



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Detección del Plasminógeno/Plasmina en la
infección por Mycobacterium tuberculosis en
un modelo murino**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A :

RODRÍGUEZ FLORES EDÉN MARCELA

DIRECTOR DE TESIS: DRA. CLARA INÉS ESPITIA PINZÓN

2004



FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR





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.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA



Recibido en la División de Estudios Profesionales de la
 Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México el día
 10/05/04
 Edén Marcela Rodríguez Flores
 10/05/04
 [Firma]

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:
 "Detección del Plasminógeno/Plasmina en la infección con Mycobacterium
tuberculosis en un modelo murino".
 realizado por Edén Marcela Rodríguez Flores

con número de cuenta 9717751-3 , quien cubrió los créditos de la carrera de:
 Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario

Dra. Clara Inés Espitia Pinzón *[Firma]*

Propietario

M. en C. Jaime Campuzano Granados *[Firma]*

Propietario

Dra. Luz María López Marín *[Firma]*

Suplente

I.Q. Eduardo Rodríguez Bustamante *[Firma]*

Suplente

M. en C. Ma. de los Remedios Josefina Ramírez Rangel
[Firma]

Consejo Departamental de Biología FACULTAD DE CIENCIAS

[Firma]
M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez



El presente trabajo se realizó bajo la dirección de la Dra. Clara Inés Espitia Pinzón del departamento de Inmunología en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México y con la colaboración del grupo de trabajo del Dr. Rogelio Hernández Pando del departamento de Patología Experimental del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubiran"

Dedicatoria

A mi madre por ser una mujer a quien admiro por su fuerza, inteligencia y dedicación. Gracias por todo lo que me has enseñado.

A mi padre por siempre confiar en mí, por todo su apoyo, consejos y por que siempre me haces sonreír.

A mis hermanas Daniela y Renata por ser mis amigas, escucharme, por todas esas noches de pláticas y por estar en los momentos en que las necesito.

A mi abuela Felisa por ser una de las mujeres más asombrosas y por que sé que es mi ángel. A mi abuelo Guillermo por sus regaños. A todos mis abuelos por darme la familia tan maravillosa que tengo, pero sobretodo por su cariño.

A mis tíos que siempre han estado conmigo, por todas sus enseñanzas y por todos los buenos momentos que me han regalado. A todos mis primos. A Elizabeth (Lichita) por ser mi amiga y por todas sus ocurrencias.

A Memo por motivarme a ser una mejor persona, su paciencia y por dar alegría a mi vida. Gracias por enseñarme a ver la vida de otra manera chaparro.

A Dios por ser mi fuerza, mi confianza y mi guía, por que siempre esta conmigo y por permitirme cumplir mis objetivos.

Agradecimientos.

A la Dra. Clara Espitia por permitirme realizar este trabajo, por su asesoría, por su tiempo y por darme la oportunidad de aprender.

A Jaime Campuzano por toda la ayuda que me brindo siempre que lo necesite y por todo lo que me enseñó.

Al Dr. Rogelio Hernández Pando y su grupo de trabajo y al departamento de Patología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia por su apoyo para realizar este trabajo.

A mis sinodales por su tiempo para la revisión de esta tesis y por sus consejos

A mis compañeros de laboratorio Jaime, Cristina, Toño, Pedro, Ingrid, Elizabeth, Wendy, Martha y Fernando por su orientación y por crear un ambiente de trabajo agradable.

A Vero, Memo, Claus, Rubén y Paty por su ayuda para la impresión de esta tesis.

A mis amigas amazonas Erika A, Erika S, Fabiola, Rocío, Valentina y Mónica por ofrecermme su amistad y compartir conmigo los mejores momentos de esta maravillosa carrera. A Paulina, Alejandra, Iván, Marco, Lorena, Dulce y los demás por su amistad.

A mis amigos Hino, María, Iliana, Cesar, Anita, Sandra y todos los demás por permitirme formar parte de sus vidas.

A mis profesores por compartirme su conocimiento y motivarme a seguir en este camino. A Emilio Córdova y Eduardo Rodríguez por sus consejos, paciencia y ayuda.

A Zenón Cano y Ana Flisser por ser mi ejemplo a seguir.

A la UNAM y a la Facultad de Ciencias por permitirme pertenecer a la Máxima Casa de Estudios y brindarme mi formación como Bióloga.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN

I.1 Historia de la tuberculosis.....	1
I.2 Epidemiología	
I.2.1 La tuberculosis en el Mundo.....	2
I.2.2 La tuberculosis en México.....	3
I.3 Agente causal.....	4
I.4 Tuberculosis: La enfermedad.....	5
I.5 Patogenia	5
I.6 Respuesta Inmune.....	7
I.7 Diseminación.....	9

2. ANTECEDENTES

2.1 Mecanismo de acción de bacterias invasivas.....	11
2.2 Complejo Plasminógeno / Plasmina	
2.2.1 Componentes del sistema del Plasminógeno.....	12
2.2.1.1 Plasminógeno.....	13
2.2.1.2 Plasmina.....	14
2.2.1.3 Activador de Plasminógeno tipo tisular	15
2.2.1.4 Activador de Plasminógeno tipo Uroquinasa.....	15
2.2.1.5 Activadores Bacterianos.....	16
2.2.1.6 Alfa 2-antiplasmina.....	16
2.2.2 Función fisiológica.....	17

2.3. Bacterias capaces de interactuar con el Plasminógeno.....	18
2.3. 1 Patógenos capaces de unir Plasminógeno.....	20
2.3.2 Activadores de Plasminógeno en bacterias patógenas.....	20
3. JUSTIFICACIÓN.....	21
4. HIPÓTESIS.....	22
5. OBJETIVO GENERAL.....	23
5.1. OBJETIVOS PARTICULARES.....	23
6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	24
7. MÉTODOS.....	25
8. RESULTADOS.....	29
9. DISCUSIÓN.....	36
10. CONCLUSIONES.....	38
11. PERSPECTIVAS.....	39
BIBLIOGRAFÍA.....	40
ANEXO I.....	48
ANEXO II.....	51

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Historia de la tuberculosis

La tuberculosis es una enfermedad muy antigua. Las primeras referencias que se tienen sobre la enfermedad se hallaron en jeroglíficos encontrados en Egipto, Babilonia y China. También se observaron lesiones de tipo tuberculoso en la columna vertebral de momias egipcias. Las primeras descripciones anatómo-patológicas de la enfermedad comenzaron a realizarse en el siglo XVII. En 1679, Franciscus de la Boe fue el primero en identificar y caracterizar las lesiones macroscópicas asociadas con la enfermedad, denominándolas tubérculos. Posteriormente, Manget en 1702, describió los rasgos anatómo-patológicos de la tuberculosis miliar ¹.

En 1720, Marten fue el primero en afirmar que la tuberculosis podría ser causada por criaturas diminutas, siendo éstas las que podrían generar las lesiones y síntomas de la enfermedad. El término tuberculosis, derivado del latín *tubercula* (protuberancia o nódulo pequeño), fue utilizado hasta 1839². En 1882, Robert Koch demostró que el agente causal de la enfermedad era un bacilo, *Mycobacterium tuberculosis*. Koch identificó el bacilo en lesiones tuberculosas mediante la tinción de Ziehl-Neelsen, desde entonces se le conoce como "bacilo de Koch". Los primeros registros sobre las epidemias causadas por esta bacteria aparecen en Europa y en los Estados Unidos en el siglo XIX, asociadas principalmente con la Revolución Industrial. En el siglo XIX, Bayle y Laënc establecieron las formas y estadios de la tuberculosis como enfermedad. ²

En 1924, Albert Calmette y Alphonse Guérin desarrollaron una vacuna denominada BCG (Bacilo de Calmette-Guerin). Mas tarde se descubrieron los primeros antibióticos contra esta enfermedad, siendo la estreptomycin descubierta por Selman Waksman en 1944, el primer agente quimioterapéutico específico contra la tuberculosis. Posteriormente se descubrieron otros agentes antifímicos como el ácido p-amino salicílico (PAS), la isoniacida, el etambutol y la rifampicina.³

1.2 Epidemiología

1.2.1 La tuberculosis en el Mundo

La tuberculosis continúa siendo un grave problema de salud pública en el mundo, a pesar de los grandes avances para su diagnóstico, tratamiento y prevención. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que durante el periodo comprendido entre el 2000 al 2020 habrá 1 000 millones de individuos infectados por *M. tuberculosis*, de los cuales 200 millones enfermarán y 35 millones morirán si no se mejoran el control y tratamiento de la enfermedad. Las incidencias más altas de la enfermedad se presentan en los países subdesarrollados del continente Africano, Asiático, y América Latina, como puede observarse en la Figura 1.1 ⁴. Actualmente la OMS estima que cada año, 3 millones de personas mueren por tuberculosis y 8 millones se infectan; de éstos el 95% vive en países en vías de desarrollo. Así mismo, la OMS estimó que un tercio de la población mundial está infectada por *M. tuberculosis* sin embargo, solo del 5-10% desarrollará la enfermedad ⁵. Las condiciones que favorecen la infección por tuberculosis en los países en vías de desarrollo son: la pobreza, la coinfección con VIH, la falta de control y un diagnóstico temprano y preciso ⁶. Además, se ha estimado que la incidencia mundial de tuberculosis aumenta aproximadamente 0.4% al año ^{7,8}.

INCIDENCIA DE TUBERCULOSIS

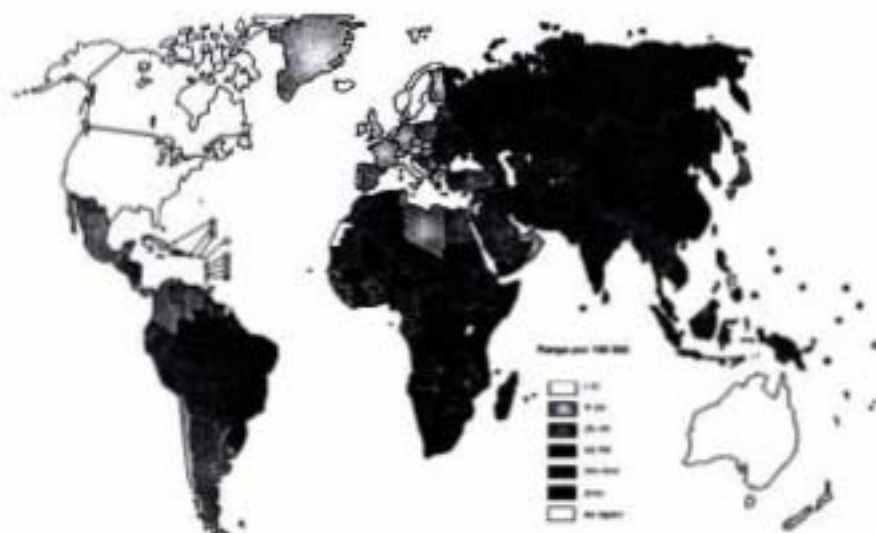


Figura 1.1. Tasas de incidencia de tuberculosis en el mundo en el año 2001, estimadas por la Organización Mundial de la Salud. (Tomado de WHO Report 2003).

1.2.2 La tuberculosis en México

En el 2001, la Secretaría de Salud determinó que la incidencia de tuberculosis en México fue de 18 por 100 000 habitantes ⁹. Esta incidencia fue inferior al promedio latinoamericano, que a mediados de los años noventa se estimó en 32 casos nuevos por 100 000 habitantes. La infección por tuberculosis se observa principalmente en jóvenes y adultos de edad media que pertenecen a la población económicamente activa ¹⁰. Otro problema grave que incrementa la incidencia de la tuberculosis en México y otras partes del mundo es la presencia de cepas multidrogo resistentes. Esto fue confirmado en un estudio realizado en tres estados de México en los que se observó una alta resistencia a los fármacos de primera elección ¹¹.

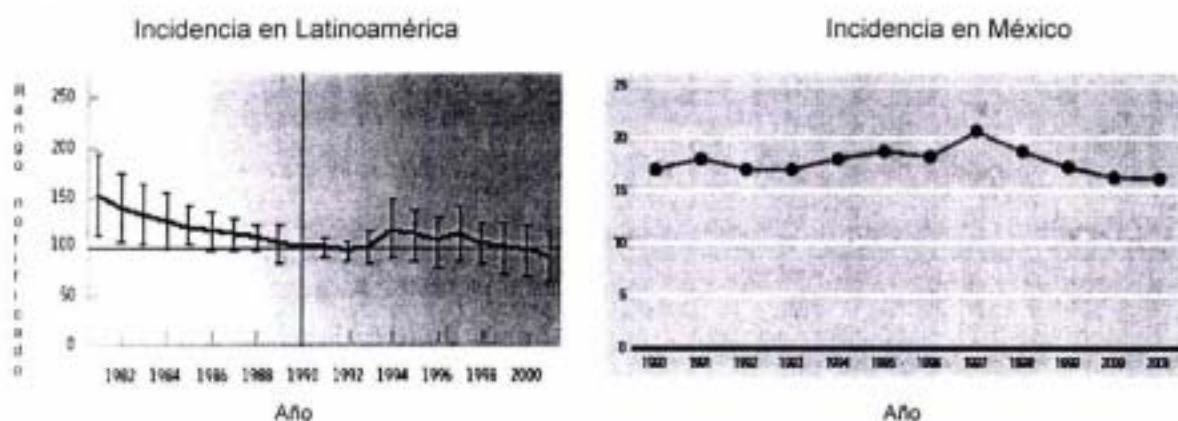


Figura 1.2. Incidencia de tuberculosis en Latinoamérica y México. A la izquierda se representa la tendencia de la tasa de casos notificados de 1981-2001 en Latinoamérica. (Tomada de Reporte WHO 2003). A la derecha se presenta la morbilidad por tuberculosis pulmonar en México de 1990 al 2001. (Tomado de Salud: México, 2001).

En el año de 1997, la OMS consideró a México como un país de alto riesgo para tuberculosis. Como muestra la Figura 1.2, la tasa de incidencia de esta enfermedad en México y Latinoamérica se ha mantenido relativamente estable en los últimos años. Sin embargo las diferencias entre entidades federativas son considerables, siendo los estados con mayor incidencia Baja California, Tamaulipas, Guerrero y Chiapas ¹². En México y otros países, la tuberculosis constituye un problema que va en ascenso y que presenta nuevos retos para su control, entre los que destacan, la asociación con la infección por VIH y la drogoresistencia ¹³.

1.3 Agente causal

La tuberculosis es causada por bacterias del género *Mycobacterium*. El ser humano puede infectarse por tres especies distintas de *Mycobacterium*: *M. tuberculosis*, *Mycobacterium bovis* y *Mycobacterium africanum*, siendo *M. tuberculosis* el patógeno más común en las infecciones humanas.

M. tuberculosis es un bacilo aerobio estricto, inmóvil, no esporulado, no encapsulado, que precisa de un tiempo muy prolongado para su multiplicación (15-20 horas) y requiere de 2 a 6 semanas para crecer en medios sólidos. La temperatura corporal (35-37°) y una atmósfera enriquecida con O₂ estimula su desarrollo. Microscópicamente es un bacilo alargado de aproximadamente 0.4 x 3 µm y de forma arrojada. Pertenece a la clase Actinobacteridae; orden Actinomycetales; familia Mycobacteriaceae; género Mycobacterium y al complejo *Mycobacterium tuberculosis*¹.

Como todas las micobacterias, se caracteriza por tener una cubierta lipídica constituida por ácidos micólicos. Ello ocasiona que, una vez teñidas con ciertos colorantes derivados de las anilinas como la fucsina fenicada, retengan esta coloración a pesar de ser tratadas con un ácido y un alcohol, por lo que se les ha denominado bacilos ácido-alcohol-resistentes. El contenido lipídico de la pared celular de la micobacteria es extraordinariamente alto, esto trae como consecuencia que la pared sea responsable de la relativa resistencia a las defensas fagocitarias del huésped y posiblemente, de los acontecimientos inmunológicos que contribuyen a la patología de la enfermedad causada por esta micobacteria. Esta cubierta lipídica confiere a las bacterias la capacidad de sobrevivir en un clima seco durante largos periodos. Sin embargo, pueden ser eliminadas, mediante rayos de sol directos o radiación ultravioleta².

1.4 Tuberculosis: La enfermedad

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa crónica debilitante en la que predominan con frecuencia los síntomas generales como fiebre, anorexia, debilidad, pérdida de peso y disnea. Cada persona enferma infectará en promedio entre 10 y 15 personas cada año. La transmisión de la tuberculosis se da fundamentalmente por vía respiratoria, el bacilo se transmite a través de pequeñas partículas de menos de 10 μm emitidas al estornudar, hablar o toser. Con la tos pueden emitirse unas 3 000 partículas potencialmente infecciosas e igual número puede eliminarse al hablar 5 minutos y muchas más al estornudar. La mayoría de los pacientes tuberculosos excretan pocos bacilos, por lo que generalmente se requiere un contacto continuo para infectarse, como sucede con la convivencia intrafamiliar. Sin embargo, una sola bacteria es teóricamente capaz de producir una tuberculosis en un individuo inmunodeprimido ¹⁴.

1.5 Patogenia

Las micobacterias dan origen a lesiones características denominadas tubérculos. La infección inicial se produce cuando los bacilos alcanzan los alvéolos pulmonares. Una vez establecida la infección se afectarán sobre todo, los segmentos posteriores de los lóbulos superiores, ya que *M. tuberculosis* es un microorganismo aeróbico con preferencia por las áreas pulmonares mejor ventiladas ¹⁵.

La principal ruta de entrada de *M. tuberculosis* es la vía respiratoria. La corriente de aire bronquial favorece la deposición de los bacilos inhalados en los segmentos basales del lóbulo bajo, del lóbulo medio, de la lingula, o de los segmentos anteriores del lóbulo superior, llamados "segmentos de infección primarios" ¹⁶. Los bacilos tuberculosos inhalados son fagocitados por los macrófagos alveolares y transportados a los nódulos linfáticos locales. Los macrófagos infectados y los monocitos circulantes una vez presentes en el sitio de

infección comienzan a secretar enzimas proteolíticas, generando una lesión exudativa. Los fagocitos mononucleares activados incitan la formación del granuloma con activación eventual de células T. El granuloma esta formado por células infectadas rodeadas por células no infectadas, células espumosas y linfocitos. Solamente las partículas inhaladas más pequeñas, que contienen entre 1 y 3 bacilos, van a ser capaces de llegar al alveolo y ser fagocitados por los macrófagos alveolares. Unos bacilos serán destruidos y otros podrán resistir los mecanismos defensivos celulares y provocar una primoinfección tuberculosa, con lo cual se constituye el llamado nódulo de Ghon, linfangitis regional y adenopatía satélite ¹⁷. Las bacterias pueden sobrevivir por largos periodos en los tejidos y nódulos linfáticos generando una enfermedad post- primaria (Figura 1.3) La repercusión sobre el pulmón se traduce en dos situaciones patológicas distintas:

Primoinfección tuberculosa subclínica: ocurre por el mero contacto con el bacilo tuberculoso. Se caracteriza por la ausencia de síntomas y signos clínicos, radiológicos y bacteriológicos. Sin embargo la prueba de tuberculina es positiva.

Enfermedad tuberculosa: manifestaciones clínicas, radiológicas, bacteriológicas e inmunológicas. ¹⁸

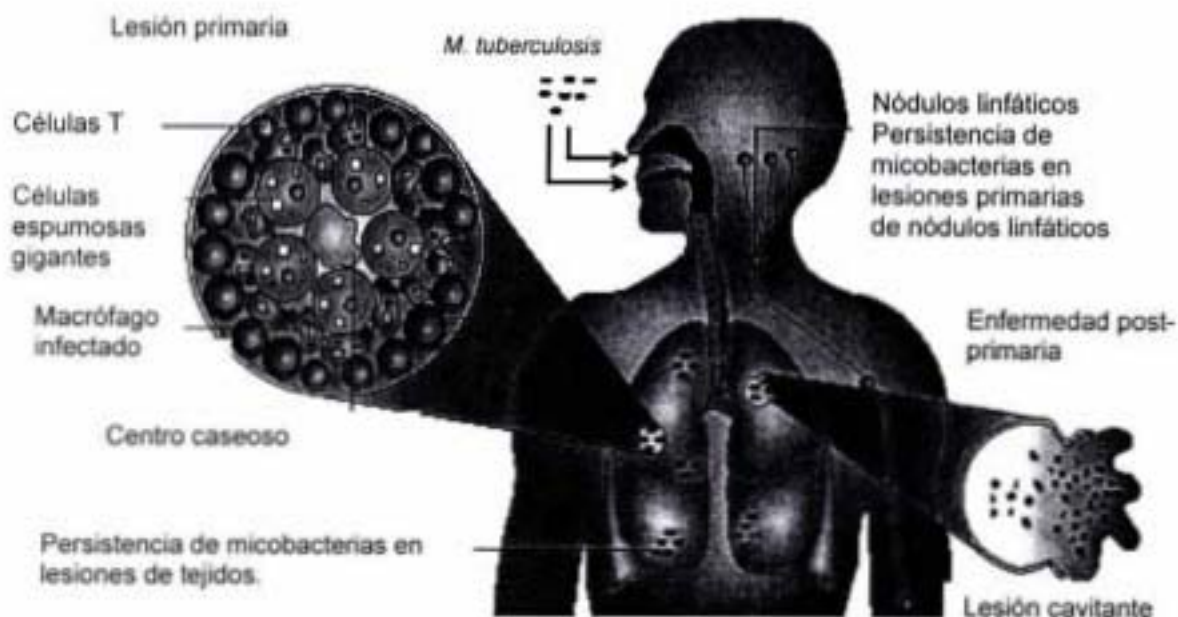


Figura 1.3. Persistencia de micobacterias. Tomado de Stewart G. et al. 2003. *Tuberculosis: a problem with persistence. Nature Rev Microb.* 1(2): 97-105

1. 6. Respuesta inmune

M. tuberculosis contiene un gran número de sustancias antigénicas, en su pared celular, que interfieren en la función macrofágica y permite la sobrevivencia de las bacterias en su interior. Inicialmente cuando la micobacteria consigue llegar al alvéolo pulmonar, se produce una ligera reacción inflamatoria en la que predominan los neutrófilos polimorfonucleares. Estas células son pronto sustituidas por macrófagos que ingieren los bacilos para ser luego transportados hacia el sistema linfático¹⁹. La capacidad de estos macrófagos para erradicar por sí solos al bacilo tuberculoso en estas primeras etapas parece ser muy escasa, quizá porque su función se ve interferida por los productos liberados por la bacteria, de modo que, a pesar de la acción microbicida de los macrófagos, los bacilos siguen dividiéndose durante unas semanas²⁰. Posteriormente cuando los macrófagos presentan los antígenos micobacterianos a través del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), se produce la activación de linfocitos T, produciéndose una expansión clonal y la liberación de citocinas que activan y atraen a más macrófagos al sitio de la infección para constituir un granuloma. Estos están constituidos por macrófagos, algunos de ellos se transforman en células epitelioides que tienen una menor capacidad microbicida pero mayor capacidad de síntesis de citocinas, y en células gigantes multinucleadas tipo Langerhans, que son macrófagos cuyos núcleos se disponen en la periferia rodeando al antígeno tuberculoso²¹.

Las células epitelioides secretan una sustancia que estimula a los fibroblastos para la producción de colágeno. Esto contribuye a la formación de la cápsula del granuloma la cual tiene la función de delimitar físicamente la lesión. Los linfocitos T activados estimulan a los macrófagos; estos a su vez comienzan a producir una gran cantidad de enzimas líticas con capacidad de destruir las bacterias e inducir necrosis celular y tisular (caseosas), lo que caracteriza al granuloma tuberculoso.

La reacción granulomatosa es la manifestación de una respuesta de hipersensibilidad de tipo tardío a los antígenos de la micobacteria ²². Además, como parte de la respuesta a la infección por *M. tuberculosis*, los macrófagos producen IL-12 la cual promueve la producción de IFN- γ por parte de las células T CD4+, T CD8+ y las células NK, que forman parte de la respuesta inmune de tipo Th 1 ²³. Tanto el IFN- γ como la IL-12 son esenciales para el desarrollo de células T CD8+ y las células T doble negativas restringidas a CD1 así como de células citotóxicas CD8+ restringidas a MHC clase I capaces de matar a macrófagos infectados por *M. tuberculosis*. ²⁴⁻²⁵

Las bacterias viables pueden persistir de 2 formas: secuestradas dentro de lesiones focales caracterizado por fibrosis y calcificación subsiguiente (caseación y licuefacción); ó fuera de lesiones focales. Se cree que las células son lisadas por gránulos de perforina generados por células CD8+ propiciando la liberación de las bacterias. (Figura 1.4)²¹

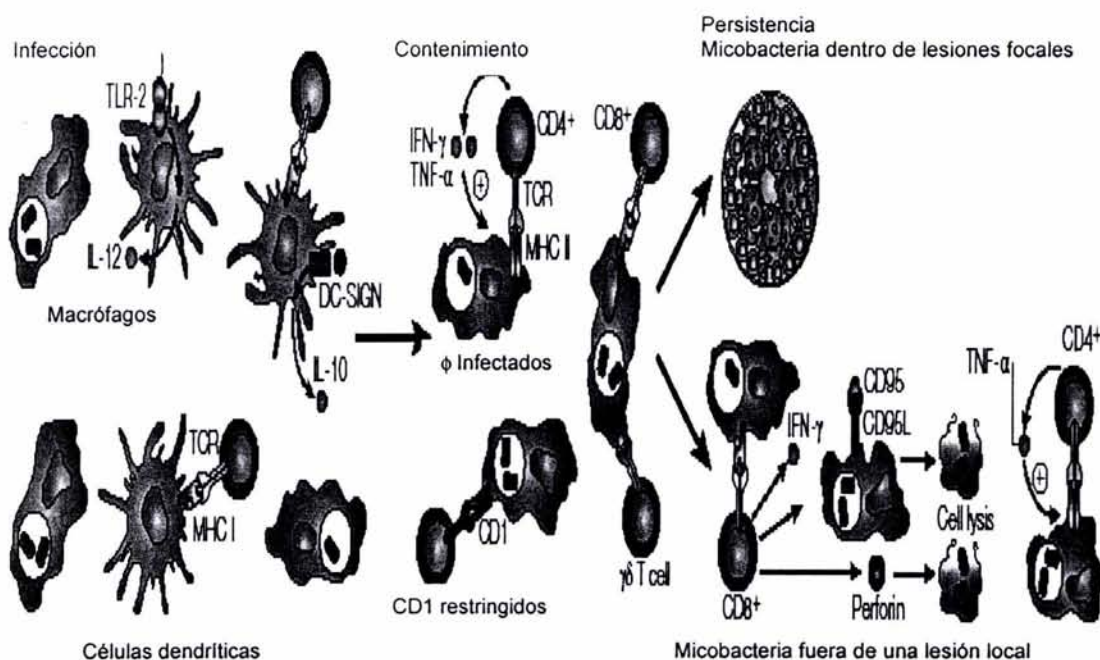


Figura 1.4. Mecanismos de respuesta inmune, contención y persistencia. Tomado de Stewart G, et al. 2003. *Tuberculosis: a problem with persistence. Nature Rev Microb.* 1(2): 97-105

1.7 Diseminación.

Hay pocas enfermedades capaces de afectar tantos órganos y de simular tal cantidad de entidades nosológicas como la tuberculosis. Desde el foco inicial de la primoinfección el bacilo tuberculoso puede diseminarse, fundamentalmente por vía hematológica, aunque también por vía linfática y broncogena a otras áreas del pulmón y a otros órganos. La diseminación extrapulmonar de *M. tuberculosis* puede darse por el transporte de los bacilos vía el sistema linfático que proceden de la región infectada del pulmón, o por el pasaje directo del bacilo del lumen alveolar a los capilares subyacentes²⁶. El proceso de diseminación permite al bacilo alcanzar las regiones vulnerables extrapulmonares como los huesos y articulaciones (tuberculosis espinal o enfermedad de Pott), el sistema nervioso central (meningitis tuberculosa), el tracto del genitourinario, el segmento ileocaecal del intestino y la piel. Muchos de los bacilos engullidos son removidos del cuerpo por mucociliaridad. Sin embargo, algunos bacilos pueden alcanzar los nódulos linfáticos hilares y de ahí el torrente sanguíneo²⁷.

Durante muchos años, el modelo de diseminación a través de los macrófagos ha sido el más aceptado para explicar las etapas tempranas de la patogénesis de la tuberculosis. Sin embargo, estudios recientes sugieren que pudieran existir mecanismos de diseminación macrófago-independientes para *M. tuberculosis*, como se ha demostrado en estudios donde se han empleado ratones deficientes de macrófagos alveolares, así como en ratones deficientes en la producción del factor fagocítico de crecimiento mononuclear (factor estimulante de colonias 1)²⁸. Además se ha demostrado que *M. tuberculosis* presenta citotoxicidad hacia neumocitos humanos originando infiltración celular y necrosis, sugiriendo que los bacilos pueden pasar directamente al torrente sanguíneo²⁹. En un estudio reciente se ha demostrado que la translocación de *M. tuberculosis* involucra la invasión de células epiteliales y el transporte bacteriano por fagocitos mononucleares infectados. Además, otras observaciones sugieren que *M. tuberculosis* necesita unirse e invadir células epiteliales para posteriormente diseminarse a través de la barrera alveolar³⁰⁻³².

Se ha reportado también que la adhesina hemaglutinina de unión a heparina (HBHA: heparin-binding haemagglutinin adhesin) está involucrada en la adhesión a células epiteliales ³³. También se observó que la HBHA tiene un papel importante en el inicio y mantenimiento de la fase pulmonar de la tuberculosis. A partir de estos estudios se concluyó que HBHA es esencial para el escape del pulmón y el establecimiento de la enfermedad extracelular ³⁴.

Existen algunas moléculas del hospedero que las bacterias pueden usar para su diseminación, tal es el caso de los proteoglicanos (Pg). Algunas bacterias como *M. tuberculosis* han desarrollado mecanismos para explotar los Pg de los hospederos para llevar a cabo funciones como la unión a células blanco. Algunas interacciones con Pg pueden facilitar la invasión celular o la diseminación sistémica ³⁵.

2. ANTECEDENTES

2.1 Mecanismo de acción de bacterias invasivas

La actividad proteolítica es un factor importante en la patogénesis de las infecciones bacterianas, tanto por el daño a los tejidos, como por la invasión bacteriana a sitios de infección secundaria dentro del hospedero. Esta, puede ocasionar degradación de los tejidos del huésped a través de las proteasas bacterianas y con esto potenciar la propagación de los microorganismos rompiendo las barreras de los tejidos ³⁶.

A pesar de que la tuberculosis es una enfermedad que presenta uno de los más altos índices de mortalidad y morbilidad en el mundo, se sabe poco de los factores de virulencia y patogenicidad que le permiten invadir y diseminarse en el hospedero. La migración de macrófagos y otros leucocitos al sitio de infección de la micobacteria, así como la formación de la respuesta de granulomas, requiere la degradación de la matriz extracelular (EMC) y membranas basales. La degradación de proteínas de EMC puede estar implicada en este proceso de diseminación ³⁷.

Debido a la amplia actividad proteolítica de la Plasmina (Plm) y a la alta concentración del Plasminógeno (Plg) en el plasma, se ha propuesto que el sistema Plg/Plm puede ser un mecanismo usado por muchas bacterias patógenas para facilitar su movimiento a través de las barreras tisulares. Para algunos microorganismos esta demostrado que la capacidad de fijar y activar el Plg a Plm la cual es resistente a la inhibición por α 2-antiplasmina, su principal inhibidor, constituye un factor importante para su diseminación. El fenómeno de invasividad esta acompañado por daño tisular. En este proceso se dan numerosas interacciones donde participan moléculas que se adhieren a la matriz extracelular, mientras otras activan el Plg a Plm con la subsiguiente degradación del tejido y avance del patógeno ³⁸.

2.2 Complejo Plasminógeno/ Plasmina

El complejo Plg/ Plm, forma parte del sistema fibrinolítico y comprende una proenzima inactiva Plg, una enzima activa Plm, activadores, receptores (PlgR) e inhibidores. La Plm degrada fibrina y activa metaloproteinasas de la matriz (MMPs) que a su vez, degradan componentes de la ECM. Se han identificado dos activadores fisiológicos del Plg (PA): PA tipo- tejido (t-PA) y PA tipo-uroquinasa (u-PA). La inhibición del sistema del Plg ocurre a nivel de PA, por inhibidores específicos de PA (PAIs); al nivel de Plm, principalmente por α 2-antiplasmina, o al nivel de MMPs, por los inhibidores tisulares de MMPs (TIMPs)³⁹

2.2.1 Componentes del sistema del Plasminógeno.

El sistema del Plg fue inicialmente caracterizado por su papel en la degradación en los depósitos de fibrina intravascular. En 1941, Milstone demostró que la lisis de la fibrina por una sustancia estreptocócica, descrita en 1933 por Tillet y Garner, dependía de un factor lítico presente en el suero humano; el precursor fue llamado Plg y la enzima Plm. En 1947, Astrup demostró que los tejidos animales contenían un agente capaz de activar el Plg (t-PA) y en ese mismo año, MacFarlane y Pilling encontraron actividad fibrinolítica en la orina identificada en 1951 por Williams y denominada uroquinasa (u-PA)⁴⁰

Las enzimas del sistema del Plg son todas serina proteinasas. El sitio activo de las serina proteinasas consiste de una triada catalítica compuesta por los aminoácidos serina, ácido aspártico e histidina. Este sitio activo está localizado en la región carboxiterminal de las moléculas (parte serina proteinasa), la región amino terminal contiene uno o más dominios estructurales/funcionales (módulos). Los inhibidores del sistema del Plg son miembros de la superfamilia de las serpinas (inhibidores de serina proteinasas) En la región carboxiterminal, los inhibidores del sistema del Plg tienen un sitio de unión a péptidos (Arg-X ó Lys-X) específico reactivo, que es cortado por sus enzimas blanco, resultando en la formación de un complejo enzima-inhibidor inactivo⁴¹.

2.2.1.1 Plasminógeno

El Plg es una glicoproteína monocatenaria que se sintetiza en el hígado, es abundante en el plasma humano y en los fluidos extracelulares. Esta compuesta por 791 aminoácidos (aa) y 24 puentes disulfuro con un contenido en carbohidratos del 2% y un peso molecular de 92.000 daltons. Esta proteína está organizada en siete dominios estructurales, denominados kringles, que comprenden un péptido de pre-activación (residuos 1- 77).

En la región amino-terminal contiene cinco dominios kringle homólogos secuenciales (estructuras de triple vuelta unidas por puentes disulfuro de cerca de 80 residuos), y del dominio proteinasa (residuos 562-791). Los dominios kringle contienen sitios de unión a lisina (LBS, "lysine binding sites") que juegan un papel crucial en el reconocimiento específico de la fibrina, superficies celulares y de la α 2- antiplasmina y sitios de unión a sitios aminohexil ⁴².

El Plg se une a través de los LBS a la célula endotelial lo que favorece su activación a nivel local. El gen que codifica esta proteína está localizado en el cromosoma 6 humano en la banda q26 o q27. Cada uno de los cinco dominios es codificado por dos exones separados por un intrón en medio de cada estructura. Es convertido a su forma activa por activadores tanto eucarióticos como procarióticos. La forma nativa del Plg es llamada Glu-Plg debido a que posee un residuo de ácido glutámico en su región amino terminal ⁴³.

La activación de Plg está regulada herméticamente. Esto se da por activadores específicos, inhibidores que controlan el sistema de Plg (ambos al nivel de activación), y por su inmovilización a los receptores celulares o a las moléculas designadas. La unión de Plg a receptores celulares es usualmente inhibida por lisina o análogos de lisina, indicando que esta unión es mediada por sitios de unión de lisina en el Plg ⁴⁴.

2.2.1.2 Plasmina

La activación del Plg a Plm tiene lugar por escisión del enlace peptídico Arg₅₆₁-Val₅₆₂ en la molécula del Glu-Plg por acción de los diferentes activadores. La Plm así formada, es una serina proteasa bicatenaria compuesta por una cadena pesada derivada de la porción amino-terminal, que contiene 560 aa, y las 5 regiones "kringles" en donde se localizan los LBS. Contiene además una cadena ligera derivada de la posición carboxiterminal compuesta por 241 aa, que contiene el centro activo formado por los aminoácidos serina, histidina y ácido aspártico. Ambas cadenas están unidas por puentes disulfuro. Esta estructura puede ser observada en la Figura 1.5 ⁴⁵.

La Plm degrada laminina, fibronectina, proteoglicanos y otras proteínas de la matriz extracelular. También se ha observado que puede activar procloagenasas. La Plm es una proteasa de amplio espectro que preferentemente se une a residuos de arginina o lisina ⁴⁶. La vida media de la Plm libre en la sangre está estimada en aproximadamente 0.1 segundos. La Plm con un LBS ocupado es inactivada 50 veces más lentamente por la α 2-antiplasmina. El bloqueo reversible del sitio activo de la Plm con su sustrato reduce marcadamente el rango de inactivación por la α 2-antiplasmina ⁴⁷.

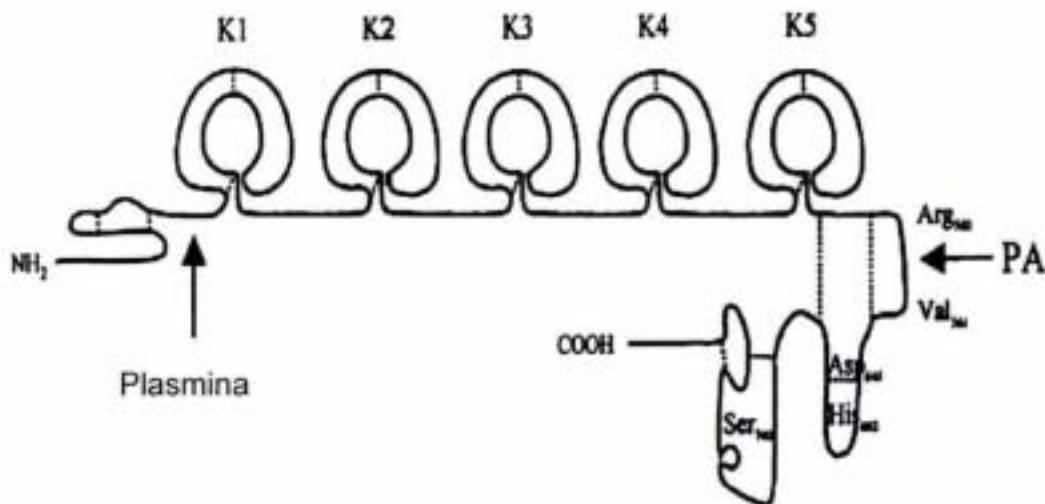


Figura 2.1. Esquema de la estructura del Plg/Plm humano mostrando los sitios de activación. Tomado de Lähteenmäki L. et al. Bacterial plasminogen activators and receptors. FEMS Microbiol Rev. 25: 531-552

2.2.1.3 Activador de Plg tipo tisular (t-PA: Tissue-Type PA)

El t-PA consiste de 530 aa. La enzima t-PA está compuesta de algunos dominios homólogos con otras proteínas: un dominio "finger" que comprende los residuos 4-50, un dominio de un factor de crecimiento que incluye residuos del 50-87, dos anillos kringle que comprenden los residuos 87-176 y del 176-262, y un dominio proteasa constituido por los residuos 276-527, que comprenden la triada catalítica.

La unión de t-PA a fibrina es comúnmente mediada por los dominios finger y el segundo anillo kringle. El gen humano para el t-PA está localizado en el cromosoma 8 (bandas 8.p.12- >q.11.2). El t-PA es una enzima pobre en ausencia de fibrina, que aumenta el rango de activación del Plg al menos 100 veces ⁴⁸.

La vía de activación mediada por t-PA está involucrada principalmente en la homeostasis de la fibrina, y la vía mediada por u-PA está involucrada principalmente en los fenómenos, como migración celular y remodelación de tejidos ⁴⁹.

2.2.1.4 Activador de Plasminógeno tipo Uroquinasa

u-PA o pro-uroquinasa está compuesta de un dominio tipo factor de crecimiento, un dominio kringle, y un dominio tipo proteasa que contiene la triada catalítica. El dominio con el factor de crecimiento es responsable de la unión del u-PA a su receptor, que está en la superficie de una variedad de células. El u-PA de cadena sencilla (scu-PA) es convertido a un u-PA de doble cadena (tcu-PA) por un corte proteolítico de la unión peptídica entre Lys₁₅₈-Ile₁₅₉. El gen humano del u-PA está localizado en el cromosoma 10 ⁵⁰.

2.2.1.5 Activadores Bacterianos

Actualmente se conocen dos moléculas de origen bacteriano capaces de activar el sistema del Plg. La Estreptoquinasa (Stk) una proteína bacteriana que cuando se adiciona al plasma humano, forma un complejo con el Plg; este complejo activa otras moléculas de Plg a Plm. El complejo Stk-Plg es insensible a inhibidores de proteasas circulantes y activa Plg libre o unido a fibrina relativamente de forma indiscriminada, produciendo un estado llamado "estado lítico sistémico", caracterizado por la degradación de fibrinógeno y la falta de la α 2-antiplasmina en la sangre circulante.

La Estafiloquinasa (Sth) es un polipéptido de cadena simple de 136 aa sin puentes disulfuro que es secretada por algunas cepas de *Staphylococcus aureus*. Tal como la Stk, la Sth no es una enzima, pero forma complejos estoquiométricos 1:1 con el Plg que activan otras moléculas de Plg. Igualmente, el complejo formado está protegido contra la rápida inhibición por α 2-antiplasmina ⁵¹.

2.2.1.6 Alfa 2-antiplasmina

Fue aislada del plasma humano, como una glicoproteína de 464 aa. Es única entre las serpinas debido a que su extensión carboxiterminal de 51 residuos de aa, contiene un sitio de unión secundario que reacciona con los LBS de los kringles 1 y 3 del Plg y la Plm. El residuo Gln14 de la región amino-terminal de la α 2-antiplasmina puede entrecruzar las cadenas A α de fibrina, en un proceso dependiente de Ca²⁺ y es catalizado por el factor de coagulación XIII. El gen humano para α 2-antiplasmina está localizado en el cromosoma 18, banda p11.1-q11.2 ⁵².

2.2.2 Función fisiológica

La generación de Plm es fundamental para la solubilización de trombos que contengan fibrina, así como en otros procesos biológicos, tales como la degradación de coágulos sanguíneos, movimiento y migración celular, cicatrización, remodelación de tejidos, embriogénesis. También puede participar en procesos como en invasión y propagación de productos que afectan la permeabilidad de vasos sanguíneos y pueden llevar a la acumulación de células inflamatorias ⁵³.

Estudios recientes han demostrado que el sistema del Plg y las MMP participan en la formación neointima arterial, arterosclerosis, formación de aneurisma y de isquemia miocárdica, angiogénesis, crecimiento de tumores, metástasis e infección. La expresión de uPA-uPAR es crítica para la habilidad de leucocitos para degradar proteínas de matriz y atravesar tejidos durante el reclutamiento en sitios inflamatorios ⁵⁴.

En la Figura 2.2 se muestra una representación del sistema Plg. El Plg es activado a Plm por t-PA o u-PA. La Plm degrada fibrina. Además, puede activar pro-MMP a MMP favoreciendo la degradación de EMC. Este proceso puede ser inhibido a nivel de PA por PAI, a nivel de Plm por α_2 -antiplasmina y a nivel de MMPs por TIMPs.

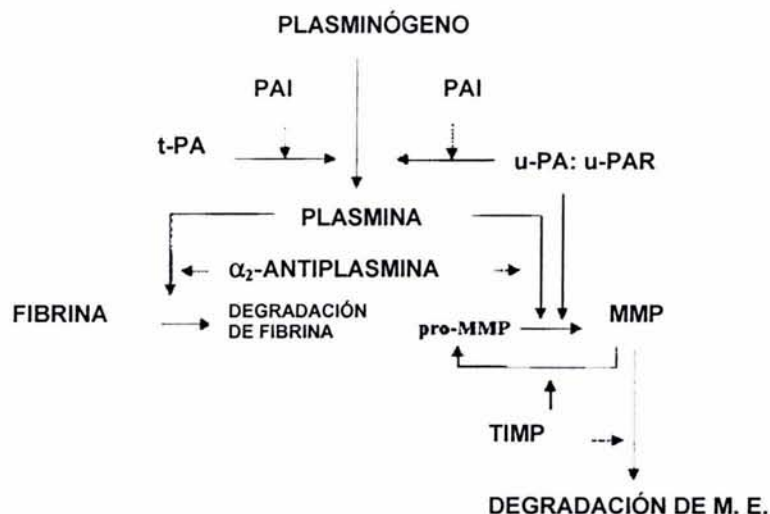


Figura 2.2. Representación del sistema Plg/Plm. Tomado de Collen D. 1999. The plasminogen (fibrinolytic) system. *Thrombosis and Haemostasis*. 82(2): 259-270

2.3. Bacterias capaces de interactuar con el Plasminógeno.

Se ha demostrado que algunas bacterias pueden interactuar con el sistema del Plg del hospedero. Estas pueden expresar PAs endógenos y unir el Plg directamente a través de receptores de superficie celulares bacterianos y utilizar PAs del hospedero ^{55, 56,57}. El hallazgo de receptores o activadores en algunas bacterias patógenas nos ha llevado a sugerir que la formación de Plm puede tener un papel en el daño a tejidos asociado con infecciones invasivas ^{58,59, 60}.

Muchas bacterias que causan infecciones sistémicas y expresan activadores o receptores de Plg se adhieren a membranas basales lo que pueden dejar a la bacteria en un ambiente favorable para la activación de Plg y la actividad de Plm. La unión del Plg a laminina y membranas basales aumenta la formación de Plm ⁶¹.

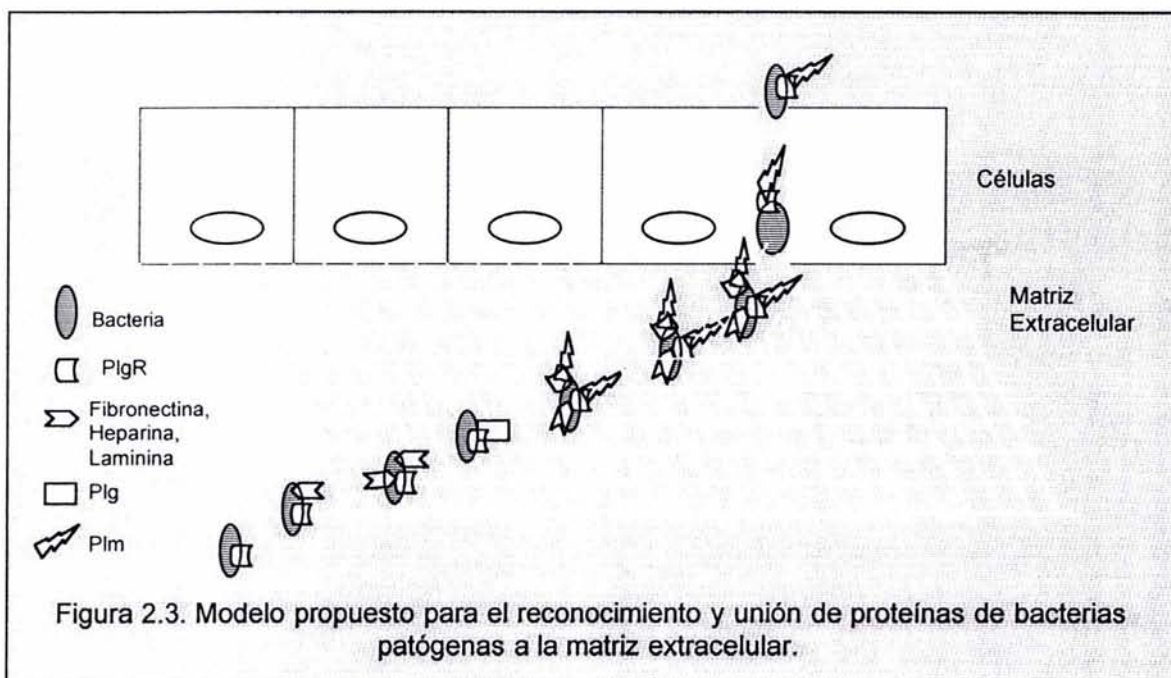
Parece que bajo condiciones *in vitro*, algunas bacterias cubiertas de Plm pueden disparar algunas características que les permiten la penetración de las membranas basales ⁶²⁻⁶⁴. Se ha demostrado que el Plg puede aumentar la diseminación de ciertas bacterias, aumentando su capacidad de migración ⁶¹ y en algunos casos incrementa su virulencia. Además la Plm puede activar algunas pro-metaloproteinasas ^{65,66}, elastasa latente⁶⁷, activadores pro-Plg ⁶⁸ y degradar inhibidores de metaloproteinasas tisulares⁶⁹.

Se ha estudiado relativamente poco la relación que pudiera tener *M. tuberculosis* con el sistema del Plg. Algunos estudios demuestran la inducción de un activador de Plg, el cual es secretado por los macrófagos solo cuando son estimulados con BCG⁷⁰. Este activador es una serina proteinasa que no muestra reacción cruzada antigénica con uPA o tPA⁷¹. Schuyler y Forman, asociaron un activador con características similares con el desarrollo de granulomas y para mediar la inflamación y la fibrinólisis ^{72,73}.

Recientemente en nuestro laboratorio se demostró la interacción directa del Plg con *M. tuberculosis*. Se identificaron moléculas capaces de unirse a Plg. Las proteínas encontradas tienen un peso aproximado de 30, 60, 66 kDa y están presentes en la pared celular y en el extracto soluble de *M. tuberculosis*. Además se observó que pueden activar el Plg solo en presencia de fibrina⁷⁴.

En otro estudio se demostró que el Plg juega un papel en el recambio de proteínas de matriz extracelular dentro de los granulomas y tiene un efecto limitado en la diseminación de *M. avium* de los pulmones. Debido a esto se sugirió como la función del Plg, limitar la fibrinólisis progresiva en el granuloma durante una infección crónica micobacteriana⁷⁵.

En la Figura 2.3 podemos observar el mecanismo mediante el cual, las bacterias pudieran utilizar este sistema. Este mecanismo es similar al utilizado por las células cancerígenas, por lo que este proceso ha sido denominado como metástasis bacteriana.



También se ha reportado que algunas bacterias patógenas pueden unirse al Plg mediante receptores como los que se enlistan en la Tabla 2.1

Tabla 2. 1. Patógenos capaces de unir Plg

Microorganismo	PlgR	Referencias
<i>Borrelia burdoferi</i>	Proteínas	(Fuchs H. <i>et al.</i> PNAS. 1994, 91:12594)
<i>Escherichia coli</i>	Flagelo	(Lahteenmki K, <i>et al.</i> FEMS Microbiol. 1993,106:306)
<i>Haemophilus influenzae</i>	?	(Sjostrom I. <i>et al.</i> Biochimi Biophys Acta. 1997,1324: 58:182)
<i>Helicobacter pylori</i>	Aspartasa	(Ringer M. <i>et al.</i> FEMS Immunol. 1994, 9:29)
<i>Moraxella catarrhalis</i>	?	(Ullberg M. <i>et al.</i> Infec. Immun. 1990, 58:21)
<i>Mycoplasma fermentans</i>	?	(Tarshis M. <i>et al.</i> FEMS Microbiol.1993, 106:306)
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	?	(Ullberg M. <i>et al.</i> J Infect Dis. 1992, 166:1329)
<i>Neisseria meningitidis</i>	?	(Ullberg M. <i>et al.</i> J Infect Dis. 1992, 166:1329)
<i>Proteus mirabilis</i>	?	(Ullberg M. <i>et al.</i> Infec. Immun. 1990, 58:21)
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	?	(Ullberg M. <i>et al.</i> Infec. Immun. 1990, 58:21)
<i>Salmonella enteritidis</i>	Fimbrias	(Kukkone M. <i>et al.</i> Infec. Immun. 1998, 66:4965)
<i>Streptococcus</i>	GAPDH	(Winram SB. <i>et al.</i> Microbiol. 1996, 142:2311)
<i>M. tuberculosis</i>	HSP-70 y Gln	(Monroy, V <i>et al.</i> Infec. Immun. 2000. 158:77)

Igualmente, se ha identificado la capacidad de algunas bacterias para activar el Plg a Plm. Los activadores identificados son resumidos en la Tabla 2.2.

Tabla 2.2 Activadores de Plg en bacterias patógenas

Microorganismo	Activadores	Referencia
<i>Escherichia coli</i>	Proteasas	Leytus S. <i>et al.</i> PNAS. 1980, 78:14251)
<i>Staphylococcus aureus</i>	Estafiloquinasa	(Collen DB. <i>et al.</i> J Biol Chem. 1993, 268:8284)
<i>Streptococcus-Group A</i>	Estreptoquinasa	(Winram SB. <i>et al.</i> Microbiol. 1996, 142:2311)
<i>Yersinia pestis</i>	Pla	(Lahteenmki K, <i>et al.</i> Infect Immun.1998, 66:5755)
<i>M. tuberculosis</i>	No identificado	(Xolalpa W, Espitia C, comun personal)

3. JUSTIFICACIÓN

La actividad proteolítica es un factor importante en la patogénesis de las infecciones bacterianas, favoreciendo la invasión bacteriana a sitios de infección secundaria dentro del hospedero. El pulmón es considerado como el principal punto de entrada para las micobacterias patogénicas, sin embargo estas pueden diseminarse a otros órganos, como el riñón, el Sistema Nervioso Central, el tejido óseo, entre otros. La diseminación sistémica de los bacilos parece ser un evento importante en la patogénesis de la tuberculosis.

Debido a la amplia actividad proteolítica de la PIm, se ha propuesto que el sistema Plg/PIm puede ser un mecanismo usado por muchas bacterias patógenas para facilitar su movimiento a través de las barreras tisulares. El hallazgo de receptores y activadores para Plg en *M. tuberculosis*, así como en algunos otros patógenos sugiere que existe una relación entre la adhesión bacteriana y la proteólisis por la formación de PIm en los tejidos del hospedero, fenómenos que jugarían un papel importante en el daño de tejidos asociado con las infecciones invasivas.

El esclarecimiento de los mecanismos usados por *M. tuberculosis* para facilitarse el acceso a los tejidos vulnerables después de la infección pulmonar primaria puede proporcionar acercamientos racionales para un mejor entendimiento del proceso de infección y de los determinantes específicos de virulencia que utiliza esta bacteria para diseminarse y causar enfermedad en diferentes órganos.

4. HIPÓTESIS

Se ha demostrado que *M. tuberculosis* puede unirse y activar el plasminógeno, por lo que podría utilizar este sistema para generar daño y posiblemente diseminarse. Si la bacteria es capaz de utilizar este sistema, entonces la infección por *M tuberculosis*, puede favorecer la presencia de Plg/Plm en los pulmones infectados.

5. OBJETIVO GENERAL

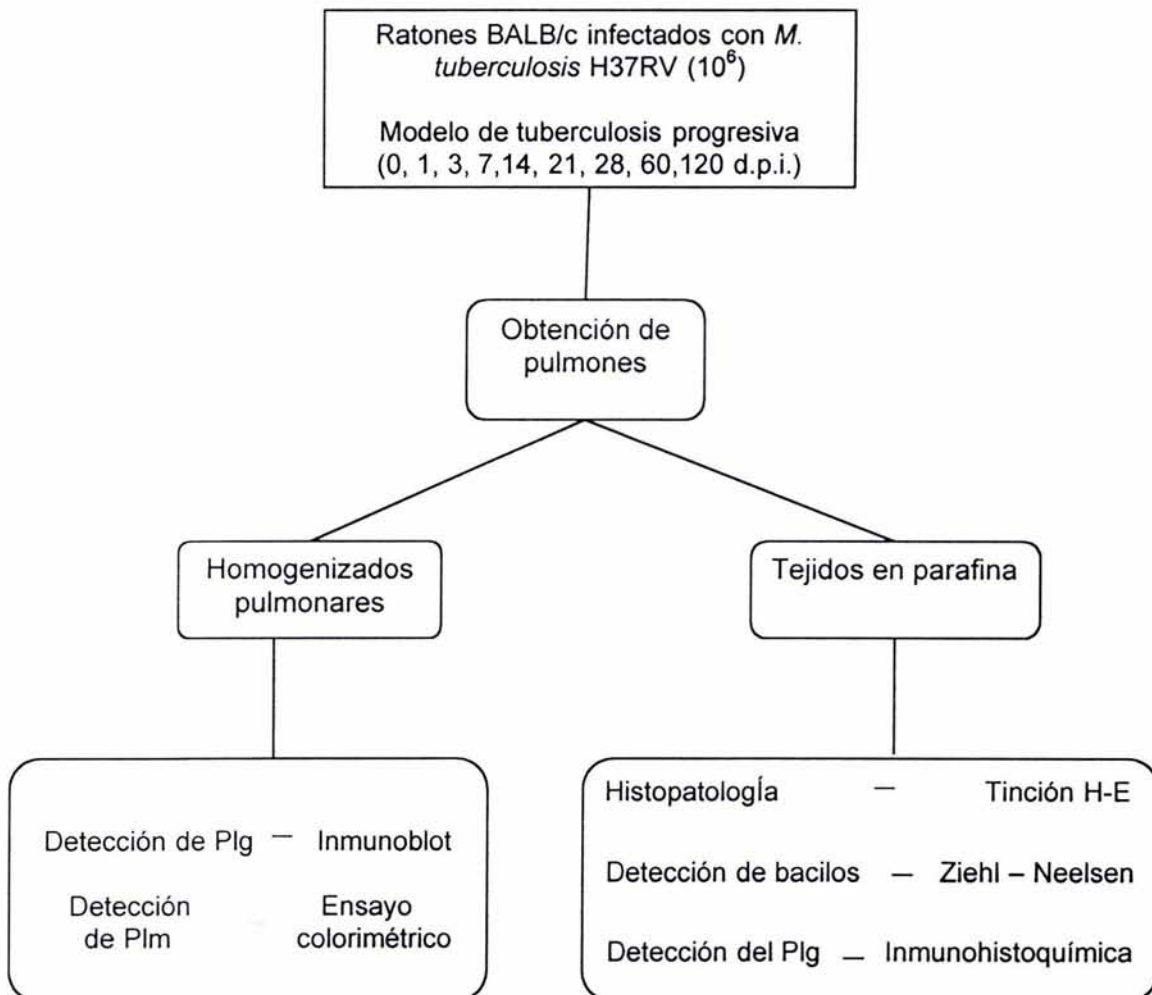
Establecer si existe alguna relación entre el desarrollo de la infección por *M. tuberculosis* con el aumento de la presencia de Plg

5.1. OBJETIVOS PARTICULARES

- Detección y cuantificación de Plg en extractos pulmonares de ratones infectados con *M. tuberculosis* a los días: 1, 3, 7, 14, 21,28, 60 y 120 días post infección. (d.p.i.).

- Detección y cuantificación del Plm en extractos pulmonares de ratones infectados con *M. tuberculosis* a los días: 1, 3, 7, 14, 21,28, 60 y 120 días post infección. (d.p.i.).

6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



7. MÉTODOS

7.1. Obtención de homogenizados pulmonares

Los homogenizados pulmonares fueron donados por el Dr. Rogelio Hernández Pando del Instituto de las Ciencias Médicas y de la Nutrición. Estos fueron obtenidos de la siguiente forma; se infectaron ratones BALB/c con 10^6 en $100 \mu\text{l}$ bacilos de *M. tuberculosis* H37Rv por vía intratraqueal. Los ratones se sacrificaron a los 0, 1, 3, 7, 14, 21, 28, 60 y 120 días post-infección (d.p.i) de acuerdo a un modelo previamente establecido. Se sacrificaron 3 ratones para cada d.p.i. A continuación se extrajeron los pulmones y fueron homogenizados en solución salina por medio de sonicación. El lisado celular fue centrifugado para separar las células rotas de la porción soluble (sobrenadante). Posteriormente fue filtrado por una membrana con poros de $0.22 \mu\text{m}$, obteniendo así el sobrenadante de los homogenizados pulmonares libres de bacterias.

7.2. Determinación de concentración de proteínas totales

Se realizó un ensayo para establecer las concentraciones en los extractos para posteriormente igualarlas. Se empleó el método de Bradford. Se aplicó una regresión lineal para ajustar los datos con una $R^2 = 0.998$

7.3. Detección de Plg/ Plm en sobrenadantes:

Las proteínas del sobrenadante de los homogenizados pulmonares fueron examinadas en un gel al 12 % SDS-PAGE (Electroforesis en Gel de Poliacrilamida Dodecil Sulfato de Sodio). En cada pozo se cargaron aproximadamente $10 \mu\text{g}$ de cada una de las muestras. Las proteínas fueron transferidas a una membrana de nylon PVDF P- inmobilon (Millipore, Co, Bedford, Mass) a 60 V durante 1 hora y guardadas hasta su utilización para inmunodetección o tinción con azul de Coomassie.

7.4. Detección de Plg/Plm

La presencia de Plm/ Plg se detectó en la membrana mediante incubación con un anticuerpo policlonal anti-Plg diluido 1:500 en solución BSA al 3 % PBS-tween 20 al 0.05 % durante una hora a temperatura ambiente y en agitación. La membrana fue lavada con PBS-tween20 al 0.05 %. En seguida se incubó durante 30 minutos con un anticuerpo anti-IgG de cabra conjugado con peroxidasa a una dilución 1:2000 en solución BSA al 3 % PBS-tween 20 al 0.05%. Nuevamente se lavó con PBS-tween20. Finalmente se reveló incubando la membrana con 1 μ l/ml de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en PBS-tween y diaminobencidina (DAB). Se utilizó como control positivo un carril con 0.025 U de Plg comercial.

7.5. Determinación de la actividad de Plm en sobrenadantes

La actividad enzimática de la Plm se detectó en placas de ELISA para microtitulación. En este ensayo se colocó en cada pozo 20 μ l de sobrenadante (1 μ g de proteína), 20 μ l de un sustrato cromogénico para Plm llamado Cromozym, se llevó todo a 200 μ l con buffer PBS 50 mM pH 7.4. El sustrato se agrega al final y la placa se leyó inmediatamente a D.O $_{405nm}$. Posteriormente la placa se mantuvo incubada a 37 °C y se tomaron lecturas cada h durante 24h. En el ensayo se tuvieron como controles: Plm comercial (6.25 a 1.25 μ g/ml) como control positivo y 20 μ l del sustrato cromogénico como control negativo.

7.6. Cuantificación de Plm

Se utilizaron placas de microtitulación donde se agregó en cada pozo 1 μ g de proteína del sobrenadante o una curva de diferentes concentraciones de Plm comercial (6.25 a 1.25 μ g/ μ l) Se les adicionó 20 μ l de un sustrato cromogénico y se llevó todo a 200 μ l con buffer PBS 50 mM pH 7.4. La placa se incubó a 37° C y se leyó a las 24h a D.O $_{405nm}$. Con los resultados obtenidos de las diferentes concentraciones de Plm comercial se determinó la concentración de Plm en los sobrenadantes de los pulmones, por medio de una regresión lineal obteniendo una $R^2=0.9998$

7.7. Exploración del daño histopatológico en tejidos pulmonares

Las laminillas con cortes seriados de los pulmones murinos de los diferentes d.p.i fueron teñidas con hematoxilina- eosina para detectar la evolución de las lesiones histopatológicas durante el desarrollo de la infección.

7.8. Detección de la presencia de *M. tuberculosis* en tejidos pulmonares

Las laminillas con cortes seriados de los pulmones murinos a los diferentes d.p.i fueron teñidas utilizando la técnica Zhiel – Neelsen, y posteriormente observadas al microscopio, para identificar la presencia de *M. tuberculosis* durante el desarrollo de la infección.

7.9. Detección de Plg/ Plm en tejidos pulmonares.

Los pulmones de los animales sacrificados a los diferentes d.p.i fueron fijados en parafina. Posteriormente se realizaron cortes de 5 μ m de espesor. Los cortes fueron desparafinizados y rehidratados y se bloqueó la peroxidasa endógena con una solución de metanol y peróxido de hidrógeno al 3% durante 1h. Las laminillas fueron lavadas 2 veces durante 5 minutos con PBS-tween 20 al 0.01%. En seguida se incubaron durante 1 h con Bloqueador Universal diluido (vector-lab) 1/50 en PBS-tween 20 al 0.01% y BSA 3%. Después de decantar el bloqueador, las laminillas fueron incubadas con un anticuerpo anti-Plg policlonal (1: 50) durante 12 horas. Nuevamente se realizaron dos lavados de 5 min con PBS-tween 20 al 0.01%. Posteriormente las laminillas se incubaron con un anticuerpo anti-IgG de cabra acoplado con peroxidasa. Se realizaron dos lavados durante 5 min con PBS-tween 20 al 0.01%. Finalmente se revelaron con diaminobenzidina y peróxido de hidrógeno al 3% en PBS-tween 20 al 0.01%.

7.10. Cuantificación de P1g/ P1m en tejidos pulmonares

La cuantificación de la positividad se determinó por medio de la obtención del promedio de la presencia de células positivas al anticuerpo observado al microscopio para cada d.p.i.

Los detalles de los reactivos utilizados pueden consultarse en el Anexo I.

8. RESULTADOS

8.1. Detección de P1g/ P1m en extractos pulmonares por Inmunoblot

La presencia de P1g/P1m detectada con un anticuerpo anti-P1g en los pulmones infectados, se hace evidente a partir de día 21 y aumenta con el tiempo de infección. (Fig. 8.1)

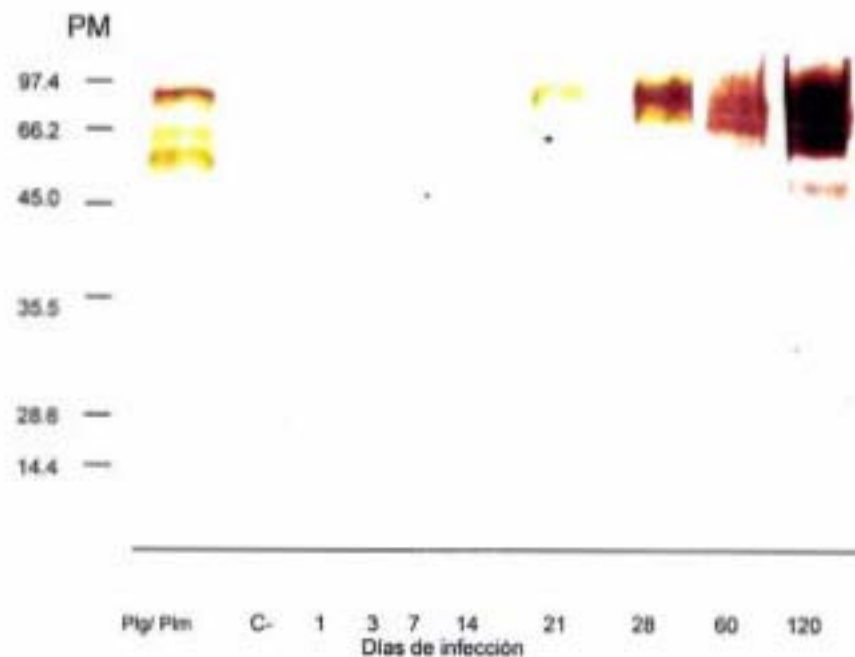


Figura 8. 1. Inmunoblot de los homogenizados pulmonares. P1g/P1m, C: control negativo. Carriles: 1, 3, 7, 14, 21, 28,60 y 120 corresponden a los homogenizados pulmonares de los animales infectados y sacrificados a los diferentes tiempos post. infección. Los datos presentados son representativos de tres experimentos donde se utilizaron un pool de tres individuos por muestra (d.p.i.). En todos los carriles se cargó la misma concentración de proteína

8.2. Detección y cuantificación de actividad plasmina

La actividad enzimática aparece en el día 21 y aumenta conforme el tiempo de infección, en especial es notable en los días 28 y 60 (Fig 8.2).

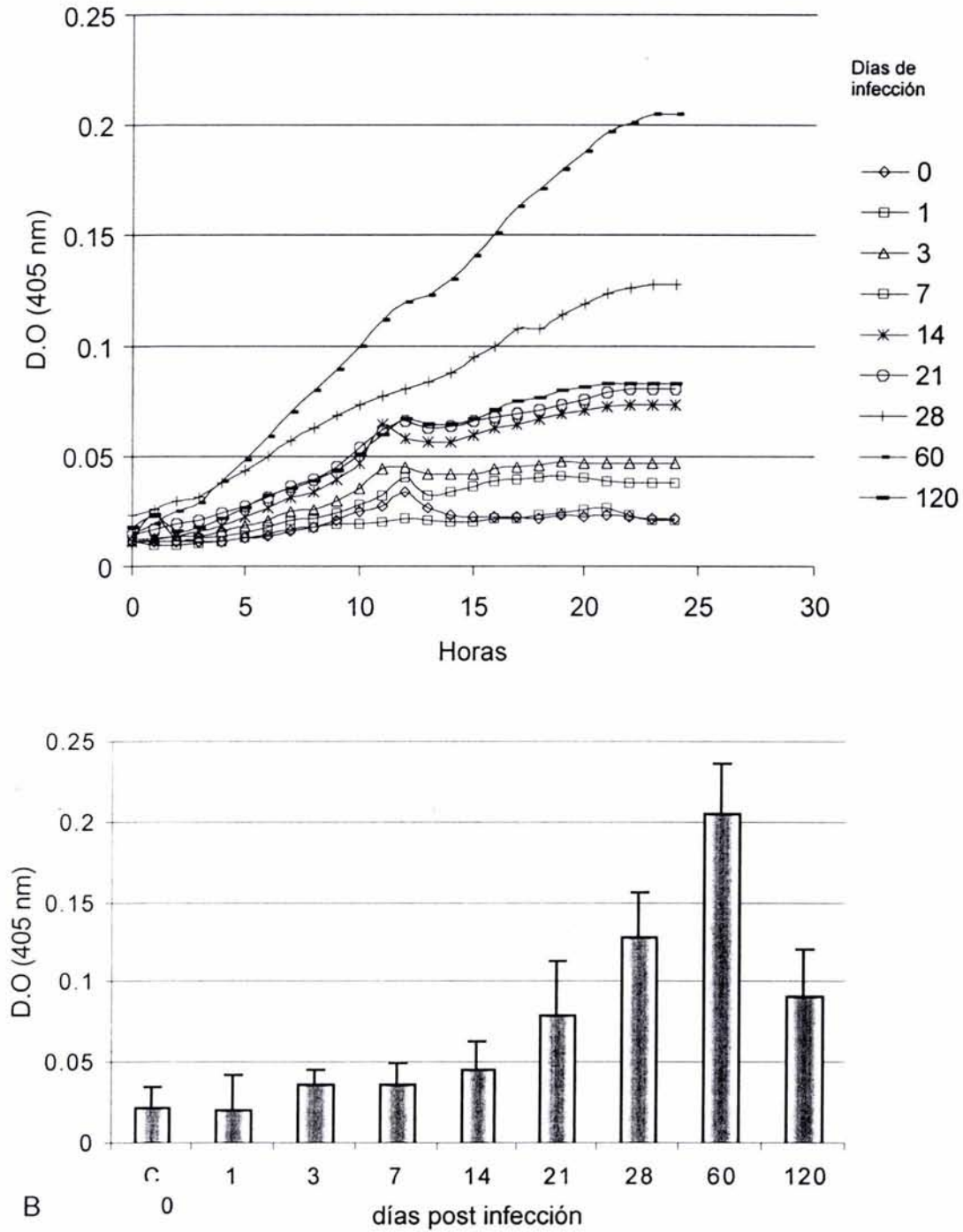


Fig. 8. 2. Cinética enzimática de extractos pulmonares. A. Cinética durante 24 horas. B. D.O. a las 24 horas. En ambas figuras podemos observar que existe un aumento en la actividad enzimática de plasmina a partir del día 14.

La concentración de la Plm en los extractos de los pulmones homogenizados, coincide con su actividad aumentando a medida que avanza la infección. La concentración varió de 0.4 microunidades (μu) en el control hasta 2.35 μu en la muestra de 60 días. En el caso de las muestras de 120 días esta concentración disminuyó concordando con la disminución de actividad (Fig 8. 3).

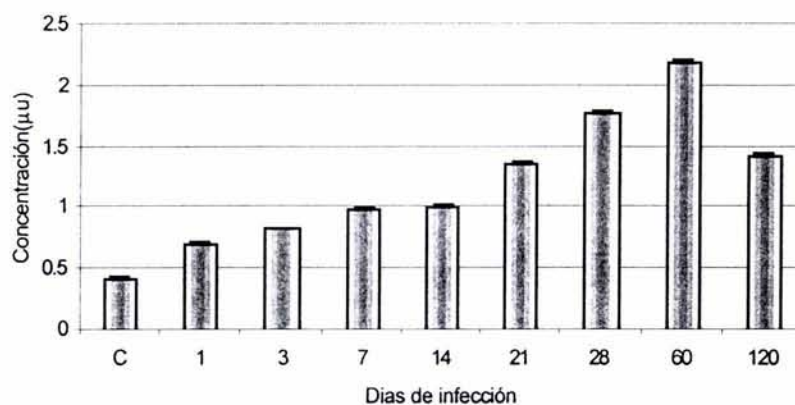


Fig. 8. 3. Cuantificación de la concentración de Plm en los extractos pulmonares.

En la Tabla 8.1 se muestran los valores de Plm obtenidos para cada d.p.i.

Tabla 8.1. Concentración de Plm en sobrenadantes de homogenizados pulmonares

d.p.i.	Concentración Plm (μu)
0	64.85
1	65.27
3	75.68
7	77.99
14	80.43
21	80.88
28	88.49
60	96.21
120	79.27

8.3 Tinción con Hematoxilina- eosina

En las Figuras VIII. 4a y VIII.5a se observa que en los tejidos normales, al igual que en los primeros días de infección no hay cambios evidentes en los tejidos. A partir del día 7 se observa la aparición de un infiltrado celular compuesto principalmente por macrófagos, el cual aumenta y para el día 14, muestra una distribución más amplia haciéndose evidente las lesiones a lo largo del tejido. En el día 21 se observa la presencia de lesiones granulomatosas y para el día 28 la presencia de granulomas aumenta tanto en frecuencia como en el grado de la lesión. En el tejido del día 60, se observan lesiones extensas en casi todo el tejido.

8.4 Tinción con Zhiel – Neelsen

Las Figuras VIII.4b y VIII.5b muestran que tanto en el control sano como en los primeros 7 días de infección no hay presencia de micobacterias en los tejidos. A partir del día 14 se empiezan a detectar, y su número va aumentando a medida que aumenta la infección. Las bacterias se localizan en los sitios donde se encuentran lesiones.

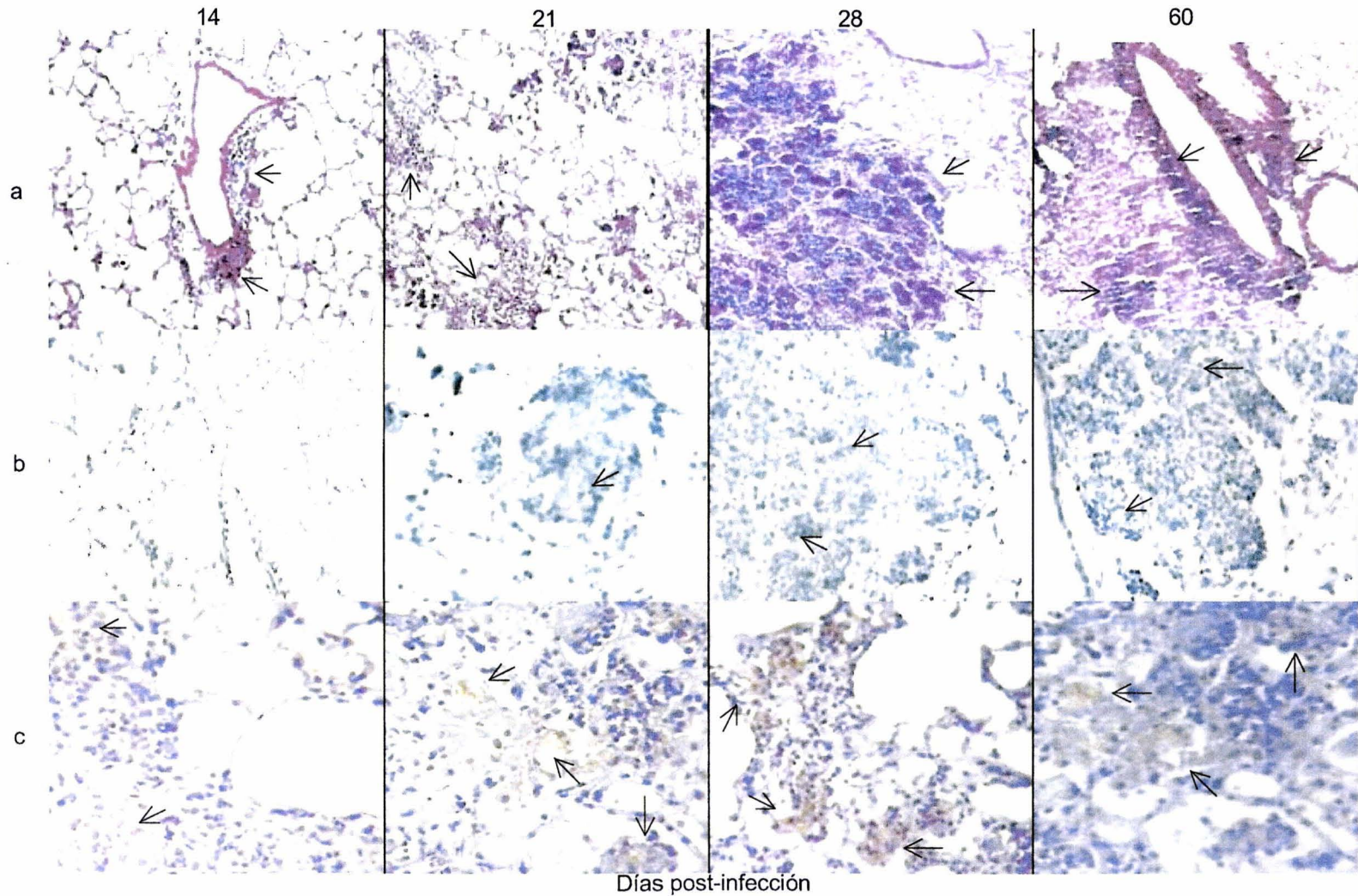
8.5 Inmunohistoquímica

En las figuras VIII.4c y VIII.5c se observa que tanto en el control como en los 7 primeros días de infección no hay P1g/P1m en los tejidos. Es a partir del día 14 cuando se empieza a observar la presencia de P1g/P1m. En los días subsiguientes la marca aumenta en intensidad y en frecuencia a medida que aumentan los días de infección. Interesantemente, se observó que la reactividad se limitó principalmente a los sitios donde se presentan las lesiones. Además en estos sitios se observa la presencia de macrófagos, con micobacterias.

Figura VIII. 4. Tejidos de 0 a 7 días de infección con a) Tinción de Hematoxilina- eosina, b) Tincón con Zhiel – Neelsen y c) Inmunohistoquímica. a) Podemos observar que en los tejidos normales, al igual que en los primeros días no se observa ningún cambio evidente en el tejido. A partir del día 7 empezamos a observar la aparición de infiltrado en algunas células. b) podemos observar que en estos tejidos no hay presencia de bacterias. c) En la inmunohistoquímica podemos observar que no existe reconocimiento por parte del anticuerpo tanto en el control como en los 7 primeros días de infección.



Figura VIII. 5. Tejidos de los días 14 a 60 días con a) Tinción de Hematoxilina- eosina, b) Tinción con Zhiel- Neelsen y c) Inmunohistoquímica. a) En el día 14 aparece un infiltrado. A partir del día 21 observamos la presencia de lesiones tisulares que se hacen más evidentes conforme al desarrollo de la enfermedad. b) En el tejido del día 14 observamos pocas bacterias. Posteriormente observamos un aumento en el número de bacterias c) A partir del día 14 podemos observar reconocimiento por parte del anticuerpo. En los días subsiguientes la marca del anticuerpo aumenta.



8.6 Cuantificación de Plg/Plm en tejidos

El promedio del número de células positivas se observa en la gráfica de la figura 8.6. En los controles y primeros días de infección no se observa ninguna célula positiva. En la muestra del día 14 aparecen las células positivas las cuales aumentan en los días subsecuentes. El número máximo de células positivas se alcanza a los 28 días. A los 60 días, el número de células positivas disminuye a los niveles del día 21. Esto puede deberse a que existe un menor número de células totales en el tejido. Los resultados presentados anteriormente sugieren que puede existir una relación entre la presencia de la bacteria y el Plg con el daño al tejido pulmonar.

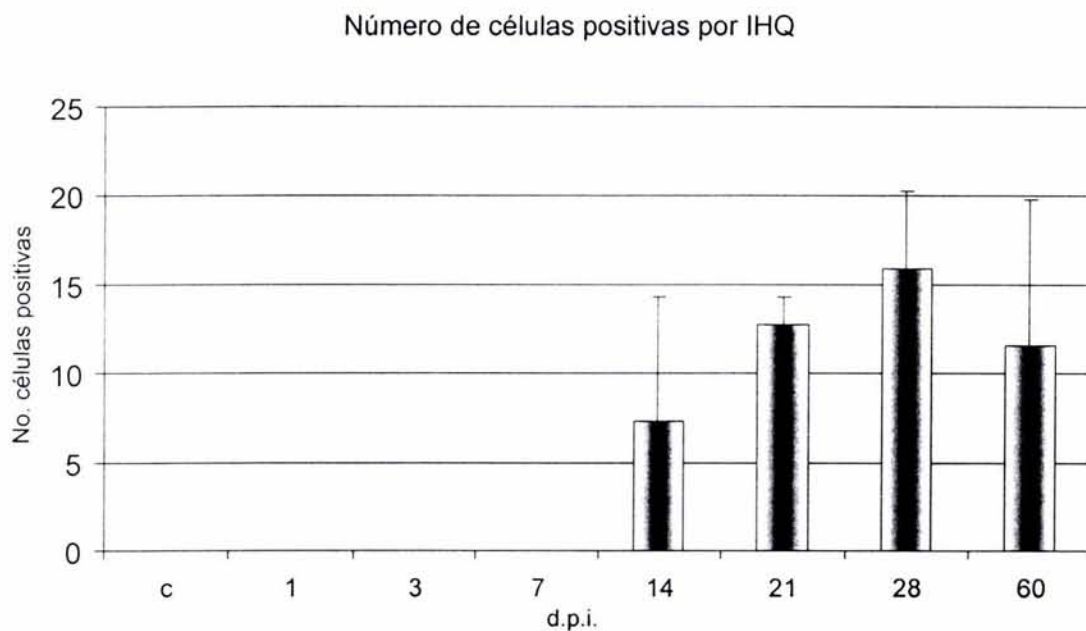


Figura 8.6. Número de células positivas a Plg detectadas por IHQ

9. DISCUSIÓN

M. tuberculosis es un patógeno exitoso debido a que tiene la capacidad de sobrevivir en su hospedero y diseminarse. En la actualidad, no se han identificado factores involucrados en la diseminación de la micobacteria. Se han propuesto varias hipótesis para explicar la liberación de bacterias y por ende su diseminación. Una de las más aceptadas actualmente, implica la liberación de las bacterias debido a la muerte de los macrófagos como resultado de la replicación bacteriana ⁷⁶. Otros proponen que la diseminación de *M. tuberculosis* de los pulmones está determinada por factores innatos del hospedero y es independiente de los linfocitos B o T. Se observó que la bacteria inicialmente emigra de los pulmones vía linfática ya que se le ha encontrado en nódulos linfáticos periféricos cerca de otros órganos ⁷⁷.

Algunas bacterias patógenas tienen la capacidad de utilizar el sistema del Plg/Plm para su diseminación. La presencia de receptores y activadores para Plg en *M. tuberculosis*, sugiriendo que las micobacterias pudieran también utilizar este sistema en invasividad y patogénesis. En este trabajo se buscó la existencia de una posible relación del aumento en la presencia de Plg y el desarrollo de la enfermedad tuberculosa.

Se demostró que la presencia del Plg/Plm en los pulmones infectados, se hace evidente a partir de día 14 y aumenta con el tiempo de infección. Con respecto a la actividad de Plm, se puede observar que aumenta a los 14 d.p.i. y continúa aumentando conforme se desarrolla la infección. La concentración de Plm también aumenta conforme progresa la enfermedad.

En el análisis de los tejidos por inmunohistoquímica, se detectó la presencia de Plg/Plm a partir del día 14, lo que está correlacionado con la presencia, aumento de las bacterias, y con la gravedad de las lesiones originadas. La presencia de Plg/ Plm en los tejidos, se observó únicamente en las zonas con lesiones tisulares.

En el modelo establecido por el Dr. Rogelio Hernández, a partir del día 14 aumentan las UFC y la severidad de las lesiones tisulares. La presencia del Plg y de la actividad de Plm, se hace evidente a partir del día 14, excepto en el Inmunoblot. Esto puede deberse a que las otras técnicas utilizadas tienen mayor sensibilidad.

En todos los casos, existe una disminución de la presencia de Plg/Plm en el día 120. En el modelo utilizado en este trabajo se observa una disminución de la carga bacteriana (UFC) y del tamaño de las lesiones granulomatosas a los 120 d.p.i. Esto, junto con la gravedad de la enfermedad de los animales pudiera generar una disminución en la presencia de Plg /Plm.

Los resultados en conjunto, sugieren que existe una relación entre el desarrollo de la enfermedad y la presencia de Plg/Plm. Por lo que se sugiere que *M. tuberculosis* pudiera utilizar este mecanismo para producir daño e invasión tisular.

10. CONCLUSIONES

- ✚ La presencia del P_{Ig}/P_{Im} en homogenizados pulmonares de ratones infectados con *M. tuberculosis* aumenta conforme el desarrollo de la infección

- ✚ La actividad y concentración de P_{Im} aumenta con el desarrollo de la infección, detectándose desde el día 14 p. i.

- ✚ La presencia de P_{Ig}/P_{Im} se localiza exclusivamente en áreas específicas con lesiones tisulares.

- ✚ Existe una correlación entre el desarrollo de la enfermedad y el aumento en la presencia de P_{Ig}/P_{Im}.

11. PERSPECTIVAS.

Los resultados de este trabajo sugieren que existe una relación entre la tuberculosis y la presencia de Plg/Plm. Sin embargo, se requerirán de nuevos abordajes experimentales a fin de demostrar la participación de la bacteria en la inducción Plg/Plm en los tejidos afectados. La detección de la inducción de los activadores para Plg, como el t-PA a consecuencia de la infección por la micobacteria, podría ser un indicador importante de la interacción del microorganismo con el sistema Plg/Plm.

En el laboratorio, se ha demostrado que *M. tuberculosis* es capaz de inducir la activación de Plg a Plm. La identificación y caracterización del activador de Plg micobacteriano permitirá profundizar en los mecanismos involucrados en esta interacción.

Otro aspecto importante a estudiar es definir la participación de los aislados clínicos de *M. tuberculosis*, especialmente aquellos que por su localización extrapulmonar pudieran teóricamente tener una mayor capacidad de diseminación. El estudio de la interacción de estos aislados con el sistema Plg/Plm, así como su determinación en los órganos afectados serán aspectos claves en la dilucidación de los mecanismos de invasividad y patogénesis asociados a la infección con micobacterias patógenas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Bloom B.R., 1994. Tuberculosis: Pathogenesis, Protection, and Control. *American Society for Microbiology Press*, USA.
2. Schlossberg, D. 2000. Tuberculosis e infecciones por micobacterias no tuberculosas. *Mc Graw Hill*. Cuarta edición. USA.
3. Sudre P, Ten Dam G, Kochi A. 1992. Tuberculosis in the present time: A global overview of the tuberculosis situation. *Bull World Health Organ*.70(2):149-59.
4. Cauten GM, Pio A, ten Dam HG. 2002. Annual Risk of Tuberculosis Infection. *Bull World Health Organ*. 80(6):503-11
5. Davey S. 2001. New global plan to halt TB. *Bull World Health Organ*. 79(12):1172-3.
6. Gazzard B. 2001. Tuberculosis, HIV and the developing world. *Clin Med* 1(1): 62-8.
7. Rajagopalan S. 2001. Tuberculosis and Aging: A Global Health Problem. *Aging and Infectious diseases*. *Clin Infect Dis*.1;33(7):1034-9.
8. WHO Report 2003. Global Tuberculosis Control: Surveillance, Planning, Financing. *Bull World Health Organ*. <http://www.who.int/gtb>
9. Morbilidad por tuberculosis pulmonar en Salud: México 2001. Primera edición. Secretaría de Salud. pp. 54-55. <http://www.ssa.gob.mx>
10. Báez-Saldaña R, Pérez-Padilla R, Salazar-Lezama M. 2003. Discrepancias entre los datos ofrecidos por la Secretaría de Salud y la Organización Mundial de la Salud sobre tuberculosis en México, 1981-1998. *Salud Pública Mex*. 45(2): 78-83
11. Pérez-Padilla R. 2001. La tuberculosis en México, deuda añeja de salud pública. *Gac Med Mex*. 137(1): 93-4.
12. Flisser A, Velasco A, Martínez C, González F, Briseño B, García R, Caballero A, Hernández I, García H, Gutiérrez L, Rodríguez G, López I, Galindo S, Vázquez R, Balandrano S, Guzmán C, Olivo A, De la Rosa JL, Magos C, Escobar A, Correa D. 2002. Infectious Diseases in Mexico. A Survey from 1995–2000. *Arch Med Res*. 33(4):343–350

13. Garcia-Garcia Mde L, Valdespino-Gomez JL, Palacios-Martinez M, Mayar-Maya ME, Garcia-Sancho C, Sepulveda-Amor J. 1995. Tuberculosis and AIDS in Mexico. *Salud Pública Mex.* 37(6):539-48.
14. Leung AN. 1999. Tuberculosis: the essentials. *Radiology.* 210(2):307-322
15. Cardona P, Auxina V. 2000. Histopathology of tuberculosis. Approaching the development of pulmonary lesions through an aerosol-induced experimental model in animals. *Arch Bronconeumol*, 36(11): 645-650
16. Clark-Curtiss JE, Haydel SE. 2003. Molecular genetics of *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis. *Annu Rev Microbiol.* 57:517-49
17. Falkow S. 2004. Molecular Koch's postulates applied to bacterial pathogenicity a personal recollection 15 years later. *Nature Rev Microbiol.* 2(1): 67-72
18. Milburn HJ. 2001. Primary tuberculosis. *Curr Opin Pulm Med.* 7(3):133-41.
19. Murray CJ, Styblo K, Rouillon A. 1990. Tuberculosis in developing countries: burden, intervention and cost. *Bull Int Union Tuberc Lung Dis.* 65(1): 6-24.
20. Zúñiga JA. 2000. Aspectos inmunogenéticos de la tuberculosis pulmonar. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex.* 13(4): 240-247
21. Stewart G, Robertson BD, Young DB. 2003. Tuberculosis: a problem with persistence. *Nature Rev Microb.* 1(2): 97-105
22. Flynn JL, Ernst JD. 2000. Immune responses in tuberculosis. *Curr Opin in Immunol.* 12(4):432-36
23. Flynn JL, Chan J. 2001. Immunology of Tuberculosis. *Annu Rev Immunol.* 19:93-129
24. Kaufmann S. 2001. How can immunology contribute to the control of tuberculosis? *Nat Rev Immunol.* 1: 20-30
25. Crevel R, Ottenhoff TH, Meer JW. 2002. Innate Immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Microbiol Rev.* 15(2): 294-309

26. Dmitriev BA, Ehlers S, Rietschel ET, Brennan PJ. 2001. Molecular mechanisms of the mycobacterial cell wall: from horizontal layers to vertical scaffolds. *Intl. J. Med. Microbiol.* 290:251– 58
27. Balasubramanian V, Wiegand EH, Taylor BT, Smith DW. 1994. Pathogenesis of tuberculosis: pathway to apical localization. *Tuber Lung Dis.* 75(3):168-78.
28. Harmsen AG, Muggenburg BA, Snipes MB, Bice DE. 1985. The role of macrophages in particle translocation from lungs to lymph nodes. *Science.* 230 (4731):1277–1280.
29. Teitelbaum R, Schubert W, Gunther L, Kress Y, Macaluso F, Pollard JW, McMurray DN, Bloom BR. 1999. The M cell as a portal of entry to the lung for the bacterial pathogen *Mycobacterium tuberculosis*. *Immunity.* 10(6): 641–650.
30. Reddy VM, Hayworth DA. 2002. Interaction of *Mycobacterium tuberculosis* with human respiratory epithelial cells (HEp-2). *Tuberculosis.* 82 (1): 31–36.
31. Birkness KA, Deslauriers M, Bartlett JH, White EH, King CH, Quinn FD. 1999. An in vitro tissue culture bilayer model to examine early events in *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Infect. Immun.* 67(2): 653–658.
32. Vidal M.C, Melo MA, Reddy VM, Locht C, Menozzi FD. 2003. Systemic dissemination in tuberculosis and leprosy: do mycobacterial adhesins play a role? *Microbes and Infection* 5: 677–684
33. Pethe K, Bifani P, Drobecq H, Sergheraert C, Debie AS, Locht C, Menozzi FD. 2002. Mycobacterial heparin-binding hemagglutinin and laminin-binding protein share antigenic methyllysines that confer resistance to proteolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99(16):10759-64
34. Pethe K, Alonso S, Biet F, Delogu G, Brennan MJ, Locht C, Menozzi FD. The heparin-binding haemagglutinin of *M. tuberculosis* is required for extrapulmonary dissemination. *Nature.* 2001 Jul 12;412(6843):190-4.

35. Menozzi FD, Pethe K, Bifani P, Soncin F, Brennan MJ, Locht C. 2002. Enhanced bacterial virulence through exploitation of host glycosaminoglycans. *Mol Microbiol.* 43(6):1379-86.
36. Bermudez L, Sangari F, Kolonoski P, Petrofsky M, Goodman J. 2002. The Efficiency of the Translocation of *Mycobacterium tuberculosis* across a Bilayer of Epithelial and Endothelial Cells as a Model of the Alveolar Wall Is a Consequence of Transport within Mononuclear Phagocytes and Invasion of Alveolar Epithelial Cells. *Infect Immun.* 70(1): 140–146
37. Lijnen HR. 2002. Matrix Metalloproteinases and Cellular Fibrinolytic Activity. *Biochemistry (Moscow)*, 67(1): 92-98
38. Lottenberg R, Wenz D, Boyle M.D.P. 1994. Capturing host plasmin(ogen): a common mechanism for invasive pathogens? *Trends Microbiol.* 2(1):20-4.
39. Lähteenmäki K, Kuusela P, Korhonen TK. 2001. Bacterial plasminogen activators and receptors. *FEMS. Microbiol Rev.* 25(5):531-552
40. Collen D. 1999. The Plasminogen (Fibrinolytic) System. *Thromb Haemostasis.* 82(2): 259-70
41. Robbins KC, Summaria L. 1976. Plasminogen and plasmin. *Methods Enzymol.* 45: 257-273
42. Markus G, Evers J, Hobika GH. 1979. Comparison of some properties of Native (Glu) and Modified (Lys) Human Plasminogen. *J Biol Biochem.* 253(3):733-739.
43. Gong Y, Kim O, Felez J, Grella D, Francis K, Castellino J, Miles L. 2001. Conversion of Glu-Plasminogen to Lys-Plasminogen Is Necessary for Optimal Stimulation of Plasminogen Activation on the Endothelial Cell Surface. *J Biol Chemistry.* 276(22): 19078–19083
44. Castellino FJ, Powell JR. 1981. Human plasminogen. *Methods Enzymol.* 80 ptC: 365-78
45. Bass R, Ellis V. 2002. Cellular mechanisms regulating non-haemostatic plasmin generation. *Biochem Soc Trans.* 30(2): 189-194

46. Edwards DR, Murphy G. 1998. Proteases, invasion and more. *Nature*. 394(6693):527-28
47. Medved L, Niewenhuizen W. 2003. Molecular mechanism of initiation of fibrinolysis by fibrin. *Thromb Haemost.* 89(3).409-19
48. Berg DT, Burck PJ, Berg DH, Grinnell BW.1993. Kringle glycosylation in a modified human tissue plasminogen activator. *Blood*. 81 (5): 1312-22
49. Hoylaerts M, Rijken D, Lijnen H, Collen D. Kinetics of the Activation of Plasminogen by Human Tissue Plasminogen Activator. *J Biol Chem*. 257(6): 2912-2919.
50. Sisson T, Hanson K, Subbotina N, Patwardhan A, Hattori N, Simon R. 2002. Inducible lung-specific urokinase expression reduces fibrosis and mortality after lung injury in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 283(5): L1023–L1032,
51. Jespers L, Vanwetswinkel S, Lijnen HR, Van Herzeele N, Collen D, De Maeyer M. 1998. Interface scanning and 3D model of the staphylokinase: plasmin activator complex. *Fibrinol Proteol*. 12(1):4
52. Jespers L, Vanwetswinkel S, Lijnen HR, Van Herzeele N, Van Hoef B, Demarsin E, Collen D, De Maeyer L. 1999. Structural and functional basis of plasminogen activation by staphylokinase. *Thromb Haemost.* 81(4):479-485.
53. Carmeliet P, Collen D. 1998. Development and disease in proteinase deficient mice: role of the plasminogen, matrix metalloproteinase and coagulation system. *Thromb Res.* 91(6):255-285.
54. Ploplis VA, Castellino FJ. 2000. Nonfibrinolytic Functions of Plasminogen. *Methods*. 21(2): 103-110.
55. Boyle M, Lottenberg R. 1997. Plasminogen activation by invasive human pathogens. *Thromb Haemost.* 77(1): 1-10
56. Lähteenmäki K, Kuusela P, Korhonen TK. 2000. Plasminogen activation in degradation and penetration of extracellular matrices and basement membranes by invasive bacteria. *Methods* 21(2): 125-32

57. Lähteenmäki K, Virkola R, Pouttu R, Kuusela P, Kukkonen M, Korhonen T. 1995. Bacterial Plasminogen receptors: in vitro evidence for a role in degradation of the mammalian extracellular matrix. *Infect Immun.* 63(9): 3659-3664
58. Korhonen TK, Virkola R, Lahteenmaki K, Bjorkman Y, Kukkonen M, Raunio T, Tarkkanen AM, Westerlund B. 1992. Penetration of fimbriate enteric bacteria through basement membranes: a hypothesis. *FEMS Microbiol Lett.* 79(1-3):307-12.
59. Coleman JL, Gebbia JA, Piesman J, Degen JL, Bugge TH, Benach JL. 1997. Plasminogen is required for efficient dissemination of *B. burgdorferi* in ticks and for the enhancement of spirochetemia in mice. *Cell.* 89(7):1111-19.
60. Westerlund B, Korhonen TK. 1993. Bacterial proteins binding to the mammalian extracellular matrix. *Mol. Microbiol.* 9(4): 687-94
61. Coleman JL, Benach JL. 1999. Use of the plasminogen activation system by microorganisms. *J Lab Clin Med.* 134(6):567-76.
62. Schroeder B, Boyle M, Sheerin B, Asbury A, Lottenberg R. 1999. Species Specificity of Plasminogen Activation and acquisition of surface associated proteolytic activity by group C *Streptococci* grown in plasma. *Infect Immun.* 67(12): 6487-6495
63. Coleman JL, Roemer EJ, Benach JL. 1999. Plasmin coated *Borrelia burgdorferi* degrades soluble and insoluble components of the mammalian extracellular matrix. *Infect Immun.* 67(8): 3929-36.
64. Lähteenmäki K, Virkola R, Saren A, Emody L, Korhonen TK. 1998. Expression of plasminogen activator Pla of *Yersinia pestis* enhances bacterial attachment to the mammalian extracellular matrix. *Infect. Immun.* 66(12):5755-62.
65. Redlitz A, Fowler BJ, Plow EF, Miles LA. 1995. The role of an enolase-related molecule in plasminogen binding to cells. *Eur J Biochem.* 227(1-2): 407-15.

66. Vassalli JD, Wohlwend A, Belin D. 1992. Urokinase-catalyzed plasminogen activation at the monocyte/ macrophage cell surface: a localized and regulated proteolytic system. *Curr Top Microbiol Immunol.* 181: 65-86.
67. Lijnen HR, Collen D. 1995. Mechanisms of physiological fibrinolysis. *Baillieres Clin Haematol.* 8(2):277-90.
68. Parkkinen J, Rauvala H. 1991. Interactions of plasminogen and tissue plasminogen activator (t-PA) with amphotericin. *J. Biol. Chem.* 266(25):16730-35.
69. Mulichak AM, Tulinsky A, Ravichandran KG. 1991. Crystal and molecular structure of human plasminogen kringle 4 refined at 1.9-A resolution. *Biochemistry.* 30(43): 10576-88.
70. Izaki S, Hibino T, Isozaki Y, Hsu PD, Izaki M, Matsuo O. 1984. Plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor associated with granulomatous inflammation; a study with murine leprosy. *Thromb Haemost.* 52(3): 243-249
71. Gordon S, Cohn ZA. 1978. Bacille calmette- Guerin infection in the mouse. Regulation of macrophage plasminogen activator by T lymphocytes and specific antigen. *J Exp Med.* 147(4):1175-88
72. Schuyler M, Forman W. 1984. Alveolar macrophage plasminogen activator. *Exp Lung Res.* 6(2):159-69
73. Isaki S, Isozaki Y, Satoh M, Hibino T, Kon S, Izaki M. 1983. Comparative study with two polar types of murine leprosy: an involvement of plasminogen activator and its possible regulating factor in the granulomatous tissue reaction. *J Invest Dermatol.* 80(2):81-5
74. Monroy V, Amador A, Ruiz B, Ezpinosa-Cueto P, Xolalpa W, Mancilla R, Espitia C. 2000. Binding and activation of human plasminogen by *Mycobacterium tuberculosis*. *Infection Immunity.* 68(7): 4327-30.
75. Sato J, Schorey J, Ploplis VA, Haalboom E, Krahule L, Castellino Fj. 2003. The fibrinolytic system in dissemination and matrix protein deposition during a mycobacterium infection. *Am J Pathol.* 163(2):517-31

76. Rhoades ER, Frank AA, Orme IM. 1997. Progression of chronic pulmonary tuberculosis in mice aerogenically infected with virulent *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberc. Lung Dis.* 78(1):57–66.
77. Chackerian A, Alt JM, Perera TV, Dascher C, Behar S. 2002. Dissemination of *Mycobacterium tuberculosis* is influenced by Host Factors. *Infect Immun.* 70(8):4501–09

Anexo I

Determinación de concentración de proteínas

Se empleó el método de Bradford que determina concentración de proteína en base a los anillos aromáticos presentes en aminoácidos. Kit de Bio-Rad. Protein Assay No.Cat. 500-0006

SDS-PAGE

Para visualizar las proteínas de las muestras se prepararon geles al 12 % SDS-PAGE (Electroforesis en Gel de Poliacrilamida - Dodecil Sulfato de Sodio).

Gel separador 12 %

Resolving gel 4X buffer 1.5 M Tris pH 8.8, 0.4% SDS	2.5 ml
H ₂ O	3.5 ml
Acrilamida 30 %, Bis acrilamida 0.8 % (Bio-Rad)	4 ml
10 % Persulfato de amonio	100 µl
TEMED	10 µl

Gel concentrador 4.5 %

Stacking gel 4X buffer 0.5 M Tris pH 8.8, 0.4 % SDS	1.25 ml
H ₂ O	3 ml
Acrilamida 30 %, Bis acrilamida 0.8 % (Bio-Rad)	0.75 ml
10 % Persulfato de amonio	50 µl
TEMED	10 µl

Los reactivos utilizados fueron:

Hidroximetil-aminometano (TRIS)
Dodecil Sulfato de Sodio (SDS)
Acrilamida
Bisacrilamida
Persulfato de Amonio
N,N,N',N'-tetramethylenediamina (TEMED)

Bio- Rad No. Catalogo. 161-0719
Boehringer No. Catalogo. 1667289
Bio- Rad No. Catalogo. 161-0107
Bio- Rad No. Catalogo. 161-0201
Bio- Rad No. Catalogo. 161-0700
Bio- Rad No. Catalogo. 161-0800

Western Blot

Las proteínas fueron transferidas a membranas de nylon PVDF. Immobilon-P (Millipore, Co., Bedford, Mass). Las membranas fueron activadas previamente a la transferencia incubándolas 5 min en metanol.

Immunoblot

Las diluciones de los anticuerpos fueron preparadas en PBS pH 7.4, 150 mM NaCl y 0.01 M de fosfatos con Albumina de Suero Bovino al 3% y Tween 20 al 0.05%.

Los reactivos utilizados fueron:

Albumina de suero bovino	Sigma No. Cat. A9647
Polioxietileno- Sorbitan Monolaurato (Tween 20)	Sigma No. Cat. P-1379
Plasminógeno de suero humano.	Roche. No. Cat. 874 477
Anticuerpo policlonal anti plasminógeno murino hecho en cabra	Santa Cruz. No. Cat. Sc-15036
Anticuerpo policlonal anti IgG de cabra hecho en conejo conjugado con peroxidasa	Zymed No. Cat 81-1620
3,3-diaminobenzidina tetrahydrochloride	Sigma No. Cat. D5637

Ensayos colorimétricos

Para los ensayos de detección de P1m se utilizaron los siguientes reactivos:

Sustrato cromogénico Chromozym PL.	Roche No. Cat. 378 461
Placas para ELISA.	Costar 3590 EIA/RIA
Plasmina de plasma humano	Roche No. Cat 602 361

Exploración del daño histopatológico en tejidos pulmonares

Los cortes fueron teñidos con:

Hematoxilina de Harris	JT BAKER No. Cat. 17372-87-1
Eosina	JT BAKER No. Cat. 17372-87-1

Detección de la presencia de *M. tuberculosis* en tejidos pulmonares

La técnica para la tinción Ziehl-Neelsen fue la siguiente:

1. Agregar al frotis Fucsina Fenicada de Ziehl-Neelsen. durante 30-45 min
2. Lavar con agua corriente
3. Decolorar con la mezcla ácido-alcohol.
 - o Ácido clorhídrico concentrado3 ml
 - o Etanol 95%97 ml
4. Lavar con agua para que no prosiga la decoloración.
5. Teñir con azul de metileno 1 min.
6. Lavar con agua el resto de colorante.
7. Secar la preparación.
8. Examinar al microscopio.

Los reactivos utilizados fueron:

Fucsina Fenicada Ziehl Neelsen P / Baar	HYCEL No Cat. 42628
Ácido clorhídrico	JT BAKER No. Cat. 9535-02
Etanol absoluto	JT BAKER No. Cat. 9014-03
Azul de metileno	JT BAKER No. Cat. 7220-79-3

VII.9 Detección de Plg/Plm en tejidos pulmonares.

Los reactivos utilizados para el ensayo de inmunohistoquímica fueron:

Poli L-Lisina	SIGMA P8920
Parafina	JT BAKER No. Cat. 8002-74-2
Xileno	JT BAKER No. Cat. 9490-03
Etanol absoluto	JT BAKER No. Cat. 9014-03
Metanol	JT BAKER No. Cat. 9070-03
Peróxido de hidrógeno	SIGMA No. Cat. 7722841
Bloqueador Universal de proteínas libres de suero	QUÍMICA VALANER No. Cat. DOIX090980
Anticuerpo policlonal anti plasminógeno murino hecho en cabra	Santa Cruz. No. Cat. Sc-15036
Anticuerpo policlonal anti IgG de cabra hecho en conejo conjugado con peroxidasa	Zymed No. Cat 81-1620
3,3-diaminobenzidina tetrahydrochloride	Sigma No. Cat. D5637
Hematoxilina de Harris	HYCEL No. Cat. 738

Anexo II. Lista de abreviaturas

	Abreviatura
Bacilo de Calmette-Guerin	BCG
Ácido paraamino salicílico	PAS
Organización Mundial de la Salud	OMS
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>M. tuberculosis</i>
Virus de la Inmunodeficiencia Humana	VIH
Complejo mayor de histocompatibilidad	MHC
Matriz extracelular	EMC
Plasminógeno	Plg
Plasmina	Plm
Metaloproteinasas de la matriz	MMPs
Activadores de Plasminógeno	PA
Activador de Plasminógeno tipo- tejido	t-PA
Activador de Plasminógeno tipo-uroquinasa	u-PA
Receptor para u- PA	uPAr
Inhibidores específicos de Activadores de Plasminógeno	PAIs
Inhibidores tisulares de metaloproteinasas	TIMPs
Sitios de unión a lisina (lysine binding sites)	LBS
Aminoácidos	Aa
Arginina	Arg
Lisina	Lys
Arginina	Arg
Valina	Val
Días post infección	d.p.i.
Estreptoquinasa	Stk
Estafiloquinasa	Sth
Electroforesis en Gel de Poliacrilamida - Dodecil Sulfato de Sodio	SDS-PAGE
Diaminobencidina	DAB
Densidad óptica	D.O
Proteoglicanos	Pg
Adhesina hemaglutinina de unión a heparina	HBHA
