

84
zej



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA

**SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS Th1/Th2
DURANTE EL TRANCURSO DE LA TUBERCULOSIS
PULMONAR EXPERIMENTAL EN UN
MODELO MURINO**



EXAMEN DE TESIS DIGNALES
FACULTAD DE QUIMICA

**T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A
L E N I N P A V O N R O M E R O**



MEXICO, D.F.

1995

FALLA DE ORIGEN

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

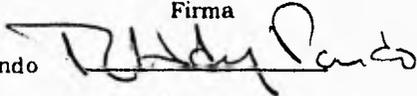
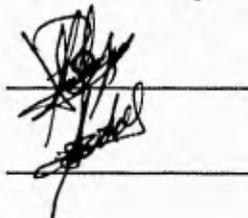
Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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.

Jurado asignado

Presidente	Profesora. Elda Beatriz Peniche Quintana.
Vocal	Profesor. Saturnino de Leon Chapa.
Secretario	Profesor. Rogelio Hernández Pando.
1er. Suplente	Profesora. Rosana Pelayo Camacho
2do. Suplente	Profesor. Jorge Fernando Paniagua Solis.

Sitio donde se desarrolló el tema: Departamento de Patología del Instituto Nacional de la Nutrición " Salvador Zubirán "

		Firma
Asesor del tema	Dr. Rogelio Hernández Pando	
Supervisor técnico	M. en C. Jorge Fernando Paniagua Solis	
Sustentante	Lenin Pavón Romero	

*A ti, que sin mencionar tu nombre
estas presente en mi pensamiento.*

A mi padre:

Por su ejemplo y enseñanza.

A mi madre:

Por su atención, cariño y apoyo.

**A mis padres: por brindarme una educación
profesional y formarme como hombre.**

A mis hermanos:

Y,GF,AZ.

A mis Abuelos :

Por su apoyo en los
momentos difíciles.

A mis tíos :
por sus consejos.

**A todas aquellas, personas e instituciones que
hicieron posible la realización de esta tesis.**

A mi amigo :
por su comprensión.

A GUADALUPE.

ÍNDICE

	PAGINA
INTRODUCCIÓN6
I.- GENERALIDADES9
1.1 Aspectos históricos9
1.2 Características del bacilo tuberculoso	...13
1.3 Mecanismos de la enfermedad	...18
1.4 El bacilo tuberculoso y el sistema inmunológico	...21
II.- SECCIÓN EXPERIMENTAL	...36
2.1 Materiales.	...36
2.2 Métodos	...40
2.3 Resultados experimentales	47
2.4 Discusión	...57
III.- CONCLUSIONES	...66
IV.- APÉNDICE	...68
V.- BIBLIOGRAFÍA	...70

INTRODUCCIÓN

Se ha demostrado que durante el transcurso de las enfermedades infecciosas crónicas, existe la interacción de las subpoblaciones linfocitarias Th1/Th2 que pueden encausar la respuesta inmunológica hacia la protección mediada por una respuesta celular competente en contra del agente causal, ó hacia un patrón de no respuesta hacia el agente infeccioso, lo cual permite que la enfermedad se agrave o se haga crónica.

Los resultados que se presentan en este trabajo de tesis, demuestran la presencia de dichas subpoblaciones linfocitarias en los compartimentos histológicos del pulmón durante el transcurso de la tuberculosis pulmonar en un modelo experimental murino, determinando la cinética de aparición de dichas subpoblaciones, correlacionándolas con el daño patológico en el tejido pulmonar.

Los resultados se obtuvieron aplicando técnicas inmunohistoquímicas y de biología molecular, obteniendo resultados similares por distintos métodos que les proporcionan una gran solidez , en los cuales se observa la participación e influencia de las subpoblaciones linfocitarias durante el transcurso de la tuberculosis pulmonar.

En el experimento se utilizaron ratones singénicos de la cepa BALB/c de 6 a 8 semanas de edad, dada la susceptibilidad que presentan éstos a la cepa de *M. tuberculosis* H37Rv.

La cepa de tuberculosis antes mencionada se utilizó para inducir la enfermedad en los ratones BALB/c inoculándola por vía intratraqueal en una campana de bioseguridad por medio de procedimientos quirúrgicos.

Los animales inoculados se mantuvieron en microaisladores y se sacrificaron en periodos de 1, 3, 7, 14, 21, 28, 60, 120 días posteriores a la inoculación, de los animales sacrificados se obtuvieron los pulmones y sangre y se llevaron a cabo determinaciones de hipersensibilidad retardada en su cojinete plantar.

Con los pulmones de los ratones sacrificados se obtuvieron cortes histológicos, en los cuales se efectuaron tinciones con H/E, y de los cuales se obtuvieron los resultados del análisis planomorfométrico que permitieron establecer claras comparaciones y relaciones entre la respuesta inmunológica y las lesiones observadas durante la enfermedad.

En los cortes de los pulmones mencionados anteriormente, se efectuó la detección de las células productoras de IFN- γ , IL-2, IL-4 por medio de la aplicación de la técnica de inmunohistoquímica.

De los cortes, se obtuvo por medio de la cuenta de las células presentes en las lesiones histológicas, el porcentaje de las células productoras de las citocinas antes mencionadas. Y por medio de los resultados se estableció una relación entre las citocinas producidas, con el tipo de respuesta correspondiente al tiempo de análisis.

Además, por medio de la técnica de RT-PCR (Reacción en cadena de la polimerasa dependiente de la transcriptasa reversa) se efectuó la detección de las secuencias para la expresión de la IL-12, IL-4 e IFN- γ , con lo que pudo

establecerse una correlación entre la intensidad del mensaje de cada citocina y el tipo de respuesta que se presenta a los diferentes tiempos en los que se determinaron

Se evidenció la influencia moduladora en las subpoblaciones linfocitarias, sobre la producción de las subclases de inmunoglobulinas durante la evolución de la tuberculosis, con la determinación de las inmunoglobulinas IgG1 e IgG2a con la técnica de ELISA.

En cuanto a los resultados obtenidos de las pruebas de hipersensibilidad retardada, se establece una correlación entre el tipo de respuesta observado en los cojinetes plantares de los ratones y la respuesta observada en los pulmones, observando los daños histológicos que esta respuesta causa en el particular caso de la tuberculosis pulmonar.

En base a los resultados aquí mostrados se concluye, que durante la respuesta inmunológica montada en contra de *M. tuberculosis* H37Rv, existe al inicio de la enfermedad un predominio de la subpoblación linfocitaria Th1 el cual, está asociado a una respuesta protectora en contra del agente causal de la enfermedad y que siguiendo el curso de la evolución de la enfermedad, se observa que la subpoblación linfocitaria Th2 aumenta drásticamente con lo que el efecto protector disminuye y un patrón de no respuesta protectora predomina; sin embargo, el patrón no es totalmente Th2 ya que la subpoblación Th1 no desaparece totalmente y la respuesta puede definirse como Th0 hacia el corte del experimento.

I. GENERALIDADES

1.1 Aspectos históricos

La tuberculosis es una enfermedad infecto-contagiosa, que presenta un alto índice de casos nuevos al año en el mundo; sin embargo, esta enfermedad es tan antigua como la misma humanidad, compañera inseparable del hombre desde que éste apareció en la tierra.

La tuberculosis es una enfermedad tan antigua, que ha sido encontrada en vértebras de hombres del neolítico y en huesos de animales prehistóricos.⁴⁸

En los albores del siglo XXI, la tuberculosis fue declarada emergencia mundial por la O.M.S.^{39, 48}, su asociación con el SIDA es preocupante, mientras la pobreza aumenta en todo el mundo y con ella las enfermedades infecciosas, el deseo de toda la humanidad es que la tuberculosis pase ya a formar parte de la historia, y deje de estar presente como uno de los grandes fracasos de la medicina preventiva.

La tuberculosis, se caracteriza por un largo período de incubación, infección latente y de curso crónico.^{1, 26} Se ha estimado que 60 millones de personas padecen tuberculosis, y cada año aparecen aproximadamente 10 millones de casos nuevos. Anualmente más de 3 millones de personas mueren de esta enfermedad, al mismo tiempo se ha estimado que 1/3 o 1/2 del total de la población mundial (aproximadamente 2 billones de personas) están

infectadas con *M. tuberculosis*.^{36, 76} Muchos de éstos infectados albergan microorganismos latentes en pequeños granulomas.

La tuberculosis es una de las enfermedades más ampliamente difundidas. Fracastorius, en la primera mitad del siglo XVI, sospechó su naturaleza infecciosa, y en 1865 Villemin demostró que la enfermedad podía transmitirse inoculando material tuberculoso. En 1882 Koch descubrió el bacilo de la TUBERCULOSIS mediante métodos de tinción especiales, lo aisló y desarrollo en cultivo puro, y reprodujo la enfermedad inoculando el bacilo en animales de experimentación. El descubrimiento de Koch, de que la tuberculosis era causada por un agente infeccioso, revolucionó las ideas existentes sobre la enfermedad. Los postulados de Koch se desarrollaron con el modelo de la tuberculosis en mente y se convirtieron en punto focal de los avances de la microbiología y la medicina.

A pesar de que en el año de 1943 se descubrió la estreptomycinina y a partir de la utilización de este fármaco, la quimioterapia se convirtió en una forma común de tratamiento, la aparición de cepas resistentes a los fármacos utilizados, renueva a la tuberculosis como un problema que debemos afrontar.

La tuberculosis se presenta en forma crónica, su agente causal es *M. tuberculosis*, el cual inicialmente afecta a los pulmones pero puede lesionar cualquier órgano o tejido corporal.

El proceso de daño tisular en la tuberculosis, es más el resultado de la respuesta inmunológica del individuo hacia el estímulo inflamatorio

provocado por el bacilo tuberculoso, que el daño causado por el bacilo tuberculoso a su hospedero.^{1,33}

La transmisión se lleva a cabo cuando una persona inhala uno o más bacilos contenidos en una gotita de flúge, que es el material infectante que un tuberculoso bacilífero nebuliza a su alrededor al toser, hablar, reír, gritar, cantar o estornudar. Aunque cualesquiera aceleración de flujo aéreo proveniente de los pulmones puede nebulizar partículas finas, sin duda, que la más capaz de generar aerosoles potencialmente infectantes es la tos.²⁶

En contacto con el aire las gotitas de flúge se evaporan, dejando unos núcleos de 1 a 5 μm ., que se dispersan fácilmente con cualquier corriente de aire, pudiendo mantenerse suspendidos en el ambiente y recircular por largo tiempo. Aunque cada una de estas partículas, por su tamaño, sólo pueden contener pocas micobacterias, hay que tener presente que en los contagios masivos intrafamiliares, son muchas las gotitas infectantes que pueden ser inhaladas, simultánea o sucesivamente.

Pese a los efectos nocivos que ha tenido la enfermedad en la humanidad, ha permitido a los inmunólogos utilizar a la tuberculosis como un modelo para dilucidar procesos importantes de la respuesta inmunológica más claramente, y poder establecer todas las interacciones que se presentan por la presencia de un antígeno con las características del bacilo tuberculoso.

Teniendo a la micobacteria como parte central, se ha podido revolucionar los conceptos de la Inmunología en general. El mismo Koch mostró que la exposición a los antígenos de la micobacteria desarrollan en la piel hipersensibilidad a los antígenos del microorganismo, y observó que ese

era el punto de inicio para el desarrollo de la reacción alérgica observada. Claramente la hipersensibilidad retardada y la reacción alérgica mediada por IgE se definieron en relación con el bacilo tuberculoso. En la década de los 40's Merrill Chase mostró de forma concluyente que la reacción de hipersensibilidad a la tuberculina podía ser transferida de un animal con prueba dérmica positiva a la tuberculina, hacia un animal negativo a dicha prueba, no por el suero, sino por la transferencia de células, estableciendo las bases de la inmunología celular.⁸

En la década de los 60's, Barry Bloom usando antígenos del bacilo tuberculoso, desarrolló un método por medio del cual se pudo examinar un mediador soluble, denominado factor inhibidor de la migración, la primera de varias citocinas descritas que están involucradas en la respuesta inmunológica.⁹

Con los avances obtenidos en el campo de la inmunología, debido a la gran cantidad de estudios llevados a cabo en años anteriores, se ha logrado comprender gran cantidad de interacciones celulares *in vitro*.¹⁰, sin embargo ha surgido una nueva era en el estudio de la inmunología, en donde deberán de comprenderse con claridad absoluta el gran número de interacciones celulares *in situ*, las cuales son más complejas y con una gran cantidad de moduladores que los observados *in vitro*, y esto se logrará utilizando los desarrollos científicos y tecnológicos que se han empleado.^{11, 40}

Actualmente, es necesario continuar con la investigación en tuberculosis, no sólo por que en nuestro país es un problema de salud pública importante, sino también, porque todavía no se dilucidan

completamente los mecanismos por medio de los cuales, el microorganismo interacciona con el sistema inmunológico para causar una enfermedad en la cual, el sistema inmunológico no puede actuar de forma competente y el mayor daño observado está causado por la acción del sistema inmunológico y no por el bacilo tuberculoso *per se*.

1.2 Características del bacilo tuberculoso.

Taxonomía

El género *Mycobacterium*, pertenecen al orden de los Actinomycetales, dentro de la familia *Mycobacteriaceae*.

Características microscópicas.¹⁴

Los bacilos de la tuberculosis son bastones delgados, algunas veces ligeramente curvos, de 0.2 a 0.8 μm . de diámetro, y 2 a 7 μm . de largo. Se presentan aislados, pero a veces se observan en grupos pequeños, en ocasiones como masas compactas donde no pueden distinguirse los bacilos individuales. Los bacilos de la variedad humana tienden a ser algo más largos y delgados que los del tipo bovino, pero la morfología de ambos es variable, y ese carácter no sirve para diferenciarlos. En los tejidos suele conservarse la forma bacilar; en cultivos, algunas veces se observan formas filamentosas más largas con células hinchadas, o en forma de maza que semejan al bacilo diftérico.

El bacilo tuberculoso no es móvil, ni formador de esporas. Es notable la estructura granulosa de las células individuales. A menudo se observan vacuolas en abundancia; incluso puede dar a las células teñidas el aspecto de

una cadena de cocos. El significado de los cuerpos pequeños, que se tiñen intensamente, observados ocasionalmente en las células, se ha interpretado en varias formas, pero se cree que sean gránulos de polifosfato; también se observan vacuolas lipídicas, que se tiñen con colorantes lipofílicos.

Composición química ^{29, 60}

Haciendo referencia al peso seco de la bacteria, sabemos que aproximadamente el 40% del peso total está dado por el citoplasma y membrana, mientras que el 60% restante está dado por la pared celular, constituida por lípidos entre los que destacan:

- Ceras D. (Arabinosa, galactosa, glucosamina, ácido murámico, ácido micólico y aminoácidos; funciona como coadyuvante en la respuesta inmunológica e inducción del interferón)
- Micósidos (Glucolípidos)
- Triglicérido (Esteres de ácidos grasos y glicerol)
- Sulfolípidos
- Lipoproteínas

Consecuencias de su composición química

Su composición química tan peculiar, determina que las micobacterias muestren algunas diferencias notables en relación a la mayoría de las bacterias como:

- Lento desarrollo
- Son altamente hidrófobos
- Resisten la desecación
- Resisten la acción de oxidantes ácidos y álcalis diluidos.
- No pueden teñirse fácilmente mediante métodos usuales eficaces con otras bacterias.
- Resisten la decoloración con alcohol-ácido
- Los medios en los que se cultiva contienen componentes poco comunes

Propiedades de crecimiento ⁵⁶

Medios de cultivo

Los medios más adecuados para el desarrollo de las micobacterias son: Löwestein Jensen que contiene verde de malaquita y cuya presentación es en "pico de flauta", el ATS, el Cohen Middlebrook 7H10 y 7H11, que se emplean en placa, principalmente para realizar pruebas de sensibilidad a los diversos fármacos antituberculosos, el Petraghani y el Petroff.

Los componentes, en los que la mayoría de los medios anteriores coinciden son: huevo completo coagulado o yema coagulada, glicerol, ácidos grasos principalmente el oleico, albúmina, hidrolizados de caseína, harina de papa, Tween 80, antibacterianos y antifúngicos.

Condiciones de incubación

Ya que las micobacterias son aerobios estrictos, y que en el periodo de su crecimiento deben de sintetizar gran cantidad de lípidos, su incubación adecuada incluye la necesidad de proporcionarle ambientes húmedos con 5 a 10 % de CO₂. Del mismo modo, la temperatura óptima es de 35°C y el tiempo que requieren para desarrollarse varía entre los 15 y los 25 días.

Características macroscópicas

Las especies capaces de desarrollar *in vitro* producen colonias de 4 a 6 mm. de diámetro, planas, bordes muy irregulares con aspecto granular y generalmente de un color amarillo muy claro mate.

Clasificación de Runyon ⁶²

Runyon ha diseñado una clasificación, que sólo involucra a las especies consideradas como MOTT (Otras bacterias diferentes a la de la tuberculosis) ó atípicas basándose en la capacidad de las cepas para producir un pigmento carotenoides amarillo brillante en presencia y/o ausencia de luz, dicha clasificación incluye cuatro grupos que son:

1. Fotocromógenos. A este grupo pertenecen las MOTT cuyas colonias manifiestan el pigmento mencionado, cuando se les ha incubado en presencia de la luz. Su principal especie es *M. kansasii*, cuya frecuencia

como causante de enfermedad suele igualar o superar a la de *M. tuberculosis* en algunas zonas geográficas

II. Escotocromógenos. Se encuentra integrado por las micobacterias atípicas que producen dicho pigmento, tanto en presencia como en ausencia de la luz. Su especie más relevante es *M. scrofulaceum*.

III. No Fotocromógenos o no cromógenos. Incluye a las MOTT que no sintetizan el pigmento en cuestión, bajo ninguna circunstancia. Su especie más distintiva es *M. intracellulare*.

IV. De crecimiento rápido. Agrupa a las micobacterias cuyas colonias aparecen dentro de los 7 primeros días de incubación. Su representante de mayor relevancia en salud pública es *M. fortuitum*.

Patogenia de la tuberculosis ⁴².

Los bacilos de la tuberculosis son intracelulares facultativos, que incluso pueden desarrollarse dentro de los macrófagos ^{1, 76}, los bacilos tuberculosos pueden adquirirse por vía aérea, oral, cutánea, oftálmica, uretral, ótica y vaginal.

Atributos bioquímicos de la virulencia de *M. tuberculosis*:

- Un glucolípido denominado 6,6' dimicolil- α -D-trehalosa ó factor cordón ó factor serpiente que es responsable de la disposición del microorganismo en cadena y en paralelo *in vitro*. Además, dicho glucolípido es leucotóxico ya que inhibe a la deshidrogenasa

succínica, provoca el hinchamiento de las mitocondrias y destruye el retículo endoplásmico rugoso disgregando a los ribosomas.

- Sulfolípidos.
- Complejo catalasa-SOD (Catalasa-superóxido dismutasa) que neutraliza la acción oxidante del peróxido de hidrogeno y del ión superóxido.

1.3 Mecanismos de la enfermedad.

La infección por el bacilo tuberculoso.

El arribo del bacilo de Koch a los alvéolos produce una inflamación inespecífica, inicialmente de grado mínimo, caracterizada por hiperemia, edema e infiltración de polimorfonucleares. A las 48 horas aparece la respuesta monocitaria, constituida por macrófagos residentes del pulmón. Los macrófagos alveolares fagocitan al bacilo tuberculoso como si fuera una partícula inerte de carbón o de polvo y, eventualmente, lo transportan a los ganglios linfáticos hiliares.³⁹

Por carecer de toxicidad primaria, las micobacterias se multiplican libremente dentro de los macrófagos, pudiendo llegar a destruirlos, liberándose en el medio extracelular. Algunos bacilos son transportados por la circulación linfática o dentro de los macrófagos a los ganglios hiliares y del mediastino; desde allí se vacían a la sangre venosa y se diseminan por todo el organismo, produciendo las llamadas siembras orgánicas de la tuberculosis.

Actualmente, se acepta que durante la primo-infección se produce siempre una bacteremia silenciosa, mediante la cual el bacilo se siembra en diversos tejidos del cuerpo, asentándose de preferencia donde encuentra un sistema reticuloendotelial abundante. La posibilidad de que se establezca en uno u otro órgano parece depender, en gran medida, de la tensión parcial de oxígeno que en él encuentre. Así se explicaría el desarrollo de la tuberculosis en las serosas, las meninges, en la metafisis de los huesos (en la zona de crecimiento), en el riñón y en los órganos genitales durante la pubertad. El órgano que tiene la tensión parcial de oxígeno más alta del organismo es el pulmón y en éste son las regiones apicales y dorsales las más frecuentemente afectadas.^{9, 26}

En efecto, en posición erecta, las partes altas de ambos pulmones casi no tienen circulación, y aunque también tienen menor ventilación, la relación ventilación/circulación es más elevada. Esto se asocia a la presencia de una abundante irrigación bronquial, portadora de sangre bien oxigenada, todo lo cual determina tensiones parciales de oxígeno que pueden llegar, en las zonas apicales, a los 130 mm de Hg a nivel del mar. Estos hechos, explicarían que la forma de tuberculosis posprimaria más frecuente en la clínica, sea la que asienta en las llamadas zonas vulnerables, que son las partes altas y posteriores de los pulmones.²⁶

Una vez producida la primo-infección, en la gran mayoría de los casos el bacilo queda encapsulado en pequeños focos quiescentes, que no progresan ni determinan enfermedad, y con frecuencia se calcifican. Sólo sabemos que el sujeto ha sido infectado, es decir que tiene bacilos tuberculosos vivos, en estado latente, en alguna parte del organismo, por que reacciona

positivamente a la tuberculina ²², en el caso particular de nuestro país, sólo se presenta dicho comportamiento, si el paciente no ha sido vacunado.

Se ha calculado que sólo una minoría de las personas que son infectadas con el bacilo de Koch son capaces de progresar a enfermedad, la mitad de las veces tempranamente, en los meses o años siguientes a la primo-infección, determinando las llamadas tuberculosis posprimarias, y en la otra mitad de los casos más tardíamente, con frecuencia muchos años después de haber sido infectados por primera vez, produciendo la tuberculosis de reactivación endógena ó secundaria.

El riesgo de pasar de infección a enfermedad depende de una serie de factores, entre los cuales destaca la historia previa de exposición al bacilo de Koch que haya tenido cada población, con su efecto seleccionador de individuos más resistentes, lo que les permite montar una respuesta inmune más adecuada.

Puede estimarse que este riesgo varía entre un 5 a 10% para países desarrollados y un 10 a 20% o más para los países en desarrollo; en condiciones especiales puede ser desmesuradamente alto.⁹

Aún no se sabe en forma precisa cuál es el mecanismo íntimo por el cual un individuo pasa de infectado a enfermo; sólo se conocen algunos de los factores que favorecen este infortunado evento. De los cuales puede distinguirse los que dependen del bacilo antes ya mencionados, los debidos al ambiente y los referentes al hospedero.

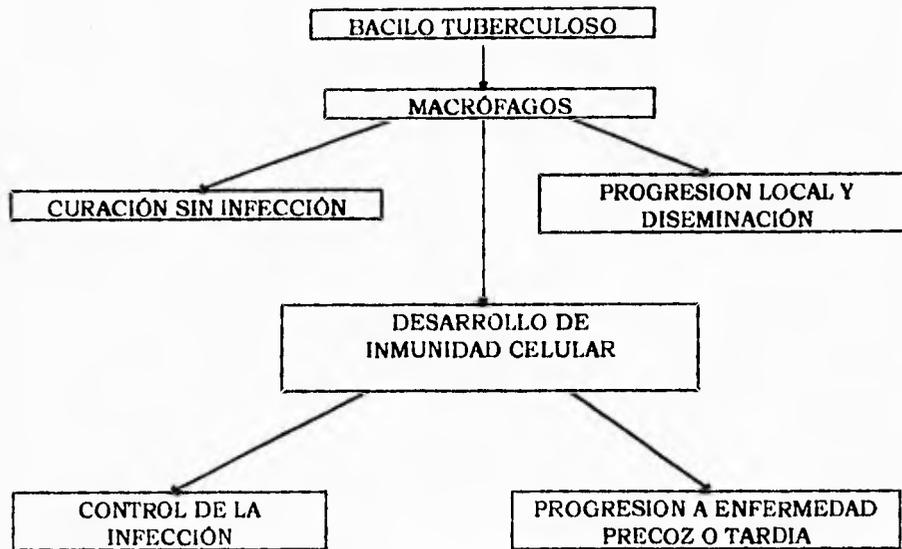


Figura 1. Evolución de la infección tuberculosa

1.4 El bacilo tuberculoso y el sistema inmunológico.

Características de las bacterias intracelulares ^{39, 40}

M. tuberculosis es una bacteria intracelular, por cumplir con los siguientes criterios:

La capacidad de desarrollar dentro de los macrófagos es el primero de ellos, habitando dentro de los macrófagos, la micobacteria puede evitar la respuesta mediada por anticuerpos, en tanto procesan y presentan sus proteínas los macrófagos infectados, promoviendo la estimulación de las células T, dejando claro que éstas son indispensables para presentar resistencia, y adquirir un

papel importante en la patogenia. El papel crucial de los linfocitos T es el segundo criterio. El crecimiento microbiano en el espacio extracelular causa la acumulación de polimorfonucleares, lo cual resulta en una reacción purulenta. En cambio, la reacción tisular a las bacterias intracelulares es típicamente granulomatosa, siendo esta característica el tercer criterio. Sin embargo, las bacterias intracelulares son retenidas dentro de los granulomas, sucediendo en pocos casos la erradicación de dichas bacterias. De ahí que la enfermedad se convierta en crónica lo cual es el cuarto criterio.

Importancia de las células fagocíticas en la respuesta inmunológica contra
M. tuberculosis

La fagocitosis profesional, que está dada por los polimorfonucleares y los macrófagos, es el principal mecanismo efector en la defensa antimicrobiana, donde los polimorfonucleares juegan un papel importante en la infección intracelular aguda ¹⁶, la gran capacidad secretoria de sustancias tales como hidrolasas ácidas, mieloperoxidasa, muraminidasa y lactoferrina de los polimorfonucleares, los hace partícipes de la destrucción del tejido y la licuefacción de los granulomas. ⁷⁵

Las principales funciones de los polimorfonucleares son la generación de radicales libres de oxígeno (ROI) y nitrógeno (RNI); la limitación del hierro disponible; acidificación de los fagosomas, más la fusión fagosoma-lisosoma; y la producción de defensinas. Muchos de estos mecanismos sólo se presentarán si se lleva a efecto una adecuada activación, la cual en el caso

del modelo murino puede llevarse a cabo por la estimulación del IFN- γ y algunas otras interleucinas. ²⁷

Las estrategias que las bacterias intracelulares utilizan para vivir en las células de su hospedero, son las causantes de la activación de la protección inmunológica y eventos patológicos subsecuentes.

M. tuberculosis contribuye a su propia fagocitosis por los macrófagos por medio de dos mecanismos. El primero de ellos, es que las micobacterias secretan abundantes cantidades de moléculas de 30-32 kDa y 57-60 kDa que promueven la fagocitosis por los receptores de fibronectinas ubicados en la superficie del macrófago ⁶⁸. Segundo, *M. tuberculosis* induce la activación de factores de complemento como el C3 (C3a C3b etc.) que con su posterior deposición sobre la superficie de la micobacteria, pueden utilizarse por ésta para ser fagocitada vía receptores de complemento ⁶⁵, la entrada por esta vía es relativamente segura porque no induce la formación de ROI; del mismo modo, *M. tuberculosis* también produce enzimas detoxificantes de ROI e inhibidores de la fusión de fagosomas-lisosomas, el NH₄⁺ está involucrado en la neutralización de la acidez del pH endosomal, en el bloqueo de la producción de ROI y en la inhibición de los movimientos y fusión de los lisosomas con los fagosomas ²¹. Los glicolípidos también participan en la sobrevivencia del bacilo tuberculoso, el lipoarabinomano (LAM) interfiere con la primo-activación de los macrófagos y los sulfolípidos inhiben la fusión de fagosomas-lisosomas e interfiere con la producción de ROI. ⁵³ Finalmente, debido a la constitución de la pared rica en lípidos del bacilo tuberculoso, la reducción de la actividad metabólica y, adicionalmente la replicación

retardada de *M. tuberculosis* le permiten la sobrevivencia de forma intraendosomal.

Los linfocitos en la respuesta inmunológica a *M. tuberculosis*

En cuanto a los linfocitos, se les puede separar en tres subpoblaciones en base a los receptores de las células T (TCR) y a las moléculas accesorias que interaccionan con el principal complejo de histocompatibilidad (MHC) de las células blanco ³⁶. Estas subpoblaciones están conformadas por células T CD4 α/β , dichas células reconocen antígenos peptídicos en el contexto del MHC II; las células T CD8 α/β , las que reconocen antígenos peptídicos en el contexto del MHC I; y las células T γ/δ , que carecen de CD4 y de CD8 ⁷³. De acuerdo al patrón de secreción de interleucina de las células T CD4, estas pueden dividirse en Th1 que secretan IL-2/IFN- γ y Th2 que secretan IL-4/IL-5 ^{44, 69, 70}. El papel central de los linfocitos es la adquisición de resistencia en contra de bacterias intracelulares, lo cual se estableció antes de que la separación de las células T en α/β y en γ/δ fuera posible, ahora sabemos que los efectos observados, pueden ser imputados a los linfocitos T α/β que conforman un 90% de los linfocitos en sangre periférica, tanto en el humano como en los ratones. ⁴⁶

Las células T CD4 sin duda, contribuyen a la respuesta inmunológica en contra de las bacterias intracelulares, y la reestimulación con antígenos homólogos al antígeno infeccioso de las células T CD4 ⁴², de los ratones infectados con *M. tuberculosis* producen IL-2 e IFN- γ , recibiendo la denominación de linfocitos Th1 ⁵⁹. Las células Th1 antígeno específicas para

las bacterias intracelulares, presentan una actividad citolítica en el sistema inmunológico murino y humano. En el caso de los linfocitos Th2 producen la IL-4, lo cual se ha detectado en ratones inmunizados con *M. tuberculosis*, y se ha observado que un patrón de respuesta linfocitaria tipo Th2 promueve la susceptibilidad a la infección ^{41, 67}, mientras que las de tipo Th1 desarrollan un aumento de la resistencia a la infección ^{6, 7}. Durante la infección, la producción del IFN- γ no sólo está dada por las células tipo Th1, también por las células NK, γ/δ y los linfocitos CD8, los cuales probablemente no son controlados por las células tipo Th2, esto se puede observar claramente ya que en estadios tempranos de la enfermedad se favorece la respuesta tipo Th1 por la producción de IFN- γ sobre la Th2. ¹⁰

En cuanto a las células T CD8 *in vitro*, expresan una actividad citolítica específica y producen IFN- γ ; sin embargo, los análisis *in situ* revelan que las células T CD8 con potencial citolítico en tuberculosis, forman una envoltura en los granulomas ¹⁸. La evasión de la actividad citolítica mediada por las células CD8, está dada por que inicialmente se necesita del procesamiento de los antígenos bacterianos presentes en el endosoma, por la maquinaria del macrófago para su presentación en el contexto de las moléculas MHC clase I ²; las bacterias intracelulares se replican dentro de los compartimentos endosomales y no en el citoplasma, sin embargo se explica el procesamiento de los antígenos micobacterianos, debido a que durante su larga persistencia *in vivo*, el compartimento endosomal permite la filtración de proteínas o metabolitos de bajo peso molecular que pueden ser presentados en el contexto del MHC clase I. ^{44, 73}

En cuanto a las células T α/β , la contribución relativa de la protección puede determinarse en dos formas. La primera, por la adopción de una transferencia de células T proveniente de un ratón infectado y, la segunda, porque *in vivo* se eliminan las células T α/β , por medio de la utilización de anticuerpos monoclonales. En la tuberculosis murina éstos dos puntos han demostrado la relevancia del papel dominante de las células T CD4 con alguna contribución de células T CD8^{50, 51, 64}. Porque ambas subpoblaciones de células T expresan una actividad biológica similar diferenciada en el reconocimiento de sus células blanco, se hace notar que *M. tuberculosis* sólo reside en células fagocíticas mononucleares que expresan moléculas del MHC clase II y son altamente resistentes a la muerte intracelular; así, la protección depende de la activación de los macrófagos por las células T CD4.

Los linfocitos γ/δ se han estudiado en su respuesta inmunológica durante los últimos años, demostrando lo siguiente: Primero, las células T γ/δ provenientes de animales infectados con *M. tuberculosis* responden vigorosamente a los lisados de *M. tuberculosis in vitro*.³⁵ Segundo, un elevado número de hibridomas de células esplénicas T γ/δ reaccionan vigorosamente con el derivado proteínico purificado (PPD). Tercero, la expresión marcada de linfocitos T γ/δ provenientes de sangre periférica de individuos sanos pudo estimularse *in vitro* por antígenos micobacterianos.¹⁷

Se ha observado que existe una marcada activación oligoclonal de los linfocitos T γ/δ sobre todo en los linfocitos humanos, advirtiéndose que uno de cada dos linfocitos T γ/δ de sangre periférica pueden estimularse por lisados de *M. tuberculosis*.

La estimulación de las células T γ/δ por las bacterias intracelulares puede evocar a la actividad de los superantígenos para las células T α/β . Las entidades estimuladoras para las células T γ/δ por las micobacterias, son las de bajo peso molecular aproximadamente < 3 kDa, y moléculas resistentes a las proteasas. Sin embargo, no es fácil considerar de qué manera, pequeñas moléculas se enlazan a las moléculas accesorias y a las células T, lo cual implica una activación de la forma en que lo realizan los superantígenos. ⁷²

La estimulación de células T γ/δ por las micobacterias, expresa varias funciones biológicas relevantes en la defensa contra las bacterias intracelulares, como la lisis de las células infectadas por las micobacterias y la secreción de IFN- γ y TNF. Así, el conocimiento del espectro de la actividad biológica de las células T γ/δ indica la participación de éstas en la respuesta inmunológica en contra de las bacterias intracelulares en forma similar a la de las células T α/β ²⁸, y de rápida activación inespecífica por componentes microbianos que podrían asegurar una primer línea de defensa. ⁵ Por otro lado, la contención de las bacterias intracelulares dentro de las células del hospedero puede interferir con la liberación en suficiente cantidad de componentes estimuladores. Estudios recientes, sin embargo, describen la expansión de las células T γ/δ con la participación de los macrófagos infectados con *M. tuberculosis* viva, indicando activación policlonal de las células T γ/δ en la inmunidad antibacteriana. ³²

La activación de las células T γ/δ por los antígenos de *M. tuberculosis* no está restringida a componentes de bajo peso molecular de hecho, antígenos > 30 kDa, probablemente proteínas, son capaces de estimular células T γ/δ . ⁷⁴

Posterior a la administración de una inyección de lepromina, se ha observado un incremento del número de las células T γ/δ en las lesiones intradérmicas de pacientes leprosos ⁷⁷, observándose posteriormente regresión al estado inicial, este comportamiento no se observa en las lesiones cutáneas lepromatosas o tuberculoides. Así, la acumulación de células T γ/δ , está asociada con el grado de inflamación que se ha relacionado con el establecimiento de lesiones crónicas ³⁷. Las líneas de células T γ/δ obtenidas de dichas lesiones responden a la preparación de la pared celular de *M. leprae* y al PPD. El incremento del número de las células T γ/δ fueron también observadas en áreas necróticas de la tuberculosis linfadenóide, con la mayoría de las células concentradas en la vecindad o dentro de las áreas necróticas.

Se ha observado la acumulación de las células T γ/δ en el pulmón de los ratones infectados con una inoculación por aerosol de *M. bovis*. ³ En el caso de una infección con *M. bovis*, posterior a una inoculación por vía intraperitoneal, se observó una acumulación local en la cavidad peritoneal en el día 3 o 7, en ambos casos la aparición de las células T γ/δ precede a la aparición de las células T α/β . Las células T γ/δ provenientes de los ganglios linfáticos de los ratones inmunizados con *M. tuberculosis* muerta, responden vigorosamente a las preparaciones de antígenos micobacterianos.⁴³

Las citocinas en la respuesta inmunológica

Las citocinas tienen un papel importante en la respuesta inmunológica, como en el caso del IFN- γ que juega un papel central en la adquisición de

resistencia en contra de las bacterias intracelulares en los ratones. ^{13, 55} Esta interleucina es producida por todos los mediadores de resistencia llamados células T CD4, células T CD8, células T γ/δ y células NK. ⁵¹ Sabemos que la administración de IFN- γ recombinante protege a los ratones de infecciones letales con *M. tuberculosis*, mientras que la neutralización con anticuerpos anti-IFN- γ induce exacerbación de la enfermedad ^{25, 49}; De la misma forma, el IFN- γ es un potente potenciador de la acción tuberculostática en los macrófagos murinos; sin embargo, existen algunas cepas que son resistentes, los macrófagos que se han estimulado con IFN- γ convierten la 25-hidroxivitamina D3 a 1,25-dihidroxivitamina D3 ⁵⁹ *in situ* quien posteriormente actúa como coestimulador de la actividad tuberculostática con una probable participación del TNF.

Los linfocitos T CD4 inducen la acción tuberculostática en los macrófagos via IFN- γ probablemente en colaboración con el TNF y la 1,25-dihidroxivitamina D3. Cabe, en este punto, hacer el señalamiento de que en el caso de los macrófagos humanos, más no en los murinos, los macrófagos expuestos al IFN- γ , desarrollan la 1-hidroxilasa, la cual convierte a la forma inactiva en circulación de la vitamina D3 (25-OH colecalciferol) en un derivado activo 1-hidroxilado (1,25(OH)₂ vitamina D3 ó calcitriol) ^{59, 60}, estando relacionado el calcitriol con la regulación del balance del calcio y con la regulación de la activación de los macrófagos durante la respuesta inmunológica mediada por células. Los metabolitos de la vitamina D3 de forma conjunta con el IFN- γ tienen la capacidad de incrementar la resistencia de los macrófagos humanos a *M. tuberculosis* ^{58, 61}

El TNF es secretado por los macrófagos después de la estimulación de éstos con micobacterias, proteínas, y el LAM, la diferencia en la secreción de TNF por las LAM está asociado con diferencias de la virulencia de las micobacterias; sin embargo, el TNF por sí solo, es incapaz de activar la capacidad tuberculostática de los macrófagos murinos ³³, esto demuestra la sinergia con el IFN- γ , sin embargo la administración de anticuerpos anti-IFN- γ bloquea la inducción de la actividad tuberculostática. Se sabe que la administración de dichos anticuerpos disminuye la resistencia de los ratones en contra de las infecciones letales con *M. tuberculosis*, pero no hay efecto observado en una infección secundaria. ²⁰

La administración de anticuerpos anti-TNF inhibe la formación de los granulomas y en los animales en que se les administraron éstos anticuerpos se encontraron micobacterias en el hígado. ⁶³

En cuanto a la IL-1, durante la infección con *M. tuberculosis* sus niveles se incrementaron, mientras que la IL-4 es capaz de activar la función tuberculostática en los macrófagos murinos. ²⁷ Los macrófagos estimulados con IL-4 de forma previa a la infección con micobacterias, fallan al inhibir el crecimiento intracelular de la micobacteria, esto se ha observado utilizando *M. bovis*, sin embargo, si se administra posterior a la infección se observa que el crecimiento intracelular se reduce de forma significativa. La IL-4 induce *in vivo* un flujo de monocitos y la formación de células gigantes multinucleadas *in vitro*, por medio de esta vía contribuye a la formación y estabilización de los granulomas. ⁴³

Otras citocinas, como el IFN- α , IL-2, IL-6, IL-8 y CSF también participan en la respuesta inmunológica en contra de las bacterias intracelulares.^{38, 52, 61} La producción de IL-6 por los macrófagos de los individuos infectados con *M. tuberculosis* está incrementada, la IL-6 induce la actividad micobactericida en los macrófagos de una forma similar a la de la IL-4, mientras que la producción de IL-8 por los macrófagos y otras células que han sido estimuladas por antígenos micobacterianos, está relacionada directamente con la fagocitosis de *M. tuberculosis*.⁴³ La IL-8 está relacionada con la aparición de lesiones en estados tempranos de la infección, ya que esta interleucina puede atraer a las lesiones PGN y posteriormente atraer linfocitos T, contribuyendo a la formación de granulomas.⁴

Inmunidad local

Las bacterias intracelulares no entran al organismo de forma directa, primeramente atraviesan a través de la barrera de las mucosas. El pulmón sirve como el mayor sitio de entrada para las bacterias intracelulares, y puede considerarse de forma virtual como un órgano estéril, por lo que las micobacterias no compiten con otras bacterias por adherirse a la superficie del pulmón³⁴, los alvéolos pulmonares están libres de macrófagos y las células T existen en el intersticio del pulmón y emigran hacia la luz alveolar.

M. tuberculosis sólo invade de forma exitosa a su hospedero si los pocos microorganismos contenidos en las gotas de flúge se inhalan, las grandes gotas son removidas por mecanismos bronquiales inespecíficos. Los microorganismos son fagocitados por los macrófagos alveolares en el medio

externo y posteriormente sucede uno de los dos siguientes eventos, mueren sin entrar al hospedero o son traslocados hacia el interior del intersticio, particularmente hacia los ganglios locales.

Los linfocitos T intraepiteliales (IEL) son las primeras células T que tienen contacto con las bacterias invasoras, su papel en la defensa antibacteriana no se ha establecido. Estudios *in vitro* efectuados en el ratón, demuestran que los IEL poseen funciones efectoras innatas, independientemente del arreglo del TCR ya sea α/β o γ/δ , los IEL expresan una potente actividad citolítica en los ensayos de la redireccionalización de la muerte bacteriana mediada por inmunoglobulinas, y en la producción de IFN- γ .^{76, 55}

La lesión granulomatosa

El encuentro entre las bacterias intracelulares y los mecanismos de defensa del hospedero, es un evento local centrado en la lesión granulomatosa, la cual es una forma de protección antibacteriana del hospedero.

El fracaso en la formación del granuloma o el rompimiento de éste, generalmente conduce a la exacerbación de la enfermedad, con consecuencias fatales. Del mismo modo, el crecimiento de los granulomas afecta a la funcionalidad del tejido causando un efecto patogénico.⁷¹

El granuloma ideal puede considerarse como una forma de protección, cuya constitución está dada por linfocitos T de diversos fenotipos y macrófagos de diferentes estados de maduración. Su constitución está dada

por células gigantes multinucleadas, células epitelioides, monocitos recién emigrados y macrófagos maduros esparcidos entre una gran cantidad de células T. El granuloma se encuentra totalmente rodeado por una envoltura constituida principalmente por linfocitos T CD8.^{47,64} Los microorganismos se encuentran localizados dentro de los macrófagos del granuloma.

Como resultado de la muerte necrótica de las células internas del granuloma, se desarrolla un centro caseoso, pero fijo y sólido.^{1, 57} Eventualmente la lesión es encapsulada por fibrosis y calcificación

En la fase temprana de la formación del granuloma se presenta la extravasación de los PNGs y subsecuentemente monocitos, debido a la secreción de metabolitos bacterianos, factores del complemento e interleucinas. Como ya se ha mencionado, los macrófagos infectados producen numerosas citocinas como IL-1, IL-6, IL-8 y TNF- α , que estimulan a las células endoteliales locales y a las células fagocíticas. La estimulación de las células endoteliales que rodean a la lesión primaria, hace que expresen una elevada concentración de selectinas e integrinas, promoviendo de esta forma la extravasación y adhesión de las células fagocíticas que están emigrando.⁴⁵

Sin embargo, los neutrófilos y monocitos restringen la replicación bacteriana, pero frecuentemente fallan en la eliminación de los patógenos, al mismo tiempo que la liberación de enzimas proteolíticas causan daño tisular. Esta lesión primaria posteriormente se torna en exudado.

Eventualmente, los linfocitos T específicos son activados en los ganglios linfáticos, al circular los linfocitos T activados, pasan por la lesión

inflamatoria y se adhieren a la pared de los vasos sanguíneos con ayuda de las integrinas y selectinas, los linfocitos migrarán hacia el granuloma.³¹

Gradualmente, el infiltrado celular comienza a organizarse y a formar un granuloma constituido principalmente de macrófagos. La aparición del TNF es importante en este evento, haciendo el señalamiento de que la subpoblación de linfocitos T α/β es la de mayor predominio durante todo el desarrollo del granuloma y que los linfocitos T γ/δ tienen una importante contribución en la etapa inicial.⁵

La interacción antígeno específica de los macrófagos infectados con los linfocitos T, induce la producción de IFN- γ que estimula la actividad antimicrobiana del macrófago.

El granuloma es el sitio de actividad más intensa para la protección contra las bacterias intracelulares, por que restringe su replicación y las confina en un punto discreto, en donde se efectúa lo siguiente:

1. Activación de macrófagos capaces de inhibir el crecimiento bacteriano
2. Promoción del encapsulamiento, fibrosis y calcificación
3. Permite la necrosis al reducir nutrientes y el abasto de oxígeno.

Aún así, frecuentemente los patógenos microbianos no son totalmente erradicados y algunos microorganismos sobreviven en forma latente, por medio de un balance entre la persistencia microbiana y las defensas del hospedero.

En el particular caso de la tuberculosis, los granulomas proliferativos y productivos, pueden evolucionar en cinco direcciones:

1. El delicado balance entre la persistencia microbiana y la protección local, establece un equilibrio y se observa una perpetuación de una inmunidad estable sin enfermedad, esto se observa en más del 90% de los individuos infectados.
2. En casos raro, el granuloma proliferativo logra una total erradicación del patógeno y desaparece.
3. Este punto corresponde a una fuerte respuesta inmunológica donde prevalece la reacción necrótica, con lo que se extiende el daño tisular . Hay una secreción intensa de citocinas fibrogénicas, incluyendo el TNF y el TGF- β permitiendo el desarrollo de fibrosis pulmonar.
4. A condición de que prevalezcan los mecanismos citolíticos y de destrucción celular, el granuloma se convertirá en un exudado y subsecuentemente se licúa. En el detritus celular las micobacterias crecen de forma incontrolable, extendiendo el daño tisular de forma marcada, dañando al órgano. La diseminación microbiana a través de la vía hematogena promueve la infección de órganos secundarios y la ruptura del sistema broncoalveolar facilita la liberación al medio ambiente. La excesiva producción de TNF que se libera a la circulación causa caquexia. Esta enfermedad toma una forma maligna y es altamente contagiosa.
5. En el caso de las inmunodeficiencias, el granuloma se rompe rápidamente y la micobacteria se disemina, generando una tuberculosis miliar.

II. SECCIÓN EXPERIMENTAL

2.1 Materiales.

Equipo

Balanza analítica (METTLER AE100)

Cajas de contención con microaisladores

Calibrador de ingeniero (Mitutoyo)

Cámara de electroforesis 2050 MIDGET (LKB Bromma)

Cámara de transferencia 2051 MIDGET MULTIBLOT (LKB Bromma)

Cámara húmeda

Campana de bioseguridad VECO

Equipo de filtración millipore, para la obtención de agua desionizada

Fuente de poder EPS-500/400 120V AC.

Micropipeta de 1,000 μ L (Gilson)

Micropipeta de 20 μ L (Gilson)

Micropipeta de 200 μ L (Gilson)

Micropipeta multicanal de 8 pozos de 200 μ L (Cotsar)

Microscopio acoplado a una cámara lúcida (American Optical)

Microscopio de fluorescencia (American Optical)

Microscopio óptico (Carl Zeiss)

Microtomo (CROTOME 820 American Optical)

Placa calentadora y Agitador magnético (CORNING)

Secador de laminillas 40-100°C (Lipshow)

Sintetizador de oligonucleótidos (Oligo DNA Synthesizer, Beckman)

Tabla digitalizadora (ZIDAS, Carl Zeiss)

Thermolyne Maxi Mix (SYBRON)

Material biológico

24 ratones singénicos pertenecientes a la cepa BALB/c, machos de 6 a 8 semanas de edad, libres de patógenos.

M. tuberculosis H37Rv

Material de uso común.

- 3 Embudos
- 2 Kikasatos
- 200 Laminillas K de $\pm 26 \times 76$ mm. con canto esmerilado con pantalla ALEMANIA
- 3 Matraz aforado de 250 mL (Pyrex)
- 5 Pipetas graduadas de 10 mL (Kimax) Pipetas graduadas de 5 mL (Kimax)
- 3 Probetas graduadas de 100 mL (Pyrex)
- 500 Puntas de micropipeta de 200 μ L

- 500 Puntas de micropipetas de 1,000 μ L.
- 50 Tubos falcon de 50 mL
- 3 Vasos de precipitado de 1,000 mL
- 5 Vasos de precipitados de 100 mL (Pyrex)
- 50 Viales de Nunc

Reactivos

Acetona R.A. (J.T. Baker)

Ácido cítrico monohidratado (Omnichem) R.A

Ácido sulfúrico R.A. (J.T. Baker)

Alcohol 96° Industrializado

Alcohol etílico R.A. (Omnichem)

Anticuerpo policlonal de cabra anti-subclase IgG1 (Seralab, Crawley
Down, Suissex UK)

Anticuerpo policlonal de cabra anti-subclase IgG2a (Seralab, Crawley
Down, Suissex UK)

Bicarbonato de sodio R.A. (Sigma)

Biotinamidocaproato N-hidroxisuccinamida éster $C_{26}H_{36}N_4O_6S$ R.A.(Sigma)

Carbonato de sodio R.A. (Sigma)

4-Cloro-1Naftol R.A. (Sigma)

Cloruro de amonio R.A. (Merck)

Cloruro de potasio R.A. (Baker)

Diacetato de fluoresceína R.A. (Aldrich)

Diaminobencidina R.A (Sigma)

Dimetilsulfóxido HLPC. (Malinckrodt)

Estreptoavidina-peroxidasa R.A. (DAKO)

Fosfato de sodio dibásico R.A. (Baker)

Fosfato de sodio monobásico R.A.(Baker)

Glicina R.A.(Merk)

Hidróxido de sodio R.A. (Reproquifin)

Kitt ABC (ABC peroxidado)(Vectastin)

2-Mercaptoetanol R.A. (Sigma)

Metanol absoluto R.A. (J.T. Baker)

Oligo d(T₁₂₋₁₈) (USB Corp. Cleveland)

Ortocloronaftol R.A. (Sigma)

Ortofenildiamina R.A. (Sigma)

Peróxido de hidrógeno 30% R.A. (Merk)

RNAsin (Promega, Madison, WI.)

Silane R.A. (Sigma Con S Mo USA)

Solución Inyectable (PISA, Cloruro de sodio 0.9%)

Sulfato de amonio R.A. (Merck)

TNF recombinante (Genzyme, BO. USA)

Transcriptasa reversa del virus de la leucemia murina (Gibco BRL,
Gaithesburg, MD.)

Tris·HCl, Grado enzimático (Sigma)

Trizol (fenol y tiocianato de guanidina) (Life Technology Gaithersburd M.D.)

Tween 20 R.A. (Sigma)

Xileno R.A. (J.T. Baker)

2.2 Métodos.

Bacteria infectante y fuente de antígenos. Se utilizó la cepa virulenta de *M. tuberculosis* H37Rv, que se cultivó en el medio líquido de Proskauer y Beck modificado por Youmans. Después de 4 semanas de cultivo, las colonias bacterianas se resuspendieron en amortiguador fosfato-salino (PBS) con 0.05% de Tween 80, después de disgregar a las bacterias con perlas estériles de vidrio en agitación, la suspensión se centrifugó durante 1 minuto a 350g para eliminar grumos bacterianos. Posteriormente se llevó a cabo un recuento bacteriano preliminar por medio de un frotis en un volumen y área conocida, se tiñeron los frotis con la tinción de Ziehl-Nielsen y se revisaron 10 campos al azar. La suspensión se ajustó finalmente a una concentración final de 1×10^6 bacterias en 100 μ L de PBS, separando en alícuotas la suspensión bacteriana y almacenándola a -70°C . Antes de usar a las bacterias para inocular a los ratones, se determinó la viabilidad de acuerdo al método mencionado posteriormente.

Determinación de la viabilidad de las bacterias. Se utiliza diacetato de fluoresceína al 98%, se prepara un patrón disolviendo 5 mg de diacetato de

fluoresceína en un mililitro de acetona a -20°C , de la solución patrón se toman 25 μL . Adicionándolos a 2 mL de PBS y ajustando el pH a 7.2 en frío, asegurándose de que la solución no contenga iones Ca^{++} , ni Mg^{++} . Se mezclan 25 μL de la solución de trabajo con 25 μL de la muestra, y se efectúa la cuenta de las bacterias viables en la cámara de Neubauer en un microscopio con una fuente de luz ultravioleta.

Modelo experimental de tuberculosis pulmonar.

Para producir tuberculosis pulmonar, se anestesiaron los ratones BALB/c con 18 μL de pentobarbital sódico a razón de 56 mg por Kg de peso, intraperitonealmente. La tráquea fue expuesta a través de una pequeña incisión media en la cara anterior del cuello, a través de ella se inyectó directamente una suspensión de 1×10^6 bacterias en 100 μL de PBS. Posteriormente, la incisión quirúrgica se suturó con seda estéril, el animal se mantuvo en posición vertical hasta que desapareció el efecto de la anestesia. Finalmente, los animales de experimentación se mantuvieron en grupos de cinco animales en cajas contenedoras con microaisladores. Todo el procedimiento quirúrgico, así como el sacrificio y la toma de productos se realizó en una campana de alta seguridad biológica, bajo normas estrictas de bioseguridad.

Estudio histopatológico, morfométrico e inmunohistoquímico.

Marcaje de los anticuerpos monoclonales utilizados. Los anticuerpos monoclonales, utilizados en la determinación de interleucinas en las células linfoides fueron biotinilados, incubándolos en éster de biotina disuelto en

dimetilsulfóxido, en una proporción de 1 mg de proteína por 2.5 mg de biotina en amortiguador de carbonatos 0.5M pH 9 en agitación por 4 horas a temperatura ambiente; la reacción de unión biotina proteína se detuvo con la adición de una solución de NH_4Cl 1M llegando a una concentración final de 0.1 M en la mezcla de reacción. La biotina libre fue eliminada por diálisis extensa contra PBS. Se separaron alícuotas de los anticuerpos marcados y se almacenaron a 4°C hasta el momento de su uso.

Se sacrificaron grupos de tres animales, por exsanguinación en periodos de 1, 3, 7, 14, 21, 28, 60 y 120 días después de la inoculación intratraqueal de *M. tuberculosis*. Inmediatamente después, se fijaron sus pulmones por medio de perfusión intratraqueal con 1 mL de alcohol etílico absoluto. Después de extraerlos, los pulmones se deshidrataron en alcoholes con concentración creciente y se incluyeron en parafina. De los bloques de inclusión se obtuvieron cortes histológicos de 5 μm de grosor utilizando un microtomo.

Los cortes histológicos se tiñeron con hematoxilina y eosina para su estudio histológico. Para el estudio inmunohistoquímico de los mismos bloques se obtuvieron múltiples cortes montados en laminillas cubiertas con Silane. Después de desparafinarlos y eliminar la actividad endógena de peroxidasa al incubarlo con una solución de metanol- H_2O_2 3%, el tejido pulmonar se incubo por 3 horas con anticuerpos monoclonales α -IL-2, α -IL-4 marcados con biotina diluidos 1/50 en PBS. Posteriormente de lavarlos extensamente con PBS, se incubaron con estreptoavidina-peroxidasa dilución 1/300 en PBS por una hora. La peroxidasa se reveló con una solución de

diaminobencidina- H_2O_2 por treinta minutos, finalmente se contratiñeron con hematoxilina.

Con la finalidad de tener una aproximación cuantitativa de las células productoras de IL-2 e IL-4 y además definir su localización anatómica, los cortes histológicos incubados con los anticuerpos para cada una de las interleucinas se estudiaron con técnicas morfométricas. El área en micras cuadradas del tejido linfoide asociado a la mucosa bronquial, infiltrado inflamatorio perivascular, intersticio alveocapilar, los granulomas y las áreas neumónicas se determinaron con un digitalizador de imagen Zidas. La relación porcentual de las células productoras de cada una de las citocinas en cada una de las regiones anatómicas mencionadas y durante la evolución de la enfermedad, se estimó al contar el número total de células negativas y positivas inmunohistoquímicamente, en cuando menos tres campos histológicos seleccionados al azar y observados con el objetivo de 40x, en dos a tres experimentos diferentes. Los resultados se expresaron en porcentaje.

Determinación del ARNm de citocinas por RT-PCR.

Se sacrificaron grupos de tres animales por exsanguinación en los periodos previamente indicados. Inmediatamente después se expuso la cavidad torácica y los pulmones disecados, después de eliminar los ganglios linfáticos de la región inter-traqueobronquial, los pulmones se congelaron en nitrógeno líquido, y se almacenaron en viales a $-70^{\circ}C$ hasta su uso. La mitad del pulmón derecho e izquierdo se colocaron en tubos de 50 mL, a los que se les adicionó 1 mL de Trizol (fenol y tiocionato de guanidina) y se

homogenizaron en politrón. Se purificó el ARN y de éste se obtuvo una copia complementaria de ADN (ADNc) por la actividad de la enzima transcriptasa reversa, el ADNc se utilizó para realizar PCR con iniciadores para IFN- γ , IL-4 e IL-12 cuyas secuencias se muestran posteriormente. El producto de la reacción de PCR se corrió en geles de acrilamida al 6%. También parte del producto se utilizó para purificar el ADN replicado y marcado con UTP-digoxigenina para utilizarse como sonda molecular en análisis de Southern-blot no radiactivo, con este procedimiento se corroboró la especificidad del PCR y además se realizó densitometría con el fin de tener un estimado cuantitativo del mensaje genético de cada una de las citocinas. Los iniciadores para el gen constitutivo de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa se utilizaron como control.

Aislamiento del ARN. El aislamiento se efectuó, posterior al homogeneizado con el reactivo Trizol, el homogeneizado se mezcló con cloroformo y se centrifugó, provocando la aparición de dos fases una acuosa y otra orgánica. El ARN se precipitó de la fase acuosa por medio de la adición de isopropanol, lavado y disuelto en agua o estabilizado en formamida

Síntesis del ADNc. La primera cadena de ADN. se sintetizó a 37°C por 1.5 horas, usando 5 μ L (3-5 μ g) de ARN obtenido del tejido en H₂O destilada-DEPC, 5.0 μ L 5x del amortiguador RT (250 mM Tris-HCl pH 8.3, 375 mM KCl, 50 mM ditiotriol, 15mM MgCl₂), 1.0 μ L (40 U), RNAsin, 4.0 μ L de una mezcla de dNTP (10mM de cada uno. dATP dCTP, dGTP, dTTP), 1.0 μ L del Oligo d(T₁₂₋₁₈) y 1.0 μ L (200 U) Transcriptasa reversa del virus de la leucemia

murina. Después de la incubación las muestras se calentaron a 95°C por 5 minutos y después rápidamente se enfriaron en hielo.

Secuencias de los iniciadores utilizados en el PCR. El par de iniciadores específicos de cada citocina son los siguientes:

IL-4:(sense)	5'ACAAAATCACTTGAGAGAGATCAT3'	y
(antisense)	5'AGTAATCCATTTGCATGATGCTCTT3' (351 bp)	
IFN- γ :(sense)	5'GAAAGCCTAGAAAGTCTCATAACT3'	y
(antisense)	5'ATCAGCAGCGACTCCTTTCCGT3' (388 bp)	
IL-12:(sense)	5'CCTCAGAAGCTAACCATCTCCT3'	y
(antisense)	5'CAGCCATGAGCACGTGAACCGT3' (420 bp)	

Estudios de las subclases IgG-1 e IgG-2a por ELISA y Western-blot.

La producción de la subclase IgG-2a la regulan los linfocitos CD4+ de la subpoblación Th1, mientras que la subclase IgG-1 lo es por las células T de clase Th2. Fue, por lo tanto, es de interés estudiar su cinética tanto por los métodos cualitativos (Western-blot), como cuantitativos (ELISA). Para realizar ambos estudios los antígenos micobacterianos se obtuvieron del medio de cultivo después de separar la masa bacteriana por centrifugación y filtración. Posteriormente, los antígenos se precipitaron con sulfato de amonio al 45%, se lavaron y disolvieron en PBS. Para el estudio de Western-blot los antígenos obtenidos del filtrado del medio de cultivo se separaron por SDS/PAGE en un medio discontinuo, con un gel concentrador preparado al 3%, y otro de concentración al 10%. Las proteínas se transfirieron a membranas de

nitrocelulosa. Después de haber bloqueado a dichas placas con PBS-Albúmina al 1% y 0.33% de Tween20 durante 2 horas a temperatura ambiente, la nitrocelulosa se cortó en tiras e incubó durante toda la noche a 4°C con la mezcla de sueros diluidos 1/50 de tres ratones. Después de lavar extensamente, las tiras de nitrocelulosa se incubaron por separado con anticuerpos policlonales de cabra antisubclase IgG-1 e IgG-2a de ratón, acoplados a peroxidasa, diluidos ambos 1/1,000 por 2 horas a temperatura ambiente. La peroxidasa se reveló con ortocloronaftol al 3% disuelto en metanol con H₂O₂.

En cuanto a los estudios realizados aplicando la técnica de ELISA, se sensibilizaron placas de poliestireno con 2 µg por pozo de los antígenos totales obtenidos del filtrado de cultivo disueltos en amortiguador de carbonatos pH 9.6 (NaHCO₃/Na₂CO₃) durante toda la noche a una temperatura de 4°C en cámara húmeda. Después de lavar con PBS/Tween20 al 2%, se bloqueó con una solución de PBS-Albúmina al 3% , se incubaron por separado con los anticuerpos antisubclase IgG-1 e IgG-2a ambos en una dilución 1/1,000 durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de lavar para revelar la peroxidasa se utiliza como cromógeno la ortofenilendiamina diluido en amortiguador de citrato pH 5 (NaC₆O₇H₆/Na₂HPO₄) por 15 minutos, la reacción se detuvo con una solución de H₂SO₄ 2.5M y se leyó a una longitud de onda de 492 nm con un lector de placas.

Prueba de hipersensibilidad retardada (DTH) y sensibilidad al TNF.

Las pruebas de DTH se efectuaron en grupos de tres animales, administrando 20 µL de solución salina estéril libre de pirógenos que se

inyectaron en el cojinete plantar de la pata derecha. Antes y 24 horas después de la inyección, se midió el grosor del cojinete plantar con un calibrador de ingeniero, la sustracción de ambas medidas se expresó en μm .

La magnitud de la inflamación, como un indicador de lesión tisular mediado por TNF, es dependiente del balance entre los linfocitos T CD4⁺ de clase Th1 y Th2. El modelo experimental consiste en inyectar subcutáneamente 1 μg de TNF recombinante disuelto en 20 μL de solución salina estéril libre de pirógenos, en el mismo sitio en donde se inyectaron los antígenos del filtrado del medio de cultivo para la prueba de hipersensibilidad retardada, 20 horas después de la inyección del TNF se vuelve a medir el grosor del cojinete plantar con el calibrador de ingeniero y la medida se expresa en micras.

2.3 Resultados experimentales.

Los resultados, que se muestran a continuación están constituidos por imágenes pertenecientes a tejido pulmonar, correspondientes a los periodos establecidos en el diseño experimental para el sacrificio de los ratones inoculados con *M. tuberculosis*, mostrando los tiempos a los cuales la evolución de la tuberculosis y el daño que causa al tejido pulmonar es más representativo, permitiendo con mayor facilidad comprender la actividad de las subpoblaciones linfocitarias en el transcurso de la enfermedad, observándolas por medio de su patrón de secreción de interleucinas y asociándolas al daño observado.

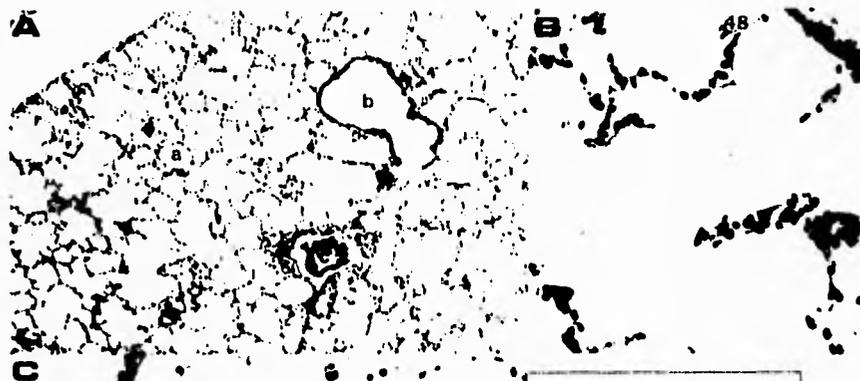


Figura 2. Día 1, posterior a la inoculación.
 A. Imagen de 1 día, teñido con hematoxilina/eosina.
 B. Inmunohistoquímica para las células productoras de IL-2.
 C. Inmunohistoquímica para las células productoras de IL-4.

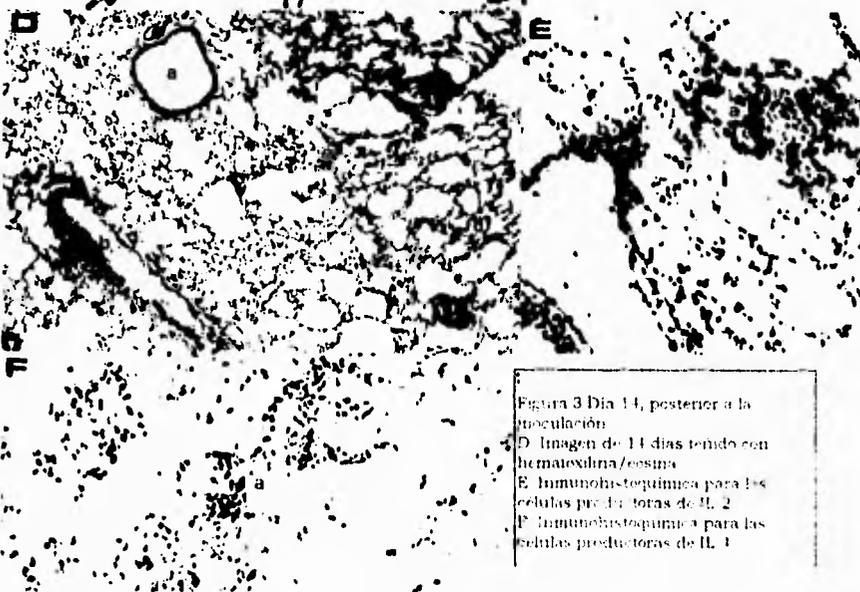


Figura 3. Día 14, posterior a la inoculación.
 D. Imagen de 14 días teñido con hematoxilina/eosina.
 E. Inmunohistoquímica para las células productoras de IL-2.
 F. Inmunohistoquímica para las células productoras de IL-4.

FALLA DE ORIGEN

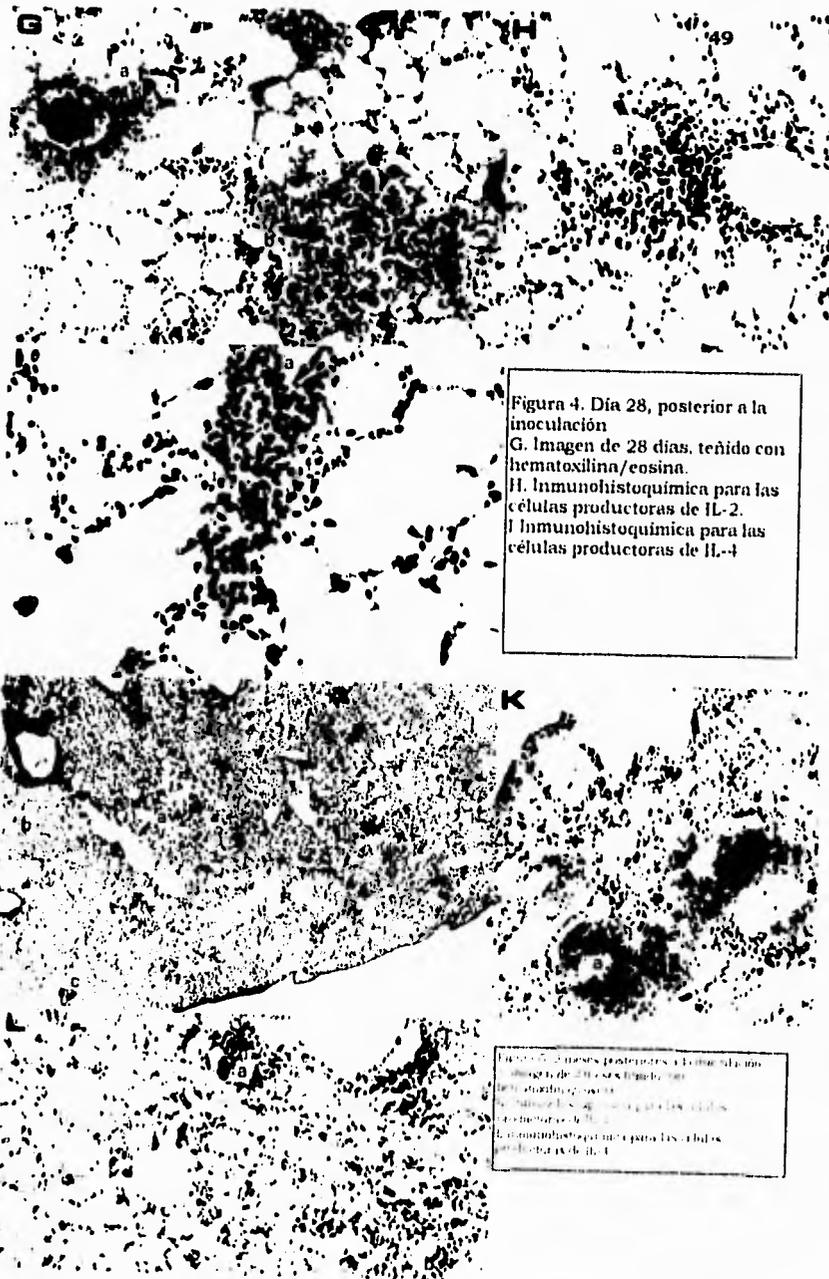


Figura 4. Día 28, posterior a la inoculación
 G. Imagen de 28 días, teñido con hematoxilina/eosina.
 H. Immunohistoquímica para las células productoras de IL-2.
 I. Immunohistoquímica para las células productoras de IL-4

Imagen de 28 días posterior a la inoculación
 Imagen de 28 días, teñido con hematoxilina/eosina.
 Immunohistoquímica para las células productoras de IL-2.
 Immunohistoquímica para las células productoras de IL-4

FALLA DE ORIGEN



Figura 6. 4 meses posteriores a la inoculación, M. Imagen de 4 meses teñido con hematoxilina/eosina; N. Inmunohistoquímica para las células productoras de IL-2; O Inmunohistoquímica para las células productoras de IL-4; Sección P Granuloma de 4 meses, Inmunohistoquímica para la células productoras de IL-2; Q. Granuloma de 4 meses, Inmunohistoquímica para las células productoras de IL-4.

FALLA DE ORIGEN

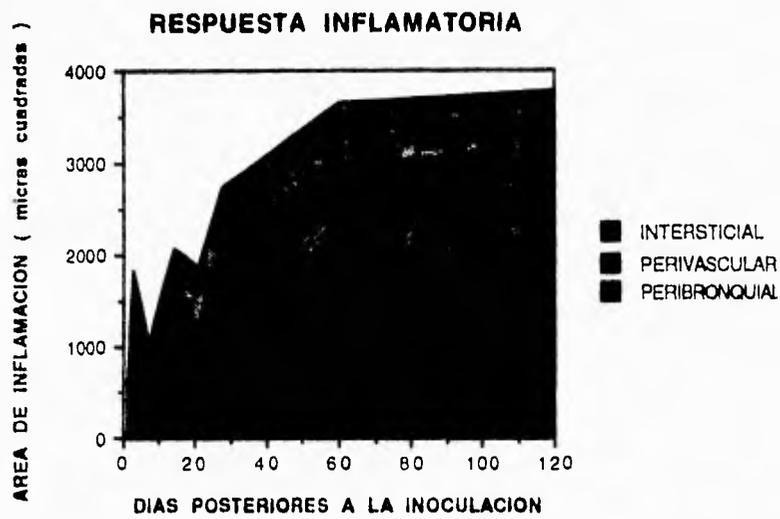


Figura 7. La respuesta inflamatoria está mediada por la migración de las células involucradas en la respuesta inmunológica, hacia los sitios donde la presencia de la micobacteria promueve la liberación de factores quimiotácticos. La disminución que se observa al día 7 se debe a la eficiencia en la respuesta inmunológica de los animales de experimentación, y a que no todas las micobacterias logran establecerse eficazmente, a partir del día 7, la inflamación presenta una cinética lineal, siendo el compartimento intersticial el que presenta mayor inflamación durante el transcurso de la enfermedad, seguido de la región perivascular y la región con menor inflamación, es la región peribronquial.

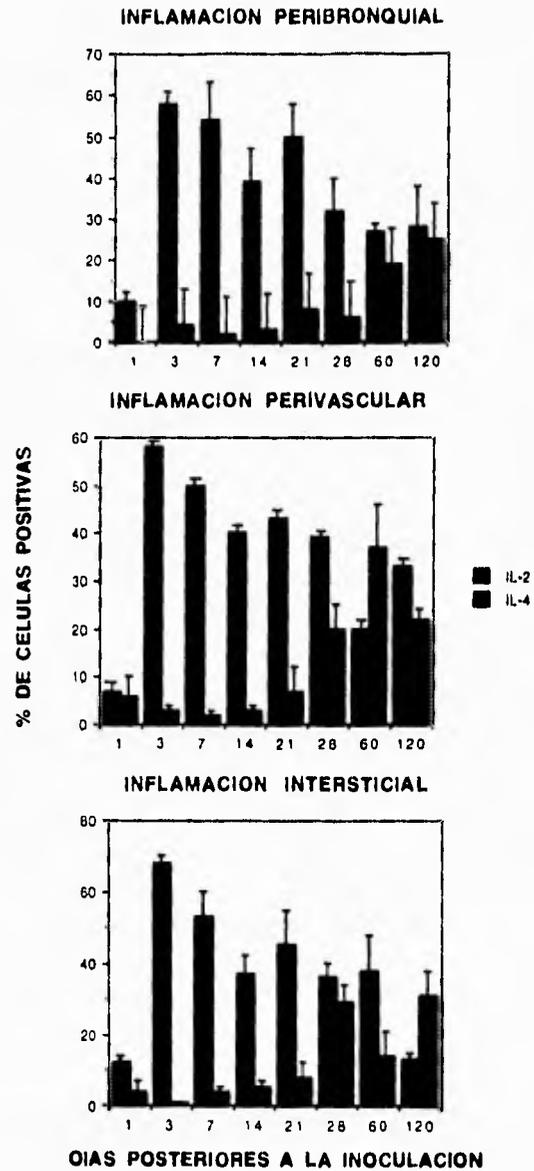


Figura 8. La inflamación observada en los diferentes compartimentos anatomopatológicos del pulmón, está constituida principalmente por linfocitos, pero dependiendo del perfil de secreción de citocinas de estos, será a la subpoblación linfocitaria a la que pertenecen, los que producen IL-2 son de la subpoblación linfocitaria Th1, y los que producen IL-4 pertenecen a la subpoblación linfocitaria Th2. Claramente se observa que hay un predominio de la respuesta Th1 hasta el día 21 posterior a la inoculación, a partir del día 28 la intensidad de la respuesta Th2 es mayor, teniendo en cuenta que mientras la respuesta sea Th1 la protección hacia la enfermedad será mayor y decaerá la protección mientras mas intensa sea la respuesta Th2

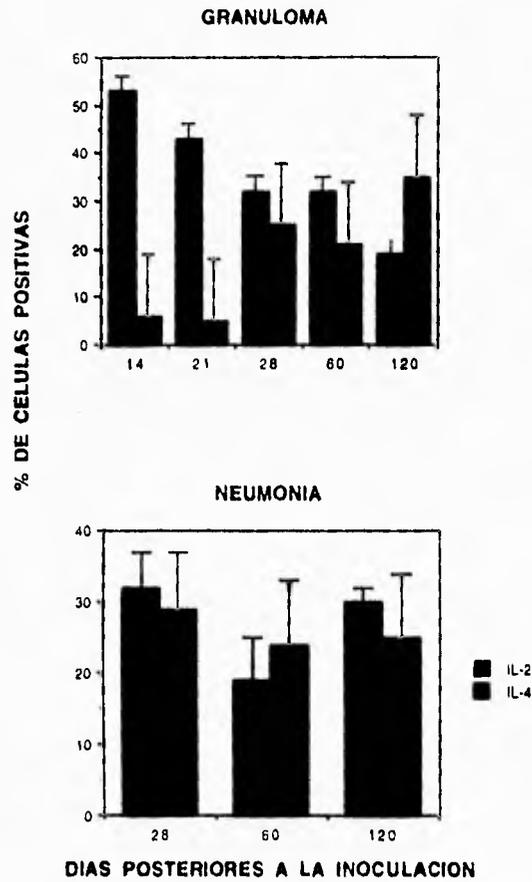


Figura 9. El porcentaje de los linfocitos de cada subpoblación que constituye a los granulomas y en las zonas de neumonía, están relacionados con la protección que brinda el sistema inmunológico del ratón, ya que del día 14 al 21 posteriores a la inoculación, aparecen los granulomas que reflejan un efecto protector, éstos están constituidos en mayor proporción por linfocitos Th1. En el periodo comprendido del día 28 al 60 posteriores a la inoculación, la subpoblación Th2 aumenta, lo que se refleja en la aparición y extensión de las zonas neumónicas. Hacia el día 120 la cantidad de linfocitos de ambas subpoblaciones, es equivalente

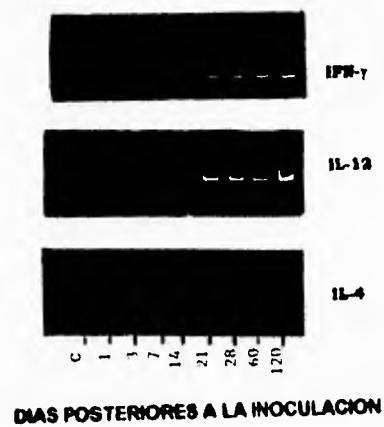


Figura 10. La determinación de la cinética de expresión genética de las interleucinas IFN- γ , IL-12 e IL-4, presentes en los linfocitos de los pulmones infectados por *M. tuberculosis*. Existe expresión basal de IL-4 en ratones normales. IFN- γ e IL-12 no se expresan de forma basal, y sólo se presentan ante el estímulo inflamatorio provocado por la micobacteria, el mensaje de codificación de dichas citocinas, aumenta en la misma intensidad ya que una promueve la aparición de la otra.

FALLA DE ORIGEN

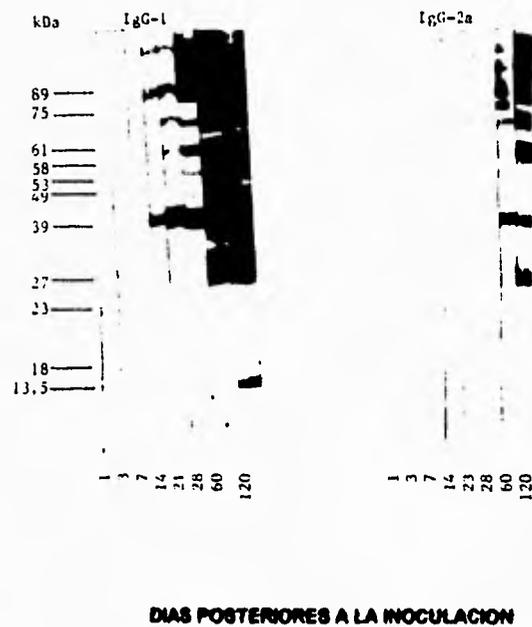


Figura 11. La detección de las subclases de Inmunoglobulinas IgG-1 e IgG-2a, dirigidas a antígenos micobacterianos presentes en el suero de los ratones, permite indirectamente estudiar la actividad moduladora de las subpoblaciones linfocitarias Th1 y Th2 sobre la respuesta inmunológica. Es evidente que la respuesta Th2 (IgG-1) es más intensa desde el día 14 posterior a la inoculación, que la respuesta Th1 (IgG-2a) la cual es también importante en los días 60 y 120 posterior a la inoculación intratraqueal de *M. tuberculosis*.

FALLA DE ORIGEN

SUBCLASES DE IgG EN TUBERCULOSIS PULMONAR EXPERIMENTAL

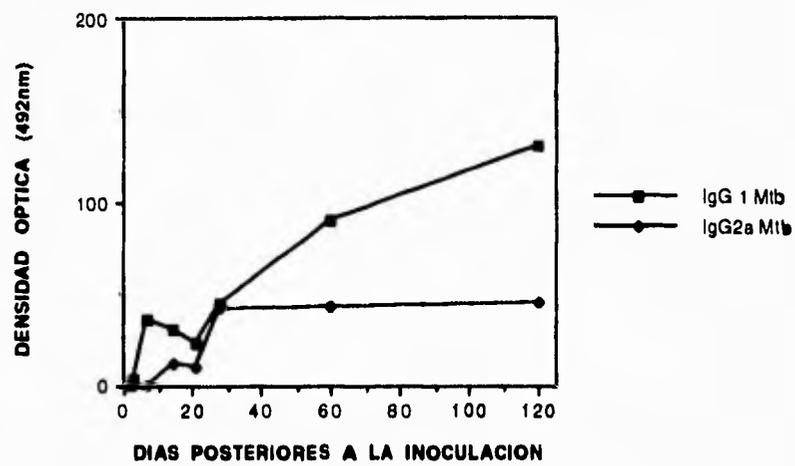


Figura 12. La cinética de aparición de las subclases de inmunoglobulinas IgG-1 e IgG-2a, permite inferir el balance de las subpoblaciones Th1 y Th2. La subpoblación Th1 mantiene niveles casi constantes de la IgG-2a a partir del día 28 posterior a la inoculación, Por su parte, la subpoblación Th2 muestra su efecto inductor desde el día 3 y mantiene una cinética lineal hasta el final del experimento.

2.4 Discusión

Histopatología, inmunohistología y morfometría de las lesiones pulmonares.

Un día después de la inoculación intratraqueal de *M. tuberculosis* H37Rv., la respuesta inflamatoria se localiza principalmente en el intersticio, observándose una imagen de ensanchamiento de este compartimento anatómico (Fig. 2A " a "), existe también infiltrado inflamatorio en la pared de los vasos sanguíneos, particularmente las vénulas, (Fig. 2A " c "). Aunque a este tiempo, la inflamación de la región peribronquial no es tan evidente como la de los otros dos compartimentos anatomopatológicos, ésta también existe y está constituida predominantemente por linfocitos (Fig. 2A " b "). En el estudio inmunohistoquímico, se muestra que las células IL-2 positivas son las más abundantes, sólo escasas células IL-4 positivas se observan en el intersticio (Fig. 2B y C) (Fig. 8). Los cortes del tercer día poseen una imagen histológica similar, mientras que en el día 7 la inflamación disminuye, tan solo algunas vénulas muestran extravasación de elementos inflamatorios y el intersticio también muestra disminución de la presencia de células inflamatorias, el tejido linfoide asociado a la mucosa bronquial exhibe hiperplasia leve. En el día 14 la imagen histológica se modifica debido a la presencia de mayor inflamación, tanto en el intersticio (Fig. 3D " d "), como en el tejido linfoide asociado a bronquios y a la pared de los vasos sanguíneos (Fig. 3D " a, b, d ").

Es además notable la presencia de granulomas pequeños localizados tanto en la pared de los vasos sanguíneos, bronquios e intralveolares

(Fig. 3D " c, b "), dichos granulomas están constituidos predominantemente por linfocitos y macrófagos con ocasionales leucocitos polimorfonucleares. El estudio inmunohistoquímico muestra que la mayoría de linfocitos que constituyen al granuloma, son positivas para IL-2 (Fig. 3E " a, b "), y que en menor número están constituidos por los linfocitos productores de IL-4 (Fig. 3F " a "). En el día 28 los granulomas incrementan su tamaño (Fig. 4G " b "), sobre todo los asociados a las paredes de bronquios y vasos sanguíneos (Fig. 4G " a "), en ellos aparecen ya células gigantes, las cuales son más frecuentes en los granulomas intralveolares, la inflamación intersticial y perivascular también se incrementa. El análisis inmunohistológico muestra que, los linfocitos productores de IL-2 e IL-4 se encuentran casi en la misma proporción (Fig. 8), conforman granulomas junto con macrófagos de aspecto epitelioides, además de que la inflamación ha conformado zonas de consolidación neumónica, que afectan aproximadamente el 32% de la superficie pulmonar (Fig. 9). Dos meses después de la inoculación intratraqueal de *M. tuberculosis*, la lesión es más extensa, los granulomas son de mayor tamaño y en algunas áreas confluyen produciendo lesiones más grandes, el cambio histopatológico más importante es la presencia de áreas neumónicas más extensas (Fig. 5J " a "), constituidas por la presencia de exudado proteico intralveolar (Fig. 5J " b "), con abundantes macrófagos, linfocitos, leucocitos polimorfonucleares y células gigantes multinucleadas; el intersticio en estas áreas está ostensiblemente ensanchado debido a la presencia de abundantes células inflamatorias (Fig. 5J " c "); los vasos sanguíneos y vías aéreas localizadas en estas áreas se fusionan a las zonas de consolidación alveolar. En cuanto a las

inmunohistoquímicas para la IL-4 (Fig. 5L " a ") e IL-2 (Fig. 5K " a ") se observa que el número de linfocitos productores para la IL-2 se encuentran en mayor proporción que los linfocitos productores de IL-4; sin embargo, en ambos casos los linfocitos que constituían el mayor porcentaje de células en los granulomas, han sido desplazados por los macrófagos, con distinto grado de maduración. Las áreas de consolidación neumónica son aún más extensas en los pulmones de 4 meses de infección, en donde son evidentes también pequeños granulomas. (Fig. 6Q " a ";P " a "), Las áreas neumónicas llegan a constituir el 90% de los animales con 4 meses de infección, en donde además hay extensa fibrosis (Fig. 6M " b "), la sobrevivencia de los animales en este momento es del 5% al 10%. Los linfocitos productores de IL-4 se encuentran en mayor proporción que los linfocitos productores de IL-2 (Fig. 6O; Q)

Determinación del ARN de citocinas por RT-PCR.

No se observó mensaje genético de IFN- γ en el animal control sin infección pulmonar, un día después éste se hizo presente, se incrementó en el día 3, desapareció en el día 7 en coexistencia con la disminución de la inflamación, volvió a aparecer con gran intensidad en el día 14 y continuó incrementándose progresivamente hasta el día 120, momento en el cual se observó su máxima intensidad (Fig. 10). La misma cinética se observó para la IL-12. La cinética de IL-4 fue diferente, ya que se observó una pequeña pero evidente expresión de esta interleucina en el pulmón normal, en el día 1 incrementó su nivel pero éste se mantuvo bajo y con poca variación hasta el día 21, posteriormente en el día 28 su nivel aumentó notablemente y continuó

incrementándose hasta el día 120 en el que también llegó a su máximo nivel de expresión (Fig. 10).

Estudio de la influencia de las subpoblaciones linfocitarias Th1 y Th2 en las subclases de inmunoglobulinas IgG-1 e IgG-2a por ELISA y Western blot.

El análisis por Western blot muestra la presencia de pocas bandas producto del reconocimiento antigénico en el día 14, para ambas clases de inmunoglobulinas, siendo más evidente para la IgG1. Posteriormente, el número de bandas se incrementó, siendo siempre de mayor intensidad las reconocidas por la subclase IgG-1 (Fig. 11). Estos resultados se confirman por el estudio de ELISA, el cual muestra mayor concentración de IgG-1 sobre todo en los 60 y 120 días de la infección, con lo que se demuestra una gran actividad de Th2 (Fig. 12).

Cinética de reactividad de la inmunidad celular estudiada por pruebas de hipersensibilidad retardada, sensibilidad al TNF.

La respuesta de hipersensibilidad retardada se detectó en el día 7 y alcanzó su máxima actividad en el día 21. Dicha respuesta disminuyó paulatinamente con un valor similar al del día 7 al mes de infección, posteriormente disminuyó todavía más, llegando a su nivel más bajo en el día 120.

TNF recombinante de ratón se inyectó inmediatamente después de haber medido la hipersensibilidad cutánea retardada. El cojinete se midió de nuevo 20 h después. La inyección del TNF no produjo más inflamación entre el día 1 y 28 de la infección, pero fue más del doble en los días 60 y 120, cuando la respuesta de hipersensibilidad fue menor.

La evolución de la patología pulmonar en este modelo de tuberculosis experimental, se divide en dos fases. La primera de ellas es la fase aguda que se caracteriza por inflamación del intersticio alveolar, perivascular y peribronquial, con abundante presencia de macrófagos en el lumen alveolar, y la formación de granulomas que se inicia a mediados de esta fase.

De acuerdo a los resultados de las inmunohistoquímicas y el RT-PCR, se observa en esta fase un predominio de las células Th1, ya que las células productoras de IL-2 son numerosas en el infiltrado inflamatorio y en los granulomas; de la misma forma, la expresión genética de IFN- γ e IL-12, es evidente desde el primer día de la inoculación, los niveles se incrementan gradualmente, en correlación con la alta respuesta de la DTH, la cual alcanza su máximo al día 14 y 21 cuando los granulomas se han constituido plenamente. En comparación, la presencia y expresión funcional de los linfocitos Th2 es muy escasa en la fase aguda porque a pesar de que la expresión genética de IL-4, comienza desde el primer día de inoculación y está presente en el ratón control no infectado, estos niveles son bajos y permanecen constantes durante el primer mes, son pocas las células positivas para IL-4 en el infiltrado inflamatorio y en los granulomas.

La segunda fase de la enfermedad corresponde a la fase crónica o fase avanzada, ésta comienza a los 2 meses posteriores a la inoculación y continúa hasta el corte del experimento, cuando el 80% a 90% de los ratones ha muerto.

Histopatológicamente esta fase está caracterizada por neumonía y fibrosis intersticial que son las manifestaciones de severidad y cronicidad, respectivamente. Esta fase crónica está dominada por un balance Th0 evidente, con la simultánea elevación de la expresión genética del mensaje de IFN- γ e IL-4. El estudio inmunohistoquímico muestra un balance proporcional de los linfocitos IL-2, IL-4 positivos, que constituyen a las áreas neumónicas, con una clara predominancia de los últimos en los granulomas, los cuales en este momento son pocos, debido a que la mayoría de ellos están integrados a las áreas neumónicas, la cual afecta del 70%-80% de la superficie pulmonar.

En la fase crónica se mantiene una alta expresión genética de IFN- γ , pero al mismo tiempo hay un importante decaimiento de DTH y altos títulos de inmunoglobulinas de las subclases IgG1 e IgG2a en contra de las micobacterias.

Al comienzo de la infección, el predominio de un patrón Th1 es evidente, pero cuando la enfermedad avanza, el desarrollo de la respuesta tipo 2, lleva al establecimiento de la respuesta Th0. En consecuencia, un alto título de anticuerpos en el suero con una DTH disminuida y daño anatómico extenso, se produce aparentemente por un inadecuado balance Th1/Th2, que probablemente permite persistencia de la infección y progresión de la enfermedad.

Una observación importante, es que durante la fase crónica no hay supresión de la respuesta Th1, al menos al nivel de la expresión genética y en la cantidad de las células positivas para la producción de IL-2 en las lesiones, porque los niveles de ARNm del IFN- γ y el número de células positivas para la producción de IL-2 es muy alto. Sin embargo, es posible que su eficiencia esté reducida, por los altos niveles de citocinas secretados por las células Th2, tal es el caso de la IL-4, que evita la activación macrofágica por IFN- γ .

De cualquier forma, la cronicidad y severidad no están asociadas al decaimiento de la secreción de citocinas de los linfocitos Th1, mucho menos a la disminución de la producción de los inductores de las citocinas Th1 como la IL-12. Sin embargo, no es posible descartar que la traducción del ARNm de las citocinas pueda estar bloqueada y, en consecuencia, no existe la capacidad de secreción de estas citocinas, lo cual es poco probable debido a que las técnicas inmunohistoquímicas detectan el producto proteico terminal y como se mostró, hay una correlación muy clara entre los resultados inmunohistológicos y los del RT-PCR.

Otra consecuencia clínica y patológica del inadecuado balance Th1/Th2 en tuberculosis, es la producción de áreas necróticas de tejido. Esta es la evidencia de que las lesiones inflamatorias mediadas por la mezcla de actividades de Th1/Th2 son propensas a desarrollar necrosis.^{7,33}

Cuando se presenta el inadecuado balance de las subpoblaciones Th1/Th2, la cantidad de citocinas secretadas aumenta y se acumula en los infiltrados inflamatorios y granulomas, permitiendo que las citocinas dañen al tejido en el que se encuentran presentes y al persistir dicha acción, se

desarrolla la necrosis de la zona, este evento se ve favorecido en el periodo crónico de la enfermedad por el establecimiento de una respuesta tipo Th0 que conlleva un aumento en la secreción del TNF y una disminución de la DTH, lo anterior no se observa mientras prevalece una respuesta Th1 ya que la secreción del TNF está disminuida y la DTH está elevada, con lo que se evita el desarrollo de la necrosis del tejido.

En cuanto a la disminución observada hacia los 7 días posteriores a la inoculación en casi todas las gráficas, puede explicarse por la eficiencia en la eliminación de partículas extrañas en el pulmón, como el movimiento ciliar y la fagocitosis por macrófagos alveolares, estos mecanismos podrían estar relacionados con una eficiente eliminación de gran parte de las bacterias inoculadas; es posible que se produzca un proceso de selección que permita elegir a las micobacterias más virulentas, lo que explica que después de ese tiempo se observa un incremento logarítmico de la micobacteria.

Es posible que un alto número de microorganismos pueda conducir a la respuesta Th2 o Th1, pero otros factores también pueden participar en este fenómeno, como por ejemplo las alteraciones endocrinológicas, de hecho, se observó atrofia extensa de las adrenales en la fase crónica de este modelo.

Los resultados que se han expuesto en esta tesis, se han obtenido *in vivo*, en pulmones de animales infectados con una cepa de *M. tuberculosis* viva y virulenta, lo cual permite que la bacteria exprese la mayoría de sus antígenos y metabolitos durante el curso de la enfermedad adquirida por vía aérea, esto reproduce muy de cerca a los eventos que se darían en la enfermedad humana, ya que la micobacteria viva y la muerta no presentan la

misma capacidad antigénica y la mayoría de los modelos de tuberculosis publicados utilizan formas de inoculación por las cuales sería materialmente imposible infectarse de forma natural (inyección intraperitoneal y/o intravenosa).

Otra observación interesante, es la detección de la expresión de información genética para IL-4 en los controles negativos (ratones normales, no infectados), lo que puede sugerir que la expresión de pequeñas cantidades de la IL-4, pudiera contribuir a abatir la respuesta inmunológica celular en el pulmón hacia estímulos antigénicos con los que frecuentemente confrontamos. Por inmunohistoquímica se pudieron detectar escasas células productoras de IL-4 en el intersticio, por lo que es posible que algunos linfocitos que normalmente habitan en el pulmón puedan producir constitucionalmente IL-4.

IV. CONCLUSIONES

El modelo experimental de tuberculosis pulmonar, puede permitirnos estudiar diferentes facetas de los mecanismos inmunopatológicos de una enfermedad de extraordinaria importancia médica: la tuberculosis; mostrando la importancia de diversos mecanismos inmunopatológicos participantes.

Las subpoblaciones linfocitarias están asociadas a los fenómenos de protección inmunológica. En el periodo en el cual la subpoblación linfocitaria Th1 predomina en la respuesta inmunológica, que comprende desde la inoculación del ratón con *M. tuberculosis* hasta los 28 días posteriores a la inoculación, se manifiesta la formación de granulomas en el día 14 y hasta el día 21, lo cual se correlaciona con la alta respuesta de DTH, además de que influye en la síntesis de IgG2a y en la expresión genética del IFN- γ e IL-12 la cual aumenta linealmente, de la misma forma que la cantidad de células IL-2 positivas en las lesiones pulmonares.

En el caso del predominio de la subpoblación linfocitaria Th2 en la respuesta inmunológica, el patrón de protección disminuye, este periodo está comprendido desde los 2 meses posteriores a la inoculación y hasta el corte del experimento, anatomopatológicamente se caracteriza por neumonía y fibrosis, lo cual se correlaciona con disminución de la respuesta de DTH, además de que la síntesis de IgG1 aumenta por la influencia de la subpoblación Th2, y los linfocitos IL-4 positivos en las lesiones pulmonares.

La respuesta inmunológica hacia el final del experimento no se puede considerar como Th2 pura, dado que la expresión genética del IFN- γ e IL-12 se hace más intensa, del mismo modo la expresión genética de la IL-4 se ve aumentada; la secreción de IL-4 por las células Th2 y la secreción de IL-2 por las células Th1 en este punto, evidencia un patrón de respuesta inmunológica tipo Th0

Se sugiere que un inadecuado balance de las subpoblaciones linfocitarias Th1/Th2, puede relacionarse al daño tisular y que la protección inmunológica no sea la adecuada, para la erradicación total de la micobacteria.

V. APÉNDICE

ABREVIACIONES UTILIZADAS

- **ATS** Medio de cultivo de la American Toraxic Society
- **CSF** Factor estimulante de colonias
- **ADNc** Cadena complementaria del ácido desoxirribonucleico
- **DTH** Hipersensibilidad retardada
- **ELISA** Ensayo inmunoenzimático asociado a inmunoabsorción
- **IEL** Linfocitos intraepiteliales
- **IFN- γ** Interferón gamma
- **IgG-1** Subclase 1 de inmunoglobulina G
- **IgG-2a** Subclase 2a de inmunoglobulina G
- **IL-1** Interleucina 1
- **IL-2** Interleucina 2
- **IL-4** Interleucina 4
- **IL-6** Interleucina 6
- **IL-8** Interleucina 8
- **IL-12** Interleucina 12
- **LAM** Lipoarabinomanan

- MHC Complejo principal de histocompatibilidad
- MOTT Otras bacterias diferentes a la de la tuberculosis.
- NK Células NK
- O.M.S. Organización Mundial de la Salud
- PBS Amortiguador de fosfatos salino
- PNG Polimorfonucleares granulosos
- PPD Derivado proteínico purificado
- RNI Metabolitos reactivos del nitrógeno
- ROI Metabolitos reactivos del oxígeno
- RT-PCR Reacción en cadena de la polimerasa dependiente de la transcriptasa reversa
- SOD Superóxido Dismutasa
- Th0 Subpoblación linfocitaria de células T clase 0
- Th1 Subpoblación linfocitaria de células T clase 1
- Th2 Subpoblación linfocitaria de células T clase 2
- TNF Factor de necrosis tumoral

VI. BIBLIOGRAFÍA

1. Abbas, Abul K., Lichtman Andrew H., Pober Jordan S. 1994. Cellular and molecular immunology. Second Edition. Ed Saunders; United States of América.
2. Aldovini, A., Young R. A. 1991. Humoral and cell-mediated immune response to live recombinant BCG-HIV vaccines. *Nature* 351:479-82.
3. Augustin, A., Kubo, R.T., Sim, G. K. 1989. Resident pulmonary lymphocytes expressing the γ/δ T-cell receptor. *Nature* 340:239-41.
4. Baggiolini M., Walz, A., Kinkcl, S. L. 1989. Neutrophil-activating peptide-1 interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils. *J. Clin Invest* 84:1045-49.
5. Barnes, Peter F., C. L. Grisso, J. S. Abrams, H. Band, T. H. Rea and R. L. Modlin. 1992. $\gamma\delta$ T lymphocytes in human tuberculosis. *J. Infect. Dis.* 165:506-512.
6. Barnes, Peter F., J. S. Abrams, S. Lu, P. A. Sieling, T.H. Rea and R. L. Modlin. 1993. Patterns of cytokine production by mycobacterium-reactive human T-cell clones. *Infect. Immun.* 61:197-203.
7. Barve, Shirish S., D. A. Cohen, A. De Benedetti, R. E. Rhoads and A. M. Kaplan. 1994. Mechanism of differential regulation of IL-2 in murine Th1 and Th2 T cell subsets. *J. Immunol.* 152:1171-1181.

8. Bendinelli, Mauro y Friedman Herman. 1988. Mycobacterium tuberculosis interaction with the immune system. Ed Plenum Press. New York
9. Bloom BR, Murray CJL. 1992. Tuberculosis:Commentary on a reemergent Killer. Science 257:1055-1064.
10. Bloom, B. R., Modlin, R. L., Salgame, P. 1992. Stigma variations: observations on suppressor T cell and leprosy. Annu Rev Immunol. 10:453-88.
11. Bogen Steve A., I. Fogelman, and Abul K. Abbas. 1993. Analysis of IL-2, IL-4, and IFN- γ -Producing Cells in situ during immune responses to protein antigens. J. Immunol. 150: 4197-4205
12. Boom, W. H., R. S. Wallis and K. A. Chervenak. 1991. Human Mycobacterium tuberculosis-Reactive CD4+ T-cell clones: heterogeneity in antigen recognition, cytokine production, and cytotoxicity for mononuclear phagocytes. Infect. Immun. 59:2737-2743.
13. Bucy, R. Pat., A. Panoskaltis-Mortari, Guo-qiang Huang, J. Li, L. Karr, M. Ross, J. H. Russell, K. M. Murphy and C. T. Weaver. 1994. Heterogeneity of single cell cytokine gene expression in clonal T cell populations. J. Exp. Med. 180:1251-1262.
14. Buchanan, R.E., and N.E. Gibbons (Eds.). 1984. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 8th ed. The Williams & Wilkins Co., Baltimore.

15. Clark, Edward A. And J. A. Ledbetter. 1994. How B and T cells talk to each other. *Nature*. 367:425-428.
16. Conlan, J.W., North, R. J. 1991. Neutrophil-mediated dissolution of infected host cell as a defense strategy against a facultative intracellular bacterium. *J. Exp. Med.* 174:741-44
17. Constant, Patricia., F. Davodeau, M. A. Peyrat, Y. Poquet, G. Puzo, M. Bonneville, J. J. Fournié. 1994. Stimulation fo human $\gamma\delta$ T cells by nonpeptidic Mycobacterial Ligands. *Science*. 264:267-270.
18. Cooper, C. L. Mueller, C., Sinchaisri, T. A., et al. 1989. Analysis of naturally occurring delayed type hypersensitibity reactions in leprosy by in situ hibridization *J. Exp. Med.* 169:257-63.
19. Crowle AJ, Ross EJ, May MH. 1987. Inhibition by 1,25(OH)₂-vitamin D₃ of the multiplication of virulent tubercle bacilli in cultured human macrophages. *Infect Immun.* 62:229-234.
20. Chatterjee, D., Robert, A. D., Lowell, K., Brennan, P. J., Orme, I. M. 1992. Structural basis of capacity of lipoarabinomanan to induce secretion of tumor necrosis factor. *Infect immun* 60:1249-53.
21. D'Arcy Hart, P. Young, M. R. 1991. Ammonium chloride a inhibitor of phagosome-lysosome fusion in macrophages, concurrently induce phagosome-endosome fusion, and opens a novel pathway: studies of a pathogenic Mycobacterium and nonpathogenic yeast. *J. Exp. Med.* 174:881-89.

22. Dannenberg, A. M. Jr. 1991. Delayed type hypersensitivity and cell-mediated immunity in the pathogenesis of tuberculosis. *Immunol. Today*. 12:228-33.
23. Del Prete, Gianfranco F., M. De Carli, C. Mastromauro, R. Biagiotti, D. Macchia, P. Falagiani, M. Ricci and S. Romagnani. 1991. Purified protein derivative of Mycobacterium tuberculosis and excretory-secretory antigen(s) of Toxocara canis expand in vitro human T cells with stable and appropriate (type 1 T helper or type 2 T helper) profile of cytokine production. *J. Clin. Invest.* 88:346-350.
24. DeLibero, G., Flesh, I., Kaufmann, S. H. E. 1988. Mycobacteria reactive Lyt2+ T cell lines. *Eur J Immunol* 18:59-66.
25. Denis, M. 1991. Involvement of cytokines in determining resistance and acquired immunity in murine tuberculosis *J. Leuk Biol* 50:495-501
26. Farga, Victorino. Tuberculosis. 1992. 2a. Ed. Editorial Mediterráneo, Santiago de Chile..
27. Flesh, I. E. A., Kauffman, S. H. E. 1990. Activation of tuberculostatic macrophage functions by Interferon- γ Interleukin 4 and tumor necrosis factor. *Infect. Immunol.* 58:2675-77.
28. Follows, George A., M. E. Munk, A. J. Gatrill, P. Conradt and S. H. E. Kaufmann. 1991. Gamma interferon and interleukin 2, but not interleukin 4, are detectable in γ/δ T-cell culture after activation with bacteria. *Infect. Immun.* 60:1229-1231.

29. Goren, M.B. 1972. Mycobacterial lipids: selected topics. *Bacteriol. Rev.* 36:33-64.
30. Hahn H, Kaufmann SHE. 1981. The role of cell mediated immunity in bacterial infections. *Rev. Infect. Dis.* 3:1221-1250.
31. Hannen, B. A. G., R. W. Malefijt, P. C. M. Res, E. M. Kraakman, T. H. M. Ottenhoff, R. R. P. de Vries and H. Spits. 1991. Selection of a human T helper type 1-like T cell subset by mycobacteria. *J. Exp. Med.* 174:583-592.
32. Havlir, D. V., Ellner, J. J., Chervenak, K.A., Boom, W. H. 1991 selective expansion of human γ/δ cells by monocytes infected with live *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Invest.* 87:729-33.
33. Hernandez-Pando R. And G. A. W. Rook. 1994. The role of TNF- α in T-cell-mediated inflammation depends on the Th1/Th2 cytokine balance. *Immunology.* 82:591-595.
34. Hoepelman AIM, Tuomanen EI. 1992. Consequences of microbial attachment: directing host cell functions with adhesins. *Infect. Immun.* 60:1729-1733
35. Inoue, Takehiko., Y. Yoshikai, G. Matsuzaki and K. Nomoto. 1991. Early appearing γ/δ -bearing T cells during infection with Calm tte Guérin bacillus. *J. Immunol.* 146:2754-2762.
36. Janeway, C. A. 1992. The T cells as a multicomponent signalling machine: CD4/CD8 coreceptors and CD45 in T cell activation. *Annu. Rev. Immunol.* 10:645-74.

37. Janis, Eric M., S. H. E. Kaufmann, R. H. Schwartz, D. M. Pardoll. 1989. Activation of $\gamma\delta$ T cells in the primary immune response to Mycobacterium tuberculosis. *Science*. 244:713-716.
38. Jardim, Armando., J. Alexander, H. S. Teh, D. Ou and R. W. Olafson. 1990. Immunoprotective Leishmania major synthetic T cell epitopes. *J. Exp. Med.* 172:645-648.
39. Kaufmann Steffan H.E..1993 Immunity to intracellular bacteria. *Annu. Rev. Immunol.* 11:129-63.
40. Kaufmann, Stefan H.E..1995. Immunity to intracellular microbial pathogens. *Immunology Today*. 16:7:338-342.
41. Lancaster, Joanne-Sloan, B. D. Evavold and P. M. Allen. 1994. Th2 cell clonal anergy as a consequence of partial activation. *J. Exp. Med.* 180:1195-1205.
42. Leake, E.S., Myrvik, Q.N., 1984. Phagosomal membranes of Mycobacterium bovis BCG-immune alveolar macrophages are resistant to disruption by Mycobacterium tuberculosis. *Infect. Immun.* 45:443-46.
43. Maggi, Enrico., P. Parronchi, R. Manetti, C. Simonelli, M. P. Piccinni, F. S. Rugiu, M. De Carli, M. Ricci and S. Romagnani. 1992. Reciprocal regulatory effects of IFN- γ and IL-4 on the in vitro development of human Th1 and Th2 clones. *J. Immunol.* 148:2142-2147.

44. Mosman, T. R., Coffman, R. L. 1989. TH1 and TH2 cells: Different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu. Rev. Immunol.* 10:645-74.
45. Mutis, Tuna., Kraakman, Elizabeth M., Cornelisse, Yolante E., Haanen, John B.A.G., Spits, Hergen, Vries, René R.P. De., and Ottenhoff, Tom H.M..1993. Analysis of cytokine production by Mycobacterium-Reactive T cells. *J. Immunol.* 150:4641-4651.
46. Nabors, G. S., L. C. C. Afonso, J. P. Farrell and P. Scott. 1995. Switch from a type 2 to a type 1 T helper cell response and cure of established Leishmania major infection in mice is induced by combined therapy with interleukin 12 and Pentostam. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92:3142-3146.
47. Nakayama, Kei-ichi., K. Nakayama, I. Negishi, K. Kuida, M. C. Louie, O. Kanagawa, H. Nakauchi, D. Y. Loh. 1994. Requirement for CD8 β chain in positive selection of CD8-lineage T cells. *Science.* 263:1131-1133.
48. Navarro-Reynoso F., Cicero Sabido R. 1995. La tuberculosis pulmonar a través del tiempo. Una síntesis histórica. *Rev. Inst. Nal. Enf. Resp. Méx.* 8: 72-82.
49. Onwubalili, J. K., G. M. Scott and J.A. Robinson. 1985. Deficient immune interferon production in tuberculosis. *Clín. Exp. Immunol.* 59:405-413.

50. Orme, I. M., Miller, E. S., Roberts, A. D., Furney, S. K., Griffin, J. P., Dobos, K. M., Chi D., Rivoire, B., Brennan, P.J. 1992. T lymphocytes mediating protection and cellular cytotoxicity during the course of Mycobacterium tuberculosis infection. *J. Immunol.* 148:189-96.
51. Orme, Ian M., Roberts, Alan D., Griffin, John P., and Abrams John S.. 1993. Cytokine secretion by CD4 T lymphocytes acquired in response to Mycobacterium tuberculosis infection. *J. Immunol.* 151:518-525.
52. Oswald, I. P., R. T. Gazzinelli, A. Sher and S. L. James. 1992. IL-10 synergizes with IL-4 and transforming growth factor- β to inhibit macrophage cytotoxic activity. *J. Immunol.* 148:3578-3582.
53. Pabst, M. J., Gross, J. M., Brozna, J. P., Goren, M. B. 1988. Inhibition of macrophage priming by sulfatide from Mycobacterium tuberculosis. *J. Immunol.* 140:634-40.
54. Pedrazzini, T., Louis, J. A. 1986 Functional analysis in vitro and in vivo of Mycobacterium bovis strains BCG-specific T cell clones. *J. Immunol.* 136:1828-34.
55. Quill, Helen., A. Bhandoola, G. Trinchieri, J. Haluskey and D. Peritt. 1994. Induction of interleukin 12 responsiveness is impaired in anergic T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 179:1065-1070.
56. Ramakrishnan, T., P. S. Murthy, and K. P. Gopinathan. 1972. Intermediary metabolism of mycobacteria. *Bacteriol. Rev.* 36:65-108.
57. Roitt Ivan, Brostoff Jonathan, Male David. 1993. Immunology. Third Edition. Ed. Mosby; England.

58. Rook G.A.W. and Attitah R. Al. 1991. Cytokines and the Koch phenomenon. *Tubercle*. 17:13-20
59. Rook G.A.W. 1988. The role of vitamin D in Tuberculosis (Editorial) *Am. Rev. Resp. Dis.* 138:768-770
60. Rook GAW Steele J, Fraher L et al. 1986. Vitamin D3 gamma interferon, and control of proliferation of Mycobacterium tuberculosis by human monocytes. *Immunology* 57:159-163.
61. Roth, Michael D. 1994. Interleukin 2 induces the expression of CD45RO and the memory phenotype by CD45RA+ peripheral blood lymphocytes. *J. Exp. Med.* 179:857-864.
62. Runyon EH: Anonymous mycobacteria in pulmonary disease. 1959. *Med Clin North Am.* 43:273.
63. Saha, Bhaskar., G. Das, H. Vohra, N. K. Ganguly and G. C. Mishra. 1994. Macrophage-T cell interaction in experimental mycobacterial infection. Selective regulation of co-stimulatory molecules on Mycobacterium-infected macrophages and its implication in the suppression of cell-mediated immune response. *Eur. J. Immunol.* 24:2618-2624.
64. Salgame, Padmini., J. S. Abrams, C. Clayberger, H. Goldstein, J. Convit, R. L. Modlin, Barry R. Bloom. 1991. Differing lymphokine profiles of functional subsets of human CD4 and CD8 T cell clones. *Science.* 254:279-282.

65. Schlesinger LAS, Bellinger-Kawahara CG, Payne NR, Horwitz ME. 1990. Phagocytosis of Mycobacterium tuberculosis is mediated by human monocyte complement receptors and complement component C'3. *J. Immunol.* 144:2771-2780.
66. Schlossberg D. 1988., Tubercucosis, 2nd ed. New York:Springer Verlag,
67. Sieling, Peter A., Abrams, John S., Yamamura, Masahiro., Salgame, Padmini, Bloom, Barry R., Rea, Thomas H., and Modlin, Robert L.. 1993. Immunosuppressive roles for IL-10 and IL-4 in human infection. *J. Immunol.* 150:5501-5510.
68. Sthal PD. 1992. The mannose receptor and other macrophage lectins. *Curr. Opin. Immunol.* 4:49-52
69. Street, Nancy E., J. H. Schumacher, T. A. T. Fong, H. Bass, D. F. Fiorentino, J. A. Leverah and T. R. Mosmann. 1990. Heterogeneity of mouse helper T cells. *J. Immunol.* 144:1629-1639.
70. Surcel, H. M., M. T. Blomberg, S. Paulie, G. Andersson, C. Moreno, G. Paslov and J. Ivanyi. 1994. Th1/Th2 profiles in tuberculosis, based on the proliferation and cytokine response of blood lymphocytes to mycobacterial antigens. *Immunology.* 81:171-176.
71. Tscopoulos, Anne., Q. Hamid, V. Varney, S. Ying, R. Moqbel, S. R. Durham and A. B. Kay. 1992. Preferential messenger RNA expression of Th1-type cells (IFN- γ +, IL-2+) in classical delayed-type (tuberculin) hypersensitivity reactions in human skin. *J. Immunol.* 148:2058-2061.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

72. Tsuyuguchi, I., Kawasumi, H., Ueta, C., Yano, I., Kishimoto, S. 1991
Increase of T cell receptor γ/δ -bearing T cell in cord blood of new born babies obtained by *in vitro* stimulation with micobacterial cord factor. *Infect. Immun.* 59:3053-59.
73. Vordermeier, H. Martin., D. P. Harris, C. Moreno and J. Ivanyi. 1994.
Promiscuous T cell recognition of a H-2 IA-presented mycobacterial epitope. *Eur. J. Immunol.* 24:2061-2067.
74. Vordermeier, Hans-M., D. P. Harris, G. Friscia, E. Román, H. M. Surcel, C. Moreno, G. Pasvol and J. Ivanyi. 1992. T cell repertoire in tuberculosis: selective anergy to a immunodominant epitope of the 38-kDa antigen in patients with active disease. *Eur. J. Immunol.* 22:2631-2637.
75. Weiss, S. J. 1989. Tissue destruction by neutrophils. *N. Eng. J. Med.* 170:27-37.
76. William E. Paul., 1993. *Fundamental Immunology*, 3rd Edition. Ed. Raven Press, New York, N.Y.
77. Yamamura, Masahiro., K. Uyemura, R. J. Deans, K. Weinberg, T. H. Rea, B. R. Bloom, R. L. Modlin. 1991. Defining protective responses to pathogens: cytokine profiles in leprosy lesions. *Science.* 254:277-279.