

---

## Interleucina-12 aumenta la actividad de la mieloperoxidasa de macrófagos en gérbiles infectados experimentalmente con *Sporothrix schenckii*

Aurelio Flores-García<sup>1</sup>, Jesús Salvador Velarde-Félix<sup>2</sup>, Pedro Aguiar- García<sup>1</sup>, Rogelio Sánchez-Gutiérrez<sup>3</sup>, Elza Bertha Flores-García<sup>4</sup>, Martha Edith Cancino-Marentes<sup>1</sup>, Cecilio Paredes-Estrada<sup>1</sup>, María Raquel Moya-García<sup>3</sup>, Claudia Elena González Zúñiga<sup>1</sup>, Alejandro Zambrano-Parra<sup>1</sup>.

95

<sup>1</sup>U.A. de Medicina, Universidad Autónoma de Nayarit, México. <sup>2</sup>Centro de Medicina Genómica del Hospital General de Culiacán, México. <sup>3</sup>U. A. de Enfermería, Universidad Autónoma de Nayarit, México. <sup>4</sup>Hospital General de Zona No.1, Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), Nayarit, México.

### Introducción

*S. schenckii*, es un hongo dimórfico que causa esporotricosis usualmente por implantación traumática en la piel y raramente por inhalación de esporas que causan una infección pulmonar. La esporotricosis presenta diferentes formas clínicas, que van de la cutánea fija a la infección sistémica. Esta última ocurre en individuos inmunodeprimidos, particularmente aquellos con síndrome de inmunodeficiencia adquirida, en quienes es potencialmente fatal (Morris-Jones, 2002; Silva-Vergara *et al.*, 2005).

En los mecanismos de defensa contra *S. schenckii*, la fagocitosis mediada por macrófagos y la respuesta inmune adaptativa juegan un papel crucial (Oda 1983; Carlos *et al.*, 2009). Recientemente se reportó que la IL-12 endógena regula la fagocitosis de *S. schenckii*

por MP, evidenciada por una disminución de la internalización del hongo cuando esta citocina fue bloqueada *in vivo* con anticuerpos neutralizantes anti-IL-12, en un modelo de infección experimental (Flores-García *et al.*, 2010).

IL-12 es producida primariamente por fagocitos y células presentadoras de antígenos en respuesta a una variedad de agentes infecciosos (Trinchieri, 2003; Trinchieri, 1994). Induce la producción de interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) por células T y asesinas naturales e induce la diferenciación de células T CD4+ nativas a células Th1 productoras de IFN- $\gamma$  (Sthephanie, 1997). A su vez el IFN- $\gamma$  induce activación de macrófagos, lo cual conduce a la eliminación de una gran variedad de patógenos in

fecciosos (Goldberg *et al.*, 1990; Brown *et al.*, 1990; Flynn, 1993).

Uno de los sistemas que juegan un papel importante en la actividad microbicida de los fagocitos activados es el formado por MPO-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-cloruro. La MPO en la presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> cataliza la oxidación de cloruro para producir ácido hipocloroso, el cual es un potente agente microbicida (Klebanoff, 2005; Hansson *et al.*, 2006). La MPO es una enzima catalítica que se encuentra principalmente en neutrófilos y en menor grado en monocitos. Los macrófagos carecen de MPO, sin embargo, los macrófagos activados internalizan la MPO liberada por neutrófilos al medio extracelular (Marcinkiewicz, 1997). Por lo tanto ya que IL-12 induce la activación de macrófagos, el objetivo del presente estudio fue analizar el efecto *in vivo* de rmlIL-12 sobre la actividad de MPO de MP en gérbiles con esporotricosis experimental.

## **Materiales y métodos**

### *Animales.*

Gérbiles (*Meriones Unguiculatus*) machos de tres meses de edad con peso de 65 – 70 g fueron facilitados por el laboratorio animal del Centro

de Investigación Biomédica de Occidente (CIBO) en Guadalajara, Jal., México. Los animales fueron alojados en un ambiente libre de patógenos y con acceso libre a comida y agua. El experimento fue aprobado por el comité de ética para experimentos con animales en el CIBO.

### *S. schenckii.*

Las células de *S. schenckii* fueron obtenidas de un cultivo aislado de un paciente con esporotricosis linfocutánea diagnosticada en el departamento de dermatología del Hospital Juan I. Menchaca en Guadalajara, Jalisco, México. La fase de levaduras de este hongo se obtuvo por cultivo en infusión cerebro-corazón (DIFCO) a 37 °C, por 24 h. Las levaduras fueron lavadas tres veces con solución buffer de fosfatos (PBS) pH 7.4, por centrifugación a 2000 rpm por 5 min. El número de células fue determinado en una cámara de Neubauer y ajustadas a una concentración de 1.2 x 10<sup>7</sup> células de levadura / ml.

### *Infección experimental.*

Gérbiles machos (n=10) fueron inoculados en el cojinete plantar posterior izquierdo con 6x10<sup>6</sup> células de levaduras de *S. schenckii* suspendidas en 0.05 ml de solución estéril de NaCl al 0.15 M. Un grupo control

(n=5), de animales no infectados, fueron inyectados únicamente con NaCl al 0.15 M.

*Tratamiento con IL-12 recombinante murina (rmIL-12).*

Gérbiles infectados (n=5) fueron inyectados intraperitonealmente (i.p.) con 500 ng de rmIL-12 diluida en 0.3 ml SBF, diariamente por 5 días consecutivos iniciando el mismo día de la inoculación, mientras los otros 5 gérbiles infectados recibieron solamente SBF. Los animales del grupo control (n=5) también recibieron SBF solamente.

*Macrófagos peritoneales.*

Dos semanas después de la infección, macrófagos activados con tioglicolato fueron cosechados de los gérbiles por medio de lavado peritoneal usando 10 ml de SBF estéril (pH 7.4). Las células peritoneales fueron lavadas dos veces por centrifugación a 200 g por 5 min y resuspendidas en RPMI-1640 (Sigma St Louis, MO). La viabilidad de células fue valorada con tinción de azul Trypano. Ordinariamente, más del 95% de células colectadas fueron viables.

*Valoración de la mieloperoxidasa.*

La actividad de la MPO fue determinada por el método Kaplow como ha sido previamente descrito (Ramos-Zepeda *et al*, 1986) y expresada como porcentaje de actividad de 300 MP.

*Análisis estadístico.*

Los resultados son expresados en el cuadro 1 como la media  $\pm$  desviación estándar (DE) de experimentos realizados por triplicado. La diferencia estadística entre los grupos fue evaluada por la prueba *t* de Student's, y un valor de  $p < 0.05$  fue considerado significativo.

**Resultados**

*Actividad de MPO.* Los resultados de este trabajo muestran que la actividad de la MPO de MP de gérbiles infectados no tratados con rmIL-12 fue significativamente más baja, cuando se comparó con la actividad de MPO de los macrófagos del grupo control. (cuadros 1 y 2). Por el contrario, los MP de los gérbiles infectados y tratados con rmIL-12 expresaron una actividad a MPO significativamente más alta comparada con los MP del grupo control.

Cuadro 1. % de actividad de mieloperoxidasa de MP.

Grupos (n=5)	Media	DE	Valor de P
Control	9.66	1.22	<0.001
Infectados no-tratados	5.98	1.10	<0.001
Infectados tratados con rmIL-12	13.38	1.67	<0.0001

---

## Discusión

IL-12 es una citocina proinflamatoria que es crucial en la regulación de la resistencia innata y la inmunidad adquirida en la defensa del organismo frente a una gran variedad de infecciones (Trinchieri, 2003). Los resultados de este estudio indican que rmlL-12 administrada i.p. ejerce un efecto sobre la actividad de MPO, como se evidenció por un aumento significativo de la actividad de esta enzima en los MP de gérbiles infectados con *schenckii*. Por el contrario, en gérbiles infectados no tratados con rmlL-12, sus macrófagos mostraron una baja actividad de MPO. Este hallazgo es nuevo, ya que no existen estudios previos que hayan reportado este fenómeno en infección experimental con este hongo patógeno.

Los resultados sugieren que rmlL-12 podría jugar un papel importante en la eliminación de *S. schenckii* por MP, vía el sistema oxidativo dependiente de MPO, a través de aumentar la actividad de esta enzima. Esto basado en la información de que la MPO, a partir de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y cloruro cataliza la formación de ácido hipocloroso, el cual es un potente agente microbicida (Hansson *et al.*, 2006).

En apoyo de lo anterior, estudios previos han reportado que

fagocitos deficientes en MPO expresan *in vitro* una deficiencia marcada en su actividad fungicida contra *Cándida albicans* (Diamond *et al.*, 1980). Asimismo, se ha demostrado en ratones deficientes en MPO, que el sistema oxidativo dependiente de MPO es importante *in vivo* para las defensas del hospedero contra una variedad de microorganismos, entre los que se incluyen *C. albican* y *Aspergillus fumigatus* (Aratani *et al.*, 1999; Aratani *et al.*, 2000; Aratani *et al.*). Además, resultados de un estudio más reciente, también en un modelo de ratones deficiente en MPO, su

gieren que esta enzima juega un papel principal en la defensa contra *Cryptococcus neoformans* (Aratani, 2006).

## Conclusiones

Estos datos sugieren que rmlL-12 tiene la capacidad de aumentar la actividad de la MPO en MP durante la infección experimental con *S. schenckii* en este modelo animal, sin embargo, se requiere de investigación adicional para dilucidar los mecanismos moleculares subyacentes involucrados en el proceso.

## Bibliografía

- Aratani, Y., Koyama, H., Nyui, S., Suzuki, K., Kura, F. & Maeda, N. (1999). Severe impairment in early host defense against *Candida albicans* in mice deficient in myeloperoxidase. *Infect Immun* 1999; 67:1828–1836.
- Aratani, Y., Kura, F., Watanabe, H., Akagawa, H., Takano, Y., Suzuki, K., Maeda, N. & Koyama, H. (2000). Differential host susceptibility to pulmonary infections with bacteria and fungi in mice deficient in myeloperoxidase. *J Infect Dis* 182, 1276–1279.
- Aratani, Y., Kura, F., Watanabe, H., Akagawa, H., Takano, Y., Suzuki, K., Dinauer, M. C., Maeda, N. & Koyama, H. (2002 b). Relative contributions of myeloperoxidase and NADPH-oxidase to the early host defense against pulmonary infections with *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. *Med Mycol* 40, 557–563.
- Aratani, Y., Kura, F., Watanabe, H., Akagawa, H., Takano, Y., Ishida-Okawara A. Suzuki, K., Dinauer, M. C., Maeda, N. & Koyama, H. (2006). Contribution of the myeloperoxidase-dependent oxidative system to host defence against *Cryptococcus neoformans*. *J Med Microbiol*; 55(9):1291-1299.
- Brown, A. E., Webster, H. K., Teja-Isavadharm, P., & Keeratithakul, D. (1990). Macrophage activation in falciparum malaria as measured by neopterin and interferon-gamma. *Clin Exp Immunol.*; 82(1): 97–101.
- Carlos, I. Z., Sassá, M. F., Sgarbi, D. B., Placeres, M. C., Maia, D. C. (2009). Current Research on the Immune Response to Experimental Sporotrichosis. *Mycopathologia*; 168:1–10.
- Diamond, R. D., Clark, R. A., & Haudenschild, C. C. (1980). Damage to *Candida albicans* hyphae and pseudohyphae by the myeloperoxidase system and oxidative products of neutrophil metabolism in vitro. *J Clin Invest*, 66, 908–917.
- Flores-García, A., Garibaldi-Becerra, V., Barba-Barajas, M., Velarde-Félix, S., & Fernandez-Argüelles, R. (2010). Endogenous Interleukin-12 Regulates Macrophage Phagocytosis of *Sporothrix schenckii*. *Rev Fac Cien Med (Quito)*;35(1):56-57.
- Flyn, J. L., Chan, J., Triebel, K. J., Dalton, D. K., Stewart, T. A. & Bloom, B. R. (1993). An essential role for interferon gamma in resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *JCB, J Cel Biol*; 178(6): 2249-2254.
- Goldberg, M., L., Belkowski, L. S., & Bloom, B. R. (1990). Regulation of macrophage function by interferon-gamma. Somatic cell genetic approaches in murine macrophage cell lines to mechanisms of growth inhibition, the oxidative burst, and expression of the chronic granulomatous disease gene. *J. Clin. Invest.* 85(2): 563-569.
- Hansson, M., Olsson, I., & Nauseef, W. M. (2006). Biosynthesis, processing, and sorting of human myeloperoxidase. *Arch Biochem Biophys*; 445:214–224.
- Klebanoff, S. J. (2005). Myeloperoxidase: friend and foe. *J Leukoc Biol* 77, 598–625.

- 
- Marcinkiewicz, J. (1997). Neutrophil chloramines: missing links between innate and acquired immunity. *Immunology Today*; 18(12):577-580.
- Morris-Jones, R. (2002). Sporotrichosis. *Clin Dermatol*; 27:427-431.
- Oda, L. M., Kubelka, C. F., Alviano, C. S., Travassos, R. (1983). Ingestión of Yeast Forms of *Sporothrix schenckii* by Mouse Peritoneal Macrophages. *Infect Immun*; 39:497-504.
- Ramos-Zepeda, R., & González-Mendoza, A. (1986). Metabolic activity of phagocytes in experimental sporotrichosis. *Mycopathologia*; 93:109-112.
- Silva-Vergara, M. L., Maneira, F. R., De Oliveira, R. M., Santos, C. T., Etchebehere, R. M., & Adad, S. J. (2005). Multifocal sporotrichosis with meningeal involvement in a patient with AIDS. *Med Mycol*; 43(2):187-90.
- Sthephanie, L. (1997). Constant and Kim Bottomly. Induction of Th1 and Th2 CD4+ T cell responses: The alternative approaches. *Annu Rev Immunol*; 15: 297-322.
- Trinchieri, G. (1994). Interleukin-12. A cytokine produced by antigen-presenting cells with immunoregulatory functions in the generation of T-helper cells type 1 and cytotoxic lymphocytes. *Blood*; 84: 4008-4027.
- Trinchieri, G. (2003). Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol*; 3:133-146.

### Datos de los autores

Dr. Aurelio Flores-García  
Profesor Investigador  
Unidad Académica de Medicina  
Universidad Autónoma de Nayarit, México  
E-mail: [affloresq@gmail.com](mailto:affloresq@gmail.com)

Dr. en C. Jesús Salvador Velarde-Félix  
Centro de Medicina Genómica,  
Hospital General de Culiacán, Sin. México.

Doctorante Pedro Aguiar-García  
Unidad Académica de Medicina,  
Universidad Autónoma de Nayarit, México.

MC Rogelio Sánchez-Guatiérrez  
Unidad Académica de Enfermería,  
Universidad Autónoma de Nayarit, México.

Dra. Elza Bertha Flores-García  
Hospital General de Zona No.1,  
Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS),  
Tepic, Nayarit, México

---

Martha Edith Cancino-Marentes  
Unidad Académica de Medicina,  
Universidad Autónoma de Nayarit, México.

Dr. Cecilio Paredes-Estrada  
Unidad Académica de Medicina,  
Universidad Autónoma de Nayarit, México.

MC María Raquel Moya-García  
Unidad Académica de Enfermería,  
Universidad Autónoma de Nayarit, México.

Estudiante Claudia Elena González Zúñiga  
Unidad Académica de Medicina,  
Universidad Autónoma de Nayarit, México.

Dr. Alejandro Zambrano-Parra  
Unidad Académica de Medicina,  
Universidad Autónoma de Nayarit, México.