

REVISION DE TEMA

## Mecanismos efectores del interferón gamma contra la infección por *Toxoplasma gondii*

Jorge Enrique Gómez<sup>1</sup>, Annie Bonhomme<sup>2</sup>, Moncef Guenounou<sup>2</sup>, Jean Michel Pinon<sup>2</sup>

### Resumen

*Toxoplasma gondii* es un protozoo parásito de desarrollo intracelular. La enfermedad humana producida por *T. gondii* es una causa importante de morbilidad y mortalidad neonatal y en pacientes inmunodeprimidos. En esta reseña, se revisan los conocimientos actuales sobre los mecanismos efectores del interferón gamma (IFN  $\gamma$ ), la principal citocina protectora contra *T. gondii*, incluyendo los resultados que hemos obtenido en un modelo de infección *in vitro* de células humanas monocitarias (THP1). El IFN  $\gamma$  protege las células humanas contra *T. gondii* por mecanismos diferentes a aquéllos con los que protege las células de ratón. En el modelo de infección de células THP1, el IFN  $\gamma$  protege por dos mecanismos independientes. Un primer efecto es la reducción del porcentaje de células parasitadas, el cual está ligado a una disminución de la actividad PLA<sub>2</sub> parasitaria y celular. Se trata de un nuevo mecanismo efector del IFN  $\gamma$  contra la infección toxoplásmica, diferente a los mecanismos parasiticidas y parasitostáticos previamente descritos. Un segundo efecto ocurre por interrupción del crecimiento parasitario intracelular a través de la activación de la enzima indoleamina-oxigenasa que degrada el triptófano, lo que constituye un efecto parasitostático. Contrariamente a lo que ocurre en el modelo de infección de células monocitarias de ratón, la producción de óxido nítrico (NO) no juega un papel determinante en los monocitos humanos.

**Palabras clave:** *Toxoplasma gondii*, interferón gamma, fosfolipasa A2, cinasas MAP, células THP1, monocitos humanos.

### Effector mechanisms of gamma interferon against *Toxoplasma gondii*

#### Abstract

*Toxoplasma gondii* is an intracellular obligate protozoan parasite. Human infection is generally subclinical, but hosts with defective cellular immunity are at risk of severe disease. In many countries, congenital toxoplasmosis and toxoplasmic encephalitis in HIV-infected individuals are significant causes of morbidity and mortality. We review here the effector mechanisms of gamma interferon, the major cytokine involved in the protection against *T. gondii*. The addition of IFN  $\gamma$  to cultured infected THP1 cells protected against *T. gondii* infection by an early mechanism involving a reduction in the number of parasitized cells. The reduction in the percentage of parasitized cells obtained by treatment with IFN  $\gamma$  is linked to a decrease in parasite and cellular PLA<sub>2</sub> activity. This is a new effector mechanism of IFN  $\gamma$  against *T. gondii* infection. A second effect is by inducing

<sup>1</sup> Unidad de Parasitología, Departamento de Salud Pública y Tropical, Universidad Nacional de Colombia, Santa Fe de Bogotá, D. C., Colombia

<sup>2</sup> Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Hôpital Maison Blanche, Université de Reims, Reims, Francia

indoleamine-oxigenase (IDO), an enzyme that reduces tryptophan stores. Tryptophan is essential for intracellular growth of *T. gondii*. Induction of IDO leads to a parasitostatic effect. In human monocytes induction of nitric oxide is not a part of the antitoxoplasmicidal effect induced by IFN  $\gamma$ .

**Key words:** *Toxoplasma gondii*, gamma interferon, phospholipase A2, MAP kinases, THP1 cells, human monocyte.

## Introducción

*Toxoplasma gondii* es el agente responsable de la toxoplasmosis, una de las infecciones parasitarias más frecuentes en el mundo. La infección en el hombre es generalmente asintomática o puede tener un curso clínico benigno. Sin embargo, la infección congénita o en los pacientes inmunodeprimidos puede ser muy seria y, quizás, mortal. En Francia, las tasas de primoinfección materna han permanecido estables en los últimos 15 años: de 4 a 5/1.000 (1). El grupo de estudio de la toxoplasmosis de Reims encontró una frecuencia de 1,8 casos de toxoplasmosis congénita por cada 1.000 nacimientos en 1995 (2). En ese país, la reducción de la frecuencia de las formas severas de la infección congénita se puede atribuir a la instauración, en 1978, de un programa de vigilancia serológica para las mujeres embarazadas seronegativas (3).

En Colombia, la toxoplasmosis congénita es aún un problema importante de salud pública. Según estudios realizados en diferentes regiones del país, cada año aparecen de 2 a 10 casos de toxoplasmosis congénita por cada 1.000 recién nacidos. Actualmente, el Ministerio de Salud no cuenta con un programa de control para la enfermedad. Es por ello que, ante la ausencia de una intervención terapéutica, anualmente nacen infectados entre 800 y 3.000 recién nacidos (4-7).

En cuanto al impacto sobre la población de pacientes inmunosuprimidos, es la causa más frecuente de lesiones focales en los pacientes con infección por VIH. El riesgo de la toxoplasmosis cerebral se correlaciona directamente con la prevalencia de toxoplasmosis en la población general e inversamente con la utilización de antibióticos profilácticos (8). En Francia y en otros países europeos como España,

Alemania, Bélgica y Suiza, la toxoplasmosis en pacientes con SIDA ocurre entre 10 y 40% de las infecciones oportunistas (9). Según un estudio prospectivo francés, la frecuencia de toxoplasmosis cerebral en los pacientes que sufren de SIDA y que han seguido la profilaxis anti-*Toxoplasma* es dos veces menor que en los pacientes que no han recibido dicha profilaxis (10). A partir de los datos de prevalencia de la toxoplasmosis en la población general y del número de casos de SIDA informados por el Ministerio de Salud, se pueden esperar entre 7.000 y 10.000 casos de toxoplasmosis cerebral en Colombia (11).

Es necesario encontrar nuevas drogas para la toxoplasmosis humana debido a la toxicidad de los medicamentos clásicos utilizados en el tratamiento de los pacientes inmunodeprimidos. De 40 a 70% de los pacientes con un tratamiento para toxoplasmosis cerebral deben suspenderlo por las reacciones de toxicidad (9). Por otro lado, se encuentra un 4% de fracaso terapéutico en los niños tratados por una toxoplasmosis congénita (12).

El estudio de los mecanismos de acción de las citocinas protectoras, como el interferón-gamma (IFN  $\gamma$ ) puede dar luces sobre nuevos blancos terapéuticos. Los mecanismos por los cuales el IFN  $\gamma$  protege las células contra la infección por *Toxoplasma* no se conocen completamente. Se han postulado mecanismos de tipo parasitocida y parasitostático que se pueden inducir de manera diferente en células de ratón o humanas, o incluso de un tipo celular a otro. Así mismo, hemos encontrado que existe un efecto sobre el mecanismo de entrada del parásito a la célula.

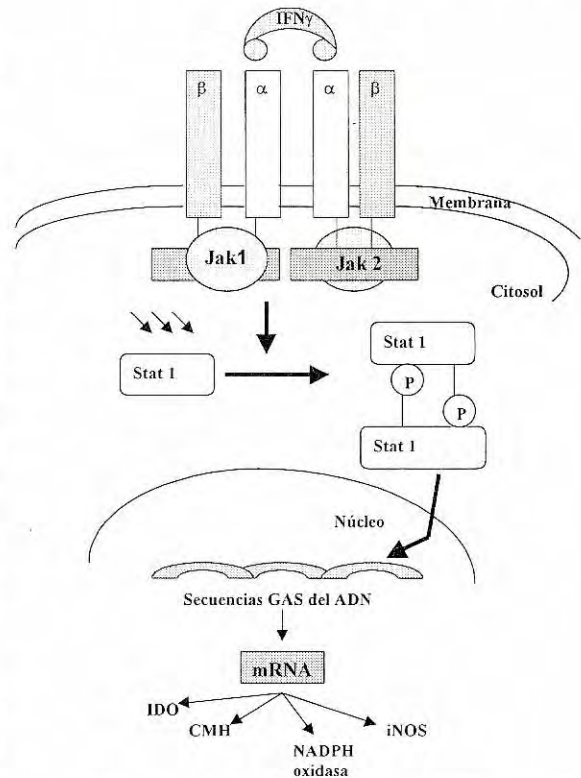
Esta revisión pretende recoger los datos existentes sobre estos mecanismos y dar una visión conjunta de ellos para el caso de una línea

monocitaria humana (THP1). Se proponen, además, nuevas vías de inhibición para el proceso de invasión parasitaria como resultado de los estudios sobre los mecanismos celulares por los cuales el IFN  $\gamma$  ejerce su acción protectora y que constituyen un potencial terapéutico.

**Estructura y función del interferón  $\gamma$**

Los interferones (IFN) son un grupo de glicoproteínas producidas en respuesta a la infección (13). Su clasificación en dos grupos se basa en sus diferencias de estructura y en sus propiedades funcionales. Los interferones de tipo I son el IFN  $\alpha$ , el IFN  $\beta$  y otros dos descubiertos recientemente, el IFN  $\tau$  y el IFN  $\omega$ . El IFN  $\gamma$  es el único que pertenece al grupo II. Los IFN de tipo I intervienen principalmente en la resistencia de las células a la infección viral y el IFN  $\gamma$  es muy importante en la infecciones de parásitos protozoarios.

El interferón  $\gamma$  es una linfocina típica producida por los linfocitos CD4+, CD8+ y NK (13). En el hombre, el subgrupo más importante de linfocitos productores de IFN  $\gamma$  es el que posee los marcadores de superficie CD30+. El IFN  $\gamma$  es un homodímero de 34 kDa, compuesto de seis superficies asimétricas antiparalelas; su simetría permite la unión a dos péptidos idénticos sobre el receptor celular. El receptor del IFN  $\gamma$  está compuesto de una glicoproteína de 90 kDa ( $\alpha$ ) y de una proteína transmembrana ( $\beta$ ). La unión del IFN  $\gamma$  a su receptor produce la fosforilación de este último (figura 1). El receptor es un complejo preformado de cinasas Jak1 y Jak2 que pertenecen a la familia de tirosina-cinasas. Se requiere la presencia simultánea de Jak1 y Jak2 para obtener su fosforilación. La fosforilación subsecuente de estas dos cinasas induce la fosforilación del factor Stat1 (*signal transducer and activator of transcription*), el cual es una proteína que induce, a su vez, la formación de homodímeros Stat1. Una vez fosforilado y dimerizado, el Stat1 puede ir hacia el núcleo donde se une a secuencias reguladoras de genes llamadas GAS (*gamma interferon activation site*). Las secuencias GAS son secuencias consenso (TTNCNNAA), que se encuentran en los genes de las proteínas activadas por el IFN  $\gamma$ . Las proteínas inducidas de esta manera son las



**Figura 1.** Vías de señalización intracelular del IFN  $\gamma$ . La unión del IFN  $\gamma$  a su complejo receptor (Jak1 y Jak2) produce su fosforilación. La fosforilación, a su vez, induce otra fosforilación del factor Stat1 (*signal transducer and activator of transcription*). Una vez fosforilado y dimerizado, el Stat1 puede ir hacia el núcleo donde se une a secuencias reguladoras de genes llamadas GAS (*gamma interferon activation site*) que se encuentran en los genes de las proteínas activadas por el IFN  $\gamma$ . Esto induce la expresión de proteínas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH), la indoleamina 2,3-dioxigenasa, la adenina-nucleótido-fosfato-oxidasa (NADPH oxidasa) y la sintetasa inducible del óxido nítrico (iNOS) que producen los radicales oxigenados y nitrados, respectivamente.

moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) implicadas en la presentación del antígeno, enzimas como la indoleamina-2,3 dioxigenasa, la adenina-nucleótidofosfato-oxidasa (NADPH oxidasa) y la sintetasa inducible del óxido nítrico (iNOS) que producen los radicales oxigenados y nitrados, respectivamente (14).

**Papel del IFN  $\gamma$  contra *T. gondii*: aportes del estudio de la respuesta inmune en el modelo murino**

El estudio de la respuesta inmune en el modelo murino de infección por *T. gondii* ha permitido

establecer cuáles son las citocinas responsables de la respuesta protectora efectiva (15). Una respuesta celular, más que humoral, es la responsable del control de la infección; es así como los ratones desprovistos de linfocitos B pueden sobrevivir a la infección, mientras que los ratones atímicos no logran hacerlo (16). Las primeras células activadas son inespecíficas, por ejemplo, los linfocitos NK que producen IFN  $\gamma$ . Esta respuesta se desencadena por los productos parasitarios de secreción. Al mismo tiempo, los monocitos comienzan a producir la IL 12 y el TNF  $\alpha$ . La mayoría de las células infectadas expresan antígenos de superficie del tipo CMH I. El efecto directo de esta forma de presentación de antígeno es la activación privilegiada de los CD8+ citotóxicos que lleva a una lisis de las células infectadas mediada por los CD8+ (17).

El IFN  $\gamma$  es el principal mediador de resistencia contra *T. gondii*. Esta citocina se considera como la clave de la respuesta inmune protectora contra *T. gondii* y otras infecciones intracelulares (18). La administración del IFN  $\gamma$  retarda la muerte de ratones que han sido inoculados con una dosis letal de taquizoítos de *T. gondii*. Así mismo, el IFN  $\gamma$  disminuye la severidad de las encefalitis toxoplásmicas en el modelo murino. La reactivación de la infección también está controlada por niveles adecuados de IFN  $\gamma$ . La administración de anticuerpos anti-IFN  $\gamma$  lleva a la aparición de quistes y taquizoítos libres (18). Si bien se ha demostrado que los CD8+ producen una cantidad importante, los CD4+, que son productores del IFN  $\gamma$  a una menor escala, también son necesarios para inducir una resistencia primaria. Una vez se ha establecido la inmunidad, la resistencia depende directamente de la actividad de los CD8+. La IL12 induce un fenotipo Th1 en las poblaciones de linfocitos durante la respuesta primaria a la infección y lleva a una producción aumentada del IFN  $\gamma$ . El TNF  $\alpha$  también juega un papel importante como potencializador del IFN  $\gamma$ ; los anticuerpos anti-TNF  $\alpha$  agravan la enfermedad en los ratones susceptibles y bloquean parcialmente la actividad de los macrófagos expuestos al IFN  $\gamma$ . Por otra parte, cuando los macrófagos se exponen a concentraciones bajas de TNF  $\alpha$  y de IFN  $\gamma$ , se

observa una mayor inhibición de la replicación de *T. gondii* que cuando se utiliza solamente el IFN  $\gamma$  (17).

Otro elemento importante aportado por el estudio del modelo murino es el relacionado con las vías T independientes (macrófagos y células NK). Se ha demostrado que las vías T independientes pueden proteger al huésped de una infección diseminada en el ratón desnudo. Esto prueba que las células no-T pueden ser un blanco potencial para las citocinas administradas exógenamente en el huésped inmunodeficiente. Otro aspecto estudiado en este modelo es el papel de las citocinas Th2; la IL 10 provoca una disminución en la producción del IFN  $\gamma$  e inhibe las funciones inducidas por esta citocina en el macrófago y la IL 6 contrarregula la respuesta protectora. De hecho, la utilización de anticuerpos anti-IL 6 y anti-IL 10 prolonga la vida de ratones desnudos y disminuye el número de quistes presentes en las lesiones inflamatorias. El factor de crecimiento y transformación  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) es otra citocina contrarreguladora que inhibe la expresión de receptores para el TNF  $\alpha$  durante la infección toxoplásmica. En conclusión, las citocinas de tipo Th2 como la IL 6, la IL 10 y el TGF- $\beta$ 1 tienen un papel negativo por la inhibición de la producción de las citocinas Th1 que son protectoras (19).

#### **Mecanismos efectores del IFN $\gamma$ durante la infección por *T. gondii*: diferencias entre macrófagos murinos y humanos**

El primer efecto descrito del IFN  $\gamma$  sobre los macrófagos y monocitos, que contrarresta el crecimiento de *T. gondii*, fue la producción de los competidores intermediarios de la cadena de oxígeno (20). Este mecanismo consiste en la inducción de la enzima deshidrogenasa de la nicotinamida-fosfato (NADPH) que, en presencia de dos moléculas de oxígeno, lleva a la producción de aniones superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), los cuales se convierten en peróxido de hidrógeno por la acción de la enzima superóxido-dismutasa. El peróxido de hidrógeno es una molécula altamente tóxica para ciertos parásitos en el interior de los fagolisosomas. Sin embargo, se ha encontrado que *in vitro*, los monocitos procedentes de pacientes con deficiencia en actividad NADPH

oxidasa (enfermedad granulomatosa crónica) continúan siendo protegidos por la adición del IFN  $\gamma$  exógeno, lo cual indica la existencia de mecanismos independientes de la producción de radicales oxigenados (20).

El óxido nítrico (NO) es otra molécula que tiene efectos antiparasitoides. Esta vía consiste en la producción de NO a partir de la L-arginina por la enzima NO-sintetasa (NOS). En las células de la línea monocitaria existen dos tipos de NOS: una NOS constitutiva, regulada por iones  $Ca^{2+}$  y calmodulina, y otra NOS inducible, regulada por citocinas. El NO provoca la pérdida de hierro en las enzimas que participan en la cadena de oxígeno (21, 22). Murray y Tietelbaum (23) demostraron que, si bien este mecanismo contribuye al efecto parasitoides en los macrófagos de ratón, no juega un papel importante en los monocitos o macrófagos humanos.

Pfefferkorn (24) demostró que el IFN  $\gamma$  bloquea el crecimiento parasitario en los fibroblastos humanos por agotamiento de los depósitos de triptófano, el cual es esencial para el crecimiento parasitario. Este efecto se produce a través de la inducción de la enzima 2,3-indoleaminoxigenasa (IDO) la cual cataliza la incorporación del anillo de pirrol en varios derivados indol como el triptófano, el 5-hidroxitriptófano y la 5-hidroxitriptamina (serotonina). La IDO es la primera enzima de la vía de la kinurenina que une el triptófano a la alanina y a la acetil-CoA. El núcleo pirrol sufre una catálisis oxidativa y el triptófano es convertido en N-formil-kinurenina la cual es clivada por la N-formilkinurenina-formamidasa para producir, finalmente, kinurenina. Esto explica por qué, durante la terapia con IFN  $\gamma$ , los pacientes presentan disminución de los niveles de triptófano y aumento de los de kinurenina en suero y orina. La kinurenina es transformada por varias enzimas del hígado y del cerebro en alanina y sus metabolitos, como el ácido quinolínico que tiene efectos neuroactivos. Se ha propuesto que la inducción de la IDO contribuye al efecto antiproliferativo y antitumoral del IFN  $\gamma$ .

Murray y colaboradores investigaron si el empobrecimiento en triptófano interviene como un mecanismo antimicrobiano inducido por el IFN

$\gamma$  en los macrófagos derivados de monocitos humanos (25). Si bien la adición de triptófano revierte parcialmente el efecto protector del IFN  $\gamma$ , su importancia es variable de un tipo de macrófagos derivados de monocitos humanos a otro. Por ejemplo, la adición de triptófano disminuye el efecto del IFN  $\gamma$  en macrófagos derivados de monocitos humanos de pacientes normales y de pacientes con CGD pero no sobre los macrófagos de origen pulmonar. Los autores interpretaron este hallazgo como si la participación de la IDO en los efectos anti-*Toxoplasma* del IFN  $\gamma$  fuera variable según el órgano implicado. Por otro lado, Catarral y colaboradores compararon los macrófagos de origen peritoneal humano con los macrófagos peritoneales de ratón y demostraron que los de origen humano no utilizaban la vía de radicales oxigenados, como sí lo hacían los de ratón (26). Esto demostró que definitivamente los mecanismos efectoros del IFN  $\gamma$  en macrófagos humanos son diferentes a las vías utilizadas por el IFN  $\gamma$  en el ratón y, en consecuencia, que deben existir mecanismos inmunológicos innatos diferentes en ambas especies.

La depleción de hierro como mecanismo efector del IFN  $\gamma$  contra *T. gondii* fue probada en macrófagos derivados de monocitos humanos (27). Este efecto mostró su eficacia para *Legionella pneumophila* pero no contra *T. gondii*. Varios trabajos sugieren la existencia de mecanismos adicionales del IFN  $\gamma$  contra *T. gondii*; por ejemplo, en las células endoteliales humanas, ni la saturación de los cultivos con triptófano, ni los inhibidores de la producción de derivados nitrados ni de la producción de radicales oxigenados impidieron el efecto protector del IFN  $\gamma$  (28). Además, se observó un efecto sobre la invasión que no estaba ligado a efectos parasitoides o parasitostáticos en las células de microglia fetal humana (29).

Los estudios sobre los mecanismos efectoros del IFN  $\gamma$  demuestran, entonces, la existencia de vías pleiotrópicas que varían en importancia de un tipo celular a otro y de una especie a otra. El papel protector preponderante de esta citocina lleva a preguntarse sobre la existencia de vías desconocidas que puedan sugerir nuevas perspectivas

terapéuticas que imiten las vías efectoras naturales de esta citocina.

### **Un nuevo mecanismo efector del IFN $\gamma$ : inhibición de la invasión parasitaria por inhibición de actividades fosfolipasa A2**

Los hallazgos en microglia fetal humana nos llevaron a formular la hipótesis de que el IFN  $\gamma$  podría estar actuando sobre enzimas que favorecen la invasión parasitaria. Las candidatas que aparecieron en primer lugar fueron las enzimas fosfolipasas A2 (PLA<sub>2</sub>). Las fosfatidas sn-2 acilhidrolasas o PLA<sub>2</sub> son esterasas que hidrolizan las uniones éster que se encuentran en la posición sn-2 de los fosfolípidos. El resultado de esta actividad enzimática es la liberación de un ácido graso libre y de un lisofosfolípido. Las PLA<sub>2</sub> son en realidad una superfamilia de enzimas compuesta de nueve grupos que participan en los procesos de transducción de señal, formación de eicosanoides y remodelación de los lípidos de membrana (30). Las PLA<sub>2</sub> favorecen el proceso de invasión de varios microorganismos como *Trypanosoma* (31), *Entamoeba* (32) y *Rickettsia* (33). Saffer, Krug y Schwartzmann demostraron que la utilización de inhibidores de la actividad PLA<sub>2</sub> disminuye la infección por *T. gondii* (34). En otro trabajo, el mismo equipo caracterizó una actividad fosfolipasa A en las fracciones sonicadas de *T. gondii* (35). En un ensayo de invasión celular, la adición de esas fracciones solubles aumentó hasta 2,6 veces el porcentaje de invasión de los taquizoítos. Schwartzmann y Saffer propusieron varias hipótesis para explicar cómo las PLA<sub>2</sub> pueden participar en la penetración de *T. gondii* a la célula huésped (35). Por un lado, los productos de la actividad de la PLA<sub>2</sub> parasitaria (especialmente, el ácido araquidónico) pueden provocar lisis de la membrana celular (36), fusión de la misma (37) o liberación de Ca<sup>2+</sup> (38). De otro lado, una modificación de la fluidez de la membrana por la hidrólisis de ciertos fosfolípidos facilitaría la invaginación de la membrana de la célula huésped por el parásito (39).

Por métodos inmunocitoquímicos de microscopía electrónica, pudimos poner en evidencia la presencia de varias isoformas de PLA<sub>2</sub> en el parásito, que eran homólogas a algunas descritas

en las células de mamíferos (40). Así, dos PLA<sub>2</sub> secretoras o sPLA<sub>2</sub> de tipo I y tipo II, se localizaron esencialmente en organelos secretores (roptrias y gránulos densos) y una PLA<sub>2</sub> citosólica o cPLA<sub>2</sub> en el citosol y en la membrana perinuclear. Esta última observación coincide con la localización descrita en las células de mamíferos (41).

Como habíamos encontrado en un modelo de infección *in vitro* que el IFN  $\gamma$  posee un efecto sobre la invasión diferente de los efectos de inducción de mecanismos parasitocidas y parasitostáticos descritos previamente (42), propusimos la hipótesis de que este efecto podría estar ligado a efectos del IFN  $\gamma$  sobre una o varias PLA<sub>2</sub>. Para el estudio de las modificaciones en actividad de cada isoforma de PLA<sub>2</sub>, desarrollamos un modelo de infección en cultivos celulares utilizando la línea monocitaria humana THP1. En este modelo, demostramos en una primera etapa la implicación de la sPLA<sub>2</sub> y la cPLA<sub>2</sub> en el proceso invasor de *T. gondii* con inhibidores específicos para cada tipo de PLA<sub>2</sub>. Posteriormente, realizamos un fraccionamiento subcelular y obtuvimos una fracción soluble (membrana) y otra citosólica. En estas fracciones realizamos mediciones de actividad de cPLA<sub>2</sub> y sPLA<sub>2</sub> tipo IIa en células infectadas y no infectadas y tratadas y no tratadas con el IFN  $\gamma$ . Las pruebas de actividad enzimática y la realización de *Western blots* nos demostraron que la infección por *T. gondii* induce una fuerte actividad de la enzima sPLA<sub>2</sub> tipo IIa, en las fracciones de membrana de las células infectadas. Además, encontramos que el IFN  $\gamma$  reduce la actividad y la expresión de este tipo de sPLA<sub>2</sub> en las células y en los parásitos. La infección por *T. gondii* disminuye la expresión de la proteína cPLA<sub>2</sub> en las fracciones citosólicas de las células infectadas y produce un aumento importante de la actividad enzimática específica cPLA<sub>2</sub> en las fracciones de membrana de esas mismas células infectadas. La adición del IFN  $\gamma$  disminuye este aumento. A diferencia de la sPLA<sub>2</sub>, el aumento en la actividad cPLA<sub>2</sub> no se debe a la cPLA<sub>2</sub> de origen celular sino a la de origen parasitario. También hemos demostrado que el IFN  $\gamma$  reduce la actividad cPLA<sub>2</sub> parasitaria en fracciones de *T. gondii* sin célula, lo cual explica el efecto obtenido sobre las fracciones de membrana de células infectadas (40).

La protección del IFN  $\gamma$  contra la invasión de *T. gondii* es un nuevo mecanismo protector diferente a los de activación parasitocida y parasitostática informados previamente (42). Se describió un efecto anti-invasor del IFN  $\gamma$  en infecciones por otros microorganismos, como en el caso de infección por *Pneumocystis carinii* en un modelo de infección sobre células de epitelio alveolar A549 (43), para *Yersinia enterocolitica* en fibroblastos humanos (44) y para *Trypanosoma cruzi* en macrófagos humanos (45). La disminución de la infección por *P. carinii* se ha explicado por una disminución de la expresión de integrinas  $\alpha 5$  y  $\beta 1$  celulares (43). La disminución de la infección por *T. cruzi* se explicó por una disminución en la expresión de receptores de manosa (45); no se planteó ningún mecanismo en el caso del modelo con *Yersinia*. Bauvois y colaboradores han informado que el tratamiento de los monocitos humanos por IFN  $\gamma$  reduce su capacidad de migración hacia el espacio extravascular a través de una disminución en la expresión de las integrinas  $\alpha 5$  y  $\beta 1$  (46). Dhawan y colaboradores demostraron que la infección por el virus VIH induce los monocitos humanos a un aumento en su capacidad de migración (47). El tratamiento *in vitro* de esos monocitos con IFN  $\gamma$  reduce esta capacidad. Este efecto se correlacionó con una reducción en la expresión de la metaloproteinasa MMP-9, lo cual se atribuyó a una disminución de la actividad  $PLA_2$ , productora de  $PGE_2$ , una prostaglandina necesaria para la síntesis de MMP-9 (47). Por tanto, el efecto inhibitorio de la invasión para varios microorganismos dado por el IFN  $\gamma$  se puede explicar por una serie de eventos en cascada en la cual la inhibición de la  $PLA_2$  actúa como el evento iniciador principal. La disminución de la actividad  $PLA_2$  puede tener consecuencias sobre ciertos receptores de membrana necesarios para la entrada activa del parásito. El estudio de la relación entre la disminución de la expresión de esos receptores y la actividad  $PLA_2$  permitirá discernir los mecanismos subyacentes al papel de la  $PLA_2$  en el proceso de invasión por *T. gondii*. Se debe hacer énfasis en la necesidad de diferenciar correctamente los procesos de fagocitosis de aquellos del proceso de invasión activa de los patógenos. La protección contra la

invasión activa de *T. gondii* puede ser un factor clave de la protección de las células huésped contra el parásito. Al evitar una entrada activa del parásito, lo cual permite su supervivencia intracelular, el sistema inmune favorece un proceso de fagocitosis. Este proceso de fagocitosis es igualmente preparado por el IFN  $\gamma$  que desencadena la maduración de los monocitos y su transformación en macrófagos, los cuales se encuentran completamente activados para realizar los procesos parasitocidas (48).

Tratando de profundizar en los mecanismos de transducción de señal, estudiamos la actividad de cinasas MAP en las fracciones citosólicas y de membrana de las células no infectadas e infectadas no tratadas y tratadas con IFN  $\gamma$ . Las cinasas MAP regulan varias funciones celulares como la respuesta a los factores de crecimiento, la diferenciación, la modificación del citoesqueleto y la activación de ciertas enzimas como la  $cPLA_2$ . Nuestros resultados muestran un aumento importante de la actividad de fosforilación de las cinasas MAP en las fracciones citosólicas y, sobre todo, en las de la membrana de las células infectadas por *T. gondii* (49). La adición de IFN  $\gamma$  redujo de manera importante este aumento de la actividad de cinasas MAP en las fracciones de células infectadas (49). Esto demostró que las cinasas MAP hacen parte de las vías de transducción de señal del IFN  $\gamma$ .

### Conclusiones y perspectivas

La figura 2 representa el conjunto de mecanismos efectores del IFN  $\gamma$  encontrados en el caso de infección por *Toxoplasma* en la línea monocitaria humana THP1. Hemos encontrado un nuevo mecanismo protector del IFN  $\gamma$  contra la infección por *T. gondii*. Este mecanismo está ligado a la reducción de la actividad de las  $PLA_2$  de origen parasitario, enzimas importantes para el proceso de invasión. Hemos demostrado, igualmente, que el IFN  $\gamma$  recombinante humano reduce las actividades de las  $sPLA_2$  y las  $cPLA_2$  parasitarias por un efecto directo sobre el parásito. Es ahora importante determinar como el IFN  $\gamma$  actúa sobre *T. gondii* y determinar la existencia de receptores parasitarios para esta citocina de origen humano. Este nuevo mecanismo nos ha llevado a realizar

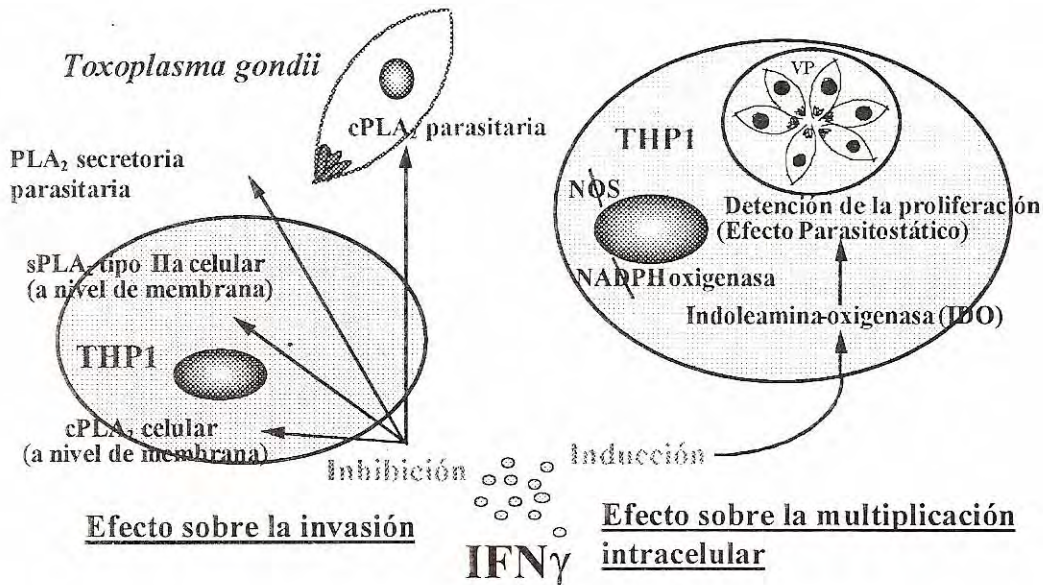


Figura 2. Mecanismos efectores del IFN $\gamma$ . Esquema de los mecanismos efectores por medio de los cuales el IFN $\gamma$  protege las células de la línea monocitaria THP1. Basado en los resultados presentados en las referencia 40 y 42.

ensayos en un modelo murino de infección toxoplásmica con inhibidores de PLA<sub>2</sub> con el fin de determinar su posible papel como coadyuvantes en la terapéutica.

### Referencias

1. **Carne B, Tirard-Fleury V.** La toxoplasmose chez la femme enceinte en France: séroprévalence, taux de séro-conversion et niveau de connaissance des mesures préventives. Tendances 1965-1995. Med Mal Infect 1996;26:431-6.
2. **Leroux B, Marx-Chemla C, Dupouy D, Trenque T.** Toxoplasmose congénitale: diagnostic néonatal. En: Groupe de Toxoplasmose de Reims, editores. Colloque Laboratoires Abbott - Diagnostic de la toxoplasmose materno foetale, ses conséquences. Reims: CHRU Laboratoire de Parasitologie-Mycologie 45 rue Cognacq Jay 51092;1995. p. 13.
3. **Thulliez P.** Screening programme for congenital toxoplasmosis in France. Scand J Infect Dis 1992;84(Suppl.):43-5.
4. **Gómez JE, Montoya MT, Castaño JC, Ríos MP, Montoya MT.** Toxoplasmosis congénita e hidranencefalia. Acta Med Colomb 1992;17:457-8.
5. **Gómez JE, Montoya MT, Castaño JC, Ríos MP, Perez JC.** Epidemiología de la infección por *Toxoplasma gondii* en gestantes de Armenia (Quindío). Colombia Médica 1993;24:14-8.
6. **Gómez JE, Castaño JC, Montoya MT.** Toxoplasmosis congénita en Colombia: un problema subestimado de salud pública. Colombia Médica 1995;26:66-70.
7. **Gómez JE, Montoya MT, Castaño JC.** A maternal screening program for congenital toxoplasmosis in Quindío, Colombia, and application of mathematical models to estimate incidences using age stratified data. Am J Trop Med Hyg 1997;57:180-6.
8. **Ammasari A, Murri R, Cingolani A, De Luca A, Antinori A.** AIDS-associated cerebral toxoplasmosis: an update on diagnosis and treatment. En: Gross U, editor. *Toxoplasma gondii*. Berlin: Springer. 1996; p.209-22.
9. **Katlama C.** Diagnosis and treatment of toxoplasmosis of the CNS in patients with AIDS. CNS Drugs 1996;5:331-43.
10. **Raffi F, Aboulker JP, Michelet C, Reliquet V, Pelloux H, Huart A, et al.** A prospective study of criteria for the diagnosis of toxoplasmic encephalitis in 186 AIDS patients. AIDS 1997;11:177-84.
11. **Montoya MT, Gómez JE, Castaño JC, Marx C, Aubert D, Bonhomme A, et al.** Avances diagnósticos en toxoplasmosis: PCR, nuevos marcadores de infección evolutiva y otras técnicas. Acta Med Colomb 1996;21:127-38.
12. **Pinon JM, Chemla C, Villena I, Foudrinier F, Aubert D, Toubas D, et al.** Early neonatal diagnosis of congenital toxoplasmosis: value of comparative enzyme-linked immunofiltration assay immunological profiles and anti-*Toxoplasma gondii* immunoglobulin M (IgM) or IgA



- immunocapture and implications for postnatal therapeutic strategies. *J Clin Microbiol* 1996;34:579-83.
13. **Billiau A.** Interferon  $\gamma$  biology and role in pathogenesis. *Adv Immunol* 1996;62:61-130.
  14. **Gallin JI, Farber JM, Holland SM, Nutman TB.** Interferon  $\gamma$  in the management of infectious diseases. *Ann Intern Med* 1995;123:216-24.
  15. **Gómez-Marín JE, Bonhomme A, Guenounou M, Aubert D, Valère A, Belloni A, et al.** Citoquinas y quinasas de proteínas durante el proceso infeccioso de *Toxoplasma gondii*. En: Carvajal H, Frenkel JK, de Sánchez N, editores. *Memorias del Segundo Congreso Internacional de Toxoplasmosis*. Facultad de Salud, Universidad del Valle, Cali, Colombia. Departamento de Biología, Universidad de los Andes, Santafé de Bogotá. 1998; p. 61-5.
  16. **Reyes L, Frenkel JK.** Specific and non-specific mediation of protective immunity to *Toxoplasma gondii*. *Infect Immun* 1987;55:856-63.
  17. **Gazzinelli RT, Denkers EY, Sher A.** Host resistance to *Toxoplasma gondii*: model for studying the selective induction of cell mediated immunity by intracellular parasites. *Infect Agents Dis* 1993;2:139-43.
  18. **Subauste CS, Remington JS.** Role of gamma interferon in *Toxoplasma gondii* infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1992;10:58-67.
  19. **Gómez-Marín J.E., Pinon J.M., Bonhomme A, Guenounou M.** Does human toxoplasmosis involve an imbalance in T1/T2 cytokines? *Medical Hypotheses* 1997;48:161-9.
  20. **Murray HW, Rubin BY, Carriero SM, Harris AM, Jaffee EA.** Human mononuclear phagocyte antiprotozoal mechanisms: oxygen dependent vs oxygen independent activity against intracellular *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* 1985;134:1982-7
  21. **Langermans JAM, van der Hulst MEB, Nibbering PH, Hiemstra PS, van Furth R.** IFN  $\gamma$  induced L-arginine dependant toxoplasmic activity in murine peritoneal macrophages is mediated by endogenous tumor necrosis factor alpha. *J Immunol* 1992;148:568-74.
  22. **Ding AH, Nathan CF, Stuerh DF.** Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. *J Immunol* 1988;141:2407-12.
  23. **Murray H, Teitelbaum RF.** L-arginine-dependent reactive nitrogen intermediates and the antimicrobial effect of activated human mononuclear phagocytes. *J Infect Dis* 1992;165:513-7.
  24. **Pfefferkorn ER.** Interferon gamma blocks the growth of *Toxoplasma gondii* in human fibroblasts inducing the host cell to degrade tryptophan. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984;81:908-12.
  25. **Murray HW, Aszuro-Sudol A, Wellner D, et al.** Role of tryptophan degradation in respiratory burst independent antimicrobial activity of gamma interferon stimulated human macrophages. *Infect Immun* 1989;57:845-9.
  26. **Caterall JR, Black CM, Leventhal JP, Rizk NW, Wachtel JS, Remington JS.** Nonoxidative microbicidal activity in normal human alveolar and peritoneal macrophages. *Infect Immun* 1987;55:1635-40.
  27. **Murray H, Granger AM, Teitelbaum RF.** Gamma interferon-activated human macrophages and *Toxoplasma gondii*, *Chlamydia psitaci* and *Leishmania donovani*: antimicrobial role of limiting intracellular iron. *Infect Immun* 1991;59:4684-6.
  28. **Woodman JP, Dimier IH, Bout D.** Human endothelial cells are activated by IFN  $\gamma$  to inhibit *Toxoplasma gondii* replication: Inhibition is due to a different mechanism from that existing in mouse macrophages and human fibroblasts. *J Immunol* 1991;147:2019-23.
  29. **Chao CC, Gekker G, Hu S, Peterson PK.** Human microglial cell defense against *Toxoplasma gondii*: the role of cytokines. *J Immunol* 1994;152:1246-57.
  30. **Dennis EA.** Diversity of group types, regulation and function of phospholipase A2. *J Biol Chem* 1994;269:13057-60.
  31. **Connely MC, Kerszenbaum F.** Modulation of macrophage interaction with *Trypanosoma cruzi* by phospholipase A<sub>2</sub>-sensitive component of the parasite membrane. *Biochem Biophys Res Commun* 1984;121:931-9.
  32. **Radvin J, Murphy CF, Guerrant RL, Long-Krug S.** Effects of antagonists of calcium and phospholipase A2 on the cytopathogenicity of *Entamoeba histolytica*. *J Infect Dis* 1985;152:542-9.
  33. **Walker DH, Firth WT, Ballard JG, Hegarty BC.** Role of phospholipase associated penetration mechanism in cell injury by *Rickettsia rickettsii*. *Infect Immun* 1983;40:840-2.
  34. **Saffer LD, Long-Krug SA, Schwartzmann JD.** The role of phospholipase in host cell penetration by *Toxoplasma gondii*. *Am J Trop Med Hyg* 1989;40:145-9.
  35. **Saffer LD, Schwartzmann JD.** A soluble phospholipase of *Toxoplasma gondii* associated with host cell penetration. *J Protozool* 1991;38:454-60.
  36. **Dwight JF, Hendry BM.** Actions of arachidonic acid on erythrocyte membrane Rb permeability. *Clin Chim Acta* 1995;238:187-97.
  37. **Creutz CE.** Cis-unsaturated fatty acids induce the fusion of chromaffin granules aggregated by synexin. *J Cell Biol* 1981; 91: 247-256.
  38. **Rustenbeck I, Lenzen S.** Effects of lysophosphatidylcholine and arachidonic acid on the regulation of calcium transport. *Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharm* 1989;339:37-41.
  39. **Borochof H, Zahler P, Wilbrandt W, Shinitzky M.** The effect of phosphatidylcholine to sphingomyelin mole ratio on the dynamic properties of sheep erythrocyte membrane. *Biochim Biophys Acta* 1977;470:382-8.

40. **Gómez Marín JE, Bonhomme A, Pinon JM.** Une famille d'enzymes présents des protozoaires aux mammifères: comment les phospholipases A2 participent au processus d'invasion de *Toxoplasma gondii*. *Année Biol (Paris)* 1998;78:185-202.
41. **Peters-Golden M, Song K, Marshall T, Brock T.** Translocation of cytosolic phospholipase A2 to the nuclear envelope elicits topographically localized phospholipid hydrolysis. *Biochem J* 1996;318:797-803.
42. **Gómez JE, Bonhomme A, Guenounou M, Pinon JM.** Role of interferon  $\gamma$  against invasion by *Toxoplasma gondii* in a human monocytic cell line (THP1): involvement of the parasite's secretory phospholipase A<sub>2</sub>. *Cellular Immunol* 1996;169:218-25.
43. **Pottratz ST, Weir AL.** Gamma interferon inhibits *Pneumocystis carinii* attachment to lung cells by decreasing expression of lung cell-surface integrins. *Eur J Clin Invest* 1997;27:17-22.
44. **Huppertz HI, Heesemann J.** The influence of HLA B27 and interferon  $\gamma$  on the invasion and persistence of *Yersinia* in primary human fibroblastes. *Med Microbiol Immunol* 1996;185:163-70.
45. **Kahn S, Wleklinski M, Aruffo A, Farr A, Coder D, Kahn M.** *Trypanosoma cruzi* amastigote adhesion to macrophages is facilitated by the mannose receptor. *J Exp Med* 1995;182:1243-58.
46. **Bauvois B, van Weyenbergh J, Rouillard D, Wietzerbin J.** TGF-b1-stimulated adhesion of human mononuclear phagocytes to fibronectin and laminin is abolished by IFN- $\gamma$ : Dependence on  $\alpha$ 5b1 and  $\beta$ 2 integrins. *Exp Cell Res* 1996;222:209-17.
47. **Dhawan S, Wahl LM, Heredia A, Zhang Y, Epstein JS, Meltzer MS, et al.** Interferon  $\gamma$  inhibits HIV-induced invasiveness of monocytes. *J Leuk Biol* 1995;58:713-6.
48. **Adams RO, Hamilton TA.** Macrophages as destructive cells in host defense. En: Galin JI, Goldstein IM, editores. *Inflammation: basic principles and clinical correlates*. New York: Raven Press; 1992. p.637-62.
49. **Gómez JE, Bonhomme A, Valere A, El'Btaouri H, Antonicelli F, Burllet H, et al.** Interferon  $\gamma$  signal transduction during parasite infection: Modulation of MAP kinases in the infection of human monocyte cells (THP1) by *Toxoplasma gondii*. *Parasite Immunol* 1998;20:631-5.