

2. El papel de las subpoblaciones de células T y las Citoquinas en la regulación de infecciones bacterianas intracelulares

*Oliveira SC, Harms JS, Rech EL, Rodarte RS, Bocca AL, Goes AM and Splitter GA.

*Departamento de Bioquímica e Inmunología, Universidad Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil.

Brazilian J of Med Biol Res 1998; 31 :77-84

La respuesta inmune óptima a patógenos bacterianos intracelulares como *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Mycobacterium tuberculosis* y *Brucella abortus*, depende de la inmunidad adquirida mediada por células, la activación de macrófagos y las interacciones entre las diferentes subpoblaciones de linfocitos T.

La *Brucella abortus*, es una bacteria intracelular facultativa que infecta humanos y animales domésticos como los bovinos, a los cuales puede causar aborto espontáneo. La *Brucella* se replica en los fagocitos mononucleares del hospedero, allí sobrevive, escapando a los mecanismos extracelulares de respuesta, tales como el complemento y los anticuerpos. En general la patogénesis inducida por los agentes infecciosos intracelulares es el producto de una serie de interacciones entre el patógeno, las células del hospedero infectado y diferentes elementos del sistema inmune.

En esta revisión se describirán algunos experimentos realizados con *Brucella abortus* para ilustrar algunas de sus interacciones con el sistema inmune.

1. La *Brucella abortus* induce un perfil de citoquinas tipo 1 similar en linfocitos T de murinos, bovinos y humanos.

Las citoquinas son moléculas claves que determinan si la respuesta inmune es o no protectora. La divergencia hacia células Th2 (ayudadoras) o Th1 (citotóxicas) es regulada por la respuesta inmune natural contra la infección. La IL-12 y la IL-4 han sido identificadas como citoquinas inductoras de la respuesta celular Th1 o Th2 respectivamente. Utilizando RT-PCR para los perfiles de transcripción o ELISA para los productos secretados, se demostró que monocitos humanos expresaron transcritos de RNAm para la IL-12 a las 4 horas y secretaron

IL-12 24 horas después de la estimulación con las *Brucella abortus in vitro*. También se demostró que células de bazo murino expresaban el gen de la IL-12. Esta producción temprana de IL-12 durante la infección con *B. abortus* es de vital importancia para activar la vía de células Th1 que producen IFN- γ . En el modelo bovino y murino el perfil de citoquinas fue similar, observándose un aumento de transcritos para el INF- $\gamma\gamma$, pero no para IL-2 o IL-4, concluyendo que, el perfil de transcripción de citoquinas, así como los productos secretados son similares entre células T de murinos, bovinos y humanos, después de la estimulación con *B. abortus*.

2. El Papel de los linfocitos CD8+ y CD4+ en el control de la infección.

Para determinar la contribución de células CD4+ y CD8+ en el control de brucelosis, el número de bacterias fue monitoreado en bazo de ratones defectuosos (knockout) para el gen que codifica moléculas del CMH clase I y clase II y ratones control C57BL/6. Durante cuatro semanas post-infección, los animales fueron sacrificados semanalmente y se contaron las unidades formadoras de colonias (UFC). La brucelosis murina fue severa en animales con deficiencia funcional de células T CD8+ (en los ratones deficientes en la expresión de moléculas del CMH clase I), después de la primera semana post-infección, las UFC de *B. abortus* aumentaron dos logaritmos más que ratones defectuosos para el CMH clase II, demostrando el papel de las células T CD8+ sobre la inmunidad mediada por células en la brucelosis murina. El perfil de transcripción de citoquinas indicó que los esplenocitos infectados con *Brucella* de tres cepas de ratones, exhibió un perfil de citoquinas tipo 1 detectándose un marcado incremento en el nivel de expresión de transcritos de RNAm para el IFN γ en ratones "knockout" para el CMH clase I.

Para dilucidar el trabajo en red de las citoquinas y su posible papel en el aumento de la resistencia o susceptibilidad a *B. abortus*, se midieron IL-10 y el TGF β 1 en el sobrenadante de cultivos de esplenocitos, en los cuales no se detectó la producción de TGF β 1 en ninguna de las tres cepas de ratones, pero cantidades sustanciales de IL-10 fueron detectadas en células de bazo de ratones defectuosos para el CMH I, que tenían una deficiencia funcional de células T CD8+, proponiéndose entonces, que las células T CD8+ pueden inhibir la producción de IL-10.

Para definir mejor los mecanismos usados por las células T CD8+ para controlar la infección por *B. abortus*, se determinó un perfil de transcripción de citoquinas, donde no se observó ningún incremento en la expresión de RNAm para la IL-2 y IL-4 en células T CD8+ de ratones control y defectuosos para el CMH II infectados con *B. abortus*; sin embargo, los altos niveles de expresión de RNAm para el IFN γ observados en los LT CD8+ de ratones defectuosos para el CMH II comparados con LT CD8+ de ratones defectuosos para el CMH clase I, puede servir como un mecanismo compensatorio para la deficiencia de LT CD4+. El IFN- γ juega un papel central en la resistencia adquirida contra bacterias intracelulares en ratones, esta citoquina regula la actividad microbicida del macrófago e induce el desarrollo de células Th1; además, es uno de los mecanismos más importantes por el cual las subpoblaciones de células T ayudan al sistema inmune a controlar la infección.

3. Presentación de péptidos en el contexto de CMH clase I por una línea de macrófagos transfectados con genes de *Brucella*.

El complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) presenta antígenos endógenos que son sintetizados por las células presentadoras de antígenos y procesados dentro el citosol, luego los proteosomas cortan los antígenos en péptidos, los cuales son transportados hacia el lumen del retículo endoplásmico, allí los péptidos se unen a moléculas del CMH clase I, las cuales son llevadas a la superficie de la célula. En este traba-

jo los genes GroEs, GroEl, uvrA, y L7/L12 de *Brucella*, que codifican productos inmunodominantes, fueron subclonados dentro de un vector de expresión, estos constructos fueron transfectados a una línea celular de macrófagos (RAW 264.7), los cuales se cultivaron en presencia de linfocitos T murinos sensibilizados con *Brucella* para medir la respuesta proliferativa de células T. Cuando a este medio se le agregó un anticuerpo monoclonal anti-CD4, los linfocitos T sensibilizados proliferaron con los macrófagos transfectados con los genes GroEl o L7/L12; sin embargo, cuando se adicionó anti-CD8 o anti-CMH clase I, la proliferación se anuló, sugiriendo que el reconocimiento de los péptidos estuvo restringido a las moléculas del complejo de histocompatibilidad de clase I (CMH I), dependiente de las células T CD8+. Los macrófagos transfectados, fueron irradiados con rayos gamma y transferidos a ratones BALB/c, en los cuales indujeron una inmunidad protectora parcial contra la infección por *abortus*.

4. Inmunizaciones genéticas como una nueva estrategia para inducir protección mediada por células T CD8+.

La inmunización genética es una técnica simple y eficiente para sensibilizar células T, que involucra la inyección de un plásmido de expresión dentro de un animal (por medio de inyección directa o por bombardeo de partículas usando una pistola de genes), que codifica el antígeno de interés.

Las inmunizaciones con DNA han inducido exitosamente la actividad de linfocitos T citotóxicos restringidos al CMH de clase I, confiriendo protección contra diferentes patógenos como el virus de la influenza, virus de la rabia, virus de la Hepatitis B, malaria, Leishmaniosis y tuberculosis entre otras. Esta misma tecnología podría ser aplicada para probar la habilidad específica de los genes de la *Brucella* tales como el GroEl, L7/L12 para conferir inmunidad protectora.

Colaboración de
Omar Abdul Saldarriaga C., M.V.