

00377



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS

El papel de los linfocitos T CD8⁺ en el control de
Mycobacterium tuberculosis en macrófagos
alveolares humanos infectados *in vitro*.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)

P R E S E N T A :
CLAUDIA CARRANZA SALAZAR

UNAM
POSGRADO



DE TESIS: DR. EDUARDO SADA DÍAZ

2005

COORDINACIÓN

m347642



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.

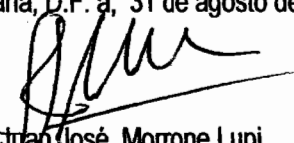
Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 11 de abril del 2005, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado de Maestría en Ciencias Biológicas (Biología Experimental) del(a) alumno(a) **Carranza Salazar Claudia** con número de cuenta **87536010** con la tesis titulada: "**El papel de los linfocitos TCD8+ en el control de *Mycobacterium tuberculosis* en macrófagos alveolares humanos infectados in vitro**", bajo la dirección del(a) **Dr. Eduardo Sada Díaz**.

Presidente:	Dra. Yolanda López Vidal
Vocal:	Dr. Rogelio Hernández Pando
Secretario:	Dr. Eduardo Sada Díaz
Suplente:	Dra. Clara Inés Espitia Pinzón
Suplente:	Dr. Stephan K. Schwander

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F. a, 31 de agosto del 2005


Dr. Juan José Morrone Lupi
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del interesado

RECONOCIMIENTOS

Autorizo a la Dirección General de Ediciones de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo excepcional.

NOMBRE: Claudia Carranza Salazar

FECHA: 8 - Sep - 05

FIRMA: [Firma]

Este trabajo se realizó bajo la dirección del Dr. Eduardo Sada Díaz en el Departamento de Microbiología Investigación del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, INER.

El comité tutorial estuvo integrado por:

Dr. Eduardo Sada Díaz

INER

Dr. Rogelio Hernández Pando

INCMNSZ

Dr. Stephan K Schwander

New Jersey Medical School

El proyecto se realizó con el financiamiento del Consejo Nacional de la Ciencia y Tecnología (CONACYT, proyecto No. 3479-M) y por Nacional Institute of Health (proyecto ROI HL51630-06).

AGRADECIMIENTOS

A mi tutor el Dr. Eduardo Sada Díaz por su apoyo para la realización de este trabajo.

De manera especial a la Dra. Martha Torres Rojas y al Dr. Stephan K. Schwander por el gran esfuerzo que realizaron para desarrollar este proyecto desde el inicio hasta el final, por su apoyo incondicional y por la gran amistad que siempre me han brindado.

A mis revisores de tesis por sus valiosos comentarios:

Dra. Yolanda López Vidal

Dr. Eduardo Sada Díaz

Dr. Rogelio Hernández Pando

Dra. Clara Espitia Pinzón

Dr. Stephan K Schwander

A Carmen, Esmeralda, María Teresa, Karen, María Esther, Bruno, Leticia, Silvia, Araceli y Rosa, porque cada uno colaboro de manera muy especial en el desarrollo de este trabajo.

Y una vez más a:

LUZ MARIA, ILEANA y DORA

por ser lo mejor que la vida me ha dado

CONTENIDO

	página
Índice	I
Índice de figuras	III
Abreviaturas	IV
Resumen	VI
Abstract	VIII
1. Introducción	1
2. Antecedentes	6
2.1 Respuesta Inmune hacia <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	7
2.2 Linfocitos T CD8 ⁺	10
2.3 Interferón gamma	13
2.4 Oxido Nítrico	14
3. Justificación	16
4. Hipótesis	17
5. Objetivo General	17
5.1 Objetivos específicos	17
6. Material y Métodos	18
6.1 Grupos de estudio	18
6.2 Lavado Bronquioloalveolar	19
6.2.1 Preparación de Células Bronquioloalveolares	19
6.3 Preparación de células mononucleares de sangre periférica	20
6.3.1 Purificación de los linfocitos TCD4 ⁺ y TCD8 ⁺	20
6.4 Preparación de <i>Mtb</i> H37Ra y <i>Mtb</i> H37Rv para la infección <i>in vitro</i> .	21
6.5 Fagocitosis	22
6.6 Infección y crecimiento intracelular de <i>Mtb</i> H37Ra y <i>Mtb</i> H37Rv en MA <i>in Vitro</i>	22
6.7 Determinación de la producción de ON	23

	página
6.8 Cuantificación de Interferon gamma	24
6.9 Análisis de marcadores de superficie por Citometria de Flujo	25
6.10 Inmuncitoquímica	25
6.11 Análisis Estadístico	26
7. Resultados	27
7.1 Fagocitosis	27
7.2 Crecimiento intracelular de <i>MtbH37Ra</i> y <i>MtbH37Rv</i> en cultivos de MA y co-cultivos AM/CD8 en Contactos Intradomiciliarios	27
7.3 Producción de IFN γ en cultivos de MA y en los co-cultivos de AM/CD8 $^{+}$ en Contactos Intradomiciliarios	31
7.4 Actividad bactericida y producción de IFN γ en cultivos de MA y en los co-cultivos de AM/CD4 $^{+}$ en Contactos Intradomiciliarios	34
7.5 Producción de ON	35
7.6 Actividad bactericida en cultivos de MA y en co-cultivos de MA/CD8 $^{+}$ en Controles de la Comunidad	39
7.7 Concentración de IFN γ en cultivos de MA y en los co-cultivos con MA/CD4 $^{+}$ y MA/CD8 $^{+}$ de CC	40
7.8 Subpoblaciones de células bronquioloalveolares	42
8. Discusión	43
9. Conclusiones	53
10. Perspectivas	55
11. Bibliografía	56
12. Apéndice	65

Índice de figuras y tablas

	página
Figura 1. Transmisión de la infección de <i>Mtb</i> en humanos	6
Figura 2. Conjunto de células que conforman al granuloma y citocinas que en este se producen	8
Figura 3. Mecanismos involucrados en el control intracelular de <i>Mtb</i> por linfocitos TCD8 ⁺	11
Tabla 1. Control del crecimiento intracelular de <i>Mtb</i> por MA y AM/CD8 ⁺ infectados con <i>Mtb</i> H37Ra y <i>Mtb</i> H37Rv	28
Figura 4. Efecto de TCD8 ⁺ en el control del crecimiento intracelular de <i>Mtb</i> H37Ra y <i>Mtb</i> H37Rv en MA y MA/CD8 ⁺ de Contactos Intradomiciliarios	30
Tabla 2. Producción de IFN γ por <i>Mtb</i> H37Ra y <i>Mtb</i> H37Rv en MA de CI con y sin linfocitos T CD8 ⁺ autólogos	31
Figura 5. Producción de IFN- γ por <i>Mtb</i> H37Ra y <i>Mtb</i> H37Rv en MA de CI de pacientes con Tuberculosis pulmonar (TBP) activa con y sin linfocitos TCD8 ⁺ autólogos	33
Figura 6. El efecto de linfocitos TCD4 ⁺ sobre el crecimiento de <i>Mtb</i> y la producción de IFN γ por MA infectados con <i>Mtb</i> H37Ra y <i>Mtb</i> H37Rv de 4 Contactos Intradomiciliarios de pacientes con TBP activa	35
Tabla 3. Producción de IFN γ por <i>Mtb</i> H37Ra y <i>Mtb</i> H37Rv en MA de 4 CI con y sin linfocitos T CD4 ⁺ autólogos.	36
Figura 7. Producción de ON por MA de 13 CI de pacientes con TBP activa	38
Figura 8. Efecto de linfocitos TCD8 ⁺ y TCD4 ⁺ sobre el crecimiento intracelular de <i>Mtb</i> en MA infectados de CC	39
Figura 9. Producción de IFN γ por MA de CC infectados con <i>Mtb</i> <i>Mtb</i> H37Ra y <i>Mtb</i> H37Rv y cultivados con o sin linfocitos TCD8 ⁺ y TCD4 ⁺ autólogos	41

Abreviaturas

TB	Tuberculosis
OMS	Organización Mundial de la Salud
<i>Mtb</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
TBP	Tuberculosis Pulmonar Activa
CI	Contactos Intradomiciliarios
CC	Controles de la Comunidad
PPD	Derivado Proteico Purificado de Tuberculosis
PPD –	PPD negativo
PPD +PPD	positivo
PBMC	Células Mononucleares de Sangre Periférica
<i>Mtb</i> H37Ra	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> , cepa del tipo avirulenta
<i>Mtb</i> H37Rv	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> , cepa del tipo virulenta
MHC-I	Complejo principal de histocompatibilidad clase I
MHC-II	Complejo principal de histocompatibilidad clase II
MA	Macrófagos Alveolares
TLR	Receptor Toll
MN	Monocitos
CD	Células dendríticas
Ags	Antígenos
NK	Células Natural Killer
IL	Interleucina
IFN γ	Interferón gamma
TNF α	Factor de Necrosis Tumoral alfa
ON	Oxido Nítrico
iNOS	Oxido Nítrico Sintetaza Inducible
BCG	Bacilo de Calmette Guèrin
IRN	Intermediarios reactivos del nitrógeno
INER	Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias
LAB	Lavado Bronquioloalveolar
BAC	Células Bronquioloalveolares
LA	Linfocitos Alveolares
MOI	Relación de infección
μ g	Microgramo
mM	Milimolar
μ M	Micromol
μ l	Microlitros
rpm	Revoluciones por minuto
min	Minuto
mm	Milímetros
PHS	Suero humano inactivado
HBSS	Solución Salina de Hanks
SFB	Suero Fetal Bovino
UFC	Unidades Formadoras de Colonias

H	Hora
D0	Día 0
D4	Día 4
D7	Día 7
SDS	Dodecil – Sulfato de Sodio
TA	Temperatura ambiente
ASB	Albúmina Sérica Bovina
ELISA	Ensayo Inmunoenzimatico
PBS	Solución Amortiguadora de pH de Fosfatos
DO	Densidad Óptica
FITC	Isotiocianato de Fluresceina
PE	Ficoeritrina
PerCP	Peridinina
FSC	Tamaño de las células
vs	Versus
SSC	Granularidad de las células
FACS	Citometría de flujo
NO ₂	Nitrito
1er Ab	Anticuerpo primario
2do Ab	Anticuerpo secundario
pg	Picogramo
ES	Error estándar

RESUMEN

La tuberculosis es una enfermedad producida por *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*), que afecta principalmente pulmón. Los mecanismos de defensa en este órgano han sido poco estudiados. Los macrófagos alveolares (MA) constituyen la primera línea de defensa y su interacción con otras células de la respuesta inmune son esenciales para el control de *Mtb*. La interacción entre linfocitos T, tanto CD4⁺ como CD8⁺ con los MA se desconocen. Por otra parte no todos los individuos infectados por *Mtb* desarrollan enfermedad activa. Un modelo para el estudio de los mecanismos de defensa son los Contactos Intradomiciliarios (CI) de pacientes con Tuberculosis pulmonar activa (TBP) que parecen ser una población protegida los cuales desarrollan una memoria específica contra *Mtb*. En este trabajo los CI se consideraron como un modelo de infección y control natural hacia *Mtb*.

En este trabajo se evaluó la capacidad de los MA de CI y de controles de la comunidad (CC) para inhibir el crecimiento intracelular de *Mtb* y la participación de los linfocitos T CD8⁺ y T CD4⁺ autólogos en está; la capacidad de éstos para producir Interferón gamma (IFN γ) y Oxido nítrico (ON) y su relación con el control del crecimiento de *Mtb*, en los MA infectados *in vitro*. Así mismo se estudio el impacto de la cepa avirulenta *Mtb* H37Ra y de la cepa virulenta *Mtb* H37Rv.

La inhibición del crecimiento intracelular fue medida en los días 0, 4 y 7 después de la infección y se reportó en Unidades Formadoras de Colonias (UFC), usando dos relaciones de infección (0.1:1 y 1:1, bacteria:célula). Los resultados mostraron que los linfocitos T CD8⁺ de los CI fueron capaces de inhibir significativamente el crecimiento de *Mtb* en los MA en comparación a los cultivos de los MA solos. Este efecto no se vio en los cultivos de los CC. La participación de los linfocitos T CD4⁺ en la inhibición del crecimiento de *Mtb* no fue significativa en ninguno de los dos grupos de estudio.

Para profundizar en el conocimiento de algunos mecanismos relacionados al control de el crecimiento de *Mtb* en el modelos de infección *in vitro* de los MA y su interacción con linfocitos se determinaron en los sobrenadantes de los cultivos ON e IFN γ . La producción de IFN γ en los cultivos de los MA fue significativamente más baja que la determinada en los sobrenadantes de los co-cultivos MA/CD8⁺ y MA/CD4⁺. La concentración de IFN γ se incrementó dos veces más en los co- cultivos MA/CD4⁺ que

en los co-cultivos MA/CD8⁺. La producción de ON en los cultivos de los MA de los CI se incremento en los días 4 y 7, pero no se observó relación con el control del crecimiento intracelular de *Mtb* o con la producción de IFN γ . La producción de ON en los sobrenadantes de los cultivos de los MA de los CC fue mínima.

En conclusión este es uno de los primeros trabajos donde se estudió la participación de los linfocitos T CD8⁺ autólogos sobre el control del crecimiento intracelular de *Mtb* en MA de CI y de CC. Los resultados obtenidos demuestran que los linfocitos T CD8⁺ de los CI están involucrados en la inhibición del crecimiento de *Mtb* en MA, sugiriendo que estas células deben de ser consideradas fundamentales en la respuesta inmune en humanos a *Mtb*. Con lo que respecta a la producción de IFN γ y de ON en este modelo de infección en los MA y linfocitos T CD8⁺ y T CD4⁺ no se demostró una relación directa sobre el control de *Mtb*.

ABSTRACT

CD8⁺ T cells have been implicated in the protective immune response against human tuberculosis, however the role that this cells is unclear. We investigated the role of human blood CD8⁺ T cells in the intracellular growth of *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) in human alveolar macrophages (AM) from healthy household contacts (HHC) of patients with active TB and healthy community controls (CC). AM were infected with *Mtb* H37Ra and H37Rv and the activity of killing in co-cultures of AM with autologous blood CD8⁺ T and CD4⁺ T cells were determined. The killing of bacteria was evaluated in three times points by CFU assay using low rates of infection (0.1, 1:1). Our data showed that CD8⁺ T lymphocytes from HHC were able of significantly increasing growth control conferred by AM alone. No contribution of CD8⁺ T from CC to the control of *Mtb* intracellular growth was observed. Nevertheless CD4⁺ T cells did not increase intracellular growth control neither in HHC nor in CC donor.

Nitric oxide (NO) and Interferon- γ (IFN- γ) were determined in AM and AM/CD8 culture supernatants as measurement of killing mechanisms. IFN- γ production by AM cultures was significantly lower than in AM/CD4 and AM/CD8 co-cultures. However, AM/CD4 produce at least twice amount of INF- γ than in AM/CD8 cultures in both groups. NO production from AM of HHC increased on days 4 and 7, but the production neither correlate with *Mtb* growth control or IFN- γ production. We did not detect NO production at all in AM supernatants culture of CC donors.

In summary, this is the first report of ex vivo CD8⁺ T cell mediated *Mtb* growth control in autologous AM from HHC and CC. CD8⁺ T cells from HHC are involved in intracellular growth control of *Mtb* in AM/CD8 co-cultures. In contrast CD8⁺ T cells from CC donors do not exhibit intracellular grow control of *Mtb* There appears to be no direct correlation between IFN- γ and NO concentrations in cell culture supernatants and growth control of *Mtb* in AM , AM/CD4 and AM/CD8.

1. Introducción.

La tuberculosis (TB) representa uno de los principales problemas de salud a nivel mundial. El principal agente etiológico causante de la TB humana es *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*), la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha reportado que una tercera parte de la población mundial esta infectada por esta bacteria. La incidencia global de TB anualmente ha crecido en un 1.1% y el número de casos en un 2.4%, aunado a esto cerca de 3 millones de individuos mueren al año por causa de la TB ^(1,2).

La TB es una enfermedad curable, pero tanto factores demográficos, como socioeconómicos hacen que la prevención y el tratamiento sean difíciles de llevar a cabo, resultando un gran problema en los países en vías de desarrollo, como son los africanos, asiáticos y latinoamericanos.

La reemergencia de la TB esta muy ligada a la pandemia del VIH, la superposición de las poblaciones infectadas con VIH y con *Mtb*, representa un grave riesgo de progresión a TB activa, ya sea por reactivación endógena o por re-infección ⁽³⁾. La OMS ha estimado medio millón de casos de coinfección VIH/TB a nivel mundial ⁽⁴⁾. Además el surgimiento de cepas resistentes a diversos fármacos antifímicos y el desapego al tratamiento por parte de los pacientes, son factores que han contribuido a que el control de la TB sea cada día más complejo.

En México la TB es un grave problema de salud, es la tercera causa de muerte por un agente infeccioso y el incremento en los últimos 5 años ha sido de un 24% en número de casos. Las tasas de morbilidad se han modificado del 14 al 18.7 casos por cada 100,000 habitantes ⁽⁵⁾.

La historia natural de la TB pulmonar es compleja. Los mecanismos de defensa en tuberculosis son altamente eficientes en humanos y solo del 5 al 10% de los individuos infectados con *Mtb* desarrollan Tuberculosis Pulmonar (TBP) activa por lo tanto la forma latente de TBP es la que mayor incidencia tiene. En países

desarrollados donde la prevalencia de la enfermedad es baja, la reactivación de la infección latente contribuye sustancialmente al aumento de la incidencia de la TBP activa ⁽⁶⁾.

Los pacientes con TBP activa son la principal fuente de la transmisión. Estos expulsan a los bacilos por medio de la tos y por vía respiratoria se infecta cualquier sujeto que inhale la bacteria. Se ha descrito que la vida media de las bacterias en las gotas de saliva que expulsan los pacientes es de 6 horas (H) y estas puede contener de 1 a 3 bacilos ⁽⁷⁾.

Los individuos que están constantemente expuestos a la tos de un paciente con TBP activa como los Contactos Intradomiciliarios (CI) o el personal intrahospitalario, presumiblemente al inhalar múltiples gotas de saliva con *Mtb*, se infectan y quizá desarrollen o no la enfermedad ⁽⁷⁾.

El estado de latencia puede persistir toda la vida del sujeto, la prueba que hasta ahora se usa para saber si los individuos han estado en contacto o están infectados por *Mtb* es la intradermoreacción a la Tuberculina (PPD, Derivado Proteico Purificado de Tuberculosis)⁽⁶⁾. Cuando la respuesta inmune del hospedero es alterada da como resultado la reactivación de la infección latente y el desarrollo de la enfermedad.

Se ha reportado que aproximadamente el 75% de los individuos que han estado en contacto con pacientes con TBP como los CI o el personal intrahospitalario manifiestan una respuesta positiva PPD y el 25% restante mantiene una respuesta negativa ⁽⁸⁾.

Los CI de pacientes con TBP parecen ser una población protegida que puede desarrollar una memoria específica contra *Mtb*. Estudios hechos en células obtenidas de sangre de CI mostraron que producen más Interferón- γ (IFN γ) y proliferan al ser estimuladas con el antígeno (Ag) de 30 kDa de *Mtb* comparadas con células obtenidas de pacientes con TBP ⁽⁹⁾.

Aunado a esto, Schwander y cols. ⁽¹⁰⁾ reportaron que las células bronquioloalveolares (BAC) obtenidas de CI al ser estimuladas con antígenos (Ags) de *Mtb*, producen más IFN γ que las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) autólogas. Estos estudios mostraron que la exposición continua a *Mtb* lleva a la infección y al desarrollo de una respuesta inmune específica en CI de pacientes con TBP, protegiéndolos de desarrollar la enfermedad.

Mucho de lo que se conoce acerca de la inmunología de TB es de estudios hechos en modelos animales, los cuales han sido esenciales para describir la respuesta inmune *in vivo*, ya que en estos modelos, la respuesta hacia la infección por *Mtb* puede ser medida selectivamente al manipular uno o más de los mecanismos que están involucrados en la respuesta contra *Mtb*.

En humanos es mucho más complejo, obviamente no se puede manipular biológicamente ningún mecanismo y su respuesta inmune suele diferir mucho entre cada sujeto, siendo muy difícil tener un patrón de la respuesta contra *Mtb*.

La infección con *Mtb* ocurre por vía aérea, el control o desarrollo de la infección es compartimentalizado y limitado a los pulmones en la primoinfección, es por eso que el trabajo *in vitro* con Macrófagos Alveolares (MA) obtenidos del pulmón es muy importante. Al estudiar los MA se puede tener una cercana aproximación de la respuesta inmune innata contra *Mtb* en el sitio de infección ⁽¹¹⁾.

Los MA poseen diferentes mecanismos efectores por medio de los cuales controlan el crecimiento de los patógenos intracelulares como lo es *Mtb*, entre estos se encuentran la fusión fago-lisosoma, la generación de los intermediarios reactivos del oxígeno (RIO) por medio del estallido respiratorio y la producción de los intermediarios reactivos del nitrógeno (RIN).

Los MA también secretan citocinas como el IFN γ y el Factor de Necrosis tumoral $-\alpha$ (TNF α) que inducen a la producción de Oxido Nítrico (ON), uno de los principales

mecanismos efectores con los que cuentan los MA contra *Mtb*, además de activar a los linfocitos T.

Los MA y células dendríticas (CD) presentan los Ags a los linfocitos T CD4⁺ induciendo a que estos produzcan citocinas como el IFN γ , el TNF α y la interleucina-2 (IL-2), que juegan un papel importante en la protección contra *Mtb* ⁽¹¹⁾. Estas citocinas además intervienen en la activación y reclutamiento de los linfocitos citotóxicos, como son los linfocitos T CD8⁺ ⁽¹²⁾.

Los linfocitos T CD8⁺ pueden lisar a los MA infectados por medio de la liberación de moléculas como las perforinas, granzimas y granzimas. Además los linfocitos T CD8⁺, también pueden actuar sobre la vía Fas-Fas Ligando ^(13,14,15). Otro factor en el que los linfocitos T CD8⁺ participan en el control de *Mtb* es por medio de la producción de IFN γ , el cual a su vez induce la activación de los MA y con esta, la producción de ON.

A pesar de que se conoce mucho sobre la respuesta inmune en TB y de la capacidad de *Mtb* de persistir en los tejidos humanos, muchos de los mecanismos con los que cuenta la bacteria para sobrevivir en las células hospederas aún no se conocen y siguen sin responderse muchas interrogantes sobre la respuesta inmune que despierta la infección con *Mtb*, como son su supervivencia en los MA humanos y la interrelación de mecanismos que se desencadenan al procesar y presentar los Ags a los linfocitos T.

Es por esto que es importante que la investigación en TB sea dirigida al entendimiento de la respuesta inmune hacia *Mtb* para contribuir en la prevención y control de la enfermedad. En humanos y en ratones la respuesta inmune es decisiva en el control y establecimiento de la infección latente ^(8,16).

El estudio de la TB en el pulmón en lavados bronquioloalveolares ha servido para el entendimiento de la inmunopatogénesis de la enfermedad, por lo cual una de

las metas de este estudio fue trabajar con los MA humanos obtenidos del sitio local de la infección.

En este trabajo los CI se consideraron como un modelo de infección y control natural hacia *Mtb*, por lo cual al estudiarlos se podría explicar de alguna manera *in vivo*, como el sistema inmunológico esta actuando para controlar y evitar el desarrollo de TB.

Se evaluó la capacidad de los MA para inhibir el crecimiento intracelular de *Mtb* y la participación de los linfocitos T CD8⁺ y T CD4⁺ en está; la capacidad de éstos para producir IFN γ y ON y su relación con el control del crecimiento de *Mtb*, en los MA de los CI y de los CC infectados *in vitro*. Así como el impacto de la cepa avirulenta *Mtb* H37Ra y de la cepa virulenta *Mtb* H37Rv.

2. Antecedentes.

La infección por *Mtb* ocurre por vía aérea, mediante la inhalación de las micobacterias (Figura 1). El pulmón es el órgano más comúnmente infectado, en parte, porque *Mtb* es un microorganismo aerobio obligado y prefiere sitios con una presión de oxígeno alta, sin embargo; la bacteria puede infectar prácticamente cualquier órgano (17).

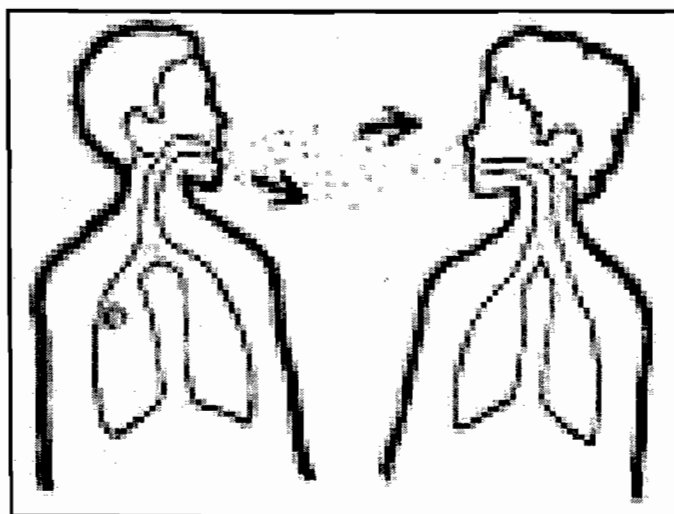


Figura 1. Transmisión de la infección con *Mycobacterium tuberculosis* en humanos (Columbia.edu).

Una vez que el bacilo alcanza los espacios alveolares es rápidamente fagocitado por los MA, que son la primera línea de defensa del organismo. En esta, la mayoría de los individuos son capaces de controlar y limitar la infección primaria, evitando la diseminación del foco infeccioso. A consecuencia de la infección por *Mtb* en estos individuos se puede o no desarrollar una respuesta positiva al PPD (18).

En el 5 y el 10% de los sujetos expuestos a *Mtb*, la infección progresa y se manifiestan los síntomas clínicos de la enfermedad. En este caso en pocos días *Mtb* se multiplica ilimitadamente en el interior del macrófago resistiendo a sus mecanismos bactericidas hasta que la célula muere y las bacterias se liberan, siendo fagocitadas

por otro macrófago ^(17,18). *Mtb*, puede evadir los efectos bactericidas de los MA lo que marca el inicio del desarrollo de la enfermedad.

Este proceso continua repitiéndose y a nivel local se forma una lesión con el curso de una inflamación y la formación del granuloma ⁽¹⁹⁾. Este nuevo caso con TBP es un foco de infección para las personas con las que convive, sobre todo aquellas con los que comparte el mismo espacio físico.

2.1. Respuesta Inmune hacia *Mycobacterium tuberculosis*.

La inmunidad adquirida hacia *Mtb* es principalmente, una respuesta celular, el inicio y el mantenimiento de esta requieren de una compleja red de interacciones celulares. El control de la infección primaria es dependiente del desarrollo de la respuesta celular tipo TH1.

Estos mecanismos se interrelacionan por diversas formas, los MA y los linfocitos T son componentes esenciales en la respuesta de protección. La interacción de estas células es crucial para el control de la infección ⁽²⁰⁾, toda la serie de eventos que se desencadenan en esta respuesta, inician con la entrada de *Mtb* al organismo.

En respuesta a la infección con *Mtb* los MA activan sus mecanismos bactericidas, dentro de los cuales se encuentra la producción de radicales de oxígeno, citocinas inflamatorias y quimiocinas que actúan como quimioatrayentes celulares, a través de las interacciones de componente bacterianos como antígenos, lípidos y glicolípidos con los receptores de los macrófagos alveolares como son los receptores Toll (TLR), los receptores para manosa y los receptores Fc, entre otros ⁽²¹⁾.

Las citocinas y quimiocinas inducen la migración de monocitos (MN) que derivan a MA y a células dendríticas (CD) residentes del sitio local de infección. Los MA que fagocitan a las bacterias inician el procesamiento de Ags bacterianos, los cuales son

presentados por medio del complejo principal de histocompatibilidad clase II (MHC-II) a los linfocitos T CD4⁺ y por clase I (MHC-I) a los linfocitos T CD8⁺.

Las CD que han fagocitado bacilos migran a nódulos linfáticos y promueven la proliferación de linfocitos T antígeno-específico. La migración de los macrófagos y de linfocitos T hacia el sitio de infección termina en la formación del granuloma, una lesión característica específica de TB ⁽²²⁾.

Además de linfocitos T y de los MA, el granuloma se conforma de otras células del hospedero, incluyendo linfocitos B, CD, células endoteliales y fibroblastos. Las proporciones de los diferentes tipos de células varían con el tiempo. El granuloma aísla a la bacteria del resto del pulmón evitando que esta se disemine ⁽²⁰⁾ (Figura 2).

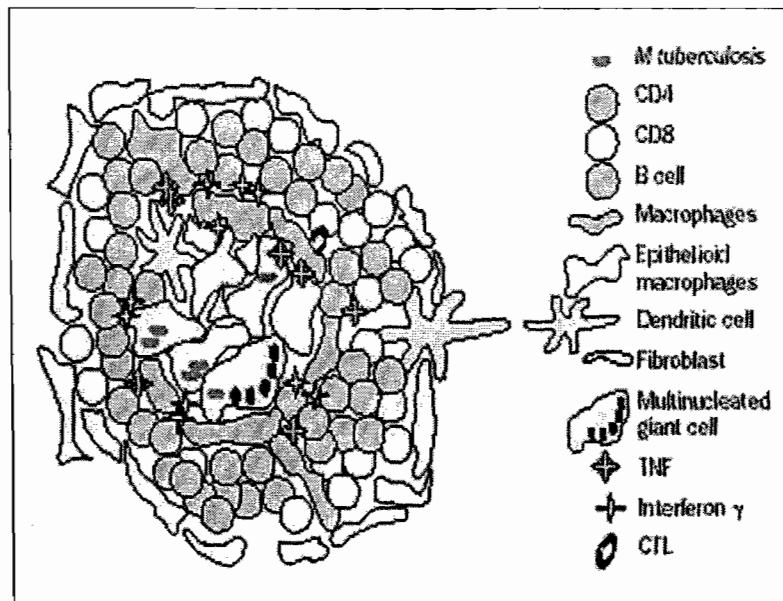


Figura 2. Conjunto de células que conforman al granuloma y citocinas que en este se producen ⁽²⁰⁾.

El granuloma funciona como un microambiente que facilita las interacciones entre las células T, los MA y las citocinas. Por otro lado, sirve como un reservorio para *Mtb* en el cual puede mantenerse por largos periodos (infección latente) ^(22, 23).

Los mecanismos inmunes resultado de la inmunidad adquirida específica hacia *Mtb* son importantes para mantener la TB latente. Las células T CD4⁺ y T CD8⁺ producen IFN γ , el cual activa a los MA ⁽²²⁾. Los linfocitos también pueden lisar a los MA infectados o matar de forma directa a las bacterias intra y extra-celulares. El TNF α es producido por los MA y linfocitos T, este está involucrado de manera compleja en el control de la infección, participa en la expresión de la enzima Oxido Nítrico Sintetaza inducible (iNOS), interviene en la migración celular así como en la localización de *Mtb* en los tejidos y promueve la formación, organización y mantenimiento del granuloma ⁽²⁴⁾.

Las CD actúan como excelentes presentadoras de Ags micobacterianos. El papel que juegan los linfocitos B es menos entendido, pero son reclutados en el sitio de lesión, contribuyen en la formación del granuloma y se ha visto que estos pueden contribuir de manera importante en la expresión y regulación de las quimiocinas, después de la infección con *Mtb* ^(20,25).

La infección con *Mtb* induce diferentes citocinas y se ha demostrado que unas son esenciales para el control de la infección, mientras otras contribuyen al desarrollo de la TB. Las células tipo TH1 secretan citocinas como la IL-2, IL-12, IFN γ y TNF α las cuales activan las funciones efectoras de los MA, como la inducción de la producción de ON y de los RNI para inhibir el crecimiento intracelular de las bacterias fagocitadas. Estas células están involucradas en procesos inflamatorios, citotóxicos y en la respuesta de la hipersensibilidad tardía ^(22, 26).

Las células tipo TH2 producen citocinas como la IL-4, IL-6, IL-10 e IL-13 que inducen la proliferación y diferenciación de células B y están asociadas por la respuesta humoral promoviendo la producción de anticuerpos. Esta respuesta trae como consecuencia la inhibición de la producción de las citocinas producidas en la respuesta tipo TH1 ⁽²²⁾.

La actividad micobactericida dependiente de las células T, se creía que era únicamente vía la liberación de citocinas activadoras de macrófagos. Sin embargo, estudios en ratones ⁽²⁷⁾ y en humanos ⁽²⁸⁾ demostraron que la micobacteria, al igual que otros patógenos intracelulares inducen la activación de células T CD4⁺ y T CD8⁺ citotóxicas.

Se ha reportado que en humanos una población de las células TCD4⁺ y TCD8⁺ tienen actividad citotóxica a *Mtb* y su efecto micobactericida se realiza a través de la destrucción (lisis) ó muerte celular programada (Apoptosis) de los macrófagos infectados, que son el hábitat intracelular de *Mtb* ^(12,13,29).

A pesar de que el hospedero cuenta con toda la maquinaria de defensa contra *Mtb*, ésta puede sobrevivir y multiplicarse en los MA. La bacteria se localiza en el interior de vacuolas llamadas fagosomas. El fagosoma puede fusionarse con el compartimiento lisosomal y toda la gama de enzimas proteolíticas y metabolitos activos que éste contiene actúan sobre la bacteria para lisarla, sin embargo, *Mtb* es capaz de bloquear la fusión o evitar la acidificación de los fagolisosomas inhibiendo así la acción de los mecanismos bactericidas. Aún ahora se desconoce la actividad micobactericida de un gran número de enzimas proteolíticas y metabolitos activos producidos durante la infección ⁽²⁰⁾.

2.2 Linfocitos T CD8⁺.

La mayoría de las investigaciones se han enfocado al estudio de las poblaciones de los linfocitos T CD4⁺ y a las citocinas y quimiocinas producidas por ellos en respuesta a la infección con *Mtb*, en los últimos años se ha demostrado que los linfocitos T CD8⁺ están involucrados de manera importante en la respuesta inmune contra *Mtb* ^(12,27,28,29).

Estudios en modelos animales han reportado que los linfocitos T CD8⁺ migran al pulmón de manera similar a los linfocitos T CD4⁺ en el curso de la infección por *Mtb*

⁽³⁰⁾. Los linfocitos T CD8⁺, tienen la capacidad de reconocer Ags endógenos de *Mtb* de manera temprana presentados la vía MHC-I en la superficie de las células presentadoras de Ag. Una vez que el Ag es reconocido por estos, se inicia una serie de vías de activación en los linfocitos T CD8⁺ que llevan a la eliminación de la célula blanco o pueden actuar de manera directa sobre los bacilos ⁽³¹⁾.

Las células T CD8⁺, además de la producción de las citocinas contribuyen al control de la infección de *Mtb* ⁽³²⁾ por medio de otros mecanismos (Figura 3) como:

1. Citotoxicidad vía liberación de Perforinas, Granzimas y Granulinas (A y B).
2. Citotoxicidad mediada a través de Fas-Fas ligando.
3. Actividad micobactericida directa.

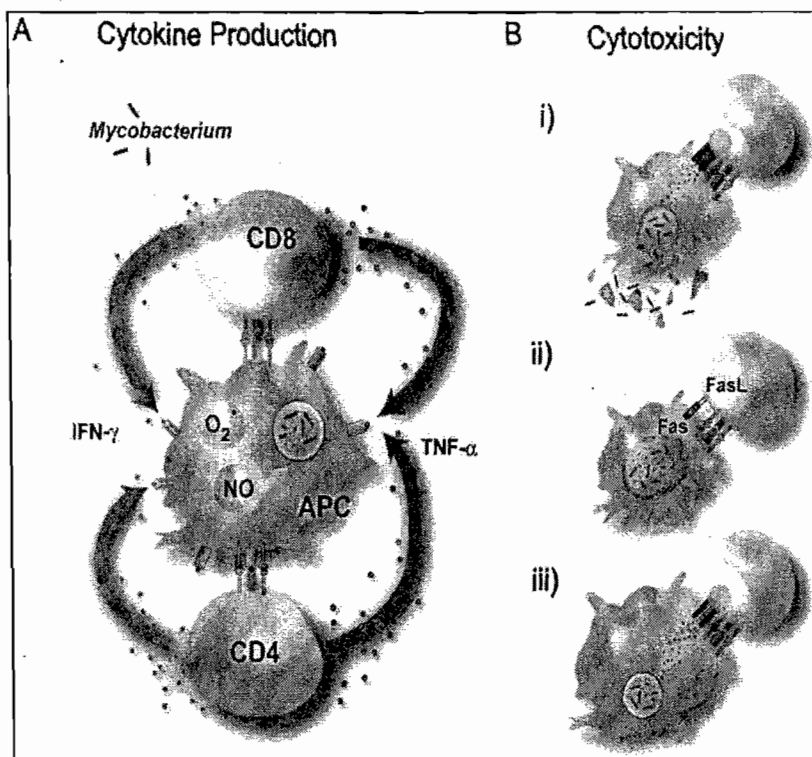


Figura 3. Mecanismos involucrados en el control intracelular de *Mtb* por linfocitos T CD8⁺ ⁽³²⁾.

Se ha descrito que algunos linfocitos T CD8⁺ pueden ser *Mtb* antígeno-específico ^(13,33). En humanos los linfocitos T CD8⁺ antígeno-específico pueden actuar directamente sobre la bacteria intracelular, vía granulinsina jugando un papel importante en control de la TB latente ^(34,35).

Uno de los principales mecanismos efectores de los linfocitos T CD8⁺ es la citotoxicidad, donde mediante exocitosis se liberan proteínas almacenadas en los gránulos preformados. Estos gránulos contienen proteínas llamadas perforinas y granzimas. La perforina, presenta una alta homología y actúa de forma similar al factor C9 del complemento, se polimeriza en la membrana celular de la célula blanco, generando poros que permiten el paso de agua y electrólitos, induciendo lisis osmótica ⁽³⁶⁾.

Las granzimas A y B son proteínas pertenecientes a la familia de las proteasas de serina; estas enzimas, entran a la célula a través de los poros formados en la membrana por las perforinas que son proteínas con efecto de saponinas, las cuales interactúan con los lípidos de la membrana celular degradándolos. Las granzimas tienen la capacidad de inducir Apoptosis mediante la fragmentación del DNA de las células blanco ⁽³²⁾.

El mecanismo de muerte celular puede involucrar también la interacción del receptor Fas y del ligando de Fas (FasL). Esta molécula se expresa en la superficie de los linfocitos T CD8⁺. La interacción Fas-FasL, induce apoptosis en la célula blanco ⁽³⁷⁾.

La participación de los linfocitos T CD8⁺ de manera "independiente" a los linfocitos T CD4⁺ ha sido cuestionada, ya que en algunos modelos experimentales se describe que los linfocitos T CD4⁺ son necesarios para inducir la respuesta funcional de los linfocitos T CD8⁺ ^(12,30).

Giacomini y cols. reportan que los linfocitos T CD4⁺ son necesarios para activar los mecanismos citotóxicos de los linfocitos T CD8⁺ pero no para inducir la producción de citocinas ⁽²⁶⁾.

En modelos animales como el murino, los linfocitos T CD4⁺ no son requeridos para que los linfocitos T CD8⁺ produzcan IFN γ de manera específica^(27,28).

En ratones deficientes del gene β_2 microglobulina se observo que la producción de IFN γ y de TNF α fue menor que en los ratones silvestres en respuesta al PPD⁽³⁸⁾. En otros estudios se demostró que en ratones deficientes de linfocitos T CD4⁺ infectados con *Mtb* se incrementó el número de linfocitos T CD8⁺ que se reclutan en el pulmón y que los niveles de IFN γ producido por las células así, como la expresión del RNA-mensajero para IFN γ fueron similares en las cepas silvestres⁽³⁹⁾.

Tan y cols demostraron que los MA y los MN infectados con *Mtb* a las relaciones de infección (MOI) 10:1 y 20:1 bacteria:célula, presentan Ags a los linfocitos T CD8⁺ antígeno-específico y que estos son capaces de reconocer y lisar a estas células siendo los MN más susceptibles a la lisis por linfocitos T CD8⁺⁽²⁹⁾.

La producción de IFN γ y de las funciones citotóxicas de los linfocitos T CD8⁺ han sido descritas tanto en modelos animales, como en estudios hechos en células humanas^(12,27,37,40), sin embargo el control de la infección contra *Mtb* por medio de las funciones efectoras de los linfocitos T CD8⁺ en el sitio de la infección no ha sido bien descrito.

2.3 Interferón gamma (IFN γ).

El papel protector del IFN γ en la respuesta inmune contra *Mtb*, esta bien establecido en el contexto de la presentación a los linfocitos T antígeno-específico. Estudios hechos en ratones deficientes de IFN γ han demostrado una alta susceptibilidad a la infección por *Mtb*⁽³⁸⁾, mayor a las encontradas en cepas deficientes de otros mecanismos bactericidas en los macrófagos, como las cepas deficientes al gen de la enzima iNOS, o las cepas deficientes a los linfocitos T⁽³⁹⁾.

El IFN γ es muy importante en la activación de los MA y de los MN, esta activación esta directamente relacionada con la regulación de iNOS, el cual ésta claramente involucrado en el control del crecimiento intracelular de *Mtb*. En humanos se ha visto que las mutaciones genéticas en el receptor de IFN γ conlleva a que estos sean más susceptibles a infecciones micobacterianas, aunque son pocos los casos reportados ^(41,42).

Los principales productores de IFN γ son los linfocitos T CD4⁺, T CD8⁺, T $\gamma\delta$ y las células Natural Killer (NK). Modelos experimentales de ratones deficientes en linfocitos T CD4⁺ muestran una reducción significativa habilidad en la producción temprana de IFN γ en pulmón y en la activación de los macrófagos ⁽²⁷⁾. Estos hallazgos sugieren que la producción temprana de IFN γ por T CD4⁺ pueden ser determinante para el curso de la infección; además de que los linfocitos TCD4⁺ tienen otras funciones en contra la infección con *Mtb*.

2.4. Oxido Nítrico.

La producción del ON por los macrófagos es considerado un eficiente mecanismo de defensa contra patógenos intracelulares. En modelos animales infectados con *Mtb* se ha demostrado que el ON juega un papel esencial en el control de la infección ^(43,44).

En ratón los IRN juegan un papel de protección tanto en la fase aguda como en la fase crónica de la infección con *Mtb* ⁽⁴³⁾. Modelos murinos han demostrado que al inhibir la expresión de iNOS o de NOS2, la infección con *Mtb* persiste y llega a ser crónica ⁽⁴⁴⁾. La importancia de el ON y de otros IRN en la respuesta de defensa contra *Mtb* en humanos es controversial, los hallazgos encontrados en los modelos animales, no son aplicables en TB humana.

Se ha visto que el desarrollo de la TB en humanos no necesariamente esta relacionado a la inhibición de la producción de ON. En individuos sanos se ha descrito

que los MA producen IRN en respuesta a la infección *in vitro* con *Mtb*. En éstos se ha demostrado que al inhibir NOS2, los MA infectados con el Bacilo de Calmette Guèrin (BGC), no limitan el crecimiento del bacilo y este puede multiplicarse intracelularmente de manera normal ⁽⁴⁵⁾. Además, en los MA obtenidos de pacientes con TBP se ha detectado una alta expresión de NOS2, en adición a que los niveles de ON exhalado por pacientes se incrementan ^(46,47).

A pesar de que la producción de IRN, es esencial para el control de la infección con *Mtb*, tanto en modelos animales como en humanos no se elimina completamente a las micobacterias. Lo cual sugiere que *Mtb* puede producir moléculas que contrarresten los efectos bactericidas o bacteriostáticos de los IRN ⁽²⁶⁾. No es de sorprender que el bacilo haya desarrollado estrategias complementarias para combatir la actividad micobactericida de los IRN que le permiten persistir dentro del macrófago, por ejemplo inhibir la producción de citocinas ^(48,49).

3. Justificación.

Mtb, es un patógeno intracelular donde el huésped desarrolla una respuesta celular de protección contra la infección. Esto ha conllevado a que la mayoría de las investigaciones se enfoquen al estudio de las poblaciones de los linfocitos T CD4⁺ y a toda la gama de citocinas producidas por estos en respuesta contra *Mtb*.

Sin embargo, se ha visto que otras células, como los linfocitos T citotóxicos juegan un papel importante en el control de la infección por *Mtb*. Dentro de estas células encontramos a los linfocitos T CD8⁺ los cuales parecen estar involucrados de una manera importante en la respuesta inmune contra *Mtb*.

En modelos animales y en macrófagos derivados de monocitos de humanos se ha demostrado que los linfocitos T CD8⁺ son capaces de controlar el crecimiento intracelular de *Mtb* vía Perforinas/Granzimas/Granulosinas o vía Fas-FasL. En adición, también se sabe que los linfocitos T CD8⁺ secretan citocinas como el IFN γ y el TNF α , los cuales se ha demostrado que contribuyen al control de la infección por *Mtb* por medio del reclutamiento y activación de las células fagocíticas y la activación de los mecanismos bactericidas que estas presentan.

Como antecedentes de estudios con CI, se ha reportado que la respuesta local de linfocitos alveolares (LA) obtenidos de BAC contra el Ag 85B de *Mtb* incrementa de una manera significativa la producción de el IFN γ , lo que sugiere que la exposición aerogénica con *Mtb* induce una memoria inmunológica de los linfocitos de CI. ^(9,10,50).

De tal manera el estudio *ex vivo* de la participación de los linfocitos T CD8⁺ y T CD4⁺ autólogos sobre el control del crecimiento intracelular de *Mtb*, en cultivos de MA y co-cultivos con MA/CD8⁺ y MA/CD4⁺ obtenidos de los CI y de los CC infectados *in vitro* con las cepas *Mtb* H37Ra y *Mtb* H37Rv y el efecto de la producción del ON y del IFN γ sobre las bacterias puede ayudar a entender de que manera los linfocitos T CD8⁺ están involucrados en la inhibición del crecimiento intracelular de *Mtb* en los MA humanos.

4. Hipótesis.

Los linfocitos T CD8⁺ juegan un papel importante en el control y muerte de *Mtb*. Si los CI están expuestos a *Mtb* y no desarrollan la enfermedad, entonces tienen una respuesta celular eficiente, en la que los linfocitos T CD8⁺ participan en el control intracelular *Mtb* en los MA infectados.

5. Objetivo General.

Evaluar si los linfocitos T CD4⁺ y T CD8⁺ de los CI responden contra *Mtb* de forma diferente a los CC por efecto de la exposición constante al patógeno.

Estudiar a los linfocitos T CD4⁺ y de T CD8⁺ en el control del crecimiento intracelular de *Mtb* en MA infectados *in vitro* con *Mtb* H37Ra y *Mtb* H37Rv de CI de pacientes con TBP y de CC, PPD+ y PPD -.

5.1 Objetivos específicos.

1. Estudiar la eficiencia de los MA en el control del crecimiento intracelular de *Mtb* H37Ra y *Mtb* H37Rv en CI de pacientes con TBP y en CC, PPD+ y PPD -.
2. Determinar el papel del ON en el control del crecimiento intracelular de *Mtb* en infección *in vitro* de MA en CI de pacientes con TBP y CC, PPD + y PPD-.
3. Evaluar el efecto del IFN γ en la inhibición del crecimiento micobacteriano de *Mtb* en MA y el efecto de este en los co-cultivos de MA/CD8⁺.
4. Establecer si existe una asociación entre la producción de ON y de IFN γ en el control del crecimiento intracelular de *Mtb* en cultivos de MA y co-cultivos de MA/CD8⁺.

6. Material y Métodos.

6.1 Grupos de estudio.

En el estudio se incluyeron 13 CI de pacientes con TBP (6 hombres y 7 mujeres), de los cuales fueron 8 PPD+ y 5 PPD -; 11 CC (7 hombres y 4 mujeres) 3 PPD+ y 7 PPD -. Las edades fluctuaron entre los 18 y 60 años, la media de edad para ambos grupos fue de 33 años.

Todos los sujetos fueron reclutados en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) y fueron debidamente informados sobre los estudios que se les realizaron dando su consentimiento por escrito para ser incluidos en este estudio. El proyecto fue aprobado por el comité de ética del INER con clave C-4201.

Los criterios de inclusión para considerar a un sujeto como CI fueron los siguientes: sujeto que vive en el mismo domicilio que el paciente con TBP; por lo menos debió de estar en contacto directo y continuo con el paciente 3 meses antes del diagnóstico del paciente índice; el paciente con TBP debió ser virgen a tratamiento antifímico o no llevar más de 2 semanas de tratamiento y contar con baciloscopias positivas. Los CC no debían tener historia de exposición a *Mtb*.

Los sujetos seleccionados no tenían síntomas clínicos ni radiográficos de TBP o alguna otra enfermedad respiratoria y todos fueron seronegativos al Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH). A ambos grupos se les realizó estudios de laboratorio clínicos y se les aplicó PPD, que fue medido a las 48 o 72 H.

A cada sujeto se le tomo una muestra de sangre 180 mililitros (mL) y se les realizó un Lavado Bronquioloalveolar (LBA) en el Servicio de Broncoscopia del INER.

Este trabajo se llevó en colaboración con Department of Medicine and Center for Emerging Pathogens, University of Medicine and Dentistry of New Jersey (UMDNJ), Newark NJ, 07103, USA. Apoyado por NIH grant RO1 HL51630-06.

6.2 Lavado Bronquioloalveolar.

Las BAC fueron obtenidas del LBA, siguiendo el procedimiento descrito por Schwander ⁽¹⁰⁾. Los LBA se llevaron a cabo en el servicio de Broncoscopia del INER con un broncoscopio de fibra óptica marca P30 (Olympus BF), el cual fue introducido en el lóbulo medio y la lingula del pulmón. El lavado se realizó con un volumen total de 300 mL de solución salina estéril al 0.9%. El volumen medio recuperado fue del 78%.

6.2.1 Preparación de Células Bronquioloalveolares.

El LBA fue centrifugado a 1200 rpm, por 15 min a 4°C. Las células fueron resuspendidas a una concentración de 1×10^6 células/mL en medio de cultivo RPMI-1640 (BioWhittaker, Walkersville, MD) suplementado con 50 µg/mL de sulfato de gentamicina, 200 mM L-glutamina y 10% de suero humano inactivado (PHS).

Los MA fueron enriquecidos a partir de BAC utilizando eritrocitos de carnero (SRBC) ⁽⁵⁰⁾ sensibilizados con 1 IU de neuraminidasa (Sigma Chemical Co, St Louis, MO), por 1 H en baño María, después de la incubación fueron lavados con Solución Salina de Hanks (HBSS) y resuspendidos en medio RPMI-10% PHS.

Posteriormente los BAC fueron resuspendidos a una concentración de $1-2 \times 10^7$ células/mL, se mezclaron con SRBC y Suero Fetal Bovino (SFB) en proporción 2:2:1. La mezcla se incubó por 10 min a 37°C, después de lo cual se centrifugó 10 min a 1000 rpm a 4°C y se incubaron en hielo por 1 H.

Al término de la incubación la mezcla se homogenizó suavemente y las células fueron separadas por gradiente de Ficoll-Hypaque (Sigma), centrifugando a 2000 rpm, durante 35 min a 4°C. Los MA se recolectaron de la interface y se lavaron 3 veces con medio RPMI.

Los eritrocitos remanentes fueron lisados adicionando 4 mL Buffer de lisis (ver anexo) e incubando 5 min en hielo y después de lo cual las células se lavaron con RPMI. Finalmente se contaron y se ajustaron a una concentración final de 1×10^6 células/mL en RPMI-10% PHS. La viabilidad de las BAC y los MA fue determinada con Azul de Tripano.

6.3 Preparación de células mononucleares de sangre periférica.

La sangre periférica usando heparina como anticoagulante, se diluyó a una relación 1:1 con RPMI, los PBMC autólogos fueron separados por medio de un gradiente de densidad de Ficoll-Hypaque, (Sigma)⁽¹⁰⁾ a una relación 1:3 (Ficoll- dilución de sangre), centrifugando a 1200 rpm, durante 45 min a 18°C. Los PBMC fueron recuperados de la interface, lavados dos veces con RPMI y contados con hemocitometro (Hausser Scientific, Horsham, PA) para resuspenderlos a la concentración deseada con medio RPMI-10% PHS.

6.3.1 Purificación de los linfocitos T CD4⁺ y T CD8⁺.

Los linfocitos T CD4⁺ y T CD8⁺ fueron purificados a partir de los PBMC por medio de anticuerpos específicos para cada subpoblación celular conjugados con microperlas magnéticas, la técnica se realizo siguiendo las recomendaciones del fabricante (Miltenyi Biotec, Auburn, CA) como se describe a continuación.

Los PBMC fueron centrifugados a 2000 rpm, 10 min a 4°C, las células fueron resuspendidas en Buffer de Miltenyi (80 μ l por cada 10^7 células) se adicionó 20 μ l de las microperlas magnéticas acopladas con anticuerpo CD4⁺. La muestra se incubó a 8°C (en refrigeración) durante 15 min. Se centrifugo a 1200 rpm, 10 min a 20°C. Las células se resuspendieron en 1 mL de Buffer de Miltenyi y se pasaron a través de una columna magnética. Las células negativas a CD4⁺, se recolectaron y las células T CD4⁺ purificadas por selección positiva se obtuvieron después de realizar 3 lavados de

la columna. Estas se centrifugaron y se resuspendieron en RPMI-10% PHS a una concentración de 1×10^6 , el porcentaje de pureza fue del 92%.

En un segundo paso se purificó la subpoblación de los linfocitos T CD8⁺ a partir de las células negativas para CD4⁺ recolectadas en los lavados de la columna. Se obtuvieron de la misma manera que las T CD4⁺ utilizando microperlas magnéticas acopladas con anticuerpo CD8⁺; el porcentaje de pureza fue del 98%.

6.4 Preparación de *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra y H37Rv para la infección *in vitro*.

Las cepas tipo *Mtb* H37Ra y *Mtb* H37Rv (ATCC, Manassas, VA) fueron crecidas en medio líquido 7H9 (Difco Laboratories, Detroit, MI), suplementado con 10% de ADC (albumina, dextrosa y catalasa, Difco) y 2% de glicerol⁽⁵¹⁾. Después de 21 días de incubación a 37°C en incubadora orbital con agitación fueron cosechadas por centrifugación a 3000 rpm, 30 min a 18°C. Se descartó el sobrenadante y las bacterias fueron resuspendidas en medio 7H9.

Para obtener una suspensión de bacilos individuales se adicionaron 5 perlas de cristal de 5 mm de diámetro estériles y se mezcló vigorosamente en vortex durante 5 min. La suspensión de *Mtb* fue centrifugada a 1000 rpm, 10 min a 4°C y el sobrenadante se recolectó y se distribuyó en alícuotas de 1 mL, fueron congelados a -80°C hasta su uso.

En el 10% de los viales seleccionados al azar se determinó la concentración del stock congelado de *Mtb* H37Ra y *Mtb* H37Rv. La concentración fue medida por Unidades Formadoras de Colonias (UFC). De cada alícuota se disgregaron las bacterias con perlas de cristal de 3 mm de diámetro durante 5 min, se centrifugaron a 2000 rpm durante 5 min y se recolectó el sobrenadante, a partir del cual se hicieron 12 diluciones seriadas (1:10) con medio 7H9, que fueron sembradas por triplicado en

placas de agar de 7H10, incubadas por 21 a 37°C en 5% de CO₂ y 85% de humedad relativa. Las UFC fueron cuantificadas con ayuda de una lupa estereoscópica.

Para cada experimento se tomó una alícuota, se descongeló, se agito y se centrifugo a 5000 rpm por 5 min, posteriormente se descartó el medio y se resuspendieron las bacterias en medio RPMI-30% PHS (medio infectante). Las bacterias se disgregaron en esta suspensión adicionando perlas de cristal de 3 mm de diámetro y se mezclaron en vortex durante 5 min, después de lo cual se centrifugaron a 2000 rpm durante 5 min y del sobrenadante se ajustaron las bacterias a 1×10^7 de UFC para infectar a los MA. Se cuantifico las UFC de H37Ra y H37Rv en cada experimento.

6.5 Fagocitosis.

Se infectaron los MA con las cepas *Mtb* H37Ra y *Mtb* H37Rv por 1 H a 37°C en 5% CO₂, utilizando dos MOI, 0.1: 1 y 1: 1 con cada cepa.

El porcentaje de infección fue medida por tinción de Ziehl Neelsen (ZN) y cuantificada por conteo de campos de 100 células por triplicado.

6.6 Infección y crecimiento intracelular de *Mtb* H37Ra y *Mtb* H37Rv en MA *in vitro*.

En placas de cultivo de 96 pozos (Corning Inc., Corning, NY) de fondo redondo se colocaron por triplicado 1×10^5 los MA resuspendidos en RPMI-10% PHS por pozo, se dejaron adherir toda la noche a 37°C en 5% CO₂. Al día siguiente los sobrenadantes se descartaron y los MA se infectaron a los MOI 0.1:1 y 1:1 con *Mtb* H37Ra y *Mtb* H37Rv respectivamente durante 1 H a 37°C en 5% CO₂.

Los pozos fueron lavados 3 veces para remover las bacterias no fagocitadas y se les agrego 200µl de RPMI-10% PHS a los pozos de los MA solos. A los co-cultivos

se les agrego 100µl de RPMI-10% PHS más 100µl de la suspensión de los linfocitos T autólogos T CD4⁺ o T CD8⁺ (AM/CD4⁺ y AM/CD8⁺) a una relación 1:1 célula:célula.

Para medir el crecimiento intracelular de *Mtb* H37Ra y *Mtb* H37Rv los cultivos de los MA y los co-cultivos se incubaron durante tres tiempos. Durante 1 H para el día 0 (D0) por cuatro y siete días (D4, D7) a 37°C en 5% CO₂. En los mismos tiempos se recolectaron los sobrenadantes de los cultivos para la determinación de IFN γ por ELISA y de ON por el método de Griess.

En los días 0, 4 y 7, los MA y los co-cultivos de AM/CD4⁺ y AM/CD8⁺ fueron lisados adicionando 100 µl de Dodecil-Sulfato de Sodio (SDS) (Sigma) al 0.1% durante 10 min a temperatura ambiente (TA). La acción del SDS se neutralizó adicionando medio 7H9 con Albúmina Sérica Bovina (BSA) al 20% (Sigma).

De las bacterias obtenidas en la lisis celular se hicieron 4 diluciones seriales (1:10) para cada condición y se sembraron por triplicado en cajas Petri con agar 7H10 Middlebrook (Difco) para determinar las UFC después de 21 días de incubación a 37°C en 5% CO₂.

La viabilidad de los MA y de los linfocitos T CD4⁺/CD8⁺ en los cultivos y co-cultivos fue medida por azul de tripano en los días 0, 4 y 7 en 4 experimentos para ambos grupos de estudio. La media en todas las condiciones experimentales fue para el D0 94.8%, D4 94.9% y D7 93.1%.

6.7 Determinación de Oxido Nítrico.

En los sobrenadantes recolectados de los cultivos de los MA y de los co-cultivos de AM/CD4⁺ y AM/CD8⁺ se determinó el ON por medio del método de Griess⁽⁵¹⁾. De cada muestra se usaron 50 µl del sobrenadante y se mezclaron con 50 µl del reactivo de Griess en una placa de cultivo de 96 pozos de fondo plano, se incubó en oscuridad durante 10 min a TA. Se determinó la densidad óptica a 550 nm en un lector de ELISA

(Labsystems Multiskan MCC/340, Labsystems, Finland). Para la curva de referencia se utilizó Nitrato de Sodio (NaNO_2). Las concentraciones de Nitritos (NO_2) fueron expresadas en micromoles (μM) después de sustraer el valor del medio RPMI como valor de fondo.

6.8 Cuantificación de Interferón gamma.

En los sobrenadantes de los cultivos de los MA y de los co-cultivos de AM/CD4^+ y AM/CD8^+ de los días 0, 4 y 7 se determinó la producción de $\text{IFN}\gamma$, por medio de un ensayo Inmunoenzimático (ELISA).

Para lo cual se sensibilizaron placas de 96 pozos con 50 μl de una solución de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ del anticuerpo primario (1er Ab) de, ratón-anti $\text{IFN}\gamma$ humano (Endogen, Woburn, MA) diluido en 1X PBS (Bio-Whittaker, Cambrex, Maryland, USA). Las placas se incubaron 2 H a 37°C y se guardó a 4°C toda la noche.

Al día siguiente se desechó el 1er Ab de la placa y se bloqueó por 15 min a TA con 100 μl PBS Superblock (Pierce, Rockford, IL). Posteriormente se lavó la placa con PBS 0.05% Tween 20. A la par se realizó una curva estándar con $\text{IFN}\gamma$ recombinante humano diluido en PBS - BSA-0.2%, Tween 20 (Endogen) usando diluciones seriales (1:1) (0 a 1000 pg/mL). A cada pozo se le agregó 50 μl de la dilución del estándar o de las muestras y se incubó por 2 H a 37°C. Después se lavaron con PBS 0.05% Tween 20 y se les agregó 50 μl del segundo anticuerpo anti- $\text{IFN}\gamma$ biotinilizado a una concentración de 0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Endogen) con el que se incubó durante 1 H a TA en oscuridad.

Se lavaron de nuevo las placas y se agregaron 50 μl por pozo de una dilución de 1:2000 estreptavidina - fosfatasa alcalina (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) con la que se incubaron por 30 min a TA. Finalmente se lavó la placa y se agregaron 50 μl por pozo del sustrato de fosfatasa diluido en buffer de sustratos (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), incubándose 20 min a TA en oscuridad. La

reacción se paró con 50 µl por pozo de PBS-5% EDTA y la absorbancia fue leída a 405 nm con lector de ELISA (Labsystems Multiskan MCC/340, Labsystems, Finland). Los resultados se presentan como la media de la densidad óptica (DO) de los triplicados de cada muestra.

6.9 Análisis de marcadores de superficie por Citometría de Flujo.

Las subpoblaciones celulares de las BAC y la pureza de las poblaciones enriquecidas de los MA y de los linfocitos T CD4⁺ y T CD8⁺ fueron analizadas por medio de citometría de flujo (FACS). Se utilizó anticuerpos anti-CD3⁺, anti-CD4⁺, anti-CD8⁺, anti-CD56⁺, anti-γδ TCR y anti-CD14⁺ marcados con FITC, anti-CD69⁺, marcado con PE y anti-CD3⁺ marcado con PerCP.

Como control de isotipo se utilizó un anticuerpo, anti-IgG1 de ratón, marcado con FITC-PE y anti-IgG2a de ratón marcado con PerCP (Becton Dickinson, San Jose, CA).

De cada muestra se tiñeron 2 x10⁵ células/mL, agregando 2.5 µl de cada anticuerpo e incubando por 20 min a TA. Finalmente se lavaron con PBS (BioWhittaker, Walkersville, MD), se fijaron con 1% de paraformaldehído y se almacenaron a 4°C hasta su adquisición en el citómetro FACS calibur (Becton Dickinson). Los datos se analizaron con el programa CELL-Quest (Becton Dickinson). Para el análisis de linfocitos de los BAC se delimitó una región en las gráficas FSC vs. SSC. En los análisis de la pureza de MA y de linfocitos T CD4⁺ y T CD8⁺ no se delimitó región.

6.10 Inmuncitoquímica.

Las poblaciones celulares de las BAC y de los MA de los CI y de los CC se analizaron por medio de las tinciones de Wright's para determinar la morfología de los

núcleos y con la tinción de Peroxidasa, para determinar la madurez de los MA y los neutrófilos.

6.11 Análisis Estadístico.

Los datos fueron analizados utilizando la prueba U-Mann-Whitney, Wilcoxon Rank y Friedman. Las cuales compararon ambos grupos con sus múltiples variables determinadas (por ejemplo diferencias entre cepas *Mtb* H37Ra o *Mtb* H37Rv, reactividad de TST, en CI y CC, entre MA y co-cultivo). El intervalo de confianza fue de al menos 95%. Las diferencias estadísticas fueron de $p < 0.05$ y todos los análisis se hicieron con el programa SPSS/PC+ V11.5.

7. Resultados.

En el estudio se incluyeron 13 CI y once CC. Ocho de los CI y tres CC fueron PPD+ (>10mm) y cinco CI y ocho CC fueron PPD- (<10mm). La media de los CI positivos al PPD fue de 11.8 mm y de los CC de 11.6 mm. La media de los CI PPD negativos fue de 0.3 mm y la de los CC de 0 mm. Once de los CI y siete de los CC tenían historia de vacunación con BCG

7.1 Fagocitosis.

El porcentaje de fagocitosis en la MOI 1:1 fue comparable en *Mtb* H37Ra y *Mtb* H37Rv (20-25%) tanto en los CI y los CC. A la MOI 0.1: 1 la fagocitosis de los CI resulto entre el 11-15% y en CC fue del 4%.

7.2 Crecimiento intracelular de *Mtb* H37Ra y *Mtb* H37Rv en cultivos de MA y co-cultivos AM/CD8⁺ y AM/CD4⁺ en Contactos Intradomiciliarios.

Para determinar si la exposición a *Mtb* en los CI induce una respuesta específica en el control del crecimiento intracelular de *Mtb* en cultivos de los MA y si está, también se induce en linfocitos de sangre periférica como T CD4⁺ y T CD8⁺, se evaluó si estas dos poblaciones de linfocitos intervienen en la inhibición del crecimiento intracelular de *Mtb* en MA infectados *in vitro* con *Mtb* H37Ra y *Mtb* H37Rv a dos MOI (0.1: 1 y 1: 1) y fue determinado en los días 0, 4 y 7 en los cultivos de MA y co-cultivos de AM/CD8⁺ y AM/CD4⁺.

Los resultados del crecimiento intracelular de *Mtb* H37Ra y *Mtb* H37Rv en los cultivos de MA y en los co-cultivos de MA/CD8⁺ de CI se muestran en la Tabla 1.

Las UFC obtenidas de la lisis de los MA infectados con *Mtb* H37Rv al D0 fueron 3.6 veces mayores que las obtenidas de *Mtb* H37Ra y el incremento de las UFC en los

días 4 y 7 en la infección con *Mtb* H37Rv fue 1.8 veces mayor que con la cepa *Mtb* H37Ra en ambos MOI. El patrón del crecimiento intracelular de *Mtb* H37Ra (Figura 4a y 4c) en los MA infectados fue comparable con *Mtb* H37Rv en los MOI 0.1: 1 y 1:1 (Figura 4b y 4d).

UFC x 10 ³					
Cepa y MOI	D0	D4		D7	
	MA	MA	MA/CD8 ⁺	MA	MA/CD8 ⁺
Ra 0.1:1	5.5	225.2	78.7	381.1	159.2 *
Ra 1:1	38.6	462.0	174.2 *	865.4	372.3 *
Rv 0.1:1	21.1	422.9	273.9	691.9	531.8 *
Rv 1:1	133.5	543.3	590.9	1560.1	893.1

Tabla 1. Control del crecimiento intracelular de *Mtb* por MA y MA/CD8⁺ infectados con *Mtb* H37Ra (11 sujetos) y *Mtb* H37Rv (13 sujetos) con los MOI 0.1:1 y 1:1 bacteria/ MA en los días 0, 4 y 7 postinfección. Cada punto representa la media cada día. * Diferencias estadísticamente significativas (p<0.05) al comparar las UFC de los MA vs. MA/CD8⁺ en cada día.

En los co-cultivos de MA/CD8⁺ se observó una disminución en las UFC a partir del D4 (2.8 veces menos) en comparación con los cultivos de MA y esta reducción del crecimiento de *Mtb* fue significativa (p<0.05) para el D7 en los cultivos infectados con ambas cepas en el MOI 0.1:1 (Figura 4a y 4b).

En el MOI 1:1 el control del crecimiento intracelular de *Mtb* H37Ra en cultivo de MA y en el co-cultivo de MA/CD8⁺, fue comparable con el comportamiento de la relación 0.1:1, la reducción de las UFC en los co-cultivos de MA/CD8⁺ fue de 2.7 veces mayor que en los cultivos de los MA (Figura 4c).

El efecto de los linfocitos T CD8⁺ sobre el control de crecimiento de *Mtb* H37Ra fue estadísticamente significativo en los D4 y D7 (p=0.01) en relación a las UFC de los MA. En contraste, con *Mtb* H37Rv en el MOI 1:1 no se observó este efecto en el D4,

aunque en el D7 se vió una reducción de las UFC en co-cultivo de MA/CD8⁺ (1.7 veces menos) en relación a las UFC de los MA, no hay una diferencia estadísticamente significativa (Figura 4d).

Los linfocitos T CD8⁺ participan en el control del crecimiento de *Mtb*, de forma particular en la cepa *Mtb* H37Ra. Al infectar con la cepa *Mtb* H37Rv también contribuyeron en el control del crecimiento intracelular, pero solo en el MOI 0.1:1.

Se observó que la cepa *Mtb* H37Rv tuvo mayor capacidad de infectar y de replicarse en los MA que la cepa *Mtb* H37Ra, ya que las UFC obtenidas de la lisis de los cultivos de MA al D0 fueron 3.4 veces mayores con la cepa virulenta.

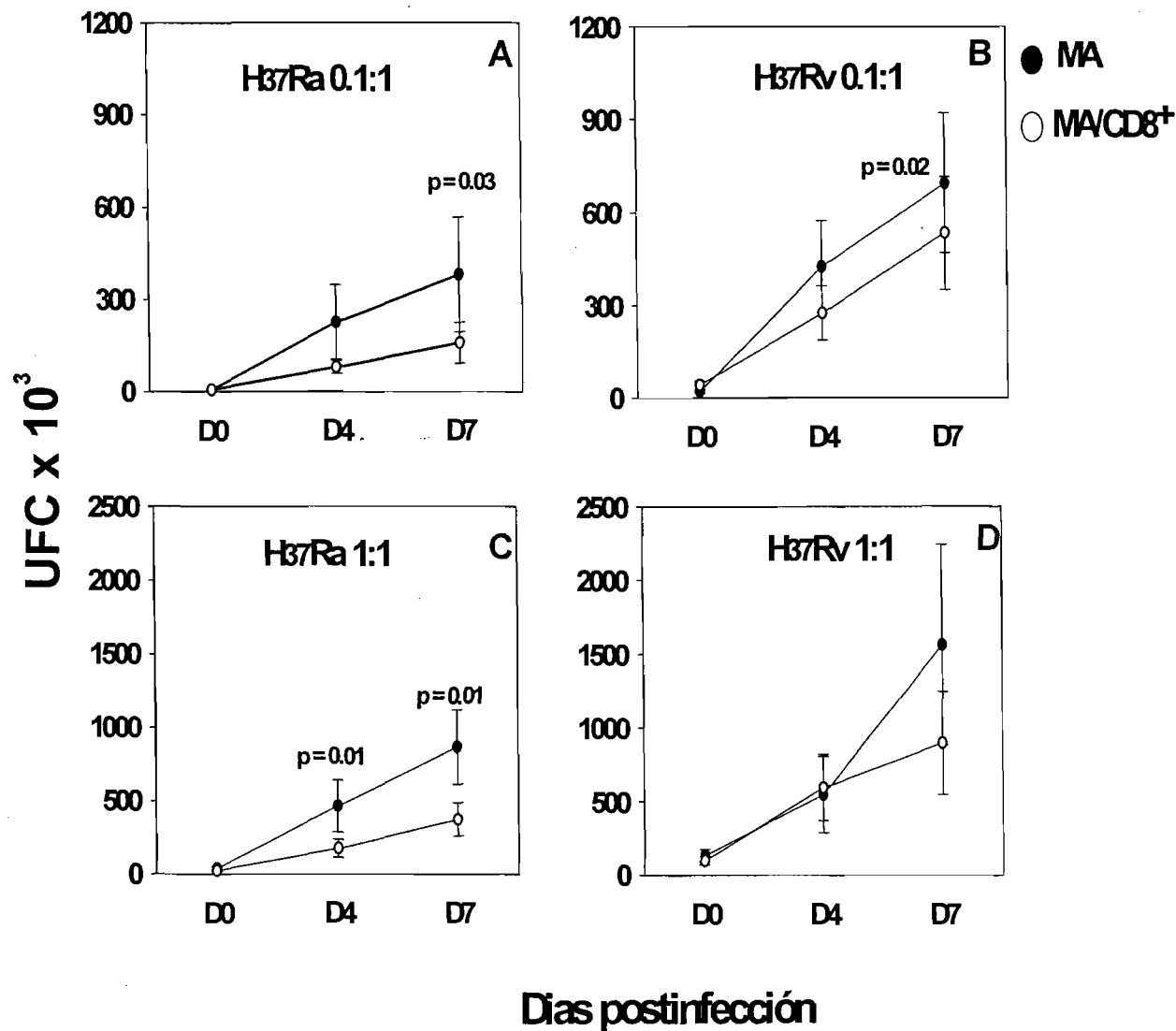


Figura 4. Efecto de los linfocitos TCD8⁺ en el control del crecimiento intracelular de *Mtb* H37Ra y *Mtb* H37Rv en MA y MA/CD8⁺ de CI. Control del crecimiento intracelular de *Mtb* por MA vs. MA/CD8⁺ infectados con *Mtb* H37Ra (11 sujetos) y *Mtb* H37Rv (13 sujetos) con los MOI 0.1:1 y 1:1 bacteria/ MA en los días 0, 4 y 7 postinfección. Cada punto representa la media cada día y el error estándar (ES).

7.3 Producción de IFN γ en cultivos de MA y en los co-cultivos de AM/CD8 $^+$ en Contactos Intradomiciliarios.

La importancia de IFN γ como activador de los MA y de los linfocitos T CD4 $^+$ y T CD8 $^+$ en respuesta a *Mtb*, ha sido bien establecida en modelos murinos y en humanos y su papel en la respuesta inmune contra *Mtb*, es muy amplio ^(39,52,53,54). En este estudio se cuantificó la producción de IFN γ en los sobrenadantes de los cultivos de los MA y de los co-cultivos de AM/CD8 $^+$ infectados con *Mtb* H37Ra y *Mtb* H37Rv respectivamente (Tabla 2).

IFN γ (pg/mL)						
Cepa y MOI	D0		D4		D7	
	MA	MA/CD8 $^+$	MA	MA/CD8 $^+$	MA	MA/CD8 $^+$
Ra 0.1:1	14.6	12.4	165.8	287.2	346.7	699.1
Ra 1:1	10.6	19.2	251.4	1160.5 *	387.8	1395.5
Rv 0.1:1	40.6	40.4	376.7	819.6 *	339	1190.7
Rv 1:1	33.6	51	792.6	2325.6 *	1120.8	2147.6

Tabla 2. Producción de IFN γ por *Mtb* H37Ra y *Mtb* H37Rv en MA de CI con y sin linfocitos T CD8 $^+$ autólogos. La concentración de IFN γ fue medida en los sobrenadantes en los días 0, 4 y 7 por ELISA. * Diferencias estadísticamente significativas ($p < .05$) al comparar la producción de IFN γ de los MA vs. AM/CD8 $^+$ en cada día.

Los resultados muestran que los MA son capaces de producir IFN γ después de la infección *in vitro* con ambas cepas de *Mtb*. La concentración de IFN γ producida por los MA infectados con *Mtb* H37Ra en el MOI 0.1:1, se incremento 2 veces del D4 al D7, mientras que en los infectados con *Mtb* H37Rv se produjo un concentración similar en los D4 y D7 (376 pg/mL en el D4 y 339 pg/mL en el D7).

En el MOI 1:1, el incremento de IFN γ fue de 1.5 veces más del D4 al D7 en ambas cepas, aunque la producción de IFN γ en los cultivos de los MA infectados con *Mtb* H37Rv fue 3 veces mayor que con *Mtb* H37Ra (Figura 5c y 5d).

Al analizar los resultados de los co-cultivos se observó que la concentración de IFN γ en los sobrenadantes de los MA/CD8⁺ también se incremento aproximadamente 3 veces más que en los MA.

En el D4 la producción se aumentó de forma significativa ($p=0.008$) en los co-cultivos de MA/CD8⁺ vs. los cultivos de MA al infectarse con *Mtb* H37Ra en el MOI 1:1 (Figura 5c). En el mismo día con la cepa *Mtb* H37Rv se observó en ambos MOI un incremento de aproximadamente 3 veces más de IFN γ con una $p<0.05$ (Figura 5b y 5d).

Al comparar la producción de IFN γ en los cultivos de los MA y co-cultivos de MA/CD8⁺ en relación con la virulencia de la cepa de *Mtb*, se observó que en la infección con *Mtb* H37Rv fue de 2 a 3 veces mayor al de los infectados con *Mtb* H37Ra (Figura 5). La virulencia de la cepa de *Mtb* se relacionó con los niveles más altos en la producción de IFN γ .

La concentración basal de IFN γ en los sobrenadantes de los cultivos de MA y de MA/CD8⁺ sin infección fue menor de 20 pg/mL en los días 0, 4 y 7.

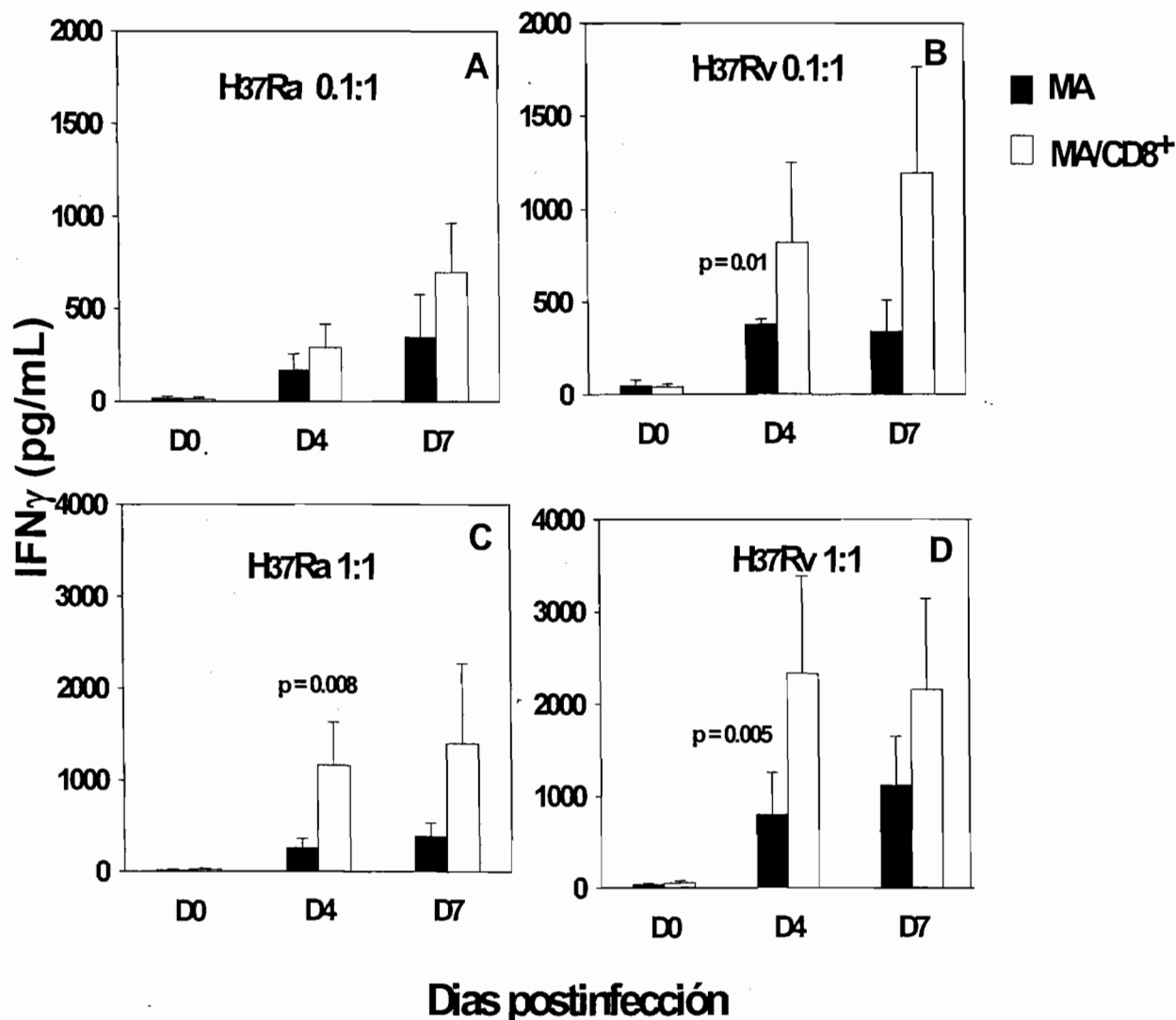


Figura 5. Producción de IFN γ por *Mtb* H37Ra y *Mtb* H37Rv en MA de CI de pacientes con TBP activa con y sin linfocitos T CD8 $^{+}$ autólogos. Después de la infección con *Mtb* H37Ra (11 sujetos) y H37Rv (13 sujetos) de MA a dos MOI (0.1:1 y 1:1), fueron cultivados con o sin linfocitos T CD8 $^{+}$. La concentración de IFN γ fue medida en los sobrenadantes en los días 0, 4 y 7 por ELISA. Los valores de P indican el incremento significativo entre las concentraciones de IFN γ de los co-cultivos de MA/CD8 $^{+}$ comparados con los cultivos de MA solos.

7.4 Actividad bactericida y producción de IFN γ en cultivos de MA y en los co-cultivos de MA/CD4 $^{+}$ en Contactos Intradomiciliarios.

De cuatro CI (por la cantidad limitante de los MA obtenidos) se hicieron co-cultivos con MA/CD4 $^{+}$ al mismo tiempo. El crecimiento intracelular de *Mtb* H37Ra y *Mtb* H37Rv en cultivos de MA y co-cultivos de MA/CD4 $^{+}$ fue determinado por UFC y se muestra en la Figura 6a y 6b.

Se observó inhibición del crecimiento intracelular en la infección con *Mtb* H37Ra en el MOI 0.1:1 los por los linfocitos T CD4 $^{+}$, pero no hubo diferencia estadística significativa (Figura 6a).

En el D4 los linfocitos T CD4 $^{+}$ inhibieron el crecimiento de *Mtb* H37Rv (Figura 6b) en relación a los cultivos de MA (sin diferencias significativas), pero para el D7 las UFC se incrementan a niveles comparables a las obtenidas en los cultivos de los MA. En el MOI 1:1 no se observó ningún efecto de los linfocitos T CD4 $^{+}$ sobre el crecimiento de las bacterias.

Los niveles de IFN γ determinados en los sobrenadantes de los co-cultivos de MA/CD4 $^{+}$ fueron mayores en comparación con los cultivos de los MA, en ambas MOI y con ambas cepas (*Mtb* H37Ra y *Mtb* H37Rv). En general la concentración de IFN γ se incrementó a partir del D4 de forma significativa ($p < 0.05$) (Tabla 3, Figura 6c y 6d).

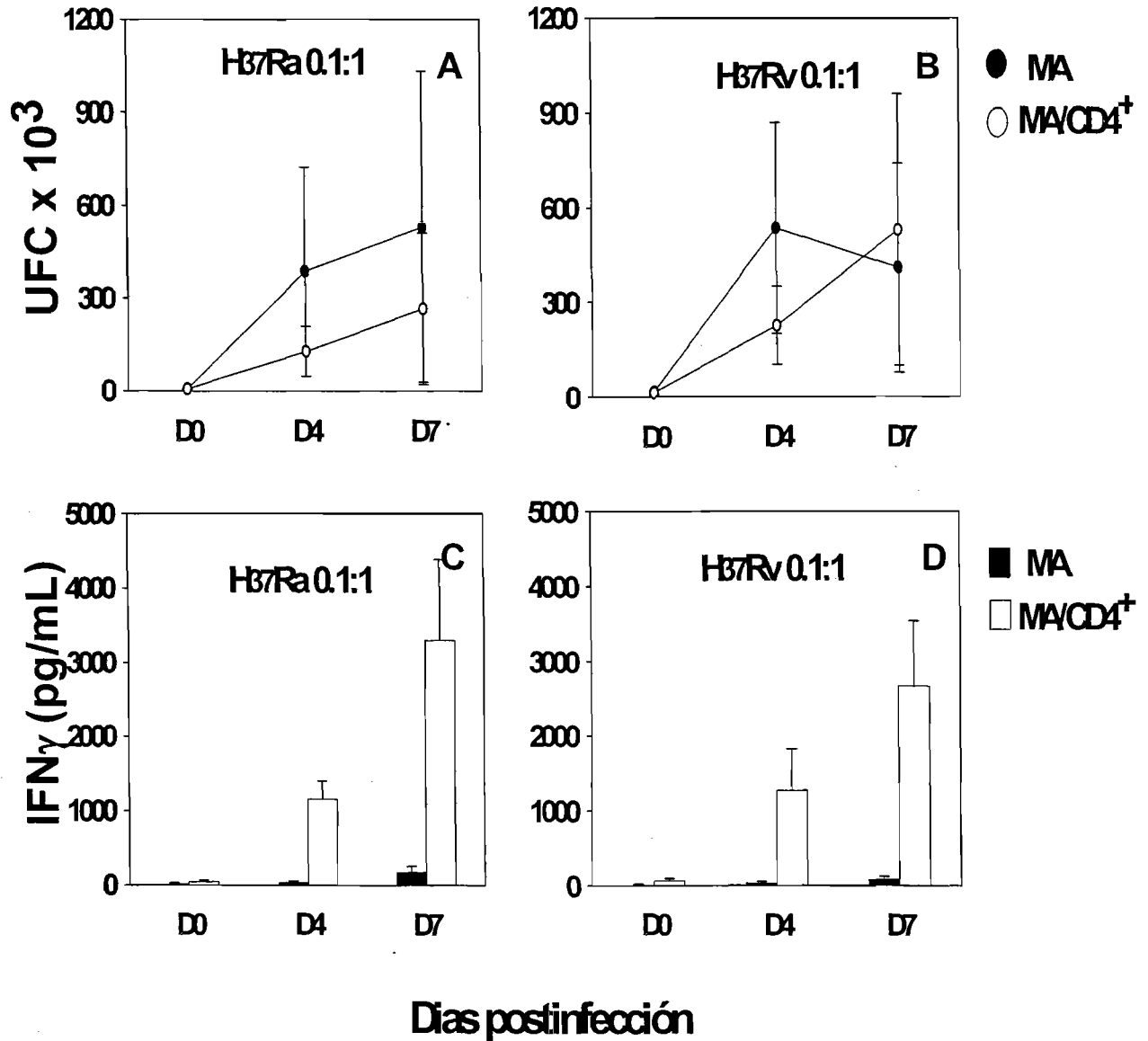


Figura 6. Efecto de linfocitos T CD4⁺ sobre el crecimiento de *Mtb* y producción de IFN_γ por MA infectados con *Mtb* H37Ra y *Mtb* H37Rv de 4 CI de pacientes con TBP activa. Después de la infección de MA con *Mtb* H37Ra y *Mtb* H37Rv a una MOI 0.1:1, fueron cultivados con o sin linfocitos T CD4⁺ autólogos. El control del crecimiento intracelular y la producción de IFN_γ fueron determinados en los días 0, 4 y 7. Las barras representan la media y el ES de los 4 sujetos por duplicado.

IFN γ (pg/mL)						
Cepa y MOI	D0		D4		D7	
	MA	MA/CD4 ⁺	MA	MA/CD4 ⁺	MA	MA/CD4 ⁺
Ra 0.1:1	15.6	44.1	34.2	1155.7*	170.9	3299.4*
Ra 1:1	12.6	34.1	73.9	2410.6*	360.5	3717.5*
Rv 0.1:1	13.5	66.3	32.9	1266.6*	82.9	2663.1*
Rv 1:1	30.7	64.3	73.1	2665.7*	383.4	3588.8*

Tabla 3. Producción de IFN γ por *Mtb* H37Ra y *Mtb* H37Rv en MA de 4 Cl con y sin linfocitos T CD4⁺ autólogos. La concentración de IFN γ fue medida en los sobrenadantes en los días 0, 4 y 7 por ELISA. * Diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) al comparar la producción de IFN γ de los MA vs. AM/CD4⁺ en cada día.

En los sobrenadantes de los co-cultivos de MA/CD4⁺ (tabla 3) la producción de IFN γ fue más alta que la obtenida en los co-cultivos de MA/CD8⁺ (Tabla 2) de forma independiente al MOI y a la cepa utilizada en la infección. Sin embargo el aumento en la producción de IFN γ en los co-cultivos de MA/CD4⁺ no se tradujo en el incremento del control de *Mtb*.

7.5 Producción de Oxido Nítrico.

Para evaluar si existe una relación entre el control del crecimiento intracelular de *Mtb* y la producción de ON en el modelo humano, se midió los niveles de ON en los sobrenadantes de cultivo de los MA y en los co-cultivos MA/CD8⁺ infectados con *Mtb* H37Ra y *Mtb* H37Rv (Figura 7).

Se observó un incremento de la producción de ON en los cultivos de los MA a partir del D4. Este incremento en la MOI 0.1:1 con la cepa *Mtb* H37Ra fue bajo ($< 200 \mu\text{M}/10^5$ células). La concentración de ON aumentó 2 veces en la MOI 0.1:1 con *Mtb* H37Rv comparado con la cepa *Mtb* H37Ra. En la MOI 1:1 indistintamente de la cepa la producción de ON fue más alta.

La producción de ON en los sobrenadantes de los co-cultivos de MA/CD8⁺ y MA/CD4⁺ no fue mayor a 100µM en ninguna de las condiciones experimentales.

Los CI fueron estratificados de acuerdo a la producción de ON en productores de ON (>100 µM) y en bajos productores (<100 µM), para analizar si los sujetos que fueron capaces de producir más ON controlaban más eficientemente el crecimiento intracelular de *Mtb* H37Ra y *Mtb* H37Rv. Al igual que en el caso de la producción de IFN γ , no se encontró una correlación entre los niveles de producción de ON en ninguna de las variables estudiadas.

La concentración de ON en los sobrenadantes de los cultivos de los CC fueron menores a 20 µM.

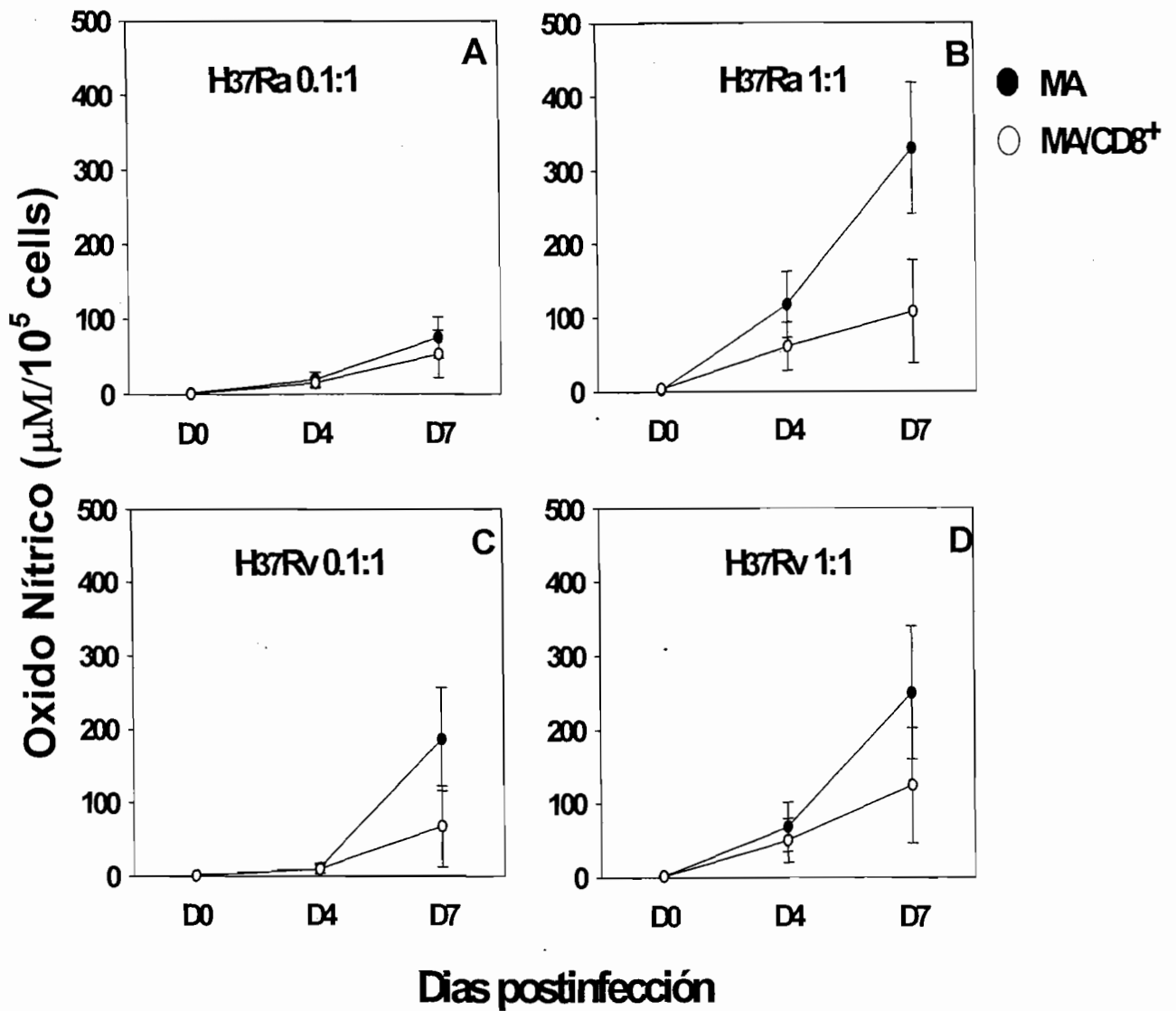


Figura 7. Producción de Oxido Nítrico (ON) por MA de 13 CI de pacientes con TBP activa. MA fueron infectados con *Mtb* H37Ra y *Mtb* H37Rv a las MOI 0.1:1 y 1:1. Los sobrenadantes de los cultivos fueron recolectados en el D0, D4 y D7. La concentración de ON fue determinada utilizando el método de Griess.

7.6 Actividad bactericida en cultivos de MA y en co-cultivos de MA/CD8⁺ en Controles de la Comunidad.

En el grupo de controles de la comunidad (CC), se determinó la contribución de los linfocitos T CD8⁺ y T CD4⁺ en el control del crecimiento intracelular de los MA infectados con *Mtb* H37Ra y *Mtb* H37Rv (Figura 8).

En la MOI 1:1 las UFC obtenidas de los co-cultivos de MA/CD8⁺ y MA/CD4⁺ infectadas con *Mtb* H37Ra y con *Mtb* H37Rv (Figura 8a y 8b) no mostraron diferencias significativas en comparación con las UFC obtenidas de los cultivos con los MA, lo cual sugirió que los linfocitos T CD4⁺ y T CD8⁺ de estos sujetos no contribuyeron al control de la infección. Un efecto similar se observó en la MOI 0.1:1.

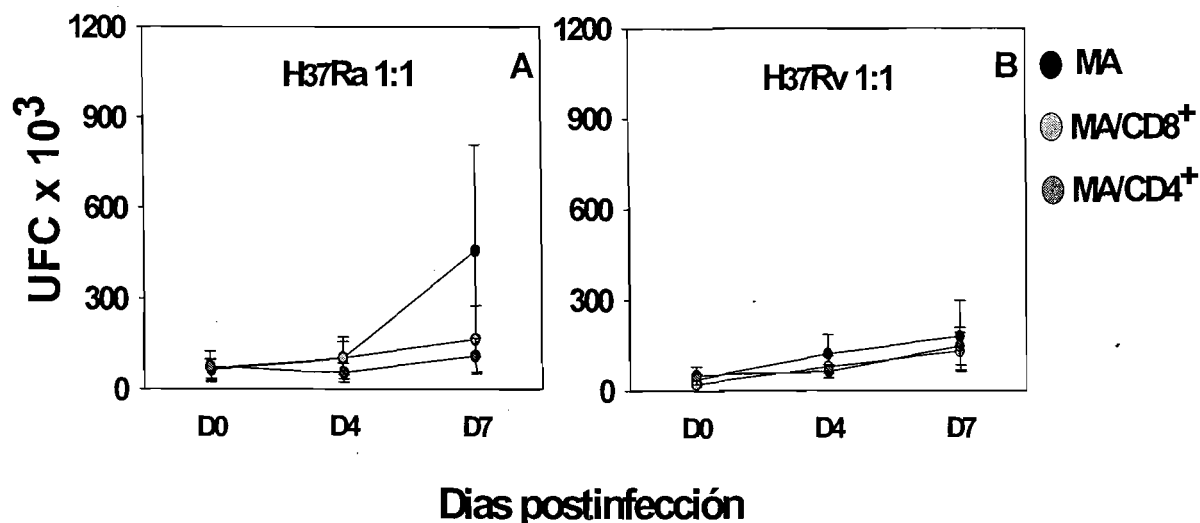


Figura 8. Efecto de linfocitos T CD8⁺ y T CD4⁺ sobre el crecimiento intracelular de *Mtb* en MA infectados de CC. Se estudiaron las diferencias en el control del crecimiento de *Mtb* en MA solos vs. MA/CD8⁺ y MA/CD4⁺ infectados con *Mtb* H37Ra (8 sujetos) y *Mtb* H37Rv (11 sujetos) en la MOI 1:1.

7.7 Concentración de IFN γ en cultivos de los MA y en los co-cultivos con MA/CD4 $^{+}$ y MA/CD8 $^{+}$ de CC.

En los sobrenadantes de los cultivos de los MA y en los co-cultivos MA/CD8 $^{+}$ y MA/CD4 $^{+}$ de los CC se determinó la producción de IFN γ . En la infección con las cepas *Mtb* H37Ra y *Mtb* H37Rv en ambas MOI, la producción de IFN γ se incrementó de manera comparable a la observada en los MA entre el D0 y el D7 (Figura 9).

Los niveles de IFN γ se incrementaron de manera significativa ($p < 0.05$) en los co-cultivos de MA/CD4 $^{+}$ en relación a la producción determinada en los sobrenadantes de los co-cultivos de MA/CD8 $^{+}$ al D7 en todas las condiciones experimentales.

Los niveles de IFN γ en los co-cultivos fueron significativamente mayores que los obtenidos en los cultivos de MA solos en los días 4 y 7. La MOI determinó de manera directa la producción de IFN γ independientemente de la virulencia de la cepa. Los niveles constitutivos de IFN γ en los MA no infectados fueron bajos menores a 50 pg/ml (Figura 9).

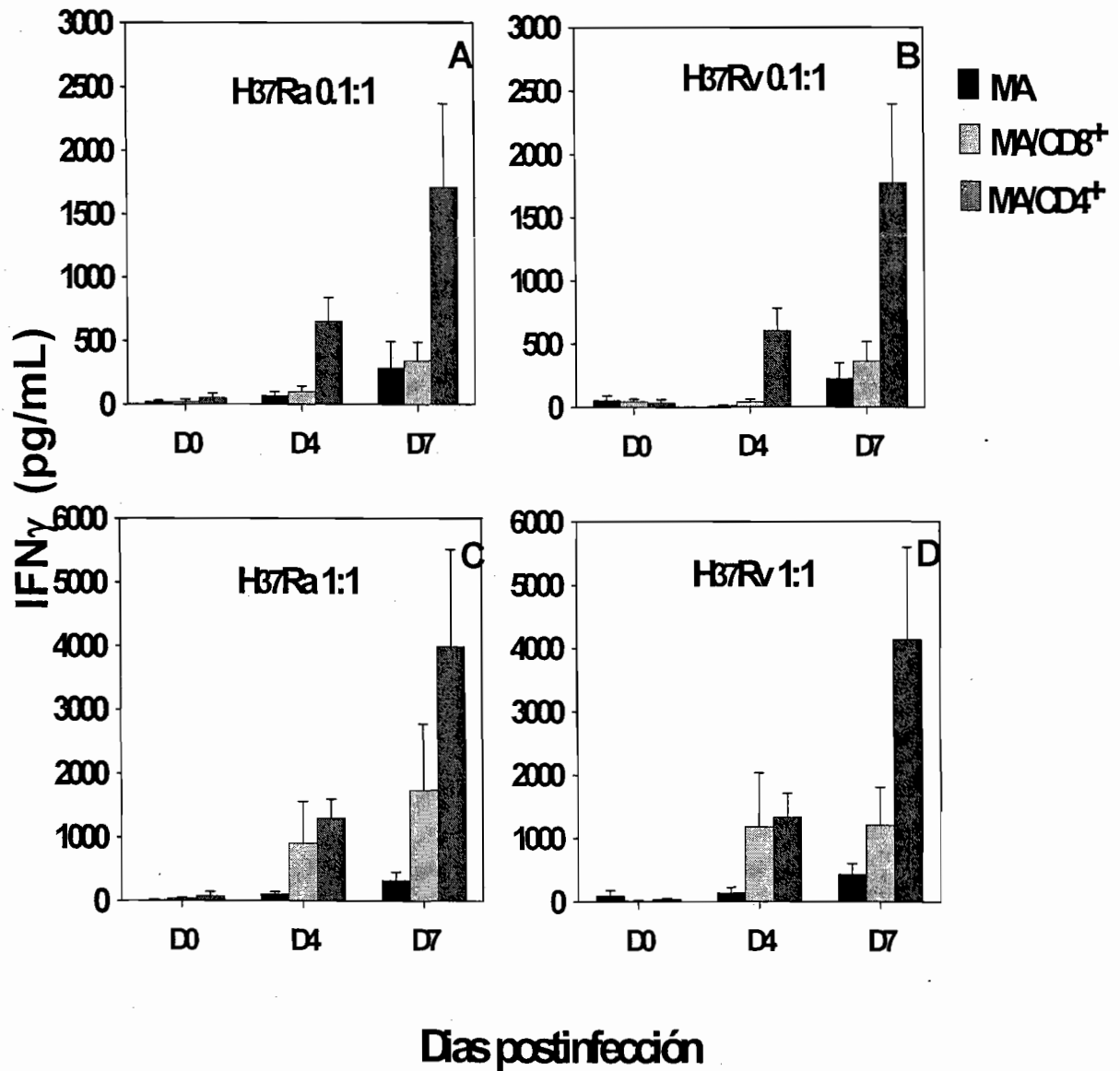


Figura 9. Producción de IFN γ por MA de CC infectados con *Mtb* H37Ra y *Mtb* H37Rv y cultivados con o sin linfocitos T CD8⁺ y T CD4⁺ autólogos. Después de la infección con *Mtb* H37Ra los MA de los CC fueron co-cultivados con o sin linfocitos T CD8⁺ y T CD4⁺. La concentración de IFN γ fue medida en los días 0, 4 y 7 en los sobrenadantes de los cultivos por ELISA.

7.8 Subpoblaciones de células bronquioloalveolares.

Al analizar las subpoblaciones de las BAC por FACS, se determinó que los CI presentaron 91.8% de MA y 7.7% linfocitos alveolares (LA). El porcentaje de los linfocitos T $CD4^+ / CD3^+$ fue del 47% y el 22% fueron $CD8^+ / CD3^+$. En los CC el 89.4% fueron MA y el 7.6% LA, dentro de ellos el 41% fue linfocitos T $CD4^+ / CD3^+$ y el 29% $CD8^+ / CD3^+$.

La pureza de los MA obtenidos por SRBC fue del 91.4% en los CI y del 91.8% en los CC evaluada por el conteo en la tinción de Wright's. La pureza de las poblaciones de linfocitos T obtenidos de sangre periférica en los CI y los CC fluctuaron entre 92.5 y 95% de $CD4^+ / CD3^+$ y entre 91 y 94%, $CD8^+ / CD3^+$.

8. Discusión.

La Tuberculosis es una enfermedad infecciosa que se adquiere por vía respiratoria. El ser humano se puede considerar que es altamente resistente a desarrollar TB activa a pesar de infectarse por *Mtb*. Esto hace pensar que existen mecanismos de defensa muy eficientes contra *Mtb*. Existen en términos generales dos tipos de respuesta a la infección por *Mtb* la respuesta inmune innata y la respuesta inmune adquirida. La primera ha sido estudiada en forma limitada, en tanto que la segunda ha sido motivo de gran número de estudios. En este trabajo se evaluaron ambas respuestas en un modelo *ex vivo* de MA infectados con *Mtb* y su interacción con diferentes poblaciones de linfocitos T.

Los CI se han considerado como un modelo humano de infección natural que es capaz de contener la infección y que puede desarrollar una respuesta inmune protectora específica a *Mtb*. Los motivos de esta resistencia a desarrollar una infección activa y permanecer la bacteria en forma latente son hasta el momento desconocidos. Ambos factores de la respuesta inmune tanto la innata como la adquirida deben de ser estudiadas.

Dentro de la respuesta innata pueden intervenir mecanismos inespecíficos como la acción de las defensinas, las células citotóxicas como las NK, los linfocitos $\gamma\delta$ y T CD8⁺ citotóxicos, que ayudan a controlar la infección sin la presentación de Ags micobacterianos a los linfocitos T antígeno-específicos. Tal vez la célula más importante de esta respuesta son los MA que son las primeras células que se ponen en contacto con *Mtb*.

En este estudio se evaluó en los MA de los CI y de los CC el control del crecimiento intracelular *in vitro* de dos cepas tipo micobacteria, la cepa avirulenta *Mtb* H37Ra y la virulenta *Mtb* H37Rv y el efecto de los linfocitos autólogos T CD8⁺ y T CD4⁺ de sangre periférica sobre la inhibición de las UFC.

Los MA se infectaron con *Mtb* a dos MOI, lo más cercanas a las condiciones de infección natural (0.1:1 y 1:1 bacteria/célula) y fueron cultivados solos o en co-cultivos con linfocitos T CD8⁺ y T CD4⁺.

Se observó que los MA infectados con *Mtb* no limitaron el crecimiento intracelular de la bacteria, ya que las UFC se incrementaron durante los días de estudio independientemente de la virulencia de la cepa y de la relación de infección.

Aunque los MA cuentan con mecanismos bactericidas para controlar el crecimiento o matar a *Mtb*, los resultados mostraron que las bacterias fueron capaces de escapar a estos efectos, resultando la cepa virulenta más eficiente para evadirlos, las UFC obtenidas con *Mtb* H37Rv de la lisis de los MA en los dos MOI y en los 3 días postinfección fueron aproximadamente 2 veces mayores que con *Mtb* H37Ra.

Los factores de virulencia en las cepas de *Mtb* son poco conocidos, recientes estudios han demostrado que los factores de alternancia llamados factores- σ , están involucrados en la transcripción de un grupo de genes que incrementan los mecanismos en *Mtb* para evadir los efectos bactericidas de su hospedero. Uno de estos factores es el llamado SigF, el cual es expresado en la fase estacionaria cuando la bacteria crece y se divide lentamente, y es indetectable en la fase exponencial. La alteración de este gen demostró que estas bacterias son más susceptibles a la respuesta de defensa del hospedero ⁽⁵⁵⁾.

Otros estudios muestran que *Mtb* puede interferir en la vía MHC-II durante el procesamiento y presentación de Ags a los linfocitos T CD4⁺. Entre estos factores se encuentran algunos glicolípidos de la pared celular de las bacterias como lipoarabinomanan, la glicoproteína de 25kDa y la lipoproteína de 19 kDa, pero los mecanismos por los cuales *Mtb* atenúa la expresión de MHC-II aún no se han descrito ^(20,56,57).

Además se ha visto que estas lipoproteínas y la proteína TACO pueden estar involucradas en el procesamiento fagosomal inhibiendo la maduración del fagosoma

así como en la fusión fagosoma-lisosoma. Por otro lado se ha descrito que las cepas avirulentas como BCG no interviene en la presentación de Ags por MHC-II⁽⁵⁸⁾.

Estudios en sangre total (Wallis, no publicado) y en cultivos de MN aislados⁽⁵⁹⁾ infectados por *Mtb in vitro*, mostraron un comportamiento similar en el crecimiento intracelular de *Mtb* como el que se observó en los resultados de este trabajo.

Un aspecto relevante de nuestros resultados evaluando la actividad y el papel de los MA en la respuesta protectora en sujetos altamente expuestos a infección por *Mtb* como son los CI, fue que estas células demostraban mayor fagocitosis que los MA de los CC no expuestos activamente a infección por *Mtb*. La respuesta a esta mayor actividad fagocítica solo puede ser especulativa sin embargo podría sugerir que los MA de los CI son mucho más activos que los CC posiblemente por efecto de algunas citocinas como TNF estudios posteriores podrían resolver esta pregunta.

El papel que juega el ON en la infección por *Mtb* en humanos aún no ha sido bien definido, ya que hay controversias sobre si participa en la muerte o en el control del crecimiento de *Mtb*, en contraste a lo encontrado en el modelo murino de TB. Sin embargo la capacidad de los MA humanos de producir ON en respuesta a la infección por micobacterias ha sido bien descrita^(47,72).

En este estudio se determino el ON en los sobrenadantes de los cultivos de MA de los CI y los CC en los días 0, 4 y 7. En los CC las concentraciones determinadas muy bajas.

No se encontró una correlación entre las concentraciones de ON y el control del crecimiento de ninguna de las dos cepas (*Mtb* H37Ra o *Mtb* H37Rv) con las cuales se infectó. Estos resultados son comparables con los reportados por Aston y cols.⁽⁷³⁾, donde se mostró que la inhibición del crecimiento intracelular de *Mtb* H37Ra en los MA no esta mediada por la producción de ON.

En contraste con lo reportado por Rich y col.⁽⁴⁷⁾ quienes reportaron que los MA de voluntarios sanos expresan iNOS y producen ON después de la infección con *Mtb*, y describen una correlación indirecta entre la inhibición del crecimiento intracelular y la cantidad de ON producido en los sobrenadantes de los cultivos.

Las diferencias reportadas entre este estudio y el de Rich, pueden deberse a las MOI utilizados y a que los sujetos reclutados en el estudio de Rich, no se encontraban expuestos a *Mtb*.

La producción de ON en los sobrenadantes de los cultivos de MA de los CI, fue diferente entre cepas, se observó que la concentración de ON fue ligeramente más alta en los cultivos infectados con la cepa avirulenta *Mtb* H37Ra que los infectados con la cepa virulenta *Mtb* H37Rv, sin que las MOI afectaran esta respuesta. Tal vez los factores de virulencia tienen efecto también sobre los mecanismos bactericidas de los MA.

El incremento de la producción de ON en la infección por *Mtb* H37Ra ha sido descrito en otros estudios, Kim y cols.⁽⁷⁴⁾ observaron que en PBMC infectados con *Mtb* H37Ra producen cantidades mayores de ON que la cepa *Mtb* H37Rv.

Finalmente aunque IFN γ es un importante inductor de ON, en este estudio no se encontró una correlación entre las concentraciones de IFN γ y ON en los sobrenadantes de los cultivos.

La interacción entre las células efectoras como los MA y los linfocitos T hasta ahora no ha sido estudiada en humanos y pobremente en modelos animales. La interacción entre monocitos y linfocitos T CD8⁺ ha sido previamente evaluada^(13,29,60) demostrándose actividad bactericida por estas células sobre estas células efectoras. Los resultados de este trabajo son muy trascendentes ya que consideramos que es el primero en donde se puede analizar la interacción de los linfocitos T CD8⁺ y T CD4⁺ con los MA.

En los CI el co-cultivo de los MA con los linfocitos T CD8⁺ inhibió de manera significativa el crecimiento tanto de la cepa *Mtb* H37Ra en ambos MOI, como el de *Mtb* H37Rv en el MOI 0.1:1, en relación a los cultivos de los MA y este efecto fue más marcado que el observado en los co-cultivos con linfocitos T CD4⁺. En el grupo de los CC no se observó el efecto de los linfocitos T CD8⁺ y T CD4⁺ sobre el crecimiento de *Mtb* en relación al cultivo de MA.

Los resultados sugieren que la exposición continua de los CI a *Mtb* permite que los linfocitos T CD8⁺ de sangre periférica proliferen de forma específica durante o después de la exposición aerogénica. Que estos linfocitos Ag-específicos son capaces de reconocer a los MA infectados con *Mtb* y de producir citocinas tipo TH1 o de lisar a las células blanco. Por lo cual, se puede pensar que el reclutamiento de los linfocitos T CD8⁺ antígeno-específico de sangre periférica de los CI hacia el sitio de inflamación (pulmón) puede jugar un papel importante en el control de la infección.

Estos resultados se relacionan con lo reportado en monocitos (MN) de sangre y en MN derivados a macrófagos de pacientes con TBP activa⁽²⁸⁾. Aunado a esto Canaday y cols.⁽⁶⁰⁾, demostraron que en sujetos PPD+ los linfocitos T CD4⁺ y T CD8⁺ expandidos *in vitro* tienen un efecto citotóxico sobre los MA infectados con *Mtb*.

Silver y cols.⁽⁶¹⁾ describen que los linfocitos T CD4⁺ son las células responsables del control de crecimiento de *Mtb* H37Rv en MN infectados, ya que al eliminar los linfocitos T CD4⁺ se incrementó el número de UFC y al excluir los linfocitos T CD8⁺ los niveles de UFC no se vieron afectados.

En nuestro estudio, no se requirió la presencia de los linfocitos T CD4⁺ en los co-cultivos de MA/CD8⁺ para observar el efecto de los linfocitos T CD8⁺ sobre el control del crecimiento intracelular. Las diferencias con lo reportado anteriormente pueden ser explicadas por el uso de un modelo diferente, el tiempo y la exposición de los CI a *Mtb* *in vivo*, a que se trabajó con los MA obtenidos del pulmón en forma directa a diferencia de la mayoría de los estudios que purifican MN de sangre periférica, a las relaciones de infección utilizadas *in vitro*.

Al igual que en los cultivos de los MA, la virulencia de las cepas de *Mtb* también intervino en la capacidad de los linfocitos T CD8⁺ para controlar el crecimiento de *Mtb*.

El efecto de los linfocitos T CD8⁺ sobre el crecimiento de la cepa *Mtb* H37Ra (avirulenta) en los co-cultivos fue 2 veces más que en los cultivos de los MA de forma constante. Lo cual no se observó en los cultivos infectados con la cepa *Mtb* H37Rv (virulenta), ya que los linfocitos T CD8⁺ solo inhibieron 0.4 veces el crecimiento de *Mtb* en el MOI 0.1:1 en los días 4 y 7 y en 1:1 se presentó un efecto hasta el D7.

Estos resultados coinciden con lo reportado por Zhang y cols. ⁽⁶²⁾ quienes demostraron un incremento de las UFC obtenidas de MN derivados a macrófagos infectados con *Mtb* H37Rv y con cepas aisladas de pacientes, en comparación con los macrófagos infectados con la cepa *Mtb* H37Ra.

En este trabajo no se evaluaron los mecanismos por los cuales las células T CD8⁺ contribuyen al control de *Mtb*, como pueden ser por medio de la vía de liberación de gránulos citotóxicos ^(25,15) y la vía Fas/FasL ^(14,63). Aunado a esta actividad citotóxica contra células blanco infectadas, los linfocitos T CD8⁺ contribuyen con la inmunidad protectora secretando IFN γ ^(14,60,64).

El IFN γ es una citocina que juega un papel importante en la respuesta de defensa contra *Mtb*, por lo cual se midió la concentración de IFN γ en los sobrenadantes de los cultivos de MA y en los co-cultivos de MA/CD8⁺ y MA/CD4⁺. Para el D4 de infección la concentración de IFN γ en los co-cultivos de MA/CD8⁺ fue más alta que en los MA pero menor a las concentraciones medidas en los co-cultivos con MA/CD4⁺ indistintamente de la cepa.

La concentración de IFN γ en los co-cultivos de MA/CD4⁺ fue dos veces mayor que en la de los co-cultivos de MA/CD8⁺, estos resultados coinciden con los reportados recientemente ⁽⁶⁵⁾ donde se demostró que los linfocitos T CD4⁺ específicos a *Mtb* son la fuente primaria de IFN γ y que los linfocitos T CD8⁺ contribuyen pero menos que las células T CD4⁺.

A pesar de la producción de IFN γ en respuesta a la infección con *Mtb*, no se encontró una relación con el control de la infección en los co-cultivos. Toossi y cols. ⁽⁶⁶⁾ reportaron que IFN γ y granzima B son inducibles en PBMC infectadas con *Mtb*, pero su expresión no se relacionó con el control del crecimiento intracelular de *Mtb* en los co-cultivos de MN y células no adherentes.

En el mismo sentido Hoft y cols. ⁽⁶⁷⁾ no encontraron correlación en los ensayos de inhibición del crecimiento de *Mtb* con la producción de IFN γ , sugiriendo que a pesar de que se produzca IFN γ y que se expresen los receptores para este, el IFN γ no media directamente la muerte de *Mtb* intracelular en ensayos *in vitro*. Brill y cols. ⁽⁶⁸⁾ reportaron que el IFN γ producido por las células NK en cultivo con MN humanos, no está asociado con el control intracelular de *Mtb* H37Rv.

Por otro lado se ha descrito que los linfocitos T CD8⁺ de sangre periférica de los CI producen IFN γ al ser estimulados con ESAT-6, demostrando que juegan un papel de protección en el control de la infección con *Mtb* en humanos ⁽⁵⁴⁾.

En pacientes con TBP activa se mostró que las BAC tienen una respuesta específica hacia *Mtb*, incrementado los niveles de IFN γ localmente, así como la frecuencia en las que las células antígeno-específicas a *Mtb* producen IFN γ ^(50,69). Otros estudios se han dirigido a estudiar el enigma de que hace *Mtb* para interferir en la producción de IFN γ , la regulación de sus genes ⁽⁷⁰⁾ y las vías de señalización intracelular ^(71,72).

Los resultados de este trabajo muestran de igual manera que los linfocitos T CD4⁺ y T CD8⁺ producen altas concentraciones de IFN γ en respuesta a la infección con *Mtb*, que es dependiente de la virulencia de la cepa y de la MOI, pero la producción IFN γ no se correlaciona con el control de la infección, como se ha demostrado en los modelos animales.

Al analizar los CI por estatus de PPD (+ o -) no se observaron diferencias en ninguno de los parámetros medidos, es decir, ni en la producción de ON, IFN γ y en el control de *Mtb* H37Ra o H37Rv, Aston y cols. ⁽⁷³⁾ reportan resultados similares.

La respuesta innata y la respuesta adquirida contra *Mtb* en los humanos es muy compleja y toda la red de este sistema debe estar entrelazada para obtener el éxito que se observa al controlar la infección por *Mtb* en la mayoría de los sujetos infectados.

La hipótesis planteada se basó en que el grupo de los CI presentan una mayor capacidad de controlar el crecimiento de *Mtb* debido a su constante exposición a *Mtb* desarrollan una efectiva respuesta de defensa, a que sus MA posiblemente son más eficientes para control de la infección y a que los linfocitos T tienen una respuesta de memoria contra *Mtb*.

Se vio que los MA y los linfocitos T CD4⁺ y T CD8⁺ de CI negativos al PPD, responden de manera similar a la infección por *Mtb*, que los sujetos PPD positivos, lo cual nos indicó que este grupo por su exposición tiene una respuesta específica a antígenos micobacterianos, a pesar de que algunos sujetos no responden a las proteínas del PPD.

Los CI que dieron una respuesta negativa al PPD pueden ser sujetos con una respuesta lenta hacia el PPD, se ha descrito que los CI a una segunda aplicación tienden a responder de manera positiva al PPD. Por otro lado puede pasar que los Ag del PPD no son reconocido por las células T de estos sujetos, pero han desarrollado clonas específicas hacia otros Ag micobacterianos como ESAT-6 o el Ag CFP-10.

Estudiar la respuesta de pacientes con TBP en el mismo contexto de este trabajo nos daría más información si, los linfocitos T CD8⁺ están o no participando en el control de la infección de manera importante.

Durante los últimos 10 años diversos grupos se han dedicado al desarrollo de una nueva vacuna contra la tuberculosis que sea más eficiente tanto en el control de la primoinfección como en la protección. Ha sido evaluado el uso de diversas proteínas

de secreción como ESAT-6, CFP10, Ag 85A, Ag 85B, Ag85 complex, así como algunas lipoproteínas como la de 19kDa, la vacunación con DNA, cepas atenuadas de micobacterias cercanas filogenéticamente a *Mtb*, así como el desarrollo de vacunas recombinantes de BCG.

Una de las estrategias en la que se enfoca el desarrollo de una nueva vacuna, es que la composición de los antígenos que la constituyan deben activar tanto los linfocitos T como los CD4⁺ y CD8⁺, así como otras subpoblaciones de linfocitos que participan en el control de la infección con *Mtb*.

Kaufman y cols. ⁽⁷⁵⁾ desarrollaron una vacuna recombinante BCG eliminando un gen de ureasa e introduciendo la proteína listeriolisina de *L. monocytogenes* (Δ Ure rBCG-hly). Ellos reportaron que ratones vacunados con Δ Ure rBCG-hly (BCG recombinante) presentaron mayor protección que los ratones vacunados con BCG.

La BCG recombinante incrementa la presentación de Ags por Clase I, esta lisa la membrana del fagosoma permitiendo la traslocación de los Ags hacia el citosol de la célula induciendo la activación de MHC Clase I con la subsecuente estimulación de los linfocitos T CD8⁺. Al ser reclutados al sitio de infección los linfocitos T CD8⁺ pueden participar de forma importante en el control de la infección produciendo IFN γ , lisando a las células infectadas vía perforinas-granzima o induciendo apoptosis.

Este trabajo presenta grandes limitaciones porque el estudio en humanos es complicado, por la variabilidad genética y las diferencias en las respuestas que esta involucra. Por ejemplo, los polimorfismos que quizá confieran resistencia o susceptibilidad a la infección por *Mtb*, el grado de exposición a *Mtb* por el contacto con el paciente con TBP activa, la respuesta positiva o negativa al PPD, así como el tiempo de conversión positiva de los sujetos al PPD, pueden ser factores importantes para la respuesta y activación de los MA y de los linfocitos T CD4⁺ y T CD8⁺.

Estos factores no pueden ser medidos o controlados al trabajar con células humanas *ex vivo*, aún con criterios de inclusión y exclusión rigurosos como los que se utilizaron en este trabajo para la selección de los sujetos que participaron en el estudio.

9. Conclusiones.

- a. Los MA infectados con *Mtb* no limitaron el crecimiento intracelular de la bacteria, las UFC se incrementaron durante los días independientemente de la cepa, relación de infección y del grupo de sujetos.
- b. El patrón de crecimiento de *Mtb* H37Ra y *Mtb* H37Rv fue similar en ambas relaciones de infección en los cultivos de MA.
- c. En los co-cultivos de MA/CD8⁺ se observó una disminución significativa ($p < 0.05$) en las UFC significativa para el D4 y D7 en la MOI 0.1:1 con *Mtb* H37Ra y *Mtb* H37Rv.
- d. Los resultados en los CI sugieren que los linfocitos T CD8⁺ de sangre periférica reconocen de forma específica a *Mtb* por la exposición aerogénica con *Mtb*, ya que reconocieron a los MA infectados con *Mtb* contribuyendo en el control intracelular de esta.
- e. Los linfocitos T CD8⁺ participaron en el control de la infección, pero este efecto estuvo condicionado por la virulencia de la cepa, así como por la relación de infección.
- f. En los CC, no se observó la participación de los linfocitos T CD8⁺ sobre el control intracelular de *Mtb*.
- g. La producción de IFN γ fue por efecto del estímulo y no por la posible contaminación con LA de las BAC que no fue posible eliminar durante el enriquecimiento de los MA.
- h. En ambos grupos de estudio, la concentración de IFN γ en los sobrenadantes de MA/CD8⁺ fue mayor en relación a la encontrada en los MA.
- i. La producción de IFN γ se vio afectada por tipo de cepa por la MOI, es decir, a una mayor MOI se incremento la concentración de IFN γ en los sobrenadantes y la cepa *Mtb* H37Rv indujo niveles más altos de IFN γ que *Mtb* H37Ra.

j. No se encontró una relación entre la producción de IFN γ y el control de *Mtb* en ninguno de los grupos.

K. Se encontró ON en sobrenadantes de los cultivos de MA de CC.

L. La importancia de ON en modelos animales ha sido bien establecida, pero en el humano sigue controversial, como se vio en este trabajo.

M. Se sugiere que la inhibición intracelular de *Mtb* por los linfocitos T CD8⁺ es debido al efecto citotóxico de los linfocitos T CD8⁺ como pueden ser las interacciones de perforinas, granzimas, granulicinas, Fas/FasL o por apoptosis sobre los MA infectados.

10. Perspectivas.

Se demostró que los linfocitos T CD8⁺ autólogos participan en el control de la infección por *Mtb* en MA de CI, por lo cual su estudio en este modelo es importante para la descripción de la respuesta inmune en los humanos. Ahora es necesario conocer y describir cual ó cuales son los mecanismos que los linfocitos T CD8⁺ desencadenan para controlar el crecimiento intracelular. Se continuara el estudio de los mecanismos citotóxicos de los linfocitos T CD8⁺ en el mismo modelo experimental.

Los objetivos en los cuales se trabajará serán: la expresión y papel biológico de Perforinas, Granzimas y Granulinas, por Elispot y PCR tiempo real.

Trabajaremos además con PBMC, MN, linfocitos T CD4⁺, NK y LA.

Se incluirá en el estudio a pacientes con TBP activa, CI y CC

11. Bibliografía.

1. The World Health Organization. 2004. Global Tuberculosis Control. Surveillance, Planning. WHO report. 7-9 págs.
2. Bates, J. 1980. Transmission and pathogenesis of tuberculosis. Clin Chest Med. 1:167-174.
3. Schoolnik, G., McAdam, R., Jacobs, W. and Hopewell, P. 1992. An outbreak of tuberculosis with accelerated progression among persons infected with the human immunodeficiency virus: an analysis using restriction fragment length polymorphisms. N Engl J Med. 326: 231-235.
4. Raviglione, N., Snider, D. and Kochi, A. 1996. Global epidemiology of tuberculosis, morbidity and mortality of a worldwide epidemic. JAMA. 273: 220-226.
5. García, G., Small, P., García, S., Mayar, M., Ferreira, R. and Palacios, M. Tuberculosis epidemiology and control in Veracruz, Mexico. Int J Epidemiol 1999; 28:135-140.
6. Vynnycky, E. and Fine, P. 1997. The natural history of tuberculosis: the implications of age-dependent risks of disease and the role of reinfection. Epidemiol Infect 119: 183.
7. Loudun, R., Bumbarana, L., Lacy, J. and Coffman, K. 1970. Aerial transmission of micobacteria. Am Rev Respir Dis. 100: 165-171.
8. Grybowski, S., Allen, E. 1974. The challenge of tuberculosis in decline. Am Rev Respir Dis. 90: 707-20.
9. Torres, M., Herrera, T., Villareal, H., Rich, E. and Sada, E. 1998. Cytokine profiles for peripheral blood lymphocytes from patients with active pulmonary tuberculosis and healthy household contacts in response to the 30-kilodalton antigen of *Mycobacterium tuberculosis*. Infect.Immun. 66: 176-180.
10. Schwander, S., Torres, M., Carranza, C., Escobedo, D., Tary-Lehmann, M., Anderson, P., Toossi, Z., Ellner, J., Rich, E. and Sada, E. 2000. Pulmonary

mononuclear cell responses to antigens of *Mycobacterium tuberculosis* in healthy household contacts of patients with active tuberculosis and healthy controls from the community. *J.Immunol.* 165: 1479-1485.

11. Cooper, M. and Flynn, J. 1995. The protective immune response to *Mycobacterium tuberculosis*. *Curr Opin Immunol.* 7: 512-516.

12. Serbina, N., Lazarevic, V. and Flynn, J. 2001. CD4(+) T cells are required for the development of cytotoxic CD8(+) T cells during *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J.Immunol.* 167: 6991-7000.

13. Stenger, S., Hanso, D. and Teitelbaum, R. 1998. An antimicrobial activity of cytotoxic T cells mediated by granulysin. *Science.* 282: 121 – 125.

14. Brookes, R., Pathan, A., McShane, H., Hensmann, M., Price, D. and Hill, A. 2003. CD8+ T cell-mediated suppression of intracellular *Mycobacterium tuberculosis* growth in activated human macrophages. *Eur.J.Immunol.* 33: 3293-3302.

15. Ernst, W., Thoma-Uszynski, S., Teitelbaum, R., Ko, C., Hanson, D., Clayberger, A., Krensky, C., Leippe, M., Bloom, B., Ganz, T. and Modlin, R. 2000. Granulysin, a T cell product, kills bacteria by altering membrane permeability. *J Immunol.* 165: 7102-7108.

16. Grzybowski, S., Barnett, G. and Styblo, K. 1975. Contacts of cases of active pulmonary tuberculosis. *Bull.Int.Union Tuberc.* 50: 90-106.

17. Loudon, R., Bumgarner, L., Lacy, J. and Coffman, G. 1969. Aerial transmission of mycobacteria. *Am Rev Respir Dis* 100: 165.

18. Sepkowitz, K. 1996. How contagious is tuberculosis? *Clin Infect Dis* 23: 954.

19. Saunders, B. and Cooper, M. 2000. Restraining mycobacteria: role of granulomas in mycobacterial infections. *Immunol Cell Biol* 78:334.

20. Tufariello, J. and Flynn J. 2003. Latent tuberculosis: mechanisms of host and bacillus that contribute to persistent infection. *Lancet.* 3: 578-90.

21. Means, T., Wang, S., Lien, E., Yoshimura, A., Golenbock, D. and Fenton, M. 1999. Human Toll-like receptors mediate cellular activation by *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol.* 163: 3920 – 29.
22. Flynn, J. and Chan, J. 2001. Immunology of tuberculosis. *Annu Rev Immunol.* 19: 93-129.
23. Chee, C., Teleman, M., Boudville, I., Do, S. and Wang, Y. 2004. Treatment of latent TB infection for close contacts as a complementary TB control strategy in Singapore. *Int J Tuberc Lung Dis.* 8: 226-31.
24. Mohan, V., Scanga, C., Yu, K., Scout, H., Tanaka, K., Tsang, E., Flynn, J. and Chan, J. 2001. Effects of tumor necrosis factor alpha on host immune response in chronic persistent tuberculosis: possible role for limiting pathology. *Infect Immun.* 69: 1847-1855.
25. North, R. and Yu-Jin, J. 2004. Immunity to Tuberculosis. *Ann. Rev. Immunol.* 22: 599-623.
26. Giacomini, E., Iona, E., Ferroni, L., Miettinen, M., Fattorini, L., Orefici, G., Julkunen, I. and Coccia, I. 2001. Infection of human macrophages and dendritic cells with *Mycobacterium tuberculosis* induces a differential cytokine gene expression that modulates T cell response. *J. Immunol.* 166: 7033-7041.
27. Harty, J. and Bevan, M. 1999. Responses of CD8+ T cells to intracellular bacteria. *Current Opinion Immunology.* 11: 89 – 93.
28. Stenger, S., Rosat, J., Bloom, B., Krensky, A. and Modlin, R. 1999. Granulysin: a lethal weapon of cytolytic T cell. *Immunol Today.* 20: 390 – 394.
29. Tan, J., Canaday, D., Boom, W., Balaji, K., Schwander, S. and Rich, E. 1997. Human alveolar T lymphocyte responses to *Mycobacterium tuberculosis* antigens: role for CD4+ and CD8+ cytotoxic T cells and relative resistance of alveolar macrophages to lysis. *J. Immunol.* 159: 290-297.

30. Ladel, C. H., S. Daugelat, and S. H. Kaufmann. 1995. Immune response to *Mycobacterium bovis* bacille Calmette Guerin infection in major histocompatibility complex class I- and II-deficient knock-out mice: contribution of CD4 and CD8 T cells to acquired resistance. *Eur.J.Immunol.* 25:377-384.
31. Behar, S., Dascher, C., Grusby, M., Wang, C. and Brenner, M. 1999. Susceptibility of mice deficient in CD1D or TAP1 to infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *J.Exp.Med.* 189: 1973-1980.
32. Lazarevic, V. and Flynn, J. 2002. CD8+ T Cells in Tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 166: 1116 – 1121.
33. Lewinsohn, D., Zhu, M. and Madison, V. 2001. Classically restricted human CD8+ T lymphocytes derived from *Mycobacterium tuberculosis*-infected cells: definition of antigen specificity. *J Immunol*; 166: 439-446.
34. Lewinsohn, D., Briden, A., Reed, S., Grabstein, K. and Alderson, M. 2000. *Mycobacterium tuberculosis*-reactive CD8+ T lymphocytes: the relative contribution of classical versus nonclassical HLA restriction. *J Immunol.* 165: 925-930.
35. Scanga, C., Mohan, V., Joseph, H., Yu, K., Chan, J. and Flynn, J. 1999. Reactivation of latent tuberculosis: variations on the Cornell murine model. *Infect Immun.* 67: 4531-38.
36. Stepp, S., Mathew, E., Bennett, P., Saint Basiele, G. and Kumar, V. 2000. Perforin: more than just an effector molecule. *Immunology Today.* 21: 254 –256.
37. Oddo, M., Renno, T., Attinger, A., Bakker, T., MacDonald, H. and Meylan, P. 1998. Fas ligand- Induced apoptosis of infected human macrophages reduces the viability of intracellular *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Immunol.* 160: 5448-5454.
38. Flynn, J., Goldstein, M., Triebold, K., Koller, B. and Bloom, B. 1992. Major histocompatibility complex I-restricted T cells are required for resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Proc Natl Acad Sci.* 89: 12013-12017.

39. Caruso, A., Serbina, N., Klein, E., Triebold, K., Bloom, B. and Flynn, J. 1999. Mice deficient in CD4 T cells have only transiently diminished levels of INF- γ , yet succumb to tuberculosis. *J Immunol.* 162: 5407-16.
40. Ladel, C., Daugelat, S. and Kaufmann, S. 1995. Immune response to *Mycobacterium bovis* bacille Calmette Guerin infection in major histocompatibility complex class I- and II-deficient knock-out mice: contribution of CD4 and CD8 T cells to acquired resistance. *Eur.J.Immunol.* 25:377-384.
41. Jouanguy, E., Lamhamedi-Cherradi, F., Altare, M., Fondaneche, D., Tuerlinckx, S., Blanche, J., Emile, F., Gaillard, J., Schreiber, R., Levin, M., Fischer, A., Hivroz, C. and Casanova, J. 1997. Partial interferon-gamma receptor 1 deficiency in a child with tuberculoid bacillus Calmette-Guerin infection and a sibling with clinical tuberculosis. *J.Clin.Invest* 100: 2658-2664.
42. Jouanguy, E., Altare, S., Lamhamedi-Cherradi and Casanova, J.. 1997. Infections in IFNGR-1-deficient children. *J.Interferon Cytokine Res.* 17: 583-587.
43. MacMiking, J., North, R., La Course, R., Mudgett, J., Shah, S. and Nathan, C. 1997. Identification of nitric oxide synthase as a protective locus against tuberculosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94: 5243 – 5248.
44. Scanga, C., Mohan, V., Tanaka, K., Alland, D., and Flynn, J. 2001. The NOS2 locus confers protection in mice against aerogenic challenge of both clinical and laboratory strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun.* 69: 7711 – 7717.
45. Nozaki, Y., Hasegawa, Y., Ichiyama, S. and Shimokata, K. 1997. Mechanism of nitric oxide-dependent killing of *Mycobacterium bovis* BCG in human alveolar macrophages. *Infect Immun.* 65: 3644-47.
46. Wang, C. Liu, C., Lin, C., Chung, K. and Kuo, H. 1998. Increased exhaled nitric oxide in active pulmonary tuberculosis due to inducible NO synthase upregulation in alveolar macrophages. *Eur. Respir. J.* 11: 809 – 815.
47. Rich, E., Torres, M., Sada, E., Finegan, K., Hamilton, B. and Toossi, Z. 1997. *Mycobacterium tuberculosis* (MTB)-stimulated production of nitric oxide by human

alveolar macrophages and relationship of nitric oxide production to growth inhibition of MTB. *Tuber.Lung Dis.* 78: 247-255.

48. Zwillig B., Kuhn D., Wikoff L., Brown D. and Lafuse W. 1999. Role of iron in Nramp1- mediated inhibition of Mycobacterial growth. *Infect. Immun* 67: 1386-1392.

49. Chan, E., Chan, and Schluger, N. 2001. What is the role of nitric oxide in murine and human host defense against tuberculosis?. Current knowledge. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 25: 606-612.

50. Schwander, S., Torres, M., Sada, E., Carranza, C., Ramos, E., Tary-Lehmann, M., Wallis, R., Sierra, J. and Rich, E. 1998. Enhanced responses to *Mycobacterium tuberculosis* antigens by human alveolar lymphocytes during active pulmonary tuberculosis. *J.Infect.Dis.* 178: 1434-1445.

51. Hirsch, C., Ellner, J., Russell, D. and Rich, E. 1994. Complement receptor-mediated uptake and tumor necrosis factor-alpha- mediated growth inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* by human alveolar macrophages. *J.Immunol.* 152: 743-753.

52. Cooper, A., Dalton, D., Stewart, T., Griffin, J., Russell, D. and Orme. I. 1993. Disseminated tuberculosis in interferon gamma gene-disrupted mice. *J.Exp.Med.* 178: 2243-2247.

53. Flynn, J., Chan, J., Triebold, K., Dalton, D., Stewart, T. and Bloom, B. 1993. An essential role for IFN - γ in resistance to *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Exp. Med.* 178: 2249-2251.

54. Pathan, A., Wilkinson, K., Wilkinson, R., Latif, M., McShane, H., Pasvol, G., Hill, A. and Lalvani, A. 2000. High frequencies of circulating IFN-gamma-secreting CD8 cytotoxic T cells specific for a novel MHC class I-restricted *Mycobacterium tuberculosis* epitope in M. tuberculosis-infected subjects without disease. *Eur.J.Immunol.* 30: 2713-2721.

55. DeMaio. 1996. A stationary-phase stress-response σ factor from M. tuberculosis. *Proc Natl Acad Sci.* 93: 2790-2794.

56. Chan, J., Fan, X., Hunter, S., Brennan, P. and Bloom, B. 1991. Lipoarabinomannan, a possible virulence factor involved in persistence of *Mycobacterium tuberculosis* within macrophages. *Infect Immun.* 59: 1755-1761.
57. Noss, E., Pai, R. and Sellati, T. 2001. Toll-like receptor 2-dependent inhibition of macrophages class II MHC expression and antigen processing by 19-kDa lipoprotein of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol.* 167: 910-918.
58. Hoal-van, E., Hon, D., Lewis, L., Beyers, N., and Helden, P. 2001. Mycobacterial growth in human macrophages; variation according to donor, inoculum and bacterial strain. *Cell Biol Int.* 25: 71-81.
59. Silver R., Li Q., Boom H., Ellner J. 1998. Lymphocyte-dependent inhibition of growth of virulent *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv within human monocytes : Derivative-Positive, but not in purified protein derivative-negative subjects. *J. Immunol* 160 : 2408-2417.
60. Canaday, D., Wilkinson, R., Li, Q., Harding, C., Silver, R, and Boom, W. 2001. CD4(+) and CD8(+) T cells kill intracellular *Mycobacterium tuberculosis* by a perforin and Fas/Fas ligand-independent mechanism. *J.Immunol.* 167: 2734-2742.
61. Silver, R., Li, Q., Boom, W. and Ellner, J. 1998. Lymphocyte-dependent inhibition of growth of virulent *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv within human monocytes: requirement for CD4+ T cells in purified protein derivative-positive, but not in purified protein derivative-negative subjects. *J.Immunol.* 160: 2408-2417.
62. Zhang, M., Gong, J., Lin, Y. and Barnes, P. 1998. Growth of virulent and avirulent *Mycobacterium tuberculosis* strains in human macrophages. *Infect.Immun.* 66:794-799.
63. Lewinsohn, D., Bement, T., Xu, J., Lynch, D., Grabstein, K., Reed, S. and Alderson, M. 1998. Human purified protein derivative-specific CD4+ T cells use both CD95-dependent and CD95-independent cytolytic mechanisms. *J Immunol.* 160: 2374-2379.
64. Smith, S., Klein, M., Malin, A., Sillah, J., Huygen, K., Andersen, P., McAdam, K. and Dockrell, H. 2000. Human CD8(+) T cells specific for *Mycobacterium tuberculosis*

secreted antigens in tuberculosis patients and healthy BCG-vaccinated controls in The Gambia. *Infect.Immun.* 68: 7144-7148.

65. Canaday, D., Ziebold, C., Noss, E., Chervenak, K., Harding, C. and Boom, W. 1999. Activation of human CD8⁺ alpha beta TCR⁺ cells by *Mycobacterium tuberculosis* via an alternate class I MHC antigen-processing pathway. *J.Immunol.* 162: 372-379.

66. Toossi, Z., Mayanja- Kizza, H., Kanost, A., Edmonds, K., McHugh, M. and Hirsch, C. 2004. Protective responses in Tuberculosis: Induction of Genes for Interferon - γ and Cytotoxicity by *Mycobacterium tuberculosis* and During Human Tuberculosis. *Scandinavian Journal of Immunology.* 60: 299-306 .

67. Hoft, D., Shewangizaw, W., Kampmann, B., Whalen, C., Ellner, J., Hirsch, C., Brown, R., Larkin, R., Li, Q., Yun, H. and Silver, R. 2002. Investigation of the Relationships between Immune-Mediated Inhibition of Mycobacterial Growth and Other Potential Surrogate Markers of Protective *Mycobacterium tuberculosis* Immunity. *The Journal of Infectious Diseases.* 186:1448–57

68. Brill, K., Qing, L., Larkin, R., Canaday, D., Kaplan, D., Boom, H. and Silver, R. 2001. Human Natural Killer Cells Mediated Killing of Intracellular *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv via Granule-Independent Mechanisms. *Infect Immun.* 69: 1755-67.

69. Nagabhushanam, V., Ting, M., Escaron, C., Zhang, J. and Ernst, J. 2003. Innate Inhibition of Adaptive Immunity: *Mycobacterium tuberculosis*-Induced IL-6 Inhibits Macrophage Responses to IFN-gamma. *J Immunol* 171: 4750-4757.

70. Kincaid, E. and Ernst, J. 2003. *Mycobacterium tuberculosis* exerts gene-selective inhibition of transcriptional responses to IFN-gamma without inhibiting STAT1 function. *J.Immunol.* 171: 2042-2049.

71. Gehring, A., Rojas, R., Canaday, D., Lakey, D., Harding, C. and Boom, W. 2003. The *Mycobacterium tuberculosis* 19-kilodalton lipoprotein inhibits gamma interferon-regulated HLA-DR and Fc gamma R1 on human macrophages through Toll-like receptor 2. *Infect.Immun.* 71: 4487-4497.

72. Nicholson, S., Bonecini-Almeida, M., Lapa e Silva, J., Nathan, C., Xie, Q., Mumford, R., Weidner, J., Calaycay, J., Geng, J. and Boechat, N. 1996. Inducible nitric oxide synthase in pulmonary alveolar macrophages from patients with tuberculosis. *J.Exp.Med.* 183: 2293-2302.
73. Aston, C., Rom, W., Talbot, A. and Joan Reibman. 1998. Early Inhibition of Micobacterial Growth by Human Alveolar Macrophages is not Due to Nitric Oxide. *Am J Respir Crit Care Med.* 157: 1943 – 1950.
74. Kim, H., Kim, J., Park, J., Shuh, G., Chung, M., Kwon, O., Rhee, C. and Han, Y. 1997. Difference of nitric oxide production in peripheral blood mononuclear cells and airway epithelial cells between healthy volunteer and patients with tuberculosis. *Tubercul. Respir . Dis.* 44: 72.
75. Grode, L., Seiler, P., Baumann, S., Hess, J., Brinkmann, V., Nasser, A., Mann, P., Goosmann, C., Bandermann, S., Smith, D., Brancroft, G., Reyrat, J., Soolingen, D., Raupach, B. and Kaufmann, S. 2005. Increased vaccine efficacy against tuberculosis of recombinant *Mycobacterium bovis* bacilli Calmette-Guérin mutants that secrete listeriolysin. *J Clin Invest.* 10: 1-8.

12. Apéndice.

Buffer de Iisis.

Disolver:

600 mg de Bicarbonato de sodio (NaHCO_3) 0.01 M

4.15 g de Cloruro de amonio (NH_4Cl) 0.1 M

18.5 mg de EDTA 0.1 mM en 500 mL de agua estéril

Filtrar en membrana de 0.22 μm , guardar a 4°C.

Buffer de Miltenyi.

Disolver en PBS:

0.5% de Albúmina (BSA)

y 2 mM EDTA

Filtrar en membrana de 0.22 μm , guardar a 4°C.

Reactivo de Griess.

Mezclar en partes iguales al momento de usar:

Sulfanilamida al 1% en Acido Clorhídrico (HCl) 1N

N-1 – Naftiletilendiamina al 0.1% en H_2O

Preparación de 7H9.

Disolver en 400 mL de agua destilada:

1.88 g de 7H9 (polvo)

Esterilizar por 15 min a 121°C

Enfriar a 50°C aproximadamente

Agregar 1.6 mL de glicerol y 40 ml de ADC.

Filtrar en membrana de 0.22 μm , guardar a 4°C.

Preparación de Agar 7H10.

Disolver en 497 mL de agua destilada:

11.4 g de 7H10 (Agar)

2.5 g de Asparagina

Esterilizar por 15 min a 121°C

Enfriar a 50°C aproximadamente.

Mezclar 6 mL de glicerol y 60 ml de OADC y filtrar en membrana de 0.22 µm.

En campana de flujo laminar agregar al medio esta mezcla y vaciar en placas Petri (Falcon de 60 mm) 10 mL del medio 7H10. Dejar enfriar a TR y colocar en estufa a 37°C de 24 a 48H como control. Guardar a 4°C.

Tinción de Ziehl Neelsen.

Las células fijadas se cubren con Carbol – fushina por 5 min.

Lavar de 3 a 4 veces con etanol al 70%.

Lavar de 3 a 4 veces con solución alcohol –ácido (Etanol al 3% de HCl).

Lavar de 3 a 4 veces con agua.

Adicionar Azul de metileno cubriendo la superficie de las células 2 min.

Lavar de 3 a 4 veces con agua.

Dejar secar a TR.

Contar las bacterias con microscopio óptico a 100X.

Tinción de Wright.

(Morfología celular)

Fijar las células con metanol 30 segundos.

Enjuagar con agua destilada

Agregar colorante de Wright 1 min

Agregar agua durante 3 min

Enjuagar y secar.

Tinción de Peroxidasa.

(Monocitos, Polimorfonucleares, morfología inmadura).

Fijar con solución metanol : acetona (1:1) 30 segundos.

Enjuagar con agua destilada.

Dejar secar la muestra.

Agregar mieloperoxidasa de 6 a 8 min.

Enjuagar con agua y secar.

Buffer de sustratos para ELISA

En 882 mL de agua desionizada agregar:

18 mL de Dietanolamina.

Ajustar el pH a 9.6

Guardar a 4°C.