 días fueron rastreables 7 días después en la periferia de los microabscesos, yuxtapuestos a fibroblastos (fig. 8A y 8C, respectivamente), en el lugar típico de las células espumosas. Además, al teñirlos con Rojo de Nilo, se comprobó que habían acumulados gotas lipídicas (fig. 8B y 8D). Obviamente, también macrófagos y DC del hospedero podrían acumular gotas lipídicas, por lo cual algunas células mostrados se tiñeron de rojo sin tener la señal del CFSE en verde.

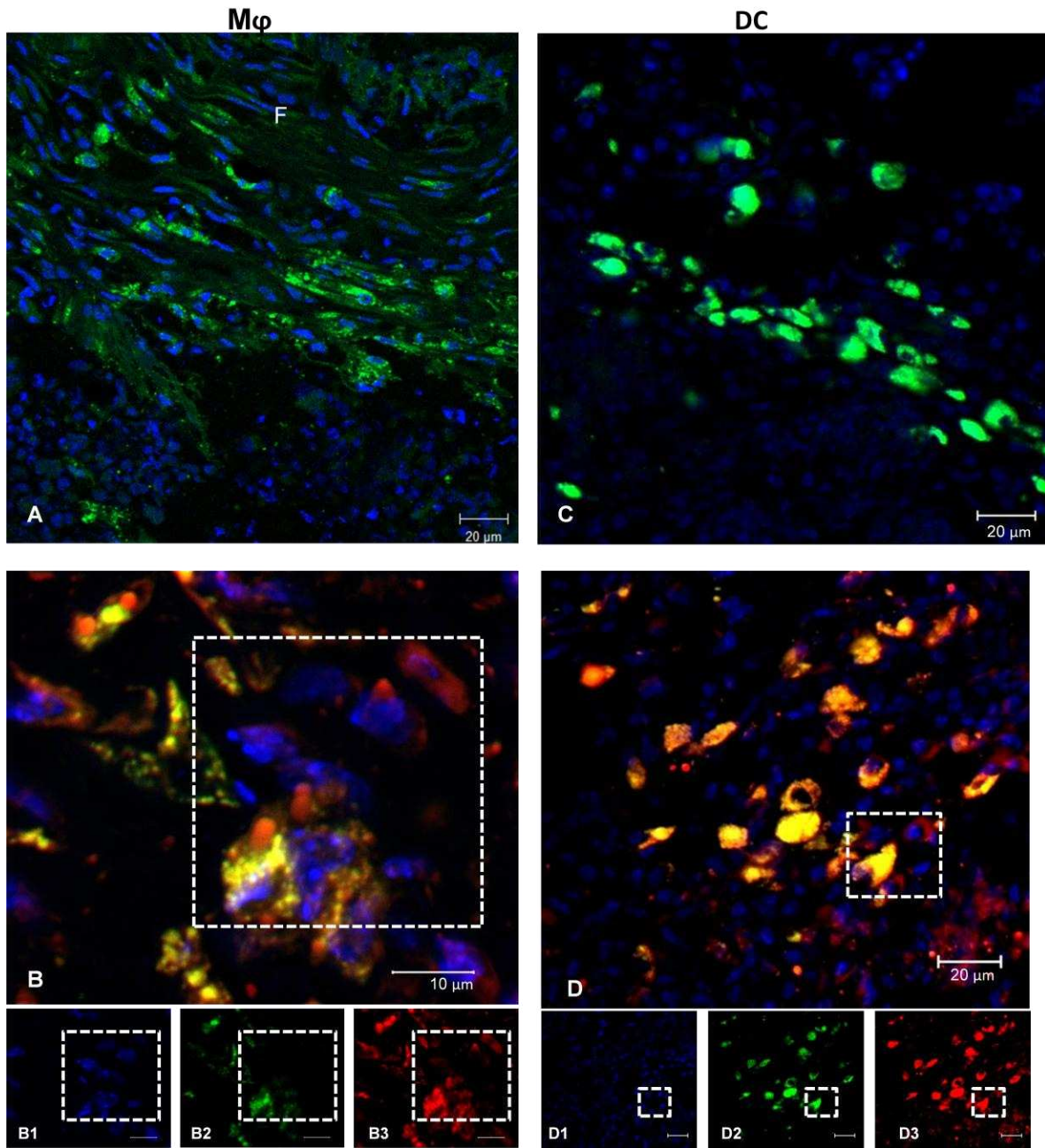


Figura 8. Macrófagos y DC se convierten en células espumosas. Macrófagos ($M\phi$) (A) o DC (C) CFSE+ fueron transferidos en día 30 de la infección y detectados 7 días después en el sitio del anillo fibroso del microabsceso. $M\phi$ (B) y DC (D) acumulan lípidos. B1 y D1: contratinción de núcleos con DAPI (azul); B2 y D2: rastreo de células CFSE+ (verde); B3 y D3: tinción de gotas lipídicas con Rojo de Nilo (rojo). B y D son imágenes compuestas: resp. B1, B2, y B3, y D1, D2, y D3. F = fibroblasto. En los cuadros resaltan tanto células transferidas que contienen gotas lipídicas como células propias del hospedero que se tiñeron de rojo por la tinción de gotas lipídicas.

6.3 Factores en el microambiente involucrados en la posible diferenciación de precursores de células espumosas

6.3.1 Niveles de expresión relativa de los transcritos de las citocinas

6.3.1.1 Validación y optimización del PCR con primers SYBRGreen

Una vez que la temperatura óptima de alineación fue establecida (vea material y métodos, tabla 3) se comprobaron la especificidad y la eficiencia del sistema de amplificación con los SYBRGreen primers: a) El pico único en las curva de disociación demuestran un producto único (fig. 9). b) Obtuvimos eficiencias entre 98.9% y 105.7% en las curvas estándar, las cuales son eficiencias aceptables, ya que se considere que eficiencias entre 90 y 105% indican que ocurre una duplicación de los productos específicos en cada ciclo de amplificación (Real-Time PCR Applications Guide, Bulletin 5279, Bio-Rad).

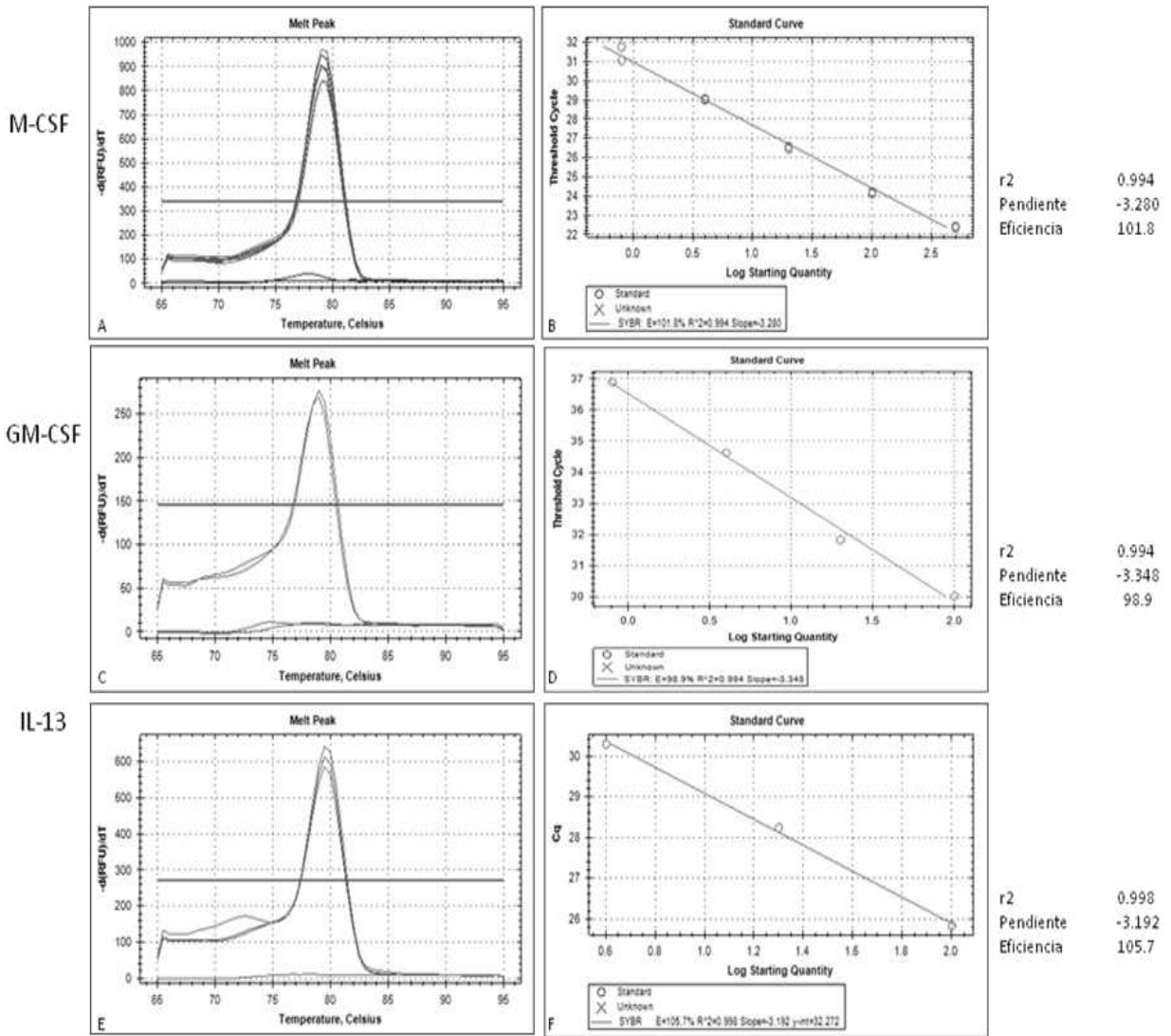


Figura 9. Especificidad y eficiencia de los ensayos de RT-qPCR con detección por el sistema SYBRGreen. Las figuras A, C, y E demuestran la especificidad del sistema de detección por los picos únicos en las curvas de disociación de los productos de M-CSF, GM-CSF e IL-13 respectivamente, mientras que las figuras B, D, y F demuestran el r^2 y la eficiencia en las curvas estándar de los mismos.

6.3.1.2 La expresión relativa *in situ* de IL-13 y GM-CSF aumenta durante la infección con Nb

Observando las curvas de amplificación de los ensayos RT-PCR (fig. 10) se nota fácilmente que el gen de referencia *gapdh* fue expresado más que las citocinas ya que el ciclo umbral (Ct) de sus curvas estuvo en el rango 21-22, mientras el rango Ct de las citocinas, en orden de mayor a menor expresión, fue: M-CSF (23-27) > IL-13 (25-35) > GM-CSF (32-40) > IL-4 (38.4-39.2). Aunque el control sin 'template' (curva azul) generó una señal ruido en los casos de GAPDH y M-CSF, la distancia con la señal específica fue suficiente grande para validar los primers. Pero no fue así en el caso de IL-13, donde el Ct de los días 0 y 0.5 no fue significativamente diferente al Ct del "non-template" control ($P = 0.09$). Sin embargo, desde el día 1 el Ct sí fue diferente en comparación con el "non-template" control ($P \leq 0.02$), y por ende es probable que fue expresado desde este momento.

El M-CSF fue el que más se expresó, tanto en homeostasis como durante la infección. Su expresión aumentó durante la inflamación, con un máximo de 5.7 x; error estándar de la media (SEM) 1.6 pero, no hubo diferencia significativa en niveles de expresión normalizados con el *gapdh* y en comparación con el día 0 o entre otros grupos (fig.11).

El GM-CSF no fue detectable en homeostasis, pero, una vez detectado en un ratón a 0.5 día y en todos los ratones a 1 día, continuó aumentando su expresión mientras transcurría la infección, sólo interrumpido con una disminución

temporal a día 15 (fig. 11). El día 60 fue cuando más se expresó GM-CSF con una expresión relativa de 129 x, SEM 55; P = 0.047.

La IL-4 tampoco fue detectable en la homeostasis y solamente a niveles muy bajos durante la inflamación aguda. Con excepción del grupo de 0.5 día, al menos un ratón no expresaría un nivel detectable de IL-4 en los diferentes grupos de inflamación (fig.11). No hubo diferencia significativa entre los grupos que expresaron IL-4.

La expresión *in situ* de IL-13 aumentó durante la inflamación aguda (60 x, SEM 18) pero sin significancia estadística, y después de una disminución temporal durante la semi-resolución de la fase aguda (18 x), la expresión se incrementó nuevo y significativamente durante la inflamación crónica (152 x SEM 35; P = 0.003) (fig. 11).

Los perfiles de expresión relativa *in situ* de GM-CSF e IL-13 durante la infección con Nb resultaron muy similares. Al compararlos, se obtuvo un coeficiente de correlación de 0.97 (Apéndice E).

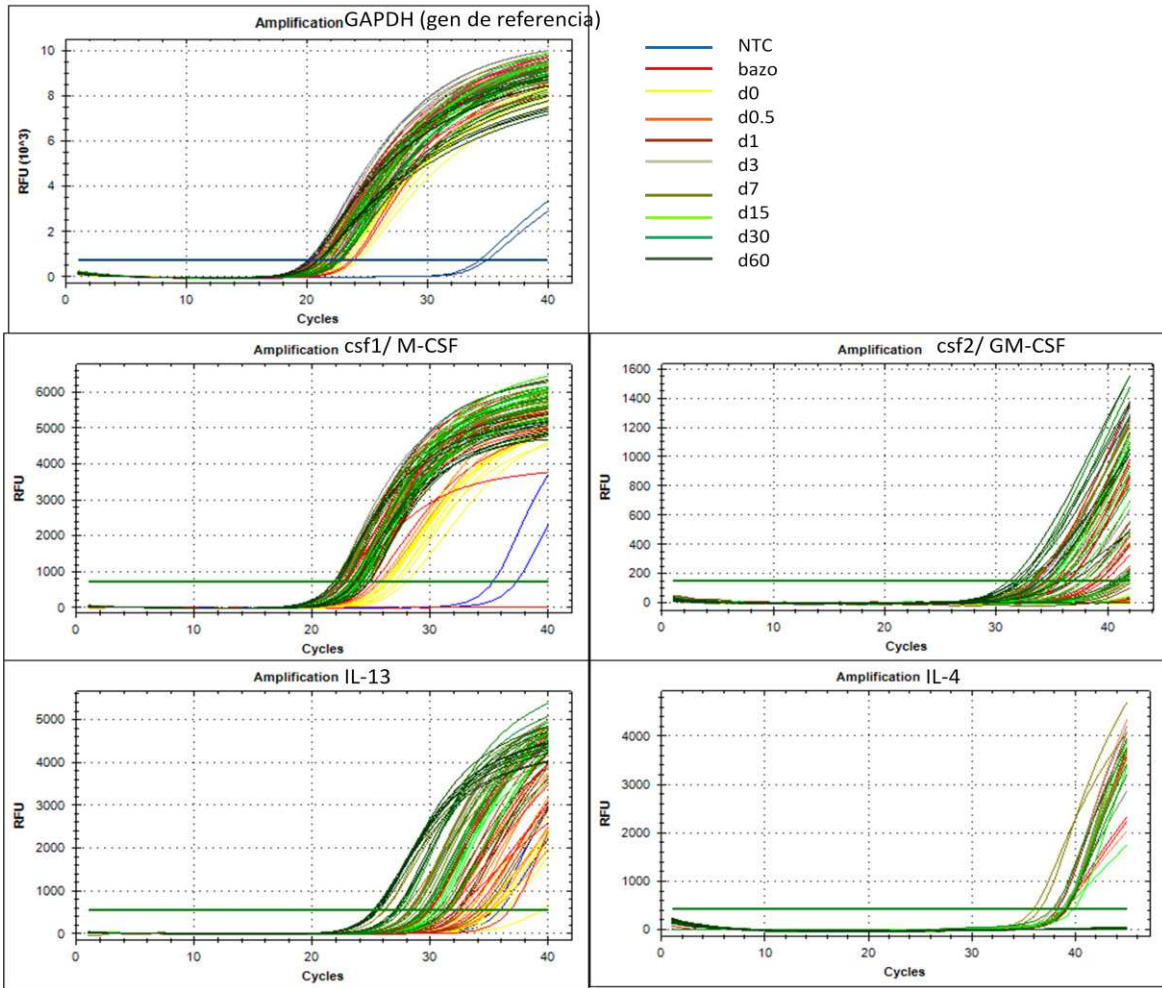


Figura 10. Resultados de los RT-qPCR de las citocinas. Se extrajo RNA de biopsias homogenizadas obtenidas (n=5), lo cual (2 μ g) sirvió como molde para generar cDNA con hexámeros al azar y M-MLUV, lo cual (500 ng) fue amplificado por RT-PCR con el sistema de detección de SYBRGreen o Taqman-FAM (por duplicado). NTC = non-template control (por sus siglas en inglés).

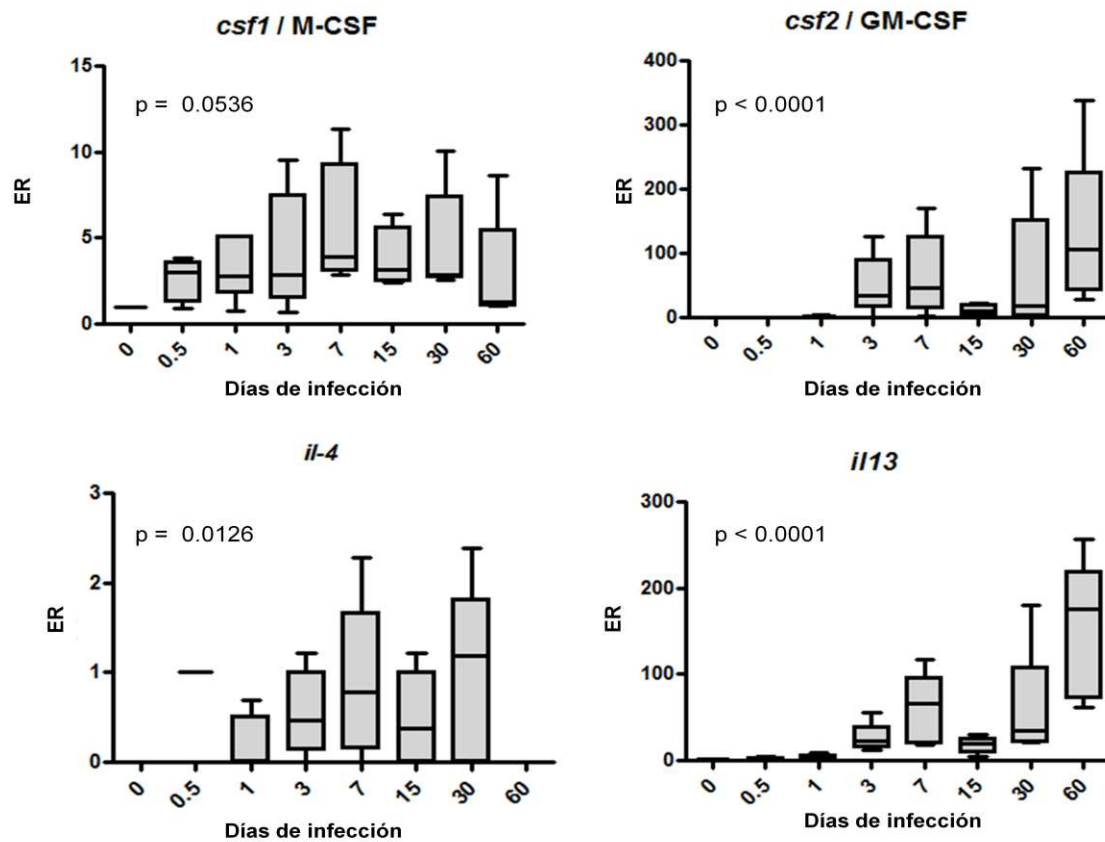


Figura 11. Los transcritos *in situ* de IL-13 y *csf2*/GM-CSF aumentan más de 100x durante la infección con Nb. ER = expresión relativa fue determinado por el método SYBRGreen o Taqman con el gen gliceraldehide-3-fosfato deshidrogenasa como referencia. Los box plots de expresión relativa indican la mediana, el cuadrante 75% (barra-superior) y el cuadrante 25% (barra-inferior) y los extremos: máximo (línea arriba), mínimo (línea abajo). Se presenta el mejor de 2 experimentos independientes con resultados similares. La prueba Kruskal-Wallis fue empleada para calcular el valor P (n=5, por duplicado). El experimento fue repetible con resultados similares.

6.3.2 Cuantificación de citocinas *in situ*

6.3.2.1 M-CSF aumenta en la inflamación crónica

El M-CSF fue la citocina más producida durante la infección por Nb, sus niveles más altos alcanzaron los 85 ± 19 pg/mg de proteína en la homeostasis; durante la inflamación aguda y su semi-resolución osciló entre 58 y 100 pg/mg proteína sin presentar cambios significantes. Sin embargo, el nivel de M-CSF se duplicó de manera significativa a ca. 188 ± 42 pg/mg proteína una vez que se había establecido el actinomicetoma en la inflamación crónica (día 60) (fig. 12). Los niveles de las otras citocinas fueron mucho menores, ca. 25-30 pg/mg proteína, en homeostasis y no mostraron cambios significativos durante la infección, con excepción de una disminución significativa a día 15 en comparación con los otros tiempos de la misma citocina (fig. 12). A nivel de proteína no se reflejó el aumento en las citocinas GM-CSF e IL-13 observado a nivel de transcritos.

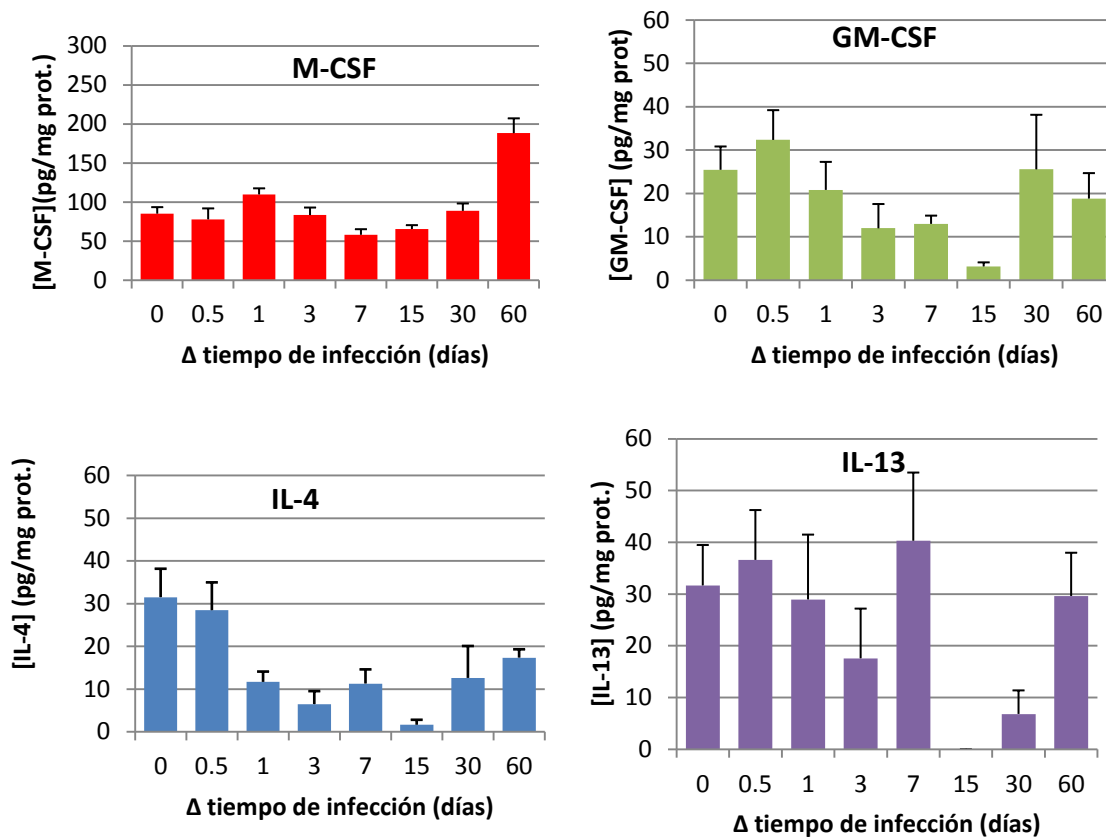


Figura 12. Cuantificación de citocinas *in situ*. Biopsias de diferentes momentos durante la infección (n=5) fueron homogenizadas, normalizadas a 1 mg proteína/mL PBS y evaluadas en duplicado por medio de ELISA. Se graficó el promedio (\pm SEM). Métodos estadísticas incluyeron, 1-way ANOVA y la prueba múltiple de Bonferoni.

6.3.3 Niveles de expresión relativo de marcadores de macrófagos M1 y M2

6.3.3.1 Los marcadores de macrófagos M2 demuestran un perfil de expresión opuesto

La expresión del marcador de macrófagos M1, *nos2/iNOS*, aumentó de manera significativa ($P < 0.0001$) inmediatamente después de la infección,

alcanzando su máxima expresión relativa (ER) durante la inflamación aguda (días 3 y 7 de la infección, respectivamente 827, SEM 158 y 922, SEM 177; ambos $P = 0.0008$), después disminuyó algo (ER 498-623, SEM 58-222), pero sostuvo un aumento significativo en comparación con el control, $3 \times 10^{-5} < P < 0.02$ (fig. 13).

Los marcadores de los macrófagos M2 demostraron expresiones relativas casi opuestas. El *chi3L3/Ym1* no fue detectable en la homeostasis, fue inducido a las 12h de la infección y alcanzó rápidamente su máxima expresión lo cual era 17 (SEM 8: $P = 0.05$) veces mayor al nivel de la primera detección a 12h. En la inflamación crónica (día 60 de la infección) su expresión disminuyó pero siguió siendo detectable, pero no significativamente diferente a la expresión de 12 h ($P = 0.343$).

Al contrario, la expresión de *retnla/FIZZ1* fue más alta en la homeostasis y ésta disminuyó significativamente en respuesta a la infección, especialmente durante la inflamación crónica donde el día 60 tuvo una expresión relativa de 3.2×10^{-4} ($P = 8 \times 10^{-4}$) (fig. 13). El coeficiente de correlación entre el tamaño de la lesión (Apéndice A) y la expresión de *retnla* fue -0.84 (Apéndice E), indicando una relación negativa entre el tamaño de la lesión y la expresión de *retnla*.

Sorpresivamente, la expresión de *chi3L3/Ym1* en el bazo de un ratón de 30 días de infección fue alta (curva roja, Ct 25.86) mientras que la expresión más alta en la lesión tuvo un Ct de 27.5. El *retnla/FIZZ1* se pudo detectar en el bazo pero no resaltó como el Ym1.

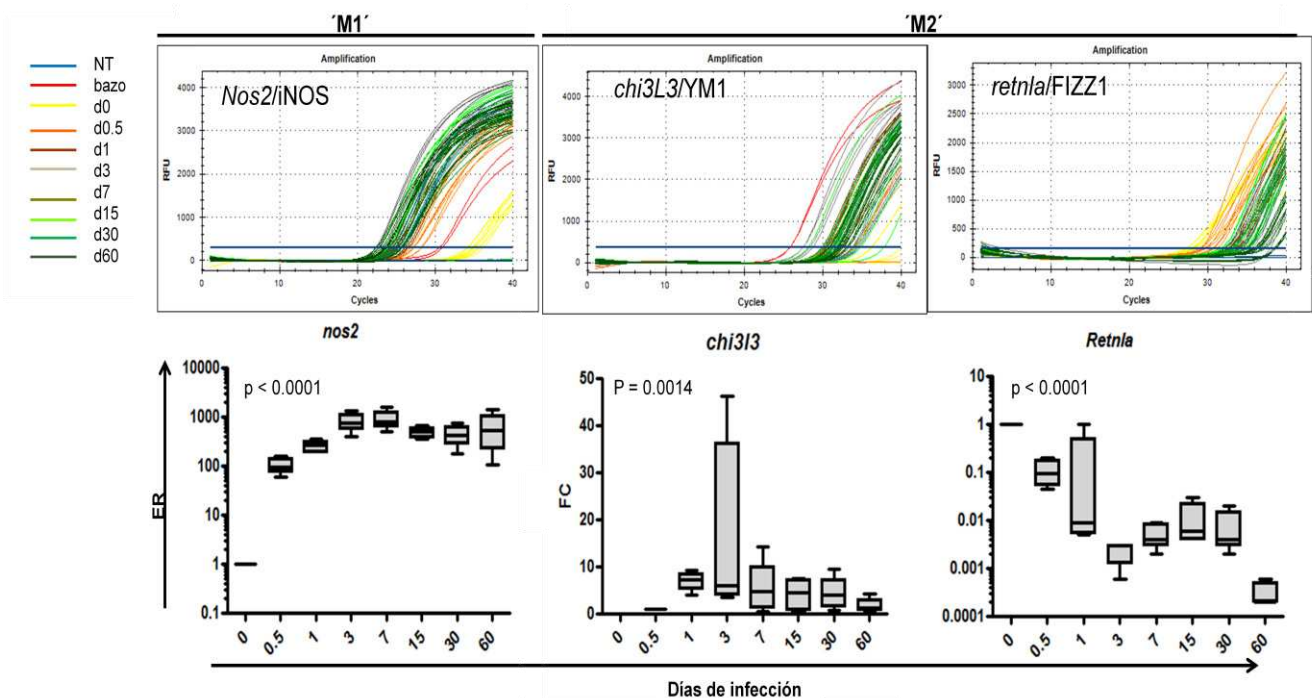


Figura 13. Aumento de la expresión relativa de *nos2* (marcador M1) y *chi3l3* (marcador M2), pero disminución de *retnl* (marcador M2). ER = expresión relativa ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) fue determinado por el método Taqman con el gen gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa como referencia. Se muestra el mejor de 2 experimentos independientes con perfiles similares. La prueba Kruskal-Wallis fue empleada para calcular el valor P (n=5, por duplicado). NT = non-template control.

CAPÍTULO 7

DISCUSIÓN

La generación de MDMO con medio condicionado de L929 generó un cultivo celular homogéneo con características morfológicas e inmunofenotípicas de macrófagos. Sin embargo, la diferenciación de DCDMO con GM-CSF en presencia o ausencia de IL-4 generó una mezcla de DC mieloides, macrófagos y neutrófilos, como se ha descrito en la literatura¹⁴¹, por lo cual resultó necesario usar técnicas de depleción¹⁴⁵ de los neutrófilos y macrófagos. Considerando el objetivo de la tesis, fue muy importante eliminar los macrófagos, y seleccionamos la depleción de macrófagos con F4/80, aceptando la pérdida de una subpoblación de DCDMO F4/80+¹⁴⁶. Otra opción podría haber sido la diferenciación con el Flt3L, lo cual genera DC en números mayores y más homogéneas¹⁴⁶. Las DC generadas con Flt3 resultan ser más pequeñas, más móviles, además de secretar menos citocinas pro-inflamatorias en respuesta a la estimulación de diferentes TLRs. Por lo tanto, las DC generadas con Flt3L se asemejan más a DC en la homeostasis, mientras que las DC generadas con GM-CSF e IL-4 se parecen más a TipDC¹⁴⁶,¹⁴⁷ (vea también la fig. 2), aunque reportes anteriores sugirieron lo contrario¹⁴⁸. Además, es conocido que al aumentar el tiempo de diferenciación hasta 9 o 12 días se genera DCDMO más maduras e inclinadas hasta cierto tipo de

activación¹⁴⁶. Para procurar DCDMO más inmaduras y vírgenes decidimos minimizar el tiempo de diferenciación a 6 días. La falta de dendritas pronunciadas en las DCDMO es una característica de las DC inmaduras.

Aunque los experimentos preliminares indicaron una supervivencia de 90% de los macrófagos 3 días después de que habían sido incubados con 10 μM CFSE, bajamos la concentración a 2 μM para disminuir la interferencia de la señal de CFSE en la inmunotipificación con PE. Sin embargo, al momento de intentar cosechar las células a corto plazo después del marcaje, 0.5-1 h para los experimentos de transferencia, ocurrió mucha muerte celular. Para evitar tal problema, decidimos recuperar las células marcadas hasta el siguiente día. El fenómeno que el marcaje con CFSE es delicado y sí afecta a las células en cierto grado, aunque aceptable, se ve reflejado en las modificaciones en el proceso de marcaje introducido por diferentes investigadores, tales como disminuir el tiempo o la temperatura de incubación con CFSE¹⁴⁹ y/o incubar en una solución que incluye una proteína como albúmina sérica bovina o SBF¹⁵⁰. Para nuestros estudios de transferencia adoptiva con células marcadas procuramos re-cultivar células marcadas para evaluar su viabilidad y funcionalidad, además de contar sólo las células viables.

Los macrófagos y DC singénicos transferidos en el actinomicetoma de treinta días fueron localizables en el lugar típico de las células espumosas, es

decir, asociado con el anillo fibroso de un microabsceso y además se tiñeron con el rojo de Nilo indicando que efectivamente se habían diferenciado en células espumosas. La diferenciación de macrófagos en células espumosas se ha descrito en varias enfermedades entre las cuales se encuentran las infecciosas⁹⁷. Por otro lado, la diferenciación de DC en células espumosas se ha sugerido en aterosclerosis¹²², pero no se ha reportado en infecciones, no obstante está reportada la presencia de macrófagos espumosos con un perfil DC en la tuberculosis¹²³. En la mayoría de los casos, el linaje de la célula espumosa es identificado por marcadores superficiales. Pero es difícil, si no imposible, encontrar marcadores exclusivos para cualquiera de las células: macrófago o DC. Tsakiris reportó que la carboxipeptidasa M, cuya expresión aumenta en las células espumosas, es inducida en macrófagos o células dendríticas después de la diferenciación de monocitos con M-CSF o GM-CSF y además por la exposición a lipoproteínas de baja densidad¹⁵¹. Este es el primer estudio que aplicó la técnica de transferencia adoptiva de células identificadas anteriormente como macrófago o DC para estudiar su diferenciación en células espumosas en un modelo de infección, y permite concluir que tanto macrófagos como DC se convierten en células espumosas en el actinomicetoma experimental inducido por Nb.

La diferenciación de DC y macrófagos en células espumosas es otra muestra de la enorme similitud entre estas dos células. Originalmente, la DC fue identificada como una célula con un fenotipo diferente a lo del macrófago y una función especial⁵⁴, incluso se descubrió un linaje especial para la DC¹⁵²,

fortaleciendo el concepto de ser una célula diferente al macrófago. Sin embargo, la brecha entre estas dos células disminuyó con el descubrimiento de 1) DC diferenciadas desde el monocito en un ambiente inflamatorio, 2) TipDC con una funcionalidad idéntica al macrófago M1⁷³, y 3) la falta de exclusividad en los marcadores^{124, 126, 153-155}.

Los precursores de las células espumosas en el actinomicetoma podrían estar en su estado proinflamatorio (M1, TipDC) o anti-inflamatorio (M2, cDC). Parece lógico suponer que un estado anti-inflamatorio podría favorecer la supervivencia de Nb dentro de la célula, pero en la literatura existe controversia sobre el tipo de activación de estas células en diferentes modelos de infección. Los antecedentes en nuestro laboratorio indican que las células espumosas eran TNF- α negativas³⁸, tal como fue reportado antes por Ares¹⁵⁶, un fenotipo consistente con los macrófagos M2. Stenzel reportó que las células espumosas en el criptococcosis cerebral efectivamente eran macrófagos M2 Ym1+⁹⁷. Por otro lado, Higgins reportó que un ambiente pro-inflamatorio, rico en GM-CSF, favorecía la aparición de células espumosas, mientras que un tratamiento con M-CSF, más relacionado con macrófagos M2, causó la disminución de células espumosas en un modelo de tuberculosis¹³⁶.

Nuestros resultados de la expresión de marcadores de macrófagos M1 (iNOS) y M2 (Ym1 y FIZZ1) indicaron que la expresión de iNOS aumentó de manera importante durante la inflamación, lo cual indica que el ambiente pro-

inflamatorio está altamente activado. Esto es consistente con la presencia local de IFN- γ reportado por nuestro grupo^{36, 41}. Resulta importante mencionar que la presencia de los transcritos iNOS no asegura la producción del óxido nítrico. Estudios en nuestro laboratorio demostraron una baja en la producción de óxido nítrico en macrófagos infectados *in vitro* con Nb¹⁵⁷. Lo anterior fue observado también en macrófagos infectados *in vitro* con *M. tuberculosis*, donde se encontró un aumento en la expresión de iNOS combinado con una disminución de la producción de óxido nítrico¹⁵⁸. Esos estudios sugieren que, aunque se genera un ambiente pro-inflamatorio y activación clásica de macrófagos M1 y TipDC, el patógeno puede interferir en la efectividad de la activación. Es importante recordar que la expresión de iNOS no comprueba la presencia de macrófagos M1 o TipDC, ya que el iNOS también podría haber sido producido por PMN¹⁵⁹, que están presentes en gran número en los microabscesos. Es necesario llevar a cabo estudios inmunohistoquímicos con iNOS para determinar las células productoras del iNOS.

En un modelo de tuberculosis en ratones, la presencia de macrófagos M2 fue sugerido por la expresión del arginasa 1¹⁶⁰, pero la validez de arginasa 1 como marcador de macrófagos M2 es controversial¹⁶¹. En nuestro estudio exploramos la posible presencia de macrófagos M2 con los marcadores Ym1 y FIZZ1.

En el presente estudio, encontramos una inducción de la expresión de Ym1 durante la inflamación, lo cual sugiere una posible activación alternativa de los

macrófagos, aunque no se puede descartar que el Ym1 fuese producido por otro tipo de célula. En la piel de ratones con dermatitis crónica proliferativa, Ym1 es abundantamente expresado por macrófagos, DC y células cebadas¹⁶², por lo cual no podemos descartar que el Ym1 fuese producido por ejemplo por células cebadas, las cuales también están presentes en las lesiones de actinomicetoma por Nb. También se ha reportado inmunoreactividad contra Ym1 en neutrófilos inmaduros en la médula ósea¹⁶³. Aún se desconoce el papel de Ym1 en procesos inflamatorios, aunque es relacionado con un ambiente Th2 y remodelación tisular, principalmente en infecciones por helmintos⁶⁶. Ym1 ha sido detectado en ambientes y fases de proliferación celular^{162, 164} y podría ser ésta su principal función a nivel local. Recientemente, se ha reportado la proliferación local de macrófagos M2 en la inflamación mediada por Th2 como fuente de células nuevas¹⁶⁵ opuesto o adicional al reclutamiento de monocitos del torrente sanguíneo. La proliferación local de macrófagos residentes en la pulpa dental durante el desarrollo del diente ha sido reportada como dependiente del M-CSF, ya que el número de macrófagos disminuyó por la presencia de anticuerpos dirigidos al M-CSF¹⁶⁶.

Contrario a lo encontrado con Ym1, el otro marcador de macrófagos M2, *retnla*/FIZZ1 fue detectable durante la homeostasis y su expresión mostró una correlación negativa con el desarrollo de la inflamación, es decir, al aumentar la inflamación, disminuye la expresión de *retnla*/FIZZ1. El papel de FIZZ1 no se

conoce, pero estudios han sugerido su posible participación en la disminución de la inflamación, ya que ratones *retn1a(-/-)* infectados con helmintos (*Schistosoma mansoni* o *Nippostrongylus brasiliensis*) generaron granulomas exacerbados⁶⁹.

Un granuloma es una acumulación de macrófagos que sirve para contener la infección. Sin embargo, este mecanismo defensivo del hospedero ha fallado en el control de algunos patógenos, por ejemplo, varios investigadores han sugerido que *M. tuberculosis* aproveche el granuloma como una estructura que le proteja y ayude a sobrevivir dentro del hospedero¹⁶⁷. De tal manera, eliminar la actividad inhibidor de FIZZ1 sobre el desarrollo del granuloma, podría ser una estrategia de inmunoevasión del patógeno.

La expresión de los marcadores M2 estudiados, Ym1 y FIZZ1, mostraron un perfil opuesto, lo anterior sugiere que su expresión puede ser regulada de manera independiente en la infección por Nb. Las citocinas Th2 suelen facilitar la expresión de ambos marcadores M2⁶⁶, sin embargo, un componente del patógeno o la presencia de IFN- γ podrían interferir en la expresión de FIZZ1⁶⁹. Si las funciones sugeridas para Ym1 y FIZZ1 fueran ciertas, el perfil de expresión encontrado en este estudio favorecía la supervivencia del patógeno, por ejemplo, la proliferación local de leucocitos facilitaría el desarrollo sin freno de un granuloma protector para el patógeno.

Mattos y colaboradores publicaron que las células espumosas en lepra lepromatosa podrían contener el patógeno causante o solamente 'ser vecinos' de células infectadas¹¹⁹. Una sustancia del patógeno y/o propia de la célula hospedera puede ser el factor del microambiente que puede inducir la acumulación de gotas lipídicas típicas de las células espumosas. El desprendimiento de factores lipídicos del patógeno, especialmente el TDM, vía exosomas desde células infectadas ha sido reportado para *M. tuberculosis*^{30, 168}. La liberación de lípidos del patógeno mediante transporte activo representa un enorme gasto energético y de carbono que debería jugar un papel importante para el éxito de la infección.

Nosotros estudiamos niveles de citocinas que podrían favorecer la formación de células precursoras preparadas para diferenciarse en células espumosas.

Generalmente, los niveles de la mayoría de las citocinas estudiadas en éste tesis no aumentaron significativamente durante el desarrollo de la inflamación, con excepción del M-CSF. Un resultado inconsistente con la expresión de los transcritos correspondientes que en la mayoría de las veces subió durante el desarrollo de la lesión. Una baja o media correlación entre transcritos y proteínas es un fenómeno reconocido, debido tanto a causas biológicas como a problemas técnicos^{169, 170}. En nuestros experimentos llama la atención que la más alta expresión de la mayoría de las citocinas en la situación de la homeostasis, con

excepción de M-CSF que generó la señal más alta a los 60 días en un experimento. En la homeostasis no existe un ambiente pro-inflamatorio con abundantes neutrófilos y macrófagos activados llenos de enzimas hidrolíticas como durante la inflamación. Es posible que las citocinas presentes en las biopsias de lesiones fuesen destruidas por estas enzimas hidrolíticas a pesar de haber procurado un ambiente frío durante el manejo de las muestras con la intención de inhibir la actividad de enzimas. Por lo anterior, una recomendación sería una fijación ligera de las biopsias en formalina $\leq 10\%$ durante 2-4 h en frío¹⁷¹ y antes de homogeneizar para inactivar hidrolasas, seguido de tres lavados en PBS en agitación para eliminar el fijativo y así disminuir una posible pérdida de determinantes de antígeno. En el caso de que, a pesar de una fijación ligera, determinantes antigénicos de las citocinas de interés hayan sido alterados y se volvieron indetectables por ELISA, se podría recurrir a tratamientos de recuperación de antígenos¹⁷¹.

Por lo anterior, enfocamos el estudio de expresión de citocinas al nivel de los transcritos. El transcrito más abundante fue M-CSF, sin embargo no mostró una diferencia significativa durante el desarrollo del actinomicetoma, por lo cual no parece jugar un papel importante en la polarización de macrófagos y DC. El M-CSF no es una citocina característica de ambientes inflamatorias o infecciosas, pero sí juega un papel importante en la infección por el virus de inmunodeficiencia humana tipo 1. El virus induce la expresión del M-CSF por macrófagos, lo cual en

turno, facilita infección de otros macrófagos vía un aumento en la expresión de receptores CCR5 y CD4 en los macrófagos con el resultado que incrementa la viremia^{172, 173}. El M-CSF generalmente está relacionado con la maduración de macrófagos en homeostasis⁷⁸, y se suele expresar constitutivamente en varios tejidos¹⁶⁶, tal como nosotros detectamos a nivel de transcritos, aunque recientemente se describió que el receptor de M-CSF fue relacionado con la formación de las TipDC pro-inflamatorias⁸⁰.

La presencia de GM-CSF puede interferir con la efectividad de M-CSF al inactivar su receptor⁹¹. El GM-CSF, contrario al M-CSF, se expresa por un estímulo, y una vez expresado, tanto el mRNA como la proteína tiene una vida media corta (min.)⁸¹.

La presencia de un ambiente tipo Th1 se había sugerido anteriormente con la detección local de IFN- γ por RT-PCR⁴¹ e inmunohistoquímica³⁶, y fue ampliada con la presencia de GM-CSF detectada en nuestro estudio. También en otras infecciones se ha reportado un aumento en la expresión de GM-CSF, por ejemplo en el pulmón de ratones infectados con *M. tuberculosis*¹³⁶, y se ha reportado su presencia y su efecto protector en infecciones por el bacilo Gram negativo *Pseudomonas aeruginosa*⁸⁷ y el hongo unicelular y oportunista *Pneumocystis jirovecii* (antes *P. carinii*)⁹². Localmente, GM-CSF es expresado por linfocitos T activados, macrófagos, mastocitos, endotelios y epitelios en un ambiente pro-inflamatorio^{92, 174}. El GM-CSF estimula localmente: 1) la liberación de metabolitos del ácido araquidónico en los neutrófilos¹⁷⁵, lo cual es consistente con

la tinción abundante de neutrófilos con rojo oleoso en el actinomicetoma por Nb (datos no reportados); 2) la activación de células de Langerhans epidérmicas, de otra manera incapaces de activar la inmunidad adaptativa; y 3) la activación clásica de macrófagos y DC⁷⁸, estimulando mecanismos microbicidas y anti-parásitos⁸¹. Por otro lado, GM-CSF (en combinación con IL-4) puede inhibir la diferenciación a macrófagos de monocitos reclutados al causar la pérdida del receptor de M-CSF⁹¹ y favorecer la diferenciación hacia DC^{74, 78}.

Aunque la expresión de la citocina Th2 IL-4 apenas fue detectable *in situ*, la expresión de IL-13 aumentó de manera importante hasta 152 veces en el día 60 de la infección. Varios tipos de células podrían ser responsables del incremento enorme en expresión de IL-13. Aparte de las células Th2, mastocitos, macrófagos y células asesinas naturales, entre otras células, pueden producir IL-13^{176, 177}.

La IL-4 e IL-13 muchas veces son consideradas como citocinas con funciones compartidas, sin embargo, IL-4 es más una citocina de los órganos linfáticos cuyo papel principal es la estimulación de células plasmáticas productoras de anticuerpos en donde ha ocurrido un cambio de isotipo¹⁷⁸, mientras que la IL-13 es más una citocina de los tejidos periféricos con efectos locales⁹⁶. Nuestros resultados concuerdan con lo reportado anteriormente, donde la IL-13 ejerce su función localmente, mientras la IL-4 lo hace a nivel sistémico¹⁷⁹. La detección de IL-4 y IL-13 es común en infecciones por helmintos^{101, 180, 181}, pero también ha sido reportado en la infección por un hongo en la criptococcosis cerebral en donde fue

relacionado con la presencia de macrófagos M2⁹⁷, y en células T de pacientes con la lepra tipo 'borderline'¹⁸².

La IL-13 se ha asociado con fibrosis¹⁰¹ y podría estar involucrada en la fibrosis extensiva presente en el actinomicetoma. También podría jugar un papel en la disminución del óxido nítrico¹⁰² a pesar de la inducción de iNOS. Además, la IL-13 podría implicado en la polarización de macrófagos tipo M2^{183, 184}. Lo anterior, podría estar dándose en el actinomicetoma, debido al daño ocasionado por Nb y en respuesta a ello se producen macrófagos M2 reparadores. Adicionalmente, la combinación de IL-13 y GM-CSF podría causar una polarización de monocitos reclutados hacia DC¹⁸⁵. La IL-13 también ha sido involucrada en la expresión del inmunomodulador lipídicos^{103, 186}. En un modelo experimental de *M. tuberculosis* se encontró abundante inmunoreactividad contra PGE2 en la lesión de tuberculosis¹³¹ y es posible que este proceso también ocurra en la infección con Nb. La expresión de PGE2 tiene efectos complejos, tanto pro-inflamatorios, inmunoestimuladores¹⁰⁵ e inmunosupresores¹⁸⁷. Aún se conoce poco sobre el papel de los inmunomoduladores lipídicos en infecciones¹¹¹, pero es un campo de estudio interesante y creciente.

En resumen, ambos, macrófago y DC, acumulan gotas lipídicas y son precursores de las células espumosas en el actinomicetoma experimental inducido por Nb. El microambiente encontrado en la lesión está acorde con la activación clásica de macrófagos y TipDC como comprobamos con el aumento de la

expresión de GM-CSF e iNOS, además de que las células dendríticas transferidas estaban polarizadas de manera pro-inflamatoria, y aún así podrían diferenciarse en células espumosas, indicando que el estado pro-inflamatorio no interfiere con la diferenciación hacia células espumosas. Simultáneamente, se encontró un ambiente Th2 con abundante expresión de IL-13 que podía inducir activación alternativa de macrófagos, como sugiere la expresión inducida de Ym1. La combinación de GM-CSF e IL-13 es favorable para la polarización de monocitos reclutados hacia DC. La IL-13 podría estar involucrada en la generación de la fibrosis que rodea a los microabscesos. La disminución en la expresión de *retnla*/FIZZ1 indica una regulación independiente de los dos marcadores de los macrófagos M2. El perfil encontrado podría favorecer la formación del actinomicetoma y la persistencia de Nb.

CAPÍTULO 8

CONCLUSIONES

1. Los macrófagos y las células dendríticas, se convierten en células espumosas en el actinomicetoma experimental inducido por *Nocardia brasiliensis*.
2. La expresión de marcadores de una respuesta pro-inflamatorio, GM-CSF e iNOS, aumenta en el actinomicetoma experimental.
3. La expresión de la citocina Th2, IL-13, y del marcador de macrófagos M2, Ym1, aumentan durante el actinomicetoma experimental.
4. Los marcadores de los macrófagos M2 demuestran perfiles de expresión opuestos, Ym1 aumenta, pero FIZZ1 disminuya.

CAPÍTULO 9

PERSPECTIVAS

1. Un estudio inmunohistoquímico para localizar la expresión de los marcadores de los macrófagos M1 y M2, y de las citocinas GM-CSF e IL-13.
2. Estudios comprobatorios *in vivo* de la importancia de GM-CSF e IL-13 en el actinomicetoma, usando el modelo del actinomicetoma experimental pero en ratones deficientes en GM-CSF o IL-13, ya sea por tratamientos con anticuerpos contra estas citocinas o en ratones 'knock out' para estas citocinas.
3. Un estudio *in vitro* para comprobar el papel de GM-CSF e IL-13, infectando macrófagos y DC in cultivo con *Nocardia brasiliensis* y verificar el efecto de éstas citocinas o de su eliminación.
4. Verificar si el Ym1 puede inducir la proliferación de macrófagos *in vitro*, y en su caso, si anticuerpos anti-Ym1 pueden inhibirlo.
5. Comprobar *in vitro* si el FIZZ1 puede inhibir la formación de un granuloma anteriormente inducido con una infección de macrófagos con *N.brasiliensis* o *M. tuberculosis* (Peyron), y en su caso, si anti-FIZZ1 permite el desarrollo desinhibido de la formación del granuloma.

REFERENCIAS

1. Uzcátegui-Negron M., S.J.A., Díaz-Corrales F., Avella J. Aislamiento selectivo de *Nocardia brasiliensis* de muestras de suelo de San Juan de Lagunillas, estado de Mérida, Venezuela, usando medio con tetraciclina. . *Rev. Soc. Ven. Microbiol.* **23**, 38-41 (2003).
2. Serrano J.A., N.-M.D. Epidemiología del actinomicetoma en las américas, in *Actinomicetoma*. (ed. S.A.H. Serrano J.A., Beaman B.L.) 241-268 (Plaza y Valdés, S.A. de C.V., México D.F.; 2007).
3. Mejía de Alejo M.A., S.J.A. Patología del actinomicetoma, in *Actinomicetoma*. (ed. S.A.H. Serrano J.A., Beaman B.L.) 141-158 (Plaza y Valdés, S.A. de C.V., México D.F.; 2007).
4. Salinas-Carmona, M.C. *Nocardia brasiliensis*: from microbe to human and experimental infections. *Microbes Infect* **2**, 1373-1381 (2000).
5. Ventura, M. *et al.* Genomics of Actinobacteria: tracing the evolutionary history of an ancient phylum. *Microbiol Mol Biol Rev* **71**, 495-548 (2007).
6. Brown-Elliott, B.A., Brown, J.M., Conville, P.S. & Wallace, R.J., Jr. Clinical and laboratory features of the *Nocardia* spp. based on current molecular taxonomy. *Clin Microbiol Rev* **19**, 259-282 (2006).
7. Gao, B., Paramanathan, R. & Gupta, R.S. Signature proteins that are distinctive characteristics of Actinobacteria and their subgroups. *Antonie Van Leeuwenhoek* **90**, 69-91 (2006).
8. Sandoval-Trujillo H, S.-S.N.L., Serrano J.A, Goodfellow M. Aspectos taxonómicos, bacteriológicos, citoquímicos y de diagnóstico microbiológico de actinomicetos aerobios productores de actinomicetoma, in *Actinomicetoma*. (ed. S.A.H. Serrano J.A., Beaman B.L.) 37-76 (Plaza y Valdés, S.A. de C.V., México D.F.; 2007).
9. Puech, V. *et al.* Structure of the cell envelope of corynebacteria: importance of the non-covalently bound lipids in the formation of the cell wall permeability barrier and fracture plane. *Microbiology* **147**, 1365-1382 (2001).
10. Beaman, B.L. & Beaman, L. *Nocardia* species: host-parasite relationships. *Clin Microbiol Rev* **7**, 213-264 (1994).
11. Bhatt, A. *et al.* Deletion of *kasB* in *Mycobacterium tuberculosis* causes loss of acid-fastness and subclinical latent tuberculosis in immunocompetent mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 5157-5162 (2007).
12. McNeil, M.M. & Brown, J.M. The medically important aerobic actinomycetes: epidemiology and microbiology. *Clin Microbiol Rev* **7**, 357-417 (1994).
13. Goodfellow, M. & Orchard, V.A. Antibiotic sensitivity of some nocardioform bacteria and its value as a criterion for taxonomy. *J Gen Microbiol* **83**, 375-387 (1974).
14. Boshoff HI, S.R., Barry C.E. 3rd Virulence and persistence mechanisms of *Mycobacterium tuberculosis*., in *Handbook of Tuberculosis: Molecular*

- Biology and Biochemistry*. (ed. R.E. Kaufmann S.H.E.) 151-191 (WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim; 2008).
15. Rhoades, E.R. & Ullrich, H.J. How to establish a lasting relationship with your host: lessons learned from *Mycobacterium spp.* *Immunol Cell Biol* **78**, 301-310 (2000).
 16. Indrigo, J., Hunter, R.L., Jr. & Actor, J.K. Cord factor trehalose 6,6'-dimycolate (TDM) mediates trafficking events during mycobacterial infection of murine macrophages. *Microbiology* **149**, 2049-2059 (2003).
 17. Spargo, B.J., Crowe, L.M., Ioneda, T., Beaman, B.L. & Crowe, J.H. Cord factor (alpha,alpha-trehalose 6,6'-dimycolate) inhibits fusion between phospholipid vesicles. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 737-740 (1991).
 18. Russell, D.G. Mycobacterium tuberculosis: Life and Death in the Phagosome, in *Handbook of Tuberculosis: Molecular Biology and Biochemistry*. (ed. R.E. Kaufmann S.H.E.) 307-322 (WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim; 2008).
 19. Moura, A.C., Modolell, M. & Mariano, M. Down-regulatory effect of *Mycobacterium leprae* cell wall lipids on phagocytosis, oxidative respiratory burst and tumour cell killing by mouse bone marrow derived macrophages. *Scand J Immunol* **46**, 500-505 (1997).
 20. Chan, J. *et al.* Microbial glycolipids: possible virulence factors that scavenge oxygen radicals. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 2453-2457 (1989).
 21. Revol, A., Espinoza-Ruiz, M., Medina-Villanueva, I. & Salinas-Carmona, M.C. Expression of Nocardia brasiliensis superoxide dismutase during the early infection of murine peritoneal macrophages. *Can J Microbiol* **52**, 1255-1260 (2006).
 22. Gringhuis, S.I. *et al.* C-type lectin DC-SIGN modulates Toll-like receptor signaling via Raf-1 kinase-dependent acetylation of transcription factor NF-kappaB. *Immunity* **26**, 605-616 (2007).
 23. Abebe, M. *et al.* Modulation of cell death by M. tuberculosis as a strategy for pathogen survival. *Clin Dev Immunol* **2011**, 678570 (2011).
 24. Okamoto, Y. *et al.* Mycobacterial sulfolipid shows a virulence by inhibiting cord factor induced granuloma formation and TNF-alpha release. *Microb Pathog* **40**, 245-253 (2006).
 25. Singh, P.P., LeMaire, C., Tan, J.C., Zeng, E. & Schorey, J.S. Exosomes released from M. tuberculosis infected cells can suppress IFN-gamma mediated activation of naive macrophages. *PLoS One* **6**, e18564 (2011).
 26. Tan, T., Lee, W.L., Alexander, D.C., Grinstein, S. & Liu, J. The ESAT-6/CFP-10 secretion system of *Mycobacterium marinum* modulates phagosome maturation. *Cell Microbiol* **8**, 1417-1429 (2006).
 27. Abdallah, A.M. *et al.* Type VII secretion--mycobacteria show the way. *Nat Rev Microbiol* **5**, 883-891 (2007).
 28. Smith, J. *et al.* Evidence for pore formation in host cell membranes by ESX-1-secreted ESAT-6 and its role in *Mycobacterium marinum* escape from the vacuole. *Infect Immun* **76**, 5478-5487 (2008).

29. Ryll, R., Kumazawa, Y. & Yano, I. Immunological properties of trehalose dimycolate (cord factor) and other mycolic acid-containing glycolipids--a review. *Microbiol Immunol* **45**, 801-811 (2001).
30. Rhoades, E. *et al.* Identification and macrophage-activating activity of glycolipids released from intracellular Mycobacterium bovis BCG. *Mol Microbiol* **48**, 875-888 (2003).
31. Takimoto, H. *et al.* Interferon-gamma independent formation of pulmonary granuloma in mice by injections with trehalose dimycolate (cord factor), lipoarabinomannan and phosphatidylinositol mannosides isolated from Mycobacterium tuberculosis. *Clin Exp Immunol* **144**, 134-141 (2006).
32. Davis, J.M. & Ramakrishnan, L. The role of the granuloma in expansion and dissemination of early tuberculous infection. *Cell* **136**, 37-49 (2009).
33. Rhoades, E.R., Geisel, R.E., Butcher, B.A., McDonough, S. & Russell, D.G. Cell wall lipids from Mycobacterium bovis BCG are inflammatory when inoculated within a gel matrix: characterization of a new model of the granulomatous response to mycobacterial components. *Tuberculosis (Edinb)* **85**, 159-176 (2005).
34. Treviño-Villarreal, J.H. in Facultad de Medicina, Vol. Dr. en Ciencias (UANL, Monterrey, Nuevo León; 2009).
35. Welsh O, V.-C.L., Mejía M.A. Aspectos clínicos, radiológicos y terapéuticos del actinomicetoma, in *Actinomicetoma*, Edn. 1. (ed. S.A.H. Serrano J.A., Beaman B.L.) 159-176 (Plaza y Valdés, S.A. de C.V., México D.F.; 2007).
36. Solis-Soto, J.M. *et al.* In situ detection and distribution of inflammatory cytokines during the course of infection with Nocardia brasiliensis. *Histol Histopathol* **23**, 573-581 (2008).
37. Salinas-Carmona, M.C., Torres-Lopez, E., Ramos, A.I., Licon-Trillo, A. & Gonzalez-Spencer, D. Immune response to *Nocardia brasiliensis* antigens in an experimental model of actinomycetoma in BALB/c mice. *Infect Immun* **67**, 2428-2432 (1999).
38. Segoviano-Ramirez, J.C. in Facultad de Medicina, Vol. Dr. en C. 108 (Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey; 2008).
39. Helming, L. *et al.* Essential role of DAP12 signaling in macrophage programming into a fusion-competent state. *Sci Signal* **1**, ra11 (2008).
40. Salinas-Carmona, M.C., Zuniga, J.M., Perez-Rivera, L.I., Segoviano-Ramirez, J.C. & Vazquez-Marmolejo, A.V. *Nocardia brasiliensis* Modulates IFN-gamma, IL-10, and IL-12 cytokine production by macrophages from BALB/c Mice. *J Interferon Cytokine Res* **29**, 263-271 (2009).
41. Rosas-Taraco, A.G., Perez-Linan, A.R., Bocanegra-Ibarias, P., Perez-Rivera, L.I. & Salinas-Carmona, M.C. *Nocardia brasiliensis* induces an immunosuppressive microenvironment in BALB/c mice favoring chronic infection. *Infect Immun* **80**, 493-499 (2012).
42. Salinas-Carmona, M.C. & Perez-Rivera, I. Humoral immunity through immunoglobulin M protects mice from an experimental actinomycetoma infection by *Nocardia brasiliensis*. *Infect Immun* **72**, 5597-5604 (2004).

43. Watve, M.G., Tickoo, R., Jog, M.M. & Bhole, B.D. How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*? *Arch Microbiol* **176**, 386-390 (2001).
44. Dzik, J.M. The ancestry and cumulative evolution of immune reactions. *Acta Biochim Pol* **57**, 443-466 (2010).
45. Cooper, M.D. & Alder, M.N. The evolution of adaptive immune systems. *Cell* **124**, 815-822 (2006).
46. Brodsky, F.M. & Guagliardi, L.E. The cell biology of antigen processing and presentation. *Annu Rev Immunol* **9**, 707-744 (1991).
47. Deenick, E.K. & Tangye, S.G. Autoimmunity: IL-21: a new player in Th17-cell differentiation. *Immunol Cell Biol* **85**, 503-505 (2007).
48. Bettelli, E., Oukka, M. & Kuchroo, V.K. T(H)-17 cells in the circle of immunity and autoimmunity. *Nat Immunol* **8**, 345-350 (2007).
49. Maddur, M.S., Miossec, P., Kaveri, S.V. & Bayry, J. Th17 cells: biology, pathogenesis of autoimmune and inflammatory diseases, and therapeutic strategies. *Am J Pathol* **181**, 8-18 (2012).
50. Silverstein The history of immunology, in *Fundamental Immunology*. (ed. P. W.E.) 23-40 (Raven Press, New York; 1984).
51. Shevach Macrophages and other accessory cells, in *Fundamental Immunology*. (ed. P. W.E.) 71-107 (Raven Press, New York; 1984).
52. Austyn, J.M. & Gordon, S. F4/80, a monoclonal antibody directed specifically against the mouse macrophage. *Eur J Immunol* **11**, 805-815 (1981).
53. Merad, M. *et al.* Langerhans cells renew in the skin throughout life under steady-state conditions. *Nat Immunol* **3**, 1135-1141 (2002).
54. Steinman, R.M. & Cohn, Z.A. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med* **137**, 1142-1162 (1973).
55. Steinman, R.M. Decisions about dendritic cells: past, present, and future. *Annu Rev Immunol* **30**, 1-22 (2011).
56. Liu, K. & Nussenzweig, M.C. Origin and development of dendritic cells. *Immunol Rev* **234**, 45-54 (2010).
57. Shrimpton, R.E. *et al.* CD205 (DEC-205): a recognition receptor for apoptotic and necrotic self. *Mol Immunol* **46**, 1229-1239 (2009).
58. Figdor, C.G., van Kooyk, Y. & Adema, G.J. C-type lectin receptors on dendritic cells and Langerhans cells. *Nat Rev Immunol* **2**, 77-84 (2002).
59. Shortman, K. & Liu, Y.J. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol* **2**, 151-161 (2002).
60. Verreck, F.A. *et al.* Human IL-23-producing type 1 macrophages promote but IL-10-producing type 2 macrophages subvert immunity to (myco)bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 4560-4565 (2004).
61. Porcheray, F. *et al.* Macrophage activation switching: an asset for the resolution of inflammation. *Clin Exp Immunol* **142**, 481-489 (2005).
62. Mylonas, K.J., Nair, M.G., Prieto-Lafuente, L., Paape, D. & Allen, J.E. Alternatively activated macrophages elicited by helminth infection can be

- reprogrammed to enable microbial killing. *J Immunol* **182**, 3084-3094 (2009).
63. Mantovani, A., Sica, A. & Locati, M. Macrophage polarization comes of age. *Immunity* **23**, 344-346 (2005).
 64. Mosser, D.M. & Edwards, J.P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* **8**, 958-969 (2008).
 65. Gordon, S. & Martinez, F.O. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity* **32**, 593-604 (2010).
 66. Raes, G. *et al.* Differential expression of FIZZ1 and Ym1 in alternatively versus classically activated macrophages. *J Leukoc Biol* **71**, 597-602 (2002).
 67. Lee, C.G. *et al.* Role of chitin and chitinase/chitinase-like proteins in inflammation, tissue remodeling, and injury. *Annu Rev Physiol* **73**, 479-501 (2011).
 68. Holcomb, I.N. *et al.* FIZZ1, a novel cysteine-rich secreted protein associated with pulmonary inflammation, defines a new gene family. *EMBO J* **19**, 4046-4055 (2000).
 69. Pesce, J.T. *et al.* Retnla (relmalphafizz1) suppresses helminth-induced Th2-type immunity. *PLoS Pathog* **5**, e1000393 (2009).
 70. Belz, G.T. & Nutt, S.L. Transcriptional programming of the dendritic cell network. *Nat Rev Immunol* **12**, 101-113 (2012).
 71. Watowich, S.S. & Liu, Y.J. Mechanisms regulating dendritic cell specification and development. *Immunol Rev* **238**, 76-92 (2010).
 72. Ginhoux, F. & Merad, M. Ontogeny and homeostasis of Langerhans cells. *Immunol Cell Biol* **88**, 387-392 (2010).
 73. Serbina, N.V., Salazar-Mather, T.P., Biron, C.A., Kuziel, W.A. & Pamer, E.G. TNF/iNOS-producing dendritic cells mediate innate immune defense against bacterial infection. *Immunity* **19**, 59-70 (2003).
 74. Geissmann, F. *et al.* Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science* **327**, 656-661 (2010).
 75. Abbas AK & Lichtman AH Cytokines, in *Cellular and Molecular Immunology*, Edn. 5th. (ed. L.A. Abbas AK) 243-274 (Elsevier Saunders, Philadelphia; 2005).
 76. Nandi, S., Akhter, M.P., Seifert, M.F., Dai, X.M. & Stanley, E.R. Developmental and functional significance of the CSF-1 proteoglycan chondroitin sulfate chain. *Blood* **107**, 786-795 (2006).
 77. Dai, X.M. *et al.* Targeted disruption of the mouse colony-stimulating factor 1 receptor gene results in osteopetrosis, mononuclear phagocyte deficiency, increased primitive progenitor cell frequencies, and reproductive defects. *Blood* **99**, 111-120 (2002).
 78. Gordon, S. The macrophage: past, present and future. *Eur J Immunol* **37 Suppl 1**, S9-17 (2007).
 79. Hibbs, M.L. *et al.* Mice lacking three myeloid colony-stimulating factors (G-CSF, GM-CSF, and M-CSF) still produce macrophages and granulocytes

- and mount an inflammatory response in a sterile model of peritonitis. *J Immunol* **178**, 6435-6443 (2007).
80. Greter, M. *et al.* GM-CSF controls nonlymphoid tissue dendritic cell homeostasis but is dispensable for the differentiation of inflammatory dendritic cells. *Immunity* **36**, 1031-1046 (2012).
 81. Morstyn, G. & Burgess, A.W. Hemopoietic growth factors: a review. *Cancer Res* **48**, 5624-5637 (1988).
 82. Iwasaki-Arai, J., Iwasaki, H., Miyamoto, T., Watanabe, S. & Akashi, K. Enforced granulocyte/macrophage colony-stimulating factor signals do not support lymphopoiesis, but instruct lymphoid to myelomonocytic lineage conversion. *J Exp Med* **197**, 1311-1322 (2003).
 83. Hamilton, J.A. & Anderson, G.P. GM-CSF Biology. *Growth Factors* **22**, 225-231 (2004).
 84. Inaba, K. *et al.* Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med* **176**, 1693-1702 (1992).
 85. Trapnell, B.C. & Whitsett, J.A. Gm-CSF regulates pulmonary surfactant homeostasis and alveolar macrophage-mediated innate host defense. *Annu Rev Physiol* **64**, 775-802 (2002).
 86. Metcalf, D. Hematopoietic cytokines. *Blood* **111**, 485-491 (2008).
 87. Ballinger, M.N. *et al.* Role of granulocyte macrophage colony-stimulating factor during gram-negative lung infection with *Pseudomonas aeruginosa*. *Am J Respir Cell Mol Biol* **34**, 766-774 (2006).
 88. O'Mahony, D.S., Pham, U., Iyer, R., Hawn, T.R. & Liles, W.C. Differential constitutive and cytokine-modulated expression of human Toll-like receptors in primary neutrophils, monocytes, and macrophages. *Int J Med Sci* **5**, 1-8 (2008).
 89. Guthridge, M.A. *et al.* Growth factor pleiotropy is controlled by a receptor Tyr/Ser motif that acts as a binary switch. *EMBO J* **25**, 479-489 (2006).
 90. Sere, K.M. *et al.* Dendritic cell lineage commitment is instructed by distinct cytokine signals. *Eur J Cell Biol* **91**, 515-523 (2012).
 91. Hiasa, M. *et al.* GM-CSF and IL-4 induce dendritic cell differentiation and disrupt osteoclastogenesis through M-CSF receptor shedding by up-regulation of TNF-alpha converting enzyme (TACE). *Blood* **114**, 4517-4526 (2009).
 92. Paine, R., 3rd *et al.* Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in the innate immune response to *Pneumocystis carinii* pneumonia in mice. *J Immunol* **164**, 2602-2609 (2000).
 93. Tada, Y. *et al.* Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor inhibits IL-12 production of mouse Langerhans cells. *J Immunol* **164**, 5113-5119 (2000).
 94. Armitage, J.O. The use of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in bone marrow transplantation. *Semin Hematol* **29**, 14-18 (1992).

95. Tacke, P.J., de Vries, I.J., Torensma, R. & Figdor, C.G. Dendritic-cell immunotherapy: from ex vivo loading to in vivo targeting. *Nat Rev Immunol* **7**, 790-802 (2007).
96. Wills-Karp, M. & Finkelman, F.D. Untangling the complex web of IL-4- and IL-13-mediated signaling pathways. *Sci Signal* **1**, pe55 (2008).
97. Stenzel, W. *et al.* IL-4/IL-13-dependent alternative activation of macrophages but not microglial cells is associated with uncontrolled cerebral cryptococcosis. *Am J Pathol* **174**, 486-496 (2009).
98. Munitz, A., Brandt, E.B., Mingler, M., Finkelman, F.D. & Rothenberg, M.E. Distinct roles for IL-13 and IL-4 via IL-13 receptor alpha1 and the type II IL-4 receptor in asthma pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 7240-7245 (2008).
99. Lee, C.G. *et al.* Interleukin-13 induces tissue fibrosis by selectively stimulating and activating transforming growth factor beta(1). *J Exp Med* **194**, 809-821 (2001).
100. Fichtner-Feigl, S., Strober, W., Kawakami, K., Puri, R.K. & Kitani, A. IL-13 signaling through the IL-13alpha2 receptor is involved in induction of TGF-beta1 production and fibrosis. *Nat Med* **12**, 99-106 (2006).
101. Kaviratne, M. *et al.* IL-13 activates a mechanism of tissue fibrosis that is completely TGF-beta independent. *J Immunol* **173**, 4020-4029 (2004).
102. Sinha, P., Clements, V.K. & Ostrand-Rosenberg, S. Interleukin-13-regulated M2 macrophages in combination with myeloid suppressor cells block immune surveillance against metastasis. *Cancer Res* **65**, 11743-11751 (2005).
103. Yang, M.S. *et al.* Interleukin-13 enhances cyclooxygenase-2 expression in activated rat brain microglia: implications for death of activated microglia. *J Immunol* **177**, 1323-1329 (2006).
104. Xu, B. *et al.* Interleukin-13 induction of 15-lipoxygenase gene expression requires p38 mitogen-activated protein kinase-mediated serine 727 phosphorylation of Stat1 and Stat3. *Mol Cell Biol* **23**, 3918-3928 (2003).
105. Krause, P. *et al.* Prostaglandin E2 is a key factor for monocyte-derived dendritic cell maturation: enhanced T cell stimulatory capacity despite IDO. *J Leukoc Biol* **82**, 1106-1114 (2007).
106. Robenek, H. *et al.* Compartmentalization of proteins in lipid droplet biogenesis. *Biochim Biophys Acta* **1791**, 408-418 (2009).
107. Guo, Y., Cordes, K.R., Farese, R.V., Jr. & Walther, T.C. Lipid droplets at a glance. *J Cell Sci* **122**, 749-752 (2009).
108. Walther, T.C. & Farese, R.V., Jr. The life of lipid droplets. *Biochim Biophys Acta* **1791**, 459-466 (2009).
109. Machaczka, M., Klimkowska, M., Regenthal, S. & Hagglund, H. Gaucher disease with foamy transformed macrophages and erythrophagocytic activity. *J Inherit Metab Dis* **34**, 233-235 (2011).
110. Schmitz, G. & Grandl, M. Lipid homeostasis in macrophages - implications for atherosclerosis. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **160**, 93-125 (2008).

111. Meester I, R.-T.A., Solis-Soto JM, Salinas-Carmona MC. The roles of lipid droplets in human infectious disease. *Medicina Universitaria* **13**, 207-216. (2011).
112. Saka, H.A. & Valdivia, R.H. Emerging Roles for Lipid Droplets in Immunity and Host-Pathogen Interactions. *Annu Rev Cell Dev Biol* (2012).
113. McLauchlan, J. Lipid droplets and hepatitis C virus infection. *Biochim Biophys Acta* **1791**, 552-559 (2009).
114. Samsa, M.M. *et al.* Dengue virus capsid protein usurps lipid droplets for viral particle formation. *PLoS Pathog* **5**, e1000632 (2009).
115. Aliberti, J. Host persistence: exploitation of anti-inflammatory pathways by *Toxoplasma gondii*. *Nat Rev Immunol* **5**, 162-170 (2005).
116. Peyron, P. *et al.* Foamy macrophages from tuberculous patients' granulomas constitute a nutrient-rich reservoir for *M. tuberculosis* persistence. *PLoS Pathog* **4**, e1000204 (2008).
117. Tanigawa, K. *et al.* Expression of adipose differentiation-related protein (ADRP) and perilipin in macrophages infected with *Mycobacterium leprae*. *FEMS Microbiol Lett* **289**, 72-79 (2008).
118. Tanigawa, K. *et al.* Essential role of hormone-sensitive lipase (HSL) in the maintenance of lipid storage in *Mycobacterium leprae*-infected macrophages. *Microb Pathog* **52**, 285-291 (2012).
119. Mattos, K.A. *et al.* Lipid droplet formation in leprosy: Toll-like receptor-regulated organelles involved in eicosanoid formation and *Mycobacterium leprae* pathogenesis. *J Leukoc Biol* **87**, 371-384 (2010).
120. Moore, K.J. & Tabas, I. Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis. *Cell* **145**, 341-355 (2011).
121. Russell, D.G., Cardona, P.J., Kim, M.J., Allain, S. & Altare, F. Foamy macrophages and the progression of the human tuberculosis granuloma. *Nat Immunol* **10**, 943-948 (2009).
122. Paulson, K.E. *et al.* Resident intimal dendritic cells accumulate lipid and contribute to the initiation of atherosclerosis. *Circ Res* **106**, 383-390 (2010).
123. Ordway, D., Henao-Tamayo, M., Orme, I.M. & Gonzalez-Juarrero, M. Foamy macrophages within lung granulomas of mice infected with *Mycobacterium tuberculosis* express molecules characteristic of dendritic cells and antiapoptotic markers of the TNF receptor-associated factor family. *J Immunol* **175**, 3873-3881 (2005).
124. Welsh, K.J., Risin, S.A., Actor, J.K. & Hunter, R.L. Immunopathology of postprimary tuberculosis: increased T-regulatory cells and DEC-205-positive foamy macrophages in cavitory lesions. *Clin Dev Immunol* **2011**, 307631 (2011).
125. Nakamura, K. *et al.* Increased numbers of CD68 antigen positive dendritic epidermal cells and upregulation of CLA (cutaneous lymphocyte-associated antigen) expression on these cells in various skin diseases. *J Dermatol Sci* **18**, 170-180 (1998).

126. Inaba, K. *et al.* Tissue distribution of the DEC-205 protein that is detected by the monoclonal antibody NLDC-145. I. Expression on dendritic cells and other subsets of mouse leukocytes. *Cell Immunol* **163**, 148-156 (1995).
127. Lulis, A.J. Atherosclerosis. *Nature* **407**, 233-241 (2000).
128. McLaren, J.E., Michael, D.R., Ashlin, T.G. & Ramji, D.P. Cytokines, macrophage lipid metabolism and foam cells: implications for cardiovascular disease therapy. *Prog Lipid Res* **50**, 331-347 (2011).
129. Noverr, M.C., Phare, S.M., Toews, G.B., Coffey, M.J. & Huffnagle, G.B. Pathogenic yeasts *Cryptococcus neoformans* and *Candida albicans* produce immunomodulatory prostaglandins. *Infect Immun* **69**, 2957-2963 (2001).
130. Biondo, G.A., Dias-Melicio, L.A., Bordon-Graciani, A.P., Acorci-Valerio, M.J. & Soares, A.M. *Paracoccidioides brasiliensis* uses endogenous and exogenous arachidonic acid for PGE_x production. *Mycopathologia* **170**, 123-130 (2010).
131. Rangel Moreno, J. *et al.* The role of prostaglandin E₂ in the immunopathogenesis of experimental pulmonary tuberculosis. *Immunology* **106**, 257-266 (2002).
132. Chen, M. *et al.* Lipid mediators in innate immunity against tuberculosis: opposing roles of PGE₂ and LXA₄ in the induction of macrophage death. *J Exp Med* **205**, 2791-2801 (2008).
133. Kim, M.J. *et al.* Caseation of human tuberculosis granulomas correlates with elevated host lipid metabolism. *EMBO Mol Med* **2**, 258-274 (2010).
134. Sorgi, C.A. *et al.* *Histoplasma capsulatum* cell wall {beta}-glucan induces lipid body formation through CD18, TLR2, and dectin-1 receptors: correlation with leukotriene B₄ generation and role in HIV-1 infection. *J Immunol* **182**, 4025-4035 (2009).
135. D'Avila, H. *et al.* *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin induces TLR2-mediated formation of lipid bodies: intracellular domains for eicosanoid synthesis in vivo. *J Immunol* **176**, 3087-3097 (2006).
136. Higgins, D.M. *et al.* Relative levels of M-CSF and GM-CSF influence the specific generation of macrophage populations during infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* **180**, 4892-4900 (2008).
137. Weston, S.A. & Parish, C.R. New fluorescent dyes for lymphocyte migration studies. Analysis by flow cytometry and fluorescence microscopy. *J Immunol Methods* **133**, 87-97 (1990).
138. Stanley, E.R. & Heard, P.M. Factors regulating macrophage production and growth. Purification and some properties of the colony stimulating factor from medium conditioned by mouse L cells. *J Biol Chem* **252**, 4305-4312 (1977).
139. Tomida, M., Yamamoto-Yamaguchi, Y. & Hozumi, M. Purification of a factor inducing differentiation of mouse myeloid leukemic M1 cells from conditioned medium of mouse fibroblast L929 cells. *J Biol Chem* **259**, 10978-10982 (1984).

140. DiDonato, D. & Brasaemle, D.L. Fixation methods for the study of lipid droplets by immunofluorescence microscopy. *J Histochem Cytochem* **51**, 773-780 (2003).
141. O'Neill HC, W., H. L. Limitations with in vitro production of dendritic cells using cytokines. *J Leukoc Biol* **75**, 600-603 (2004).
142. <http://www.histosearch.com/histonet/Aug05A/RE.HistonetRe.Cryosection.html> (Mattur K., 2005).
143. Greenspan, P., Mayer, E.P. & Fowler, S.D. Nile red: a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets. *J Cell Biol* **100**, 965-973 (1985).
144. Livak, K.J. & Schmittgen, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**, 402-408 (2001).
145. Katayama, H. *et al.* Phenotype and functional identity of GM-CSF-independent dendritic cells generated by long-term propagation of DC progenitor cells in bone marrow cells and skin Langerhans cells. *Transplant Proc* **37**, 17-19 (2005).
146. Brasel, K., De Smedt, T., Smith, J.L. & Maliszewski, C.R. Generation of murine dendritic cells from flt3-ligand-supplemented bone marrow cultures. *Blood* **96**, 3029-3039 (2000).
147. Zhan, Y. *et al.* The inflammatory cytokine, GM-CSF, alters the developmental outcome of murine dendritic cells. *Eur J Immunol* (2012).
148. Zou, G.M. & Tam, Y.K. Cytokines in the generation and maturation of dendritic cells: recent advances. *Eur Cytokine Netw* **13**, 186-199 (2002).
149. Li, X., Dancausse, H., Grijalva, I., Oliveira, M. & Levi, A.D. Labeling Schwann cells with CFSE-an in vitro and in vivo study. *J Neurosci Methods* **125**, 83-91 (2003).
150. Labadi, A. & Balogh, P. Differential preferences in serosal homing and distribution of peritoneal B-cell subsets revealed by in situ CFSE labeling. *Int Immunol* **21**, 1047-1056 (2009).
151. Tsakiris, I. *et al.* Carboxypeptidase-M is regulated by lipids and CSFs in macrophages and dendritic cells and expressed selectively in tissue granulomas and foam cells. *Lab Invest* **92**, 345-361 (2012).
152. Liu, K. *et al.* In vivo analysis of dendritic cell development and homeostasis. *Science* **324**, 392-397 (2009).
153. Hume, D.A. Macrophages as APC and the dendritic cell myth. *J Immunol* **181**, 5829-5835 (2008).
154. Kruger, T. *et al.* Identification and functional characterization of dendritic cells in the healthy murine kidney and in experimental glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* **15**, 613-621 (2004).
155. Martin, P. *et al.* Concept of lymphoid versus myeloid dendritic cell lineages revisited: both CD8alpha(-) and CD8alpha(+) dendritic cells are generated from CD4(low) lymphoid-committed precursors. *Blood* **96**, 2511-2519 (2000).

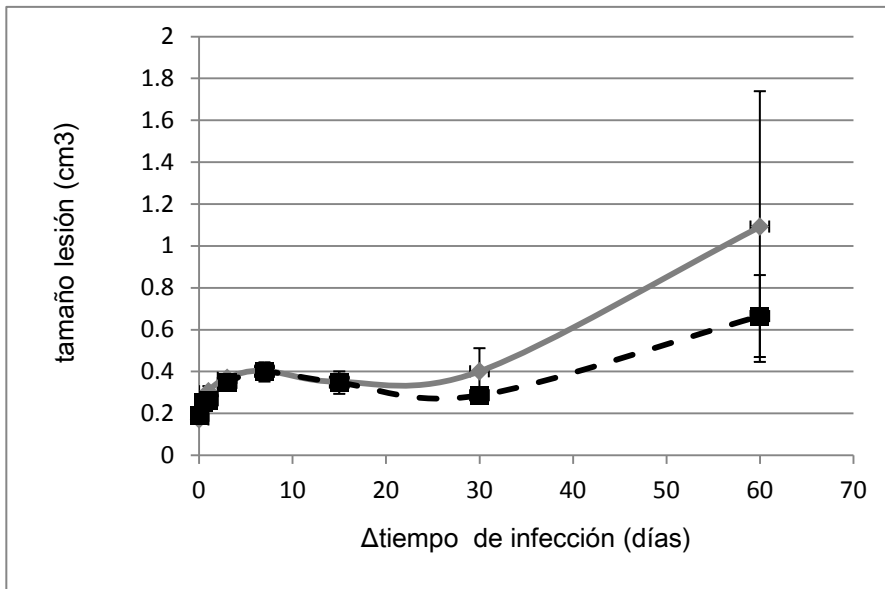
156. Ares, M.P. *et al.* Decreased inducibility of TNF expression in lipid-loaded macrophages. *BMC Immunol* **3**, 13 (2002).
157. Trevino-Villarreal, J.H., Vera-Cabrera, L., Valero-Guillen, P.L. & Salinas-Carmona, M.C. Nocardia brasiliensis Cell Wall Lipids Modulate Macrophage and Dendritic Responses favoring Development of Experimental Actinomycetoma in BALB/c Mice. *Infect Immun* (2012).
158. Hernández-Cabrera in Immunology, Vol. Dr.C. 94 (Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey; 2011).
159. Wang, L. *et al.* Specific role of neutrophil inducible nitric oxide synthase in murine sepsis-induced lung injury in vivo. *Shock* **37**, 539-547 (2012).
160. Qualls, J.E. *et al.* Arginine usage in mycobacteria-infected macrophages depends on autocrine-paracrine cytokine signaling. *Sci Signal* **3**, ra62 (2010).
161. Pesce, J.T. *et al.* Arginase-1-expressing macrophages suppress Th2 cytokine-driven inflammation and fibrosis. *PLoS Pathog* **5**, e1000371 (2009).
162. HogenEsch, H., Dunham, A., Seymour, R., Renninger, M. & Sundberg, J.P. Expression of chitinase-like proteins in the skin of chronic proliferative dermatitis (cpdm/cpdm) mice. *Exp Dermatol* **15**, 808-814 (2006).
163. Nio, J. *et al.* Cellular expression of murine Ym1 and Ym2, chitinase family proteins, as revealed by in situ hybridization and immunohistochemistry. *Histochem Cell Biol* **121**, 473-482 (2004).
164. Hung, S.I., Chang, A.C., Kato, I. & Chang, N.C. Transient expression of Ym1, a heparin-binding lectin, during developmental hematopoiesis and inflammation. *J Leukoc Biol* **72**, 72-82 (2002).
165. Jenkins, S.J. *et al.* Local macrophage proliferation, rather than recruitment from the blood, is a signature of TH2 inflammation. *Science* **332**, 1284-1288 (2011).
166. Iwasaki, Y. *et al.* In situ proliferation and differentiation of macrophages in dental pulp. *Cell Tissue Res* **346**, 99-109 (2011).
167. Silva Miranda, M., Breiman, A., Allain, S., Deknuydt, F. & Altare, F. The tuberculous granuloma: an unsuccessful host defence mechanism providing a safety shelter for the bacteria? *Clin Dev Immunol* **2012**, 139127 (2012).
168. Beatty, W.L. *et al.* Trafficking and release of mycobacterial lipids from infected macrophages. *Traffic* **1**, 235-247 (2000).
169. Guo, Y. *et al.* How is mRNA expression predictive for protein expression? A correlation study on human circulating monocytes. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* **40**, 426-436 (2008).
170. Pascal, L.E. *et al.* Correlation of mRNA and protein levels: cell type-specific gene expression of cluster designation antigens in the prostate. *BMC Genomics* **9**, 246 (2008).
171. He, Z. *et al.* Optimization of immunolocalization of cell cycle proteins in human corneal endothelial cells. *Mol Vis* **17**, 3494-3511 (2011).
172. Bergamini, A. *et al.* Macrophage colony-stimulating factor enhances the susceptibility of macrophages to infection by human immunodeficiency virus

- and reduces the activity of compounds that inhibit virus binding. *Blood* **84**, 3405-3412 (1994).
173. Haine, V., Fischer-Smith, T. & Rappaport, J. Macrophage colony-stimulating factor in the pathogenesis of HIV infection: potential target for therapeutic intervention. *J Neuroimmune Pharmacol* **1**, 32-40 (2006).
 174. Cakarova, L. *et al.* Macrophage tumor necrosis factor-alpha induces epithelial expression of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: impact on alveolar epithelial repair. *Am J Respir Crit Care Med* **180**, 521-532 (2009).
 175. Sullivan, R. Biochemical effects of human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) on the human neutrophil. *Immunol Ser* **57**, 485-498 (1992).
 176. Wynn, T.A. IL-13 effector functions. *Annu Rev Immunol* **21**, 425-456 (2003).
 177. Price, A.E. *et al.* Systemically dispersed innate IL-13-expressing cells in type 2 immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 11489-11494 (2010).
 178. Chomarat, P. & Banchereau, J. Interleukin-4 and interleukin-13: their similarities and discrepancies. *Int Rev Immunol* **17**, 1-52 (1998).
 179. Mendez-Tovar, L.J. *et al.* Cytokine production and lymphocyte proliferation in patients with *Nocardia brasiliensis* actinomycetoma. *Mycopathologia* **158**, 407-414 (2004).
 180. Pesce, J. *et al.* The IL-21 receptor augments Th2 effector function and alternative macrophage activation. *J Clin Invest* **116**, 2044-2055 (2006).
 181. Allen, J.E. & Wynn, T.A. Evolution of Th2 immunity: a rapid repair response to tissue destructive pathogens. *PLoS Pathog* **7**, e1002003 (2011).
 182. Verhagen, C.E. *et al.* Type 1- and type 2-like lesional skin-derived *Mycobacterium leprae*-responsive T cell clones are characterized by coexpression of IFN-gamma/TNF-alpha and IL-4/IL-5/IL-13, respectively. *J Immunol* **160**, 2380-2387 (1998).
 183. Nair, M.G., Cochrane, D.W. & Allen, J.E. Macrophages in chronic type 2 inflammation have a novel phenotype characterized by the abundant expression of Ym1 and Fizz1 that can be partly replicated in vitro. *Immunol Lett* **85**, 173-180 (2003).
 184. Deepak, P., Kumar, S. & Acharya, A. Interleukin-13-induced type II polarization of inflammatory macrophages is mediated through suppression of nuclear factor-kappaB and preservation of IkappaBalpha in a T cell lymphoma. *Clin Exp Immunol* **149**, 378-386 (2007).
 185. Alters, S.E., Gadea, J.R., Holm, B., Lebkowski, J. & Philip, R. IL-13 can substitute for IL-4 in the generation of dendritic cells for the induction of cytotoxic T lymphocytes and gene therapy. *J Immunother* **22**, 229-236 (1999).
 186. Rey, A. *et al.* IL-13 induces serine phosphorylation of cPLA2 in mouse peritoneal macrophages leading to arachidonic acid and PGE2 production and blocks the zymosan-induced serine phosphorylation of cPLA2 and eicosanoid production. *Biochim Biophys Acta* **1440**, 183-193 (1999).

187. Medeiros, A., Peres-Buzalaf, C., Fortino Verdan, F. & Serezani, C.H. Prostaglandin e(2) and the suppression of phagocyte innate immune responses in different organs. *Mediators Inflamm* **2012**, 327568 (2012).

APÉNDICES

APÉNDICE A: DESARROLLO DE LA LESIÓN



Desarrollo de la lesión de los 2 experimentos.

Línea continua: experimento 4; línea discontinua: experimento 5.

APÉNDICE B: CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNA POR BRADFORD

Curvas estándares fueron elaboradas con albúmina sérica bovina. La concentración protéica fue determinado por intrapolación bajo la condición que el r^2 de la curva estándar fuera por lo menos 0.99

	[prot.] (mg/mL)					
Exp 4	R1	R2	R3	R4	R5	Promedio
0 h	1.23	1.52	1.18	1.55	0.89	1.27
12 h	2.2	3.2	2.0	1.6	3.6	2.52
1 d	5.80	4.03	2.68	3.72	3.37	3.92
3 d	10.52	9.94	4.55	9.17	10.36	8.91
7 d	7.64	8.00	8.43	7.31	7.15	7.71
15 d	7.91	5.18	4.40	7.97	6.60	6.41
30 d	17.24	15.2	9.18	7.11	8.11	11.37
60 d	55.68	40.63	48.58	19.35	7.96	34.44

	[prot.] (mg/mL)					
Exp 5	R1	R2	R3	R4	R5	promedio
0 h	0.39	0.54	0.80	1.04	0.61	0.49
12 h	0.23	0.94	0.62	0.86	0.97	0.72
1d	3.47	3.59	3.08	2.66	4.67	3.49
3 d	4.89	6.28	3.85	3.10	4.06	4.44
7 d	3.35	5.68	3.96	5.61	7.20	5.16
15 d	5.99	7.43	2.35	6.85	8.64	6.25
30 d	1.78	3.48	2.72	2.20	3.11	2.66
60 d	5.29	3.16	3.19	5.20	3.16	4.00

Para preparar las soluciones ($V_{\text{final}} = 1.3 \text{ mL}$) de 1 mg proteína/mL se aplicó el siguiente cálculo:

$[\text{prot.}]_{\text{muestra}}$ (mg/mL)	V_{final} (mL)	V_{muestra} ($= (1.3 \times 1) / [\text{prot.}]_{\text{muestra}}$)	V_{PBS} ($= 1.3 - V_{\text{muestra}}$)	$[\text{prot.}]_{\text{final}}$ (mg/mL)
x	1.3	$y = 1.3/x$	$= 1.3 - y$	1

Las diluciones de 1 mg proteína/mL PBS fueron alicuoteadas (ca. 250 μL) y guardados a -20°C hasta su uso.

APÉNDICE C: CUANTIFICACIÓN Y PUREZA DEL RNA

Exp4	R1		R2		R3		R4		R5		promedio	
	RNA	260/280	RNA	260/280	RNA	260/280	RNA	260/280	RNA	260/280	RNA	260/280
0 h	2.95	1.96	3.00	2.01	2.59	1.99	2.29	1.95	3.15	1.98	2.8	1.98
12 h	2.82	1.99	1.90	1.98	1.60	1.96	1.47	2.05	1.64	2.04	1.9	2.00
1 d	3.78	1.96	4.07	1.99	3.76	1.96	3.00	1.99	3.31	1.98	3.6	1.98
3 d	7.75	1.97	7.01	1.99	7.80	1.94	5.60	1.99	4.33	2.01	6.5	1.98
7 d	5.25	2.00	5.86	1.98	4.68	1.95	4.75	1.97	7.17	1.98	5.5	1.98
15 d	3.81	1.99	8.34	1.97	7.10	1.98	5.00	2.00	5.11	1.98	5.9	1.98
30 d	10.4	1.98	7.15	1.99	7.88	1.97	4.08	1.99	4.33	1.97	6.8	1.98
60 d	6.30	1.88	10.12	1.88	9.74	1.91	11.56	1.76	7.19	1.94	9.0	1.87
bazo	-	-	-	-	-	-	-	-	7.30	1.96		
-30												

RNA ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) en DEPC-agua desionizada; R = ratón

Cuantificación con una dilución 1:100 en 10 mM Tris/1 mM EDTA (pH 8.0)

Exp5	R1		R2		R3		R4		R5		promedio	
	RNA	260/280	RNA	260/280	RNA	260/280	RNA	260/280	RNA	260/280	RNA	260/280
0 h	2.01	2.02	2.39	1.92	1.98	2.03	2.94	2.02	2.05	1.99	2.3	2.00
12 h	1.36	2.02	1.88	1.95	1.62	1.99	1.58	1.93	1.87	1.99	1.7	1.98
1 d	3.20	1.96	1.29	1.90	1.55	1.94	2.21	1.96	2.52	1.93	2.2	1.94
3 d	6.39	1.95	7.05	1.96	2.62	1.96	4.73	1.94	3.85	1.97	4.9	1.96
7 d	4.63	1.96	7.82	1.94	4.65	1.93	3.73	1.95	3.13	1.95	4.8	1.95
15 d	3.70	1.96	7.07	1.94	3.40	1.95	6.49	1.96	3.07	1.94	4.7	1.95
30 d	2.81	1.95	7.46	1.96	2.15	1.97	2.57	1.95	4.77	1.97	4.0	1.96
60 d	5.48	1.99	8.77	1.96	4.22	1.99	5.69	1.99	4.85	1.99	5.8	1.98
bazo												

RNA ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$), muestra en DEPC-agua desionizada; R = ratón

Cuantificación con una dilución 1:100 en 10 mM Tris/1 mM EDTA (pH 8.0)

RNA fue guardado a -80°C hasta su uso.

APÉNDICE D: CUANTIFICACIÓN Y PUREZA DEL cDNA

	R1		R2		R3		R4		R5		Promedio	
Exp4a	DNA	260/280	DNA	260/280	DNA	260/280	DNA	260/280	DNA	260/280	DNA	260/280
0 h	597	2.30	604	1.92	563	1.71	767	1.68	614	2.17	629	1.96
12 h	647	1.88	621	1.82	577	1.89	793	1.62	601	1.90	647	1.82
1 d	601	2.06	602	1.74	765	1.66	815	1.69	579	2.07	672	1.84
3 d	627	2.13	610	1.94	684	1.75	787	1.65	670	2.03	675	1.90
7 d	540	2.13	590	2.23	611	1.86	751	1.61	525	2.27	603	2.02
15 d	489	2.17	585	1.83	624	1.88	605	1.67	802	1.90	621	1.89
30 d	592	1.73	554	1.58	594	1.97	791	1.70	881	1.62	682	1.72
60 d	867	1.62	879	1.76	941	1.84	649	1.87	909	1.86	849	1.79
bazo									840	1.87		

cDNA (ng/μL); R = ratón.

Cuantificación con una dilución 1:100 en 10 mM Tris/1 mM EDTA (pH 8.0).

	R1		R2		R3		R4		R5		Promedio	
Exp5	DNA	260/280	DNA	260/280	DNA	260/280	DNA	260/280	DNA	260/280	DNA	260/280
0 h	926	1.69	844	1.74	989	1.54	999	1.75	873	1.76	926	1.70
12 h	906	1.71	1007	1.69	989	1.60	955	1.59	795	1.71	930	1.66
1 d	836	1.44	992	1.72	1007	1.68	950	1.66	783	1.82	913	1.66
3 d	805	1.69	771	1.76	966	1.72	962	1.69	841	1.75	869	1.72
7 d	755	1.70	886	1.67	1058	1.73	920	1.70	904	1.81	904	1.72
15 d	838	1.70	969	1.58	910	1.77	976	1.74	887	1.82	916	1.72
30 d	947	1.72			938	1.80	949	1.71	824	1.72	914	1.74
60 d	929	1.73	1107	1.65	912	1.85	1346	1.76	990	1.64	1056	1.73
bazo												

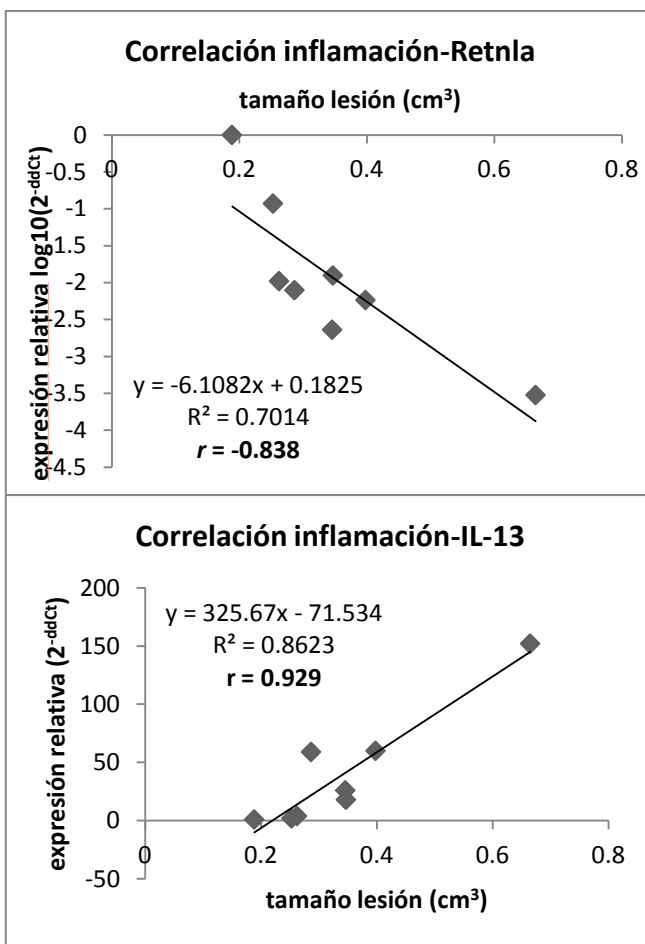
cDNA (ng/μL); R = ratón

Cuantificación con una dilución 1:100 en 10 mM Tris/1 mM EDTA (pH 8.0).

cDNA fue guardado a -20°C hasta su uso.

APÉNDICE E: COEFICIENTES DE CORRELACIÓN DE PEARSON

Variable	Tamaño lesión	IL-13
<i>nos2/iNOS</i>	0.593	
<i>chi3L3/Ym1</i>	0	-0.128
<i>retnla/FIZZ1</i>	-0.838	-0.764
GM-CSF	0.885	0.970
IL-13	0.929	



RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

Elisabeth Divera Alida Catharina Meester

Candidato para el Grado de
Doctor en Ciencias con Orientación en Inmunología

Tesis: ESTUDIO DE LA FORMACIÓN DE LAS CÉLULAS ESPUMOSAS EN EL ACTINOMICETOMA
EXPERIMENTAL POR *Nocardia brasiliensis*.

Campo de Estudio: Ciencias de la Salud

Biografía:

Datos personales: Nacida en Ursem, Los Países Bajos el 6 de agosto del 1966, hija de Cornelia G.E. Meester-Blank y Johannes Meester. Casada con el Dr. Juan Manuel Solís Soto y madre de 2 hijos, Nikita Estefanía y Max Kevin.

Educación: Egresada de la "Vrije Universiteit" (VU) en Amsterdam, grado obtenido: Drs. en Biomedicina, revalidado como Lic. en Biomedicina por la SEP. Cumplió estancias en el laboratorio de Oncología (de Dr. B. Pinedo) del hospital universitario de la VU estudiando el mecanismo de acción del fármaco anti-neoplástico etoposido/VP-16 y generando anticuerpos monoclonales dirigidos contra sarcomas blandos, utilizando técnicas como cultivo celular y elución alcalina de DNA. Estudió un Doctorado en Ciencias en la Escuela de Neurociencias (1989-1992), lo cual llevó a cabo en las instalaciones del Departamento de Histología de la Facultad de Biología de la VU, donde estudió la expresión de moléculas similares a insulina en el cerebro del molusco *Lymnaea Stagnalis* por medio de inmunohistoquímica e *in situ* hibridación bajo la supervisión del Dr. Jan van Minnen y Dr. Harry H. Boer (†). Generó 3 artículos publicados en revistas internacionales e indexadas (PMIDs: 1423480, 1323019, 1868853), pero no se tituló. Adicionalmente, estudió administración en horas vespertinas. Publicó otros 2 artículos antes de entrar al doctorado actual y la producción del doctorado actual incluye 1 artículo de revisión y 1 resumen publicados, otro artículo enviado y otro más que está en revisión por los co-autores, además participó en 4 congresos con carteles.

Experiencia profesional.

- 1) Asistente del gerente médico de Excerpta Médica Medical Communications, Elsevier Science en Amsterdam durante 6 meses;
- 2) Administradora en una agencia de Opel en Heerhugowaard, durante 2 años;
- 3) Profesionista de la tecnología de la información y computación en Cap Gemini, Utrecht, durante 3 años, (todos en los Países Bajos);
- 4) Instructor de inglés (free-lance, durante varias visitas a México entre 1991 y 1997) y de Histología, Biología Molecular y Celular, y Bioquímica en la Universidad de Monterrey y en la Facultad de Odontología de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL), Monterrey, México en el periodo 2003- 2008.