

2ej
97



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE QUIMICA



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

**EFFECTO DE LA T-2 TOXINA SOBRE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA
DE MACROFAGOS MURINOS Y SOBRE LA REACCIÓN DE
HIPERSENSIBILIDAD RETARDADA A 2,4-
DINITROFLUOROBENCENO**

T E S I S

FRANCISCO JAVIER PLASENCIA DE LA PARRA

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

1986



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

I. INTRODUCCION.	1
A. El problema de la contaminación de alimentos por hongos.	1
1. Contaminación de granos por hongos.	1
B. Micotoxinas.	3
1. Historia.	3
C. Tricotecenos.	4
1. Biosíntesis.	4
2. Hongos productores de tricotecenos.	5
3. Clasificación.	5
4. Detección de tricotecenos.	7
5. Tricotecenos de importancia.	7
D. T-2 toxina.	8
1. Micotoxicosis asociadas.	8
2. Propiedades químicas y físicas.	10
3. Metabolismo.	11
E. Efectos bioquímicos de la T-2 toxina.	12
1. Inhibición de la síntesis de proteínas.	12
2. Inhibición de la síntesis de DNA.	13
3. Inhibición de la respiración mitocondrial.	13
F. Efectos fisiológicos de la T-2 toxina.	13
1. Actividad carcinogénica.	13
2. Efectos teratogénicos.	14
3. Efectos hematológicos.	14
4. Alteraciones neurológicas.	15
5. Diarrea.	16
6. Efectos de la T-2 toxina sobre la respuesta inmune.	16
II. OBJETIVOS.	18
III. MATERIALES Y METODOS.	19
A. Preparación de la T-2 toxina	19
B. Medio de cultivo.	19
C. Animales.	20
D. Cultivo de macrófagos.	20
1. Obtención de macrófagos de la cavidad peritoneal del ratón.	20
2. Conteo de células.	21
3. Condiciones de cultivo.	21
E. Características de los macrófagos.	22
1. Células adherentes.	22
2. Tinción citoquímica.	22

F. Efecto de la T-2 toxina sobre la actividad biológica de macrófagos.	23
G. Actividad enzimática.	24
1. Lactato deshidrogenasa.	25
2. β -glucuronidasa.	26
H. Generación del anión superóxido.	27
I. Incorporación de aminoácidos marcados con (^{14}C).	28
J. Cuantificación de proteínas por el método de Lowry.	29
K. Actividad citotóxica contra células tumorales.	30
1. Línea tumoral.	30
2. Obtención de macrófagos "armados".	30
L. Fagocitosis de bacterias.	32
1. Bacterias.	32
2. Macrófagos.	33
M. Estudio del efecto de la T-2 toxina sobre la reacción de hipersensibilidad de tipo retardado (HTR).	35
1. Animales.	35
2. Sensibilización con el antígeno.	35
N. Efecto de la T-2 toxina sobre la reparación del tejido.	37
IV. RESULTADOS.	38
A. Características de los macrófagos.	38
B. Actividad enzimática.	39
C. Generación del anión superóxido.	44
D. Incorporación de aminoácidos marcados con (^{14}C).	47
E. Actividad tumoricida de macrófagos peritoneales murinos.	48
F. Fagocitosis de bacterias.	51
G. Efecto de la T-2 toxina sobre la reacción de HTR.	53
H. Efecto de la T-2 toxina sobre la reparación del tejido.	54
V. DISCUSION DE RESULTADOS.	60
A. Efecto de la T-2 toxina sobre la actividad biológica de macrófagos murinos.	60
1. Actividad enzimática.	60
2. Generación del anión superóxido.	63
3. Fagocitosis.	65
4. Actividad tumoricida.	66
B. Efecto de la T-2 toxina sobre la reacción de HTR.	67
C. Efecto de la T-2 toxina sobre la reparación del tejido.	70
VI. CONCLUSIONES.	72
VII. BIBLIOGRAFIA.	74
ANEXO	80

A B R E V I A T U R A S

ATA	Aleucia Tóxica Alimentaria
DMSO	Dimetil-sulfóxido
DNA	Acido desoxirribonucléico
DNFB	2,4-Dinitrofluorobenceno
HTR	Hipersensibilidad de Tipo Retardado
ip	Intraperitoneal
LDH	lactato deshidrogenasa
LD ₅₀	Dosis letal 50%
NADH ₂	Nicotín-adenin-dinucleótido
RNA	Acido ribonucléico
SSAF	Solución salina amortiguada con fosfatos

A B R E V I A T U R A S

ATA	Aleucia Tóxica Alimentaria
DMSO	Dimetil-sulfóxido
DNA	Acido desoxirribonucléico
DNFB	2,4-Dinitrofluorobenceno
HTR	Hipersensibilidad de Tipo Retardado
ip	Intraperitoneal
LDH	Lactato deshidrogenasa
LD ₅₀	Dosis Letal 50%
NADH ₂	Nicotín-adenin-dinucleótido
RNA	Acido ribonucléico
SSAF	Solución salina amortiguada con fosfatos

I. I N T R O D U C C I O N

A. El problema de la contaminación de alimentos por hongos.

Los daños que sufren los alimentos por la acción de distintos agentes (insectos, ácaros, roedores y hongos) representan una gran pérdida económica tanto en países desarrollados como en aquellos en vías de desarrollo. Se estima que los hongos son responsables de la mitad de estas pérdidas (44).

Los esfuerzos por obtener semillas seleccionadas para cultivo, así como el mejoramiento de las técnicas de cultivo y el uso de fertilizantes resultan estériles si, después de la cosecha los productos se deterioran.

La mayoría de los productos almacenados son susceptibles a la contaminación por hongos. La leche en polvo preparada y almacenada en malas condiciones es blanco fácil para el establecimiento de Aspergillus y Penicillium. Los productos lácteos como la crema y la mantequilla también son descompuestos por los mohos (8) así como las frutas y verduras que sufren daños durante su cosecha, almacenamiento y transporte (15).

Los hongos producen cambios en la apariencia del alimento en que crecen, así como en sus propiedades nutricionales y además modifican las cualidades organolépticas (43).

1. Contaminación de granos por hongos.

Los granos y semillas constituyen un substrato muy favorable para el desarrollo de hongos que causan múltiples daños, entre los que se

encuentran la reducción del poder germinativo, el ennegrecimiento total o parcial de los granos y semillas, calentamiento y hedor así como la producción de toxinas, que al ser ingeridas pueden ser dañinas al hombre y a animales domésticos. Todos estos cambios pueden ocurrir sin que los hongos responsables sean visibles a simple vista (12).

Los principales factores que favorecen el desarrollo de los hongos son la humedad y la temperatura. Por lo tanto, si los granos se cosechan con un alto contenido de humedad y no son secados, sufren un rápido deterioro por causa de hongos e insectos. Por otro lado, si los granos son secados pero almacenados en lugares húmedos, gradualmente ganan humedad y son susceptibles a la contaminación por mohos. Debido a esto es necesario contar con una buena infraestructura después de la cosecha: equipo de secado y de aereación, almacenes en los que se puede controlar humedad y temperatura, personal capacitado y transporte eficiente (44).

El Programa Nacional de Alimentos señaló que en 1983 se perdió un 10% de cosecha de granos por deficiencias en esta infraestructura (44).

La magnitud de las pérdidas varía de país a país pero constituye un gran problema económico en todo el mundo. Por otro lado, el consumo de toxinas fúngicas sintetizadas por los mohos que contaminan los granos representa un gran problema de salud, fenómeno que en México no se ha estudiado profundamente, por lo que se desconoce su real magnitud (44).

B. Micotoxinas.

Varios autores han acordado definir en forma precisa a las micotoxinas como aquellos metabolitos zootóxicos (exotoxinas) producidos por mohos en alimentos consumidos por el hombre y/o animales, estableciendo la diferencia con las endotoxinas que son sintetizadas por hongos venenosos que parasitan a las plantas (43).

1. Historia.

La presencia de estos metabolitos fúngicos se demostró cuando se aislaron e identificaron como los agentes causantes de la "enfermedad X" de los pavos en Inglaterra en 1960. Estos animales habían sido alimentados con cacahuates contaminados con Aspergillus flavus que producía una toxina a la cual se llamó aflatoxina (12).

Se han identificado muchas clases de aflatoxinas y se sabe que son capaces de inhibir la síntesis de DNA insertándose en la doble hélice, así como de interferir en la síntesis de RNA y de proteínas (23).

Las aflatoxinas han mostrado tener propiedades carcinogénicas ya que al alimentar ratas con una dieta que contenía aflatoxinas se observó la aparición de carcinomas hepatocelulares en la mayoría de estos animales (45). También se encontraron carcinomas primarios de hígado en truchas que consumieron alimento contaminado con aflatoxinas (65).

La intoxicación con aflatoxinas puede pasar de los animales al

hombre debido al consumo de productos como la leche. Se ha descrito que el ganado lechero, al consumir alimento contaminado con aflatoxinas las metaboliza y sus derivados, aún tóxicos como la aflatoxina M, son excretados en la leche (12).

Las aflatoxinas han sido ampliamente estudiadas y "se estima que por lo menos 15 millones de dolares se han gastado en investigaciones solamente en aflatoxinas durante un período de menos de diez años (1962-1971). Es muy probable que otras micotoxinas sean tan prevalentes y tan potencialmente peligrosas como las aflatoxinas y sin embargo es de dudarse que en ese mismo período se haya dedicado más del 5% de esa cantidad en el estudio de todas las demás micotoxinas" (12).

Estos estudios se han ampliado en los últimos diez años y se ha identificado al grupo de los tricotecenos como agentes responsables de algunas micotoxicosis.

C. Tricotecenos.

1. Biosíntesis.

Los tricotecenos son metabolitos secundarios de los hongos tóxicos. Se producen y se liberan después de que el micelio se ha establecido en el sustrato (43).

El esqueleto de los tricotecenos está constituido por 3 moléculas de ácido mevalónico. Para su formación se cicliza el pirofosfato de farnesil dando origen a un intermediario tricodieno que luego forma un dihidroxitricodieno que da lugar al tricoteceno (3).

Los tricotecenos constituyen una familia de compuestos sesquiterpenoides estructuralmente relacionados, con una doble ligadura entre las posiciones C9 y C10 y un grupo epóxido en C12 y C13.

2. Hongos productores de tricotecenos.

Los tricotecenos son sintetizados por varios géneros de hongos filamentosos: Fusarium, Myrothecium, Trichoderma, Stachybotrys, Cephalosporium y Verticimonosporum, siendo el género Fusarium el más importante productor de estas toxinas (61).

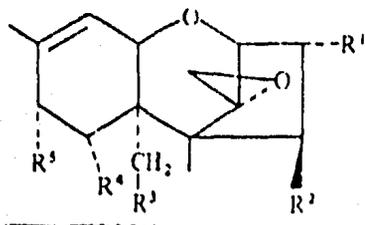
Las especies Fusarium roseum y Fusarium trincitum destacan por la alta toxicidad de sus metabolitos y por la cantidad que producen con respecto a otras especies (31). Estos mohos se caracterizan por tener escasas macroconidias que son pequeñas, oblongadas, fusoides y pediceladas, ocasionalmente forman clamidosporas intercaladas. Crecen entre 5 y 25°C y la producción de toxinas se intensifica cuando la temperatura oscila entre 0 y 5°C. La obscuridad favorece la biosíntesis de metabolitos más tóxicos. Se ha demostrado que la cebada es el mejor substrato para estos hongos y la toxicidad de sus metabolitos es mayor cuando se comparan con el trigo y el mijo (31).

3. Clasificación.

Hasta 1983, se han aislado 68 tricotecenos, algunos de éstos identificados en extractos de cultivo de hongos de los géneros productores y otros aislados de granos contaminados (3). Las características estructurales de estas moléculas permitieron clasificarlas en

cuatro grupos (61):

Clase A que abarca a los tricotecenos hidroxi- y acicloxi-substituidos. Comprende 34 metabolitos siendo los más importantes:



Tricodermol, Tricodermina

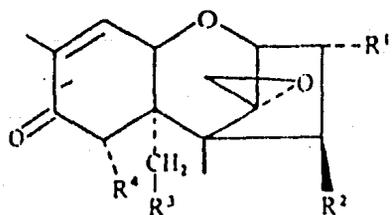
T-2 Tetraol, Diacetoxyscirpenol

Verrucarol, Neosolanol, T-2 Toxina

HT-2 Toxina y Tricoverina.

Todos estos tricotecenos tienen en común la estructura presentada arriba, pero difieren en los residuos (R1 a R5) lo que les confiere algunas diferencias en sus propiedades físicas, químicas y biológicas.

Clase B que agrupa a los tricotecenos 8-cetoderivados. Componen a este grupo 12 toxinas:



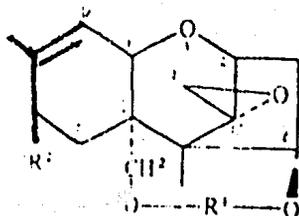
Tricotelona, Tricotecina, Nivalenol

Fusarenon-X, 4-Desoxinivalenol,

4,15-Diacetilnivalenol y

7-Desoxinivalenol.

La clase C agrupa 17 derivados macrocíclicos. Algunos de estos son:

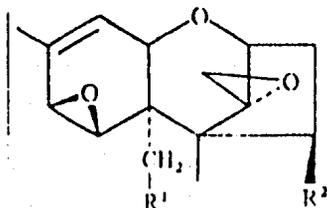


Verrucarinas A, B, J y L

Roridinas A, D, H, J, y K

Satratoxinas G y H.

En la clase D se encuentran los derivados 7,8-epoxi- de los cuales se han identificado 5 tricotecenos:



Crotocol, Crotocina,
7,8-Epoxiisoridina E
7,8-Epoxiroridina H y
Diepoxiroridina H.

4. Detección de tricotecenos.

La T-2 toxina, como la mayoría de los tricotecenos, es un agente irritante de la piel que produce inflamación y necrosis de la dermis 48 horas después de su aplicación. Esta propiedad ha sido ampliamente aprovechada para buscar toxinas en granos sospechosos y en extractos de cultivos (14).

Se cuenta, además, con otros métodos para su identificación como son el análisis por cromatografía de gases y de capa fina, así como de técnicas polarográficas (3). También hay métodos inmunoquímicos de análisis que usan suero de conejo obtenido mediante la inmunización de estos animales con la toxina conjugada a albúmina sérica bovina (13). Este suero puede ser usado en radioinmunoensayos y en técnicas inmunoenzimáticas para cuantificar la toxina problema en granos, leche, orina, suero y tejidos animales (37,38).

5. Tricotecenos de importancia.

Además de la T-2 toxina, que se revisará más adelante, merece ser mencionada la zearalenona por su potencial estrogénico. Este tricoteceno

zeno es un derivado macrocíclico (Gpo. C) que es producido por varias especies de Fusarium que se desarrollan en el maíz. Los puercos que son alimentados con el grano contaminado presentan hipertrofia de la vulva con prolapso vaginal, en la hembra. Si éstas están preñadas, generalmente abortan. Los machos intoxicados sufren atrofia de los testículos y crecimiento de las glándulas mamarias. Esta acción de la zearalenona ha impulsado a investigar su posible uso como anticonceptivo (12,63).

También se identificó otro derivado macrocíclico como el agente responsable de la Stachybotriotoxicosis. Esta enfermedad se reportó por primera vez en la Unión Soviética cuando muchos caballos murieron después de consumir paja mohosa. El moho relacionado es Stachybotrys atra. Los animales intoxicados presentaron hemorragias en mucosas, leucopenia, anemia y diarrea. Esta micotoxicosis está ampliamente distribuida en Europa, Asia y el sur de África (3).

D. T-2 Toxina.

1. Micotoxicosis asociadas.

La T-2 toxina es el tricoteceno que aparece reportado con más frecuencia como agente causal de las micotoxicosis en las cuales está involucrado el género Fusarium. A continuación se describen algunas de estas toxicosis:

La toxicosis del maíz mohoso representa un problema recurrente en el medio Oeste de los Estados Unidos. Los síntomas que presentan

los animales intoxicados son lesiones hemorrágicas en el hígado, estómago, pulmones, corazón, vejiga, riñón e intestino. Del maíz que consumían los animales enfermos se logró aislar e identificar a la T-2 toxina (29).

La T-2 toxina y el deoxinivalenol o vomitotoxina, presentes en granos, han sido reportados como factores que inducen el vómito y provocan rechazo del alimento por parte de los animales consumidores (3).

La Aleucia Tóxica Alimentaria (ATA) que se presentó en la Unión Soviética durante los años de la posguerra (1945-1949) se asoció al consumo de granos mohosos que fueron cosechados después del invierno. Los rasgos clínicos de esta enfermedad se han dividido en 4 estadios:

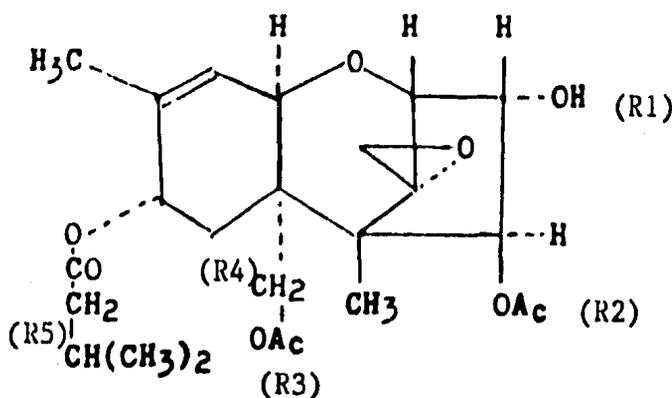
- Primer estadio. Se presenta inflamación de la mucosa gástrica e intestinal seguida de vómitos, diarrea y dolor abdominal.
- Segundo estadio. Ocurren alteraciones en el sistema hematopoyético y en el linfoide, caracterizados por leucopenia progresiva, anemia y trombocitopenia.
- Tercer estadio. Aparecen petequias en el tronco y extremidades. Hay áreas necróticas en las mucosas con hemorragias e infecciones asociadas. La cuenta de leucocitos disminuye hasta en un 95%. Los pacientes mueren a consecuencia de las infecciones o por asfixia debido al agrandamiento de nódulos linfáticos cervicales, lo que les impide respirar. Se han observado trastornos neurológicos durante el desarrollo de la enfermedad.

- Cuarto estadio. Algunos autores no lo consideran ya que es la etapa de convalecencia y recuperación de los pacientes que sobreviven. Los efectos de las toxinas son reversibles por lo que los síntomas desaparecen si se deja de consumir el alimento contaminado (31).

También se ha reportado la presencia de la T-2 toxina y otros tricotecenos en la "lluvia amarilla". Este término se le dió a un polvo amarillo que era liberado de las municiones utilizadas en las guerras de Laos y Kampuchea. Las personas expuestas a este polvo sufrían disnea, náuseas, hemorragias en mucosas, asfixia, shock y muerte (3).

2. Propiedades químicas y físicas.

La T-2 toxina es un tricoteceno hidroxi-substituido (Clase A) y su estructura química es la siguiente:



P.M. = 466.5 g/mol

Nombre químico:

8 α -(3-metilbutiriloxi)-4B,15 diacetoxyscierp-9-en-3 α ol.

El punto de fusión de este compuesto es de 150-151°C y tiene una rotación específica de -50° (43).

El residuo isobutiril (R5) en la molécula contribuye a que la T-2 toxina tenga una naturaleza lipofílica lo que le confiere una mayor actividad con respecto a otros tricotecenos que carecen de este residuo. Esta propiedad la hace más soluble en las membranas celulares y por lo tanto tan activa a bajas concentraciones (59). Es soluble en disolventes orgánicos moderadamente polares como el metanol, etanol, acetato de etilo y dimetil-sulfóxido. Es muy estable en un intervalo amplio de temperaturas: resiste temperaturas cercanas a los 0°C hasta temperaturas de cocción de los granos (2, 56).

3. Metabolismo.

La T-2 toxina es metabolizada por esterasas de los microsomas hepáticos. La molécula sufre una desacetilación en el sustituyente R2 dando lugar a la HT-2 toxina (47). Sin embargo, este cambio no es considerado como una detoxificación ya que se ha comparado la toxicidad de ambos metabolitos obteniéndose los siguientes datos:

	T-2	HT-2	
DL ₅₀ en ratón por vía intraperitoneal (mg/kg)	5.2	9.0	(60)
Inhibición de sint. de prot. en reticulocitos (µg/ml)	0.03	0.03	(59)

Cuando la T-2 toxina es administrada por vía intravenosa su vida media en el plasma es de 5 minutos, encontrándose después niveles

tanto de T-2 como de HT-2 toxina (63).

Si la T-2 toxina marcada con tritio se inocula por vía intraperitoneal en ratas y se sigue su ruta de excreción, se encuentra que el 50% de la dosis de toxina administrada y su metabolito (HT-2) están en las heces y el 10% en orina durante las primeras 24 horas. Cuando se administra oralmente, también son las heces la principal ruta de excreción (3).

E. Efectos bioquímicos de la T-2 toxina.

1. Inhibición de la síntesis de proteínas.

Se han hecho varios estudios en función de la estructura de la T-2 toxina, relacionándola con su actividad inhibitoria de la síntesis protéica en células eucarióticas.

La T-2 toxina causa una rápida desagregación de los polirribosomas, interfiriendo así en la iniciación de la síntesis de proteínas y bloqueando la reacción catalizada por la peptidil transferasa (10). La presencia de un substituyente que contenga oxígeno en la posición R2 es primordial para llevar a cabo una inhibición efectiva de la actividad de esta enzima (5). Se ha demostrado que el grupo 12,13-epoxi- es esencial para que se lleve a cabo la inhibición de la síntesis de proteínas (4). La reducción del doble enlace entre C9 y C10 provoca una disminución hasta del 80% en la toxicidad del compuesto (3).

2. Inhibición de la síntesis de DNA.

Además del efecto tan ampliamente investigado sobre la síntesis de proteínas, se ha encontrado inhibición en la síntesis de DNA en sistemas de células tumorales cultivadas 'in vitro'. La inhibición de la síntesis del DNA es probablemente una consecuencia secundaria de la inhibición de la síntesis proteica (62).

3. Inhibición de la respiración mitocondrial.

Se ha demostrado que la T-2 toxina es capaz de inhibir en un 40% el consumo de oxígeno en mitocondrias provenientes de hígados de ratas tratadas (48). Sin embargo, las dosis requeridas para producir estos efectos son cinco veces mayores que las necesarias para inhibir la síntesis de proteínas y producir la muerte de células cultivadas 'in vitro' (3).

F. Efectos fisiológicos de la T-2 toxina.

1. Actividad carcinogénica.

Se ha investigado el potencial carcinogénico de la toxina tratando ratas intragastricamente con dosis de 0.2 a 4 mg/kg (DL₅₀ por esta vía en ratas es de 3.8 mg/kg). En los animales sobrevivientes se encontraron cambios neoplásicos en células escamosas y glandulares del estómago, duodeno, islotes pancreáticos, cerebro y pituitaria. Nunca se observaron tumores en el hígado (54). El efecto de la T-2 toxina sobre las células del sistema linfóide (Ver Sección I.F.6) puede explicar la incidencia de tumores en animales tratados.

Sin embargo, reportes no publicados de Frayssinet describen experimentos en que ratones "desnudos" tratados durante varios meses con T-2 toxina no desarrollaron ningún tipo de neoplasia.

2. Efectos teratogénicos.

La inyección de T-2 toxina, marcada con tritio, en ratas preñadas demostró que este metabolito es capaz de cruzar la placenta. La toxina fué encontrada en elevada concentración en el timo del animal recién nacido, donde parece acumularse (36). Las malformaciones resultantes son anomalías en cola y extremidades en los casos en que la madre fué inyectada con T-2 toxina el día 10 de gestación (57).

La adición de T-2 toxina a la dieta de las gallinas provoca reducción en la producción de huevos, éstos con los cascarones más delgados, además de una alta proporción de embriones muertos (66).

3. Efectos hematológicos.

El síndrome hemorrágico, la anemia y leucopenia que se producen en las intoxicaciones con esta micotoxina y otros tricotecenos ha motivado la investigación de los efectos de estos metabolitos sobre los parámetros hematológicos. Estos estudios, hechos en diversos animales de experimentación (ratones, ratas, conejos, gatos), muestran solamente pequeñas variaciones de susceptibilidad de especie a especie.

Los animales que han sido tratados con dosis subletales de T-2 toxina muestran un breve período de leucocitosis con linfocitosis

relativa unas 3 horas después de la administración. Después de 24 horas se encontró solo un 10 a 20% de leucocitos con respecto a los animales control (53). La anemia, en general, es transitoria aún cuando se siga administrando T-2 toxina (3).

Los factores humorales y celulares de la coagulación también se ven afectados por la T-2 toxina. Los niveles de tromboplastina, protrombina, fibrinógeno y de los factores VII y X de la coagulación se ven reducidos hasta en un 60%. Así mismo se ha descrito un aumento en los tiempos de protrombina y parcial de tromboplastina en animales tratados con T-2 toxina (3). Se ha postulado que estos efectos pueden ser consecuencia de la inhibición de la síntesis de proteínas que ocurre en el hígado.

Los estudios hechos 'in vitro' acerca de los efectos de la T-2 toxina sobre plaquetas muestran una disminución en su contenido de calcio, así como una marcada reducción en su capacidad de agregarse (67).

4. Alteraciones neurológicas.

La adición de T-2 toxina a la dieta de pollos provoca disturbios neurológicos como posturas anormales y reflejos reducidos. La cuantificación de los niveles de dopamina y norepinefrina cerebrales sugiere que la T-2 toxina pudiera tener un efecto inhibitorio sobre la conversión de dopamina a norepinefrina (11).

5. Diarrea.

La administración oral de T-2 toxina en ratones produce edema de la mucosa y citólisis del epitelio gástrico. En el duodeno y yeyuno también hay muerte celular y edema en las vellosidades (38). Estos efectos, además de la mayor permeabilidad de los vasos sanguíneos, conducen a la salida del plasma a la luz intestinal lo que explica la diarrea que se observa en pacientes con ATA. La diarrea también se observa cuando la T-2 toxina es administrada intraperitonealmente.

6. Efectos de la T-2 toxina sobre la respuesta inmune.

La actividad inmunosupresora de la T-2 toxina constituye uno de los efectos más importantes en el desarrollo de las toxicosis causadas por esta micotoxina. Los daños sobre el tejido linfoide son más pronunciadas durante la fase aguda de la intoxicación.

Los experimentos en que se trataron ratones con extractos crudos de Fusarium o con T-2 toxina mostraron que ambos eran capaces de causar una reducción del peso del timo así como inhibir la respuesta humoral a eritrocitos de carnero. La reducción del peso del timo se traduce en un aumento de linfocitos circulantes en las primeras horas después de iniciado el tratamiento, seguido de una leucopenia que prevalece a lo largo de éste. El efecto sobre la síntesis de anticuerpos depende de la dosis de toxina administrada y es reversible, ya que desaparece 6 días después de haberse suspendido el tratamiento. También se ha demostrado que el tiempo para que se lleve a cabo el rechazo de un aloinjerto de piel es significativamente más prolongado

en animales tratados con T-2 toxina, lo que indica una reducción en la respuesta inmune mediada por linfocitos T (49).

En cambio, la respuesta inmune murina a antígenos T-independientes (poli-vinil-pirrolidina y dinitro-fenil-ficoll) después de un tratamiento con T-2 toxina no se encuentra inhibida. Las células de bazo de los ratones tratados mostraron una respuesta significativamente mayor a la de los controles. Se postula que este efecto ocurre por una alteración en la función de linfocitos T-supresores o de alguna otra subpoblación de linfocitos T (50).

En ratones que fueron tratados con T-2 toxina, se investigó la respuesta a mitógenos por parte de células de bazo y de timo. La estimulación tanto de linfocitos T como de linfocitos B se encontró inhibida en forma reversible (35). También se ha reportado inhibición de la síntesis de proteínas y de DNA en células de bazo murinas estimuladas con fitohemaglutinina (51).

I I . O B J E T I V O S

Para determinar si la T-2 toxina ejerce una actividad específica sobre la respuesta inmune T-dependiente, es necesario estudiar el efecto de esta toxina sobre cada una de las poblaciones que constituyen el aparato inmunológico.

La reacción de hipersensibilidad tipo retardado es mediada por linfocitos T. Se investigará el efecto de la T-2 toxina sobre la reacción de sensibilización por contacto usando DNFB como antígeno.

La exposición de la piel del animal a un agente químico irritante como lo es el DNFB nos permitirá también investigar los procesos de cicatrización y de regeneración tisular en ratones tratados con T-2 toxina y compararlos con los controles.

Se estudiarán los efectos de la T-2 toxina sobre los macrófagos. Estos constituyen una parte integral del sistema inmune, funcionando como células accesorias en la presentación del antígeno, como células efectoras y como células reguladoras de la respuesta inmune.

Estos efectos sobre las funciones y actividades de los macrófagos se investigarán administrando la toxina 'in vivo' o 'in vitro'.

I I I. M A T E R I A L E S Y M E T O D O S

A. Preparación de la T-2 toxina.

La T-2 toxina (Sigma, ver anexo) fue disuelta en dos disolventes según se usara:

- Para experimentos en los cuales se estudió el efecto 'in vitro', se disolvió la T-2 toxina a una concentración de 1 mg/ml en dimetil-sulfóxido (DMSO). A partir de esta solución se realizaron diluciones sucesivas en DMSO y en medio de cultivo, de tal manera que la concentración final de DMSO no excediera el 1%.

- Cuando la T-2 toxina fué administrada 'in vivo', esta se disolvió en etanol absoluto para ser diluída posteriormente con solución salina amortiguada con fosfatos (0.15M NaCl, 1mM fosfatos, pH=7.4) (SSAF). De este modo se obtuvo una solución de T-2 toxina cuya concentración fue de 200 ug/ml en etanol al 6% en SSAF.

B. Medios de cultivo.

El medio de cultivo utilizado para el mantenimiento 'in vitro' de los macrófagos fué RPMI 1640 adicionado con 2 g de bicarbonato de sodio por litro. Este medio fue suplementado con:

	Concentración final
Suero fetal bovino	15%
Glutamina	2 mM
Piruvato de sodio	1mM
Aminoácidos no esenciales	1mM
Penicilina	100 U/ml
Estreptomicina	100 ug/ml

En los experimentos de cuantificación del anión superóxido se utilizó RPMI sin rojo de fenol para evitar interferencias por color.

La solución salina de Earle fue suplementada con gelatina al 1% para realizar los experimentos de fagocitosis de bacterias. Las bacterias no fagocitadas se inocularon en agar nutritivo. (Ver sección III.I.)

C. Animales.

Se emplearon ratones de las cepa CD-1 (exogámica) y ratones BALB/c (H-2^d), DBA/2 (H-2^d) y C57BL/6J (H-2^b), mantenidos en el bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la U.N.A.M..

Se emplearon machos de 6 a 10 semanas de edad para experimentos con macrófagos y hembras de 4 a 6 semanas para experimentos de hipersensibilidad de tipo retardado.

D. Cultivo de macrófagos.

1. Obtención de macrófagos de la cavidad peritoneal del ratón.

Las células de la cavidad peritoneal de los ratones CD-1 se obtuvieron por medio de un lavado de dicha cavidad serosa con 8 ml de SSAF. Las células se centrifugaron a 400 g por 8 minutos y se lavaron 2 veces con SSAF. Se resuspendieron en 5-10 ml de medio de cultivo RPMI y se tomó una alícuota de 0.05ml para contarlas.

2. Conteo de células.

La alícuota con las células fue teñida con el colorante vital azul tripano (0.08%) para observar su viabilidad. Una fracción de ésta suspensión se colocó en el hematocitómetro (cámara de Neubauer) y se contó el número de células en el cuadro central (dividido en 25 cuadros). Se empleó la siguiente ecuación para calcular el número de células en 1 ml de la suspensión inicial:

$$\text{No. de células/ml} = N \times D \times 10000$$

Donde: N es el número de células contadas en los 25 cuadros del cuadro central.

D es el factor de dilución resultante de mezclar volúmenes iguales de la suspensión celular y de azul tripano.

10000 es el factor resultante de considerar el volumen del cuadro central de la cámara (30).

3. Condiciones de cultivo.

Las células se resuspendieron a la concentración deseada (varía según el experimento) y se colocaron en placas con pozos de 16 mm, en cajas de Petri de 35 mm, en microplacas de cultivo o en tubos de cultivo.

Las células se incubaron a 37°C en atmósfera húmeda, 7% CO₂ (condiciones de cultivo) durante 2 horas. Después de este período, las células no adherentes se eliminaron mediante dos lavados con SSAF (37°C) y un lavado más con medio de cultivo (34).

E. Características de los Macrófagos.

1. Células adherentes.

Con el objetivo de conocer el porcentaje de células que no se adhieren y que se adhieren a la superficie de la placa de cultivo, se colectaron los lavados que se realizan después de las dos primeras horas de incubación. Se concentraron las células por centrifugación y se contaron en la cámara de Neubauer. Se puede calcular así el porcentaje de células no adherentes:

$$\% \text{ de células no adherentes} = \frac{\text{No. de células no adherentes}}{\text{No. de células totales}} \times 100$$

Con este dato se puede calcular el porcentaje de células adherentes: $\% \text{ células adherentes} = 100\% - \% \text{ células no adherentes}$.

2. Tinción citoquímica.

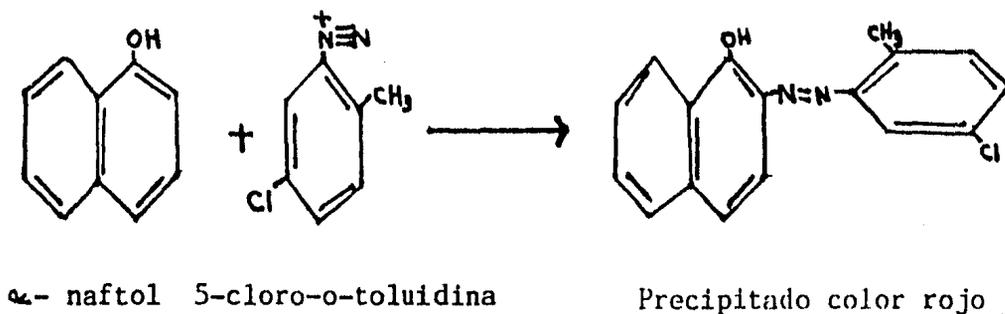
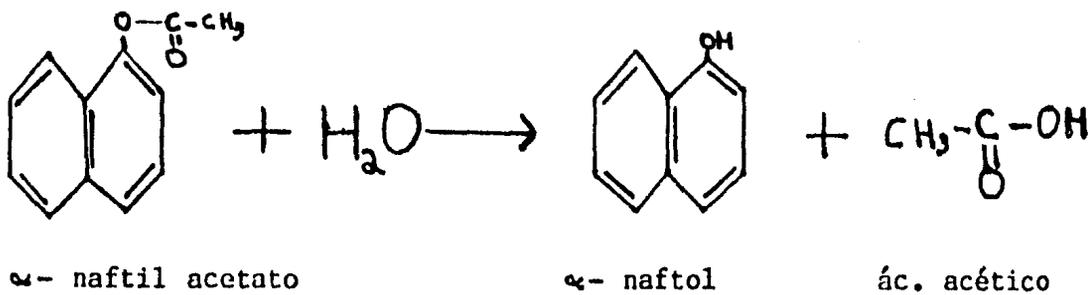
La esterasa no específica es el rasgo citoquímico más característico de los monocitos y macrófagos. Catalizan reacciones del tipo:



Lás células adheridas a cajas de Petri o a cubreobjetos se probaron para la reacción citoquímica de esta enzima.

Las preparaciones de células adherentes, sin fijar, se incubaron durante 40 minutos a temperatura ambiente con la solución de substrato que consiste en α -naftil acetato al 6.25% y 5-cloro-o-toluidina diazotado al 0.0625% disueltos en solución amortiguadora de fosfatos 0.1M pH = 7.3 y agua destilada (1:1).

La reacción que se lleva a cabo es la siguiente:



Las preparaciones se lavaron con agua destilada y se incubaron por 2 minutos con verde de metilo como colorante de contraste. Se lavaron otra vez con agua y se observaron en el microscopio de luz (58).

F. Efecto de la T-2 toxina sobre la actividad biológica de macrófagos.

Para estudiar los efectos que produce la T-2 toxina 'in vitro', se incubaron las células adherentes durante 24 horas, después de las cuales se les agregaron diferentes dosis de T-2 toxina para incubarlas 24 horas más. El intervalo de dosis de toxina fue de 0.125 a 5.0ng/ml. Se incluyeron controles donde se añadió el DMSO a la concentración

utilizada y pozos con células sin disolvente y sin toxina. Después de este período adicional, las células se prepararon según la actividad que se fuera a determinar.

Para estudiar el efecto que tiene la T-2 toxina cuando se administra 'in vivo', se inocularon ratones con la solución etanólica de T-2 toxina. Las dosis variaron de 0.5 a 1.0 mg/kg y se aplicaron durante cinco días consecutivos por vía intraperitoneal (ip), sacrificando a los animales el sexto día. Se obtuvo el exudado peritoneal y se separaron las células adherentes para su ensayo. Se incluyeron controles a los cuales solo se les aplicó el disolvente de la toxina.

G. Actividad enzimática.

Para estas pruebas, 1×10^6 macrófagos/ml se purificaron y se cultivaron en placas de 24 pozos (16 mm de diámetro).

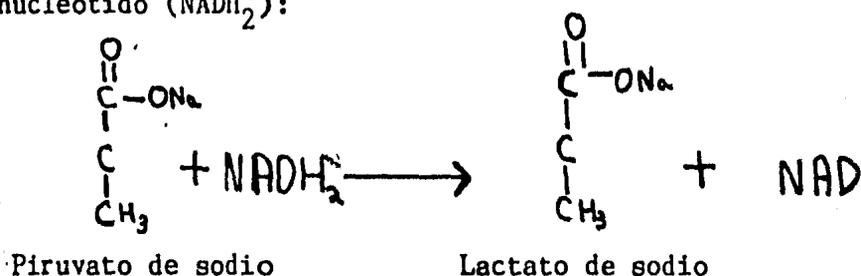
Las células cultivadas durante 24 horas con T-2 toxina o aquellas provenientes de ratones tratados se prepararon para determinar los niveles intracelulares de la enzima citoplasmática lactato deshidrogenasa (Lactato NAD-oxidoreductasa E C 1.1.1.27) y de la enzima lisosomal β -glucuronidasa (β -D glucurónido-glucuronhidrolása E C 3.2.1.31) (16).

El medio se retiró de las placas de cultivo sin desprender a las células y fué substituido por 1 ml del detergente no-iónico Tritón X 100 al 0.05% en SSAF. Las placas con las células se sometieron a procesos de congelación (-70°C) y descongelación (37°C) para liberar las

enzimas de las membranas citoplasmática y lisosomal. El lisado celular fue ensayado inmediatamente para determinar su contenido enzimático (34).

1. Lactato deshidrogenasa (LDH).

Esta enzima cataliza la reducción del piruvato por el nicotín-adenín-dinucleótido (NADH_2):



Para valorar esta enzima, el lisado celular fue ensayado de acuerdo al protocolo de los reactivos Merck-1-Test para la evaluación clínica de LDH en suero. El NADH_2 liofilizado fue reconstituido con la solución de piruvato de sodio 0.6mM en amortiguador de fosfatos 50 mM pH = 7.5 (37°C), para obtener una concentración final de 0.18 mM. Esta solución se pasó a una celda del espectrofotómetro a la cual se agregaron 0.10 ml del lisado celular. Se mezcló y se introdujo en el espectrofotómetro tomándose la lectura de la absorbancia a 340 nm durante 3 minutos consecutivos, haciendo una lectura cada minuto. Se determina la velocidad de producción de NAD, misma que es proporcional a la cantidad de enzima presente en la muestra.

La actividad de la enzima se evaluó en unidades internacionales (U) por litro (L) donde una U de enzima es la cantidad necesaria de

esta para transformar 1 μmol de sustrato en un minuto. Se puede obtener la actividad por volumen utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Actividad/volumen} = \Delta/\text{min} \times 4921 \text{ U/L.}$$

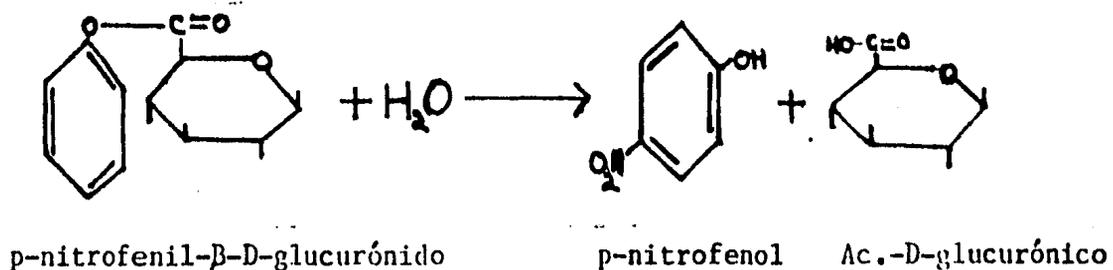
2. β -Glucuronidasa.

La enzima lisosomal β -glucuronidasa hidroliza glucurónidos conjugados:



Esta enzima fué evaluada poniendo en contacto 0.20 ml del lisado celular con 1 ml del sustrato p-nitrofenil- β -D-glucurónido (0.01M) en solución amortiguadora de acetatos 0.1M, pH = 4.5. Después de 4 horas de incubación a 37°C, se mide la liberación de p-nitrofenol, añadiendo 4 ml de hidróxido de sodio 0.025M. El p-nitrofenol liberado, del sustrato es un indicador ácido-base cuyo pI de vire es 7.5 teniendo color amarillo en soluciones con pH mayores que este. Su concentración se puede determinar leyendo la absorbancia de la mezcla de reacción a 405 nm en un espectrofotómetro y comparando su actividad con ayuda de una curva patrón de p-nitrofenol en un intervalo de concentraciones de 5 a 50 nmol/ml (34).

La reacción de hidrólisis que se lleva a cabo es la siguiente:

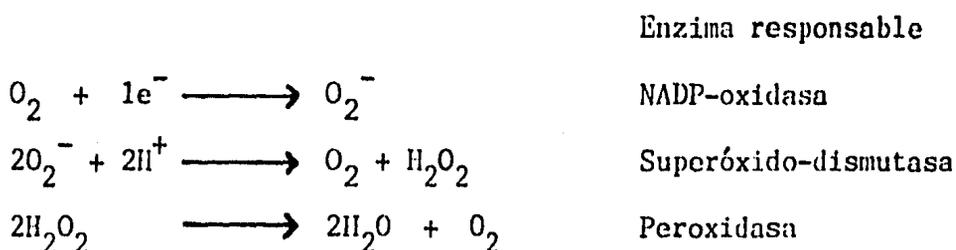


H. Generación del anión superóxido.

Los macrófagos (3×10^6 ml) tratados 'in vivo' o 'in vitro' se dejaron adherir a cajas de Petri de 35 mm de diámetro.

El anión superóxido (O_2^-) es producido a partir de la reducción del oxígeno y constituye, junto con el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), uno de los metabolitos microbicidas más eficientes (19).

Las reacciones que se llevan a cabo son las siguientes:



La liberación del anión superóxido se determinó por un método modificado del descrito por Johnston (33):

El medio de cultivo se retira y es substituido por 1.5 ml de una solución que contiene 300 μ g de ferricitocromo c (Tipo VI) en RPMI sin rojo de fenol y 50 μ g de zymosan en 0.15 ml de suero fetal bovino. Las células se incubaron durante dos horas más, en condiciones de cultivo. Después de este período, se transfirió la mezcla a tubos de ensaye, los cuales se centrifugaron a 1200 g durante 15 minutos para sedimentar el zymosan.

Se incluyeron en los controles células a las cuales se les agregaron 60 μ g de superóxido-dismutasa (Superóxido-reductasa EC 1.15.1.1) para inhibir la reducción del citocromo c por el superóxido. Se usaron

como blancos cajas sin células que contenían la mezcla de reacción.

La absorbancia del sobrenadante se leyó a 550 nm en un espectrofotómetro y, la concentración de citocromo c reducido se determina utilizando la ecuación obtenida por Massey (42) que indica la diferencia entre los coeficientes de absorptividad molar entre el citocromo c reducido y el oxidado: $E = 2.1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

I. Incorporación de aminoácidos marcados con (^{14}C).

Se determinó la capacidad para incorporar aminoácidos marcados radioactivamente por parte de macrófagos peritoneales de ratón que se incubaron durante 24 horas con T-2 toxina.

Durante las últimas 6 horas de incubación se agregaron a cada pozo 0.1 μCi de aminoácidos (NEN, 296 mCi/nmol). Al terminar el período de incubación se retiró el medio de cultivo y las células adheridas a la placa se lavaron 4 veces con SSAF para eliminar la marca no incorporada. Las células se lisaron con 1 ml de Tritón X 100 (Ver sección III.G) y 0.5 ml de este lisado fueron transferidos a tubos de ensaye donde se precipitaron las proteínas con ácido tricloroacético al 10%. Los tubos se dejaron reposar durante 15 minutos en frío (4°C) y se centrifugaron durante 15 minutos a 1200 g. El sobrenadante se eliminó y el precipitado se resuspendió en 13 ml de líquido de centelleo (Insta-Gel) para contar la radioactividad incorporada, en un contador beta.

La fracción restante (0.5 ml) del lisado celular fué usada para

determinar su contenido de proteínas, por el método de Lowry.

J. Cuantificación de proteínas por el método de Lowry (41).

La reacción para la determinación de proteínas se lleva a cabo en dos pasos; en el primero, ocurre la reacción de Cu (II) con la proteína. Se ha calculado que se une un átomo de cobre a la proteína por cada 8 residuos de aminoácidos. En el segundo paso de la reacción ocurre la reducción del complejo Cu-proteína por parte del ácido fosfomolibdico.

Los homogenados celulares, obtenidos en cada uno de los experimentos anteriores se procesaron para la determinación de proteínas.

Se tomó una alícuota de 0.40 ml de cada lisado celular y se hizo reaccionar con 4 ml del reactivo A (sulfato de cobre pentahidratado al 0.02%, tartrato de sodio y potasio al 0.02% disueltos en carbonato de sodio al 2% en hidróxido de sodio 0.1M). Se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después de este período de tiempo se agregaron 0.4 ml del reactivo B (reactivo de Folin-Ciocalteu:agua, 1:1) agitando inmediatamente. Se incubaron los tubos durante 20 minutos a temperatura ambiente y se leyó la absorbancia a 595 nm.

Para cada serie de determinaciones se elaboró un curva patrón usando albúmina sérica bovina, en un intervalo de concentraciones de 10 a 100 ug/ml en el cual la relación proteína:absorbancia es directamente proporcional. El blanco de reactivos consistió en 4 ml del reactivo A más 0.4 ml del reactivo B.

K. Actividad citotóxica contra células tumorales.

Se estudió la actividad citotóxica de macrófagos peritoneales de ratones C57B1/6J (H-2^b), tratados con diferentes dosis de T-2 toxina, en contra del mastocitoma P815 (H-2^d). Con este modelo se investigó también el efecto de la T-2 toxina cuando se administra 'in vitro' a macrófagos "armados" (39).

1. Línea tumoral.

La línea tumoral P815 es un mastocitoma con haplotipo H-2^d que crece en forma de ascitis en la cavidad peritoneal de ratones singénicos DBA/2 (H-2^d). Las células tumorales se cosechan del líquido ascítico de estos ratones y se lavan 3 veces con SSAF centrifugando a 400g durante 10 minutos. Posteriormente se resuspenden en 25-30 ml de SSAF y se cuentan (Ver sección III.D.2). Se ajusta la concentración de células a 2×10^7 células/ml y se inoculan 0.5 ml por vía ip a ratones de la misma cepa. El trasplante se realiza semanalmente.

2. Obtención de macrófagos "armados".

Se inmunizaron 4 grupos de ratones (4 ratones/grupo) de la cepa C57B1/6J con 2.5×10^7 células P815. Las células se inocularon por vía ip en un volumen de 0.5 ml de SSAF. Seis días después de la inmunización, 3 grupos se inocularon con distintas dosis de T-2 toxina (0.5 a 1.0 mg/kg/24h). El cuarto grupo se inoculó con el disolvente. El grupo control negativo consistió en ratones sin inmunizar e inoculados

con el disolvente.

El tratamiento con toxina se llevó a cabo durante los siguientes cinco días, después de los cuales se sacrificaron a los animales para obtener el exudado peritoneal. Los macrófagos (2×10^5) se dejaron adherir a la superficie de las microplacas de cultivo y después de 2 horas de incubación se lavaron para eliminar las células no adherentes (Ver sección III.E.1).

Para estudiar el efecto 'in vitro' de la toxina sobre la actividad citotóxica de los macrófagos se obtuvo el exudado peritoneal de ratones C57B1/6J y las células adherentes se incubaron con diferentes dosis de T-2 toxina durante 2 horas. Después de este período se retiraron 0.05ml del medio de cultivo que se sustituyeron por la suspensión de células blanco.

Las células P815 que se emplearon como blanco fueron cosechadas de la cavidad peritoneal de ratones DBA/2 y lavadas como se indicó anteriormente. Se contaron en la cámara de Neubauer y 2×10^6 células se resuspendieron en 0.8 ml de RPMI completo al que se le agregaron 0.2 ml de $\text{Na}^{51}\text{CrO}_4$ (Amersham, 10-35 $\mu\text{Ci/mol}$) y se incubaron durante 60 minutos en condiciones de cultivo. Posteriormente se lavaron 4 veces con SSAF para eliminar el cromo no incorporado. Las células P815 marcadas (2×10^4) se pusieron en contacto con células adherentes y se incubaron durante 4 horas en condiciones de cultivo. Se incluyeron controles en que solo se cultivaron células blanco marcadas con el fin de determinar la liberación espontánea.

Después del período de incubación indicado, las placas se centri-

fugaron a 600 g por espacio de 15 minutos. Se tomó una alícuota de 0.10 ml del sobrenadante de cada pozo y cada una de estas alícuotas fué transferida a un tubo de ensaye para contarse en un contador gamma. La cantidad de ^{51}Cr liberado es proporcional a la citólisis que sufren las células blanco.

La liberación específica es debida a la acción de los macrófagos sobre las células blanco y se calculó con la ecuación que se presenta a continuación:

$$\% \text{ Lisis específica} = \frac{L \text{ exp} - L \text{ esp}}{100 - L \text{ esp}}$$

Donde:

L exp es la liberación experimental de las células blanco en presencia de células adherentes.

L esp es la liberación espontánea de ^{51}Cr (22).

L. Fagocitosis de bacterias.

Se investigó el efecto de la T-2 toxina sobre la capacidad fagocítica de macrófagos peritoneales murinos. Para llevar a cabo este objetivo, se hicieron pruebas de fagocitosis con bacterias opsonizadas.

1. Bacterias.

Se empleó Salmonella typhi que fué mantenida en cultivo en el medio BHI (Brain & Heart Infusion).

Las bacterias que fueron usadas en la prueba de fagocitosis

fueron opsonizadas con suero humano normal. Se incubaron 0.3 ml de un cultivo de 24 horas con 0.4 ml de suero a 37°C durante 30 minutos.

2. Macrófagos.

Las células fagocíticas se obtienen de la cavidad peritoneal de ratones CD-1 tratados con T-2 toxina (0.75 mg/kg/24h) durante cinco días consecutivos. El exudado peritoneal se obtuvo el sexto día para realizar la prueba de fagocitosis. El grupo control consistió en ratones inoculados con el disolvente. Las células (7×10^6) se resuspendieron en 2 ml de solución salina de Earle suplementada con gelatina (1%). La gelatina se utiliza para proteger a los microorganismos de los efectos bactericidas de la solución salina de Earle.

La suspensión de bacterias opsonizadas (5×10^6) se añadió a cada tubo que contenía células fagocíticas. Se incluyó un tubo control con bacterias sin células. Los tubos se incubaron durante 2 horas en condiciones de cultivo con agitación continua. Una alícuota de 0.5 ml se tomó de cada tubo a distintos tiempos (0, 30, 60 y 120 minutos) y se añadió a un tubo que contenía 1.5 ml de solución de Earle (4°C) para detener la fagocitosis. Los tubos se centrifugaron por 4 minutos a 110 g para sedimentar las células; las bacterias no fagocitadas quedaron en el sobrenadante. Se hicieron diluciones sucesivas de este sobrenadante en solución salina isotónica (0.15M NaCl). Una alícuota de 0.3 ml fue tomada de la dilución más alta y se distribuyó homogéneamente en una caja de Petri. A esta se agregó el medio agar nutritivo (45°C) y se dejó solidificar. Las cajas de Petri se incubaron durante

24 horas a 37°C; después de este período se contó el número de colonias en cada caja con ayuda de un cuenta colonias. Con este dato se puede calcular el número de bacterias viables en el sobrenadante y comparar la capacidad fagocítica de los macrófagos provenientes de ratones tratados con respecto a los controles (24).

M. Estudio del efecto de la T-2 toxina sobre la reacción de Hipersensibilidad de Tipo Retardado (HTR).

La sensibilización por contacto (SC) es una forma de hipersensibilidad tipo retardado que se observa poniendo a animales en contacto con el antígeno a través de una exposición cutánea. Los compuestos químicos altamente reactivos como el trinitroclorobenceno (TNCB) o dinitrofluorobenceno (DNFB) son útiles en esta prueba ya que se unen covalentemente a proteínas de la piel y originan neoantígenos. Los animales son subsecuentemente retados en el cojinete de la pata o en la oreja 7 a 15 días después del primer contacto, observándose una respuesta inflamatoria 24 a 48 horas después en la zona del reto (26).

1. Animales.

Se emplearon hembras BALB/c de 4 a 6 semanas de edad, de 18 a 20 g de peso.

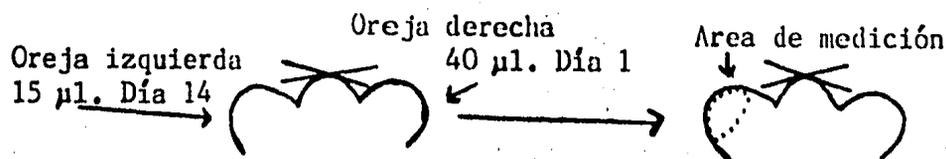
2. Sensibilización con el antígeno.

El antígeno utilizado, 2,4-DNFB fue diluido en una mezcla de acetona:aceite de oliva (1:1). La concentración final del antígeno fue de 10 mg/ml.

- El esquema de sensibilización seguido fue el siguiente:

Día 1: aplicación cutánea de 0.04 ml del antígeno en la cara externa de la oreja derecha del animal.

Día 14: Reto, mediante la aplicación de 0.015 ml de la solución del antígeno que fue aplicada en la oreja izquierda.



La reacción de HTR se manifiesta como un proceso inflamatorio muy acentuado que se puede evaluar midiendo el incremento en el grosor de la oreja retada con el antígeno. Esta medición se realizó 48 horas después del reto con ayuda de un micrómetro. El incremento en el grosor de la oreja se obtiene restando el grosor de la oreja de los ratones control negativo del grosor de la oreja de los ratones en experimentación.

Cuatro grupos de ratones (4 ratones/grupo) sensibilizados con el antígeno, fueron tratados con diferentes dosis de T-2 toxina (0.5-1.5 mg/kg/24h) durante los 16 días subsecuentes a la sensibilización. Se incluyó un grupo control positivo al cual se le aplicó el antígeno y un grupo control negativo al cual se le aplicó el disolvente (acetona:aceite de oliva). Ninguno de estos ratones fueron tratados con T-2 toxina.

Después de medir el grosor de la oreja, los animales se sacrificaron mediante anestesia con éter y se separaron los siguientes

órganos: oreja izquierda, timo y oreja derecha. El timo se pesó antes de ser fijado. Todos los órganos se fijaron en formol al 10% y se preparon para exámen histológico. Los cortes se tiñieron con hematoxilina y eosina (H-E).

N. Efecto de la T-2 toxina sobre la reparación del tejido.

EL proceso inflamatorio es la respuesta característica del tejido de los mamíferos a la lesión. Cuando un tejido es dañado por laceración, quemaduras, agentes químicos o bacterias, en el sitio de la lesión ocurren una serie de eventos que tienden a destruir o limitar al agente lesionante. La respuesta inflamatoria es seguida por la reparación del tejido dañado y para su estudio se recomienda manejar estos procesos como dos eventos separados (64).

La aplicación de un agente químico irritante como lo es el DNFB induce una respuesta inflamatoria que es seguida por el proceso de reparación. Esta reparación del tejido dañado y los efectos de la toxina sobre este proceso fisiológico pueden ser estudiados en las orejas de los ratones donde se aplicó el DNFB para su sensibilización. Por esta razón también se separó la oreja derecha de los ratones tratados con T-2 toxina y se hicieron cortes para su exámen histológico. En este trabajo, unicamente se reportan las observaciones hechas en el exámen de estos cortes, así como las medidas de espesor del tejido conectivo, que es el responsable de la reparación tisular. Estas medidas se realizaron con un micrómetro de objeto y un ocular graduado.

I V. R E S U L T A D O S

A. Características de los macrófagos.

1. Porcentaje de células adherentes.

Se determinó el número de células adherentes (Ver Sección III. E.1) en las placas de cultivo que se utilizaron en los experimentos, después de dos horas de incubación y de efectuar los lavados. Mediante este procedimiento se eliminaron las células no adherentes que consisten principalmente en linfocitos y algunas células cebadas (7).

La proporción de células adherentes que se encontró fué del 45 a 50% del total de células obtenidas de la cavidad peritoneal del ratón.

2. Tinción citoquímica.

En las preparaciones teñidas para esterasa no específica se contaron 200 células en campos escogidos al azar. En las células positivas para esterasa se observan gránulos rojos, productos de la reacción, en el citoplasma.

El 95% de las células adherentes dieron una reacción de esterasa positiva.

B. Actividad Enzimática.

1. Lactato deshidrogenasa.

Los niveles intracelulares de esta enzima en macrófagos incubados 'in vitro' con la T-2 toxina no se vieron alterados con respecto a los controles (Fig. 1). El DMSO, a la concentración empleada, no afectó a las células en cultivo; se compararon los valores con aquellos en los que se incubaron macrófagos solamente con RPMI.

En macrófagos provenientes de ratones tratados con T-2 toxina se observó un aumento significativo en los niveles intracelulares de la enzima LDH (Fig. 2).

2. β -Glucuronidasa.

Los niveles de esta enzima lisosomal no se vieron alterados en macrófagos incubados 'in vitro' con T-2 toxina. Sin embargo, se observa un aumento en los niveles de esta enzima si las células provienen de ratones tratados con T-2 toxina siguiendo el esquema empleado (Fig. 3 y 4). La dosis de 0.75 mg/kg es la más eficiente en estimular a los macrófagos.

La T-2 toxina no alteró la viabilidad de los macrófagos en cultivo cuando esta se verificó con azul tripano, después de 48 horas de incubación.

Por otro lado, no se encontraron cambios significativos en el número de células extraídas de la cavidad peritoneal de los ratones cuando se compararon con los controles.

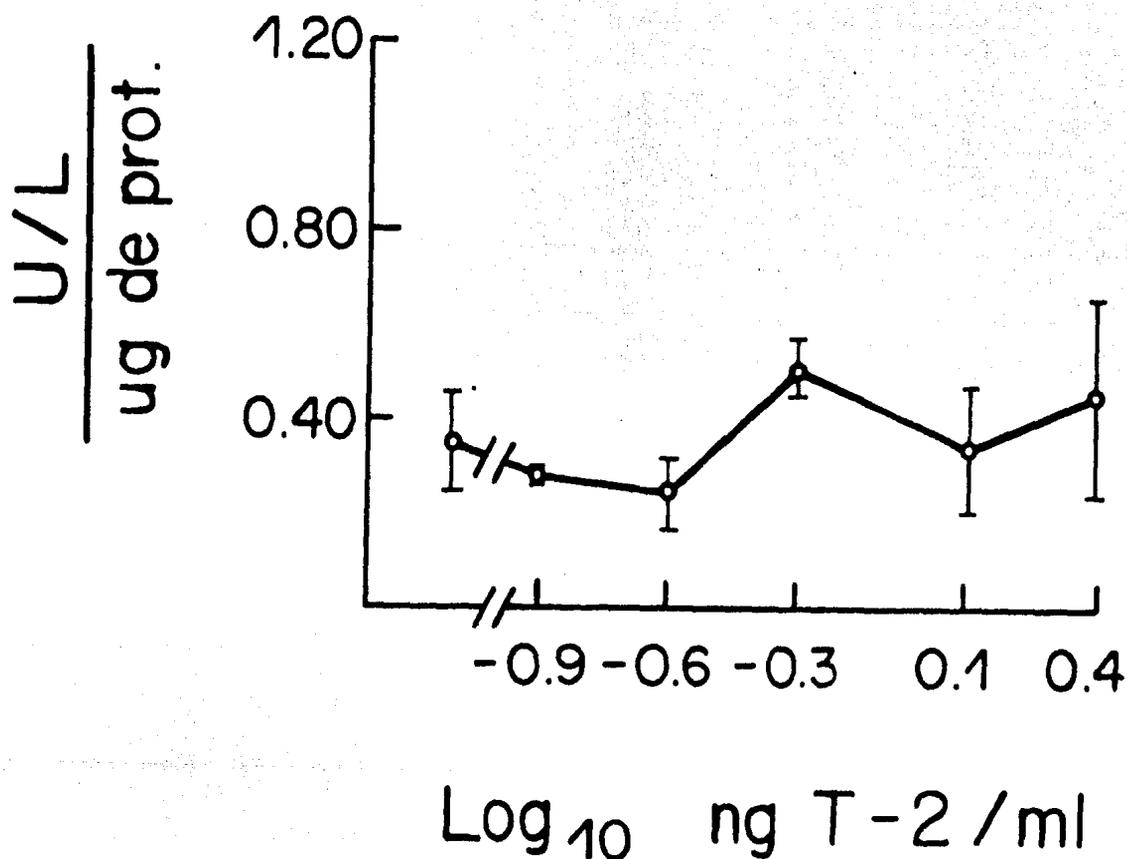


FIG. 1. Niveles intracelulares de la enzima citoplasmática lactato deshidrogenasa (LDH) en macrófagos peritoneales de ratón incubados durante 24 horas con diferentes dosis de T-2 toxina. La actividad enzimática se reporta en U/L/ug de proteína y la dosis de toxina como Log_{10} ng/ml. El primer punto corresponde a los macrófagos incubados con DMSO.

(Se grafica valor promedio \pm desviación estandar).

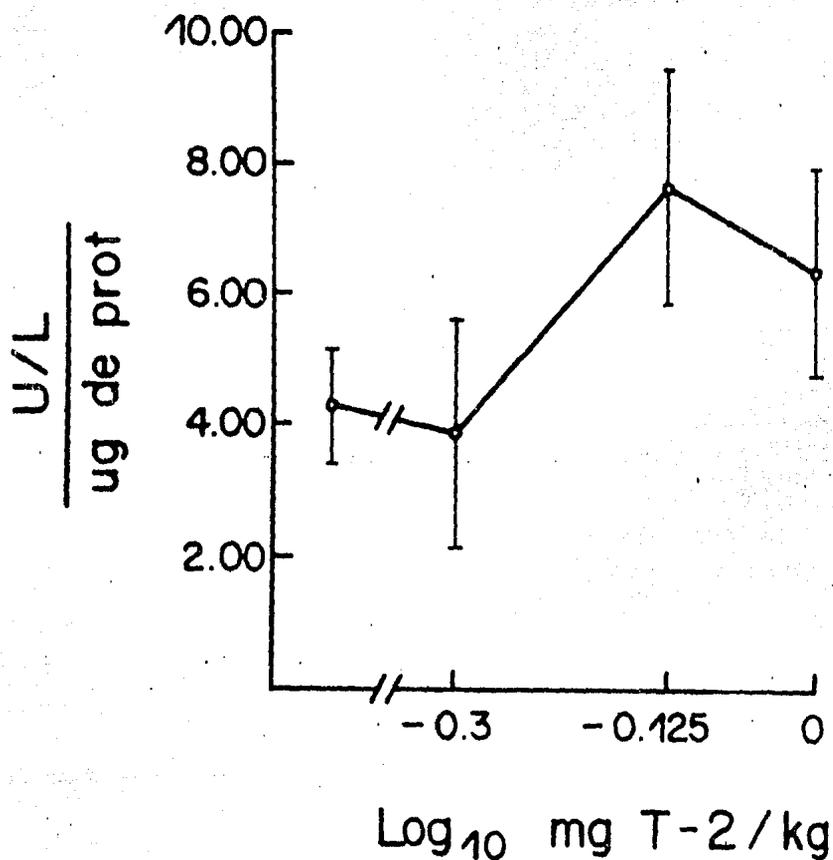


FIG. 2. Niveles intracelulares de la enzima citoplasmática deshidrogenasa láctica (LDH) en macrófagos peritoneales de ratones tratados con T-2 toxina durante 5 días consecutivos. Las dosis de T-2 toxina empleadas fueron 0.50, 0.75 y 1.00 mg/kg. El primer punto corresponde a macrófagos peritoneales de ratones que fueron inoculados con SSAF/etanol.

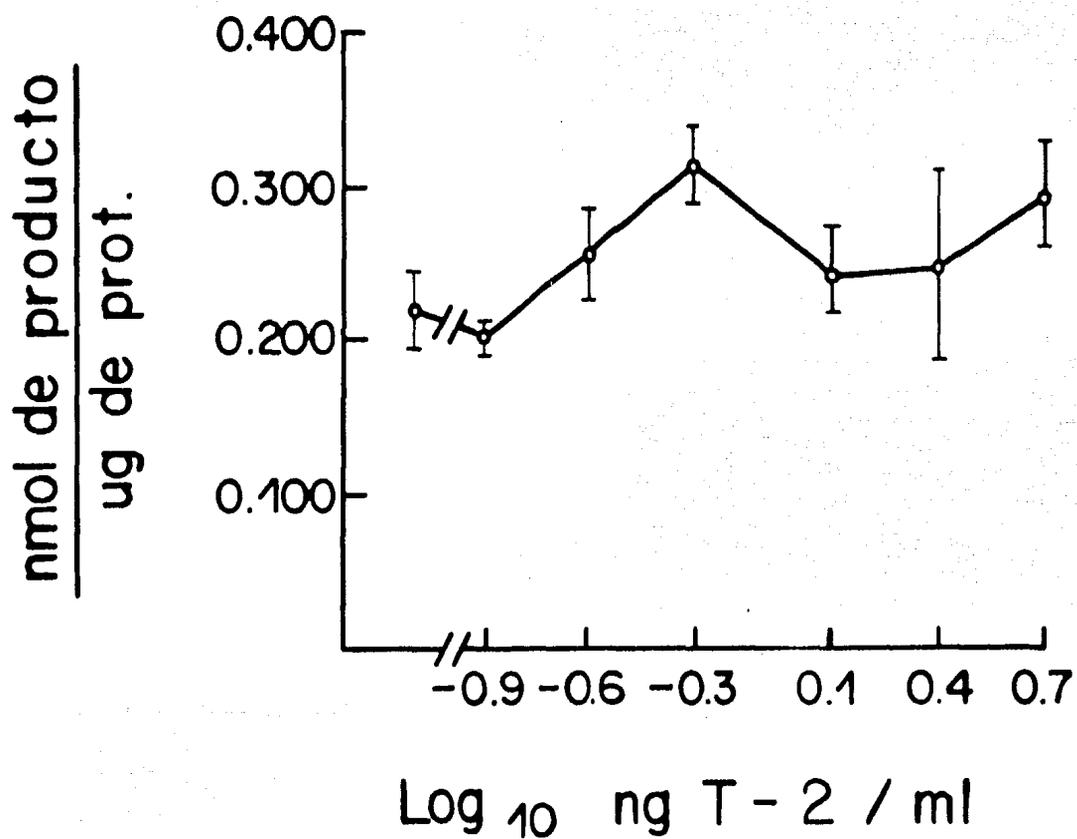


FIG. 3. Niveles intracelulares de la enzima lisosomal β -glucuronidasa en macrófagos peritoneales de ratón incubados durante 24 horas con diferentes dosis de T-2 toxina.

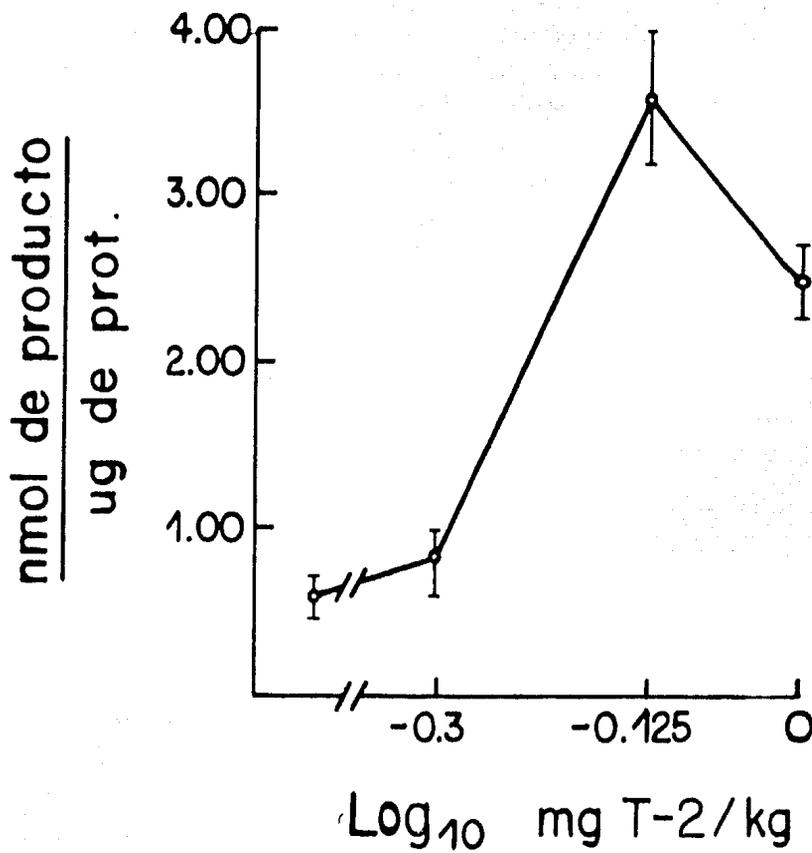


FIG. 4. Niveles intracelulares de la enzima lisosomal β -glucuronidasa en macrófagos peritoneales de ratones tratados con T-2 toxina durante 5 días consecutivos.

C. Generación del anión superóxido.

El tratamiento 'in vitro' de macrófagos peritoneales de ratón con T-2 toxina provoca una reducción en la capacidad de estas células para generar el metabolito O_2^- , independientemente de la dosis (Fig. 5). La viabilidad de las células no se observó alterada a las dosis de toxina que se probaron.

Por otro lado, cuando los macrófagos provienen de ratones tratados con T-2 toxina presentan una elevada generación del anión superóxido siendo la dosis de 0.75 mg/kg la más eficiente en estimular a las células (Fig. 6).

La enzima superóxido-dismutasa incluida en los controles fue capaz de inhibir en un 100% la reducción del citocromo c por parte del anión O_2^- .

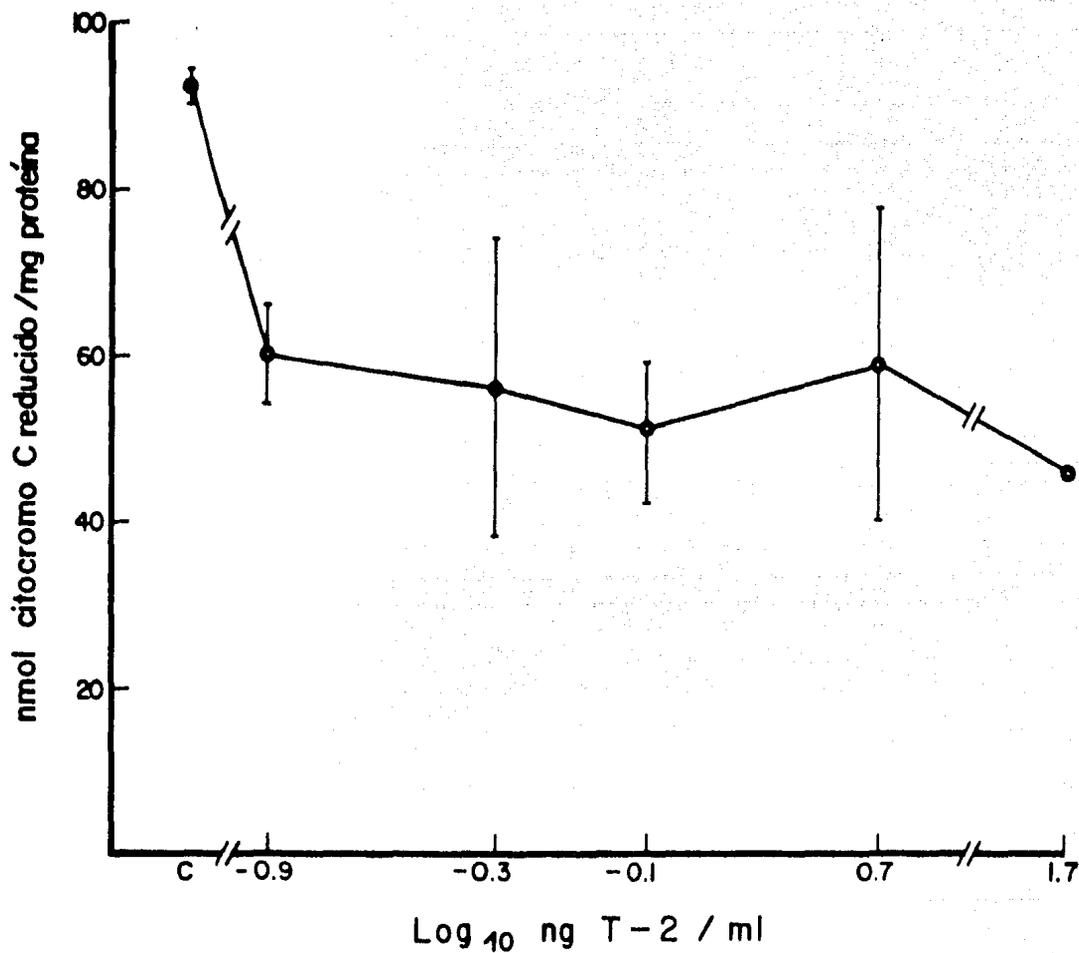


FIG. 5. Generación del anión superóxido por parte de macrófagos peritoneales de ratón incubados durante 24 horas con diferentes dosis de T-2 toxina y durante 2 horas con zymosan opsonizado.

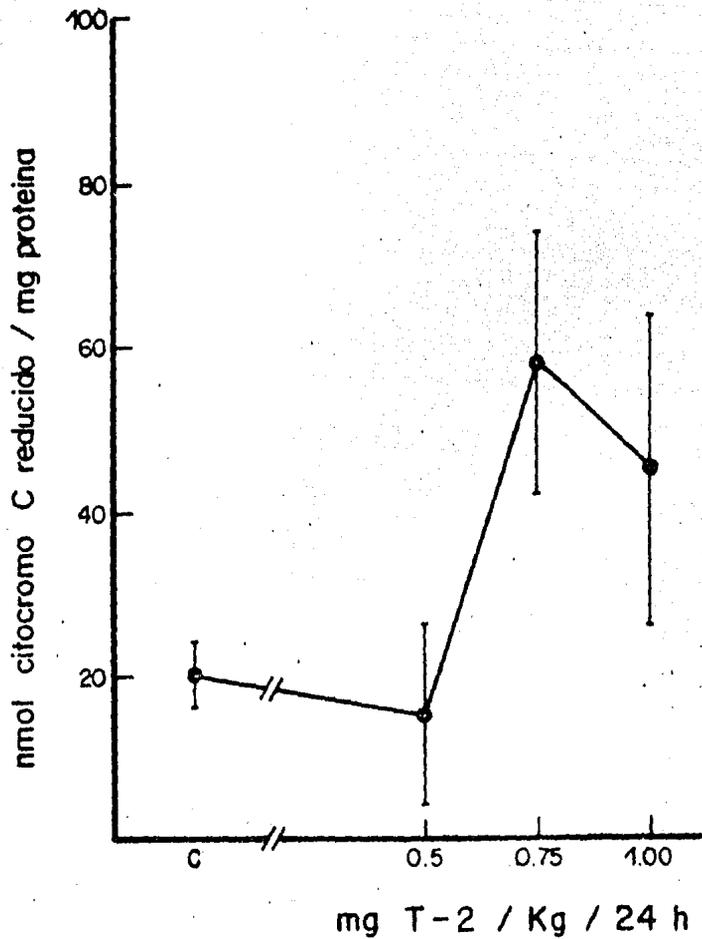


FIG. 6. Generación del anión superóxido por parte de macrófagos peritoneales de ratones tratados durante 5 días consecutivos con diferentes dosis de T-2 toxina e incubados durante 2 horas con zymosan opsonizado.

D. Incorporación de aminoácidos marcados con (^{14}C).

La incorporación de aminoácidos marcados con (^{14}C) es un índice fácil de determinar para evaluar la síntesis de proteínas en un órgano o en células en cultivo.

Tabla 1. Incorporación de aminoácidos (^{14}C) por parte de macrófagos peritoneales de ratón incubados durante 24 horas con diferentes dosis de T-2 toxina.

Tratamiento	cpm/mg proteína
RPMI	2345 \pm 780
DMSO	2110 \pm 191
0.125 ng/ml	2041 \pm 698
0.500 ng/ml	2031 \pm 254
1.250 ng/ml	1944 \pm 556
5.000 ng/ml	2355 \pm 277

donde: cpm es cuentas por minuto.

No se encontró ningún cambio significativo en la incorporación de aminoácidos por parte de los macrófagos incubados con T-2 toxina con respecto a los controles, lo que significa que la T-2 toxina, a las dosis utilizadas, no fue capaz de inhibir la síntesis de proteínas en las células incubadas durante 24 horas.

E. Actividad tumoricida de macrófagos peritoneales murinos.

La liberación de ^{51}Cr , cuantificada en el sobrenadante, es proporcional a la lisis que sufren las células tumorales. La T-2 toxina administrada 'in vitro' durante 2 horas, independientemente de la dosis, fue capaz de inhibir significativamente la lisis de células tumorales (Tabla 2).

Cuando es administrada 'in vivo', la T-2 toxina inhibe la lisis de células tumorales parte de los macrófagos. Como se observa en la tabla 3, la reducción en esta función de las células efectoras depende de la dosis de toxina administrada a los ratones.

Tabla 2. Efecto de la T-2 toxina sobre la actividad citotóxica de macrófagos peritoneales de ratones C57B1/6J contra células de la línea P815. Los macrófagos se incubaron durante 2 horas con diferentes dosis de T-2 toxina.

Tratamiento	% Liberación específica (^{51}Cr)
RPMI	31.5 \pm 5.5
DMSO	30.9 \pm 7.5
0.25 ng/ml	14.74 \pm 4.49
0.50 ng/ml	14.02 \pm 1.9
1.25 ng/ml	18.9 \pm 1.10
2.50 ng/ml	20.5 \pm 3.37
5.00 ng/ml	19.3 \pm 3.46

Tabla 3. Actividad citotóxica de macrófagos peritoneales de ratones C57B1/6J tratados con T-2 toxina durante cinco días consecutivos.

Grupo	Inmunizados con células P815	Dosis T-2 toxina (mg/kg/24 h)	% Liberación específica (^{51}Cr)
A	-	-	12.36 \pm 8.87
B	+	-	86.63 \pm 5.05
C	+	0.50	49.22 \pm 8.45
D	+	0.75	25.73 \pm 3.00
E	+	1.00	13.60 \pm 2.65

Las diferencias en la liberación específica con respecto a los controles son significativas ($p < 0.01$) y dependen de la dosis de T-2 toxina administrada a los ratones.

F. Fagocitosis de bacterias.

En las pruebas de fagocitosis que se realizaron y cuyos resultados se presentan en la Figura 7 se estudió la capacidad bacteriostática de los macrófagos peritoneales murinos. Es decir, su capacidad de controlar el crecimiento de la bacteria Salmonella typhi mediante la fagocitosis.

Los macrófagos provenientes de ratones inoculados con el disolvente no fueron capaces de controlar el crecimiento de los microorganismos durante el período de incubación. El aumento en el número de bacterias viables es el mismo a las dos horas cuando se incuban con macrófagos que cuando están únicamente en solución de Earle.

En cambio, los macrófagos provenientes de ratones tratados con T-2 toxina fueron capaces de controlar el crecimiento de las bacterias. Se observa en la Figura 7 que se mantiene constante el número de bacterias durante el período de incubación.

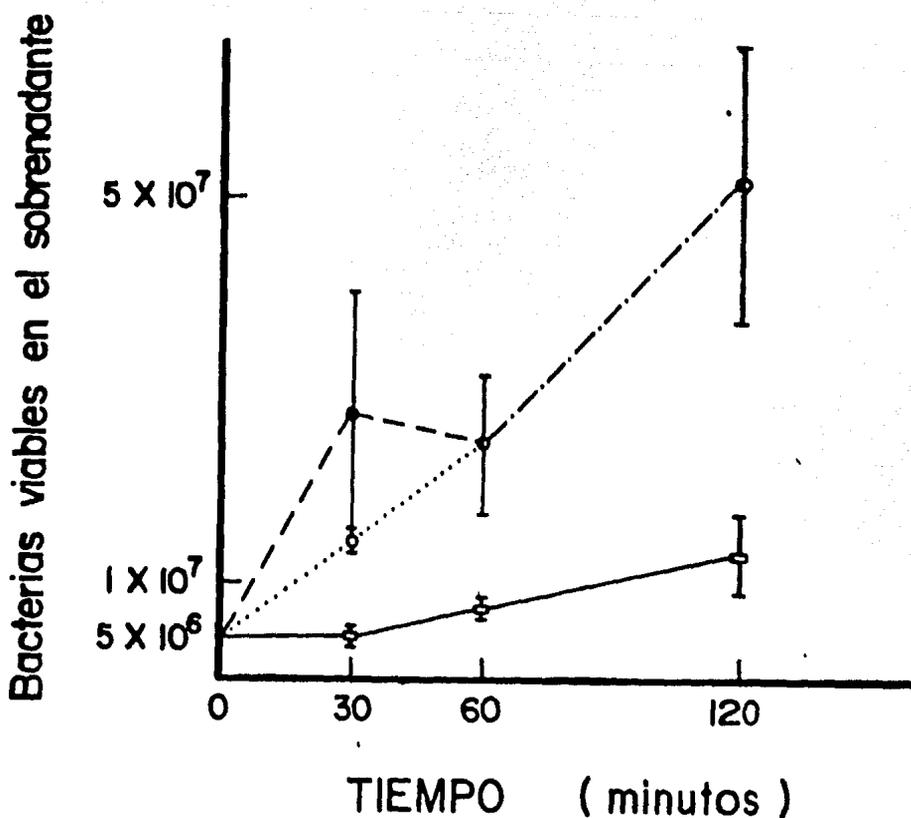


FIG. 7. Fagocitosis de bacterias (*Salmonella typhi*) por parte de macrófagos peritoneales de ratones tratados con 0.75 mg/kg/24 h de T-2 toxina durante 5 días consecutivos. La fagocitosis de bacterias se evaluó cuantificando el número de microorganismos viables después de incubarlos con las células fagocíticas.

Bacterias incubadas en solución de Earle (●----●).

Bacterias incubadas en solución de Earle con macrófagos provenientes de ratones inoculados con SSAF/etanol (○····○).

Bacterias incubadas en solución de Earle con macrófagos provenientes de ratones tratados con T-2 toxina (□—□).

G. Efecto de la T-2 toxina sobre la reacción de HTR a DNFB.

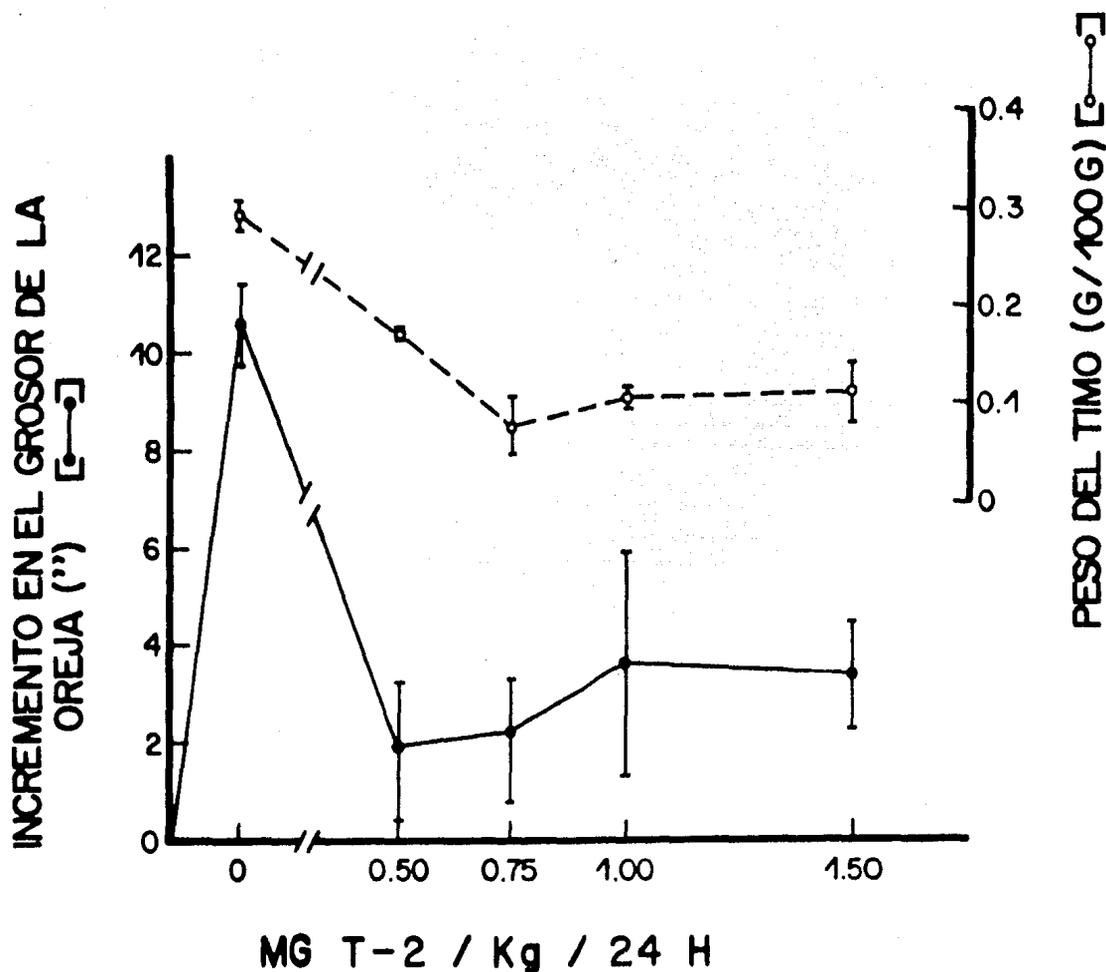


FIG. 8. Incremento en el grosor de la oreja de ratones BALB/c que fueron retados con DNFB. Se midió la reacción inflamatoria a DNFB en los grupos de ratones tratados con diferentes dosis de T-2 toxina.

La reducción en la respuesta de HTR que se observa, está acompañada por una reducción en el peso del timo. Este órgano linfóide primario es depletado en zona medular, tras la aplicación de T-2 toxina a los animales.

II. Efecto de la T-2 toxina sobre la reparación del tejido.

Observaciones histológicas.

La aplicación del DNFB a la oreja del ratón induce una reacción inflamatoria que es reparada en 15 días mediante la formación de una cicatriz en la dermis (Fotos 1 y 2). En la foto 2 se observa proliferación de fibroblastos, así como depósitos de colágena, multiplicación de pequeños vasos sanguíneos e hiperplasia de la epidermis. (Aproximadamente 3% de las células basales presentan mitosis contra 0.25% en orejas de ratones no tratados con DNFB).

Las orejas de los ratones tratados con T-2 toxina y a los cuales se les aplicó DNFB muestran una reacción fibrosa incrementada, independientemente de la dosis de toxina administrada (Fotos 3 y 4 corresponden a 0.75 y 1.00 mg/kg/24h respectivamente). La capa de queratina es más delgada que en los controles y el número de células en la epidermis es mayor.

Los cambios en el tejido conectivo de la dermis incluyen un aumento en su espesor con respecto a los controles (Fig. 9). El incremento en el espesor se debe a la intensa proliferación de fibroblastos y a los depósitos de colágena.

El aspecto de los fibroblastos en estos cortes difiere del de los controles: presentan una mayor proporción de citoplasma, distintas propiedades tintoriales y orientación azarosa (Foto 5).

Todos estos cambios ocurren únicamente en la cara externa de la oreja, donde fue aplicado el DNFB.

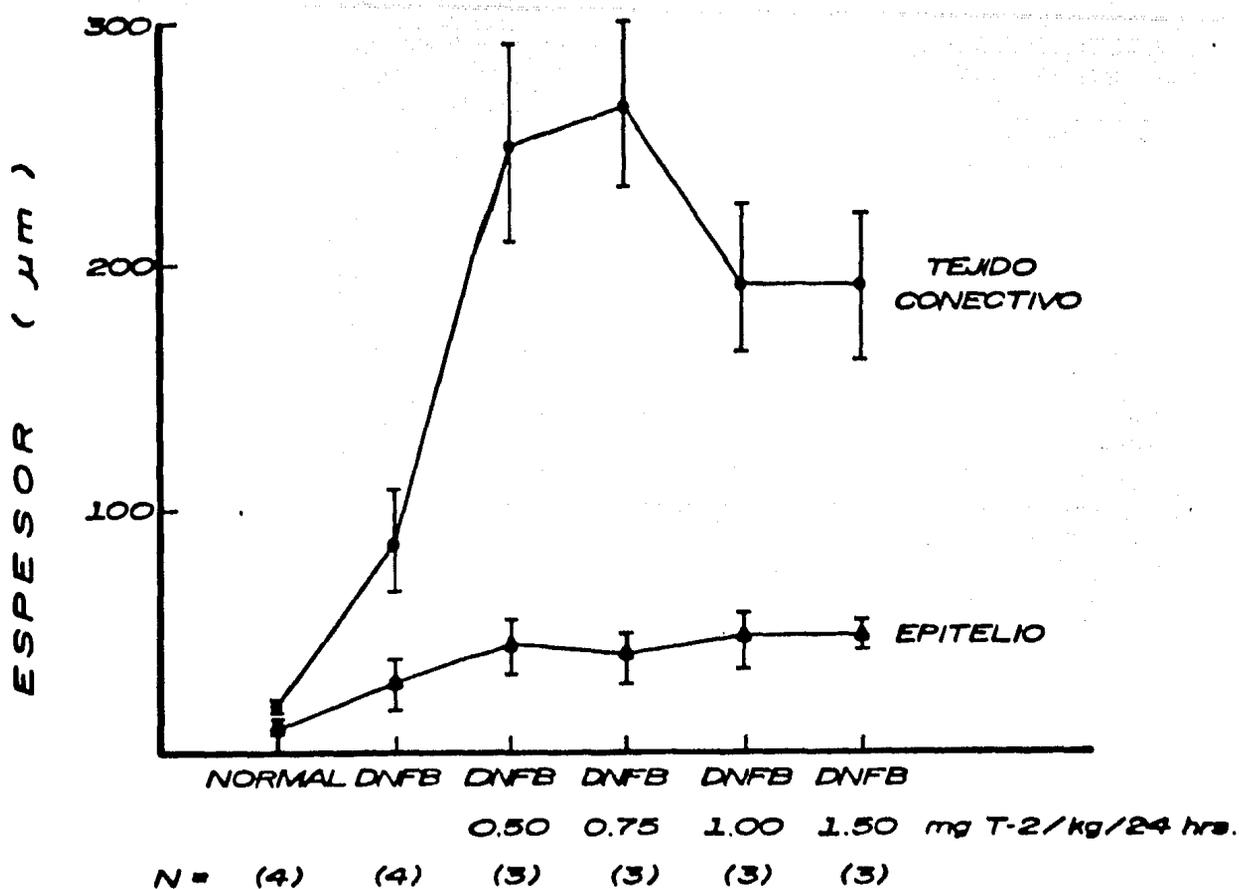


FIG. 9. Efecto de la T-2 toxina sobre la reparación del tejido. A partir de los cortes histológicos se determinó el espesor del tejido conectivo y del tejido epitelial. Se observa un aumento significativo en el espesor del tejido conectivo y del tejido epitelial en las orejas de los ratones tratado con T-2 toxina, con respecto a los controles.

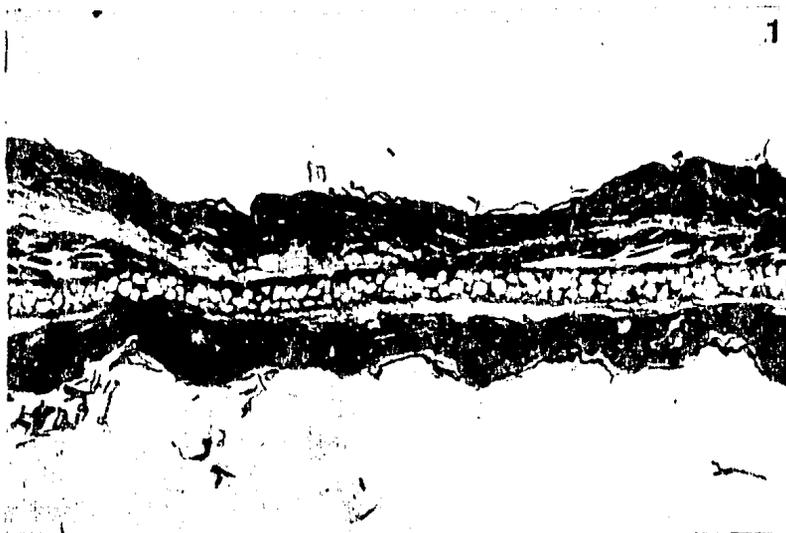


Foto 1. Oreja normal de ratón. Tinción H-E (x160).

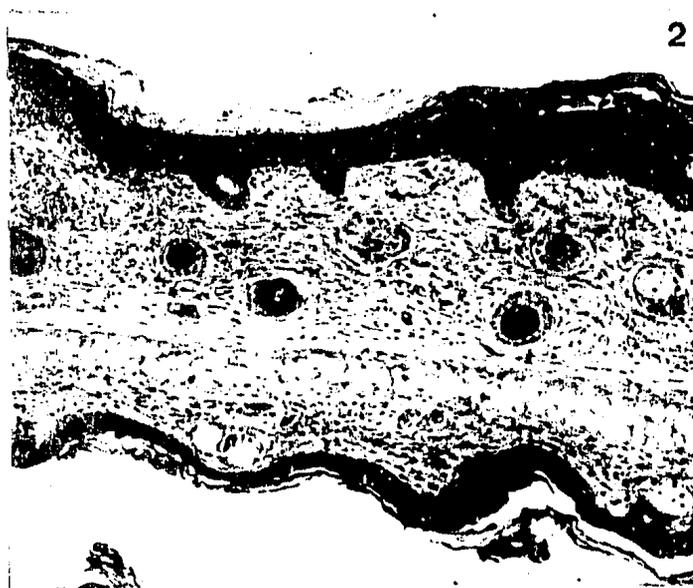


Foto 2. Oreja a la cual se le aplicó DNEB. 15 días después de la aplicación. Tinción H-E (x160).



Foto 3. Oreja a la cual se le aplicó DNFB. Proviene de un raton que ha sido tratado con T-2 toxina (0.75 mg/kg/24h). Tinción H-E (x160).



Foto 4. Oreja a la cual se le aplicó DNFb. Proviene de un ratón que ha sido tratado con T-2 toxina (1.00 mg/kg/24h). Tinción H-E (x160).

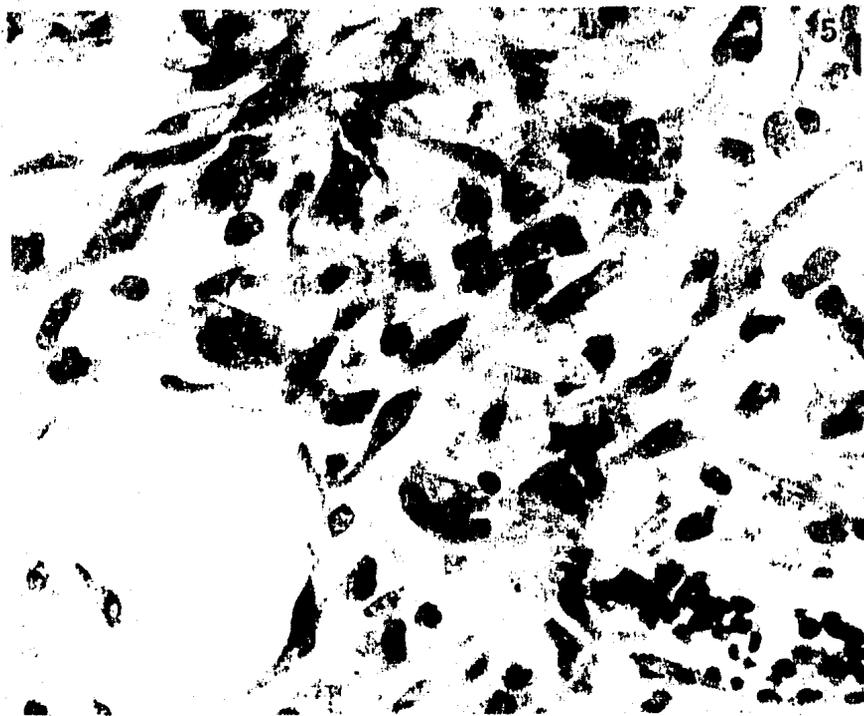


Foto 5. Aumento (x400) de un campo de la foto anterior Tinción H-E.

V. D I S C U S I O N D E R E S U L T A D O S

A. Efectos de la T-2 toxina sobre la actividad biológica de macrófagos murinos.

En la última revisión realizada acerca de la activación de macrófagos, D. Adams y T. Hamilton (1) definen y establecen las diferencias entre los conceptos de capacidades y funciones que poseen los macrófagos.

Definen una capacidad como una simple característica o propiedad que se puede cuantificar bioquímica o inmunológicamente como un rasgo específico del metabolismo o de la estructura celular. Como ejemplos de capacidades están los receptores para Fc, expresión del antígeno Ia, cantidad de H_2O_2 secretada y contenido de enzimas lisosomales.

Una función se define como la suma de varias capacidades para realizar una acción más compleja y que se puede determinar en un ensayo fisiológico. Entre las funciones más representativas de los macrófagos se encuentran la citólisis de células tumorales, citotoxicidad de células tumorales dependiente de anticuerpo (ADCC), fagocitosis, procesamiento y presentación de antígeno y quimiotaxis.

Las definiciones de capacidades y funciones permitirá comprender mejor la biología celular del macrófago y el efecto de la T-2 toxina sobre estas células.

1. Actividad enzimática.

a. Deshidrogenasa láctica.

De acuerdo a la definición descrita, las enzimas de la vía Emden-Meyerhoff forman parte de una capacidad intracelular de los macrófagos. La mayoría de los macrófagos tisulares dependen principalmente de la glucólisis aeróbica para obtener energía (7). La lactato deshidrogenasa es una de las enzimas que intervienen en la glucólisis y se encuentra ampliamente distribuida en los tejidos (16). Los niveles intracelulares de esta enzima proporcionan un índice acerca de la síntesis de proteínas que se lleva a cabo en la célula.

Ni los macrófagos incubados 'in vitro' con T-2 toxina, ni aquellos provenientes de ratones tratados 'in vivo' con la toxina muestran una disminución significativa en los niveles intracelulares de esta enzima, independientemente de la dosis. La viabilidad de las células tampoco se vio afectada después de los períodos de incubación 'in vitro' con la T-2 toxina. Por otro lado, el número de macrófagos provenientes de la cavidad peritoneal de ratones tratados 'in vivo' no varió significativamente con respecto a los controles.

Estos resultados son corroborados con los experimentos de incorporación de aminoácidos radiactivos-¹⁴C. En cambio, estas mismas dosis (0.5mg/kg/24h, tratamiento 'in vivo' y 0.125-5.0 ng/ml, 'in vitro') fueron capaces de inhibir la síntesis de proteínas y de DNA en células de bazo, médula ósea y timo de ratones tratados con T-2 toxina (5). Los autores postulan que esta extremada sensibilidad se debe a los bajos niveles de enzimas detoxificantes que tienen las células linfoides o por la presencia de un receptor en la superficie de estas cé-

lulas. Los resultados obtenidos en este trabajo apoyan esta hipótesis ya que los macrófagos y los linfocitos tienen un desarrollo ontogénico diferente, aunque las células progenitoras de ambos se derivan de la célula madre hematopoyética pluripotencial (28). Otra diferencia entre ambas células es que los macrófagos, a diferencia de los linfocitos poseen una gran carga enzimática que pueda ser capaz de alterar la estructura química de la T-2 toxina. Como ya se señaló, esta molécula requiere tener su anillo epóxido y sus sustituyentes intactos para que pueda inhibir eficientemente la síntesis de proteínas (5, 10).

b. β -Glucuronidasa.

El aumento de las enzimas hidrolíticas lisosomales es un rasgo característico de los macrófagos presentes en los sitios donde ocurre un proceso inflamatorio. Durante la resolución de la inflamación los macrófagos son responsables de remover a las células muertas y al exudado mediante fagocitosis y digestión enzimática (64).

Hay varias evidencias de que la aplicación de la T-2 toxina induce un proceso inflamatorio; Lee et al. (38) reportaron que la aplicación oral de T-2 toxina en el ratón produce citólisis del epitelio, edema y muerte celular en el estómago e intestino. Tres a seis horas después de la aplicación se observaron en los tejidos un infiltrado de neutrófilos y monocitos.

Por otro lado Yarom y Yagen (69) reportan que después de una aplicación de T-2 toxina (2 mg/kg) por vía intraperitoneal en ratas, se observa edema intersticial, hiper celularidad, hemorragia, edema y

necrosis en la microvasculatura. Los autores sugieren que la membrana plasmática de las células endoteliales es la primera estructura afectada, hecho que induce muchos de los daños descritos.

El aumento en los niveles de la enzima lisosomal β -glucuronidasa (Fig. 4) en macrófagos peritoneales de ratones tratados con T-2 toxina indica el estado de activación en que se encuentran estas células. Probablemente, este estado de activación es secundario al daño que produce la T-2 toxina sobre células epiteliales y endoteliales de los vasos sanguíneos presentes en la cavidad peritoneal. Este efecto no se observa en ratones que fueron inoculados con el disolvente (SSAF/etanol). Postulamos que el efecto de la activación de los macrófagos es secundario al daño que produce sobre otras células ya que cuando se incuba 'in vitro' una población rica en macrófagos peritoneales, la T-2 toxina no es capaz de inducir un aumento sobre la producción de esta enzima lisosomal (Fig. 3).

Sin embargo, no se puede descartar la posibilidad de que el metabolito producido 'in vivo', la HT-2 toxina, pueda ejercer algún efecto sobre la población macrofágica peritoneal. Para probar esta hipótesis es necesario realizar los mismos experimentos 'in vivo' e 'in vitro' empleando HT-2 toxina.

2. Generación del anión superóxido.

La fagocitosis de microorganismos y partículas por parte de los fagocitos mononucleares y neutrófilos esta generalmente acompañada por

una reacción respiratoria que resulta en la rápida utilización y reducción del oxígeno molecular para formar agua. En una serie de procesos bioquímicos se forman intermediarios poco estables como el anión superóxido (O_2^-) y el peróxido de hidrógeno. Estos compuestos reaccionan entre sí con radicales hidroxilo. Todos estos metabolitos están implicados en la actividad microbicida que poseen estas células (46).

La generación del O_2^- y de otros productos reactivos del oxígeno requieren de un estímulo externo que active a la enzima responsable: la NADPH oxidasa. Esta activación se puede lograr experimentalmente cuando las células fagocitan zymosan o cuando son estimuladas con forbol-miristato (33).

Se ha comparado la capacidad de generar O_2^- entre macrófagos peritoneales murinos sin estimular y macrófagos inflamatorios estimulados con LPS bacteriano, encontrando niveles de O_2^- dos a tres veces mayores en estos últimos (52).

El aumento en la generación y liberación del anión O_2^- durante la fagocitosis de zymosan que se observó (Fig. 6) en los macrófagos provenientes de ratones tratados indica un estímulo de estos. Al igual que la producción de enzimas lisosomales, el aumento en esta capacidad posiblemente sea secundario al daño de la T-2 toxina sobre otras células.

Cuando se incuban macrófagos 'in vitro' con T-2 toxina hay una disminución en esta capacidad secretora (Fig. 5). Esta reducción del metabolismo del oxígeno la encuentran también Yarom et al. (68).

Estos investigadores trabajaron con leucocitos polimorfonucleares humanos que fueron incubados con T-2 toxina y sometidos a pruebas de quimioluminiscencia encontrando una disminución en esta capacidad con respecto a las células control.

La capacidad secretora de estos metabolitos es una actividad que depende del correcto funcionamiento y de la estructura intacta de la membrana plasmática, así como de sus proteínas asociadas. Se ha postulado que la toxina pueda interactuar con la membrana plasmática de las células y provocar cambios en la disposición de fosfolípidos de membrana o bloquear receptores. Esta hipótesis de interacción entre la T-2 toxina y la membrana plasmática está apoyada por trabajos recientes (27, 55) que demuestran la actividad hemolítica de la T-2 toxina y alteración en la función de la NADPH oxidasa.

3. Fagocitosis.

La fagocitosis es una de las funciones de los macrófagos y requiere de moléculas de superficie como son los receptores para Fc, para C3 y para residuos de manosa, fucosa o N-acetilglucosamina (1).

El aumento que se observa en esta función (Fig. 7) por parte de macrófagos provenientes de ratones tratados con T-2 toxina correlaciona con el incremento de fagocitosis de zymosan que se observó en los experimentos de generación del anión superóxido.

Las células provenientes de ratones tratados con T-2 toxina fueron capaces de controlar la reproducción de las bacterias 'in vitro'.

4. Actividad tumoricida.

Los macrófagos, cuando han sido adecuadamente estimulados, son capaces de lisar células tumorales en un proceso que requiere de la unión de células neoplásicas a la membrana del macrófago y de la secreción de productos líticos. Esta interacción requiere de iones divalentes y de moléculas de superficie en la membrana. También se ha postulado la presencia de estructuras de reconocimiento en la membrana de la célula tumoral, aunque no se ha probado su participación (1).

El mecanismo de lesión más aceptado mediante el cual el macrófago mata a la célula tumoral es la producción y liberación de una proteasa de serina (32). Las características de esta enzima son: peso molecular de 40,000 daltons, es secretada por macrófagos y tiene una gran afinidad por proteínas presentes en las células tumorales.

Hay varios estadios de activación de macrófagos para que estos sean capaces de lisar células tumorales. La respuesta a linfocinas es un evento necesario que ocurre durante este proceso de activación. Este fenómeno de cooperación con linfocitos ha sido demostrado con experimentos en que se requiere de la presencia de sobrenadantes de cultivos de células de bazo para la activación de macrófagos y que estos sean capaces de unirse a células tumorales y lisarlas (20, 21).

En el modelo utilizado en este trabajo, el sitio de rechazo alógeno de las células tumorales es la cavidad peritoneal de los ratones C57B1/6J. Se ha descrito que durante el curso del rechazo del

plasmocitoma P815, el número de macrófagos peritoneales aumenta hasta 10 veces con respecto a los controles (39).

A pesar de que son los macrófagos, las principales células efectoras en este modelo, se requiere de eventos de cooperación con linfocitos T de ayuda ($\text{LyT } 1^{+}2^{-}$) para su eficiente función.

La reducción que se observa en esta función, en macrófagos provenientes de ratones tratados con T-2 toxina depende de la dosis (Tabla 3). Este efecto sobre los macrófagos puede ser secundario a la inhibición que produce la T-2 toxina sobre la respuesta T-dependiente como ya ha sido reportada (49). Los autores encontraron, también, una respuesta inhibitoria dosis dependiente.

Cuando los macrófagos son tratados 'in vitro' con T-2 toxina también muestran un decremento en su actividad citolítica. Esta actividad, como la generación de O_2^{-} , depende de la estructura intacta de la membrana y de sus proteínas asociadas, hecho que parece alterar la T-2 toxina como ya se discutió anteriormente.

B. Efecto de la T-2 toxina sobre la reacción de HSR.

La hipersensibilidad de tipo retardado es un fenómeno inmunológico dependiente de linfocitos T, manifestado por una reacción inflamatoria en el sitio de deposición del antígeno, usualmente la piel, y que alcanza su máxima intensidad de 24 a 48 horas después del reto. Estas características sirven para distinguir esta hipersensibilidad de la inmediata y de la reacción de Arthus que son dependientes de

anticuerpos y llegan a su máximo en cuestión de minutos o pocas horas (26).

El ratón, cuando ha sido inmunizado, exhibe una reacción de HTR que es específica para el antígeno si el lugar de aplicación es en el cojinete de la pata o en la oreja (40).

La sensibilización por contacto, usando compuestos como el DNFB o el TNCB es un modelo que ha permitido conocer muchos aspectos acerca de la regulación de la HTR y de los mecanismos responsables en esta respuesta.

En la sensibilización por contacto, el antígeno se une covalentemente a proteínas de la piel que funcionan como acarreadores. Estas proteínas son procesadas por células presentadoras de antígeno (CPA), siendo la célula de Langerhans el candidato más viable para realizar esta función. Esta es una célula dendrítica Ia^+ , particularmente abundante en la epidermis y que se encuentra en el sitio de aplicación del antígeno cuando se induce una respuesta de sensibilidad por contacto (6). La presentación del antígeno a linfocitos T requiere de la participación de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad, clase II (Antígeno Ia) (6).

Las células $LyT\ 1^{+}2^{-}$ son las responsables de mediar la reacción de HTR. Regulan la liberación de serotonina por parte de células cebadas, lo que causa la dilatación de los vasos sanguíneos permitiendo el paso de leucocitos circulantes a los espacios extravasculares. La activación de linfocitos T resulta en la producción de factores solubles inespecíficos y específicos para el antígeno, así como linfocinas

(25,26).

La reacción inflamatoria que se produce después del reto llega a un máximo 24 a 48 horas después de este. El exámen histológico muestra infiltración de la dermis con células mononucleares y polimorfonucleares. En algunos casos hay edema, desprendimiento de las células de la epidermis y necrosis (17).

En la Figura 8 se observa inhibición en la reacción de MTR en ratones tratados con T-2 toxina independientemente de la dosis. La inhibición de esta respuesta está acompañada por una reducción en el peso del timo; la reducción en el peso de este órgano linfoide ya había sido reportada (49) y se utiliza como control interno que es fácil de seguir durante el estudio de los efectos de la T-2 toxina sobre la respuesta inmune.

Los daños que produce la T-2 toxina sobre los linfocitos T y la supresión que induce en las respuestas T-dependientes ya descritos (49, 51) son corroborados con los resultados de esta investigación. Otro trabajo hecho en este laboratorio demostró que la T-2 toxina es capaz de inhibir 'in vitro' la producción de Interleucina-2 (IL-2) por parte de células mononucleares humanas provenientes de sangre periférica humana que se mantienen en cultivo. Esta falta de producción de IL-2 se refleja 'in vivo' como un deficiente reclutamiento celular para llevar a cabo la reacción de hipersensibilidad tipo retardado así como del rechazo del aloinjerto de piel (49).

C. Efecto de la T-2 toxina sobre la reparación del tejido.

La reparación del tejido dañado después de un proceso inflamatorio involucra la remoción de células muertas y del exudado por digestión enzimática y fagocitosis. Estos eventos son seguidos por el reemplazo del tejido dañado o muerto por parte de células derivadas del parénquima o por elementos del tejido conectivo.

Cuando proliferan elementos del parénquima, el proceso se llama regeneración y resulta en la restauración completa del tejido original. Pero cuando la principal contribución es hecha por células no especializadas del tejido conectivo, ocurre fibrosis y cicatrización y el proceso se llama reparación (64).

Una vez que los macrófagos han fagocitado las células muertas, hay multiplicación de los vasos sanguíneos y aparecen fibroblastos en el área lesionada. Estos son células bipolares con abundante citoplasma, núcleo alargado y extremos terminados en punta que se disponen en dirección perpendicular a las asas capilares recién formadas (9). La matriz gelatinosa amorfa, que al inicio, sostenía a los elementos proliferantes desaparece conforme las primeras fibrillas de colágena son producidas por los fibroblastos (64).

Este proceso de formación de tejido fibroso se observa en las orejas de los animales controles a los cuales se les aplicó DNFB (Foto 2).

Este patrón en la reacción fibrosa se ve dramáticamente alterado en las orejas de los ratones a los cuales se les aplicó DNFB y se

trataron con T-2 toxina. Para comprender los fenómenos que ocurren en este caso es necesario estudiar la reacción fibrosa durante todo su desarrollo, es decir, desde la reacción inflamatoria que se produce al aplicar el DNFB.

Las observaciones reportadas en este trabajo merecen seguir siendo investigadas, lo que constituiría un modelo muy interesante en patología experimental para el estudio de la reacción fibrosa.

V I . C O N C L U S I O N E S

1. La T-2 toxina, a las dosis empleadas en este trabajo, no inhibe la síntesis de proteínas en macrófagos peritoneales murinos en tratamientos 'in vitro' ni 'in vivo'.

2. La T-2 toxina inhibe las funciones que dependen de la estructura de la membrana plasmática en macrófagos peritoneales murinos.

3. El estímulo de macrófagos peritoneales de ratones tratados con T-2 toxina parece ser un efecto secundario, más que la activación directa de estas células.

4. La T-2 toxina inhibe la respuesta inmune en que se requiere la cooperación de linfocitos T con otras células del sistema inmune.

5. La T-2 toxina, por su efecto inhibitorio sobre la reacción de hipersensibilidad de tipo retardado, puede ser empleada en modelos de investigación que tengan como objetivo el estudio de la regulación de esta reacción inmunológica.

6. Se puede emplear, como ya se estableció, en modelos de patología experimental en el estudio de la reacción fibrosa y reparación del tejido.

Independientemente de las conclusiones obtenidas por el trabajo experimental, es importante hacer énfasis acerca de los conocimientos y perspectivas que se tienen en México sobre las micotoxinas.

El Dr. Ernesto Moreno Martínez (44) establece esta situación en el siguiente texto: "En México se ha realizado poca investigación sobre las micotoxinas, sin embargo, frecuentemente se han observado brotes de micotoxicosis que afectan la producción animal. Es necesario determinar qué micotoxinas prevalecen en nuestros granos para definir la magnitud de este problema en nuestro país. Es necesario, asimismo, contar con un eficiente sistema de inspección que certifique la calidad sanitaria de los granos de importación con respecto a la presencia de las micotoxinas, como sucede con nuestros productos de exportación.

En esta área se requiere investigación básica, aplicada y tecnológica enfocada a resolver los problemas prioritarios relacionados con la producción pecuaria y con la salud pública."

V I I . B I B L I O G R A F I A

1. Adams, D.O. & Hamilton, T.A. (1984). The cell biology of macrophage activation. En: Annual Review of Immunology. (W. Paul, ed.) Vol. 2, Annual Rev. Inc., California. 283-318.
2. Bamburg, J.R. & Strong, F.M. (1971). 12,13-Epoxytrichothecene. En: Microbial Toxins. (S. Kadis, A. Ciegler & S.J. Ajl, eds.) Vol. 7, Academic Press, N.Y. 207-292.
3. Bamburg, J.R. (1983). Biological and biochemical actions of trichothecene mycotoxins. En: Progress in Molecular and Subcellular Biology. (F.H. Hahn, ed.) Vol. 8, Springer-Verlag, Berlin. 41-110.
4. Cannon, M., Smith, K.F. & Carter, C.J. (1976). Prevention by ribosome bound nascent polyphenylalanine chains, of the functional interaction of T-2 toxin with its receptor site. J. Biochem. 156, 289-294.
5. Carter, C.J. & Cannon, M. (1977). Structural requirements for the inhibitory action of 12,13 epoxytrichothecenes on protein synthesis in eukariotes. J. Biochem. 166, 399-409.
6. Claman, H.N., Miller, S.D., Conlon, P.J. & Moorehead, J.W. (1980). Control of experimental contact sensitivity. En: Advances in Immunology. (F.J. Dixon & H.G. Kunkel, eds.) Vol. 30, Academic Press, N.Y. 121-158.
7. Cohn, Z.A. (1968). The structure and functions of monocytes and macrophages. En: Advances in Immunology. (F.J. Dixon & H.G. Kunkel, eds.) Vol. 9, Academic Press, N.Y. 164-214.
8. Cooke, W.B. & Brazis, A.R. (1968). Occurrence of molds and yeasts in diary products. Mycopathol. Mycol. Appl. 35, 281-289.
9. Correa, P., Arias-Stella, J., Pérez Tamayo, R. & Carbonell, L.M. (1980). Texto de Patología. 2da. ed. Prensa Médica Mexicana, México. 814-871.
10. Cundliffe, E., Cannon, M. & Davies, J. (1974). Mechanism of inhibition of eukariotic protein synthesis by trichothecene fungal toxins. Proc. Nat. Acad. Sci. 71, 30-34.
11. Chi, M.S., El-Halawani, M.E., Waibel, P.E. & Mirocha, C.J. (1981). Effects of T-2 toxin on brain catecholamines and selected blood components in growing chickens. Poultry Sci. 80, 137-141.
12. Christensen, C.M., & Kaufmann, H.H. (1976). Las micotoxinas y la calidad del grano. En: Contaminación por hongos en granos almacenados. (E. Moreno, trad.) Ed. Pax, México, 109-131.

13. Chu, F.S., Grossman, S., Ru-Dong, W., & Mirocha, C.J. (1979). Production of antibody against T-2 toxin. *Appl. Environment. Microbiol.* 37, 104-108.
14. Chung, C.W., Truckess, M.W., Giles, A. & Friedmann, L. (1974). Rabbit skin test for estimation of T-2 toxin and other skin-irritating toxins in contaminated corn. *J. A.O.A.C.* 57, 1121-1127.
15. Dallyn, H. & Everton J.R. (1969). The xerophilic mould. *J. Food Technol.* 4, 399.
16. Decker, L.A., ed. (1977). *Worthington enzymes manual*. Worthington biochemical corporation, N.J. 19, 199.
17. Dietrich, F.M. & Hess, R. (1970). Hypersensitivity in mice: induction of contact sensitivity and inhibition by various chemical compounds. *Int. Arch. Aller. & Appl. Immunol.* 38, 546-559.
18. Doerr, J.A., Hamilton, P.B., & Burmeister, H.R. (1981). T-2 toxicosis and blood coagulation in young chickens. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 60, 157-162.
19. Drath, D.B. & Karnovsky, M.L. (1975). Superoxide anion production by phagocytic leukocytes. *J. Exp. Med.* 141, 257-262.
20. Evans, R. & Alexander, P. (1972). Mechanism of immunologically specific killing of tumour cells by macrophages. *Nature.* 236, 168-170.
21. Evans, R. & Alexander, P. (1970). Cooperation of immune lymphoid cells with macrophages in tumour immunity. *Nature.* 228, 620-622.
22. Fathman, G.C. (1979). Preparation of mouse antisera against histocompatibility antigens. *En: Immunological Methods*. (I. Lefkovits B. Pernis, eds.) Academic Press, N.Y. 207.
23. Frayssinet, C., Lafarge, C., de Recondo, A.M. & Le Breton, E. (1964). Inhibition de l'hypertrophie compensatrice du foie chez le rat par les toxines d' Aspergillus flavus. *C.R. Acad. Sci.* 259, 2143-2146.
24. Furth, R.V., Zwet, T.L. & Leijh, P.C. (1978). 'In vitro' determination of phagocytosis and intracellular killing by polymorphonuclear and mononuclear phagocytes. *En: Handbook of Experimental Immunology*. (D.M. Wier, ed.) 3rd. ed. Blackwell Sci. Publ. London. 32.1.
25. Gershon, R. Askenase, P. & Gershon, H. (1975). Requirements for vasoactive amines for production of DTH skin reactions. *J. Exp. Med.* 142, 732-747.

26. Greene, M., Schatten, S. & Bromberg, J. (1984). Delayed type hypersensitivity. En: Fundamental Immunology. (W. Paul, ed.) Raven Pres, N.Y. 685-696.
27. Gyongosy, I.M. & Khachatourians, G.G. (1986). T-2 toxin:membrane interaction at the single cell level. Abstract 5.43.9. Sixth Int. Congress of Immunology, Toronto.
28. Ham, A.W., Cormack, D.H. (1983). Histología. 8va. ed. Ed. Interamericana, México, 343.
29. Hsu, I., Smalley, E.B., Strong, F.M. & Ribelin, W.E. (1972). Identification of T-2 toxin in mouldy corn associated with a lethal toxicoses in dairy cattles. Appl. Microbiol. 24, 684-690.
30. Hudson, L. & Hay, F.C. (1980). The lymphocyte: its role and function. En: Practical Immunology. 2nd ed. Blackwell Sci. Publ., London, 24-50.
31. Joffe, A.Z. (1974). Toxicity of Fusarium poae and Fusarium sporotrichoides and its relation to alimentary toxic aleukia. En: Mycotoxins. (F.H. Purchase, ed.) Elsevier Sci. Pub. Co., N.Y. 229-261.
32. Johnson, W.J., Sommers, S.D., Adams, D.O. (1983). Activation of macrophages for tumor cytotoxicity. En: Contemporary Topics in Immunobiology. (J. Marchalonis, ed.) Vol. 14, Plenum Press, N.Y. 127-146.
33. Johnston, R.B., Godzik, C.A. & Cohn, Z.A. (1978). Increased superoxide anion production by immunologically activated and chemically elicited macrophages. J. Exp. Med. 148, 115-127.
34. Joseph, M., Simon-Lavoine, N. & Capron, A. (1981). The stimulation of rat and mouse peritoneal macrophages by cyclomonine after 'in vivo' and 'in vitro' administration. J. Immunopharmacol. 3, 67-76.
35. Lafarge-Frayssinet, C., Lespinats, G., Lafont, P. Loisillier, F., Mousset, S., Rosenstein, Y. & Frayssinet, C. (1979). Immunosuppressive effects of Fusarium extracts & trichothecenes: blastogenic response of murine splenic and thymic cells to mitogens. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 160, 302-311.
36. Lafarge-Frayssinet, C., Chakor, K., Lafont, P. & Frayssinet, C. (1980). Transplacental transfer of T-2 toxin. En: IUPAC Symp. of Mycotoxins and Phycotoxins. (P. Krough & G.K. Scherr, eds.) Park Forest South, Pathotox Publishers.
37. Lee, S. & Chu, F.S. (1981). Radioimmunoassay of T-2 toxin in corn and wheat. J. Assoc. Anal. Chem. 64, 156-161.

38. Lee, S.C., Berry, J.T. & Chu, F.S. (1984). Immunoperoxidase localization of T-2 toxin. *Toxico. Appl. Pharmacol.* 72, 228-235.
39. Lohmann-Matthes, M.I., Ziegler, F.G. & Ritter, J. (1974). 'In vitro' macrophage-mediated cytotoxicity in an allogenic mouse system. *En: Activation of Macrophages.* (W. Wagner & H. Hahn, eds.) Vol. 2, American Elsevier Publ. Co., N.Y., 293-299.
40. Loveren, H.V., Meade, R. & Askenase, P.W. (1983). An early component of DTH mediated by T cells and mast cells. *J. Exp. Med.* 157, 1604-1617.
41. Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L. & Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
42. Massey, V. (1959). The microestimation of succinate and the extinction coefficient of cytochrome c. *Biochem. Biophys. Acta.* 34, 255-256.
43. Moreau, C. (1979). Mycotoxicosis and Mycotoxins. *En: Moulds, Toxins & Food.* (M. Moss, ed.) 2nd. ed. John Wiley & Sons, 27, 217.
44. Moreno, M.E. (1984). Los problemas de la conservación de granos y semillas en México. *Ciencia y Desarrollo.* 58, 9-17.
45. Newberne, P.M. (1965). Carcinogenicity of aflatoxin contaminated peanuts meals. *En: Mycotoxins in foodstuffs*, 187-208.
46. Nogueira, N. (1984). Intracellular mechanism of killing. *En: Contemporary Topics in Immunobiology.* (J. Marchalonis, ed.) Vol. 12, Plenum Press, N.Y., 53.
47. Ohta, M. Ishii, K. & Ueno, Y. (1977). Metabolism of trichothecene mycotoxins: microsomal deacetylation of T-2 toxin in animal tissues. *J. Biochem.* 82, 1591-1598.
48. Pace, J.C. & Murphy, P.E. (1982). 'In vitro' and 'in vivo' effects of T-2 toxin on mitochondrial respiration. *Fed. Proc.* 41, 525.
49. Rosenstein, Y., Lafarge-Frayssinet, C., Lespinats, G., Loisillier, F., Lafont, P. & Frayssinet, C. (1979). Immunosuppressive activity of *Fusarium* toxins. Effects on antibody synthesis and skin grafts of crude extracts, T-2 toxin and diacetoxyscirpenol. *Immunol.* 36, 111-117.
50. Rosenstein, Y., Kretschmer, R.R. & Lafarge-Frayssinet, C. (1981). Effect of *Fusarium* toxins, T-2 toxin and diacetoxyscirpenol on murine T-independent immune response. *Immunol.* 44, 555-560.

51. Rosenstein, Y. & Lafarge-Frayssinet, C. (1983). Inhibitory effect of Fusarium T-2 toxin on lymphoid DNA and protein synthesis. Toxicol. Appl. Pharmacol. 70, 283-288.
52. Sasada, M., Pabst, M.J. & Johnston, R.B. (1983). Activation of mouse peritoneal macrophages by LPS alters kinetics parameters of the superoxide producing NADPH oxidase. J. Biol. Chem. 258, 9631-9635.
53. Sato, N., Ueno, Y. & Enomoto, M. (1975). Acute and subacute toxicities of T-2 toxin in cats. Jap. J. Pharmacol. 25, 263-270.
54. Schoental, R., Joffe, A.Z. & Yagen, B. (1979). Cardiovascular lesions and various tumors found in rats given T-2 toxin, a trichothecene metabolite of Fusarium. Cancer Res. 39, 2179-2189.
55. Segal, R., Goldzweig, I.M., Joffe, A.Z. & Yagen, B. (1983). The hemolytic activity of T-2 toxin. Toxicol. Appl. Pharmacol. 70, 343-349.
56. Smalley, E.B. & Strong, F.M. (1974). Toxic trichothecenes. En: Mycotoxins. (I.F. Purchase, ed.) Elsevier Sci. Pub. Co., N.Y., 199-228.
57. Stanford, G.K., Hood, R.D. & Hayes, A.W. (1975). Effect of prenatal administration of T-2 toxin to mice. Res. Chem. Path. Pharmacol. 10, 743-746.
58. Stuart, A.F., Habershaw, J.A. & Davison, E.A. (1978). Phagocytes 'in vitro'. En: Handbook of Experimental Immunology. (D.M. Weir, ed.) 3rd ed. Blackwell Sci. Publ., London. 33.1.
59. Ueno, Y., Nakajima, M., Sakai, K., Ishii, K., Sato, N. & Shimada, N. (1973). Comparative toxicology of trichothecene mycotoxins: Inhibition of protein synthesis in animal cells. J. Biochem. 74, 285-296.
60. Ueno, Y., Sato, N., Ishii, K., Sakai, K., Tsunoda, H. & Enomoto, M. (1973). Biological and chemical detection of trichothecene mycotoxins of Fusarium species. Appl. Microbiol. 25, 699-704.
61. Ueno, Y. (1977). Mode of action of trichothecenes. Pure Appl. Chem. 49, 1737-1745.
62. Ueno, Y. (1980). Toxicological evaluation of trichothecene mycotoxins. En: Natural Toxins. (D. Baker & T. Wadstrom, eds.) Pergamon Press, N.Y., 663-671.

63. Vesonder, R.F., Ellis, J.J. & Burmeister, H.R. (1981). Production of vomitoxin and zearalenone by Fusarium; microbial activity of T-2 toxin, diacetoxyscirpenol and vomitoxin: toxokinetics of T-2 toxins in swine and cattle. Phytopath. 71, 910-925.
64. Wilhelm, D.L. (1977). Inflammation and healing. En: Pathology. (W.A. Anderson & J. Kissane, eds.) 7th ed. Vol. 1, Mosby Co., St. Louis, 85-89.
65. Wood, E.M. & Larson, C.P. (1961). Hepatic carcinoma in rainbow trout. Arch. Path. 71, 471.
66. Wyatt, R., Doerr, J.A., Hamilton, P.B. & Burmeister, H.R. (1975). Egg production, shell thickness and other physiological parameters of laying hens affected by T-2 toxin. Appl. Microbiol. 29, 641-645.
67. Yarom, R., More, R., Elder, A. & Yagen, B. (1984). The effect of T-2 toxin on human platelets. Toxicol. Appl. Pharmacol. 73, 210-217.
68. Yarom, R., Sherman, Y., More, R., Ginsburg, I., Borinsky, R. & Yagen, B. (1984). T-2 toxin effect on bacterial infection and leukocyte functions. Toxicol. Appl. Pharmacol. 75, 60-68.
69. Yarom, R. & Yagen, B. (1986). T-2 toxin effect on the ultrastructure of myocardial microvasculature. Br. J. Exp. Path. 67, 55-63.

A N E X O

I. Toxina y reactivos usados para las determinaciones bioquímicas

	Marca	No. cat.
T-2 toxina	Sigma	T-4887
5-cloro-2-toluendiazonio	Sigma	F-1500
Citocromo c (Tipo VI)	Sigma	C-7752
Reactivos para la determinación de LDH	Merck	15862
α -naftil acetato	Sigma	N-8505
p-nitrofenil- β -D-glucurónido	Sigma	N-1627
Superóxido dismutasa	Sigma	S-8254
Zymosan A	Sigma	Z-4250

II. Medios de cultivo.

Para células:

RPMI 1640	GIBCO	430-1800
Suero fetal bovino	Flow	29-101-54
Sol. Penicilina/Estreptomina	GIBCO	600-5145
L-Glutamina	GIBCO	320-5030
Bicarbonato de sodio	GIBCO	895-1810
Aminoácidos no esenciales	GIBCO	320-1140

Para bacterias:

Brain & Heart Infusion (BHI)	DIFCO	0498
Agar Nutritivo	Bioxón	104-1

III. Aparatos y Equipo.

	Marca	Modelo
Campana de flujo laminar	Baker	R-315
Centrifuga refrigerada	Beckman	TJ-6
Contador beta	Packard	Tri Carb 300
Contador gamma	Abbot Lab.	Autologic
Espectrofotómetro	Bausch & Lomb	Spectronic
Incubadora	National	
Micrómetro	Mitutoyo	No. 7300
Microscopio de luz	American Optical	2071
Potenciómetro	Beckman	3500