

LA DESNUTRICIÓN PROTEICA Y LA INFECCIÓN REGULAN LA EXPRESIÓN DEL RECEPTOR DE QUIMIOQUINA CXCR4 EN SUBPOBLACIONES LINFOIDES DE RATÓN

Por

Sergio Cuervo Escobar¹, Adriana Umaña Pérez¹, Karina Vargas Sánchez¹, Catalina Arévalo Ferro¹, Wilson Mejía Naranjo² & Myriam Sánchez Gómez¹

Resumen

Cuervo Escobar, S., A. Umaña Pérez, K. Vargas Sánchez, C. Arévalo Ferro, W. Mejía Naranjo & M. Sánchez Gómez: La desnutrición proteica y la infección regulan la expresión del receptor de quimioquina CXCR4 en subpoblaciones linfoides de ratón. Rev. Acad. Colomb. Cienc. 33(128): 313-322, 2009. ISSN 0370-3908.

La nutrición es un determinante de la respuesta inmune, y el déficit de proteína y calorías tienen efectos deletéreos en los sistemas de defensa de un organismo. La relación entre nutrición, migración y resistencia a infecciones es muy compleja. La quimiotaxis, o migración celular dirigida, es un fenómeno fundamental en procesos fisiológicos y patológicos. La quimioquina CXCL12 o factor derivado de células estromales-1 (SDF-1) y su receptor CXCR4 son reguladores de la hematopoyesis, la iniciación de la respuesta inmune adaptativa y la vigilancia inmunológica en tejidos periféricos. No se conoce el papel regulador de la nutrición sobre la expresión del receptor CXCR4 y sus implicaciones en la respuesta inmune. En este trabajo se examinó la expresión del receptor CXCR4 en esplenocitos y timocitos de ratón bajo restricción nutricional y frente a un reto con un agente infeccioso, *Listeria monocytogenes*. El análisis de la distribución de las diferentes subpoblaciones linfoides y la expresión del receptor CXCR4 se realizó el día 3 post-infección mediante citometría de flujo. Los resultados mostraron que el receptor CXCR4 se expresa con mayor abundancia en timocitos que en esplenocitos. La infección bacteriana indujo cambios significativos en los niveles de expresión del receptor y se observó que el perfil de expresión es sensible a los cambios en la ingesta de proteína.

Palabras clave: desnutrición, linfocitos, quimioquina, CXCR4, *listeria monocytogenes*.

¹ Laboratorio de Hormonas, Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.
Correspondencia: Myriam Sánchez de Gómez, Laboratorio de Hormonas, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.
Tel. 316 5000 Ext. 14466. Correo electrónico: mysanchezd@unal.edu.co

² Departamento de Bioquímica y Nutrición, Facultad de Ciencias Básicas, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.

Abstract

Nutrition is a determinant of the immune response and deficits in protein and calories have deleterious effects on host defense systems. The relationship among nutrition, migration and resistance to infection is very complex. Chemotaxis or cell migration is a basic phenomena for both physiological and pathological processes. Stromal-derived factor-1 (SDF-1) or CXCL12 chemokine and its receptor CXCR4 are important regulators of hematopoiesis, adaptative immunity and immunological surveillance in peripheral tissues. The regulatory role of nutrition in the CXCR4 expression and immune response are poorly understood. In the present study, we investigated the CXCR4 receptor expression in splenocytes and thymocytes of protein restricted mice infected with *Listeria monocytogenes*. Lymphocyte subsets and chemokine receptors were analysed by flow cytometry. Our results demonstrated higher levels of expression of the CXCR4 receptor in thymus in comparison with spleen. Infection induced significant changes in the CXCR4 expression levels and it was observed that the expression profile is affected by the level of protein intake.

Key words: malnutrition, lymphocytes, chemokine, CXCR4, *listeria monocytogenes*.

Introducción

Existen múltiples mecanismos a través de los cuales la desnutrición incrementa la susceptibilidad a infecciones. La función inmune tanto humoral como celular se encuentra considerablemente afectada en individuos con deficiencias energéticas o proteicas (Derek, 2005). La desnutrición proteico-calórica es la causa más común de inmunodeficiencia a nivel mundial. Un estado nutricional deficiente puede ocurrir no solo por el acceso limitado a los alimentos, sino también como resultado de alguna enfermedad. Se ha demostrado que la producción de células T y su función disminuyen en proporción a la severidad de la carencia de nutrientes (Chinen & Shearer, 2008). En niños, frecuentemente se asocia con un incremento en la susceptibilidad a infecciones bacterianas, fúngicas y virales. Estudios llevados a cabo en nuestro grupo de investigación, han mostrado como la desnutrición proteica afecta la distribución de poblaciones linfoides en bazo y timo de ratón (Naranjo *et al.*, 2002), así como otros investigadores han mostrado la asociación entre el déficit energético y procesos infecciosos con cambios en las subpoblaciones e índice apoptótico en linfocitos humanos (Najera *et al.*, 2004; El-Hodhod *et al.*, 2005). Adicionalmente se ha demostrado que estos y otros cambios generados en poblaciones fagocíticas, se encuentran asociados a una función inmune celular deficiente (Norine & John, 2003). Aunque existen diversos estudios que soportan el efecto devastador de la desnutrición sobre la función inmune, aun no se ha determinado con claridad el mecanismo por el cual se desarrolla esta inmunosupresión.

Dentro de los fenómenos involucrados en la función inmune, la migración celular resulta fundamental para la respuesta a agentes infecciosos. La migración celular es

esencial en diversos procesos biológicos, tanto fisiológicos como patológicos (Yamaguchi & Condeelis, 2007). La quimiotaxis, un tipo de migración celular dirigida a favor o en contra de un gradiente químico, es necesario en procesos de inflamación, curación de heridas y en general en respuesta inmune (Jin & Hereld, 2006). Dentro de las sustancias quimiotácticas más importantes se encuentran las quimioquinas, familia de aproximadamente 50 proteínas de bajo peso molecular que coordinan con precisión el tráfico de leucocitos a microambientes linfoides, regulando el reclutamiento de linfocitos a sitios de inflamación e infección (Pease & Williams, 2006). Una desregulación en la expresión de quimioquinas o sus receptores puede originar estados patológicos de tipo inmunológico (Tarrant & Patel, 2006; Desmetz *et al.*, 2007; Yoshinouchi *et al.*, 2007). Entre las distintas quimioquinas, CXCL12 o factor derivado de células estromales-1 (SDF-1) y su receptor CXCR4, expresados sobre la superficie de células T, células dendríticas y linfocitos B (Tarrant & Patel, 2006; Aboumrad *et al.*, 2007; Yoshinouchi *et al.*, 2007) son reguladores importantes en varios sistemas. Por ejemplo, se reporta que modulan la hematopoyesis en médula ósea y timo, la iniciación de la respuesta inmune adaptativa en bazo y nódulos linfáticos y la vigilancia inmunológica en tejidos periféricos (Moser *et al.*, 2004; Ebert *et al.*, 2005; Ghosh *et al.*, 2006). A diferencia de otros receptores de quimioquina, CXCR4 es ampliamente expresado por linfocitos inmaduros y está involucrado en su tráfico basal.

La relación entre nutrición, migración y resistencia a infecciones resulta compleja. Se ha mostrado que niveles reducidos del factor de crecimiento similar a la insulina tipo I (IGF-I), como los observados en desnutrición (Naranjo *et al.*, 2002), podrían modular la capacidad migratoria de células

hematopoyéticas (Welniak *et al.*, 2004). Así mismo, se ha visto como la desnutrición y deficiencias hormonales interfieren con la migración de leucocitos y neutrófilos y disminuye la expresión de moléculas de adhesión en leucocitos y células endoteliales (Landgraf *et al.*, 2005; Cavalcanti *et al.*, 2006; Landgraf *et al.*, 2007). Sin embargo, hasta el momento no se ha establecido claramente cómo el régimen nutricional puede afectar la migración de las células y sus efectos, específicamente sobre la migración dirigida de células del sistema inmune en estado de infección. En este estudio se examinó la expresión del receptor CXCR4 en esplenocitos y timocitos de ratón bajo restricción nutricional y frente a un reto con un agente infeccioso, con el objetivo de establecer si alteraciones en dicho receptor pueden afectar algunos de los mecanismos de la respuesta inmune celular.

Métodos

Animales y protocolo experimental

Ratones macho BALB/c (n=36) de 4 semanas de edad provenientes del Instituto Nacional de Salud (INS) criados bajo condiciones estándar, se mantuvieron en grupos de seis animales por jaula, estuvieron sujetos a ciclos de luz/oscuridad de 12 h a una temperatura constante de 22°C. El alimento se administró en forma de tabletas. Los animales tuvieron acceso libre al agua y alimento. Durante el período de adaptación de una semana se administró dieta con contenido de proteína de 12% (12 g de proteína cruda por 100 g de alimento, ICN Biomedicals, Aurora, USA). Después de este periodo, los animales se asignaron al azar en dos grupos (n=18), un grupo de ratones recibió dieta del 12% y el otro de 4% en proteína (ICN Biomedicals, Aurora, USA). Las dietas fueron isocalóricas y cada una suministró 3,7 kcal/g. Se llevó un registro de peso para cada animal. De cada régimen nutricional, al día séptimo se escogieron aleatoriamente 9 animales que recibieron vía intravenosa un inóculo con 100 unidades formadoras de colonia (UFC) de *L. monocytogenes* (Cepa ATCC 19115) por gramo de peso corporal y a los restantes 9 animales se les aplicó el vehículo (solución salina 0,85%). Esto generó cuatro grupos de estudio: animales no infectados en dieta del 12% (12) y 4% (4), y animales infectados en dieta del 12% (12i) y 4% (4i). Al tercer día post-inoculación se tomaron muestras de sangre de cada animal previa anestesia con avertina 0.2% vía intraperitoneal. El sacrificio se realizó en cámara de CO₂ e inmediatamente se removieron los tejidos, se pesaron y procesaron para los análisis respectivos. Para verificar la presencia de infección se tomó una muestra de tejido de bazo (aproximadamente 5 mg) y se maceró en 100 µl de buffer fosfato salino (PBS) con Tritón X-100 1% (Foster *et al.*, 2000); la solución se centrifugó y

50 µl del sobrenadante se sembraron en medio LB-Agar 1% (Sambrook *et al.*, 1989). Se incubó a 35°C por 48 h y las colonias resultantes se repicaron a cajas de petri con agar *Oxford* selectivo para *Listeria* (Scharlau Chemie, España). Después de dos días se observó la formación de colonias bacterianas. Los experimentos se llevaron a cabo en el bioterio del Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia y el protocolo experimental fue avalado por el Comité de Ética del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia.

Medición de niveles de Interferón- γ (IFN- γ) en suero

Se separó la fracción correspondiente al suero por centrifugación en frío durante 20 minutos a 3000 rpm. El suero se almacenó a -20°C hasta el análisis. Los niveles de IFN- γ se determinaron por ELISA específico para ratón (eBioscience, USA). La detección se realizó por lectura espectrofotométrica a 450 nm (Lin & Wu-Hsieh, 2004; Murciano *et al.*, 2006).

Análisis de subpoblaciones celulares

Se preparó una suspensión de esplenocitos y timocitos por perfusión del tejido con PBS-BSA 1%. En el caso del bazo los glóbulos rojos presentes en la suspensión se eliminaron por lisis diferencial (eBioscience, USA). La viabilidad celular se determinó usando azul Trypan y se realizó conteo en hemocitómetro. Aproximadamente 10⁶ células de la suspensión de bazo o timo se usó para evaluar las subpoblaciones de linfocitos por citometría de flujo. La identificación de las subpoblaciones se realizó con anticuerpos monoclonales anti-CD4 conjugado a Isotiocianato de Fluoresceína (FITC), anti-CD8a conjugado a ficoeritrina (PE) y B220 conjugado a PE-Cy7 (eBioscience, USA). La expresión del receptor de quimioquina CXCR4 en las distintas poblaciones linfocitarias de bazo y timo se llevó a cabo usando como marcador el anticuerpo monoclonal anti-CXCR4 conjugado a Alociocianina (APC) (R&D Systems, USA). Brevemente, las células se marcaron con 1 µg de anticuerpo específico incubando a 4°C durante 1 hora, después se lavaron, resuspendieron en PBS-BSA 1% y fijaron con una solución de paraformaldehído 1% en PBS. La adquisición de células se realizó en un citómetro de flujo Cyan® ADP (Dako Colorado Inc., USA) y el análisis de datos a través del programa Summit V4.3.

Análisis estadístico

Los resultados se analizaron usando pruebas t de Student no pareadas usando el programa SAS (SAS Institute Inc, 1999). Las diferencias se consideraron significativas cuando los valores de P<0,05.

Resultados

Efecto del contenido de proteína en la dieta y de la infección sobre el peso de órganos

En la figura 1 se muestra la variación en el peso relativo de órganos linfoides (timo y bazo) por el tipo de dieta y la infección bacteriana al final del período experimental de 10 días. El cambio de la dieta del 12% de proteína a la de 4% resulta en una disminución significativa del peso de bazo y timo con relación al peso corporal ($P < 0,0005$ y $P < 0,02$ respectivamente). Al tercer día post-infección el peso relativo del bazo de los animales infectados fue significativamente mayor (35%, $P < 0,0001$) en comparación con el control no infectado. En contraste, el tamaño relativo del timo en los dos grupos dietarios, se redujo significativamente en los animales infectados en comparación con los controles.

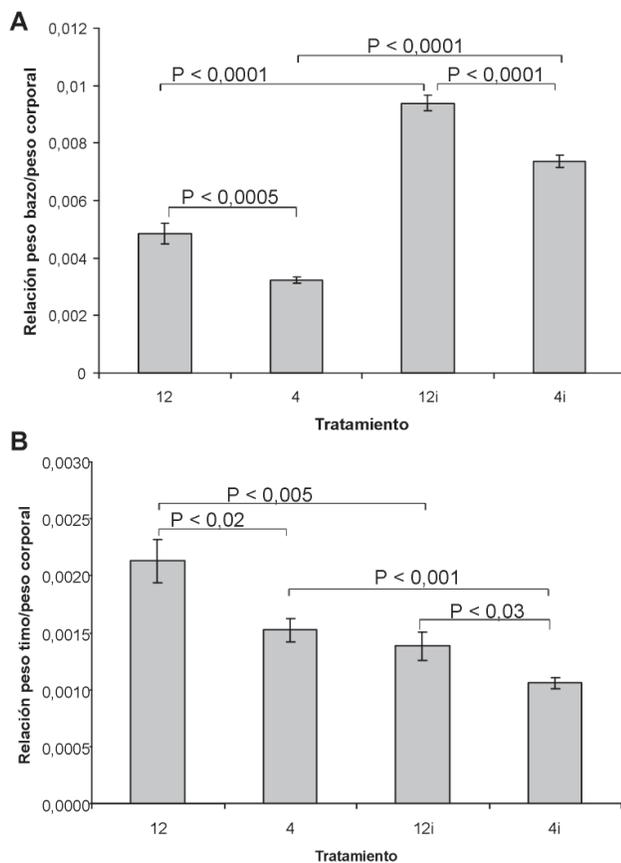


Figura 1. Efecto del déficit proteico e infección con *Listeria monocytogenes* en el peso de bazo (A) y timo (B) de ratón. La medida de peso se expresa en relación al peso corporal el día 10 de tratamiento. Los valores se expresan como la media \pm sem para $n=9$ en cada grupo.

Niveles séricos de Interferón- γ

Los niveles séricos de IFN- γ mostraron una elevación significativa ($P < 0,0001$) en los animales inoculados con el patógeno en comparación con los controles no infectados para los animales de los dos regímenes nutricionales (Figura 2). La restricción en el consumo de proteína, mostró una disminución en los niveles séricos de la citoquina pero no se alcanzó una diferencia significativa.

Efecto del consumo de una dieta deficiente en proteína y de la infección sobre la distribución de poblaciones linfocitarias en bazo y timo

En la figura 3 se puede observar el resultado típico para el análisis por citometría de flujo de timocitos (cada figura muestra el resultado obtenido para un animal proveniente de cada tratamiento). En los grupos de estudio, no infectados, el porcentaje de linfocitos T inmaduros dobles positivos (CD4+ CD8+) representó alrededor del 70% del total de timocitos (Figura 3). La infección redujo este porcentaje a aproximadamente un 12% en los ratones de los dos grupos dietarios. Los timocitos T CD8+ disminuyeron significativamente en el grupo restringido nutricionalmente y el proceso infeccioso incrementó marcadamente su porcentaje, tanto en el grupo del 12% (9 veces) como del 4% (15 veces) (Tabla 1). En contraste, la población de linfocitos maduros T CD4+ no sufrió cambios por la deficiencia en proteína ni por la infección.

El análisis por citometría de flujo no mostró cambios significativos en el porcentaje de linfocitos T CD8+, T CD4+ y

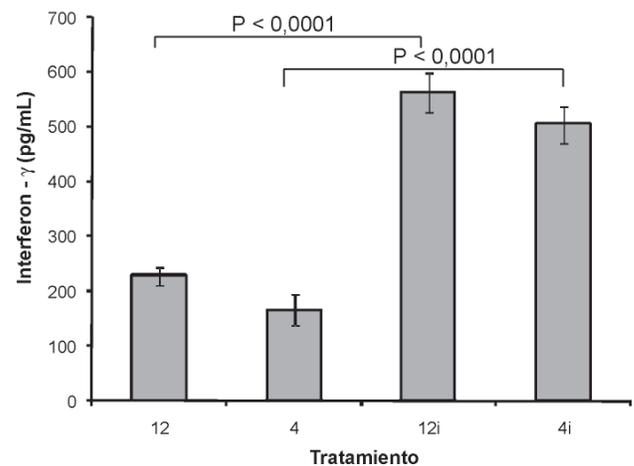


Figura 2. Niveles séricos de IFN- γ en ratones alimentados con dietas isocalóricas de diferente contenido de proteína (12 y 4%) e infectados con *Listeria monocytogenes*. La cuantificación fue llevada a cabo por medio de ensayo de ELISA tal como se describe en Métodos. Los valores se expresan como la media \pm sem para $n=4$ en cada grupo.

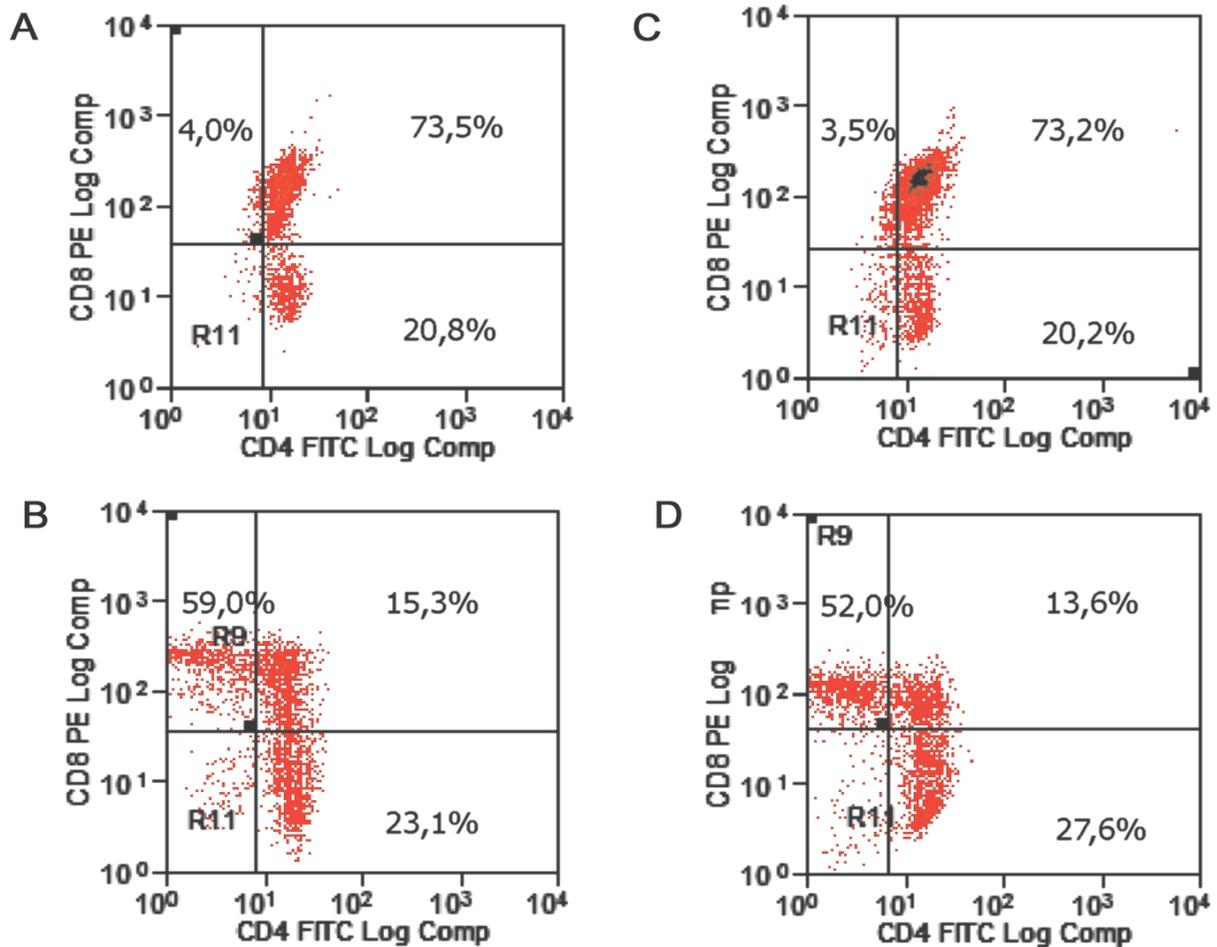


Figura 3. Efecto del consumo de una dieta deficiente en proteína y de la infección bacteriana (*Listeria monocytogenes*) sobre la distribución de células T CD4+, T CD8+ y T CD4+CD8+ en timocitos de ratón. (A) dieta 12%, (B) dieta 12% e infección, (C) dieta 4% y (D) dieta 4% e infección. Las células se analizaron por citometría de flujo como se describe en Métodos. Las figuras corresponden a los resultados obtenidos para un animal proveniente de cada tratamiento.

Tabla 1. Distribución de linfocitos en timo de ratones alimentados con dieta deficiente en proteína e infectados.

Grupo	%Linfocitos T CD8 ⁺	%Linfocitos T CD4 ⁺	%Linfocitos T CD8 ⁺ CD4 ⁺
12	6.00 ± 0.97	20.97 ± 2.10	70.41 ± 1.94
4	3.49 ± 0.59 ^a	24.27 ± 3.18	69.18 ± 2.62
12i	56.03 ± 2.84 ^b	22.10 ± 1.96	12.70 ± 2.15 ^b
4i	54.23 ± 3.10 ^c	24.57 ± 2.74	10.97 ± 1.51 ^c

Las subpoblaciones se identificaron y cuantificaron por citometría de flujo tal como se describe en Métodos.

Los grupos corresponden a: 12: Animales con dieta del 12%; 4: Animales con dieta del 4%; 12i: Animales con dieta del 12% e infectados. 4i: Animales con dieta del 4% e infectados.

Los valores se expresan como la media ± sem para n=9 en cada grupo. ^a P <0.05 respecto al grupo del 12%. ^b P <0.0001 respecto al grupo del 12%. ^c P <0.0001 respecto al grupo del 4%.

Tabla 2. Distribución de linfocitos en bazo de ratones alimentados con dieta deficiente en proteína e infectados.

Grupo	%Linfocitos T CD8 ⁺	%Linfocitos T CD4 ⁺	%Linfocitos B
12	18.86 ± 1.80	27.55 ± 1.45	35.32 ± 3.09
4	22.14 ± 2.40	31.50 ± 1.80	32.45 ± 4.03
12i	13.34 ± 0.98 ^a	25.14 ± 2.14	48.76 ± 1.95 ^a
4i	17.00 ± 1.59	30.72 ± 3.12	44.05 ± 2.07 ^b

Las subpoblaciones se identificaron y cuantificaron por citometría de flujo tal como se describe en Métodos.

Los grupos corresponden a: 12: Animales con dieta del 12%; 4: Animales con dieta del 4%; 12i: Animales con dieta del 12% e infectados. 4i: Animales con dieta del 4% e infectados.

Los valores se expresan como la media ± sem para n=9 en cada grupo. ^a P <0.02 respecto al grupo del 12%. ^b P <0.003 respecto al grupo del 12%.

B en el bazo de los animales alimentados con la dieta deficiente en proteína en comparación con los controles bien nutridos. La infección, por su parte, elevó significativamente ($P < 0,02$) el porcentaje de células B y disminuyó el de linfocitos T CD8+ esplénicos en los animales de los dos regímenes nutricionales (Tabla 2). A nivel de la población de linfocitos T CD4+ se observó una tendencia al aumento como consecuencia de la infección pero las diferencias no fueron estadísticamente significativas.

Efecto del consumo de una dieta deficiente en proteína y de la infección sobre la expresión en timo y bazo del receptor de quimioquina CXCR4

La expresión del receptor CXCR4 fue más abundante en timocitos que en esplenocitos de ratón; en estos últimos las células B presentaron los niveles más altos de expresión (datos no mostrados). No se observaron diferencias en el porcentaje de células que expresan el receptor en timo y bazo al reducir el contenido de proteína

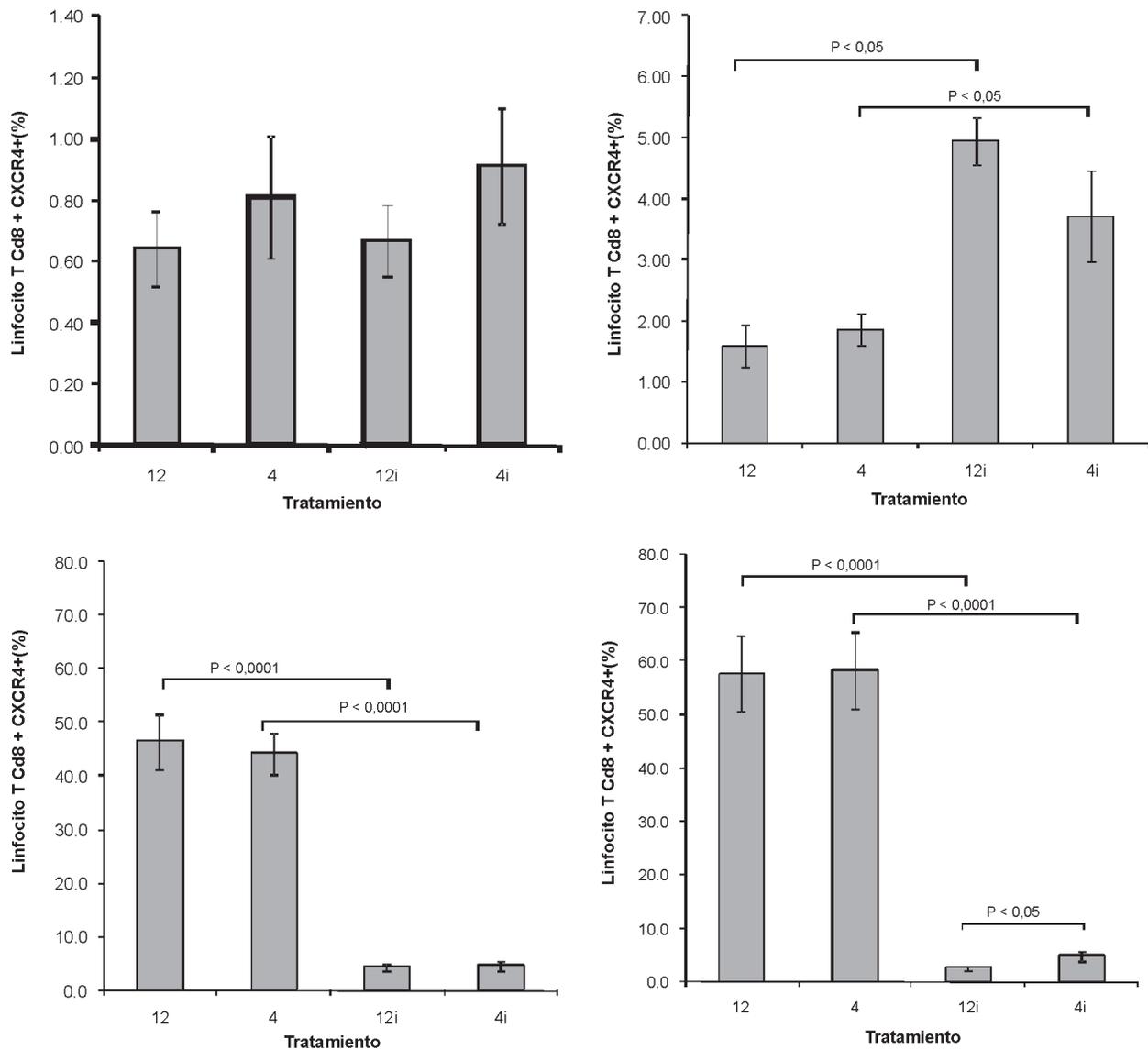


Figura 4. Efecto de la desnutrición y la infección sobre la distribución de subpoblaciones positivas para CXCR4 en linfocitos T de bazo CD8+ (A) y CD4+ (B) y linfocitos T de timo CD8+ (C) y CD4+ (D). Las subpoblaciones fueron identificadas y cuantificadas por citometría de flujo tal como se describe en métodos. Los valores se expresan como la media \pm sem para $n=9$ en cada grupo.

(Figura 4). La infección alteró significativamente el porcentaje de células que expresan el receptor CXCR4 en los dos órganos linfoides, pero de manera opuesta. Mientras que el número de linfocitos T CD8+ que expresan el receptor en timo disminuye drásticamente por la presencia del patógeno, en bazo parece no ser afectado (Figura 4 A y C). De forma similar, el porcentaje de células T CD4+ de bazo, positivas para el receptor, se eleva significativamente por el proceso infeccioso mientras que el de timo se ve reducido (Figura 4 B y D).

Discusión

El propósito de este estudio fue determinar la distribución relativa de los receptores de quimioquina CXCR4 en linfocitos de algunos tejidos linfoides y sus cambios en respuesta a la infección en ratones bajo desnutrición proteica. El modelo experimental de infección con *L. monocytogenes* ha aportado información valiosa sobre el papel de las citoquinas y quimioquinas en la respuesta inmune (Mackness, 1971). La respuesta en citoquinas a *L. monocytogenes* es predominantemente proinflamatoria de tipo 1, dentro de las cuales la producción de Interferón- γ es esencial para controlar la infección con patógenos intracelulares, como *L. monocytogenes*. La secreción de IFN- γ es muy rápida y las fuentes de la citoquina durante las fases tempranas de la infección incluye células NK, macrófagos, células dendríticas y células T. En nuestro modelo de infección en ratones BALB/c se observó una elevación marcada en los niveles circulantes de IFN- γ al día 3 post-infección, confirmando la activación de la respuesta inmune. La deficiencia nutricional en proteína mostró una reducción en el IFN- γ endógeno, que aunque no fue significativa dada la gran variabilidad biológica de los animales, sugiere en estos animales una alteración en la principal función listericida del IFN- γ , como es la activación de los macrófagos (Barsig *et al.*, 1998). Adicionalmente, los cambios globales observados en los tejidos analizados, timo y bazo, corroboraron el papel determinante de la nutrición en la respuesta a la bacteria.

Una característica interesante de la respuesta inmune a *L. monocytogenes* es la gran respuesta por células T CD8+ (Pamer *et al.*, 1997). La habilidad de esta bacteria para escapar del fagosoma hacia el citoplasma de los macrófagos implica que los péptidos derivados de ella sean rápidamente presentados por las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase I, lo que a su vez conlleva a la presentación de éstos a los linfocitos T citotóxicos. De hecho, se ha descrito que las células T CD8+ son considerablemente más potentes que las células T CD4+ en el control de la infección por *L. monocytogenes* (Mombaerts *et al.*, 1993).

Los resultados de este estudio a nivel de las distintas subpoblaciones de linfocitos T en condiciones de infección, pueden interpretarse como un incremento en la maduración de linfocitos T en timo orientada a la activación de la población de linfocitos T CD8+ y un posible mecanismo de migración, en esta misma población, hacia los sitios de infección a partir del bazo. Alternativamente, la reducción en la población de células T CD8+ en bazo se podría explicar por un ataque temprano del microorganismo sobre los linfocitos. La distribución relativa de las poblaciones en animales infectados, estaría indicando que este ataque se produce preferentemente hacia los linfocitos T CD8+. Esta afirmación está de acuerdo con algunos reportes que indican que *L. monocytogenes* puede desencadenar apoptosis en linfocitos al interior del bazo (Merrick *et al.*, 1997; Carrero *et al.*, 2006).

Lo anterior es coherente con el modelo de infección de *L. monocytogenes*, en ratones, en el que se ha determinado que la activación de células T es requerida para la eliminación total de la bacteria. Las células T CD4+ y CD8+ específicas para *Listeria* son generadas rápidamente una vez se da la infección. Como consecuencia directa de la función efectora y reguladora de las células T, la eliminación total de la infección es típicamente observada dentro del séptimo al décimo día de infección (North & Conlan, 1998; Schaible *et al.*, 1999; Edelson & Unanue, 2000).

Los resultados de la distribución de la población de linfocitos B de bazo, no evidenciaron cambios en el porcentaje de estas células por efecto de la restricción proteica. Lo anterior concuerda con estudios previos en ratones normales y con silenciamiento específico del gen *Igf-1* hepático (Liver *Igf-1* deficient - LID) (Naranjo *et al.*, 2002). Nuestros resultados mostraron que los animales infectados, independientemente de la dieta, presentan un aumento significativo en el porcentaje de linfocitos B. Esta observación resulta contradictoria con el modelo de infección de *L. monocytogenes* puesto que el principal mecanismo de control de la infección vendría dado por la inmunidad mediada por células. No obstante en estudios previos se ha reportado que, aunque el papel de la respuesta inmune humoral en el control de la infección con *L. monocytogenes* resulta controversial, existe evidencia de la presencia de altos títulos de anticuerpos en suero (Bhunja, 1997), contra Listeriolisina O (LLO) (Berche *et al.*, 1990; Baetz & Wesley, 1995; Grenningloh *et al.*, 1997), la cual promueve la ruptura de la membrana fagosomal y permite a la bacteria escapar hacia el ambiente citoplasmático rico en nutrientes, además de otros anticuerpos relacionados con factores de virulencia de este microorganismo (Peel *et al.*, 1988; Gentshev *et al.*, 1992; Grenningloh *et al.*, 1997).

gloh et al., 1997). La evidencia de estos estudios sugiere que las células B o los anticuerpos, directa o indirectamente, proveen una protección limitada pero efectiva contra la infección de *L. monocytogenes*.

Edelson y colaboradores (**Edelson et al.**, 1999; **Edelson & Unanue**, 2001) demostraron que la administración pasiva de un anticuerpo monoclonal contra LLO proveía resistencia contra la infección con *Listeria* en ratón. Incluso se ha reportado un papel de las células B en activación de células T, en infección con *L. monocytogenes*, independiente de producción de inmunoglobulinas o presentación de antígenos (**Matsuzaki et al.**, 1999). Adicionalmente un estudio más reciente demostró que *L. monocytogenes* puede infectar y eliminar células B como una posible estrategia para iniciar una infección exitosa (**Menon et al.**, 2003). Estas observaciones son evidencia clara que los linfocitos B o sus productos secretados desempeñan roles significativos en el control de la infección por *L. monocytogenes*, por lo cual no se descarta que el aumento observado en la población de células B en este estudio, esté relacionado con una participación activa de estas células en respuesta a la infección.

Aunque la producción y el papel de la quimioquina CXCL12 ha sido muy poco estudiada en infección con *L. monocytogenes*, se ha descrito su importancia en hematopoyesis, vigilancia inmunológica y respuesta inmune. En este estudio se investigó la expresión de su receptor de membrana CXCR4 en las distintas poblaciones linfocitarias analizadas. Se encontró en primer lugar, una expresión más abundante del receptor en timocitos, en comparación con esplenocitos, sin efecto aparente por la nutrición. En contraste, la infección con *L. monocytogenes* indujo cambios diferenciales en su expresión. El porcentaje de linfocitos maduros de timo positivos para CXCR4 se redujo de manera sustancial, lo que resulta contradictorio si se tienen en cuenta estudios anteriores que muestran la importancia de las células T CD8+ en la respuesta a *L. monocytogenes*. Sin embargo, aunque los fenómenos de migración celular y quimiotaxis son críticos dentro de la función inmune (**Baggiolini**, 1998; **Franz et al.**, 2002) y se espera una alta expresión de receptores de quimioquina a nivel de estas células, la extensa variedad de quimioquinas y sus receptores (**Baggiolini**, 1998; **Pease & Williams**, 2006) hacen que, dependiendo de la naturaleza de la célula y el tipo de infección, se exprese preferencialmente solo algún tipo de receptor específico (**Pease & Williams**, 2006). Es así como la quimioquina conocida como proteína inflamatoria de macrófago 1 α (MIP-1 α), producida en hígado (**Barsig et al.**, 1998) y en bazo (**Rossi & Zlotnik**, 2000) de ratones infectados con *L. monocytogenes* presenta un máximo de activación que coincide con el máximo de activación de las

células T. Sobre la base de un ensayo de transferencia adoptiva (**Cook et al.**, 1999) se postuló un papel de protección para MIP-1 α derivada de células T CD8+. Además mediante ensayos con ratones *knockout* se ha llegado a establecer que MIP-1 α está involucrada en el “homing” de las células T CD8+ a los sitios de infección (**Cook et al.**, 1999). Por esta razón es importante investigar el papel del receptor CCR1 a través del cual ejerce sus efectos MIP-1 α (**Pease & Williams**, 2006).

Los resultados mostraron que los efectos de la deficiencia de proteína sobre la expresión del receptor CXCR4 son evidentes en la infección con *L. monocytogenes*. En este contexto, pareciera que las células T CD4+ del bazo tienen un papel importante a juzgar por el incremento marcado en la proporción de las mismas que expresan CXCR4 en su superficie. La población de células B positivas para CXCR4 no mostró ningún cambio entre las distintas condiciones evaluadas, probablemente debido a que su migración, una vez en el bazo, podría no revestir mayor importancia a nivel de la respuesta inmune frente a *L. monocytogenes*.

En conclusión, este es uno de los pocos estudios que demuestran el papel regulador de la infección con *L. monocytogenes* sobre el receptor de quimioquinas CXCR4 y sugieren la importancia de un nivel nutricional adecuado en el mantenimiento de sus niveles de expresión en células linfoides.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Dirección de Investigaciones de la Universidad Nacional de Colombia – Sede Bogotá (DIB), por la financiación otorgada al proyecto Código: 8003096.

Bibliografía

- Aboumrad, E., Madec, A. M. & Thivolet, C.**, 2007. The CXCR4/CXCL12 (SDF-1) signalling pathway protects non-obese diabetic mouse from autoimmune diabetes. *Clin Exp Immunol.* **148** (3): 432-9.
- Baetz, A. L. & Wesley, I. V.**, 1995. Detection of anti-listeriolysin O in dairy cattle experimentally infected with *Listeria monocytogenes*. *J Vet Diagn Invest.* **7** (1): 82-6.
- Baggiolini, M.**, 1998. Chemokines and leukocyte traffic. *Nature.* **392** (6676): 565-8.
- Barsig, J., Fleisch, I. E. & Kaufmann, S. H.**, 1998. Macrophages and hepatocytic cells as chemokine producers in murine listeriosis. *Immunobiology.* **199** (1): 87-104.
- Berche, P., Reich, K. A., Bonnichon, M., Beretti, J. L., Geoffroy, C., Raveneau, J., Cossart, P., Gaillard, J. L., Geslin, P.**

- Kreis, H. & et al.**, 1990. Detection of anti-listeriolysin O for serodiagnosis of human listeriosis. *Lancet*. **335** (8690): 624-7.
- Bhunia, A. K.**, 1997. Antibodies to *Listeria monocytogenes*. *Crit Rev Microbiol*. **23** (2): 77-107.
- Carrero, J. A., Calderon, B. & Unanue, E. R.**, 2006. Lymphocytes are detrimental during the early innate immune response against *Listeria monocytogenes*. *J Exp Med*. **203** (4): 933-40.
- Cavalcanti, D. M., Lotufo, C. M., Borelli, P., Tavassi, A. M., Pereira, A. L., Markus, R. P. & Farsky, S. H.**, 2006. Adrenal deficiency alters mechanisms of neutrophil mobilization. *Mol Cell Endocrinol*. **249** (1-2): 32-9.
- Chinen, J. & Shearer, W. T.**, 2008. 6. Secondary immunodeficiencies, including HIV infection. *J Allergy Clin Immunol*. **121** (2 Suppl): S388-92; quiz S417.
- Cook, D. N., Smithies, O., Strieter, R. M., Frelinger, J. A. & Serody, J. S.**, 1999. CD8+ T cells are a biologically relevant source of macrophage inflammatory protein-1 alpha in vivo. *J Immunol*. **162** (9): 5423-8.
- Derek, M.**, 2005. Malnutrition and infection. **33** (3): 14-16.
- Desmetz, C., Lin, Y. L., Mettling, C., Portales, P., Noel, D., Clot, J., Jorgensen, C. & Corbeau, P.**, 2007. Cell surface CCR5 density determines the intensity of T cell migration towards rheumatoid arthritis synoviocytes. *Clin Immunol*. **123** (2): 148-54.
- Ebert, L. M., Schaerli, P. & Moser, B.**, 2005. Chemokine-mediated control of T cell traffic in lymphoid and peripheral tissues. *Mol Immunol*. **42** (7): 799-809.
- Edelson, B. T., Cossart, P. & Unanue, E. R.**, 1999. Cutting edge: paradigm revisited: antibody provides resistance to *Listeria* infection. *J Immunol*. **163** (8): 4087-90.
- Edelson, B. T. & Unanue, E. R.**, 2000. Immunity to *Listeria* infection. *Curr Opin Immunol*. **12** (4): 425-31.
- Edelson, B. T. & Unanue, E. R.**, 2001. Intracellular antibody neutralizes *Listeria* growth. *Immunity*. **14** (5): 503-12.
- El-Hodhod, M. A., Nassar, M. F., Zaki, M. M. & Moustafa, A.**, 2005. Apoptotic changes in lymphocytes of protein energy malnutrition patients. *Nutrition Research*. **25** (1): 21-29.
- Foster, M. P., Jensen, E. R., Montecino-Rodriguez, E., Leathers, H., Horseman, N. & Dorshkind, K.**, 2000. Humoral and cell-mediated immunity in mice with genetic deficiencies of prolactin, growth hormone, insulin-like growth factor-I, and thyroid hormone. *Clin Immunol*. **96** (2): 140-9.
- Franz, C. M., Jones, G. E. & Ridley, A. J.**, 2002. Cell migration in development and disease. *Dev Cell*. **2** (2): 153-8.
- Gentschev, I., Sokolovic, Z., Kohler, S., Krohne, G. F., Hof, H., Wagner, J. & Goebel, W.**, 1992. Identification of p60 antibodies in human sera and presentation of this listerial antigen on the surface of attenuated salmonellae by the HlyB-HlyD secretion system. *Infect Immun*. **60** (12): 5091-8.
- Ghosh, S., Preet, A., Groopman, J. E. & Ganju, R. K.**, 2006. Cannabinoid receptor CB2 modulates the CXCL12/CXCR4-mediated chemotaxis of T lymphocytes. *Mol Immunol*. **43** (14): 2169-79.
- Grenningloh, R., Darji, A., Wehland, J., Chakraborty, T. & Weiss, S.**, 1997. Listeriolysin and IrpA are major protein targets of the human humoral response against *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun*. **65** (9): 3976-80.
- Jin, T. & Hereld, D.**, 2006. Moving toward understanding eukaryotic chemotaxis. *Eur J Cell Biol*. **85** (9-10): 905-13.
- Landgraf, M. A., Martinez, L. L., Rastelli, V. M., Franco Mdo, C., Soto-Suazo, M., Tostes Rde, C., Carvalho, M. H., Nigro, D. & Fortes, Z. B.**, 2005. Intrauterine undernutrition in rats interferes with leukocyte migration, decreasing adhesion molecule expression in leukocytes and endothelial cells. *J Nutr*. **135** (6): 1480-5.
- Landgraf, M. A., Tostes Rde, C., Borelli, P., Zorn, T. M., Nigro, D., Carvalho, M. H. & Fortes, Z. B.**, 2007. Mechanisms involved in the reduced leukocyte migration in intrauterine undernourishment. *Nutrition*. **23** (2): 145-56.
- Lin, J. S. & Wu-Hsieh, B. A.**, 2004. Functional T cells in primary immune response to histoplasmosis. *Int Immunol*. **16** (11): 1663-73.
- Mackaness, G. B.**, 1971. Resistance to intracellular infection. *J Infect Dis*. **123** (4): 439-45.
- Matsuzaki, G., Vordermeier, H. M., Hashimoto, A., Nomoto, K. & Ivanyi, J.**, 1999. The role of B cells in the establishment of T cell response in mice infected with an intracellular bacteria, *Listeria monocytogenes*. *Cell Immunol*. **194** (2): 178-85.
- Menon, A., Shroyer, M. L., Wampler, J. L., Chawan, C. B. & Bhunia, A. K.**, 2003. In vitro study of *Listeria monocytogenes* infection to murine primary and human transformed B cells. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. **26** (3): 157-74.
- Merrick, J. C., Edelson, B. T., Bhardwaj, V., Swanson, P. E. & Unanue, E. R.**, 1997. Lymphocyte apoptosis during early phase of *Listeria* infection in mice. *Am J Pathol*. **151** (3): 785-92.
- Mombaerts, P., Arnoldi, J., Russ, F., Tonegawa, S. & Kaufmann, S. H.**, 1993. Different roles of alpha beta and gamma delta T cells in immunity against an intracellular bacterial pathogen. *Nature*. **365** (6441): 53-6.
- Moser, B., Wolf, M., Walz, A. & Loetscher, P.**, 2004. Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control. *Trends Immunol*. **25** (2): 75-84.
- Murciano, C., Villamon, E., O'Connor, J. E., Gozalbo, D. & Gil, M. L.**, 2006. Killed *Candida albicans* yeasts and hyphae inhibit gamma interferon release by murine natural killer cells. *Infect Immun*. **74** (2): 1403-6.
- Najera, O., Gonzalez, C., Toledo, G., Lopez, L. & Ortiz, R.**, 2004. Flow cytometry study of lymphocyte subsets in malnourished and well-nourished children with bacterial infections. *Clin Diagn Lab Immunol*. **11** (3): 577-80.
- Naranjo, W. M., Yakar, S., Sanchez-Gomez, M., Perez, A. U., Setser, J. & D, LeRoith.**, 2002. Protein calorie restriction affects nonhepatic IGF-I production and the lymphoid system: studies using the liver-specific IGF-I gene-deleted mouse model. *Endocrinology*. **143** (6): 2233-41.
- Norine, J. D. & John, R. S.**, 2003. Role of neutrophils in decreased resistance of protein-malnourished mice to *Candida albicans*. **23** (7): 945-958.

- North, R. J. & Conlan, J. W.**, 1998. Immunity to *Listeria monocytogenes*. *Chem Immunol.* **70**: 1-20.
- Pamer, E. G., Sijts, A. J., Villanueva, M. S., Busch, D. H. & Vijn, S.**, 1997. MHC class I antigen processing of *Listeria monocytogenes* proteins: implications for dominant and subdominant CTL responses. *Immunol Rev.* **158**: 129-36.
- Pease, J. E. & Williams, T. J.**, 2006. Chemokines and their receptors in allergic disease. *J Allergy Clin Immunol.* **118** (2): 305-18; quiz 319-20.
- Peel, M., Donachie, W. & Shaw, A.**, 1988. Temperature-dependent expression of flagella of *Listeria monocytogenes* studied by electron microscopy, SDS-PAGE and western blotting. *J Gen Microbiol.* **134** (8): 2171-8.
- Rossi, D. & Zlotnik, A.**, 2000. The biology of chemokines and their receptors. *Annu Rev Immunol.* **18**: 217-42.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T.**, 1989. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. C. S. H. L. Press. NY.
- Schaible, U. E., Collins, H. L. & Kaufmann, S. H.**, 1999. Confrontation between intracellular bacteria and the immune system. *Adv Immunol.* **71**: 267-377.
- Tarrant, T. K. & Patel, D. D.**, 2006. Chemokines and leukocyte trafficking in rheumatoid arthritis. *Pathophysiology.* **13** (1): 1-14.
- Welniak, L. A., Karas, M., Yakar, S., Anver, M. R., Murphy, W. J. & LeRoith, D.**, 2004. Effects of organ-specific loss of insulin-like growth factor-I production on murine hematopoiesis. *Biol Blood Marrow Transplant.* **10** (1): 32-9.
- Yamaguchi, H. & Condeelis, J.**, 2007. Regulation of the actin cytoskeleton in cancer cell migration and invasion. *Biochim Biophys Acta.* **1773** (5): 642-52.
- Yoshinouchi, T., Naniwa, T., Shimizu, S., Ohtsuki, Y., Fujita, J., Sato, S., Eimoto, T. & Ueda, R.**, 2007. Expression of chemokine receptors CXCR3 and CCR4 in lymphocytes of idiopathic nonspecific interstitial pneumonia. *Respir Med.* **101** (6): 1258-64.

Recibido: febrero 12 de 2009.

Aceptado para su publicación: septiembre 11 de 2009.