



# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLÁN

“Análisis del flujo de las poblaciones de linfocitos T CD4, CD8  
y gamma delta en parénquima pulmonar murino durante la  
infección con *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv y la mutante  
fadD26”

**E I P R O Y E C T O D E I N V E S T I G A C I Ó N**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

P R E S E N T A:

**LUIS DONIS MATURANO**

DIRECTOR: DR. MARCO ANTONIO VEGA LÓPEZ

CUAUTITLÁN IZCALLI, EDO. DE MÉXICO 2006



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN  
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

U. N. A. M.  
FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES CUAUTITLAN  
ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS



DRA. SUEMI RODRIGUEZ ROMO  
DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLAN  
P R E S E N T E

AT'N: Q. Ma. del Carmen García Mijares  
Jefa del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 26 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos:

El proyecto de investigación: "Análisis del flujo de las poblaciones de linfocitos T CD4, CD8 y gamma delta en parénquima pulmonar murino durante la infección con Mycobacterium tuberculosis H37Rv y la mutante fadD26".

que presenta el pasante: Luis Donis Maturano  
con número de cuenta: 40001043-8 para obtener el TITULO de:  
Químico Farmacéutico Biólogo

Considerando que dicha trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO

A T E N T A M E N T E.  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 28 de Febrero de 2006

PRESIDENTE Dr. Marco Antonio Vega López

VOCAL Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo

SECRETARIO Dr. Victor M. Zendejas Buitrón

PRIMER SUPLENTE MVZ. Angel Germán Martínez Sosa

SEGUNDO SUPLENTE QFB. Guadalupe Avilés Robles

**El hombre encuentra a Dios  
detrás de cada puerta que la  
ciencia logra abrir**

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis tutores el Dr. Leopoldo Flores Romo y la Dra. Iris Estrada García por confiar en mi trabajo y tener la paciencia de soportar a un obstinado aprendiz, así como, de sus sabios consejos para lograr mis objetivos propuestos en el ambiente profesional como personal.

Por su interés mostrado en la revisión del escrito, así como sus comentarios para enriquecer el proyecto de investigación; Dr. Marco Antonio Vega López, Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo, Dr. Victor Manuel Zendejas Buitrón, MVZ. Angel Germán Martínez Sosa y la QFB. Guadalupe Avilés Robles.

Al Dr. Alexander Pedroza González, Dra. Gina Estela García Romo, M. en C. Héctor Romero Ramírez, M. en C. Víctor Hugo Rosales García, Dr. Alberto Yairh Limón Flores, M. en C. Miguel Becerril García y la Q.B.P. Juana Calderón Amador, por mostrarme las herramientas básicas para elaborar verdaderos proyectos con calidad.

A mis amigos de la generación "QFB 27" por compartir momentos de alegría, diversión y de arduo trabajo, esperando no omitir alguno de ellos: Araceli, Jonathan, Carolina, Edmundo, Alicia, Eduardo, Ricardo, Martha, Julio, Maritere, Patricia, Azucena, Yaneth, Cecilia, Gabriel, Beatriz y Maritza.

A mis compañeros de laboratorio por enseñarme que en el ambiente de trabajo se puede trabajar con seriedad y disfrutando de todo cuanto que se realiza; Arturo, Jay, Selene, Adriana, Liz, Yolanda y Aarón.

A la Facultad y profesores de la misma, por su valiosa contribución en la formación académica recibida.

A todas las personas que de alguna manera me ayudaron, GRACIAS.

## DEDICATORIAS

**A MIS PADRES (Adriana y Alejandro):** Con todo mi cariño, respeto y admiración, por darme la mas grande herencia que han sido mis estudios, ayudándome a concluir una mas de mis metas. Y conjuntamente por mostrarme que los problemas son realmente un elemento mas, para aprender.

**A MIS HERMANOS (Alejandro y Guadalupe):** Por enseñarme que la vida presenta diversos caminos para alcanzar el éxito. Así mismo, por preocuparse de mi salud y todo cuanto comprende a mi trabajo.

**A MI TIO (Raúl †):** A quien me ha dejado un extenso camino por continuar y de quien acuñara, una frase tan indudable: “El atreverse sigue siendo la mejor manera de alcanzar el éxito”. A ti, mi mas grande admiración esperando me guíes en este duro camino y anhelando volver a verte.

**A TI:** Por estar fielmente a mi lado compartiendo éxitos y derrotas, a pesar de soportar los escasos pero excelentes momentos de alegría, cariño y amistad.

# ÍNDICE

## Abreviaturas

1.0	Introducción	1
2.0	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	3
2.1	Mutante en fadD26	4
3.0	Patogénesis de tuberculosis	5
4.0	Respuesta inmune ante tuberculosis	6
4.1	Linfocitos T y producción de citocinas	7
4.2	Evasión de la respuesta inmune	8
5.0	Planteamiento del problema	9
6.0	Hipótesis	10
7.0	Objetivos	11
8.0	Estrategia experimental	12
8.1	Bacteria e infección	12
8.2	Obtención de células de parénquima pulmonar	12
8.3	Análisis fenotípico celular por citometría de flujo	13
8.4	Tinción de células con CFSE	13
8.5	Ensayo de proliferación linfocitaria	14
9.0	Referencias	16

## ABREVIATURAS

BAL	Lavado bronquio alveolar
BALT	Tejido linfoide asociado a bronquios
CD	<i>Cluster of Differentiation</i> (marcadores de diferenciación)
CD4	Marcador molecular para linfocitos T cooperadores
CD8	Marcador molecular para linfocitos T citotóxicos
CD25	Marcador de células activadas
CD69	Marcador de células activadas
CFSE	<i>5-Carboxifluorescein diacetate succimidyl ester</i>
CR	Receptor de complemento
CTLs	Células T citotóxicas
DIMs	Phthiocerol dimicocerosatos
FACS	<i>Fluorescent Activated Cell Sorter</i>
IL	Interleucina
INF- $\gamma$	Interferon gamma
LcT	Linfocito T
Lc $\gamma\delta$	Linfocitos gamma delta
MAb	Anticuerpo monoclonal
MALT	Tejido linfoide asociado a mucosas
MHC-II	Complejo principal de histocompatibilidad clase II
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
SSF	Solución salina fisiológica
TACO	<i>tryptophane aspartate-containing coat protein</i>
TB	Tuberculosis
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral alfa

## INTRODUCCIÓN

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecto-contagiosa, causada por la bacteria llamada *Mycobacterium tuberculosis* y se transmite del enfermo al sujeto sano por vía respiratoria (1).

Esta enfermedad es de tipo crónico y cuyo órgano blanco es principalmente al pulmón, aunque *M. tuberculosis* también puede afectar casi cualquier tejido u órgano, pero tales afecciones son generalmente el resultado de la diseminación de la infección pulmonar. La TB más frecuente es la pulmonar, puesto que es la forma infectante y de mayor importancia epidemiológica, sin embargo, existen otras como la meníngea y miliar que se previenen con la vacuna BCG en niños (1).

Anualmente la TB causa la muerte de alrededor de 3 millones de personas al año y ocurren cerca de 8 millones de nuevos casos, considerando que una persona con tuberculosis que no recibe tratamiento puede infectar de 10 a 15 personas al año. Así desde 1993, debido a que la tuberculosis se ha asociado al VIH/SIDA y la aparición de cepas de *M. tuberculosis* resistentes a los medicamentos, se consideró por la Organización Mundial de la Salud una emergencia a nivel mundial (2).

Se estima que una tercera parte de la población mundial está infectada con Mtb pero, generalmente, la infección no conduce a una enfermedad activa, existiendo de esta forma la posibilidad de varios resultados posibles para las personas que tienen un encuentro con Mtb. Primero, los bacilos pueden ser destruidos inmediatamente por las respuestas innatas del hospedero. Segundo, aproximadamente el 10% de las personas que se infectan desarrollan TB activa dentro de un marco de tiempo de 1 a 3 años. En este grupo, es probable que se pierda la capacidad tanto de controlar la infección inicial como de desarrollar una respuesta protectora para prevenir la enfermedad. Finalmente, la mayoría de las personas infectadas con Mtb tienen una infección clínicamente latente; esto es,

están infectadas y son positivas para el derivado proteico purificado (PPD) pero no presentan síntomas ni infectan a otras personas. Sin embargo, se sabe que del 5-10% aproximadamente de las personas infectadas que se encuentran en un periodo latente, pueden reactivar la infección de Mtb en respuesta a perturbaciones de la respuesta inmune, como el tratamiento con corticoesteroides, la edad, el abuso de alcohol y/o drogas, y la infección con el VIH (2).

## 2.0 *Mycobacterium tuberculosis*

La TB es causada por la bacteria *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), un bacilo ácido alcohol resistente de crecimiento lento, su tiempo de generación *in vitro* es de 10- 20 horas dependiendo de la naturaleza del medio de cultivo, las colonias aparecen a las 3-4 semanas de cultivo. Su temperatura óptima de crecimiento es de 33-39 °C. El tamaño de los bacilos es de 2-4 µm de largo y de 0.5 µm de diámetro. Es una bacteria intracelular facultativa y su pared celular es constituida de una membrana celular recubierta por una capa densa de peptidoglicano y arabinogalactanas (3-10 nm) en la cual se encuentran esterificados los ácidos micólicos. Asociados a la pared celular se encuentran lípidos libres, glicolípidos y proteínas (3,4).

El metabolismo lipídico de la micobacteria es de relevancia pues existen unos 250 genes de Mtb involucrados en éste, comparado con solamente 50 genes en *E. coli*. De esta forma *Mycobacterium tuberculosis*, posee muchos sistemas biosintéticos de policétidos y lípidos conocidos, de tal manera que produce una diversidad muy amplia de moléculas lipofílicas, que varían desde ácidos grasos simples (palmitato y tubérculoestearato) hasta moléculas altamente complejas de cadena muy larga (ácidos micólicos y fenolftioceroles) que a su vez pueden formar elementos más complejos. Una de las características más importantes de Mtb, y que comparte con otros miembros del género *Mycobacterium* es su pared celular, misma que contiene una capa adicional externa a la de péptidoglicanos, la cual es excepcionalmente rica en lípidos inusuales (glicolípidos y polisacáridos). Esta envoltura celular es de composición única debido a que más del 50% de su peso seco se constituye de ácidos micólicos, lo cual le confiere su resistencia a la tinción ácido-alcohólica. Además, la capacidad lipolítica de la bacteria es importante en su crecimiento *in vivo*, pues la variedad y cantidad de lípidos disponibles en las células que infecta es una fuente substancial de sustratos (4).

## 2.1 Mutante en fadD26

El producto del gen fadD26 es parecido a la acil-CoA sintasa, la cual es una enzima requerida para la biosíntesis de phthiocerol dimicocerosatos (DIMs). De esta forma, la mutante en fadD26 de *M. tuberculosis* es completamente desprovista de DIMs. Los DIMs son una de las seis familias con cadenas largas de ácidos grasos multi-metil-ramificados, localizados en la pared celular de *M. tuberculosis*. Esto juega un papel muy importante en la permeabilidad de la envoltura celular y patogenicidad, puesto que esta molécula protege a la micobacteria de los efectos tóxicos del óxido nítrico (NO), debido a que ha sido asociada con una pseudobicapa exterior que envuelve a la bacteria y a su vez esta unida a micolatos y otros lípidos (23, 24, 25).

### **3.0 Patogénesis de tuberculosis**

El bacilo se transmite a través del aire cuando una persona inhala pequeñas gotas (1-2 micrómetros) que contienen al bacilo (1-3 bacilos viables), generadas cuando una persona enferma tose o estornuda y capaces de iniciar la infección (5, 6).

La infección inicia al inhalar los bacilos y estos llegan hasta los alvéolos pulmonares, con la posibilidad de ser captados por los macrófagos alveolares donde generalmente se reproducirán dependiendo del estado de activación de la célula (7).

Si los macrófagos no destruyen al bacilo, éste se reproduce intracelularmente, eliminando al macrófago y liberando bacilos que son ingeridos por otros macrófagos. Conforme el proceso continúa, se forma una lesión primaria característica en el pulmón, es decir la formación de granulomas. Entre los días 5-7 se observan granulomas compuestos por macrófagos y células epitelioides inmaduras, al día 9 estas células epitelioides maduran y se observan después las células gigantes de Langhans (8).

En la mayoría de las personas infectadas la respuesta inmune celular mantiene al bacilo en estado latente. Sin embargo, bajo condiciones de inmunosupresión (que pueden ser temporales) el bacilo se multiplica y alcanza niveles elevados incontrolables, generándose la necrosis caseosa extensiva que provoca las lesiones cavitarias. Las lesiones se agrandan y el bacilo entra en los bronquios y puede así transmitirse (8).

En algunos animales resistentes, se sabe que la lesión es rodeada por macrófagos activados que matan a los bacilos que escapan del centro caseoso y la enfermedad es detenida. En animales susceptibles, la lesión es rodeada por macrófagos poco activados que pueden permitir el crecimiento de bacilos, con lo cual se diseminan incontrolablemente y eventualmente podrían matar al individuo (7).

#### 4.0 Respuesta inmune ante tuberculosis

La primera línea de defensa son los macrófagos alveolares que fagocitan a la bacteria. Los procesos involucrados en la fagocitosis incluyen la unión del bacilo al fagocito, la internalización y finalmente la inhibición del crecimiento bacteriano y su eliminación. La unión al fagocito es mediada por receptores de complemento CR1, CR3 y CR4, receptores de manosa (reconociendo manosa, fucosa y GlcNAc) y otros receptores, por ejemplo la unión al bacilo por la proteína surfactante que es reconocida por receptores en la superficie de los macrófagos (C1qRp y Calreticulina). Así mismo el receptor "scavenger" (carroñero) parece participar de forma importante en el proceso de adhesión del bacilo al macrófago. Los receptores tipo Toll participan en la activación de macrófagos al interactuar con diversas lipoproteínas de Mtb, induciendo la producción de IL-12, y TNF $\alpha$  (7, 8, 9, 10, 11).

Una vez que la bacteria es engullida hacia el fagosoma, puede ser eliminada por una variedad de mecanismos que incluyen la fusión del fagosoma con los lisosomas, la generación de intermediarios reactivos del oxígeno y del nitrógeno, en particular el óxido nítrico. En 1998 Stenger *et al* reportaron que las células T citotóxicas (CTLs), pueden matar directamente a *M. tuberculosis* por medio de la granulosa que altera la integridad de la membrana del bacilo, y que en combinación con la perforina disminuye la viabilidad del bacilo intracelular. Los mecanismos moleculares que median la entrada del bacilo están pobremente caracterizados, recientemente uno de los pocos trabajos en este campo, indica una participación importante del colesterol en la entrada de la bacteria a las células fagocíticas, formando cúmulos en los sitios de entrada del bacilo; por ejemplo si la membrana celular es privada de un 60-70% en su contenido de colesterol la entrada del bacilo disminuye hasta en un 85% (5, 13, 14).

## 4.1 Linfocitos T y producción de citocinas

La respuesta inmune contra *Mycobacterium tuberculosis* está mediada principalmente por células T productoras de interferón gamma (IFN $\gamma$ ) que es esencial para una inmunidad protectora. Los ratones deficientes en la producción de IFN $\gamma$  son altamente susceptibles a la enfermedad. Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> aceleran la formación del granuloma por medio de la producción de factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) e IFN $\gamma$ . El fenotipo de las células T está asociado al tipo de manifestaciones y al desarrollo de la enfermedad. Las células Th1, con elevados niveles de IFN $\gamma$  e IL-2, se asocian con tuberculosis clínica y radiológicamente limitada, mientras que los pacientes con tuberculosis severa de rápido avance no presentan respuesta de tipo Th1. El tipo de respuesta parece estar afectado por el haplotipo de las moléculas clase II del complejo principal de histocompatibilidad (MHC-II). Estudios en ratones con haplotipo H-2<sup>b</sup> la respuesta que se genera es de tipo Th1, mientras que en ratones BALB/c (H-2<sup>d</sup>) la respuesta Th1 es menor y parcialmente inclinada a Th2. De las subpoblaciones de linfocitos T, los LcT CD8<sup>+</sup> aunque participan en la respuesta parecen no ser esenciales como los LcT CD4<sup>+</sup> para el control de la misma, así mismo, los ratones deficientes en moléculas MHC-II, IFN- $\gamma$  o en la enzima óxido nítrico sintetasa (iNOS), son muy susceptibles a la infección con *M. tuberculosis*, mientras que los ratones deficientes en MHC-I o en linfocitos T  $\gamma\delta$  solo tienen un ligero aumento en la susceptibilidad a la infección. Otra citocina esencial para la generación de la respuesta protectora, al inducir la expresión de IFN- $\gamma$  y la activación de linfocitos específicos de antígeno capaces de crear un granuloma protector, es la IL-12 producida en células presentadoras de antígeno (células dendríticas y macrófagos) (5, 15, 16, 17, 18).

## 4.2 Evasión de la respuesta inmune

El establecimiento de la micobacteria requiere de la evasión y abatimiento de varios de los mecanismos de defensa que actúan en la eliminación del patógeno. Los macrófagos infectados con Mtb son poco eficientes en estimular tanto la proliferación de los LcT CD4<sup>+</sup> específicos contra la micobacteria como la producción de citocinas por estas células. Por otro lado el colesterol participa en la asociación de una proteína denominada TACO (tryptophane aspartate-containing coat protein), que forma parte de la cubierta del fagosoma que normalmente es liberada antes de la fusión con los lisosomas. Los fagosomas que contienen micobacterias vivas que penetraron por los dominios ricos en colesterol retienen la proteína TACO, previniendo así la fusión con los lisosomas y permitiendo que la micobacteria sobreviva dentro de los macrófagos. Otro mecanismo por el cual *M. tuberculosis* elude la acción microbicida del fagolisosoma es el escape del bacilo hacia vesículas no fusionadas o hacia el citoplasma. La actividad citotóxica de los macrófagos depende del óxido nítrico, de la acidificación del fagosoma y de enzimas lisosomales; las micobacterias virulentas previenen la acidificación del fagosoma a través de la exclusión vesicular de la enzima protón – ATPasa (13, 19, 20, 21).

## 5.0 Planteamiento del problema

Para el control eficiente de la tuberculosis es necesario desarrollar una adecuada respuesta celular dependiente de células T. La generación de dicha respuesta muy probablemente depende de las interacciones del bacilo con las células del sistema inmune.

A la fecha existen pocos estudios sobre la cantidad y el estado de activación de LcT (CD4+, CD8+ y  $\gamma\delta$ +) en el pulmón durante el proceso infeccioso de tuberculosis *in vivo*, así mismo se desconocen los factores que determinan la susceptibilidad o resistencia de un individuo a la enfermedad y probablemente estos factores pueden estar relacionadas con el fenotipo de estas poblaciones de linfocitos T.

Por lo tanto el uso de micobacterias mutantes en lípidos podría reflejar la importancia que tienen los lípidos sobre la patogenicidad de este microorganismo, siendo necesario un análisis cuantitativo de las poblaciones de LcT (CD4+, CD8+ y  $\gamma\delta$ +) y su estado de activación, en vías aéreas durante el transcurso de la infección por *M. tuberculosis* y la mutante en lípidos (dimicocerosatos ftioceroles) con un modelo animal que permita utilizar la vía natural de entrada del bacilo.

## 6.0 Hipótesis

- Dado que la mutación en *fadD26* (mutante en lípidos “phtiocerol dimicocerosatos”) influye en la infección de la tuberculosis, existe la posibilidad de que se presenten diferencias en el porcentajes, número de células y estado de activación en LcT (CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> y  $\gamma\delta$ <sup>+</sup>) del parénquima pulmonar, entre ratones sanos, ratones infectados con la cepa H37Rv (Wild type) y los inoculados con la cepa *fadD26* (mutante).

## 7.0 Objetivos

### Objetivo general

- Analizar el porcentaje y los valores absolutos de las poblaciones de LcT CD4+, CD8+ y  $\gamma\delta$ + en el parénquima pulmonar bajo el modelo murino de TB pulmonar utilizando micobacterias virulentas (H37Rv) y la mutante en lípidos (fadD26).

### Objetivos particulares

- Analizar los cambios durante la infección con H37Rv y fadD26 en las poblaciones de LcT CD4+, CD8+ y  $\gamma\delta$ + en el parénquima pulmonar de ratones infectados a los días 1, 3, 7, 14, 21, 28, 60 y 90 por la técnica de citometría de flujo.
- Determinar el estado de activación a través de la cuantificación del marcador CD69 en las subpoblaciones linfocitarias a lo largo del proceso infeccioso.
- Dependiendo de los resultados anteriores analizar la capacidad de respuesta de los LcT CD4+, CD8+ y  $\gamma\delta$ + pulmonares en ratones infectados con la cepa H37Rv y la cepa mutante en fadD26, por medio de ensayos de proliferación celular *in vitro* con CSFE.

## **8.0 Estrategia experimental**

Se utilizará el modelo experimental de tuberculosis murina implementado por el Dr. Rogelio Hernández Pando, en el cual se utilizarán ratones inoculados intra-traquealmente con una cepa virulenta de *Mycobacterium tuberculosis* (H37Rv) y una mutante en dimicocerosatos ftioceroles (fadD26), tomando muestras de pulmón durante los primeros días de la infección (días 1, 3, 7, 14 y 21), así como en etapas crónicas (días 28, 60 y 90).

### **8.1 Bacteria e infección**

Se utilizará la cepa virulenta de *M. tuberculosis* H37Rv y mutante fadD26 ajustando a  $10^7$  bacilos por mililitro en solución salina, y se almacenarán a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización. Para inducir la tuberculosis pulmonar experimental se utilizarán ratones BALB/c de 6-8 semanas de edad, anestesiándolos e inoculando  $1 \times 10^6$  bacilos en  $100\mu\text{l}$  de solución salina isotónica vía intra-traqueal con ayuda de una jeringa de insulina. Los animales controles serán sometidos al mismo procedimiento, pero inoculados con solución salina estéril libre de pirógenos.

### **8.2 Obtención de células de parénquima pulmonar**

Para la obtención de las suspensiones celulares primero se eliminarán las células de los espacios alveolares mediante un lavado bronquio-alveolar (BAL). Para obtener el BAL se realizará una incisión pequeña en la tráquea por donde se introduce una sonda de 1mm de diámetro y se introducirá lentamente por instilación 1 mL de medio RPMI 1640 o PBS, la solución de lavado se retirará lentamente para no dañar el tejido y recolectándola, esta operación se repetirá 5 veces para cada animal. Una vez retirado el BAL se eliminarán las células de sangre periférica por medio de la perfusión de 10mL de PBS en el ventrículo derecho del corazón, siguiendo la vía de la circulación menor, que va hacia los pulmones.

Los pulmones se retirarán cuidadosamente evitando tomar tejido bronquial, y se cortarán en pequeños pedazos que se digerirán con 1mg/mL colagenasa tipo II (Worthington Biochemical Corporation) y 2 U/mL de DNAsa I (GIBCO, BRL) por 1.5 horas a 37 °C con agitación constante. Al final de la digestión se homogenizará la suspensión con ayuda de una jeringa o pipeta Pasteur. Los restos celulares se removerán por filtración en malla de plástico (100 µm), los eritrocitos se eliminarán incubándolos 2-4 minutos a 4 °C con una solución de lisis ( 0.15 M NH<sub>4</sub>Cl, 1 mM KHCO<sub>3</sub>, 0.1 mM Na<sub>2</sub>EDTA). El conteo celular se realizará utilizando azul tripán para verificar la viabilidad celular.

### **8.3 Análisis fenotípico celular por citometría de flujo**

Las suspensiones celulares de pulmón serán utilizadas para evaluar las características de los linfocitos T. Los anticuerpos a utilizar serán: anti-CD4, anti-CD8, anti-γδ y anti CD69. Para cada marcador se incubarán al menos 1 X 10<sup>6</sup> células con 0.1 µg del anticuerpo monoclonal correspondiente por 45 minutos a 4 °C en 50 µL de solución amortiguadora de FACS (PBS/ albúmina sérica bovina al 0.1%/ azida sódica al 0.01%). Seguidos de dos lavados con solución amortiguadora de FACS y se fijarán con paraformaldehído al 1% para ser analizadas en un citómetro FACScan (Becton Dickinson). Todas las incubaciones se realizarán en la oscuridad.

### **8.4 Tinción de células con CFSE**

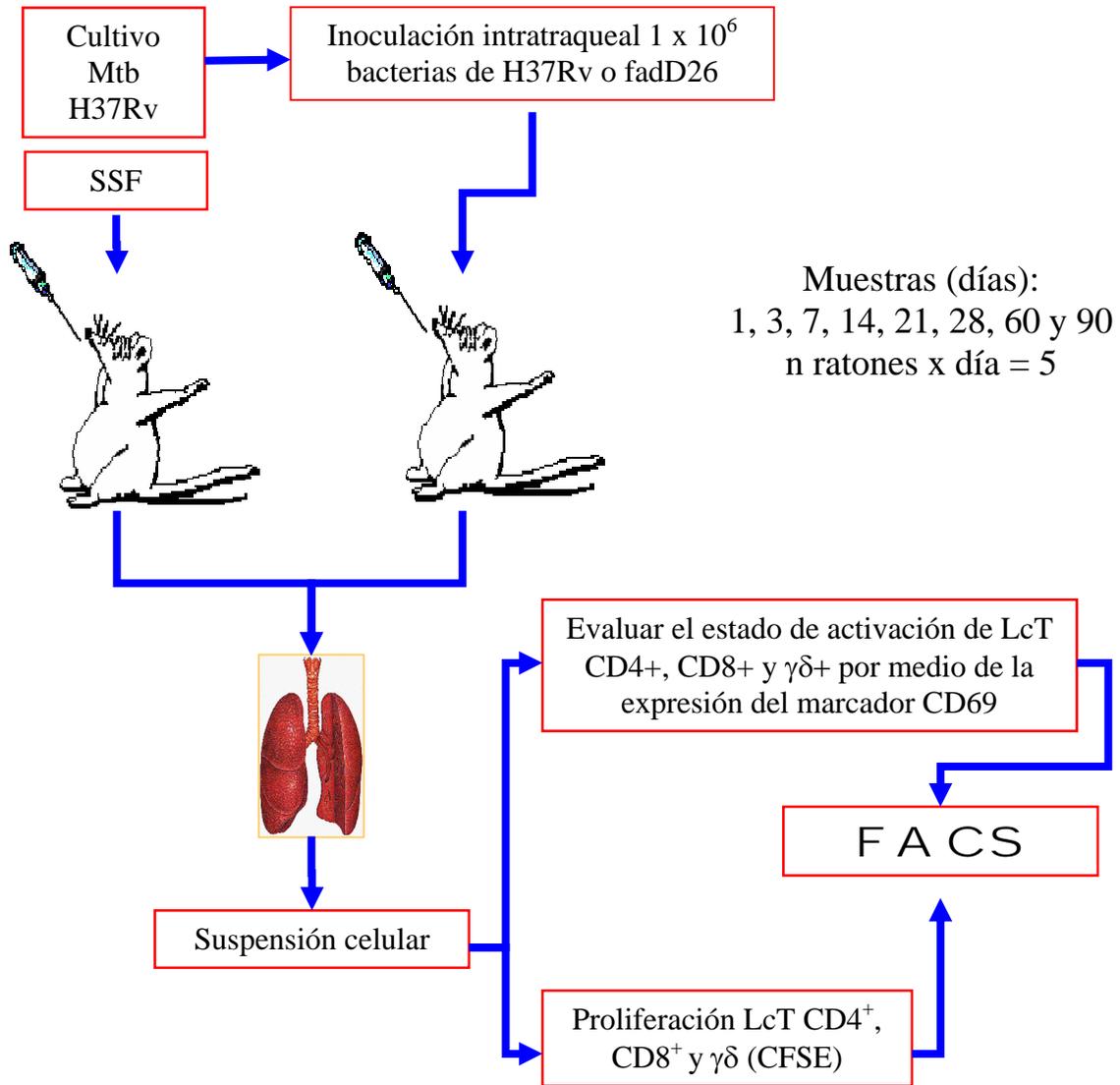
Se preparará una dilución 0.5 mM de CFSE (5-Carboxifluorescein diacetate succimidyl ester) en PBS justo antes de teñir las células. Las células a teñir serán lavadas con PBS para eliminar proteínas solubles que pudieran retener el colorante. La suspensión celular se ajustará a 50 X 10<sup>6</sup> células por mL en PBS o en medio RPMI sin suero, dejando a 37 °C y posteriormente se le adicionará de 10-20 µL de la dilución de CFSE por cada mililitro de suspensión celular. Serán incubadas durante 10 minutos a 37 °C, realizando una inversión del tubo cada 2 minutos para resuspender las células. Al finalizar el tiempo de tinción se agregará

un exceso de medio RPMI adicionado con 10 % de suero fetal bovino para bloquear la reacción de tinción. Por último las células se lavarán 3 veces con RPMI con 10% de suero fetal bovino.

### **8.5 Ensayo de proliferación linfocitaria**

Se utilizarán las células teñidas con CFSE provenientes de suspensiones pulmonares de animales inoculados con diferentes estímulos, incluyendo un grupo control inoculado con solución salina isotónica. El número de células se ajustará a  $3 \times 10^6$  por mL en medio de cultivo (RPMI 1640 adicionado con 2 mM de L-glutamina, 20 % Suero Fetal Bovino, 0.1 mM a.a. no esenciales, penicilina 100 U/mL y estreptomycinina 100  $\mu\text{g/mL}$  y 40  $\mu\text{g}$  de gentamicina). Se colocarán 3 mL de la suspensión celular por pozo en placa de cultivo de 12 pozos, e incubarán durante al menos 4 días a 37° C y 5 % de CO<sub>2</sub> con diferentes estímulos. El control negativo consistirá de células sólo en presencia de medio de cultivo, mientras el control positivo de proliferación serán células incubadas con concanavalina-A con una concentración de 5  $\mu\text{g/mL}$ . Al término del tiempo de incubación las células se recolectarán y se someterán a la tinción para citometría de flujo previamente descrita.

## Estrategia experimental



**Figura 1.** Diagrama general del procedimiento a seguir.

## 9.0 Referencias

1. WHO. (2000). Tuberculosis. *Fact Sheet*.
2. Flynn, J. and Chan, J. (2001). Tuberculosis: Latency and Reactivation. *Infection and immunity*. **69**, 4195–4201.
3. Youmans, G.; Paterson, P. and Sommers, H. (1975). *The biological and clinical basis of infectious diseases*. Saunders Company, USA.
4. Dye, C.; Scheele, S.; Dolin, P.; Pathania, V. and Raviglione, M. Global burden of tuberculosis. (1999). Estimated incidence, prevalence, and mortality by country. *JAMA* **282**, 677-686.
5. Schluger, N. and Rom, W. (1998). The host immune response to tuberculosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **157**, 679-691.
6. Andersen, P. (1997). Host response and antigens involved in protective immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *Scand. J. Immunol.* **45**, 115-131.
7. Arthur M. and Dannenberg, J. (1991). Delayed-type hypersensitivity and cell-mediated immunity in the pathogenesis of tuberculosis. *Immunol. Today* **12**, 228-233.
8. Schlesinger, L. (1993). Macrophages phagocytosis of virulent but no attenuated strains of *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by mannose receptors in addition to complement receptors. *J. Immunol.* **150**, 2920-2930.
9. Means, T.; Jones, B.; Schromm, A.; Shurtleff, B.; Smith, J.; Keane, J.; Golenbock, D.; Vogel, S. and Fenton, M. (2001). Differential effects of a Toll-like receptor antagonist on *Mycobacterium tuberculosis*-induced macrophages responses. *J. Immunol.* **166**, 4074-4082.
10. Underhill, D.; Ozinski, A.; Smith, K. and Aderem, A. (1999). Toll-like receptor-2 mediates mycobacteria-induced proinflammatory signaling in macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**, 14459-14463.
11. Brightbill, H.; Libraty, D.; Krutzik, S.; Yang, R.; Belisle, J.; Bleharski, J.; Maitland, M.; Norgard, M.; Plevy, S.; Smale, S.; Brennan, P.; Bloom, B.; Godowski, P. and Modlin, R. (1999). Host defense mechanisms triggered by microbial lipoproteins through Toll-like receptors. *Science* **285**, 732-736.

12. Stenger, S.; Hanson, D.; Teitelbaum, R.; Dewan, P.; Niazi, K.; Froelich, C.; Ganz, T.; Thoma-Uszynski, S.; Melian, A.; Bogdan, C.; Porcelli, S.; Bloom, B.; Krensky, A. and Modlin, R. (1998). An antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin. *Science* **282**, 121-125.
13. Gatfield, J. and Pieters, J. (2000). Essential role for cholesterol in entry of mycobacteria into macrophages. *Science* **288**, 1647-1650.
14. Barnes, P. and Witzel, B. (2000). Editorial: Type 1 cytokines and pathogenesis of tuberculosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **161**, 1773-1774.
15. Hansch, H.; Smith, D.; Mielke, M.; Hahn, H.; Bancroft, G. and Ehlers, S. (1996). Mechanisms of granuloma formation in murine *Mycobacterium avium* infection: the contribution of CD4<sup>+</sup> T cells. *Int. Immunol.* **8**, 1299-1310.
16. Huygen, K.; Abramowicz, D.; Vandebussche, P.; Jacobs, F.; De Bruyn, J.; Kentos, A.; Drowart, A.; Van Vooren, J. and Goldman, M. (1992). Spleen cell cytokine secretion in *Mycobacterium bovis* BCG-infected mice. *Infect. Immun.* **60**, 2880-2886.
17. Mogues, T.; Goodrich, M.; Ryan, L.; LaCourse, L. and North, R. (2001). The relative importance of T cell subsets in immunity and immunopathology of airborne *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. *J. Exp. Med.* **193**, 271-280.
18. Cooper, A.; Magram, J.; Ferrante, J. and Orme, I. (1997). Interleukin 12 (IL-12) is crucial to the development of protective immunity in mice intravenously infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Exp. Med.* **186**, 39-45.
19. Ferrari, G.; Langen, H.; Naito, M. and Pieters, J. (1999). A coat protein on phagosomes involved in the intracellular survival of mycobacteria. *Cell* **97**, 435-447.
20. McDonough, K.; Kress, Y. and Bloom, B. (1993). Pathogenesis of tuberculosis: Interaction of *Mycobacterium tuberculosis* with macrophages. *Infect. Immun.* **61**, 2763-2773.
21. Sturgill-Koszycki, S.; Schlesinger, P.; Chakraborty, P.; Haddix, P.; Collins, H.; Fok, A.; Allen, R.; Gluck, S.; Heuser, J. and Russell, D. (1994). Lack of

- acidification in *Mycobacterium* phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton-ATPase. *Science* **263**, 678-681.
22. Banchereau, J. and Steinman, R. (1998). Dendritic cells and the control of the immunity. *Nature* **392**, 245-252.
23. Daffè, M. and Lanèelle, M. (1998). Distribution of phthiocerol diester, phenolic mycosides and related compounds in mycobacteria. *J Gen Microbiol.* **134**, 2049–2055.
24. Camacho, L.; Constant, P.; Raynaud, C.; Lanèelle, M.; Triccas, J. and Gicquel, B. (2001). Analysis of the phthiocerol dimycocerosate locus of *Mycobacterium tuberculosis*. Evidence that this lipid is involved in the cell wall permeability. *J Biol Chem.* **276**, 19845–19854.
25. Rousseau, C.; Winter, N.; Pivert, E.; Bordat, Y.; Neyrolles, O.; Ave, P.; Huerre, M.; Gicquel, B. and Jackson, M. (2004). Production of phthiocerol dimycocerosates protects *Mycobacterium tuberculosis* from the cidal activity of reactive nitrogen intermediates produced by macrophages and modulates the early immune response to infection. *Cell Microbiol.* **6**, 277–287.