11201

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

E INVESTIGACION

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MEDICAS

Y NUTRICION "SALVADOR ZUBIRAN"

ANALISIS HISTOPATOLOGICO DE LA RESPUESTA INMUNOLOGICA EN UN MODELO MURINO DE TUBERCULOSIS PULMONAR CON SIMPATECTOMIA QUIMICA

FACULTAD DE MEDICINA

FEB. 22 2001

SECRETARIA DE SERVICIOS ESCOLARES

DEPARTAMENTO DE POSGRADO AMG

T E S I S

PARA OBTENER EL TITULO DE ESPECIALISTA EN

ANATOMIA PATOLOGICA

P R E S E N T A

DR. OLIVER SCHNEIDER EHRENBERG

INCMN SZ

MEXICO, D. F. FEB. 2001

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

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 AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MEDICAS Y NUTRICIÓN "SALVADOR ZUBIRÁN"
DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA

TESIS PARA OBTENER LA
ESPECIALIDAD EN ANATOMIA PATOLOGICA

ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO DE LA RESPUESTA INMUNOLÓGICA EN UN MODELO MURINO DE TUBERCULOSIS PULMONAR CON SIMPATECTOMIA QUÍMICA

TUTOR
DR. ROGELIO HERNÁNDEZ PANDO
Investigador Titular B
Departamento de Patología Experimental, INCMNSZ

PROFESOR TITULAR DEL CURSO
DR. ARTURO ÁNGELES
Jefe del Departamento de Patología, INCMNSZ

DR. OLIVER PAUL SCHNEIDER EHRENBERG
RESIDENTE DE PATOLOGIA

México, D. F., a 14 de febrero del 2001

Dr. Luis F. Uscanga Domínguez
Director de Enseñanza
P r e s e n t e

Por medio de este conducto comunico a Ud. que el Dr. **Oliver Paul Schneider Ehrenberg,** Médico Residente de 3er. año de Anatomía Patológica, ha concluido su Tesis titulada: Analisis histopatológico de la respuesta inmunulógica en un modelo murino de tuberculosis pulmonar con simpatectomía química, bajo la tutoría del Dr. Rogelio Hernández Pando.

Agradezco de antemano la atención a la presente y me despido de Ud con un cordial saludo.

A t e n t a m e n t e

Dr. Arturo Angeles Angeles
Profesor Titular del Curso
de Anatomía Patológica.

México, D. F., a 14 de febrero del 2001.

Dr. Hugo Aréchiga Urtuzuástegui
Jefe de la División de Estudios
de Posgrado e Investigación
Facultad de Medicina
Universidad Nacional Autónoma de México
P r e s e n t e

Me permito solicitar a ud. si para ello no hay inconveniente se autorice la realización de los trámites necesarios para que se le conceda el examen para obtener el reconocimiento universitario como Especialista en Anatomía Patológica al **Dr. Oliver Paul Schneider Ehrenberg** que tendrá lugar el día 20 de febrero del año en curso a las 11:00 hrs, en la sala de juntas de la Subdirección de Enseñanza del propio Instituto. Asimismo pongo a su consideración la integración del Jurado que examinará al Dr. Schneider:

Dr. Arturo Angeles Angeles Presidente	Dr. Edgardo Reyes Gutiérrez Secretario
Dr. Rogelio Hernández Pando Vocal	Dr. Javier Baquera Heredia Vocal
Dr. Julian Arista Nasr Vocal	Dra. Norma O. Uribe Uribe Suplente

Agradeciendo de antemano su atención, aprovecho la oportunidad para enviarle un cordial saludo.

A t e n t a m e n t e

Dr. Luis F. Uscanga Domínguez
Director de Enseñanza

Dr. Arturo Angeles Angeles
Profesor Titular del Curso
de Anatomía Patológica.

INCMNSZ
INSTITUTO NACIONAL
DE CIENCIAS MEDICAS Y NUTRICION
"DR. SALVADOR ZUBIRAN"
DIRECCION DE ENSEÑANZA

▪Vasco de Quiroga 15
▪Delegación Tlalpan
▪C.P.14000 México D.F
▪ Tels. 573-12-00
▪ 573-06-11

INDICE

RESUMEN

INTRODUCCIÓN

SITUACIÓN MUNDIAL ACTUAL DE LA TUBERCULOSIS
EL PROBLEMA DEL TRATAMIENTO PROLONGADO Y SU RELACIÓN CON LA PATOGENIA DE LA ENFERMEDAD

MECANISMOS INMUNOLÓGICOS QUE PARTICIPAN EN LA PROTECCIÓN Y DAÑO TISULAR EN TUBERCULOSIS

CARACTERIZACIÓN DE LAS ALTERACIONES INMUNOPATOLÓGICAS DE LA TUBERCULOSIS PULMONAR. EL MODELO EXPERIMENTAL

FACTORES QUE DESEQUILIBRAN LA RESPUESTA PROTECTORA EN TUBERCULOSIS

LA INFLUENCIA DEL SISTEMA NERVIOSO VEGETATIVO EN EL CONTROL DEL BALANCE DE CITOCINAS Th-1/Th-2

HIPÓTESIS

METODOLOGÍA

BACTERIAS Y ANTÍGENOS

MODELO EXPERIMENTAL

MORFOLÓGICA

PRUEBA DE SENSIBILIDAD

CROMATOGRAFÍA

ESTUDIO DE MANIPULACIÓN FARMACOLÓGICA

RESULTADOS

CROMATOGRAFÍA

PRUEBA DE SENSIBILIDAD

MORFOLÓGICA

ESTUDIO DE MANIPULACIÓN FARMACOLÓGICA

DISCUSIÓN

CONCLUSIONES

BIBILIOGRAFIA

RESUMEN

El sistema inmunológico siempre ha sido estudiado de forma aislada, hasta hace poco se vio que interactua con el sistema endocrino. El presente estudio trata de demostrar que el sistema nervioso y en particular la porción autónoma o vegetativa es la encargada de comunicarse con el sistema inmune.

El modelo experimental que utilizamos ya esta bien estudiado y tiene la ventaja de tratarse de uno donde la infección por tuberculosis (TB) es pulmonar. Se utiliza HPLC para determinar la cantidad de catecolaminas en pulmón, se encontro que la norepinefrina y la serotonina muestran cambios en su concentración dependiendo e la fase de tuberculosis que se encuentra.

Posteriormente realizamos una simpatectomia química con 6 hidroxidopamina (6OH) y analizamos morfometricamente la respuesta inflamatoria en los pulmones, encontrando diferencias entre los grupos. Se realizaron curvas de sobrevida. Se realizaron pruebas de hipersensibilidad cada día de sacrificio. Se pesaron los tres distintos grupos como control interno.

Los grupos consisten en: A)ratones con TB y 6OH; B)ratones con TB ; C)ratones sanos.

INTRODUCCIÓN

SITUACIÓN MUNDIAL ACTUAL DE LA TUBERCULOSIS. EL PROBLEMA DEL TRATAMIENTO PROLONGADO Y SU RELACIÓN CON LA PATOGENIA DE LA ENFERMEDAD.

La Organización Mundial de la Salud ha declarado a la tuberculosis como una emergencia mundial (1). Un tercio de la población mundial esta infectada y aunque solo el 5% de los sujetos infectados desarrollan la enfermedad activa durante los primeros dos años después de la infección, esto representa 8 millones de nuevos casos y tres millones de fallecimientos por año. La expectativa a futuro es preocupante, pues se ha calculado que para el año 2000 el número de nuevos casos será de 9 millones con aproximadamente 4 millones de defunciones por año. El problema es aun mayor en países en vías de desarrollo como el nuestro, puesto que el intervalo de edad mas afectado es el de los 30 a 50 años de edad, es decir durante la etapa mas productiva de la vida, esto contrasta con lo reportado en los países desarrollados, en donde el grupo de edad más afectado es después de los 60 años de edad.

Una razón importante del fracaso actual en el control de la tuberculosis es que aún con el mejor régimen de tratamiento con antibióticos, los medicamentos deben de administrarse por lo menos durante 6 meses, lo cual es un problema en países en desarrollo como México, puesto que además del alto costo que esto representa, debido a los pocos conocimientos médicos que habitualmente la población en general tiene, el tratamiento usualmente lo interrumpe el propio paciente semanas después de haberlo comenzado, como consecuencia del bienestar que el enfermo siente debido a la extensa destrucción de bacilos tuberculosos producida por los antibióticos durante los primeros días de su administración, la consecuencia de la interrupción del tratamiento es la recidiva de la enfermedad.

Existen dos razones interrelacionadas del porqué es necesario un largo tratamiento con antibióticos. La primera es que aunque la antibioticoterapia destruye durante los primeros días a una vasta cantidad de bacterias, quedan bacilos persistentes que supuestamente no metabolizan los medicamentos y por lo tanto no son destruidos por ellos (2). La otra razón de la necesidad del tratamiento prolongado es evitar la destrucción tisular característica de la tuberculosis conocida como el Fenómeno de Koch, el cual es en nuestra opinión, fundamental para entender la patogenia de la tuberculosis (2).

Roberto Koch observó que 4-6 semanas después del establecimiento de la infección en cobayos, la administración intradérmica de bacterias completas muertas por calor o antígenos obtenidos de filtrados de cultivo producían necrosis en el sitio de la inoculación y en los órganos en donde existieran lesiones tuberculosas (3). Un fenómeno similar se puede observar también en pacientes. En efecto, el sitio en donde se realiza la prueba de intradermoreacción (PPD) con frecuencia se necrosa en sujetos tuberculosos o que recientemente tuvieron tuberculosis, lo cual no se observa en sujetos sanos PPD positivos vacunados con BCG. El mismo Dr. Koch quiso explotar esta observación derivada de sus estudios en animales de experimentación, tratando enfermos tuberculosos con la inyección de grandes cantidades de antígenos de filtrados de cultivo, lo cual produjo necrosis en las lesiones tuberculosas. En el caso de la tuberculosis limitada a la piel (lupus vulgar), las lesiones se necrosaron, esfacelaron y cicatrizaron, por lo que el procedimiento fue realmente curativo, pero en el caso de las lesiones pulmonares u óseas en las que también se produjo extensa necrosis el resultado fue fatal, pues los pacientes sufrieron extenso daño tisular acompañado de fiebre y un cuadro parecido al choque endotóxico (4), debido a esto el tratamiento tuvo que abandonarse.

En la tuberculosis existe por lo tanto una respuesta de protección y control de la enfermedad y otra respuesta relacionada con la progresión y daño tisular (necrosis) que conduce eventualmente a la muerte. En consecuencia, uno de los objetivos fundamentales en la investigación sobre la patogenia de esta enfermedad es identificar los factores inmunológicos que caracterizan ambas respuestas. Una vez caracterizados se podría reemplazar a los factores lesivos por los protectores o potenciar a los últimos, de tal manera que se pudiera entonces diseñar tratamientos que coadyuvaran con la antibioticoterapia para hacer esta mas corta y eficiente. Es esta, en nuestra opinión, un abordaje sensato para el control de esta importante enfermedad infecciosa particularmente en países en desarrollo como el nuestro.

MECANISMOS INMUNOLÓGICOS QUE PARTICIPAN EN LA PROTECCIÓN Y DAÑO TISULAR EN TUBERCULOSIS.

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa crónica la cual afecta primariamente a los pulmones y produce alteraciones profundas y de larga evolución sobre el sistema inmunológico (5). Interacciones entre las varias poblaciones de células inmunocompetentes, particularmente linfocitos T y macrófagos, caracterizan a la respuesta inmunológica en contra de la tuberculosis como la clásica respuesta de inmunidad celular (5). Los macrófagos tienen un papel fundamental en este tipo de respuesta, puesto que son las células que fagocitan, destruyen y presentan antígenos a los linfocitos T. Receptores específicos en la membrana celular de los linfocitos T se unen a estos antígenos y responden produciendo citocinas, como el interferon gama (INF), el cual en conjunto con otras citocinas y moléculas micobacterianas inducen activación macrofágica (5). El macrófago activado es un elemento clave en la inmunidad antimicobacteriana, dado que destruyen a las bacterias y las células infectadas mas eficientemente. Además, el macrófago también regula la respuesta inmunológica a través de la secreción de citocinas específicas como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF), el cual en asociación con las citocinas producidas por los linfocitos T cooperadores de la clase 1 (Th-1) interleucina 2 (IL-2) e INF son esenciales en la protección contra el bacilo tuberculoso (6). Otra citocina macrofágica importante en tuberculosis es la interleucina 1 (IL-1), debido a que induce la secreción y expresión del receptor de IL-2 (7). Ademas, la IL-1 en sinergia con el TNF inducen la expresión de proteínas de fase aguda hepáticas (8), activan al eje hipotalamo-hipofisis-adrenal (9) e inducen la formación de granulomas los cuales son el elemento histopatológico distintivo de la tuberculosis.

En conclusión, el patrón de respuesta que se asocia a protección en tuberculosis es la respuesta o patrón de tipo 1, el cual esta representado por las citocinas INF e IL-2 producidas por los linfocitos Th-1 y las citocinas IL-1 y TNF, en conjunto con los linfocitos T CD8 citolíticos (2).

Diversos estudios realizados en humanos y en animales de experimentación han demostrado que en tuberculosis el balance de citocinas producidas por las células Th-1 (IL-2, INF) y las Th-2 (IL-4, IL-10) están relacionadas con la inmunopatogénesis de la tuberculosis (2). En efecto , las células Th-1 son protectoras por lo expuesto anteriormente, mientras que las Th-2 se relacionan con la progresión y cronicidad de la enfermedad, debido a que el patrón de citocinas que ellas producen desvían la respuesta hacia la inmunidad humoral y suprimen a la respuesta de inmunidad celular (2). Mas aun , el TNF que en asociación a IL-2 e INF es un factor crucial en protección, se convierte en un factor inductor de necrosis cuando se encuentra en un contexto de citocinas mixto Th-1+Th-2 con predominio de Th-2 (10), lo cual constituye aparentemente la base inmunopatogénica del fenómeno de Koch.

CARACTERIZACIÓN DE LAS ALTERACIONES INMUNOPATOLÓGICAS DE LA TUBERCULOSIS PULMONAR. EL MODELO EXPERIMENTAL.

En general, los modelos experimentales descritos han usado rutas no naturales de infección (intraperitoneal, intravenosa) y bacterias no virulentas. En consecuencia, los resultados obtenidos no necesariamente representan los eventos inmunopatológicos reales que se presentan durante el curso de la enfermedad. Por estos motivos y tomando en cuenta que la tuberculosis es una enfermedad primeramente pulmonar, hemos diseñado un modelo experimental de tuberculosis pulmonar por medio de la inyección intratraqueal de micobacterias vivas y virulentas en ratones singénicos Balb/c (8,9,11, 12).

El estudio histopatológico, inmunológico y molecular mostró claramente dos fases en la evolución de la enfermedad. La primera, es una fase aguda o temprana, la cual corresponde al primer mes de infección y se caracterizó por la presencia de inflamación mononuclear en el compartimiento intersticial, perivascular y peribronquial con granulomas cuya formación empezó a las 2 semanas de infección. En coexistencia con estos cambios histológicos se observó un patrón predominante de citocinas tipo 1, lo cual permitió el control temporal de la enfermedad. Posteriormente, desde el primero y hasta el cuarto mes de infección, el estudio histopatológico mostró cambios indicativos de agravamiento (neumonía progresiva y necrosis) en coexistencia con un balance de citocinas mixto Th-1+Th-2, disminución de la producción de IL-1 y TNF e intensa anergia de la inmunidad celular (11,12). Experimentalmente hemos demostrado que el patrón mixto Th-1+Th-2 de citocinas es característico de la tuberculosis avanzada y esta directamente relacionado con la destrucción tisular, progresión de la enfermedad y muerte (13). Resulta por lo tanto fundamental en el conocimiento de la patogenia de la tuberculosis, caracterizar los factores que producen este desbalance del patrón de citocinas, puesto que su reversión permitiría el control de la progresión de la enfermedad.

FACTORES QUE DESEQUILIBRAN LA RESPUESTA PROTECTORA EN TUBERCULOSIS

Existen varios factores que parecen participar en la conversión del patrón de citocinas tipo 1 protector en tuberculosis al patrón tipo 2 relacionado con la progresión de la enfermedad. Algunos de los factores mejor caracterizados son por ejemplo la carga antigénica. En efecto, la sensibilización en animales de experimentación con pequeñas dosis de micobacterias saprófitas genera un patrón de citocinas tipo 1 el cual protege a los animales de la infección. Por el contrario, la sensibilización con altas dosis del mismo antígeno micobacteriano induce el establecimiento de un patrón mixto Th-1/Th-2 lo cual permite que la enfermedad progrese rápidamente y se produzca necrosis (13,10). Alteraciones inmunoendocrinológicas, especificamente en la función del eje hipotalamo-hipofisis-adrenal que se presentan en el curso de la evolución de la enfermedad, también se relacionan al desbalance en el patrón de citocinas (9). Interesantemente, la restitución exógena de hormonas adrenales en la fase avanzada de la enfermedad restituye parcialmente el desbalance inmunológico con el consecuente mejoramiento significativo en la sobrevida y extensión de daño tisular (14). Si desde el inicio de la infección se administran hormonas adrenales promotoras de las células Th-1, la función de estas células es mayor y por más tiempo, lo cual también repercute en un significativo mejoramiento en la sobrevida al disminuir la carga bacilar (15). Otro factor potencialmente importante en la inducción de este desbalance es el exceso de producción de prostaglandina E2 (PGE2), puesto que este tipo de mediador inflamatorio es un potente inductor los linfocitos Th-2 y ademas se produce en grandes cantidades en el pulmón (16).

Un factor mas que pudiera tener influencia en el desbalance Th-1/Th-2 es la inervación y actividad local pulmonar del sistema nervioso vegetativo (SNV). La respuesta inmune puede ser modulada por la inervación de la rama simpática del SNV (17). Estudios histológicos han mostrado claramente la presencia de nervios con terminaciones sinápticas (detección de tirosina hidroxilasa) cercanas a células del sistema inmune en diversos órganos linfoides (18), estas fibras nerviosas liberan noradrenalina, el neurotransmisor esencial de la rama simpática del SNV.

LA INFLUENCIA DEL SISTEMA NERVIOSO VEGETATIVO EN EL CONTROL DEL BALANCE DE CITOCINAS Th-1/Th-2.

El SNV se divide en rama simpática y parasimpática, las cuales en general ejercen acciones opuestas en diferentes órganos. Las catecolaminas (adrenalina , noradrenalina) son los agonistas de la rama simpática, mientras que la acetilcolina lo es del parasimpático. Las catecolaminas están constituidas por un grupo catecol y un grupo amino. La epinefrina actúa primariamente como una hormona y la norepinefrina es un neurotransmisor tanto central como periférico. Ambos neurotransmisores se unen a receptores específicos (receptores adrenérgicos). Existen cuando menos 4 receptores diferentes: alfa 1 y 2, beta 1 y 2, alguno de los cuales existen en la membrana de los linfocitos.

Unos estudios con radioligandos han mostrado que la densidad de los receptores adrenérgicos en la membrana de los linfocitos varia dependiendo del subtipo celular. Los linfocitos B tienen más receptores adrenérgicos que los T, interesantemente en clonas de linfocitos Th-2 se encontraron receptores adrenérgicos , pero no se pudieron encontrar en Th-1(19).

HIPÓTESIS

Nuestra hipótesis es que en la tuberculosis avanzada existe una mayor actividad adrenérgica en el pulmón y que esto influye activando y estimulando preferencialmente a los linfocitos Th-2, con lo cual el SNV a través de su rama simpática contribuye fomentando el desbalance de citocinas que producen la progresión de la enfermedad.

La hipótesis nula sería que la actividad adrénergica no tenga influencia sobre la respuesta de los linfocitos en la tuberculosis. La hipótesis alterna sería que la actividad adrenérgica inhiba la actividad de los linfocitos Th-1 en la etapa crónica.

METODOLOGÍA

BACTERIAS Y ANTÍGENOS

La cepa virulenta de micobacterium tuberculosis H37Rv se cultivará en el medio liquido de Proskauer y Beck modificado por Youmans (20). Después de 4 semanas de cultivo, las colonias bacterianas se separarán y suspenderán en amortiguador de fosfatos salinos PBS con tween 80 al 0.05%. Las bacterias se disgregarán por agitación con perlas de vidrio estériles durante 10 minutos. La suspensión celular se centrifugará por un minuto a 360g para eliminar los grumos bacterianos grandes. Posteriormente los bacilos se contarán por medio de frotis obtenidos al extender una alicuota del sobrenadante sobre un portaobjetos de una proporción conocida entre volumen y área, de 10^6 x 100ul de amortiguador, se alicuotearan y congelarán a -70° hasta su uso. Los antígenos micobacterianos para los estudios inmunológicos se obtendrán por filtración (whatman no 3, 1.2, 0.45 y 0.22u consecutivamente) y precipitación con sulfato de amonio al 90% del mismo medio de cultivo (21).

MODELO EXPERIMENTAL

Ratones singénicos machos de 6 a 8 semanas de edad se les inyectará intratraquealmente 10^6 micobacterias vivas y virulentas de la cepa H37Rv. Los ratones anestesiados por la administración intraperitoneal de pentobarbital sódico (58mg/kg de peso), la piel y tejidos blandos de la cara anterior del cuello se disecan hasta descubrir la traquea, a través de la cual se inyecta PBS con las bacterias previamente disgregadas y después de confirmar su viabilidad con la transformación metabólica de acetato de fluoresceína de acuerdo al método previamente publicado (22). La piel se sutura con hilo de algodón estéril, los animales se mantienen en posición vertical por 15 minutos, posteriormente grupos de 5 ratones se confinan en cajas de acrílico tapadas con microaisladores.

Todos los experimentos que involucran el manejo de M. tuberculosis, sacrificio de animales infectados con toma de muestras es realizado en campana de seguridad biológica, bajo estrictas condiciones de bioseguridad y de acuerdo al reglamento ya establecido por las autoridades del bioterio en conjunto con el Comite de Investigación en animales.

METODOLOGÍA MORFOLÓGICA

Grupos de 10 ratones en 2 experimentos diferentes se sacrificarán por exsanguineación después de anestesia con pentobarbital sódico en los días 1,3,7,14,21,28,60 después de la inyección intratraqueal de M. tuberculosis, inmediatamente después se expondrá quirúrgicamente la traquea a través de la cuál se perfundirán los pulmones con alcohol etílico absoluto (23,24). Los pulmones así fijados se cortarán sagitalmente y se incluirán en parafina. Se obtendrán cortes histológicos teñidos con HyE en los cuáles se realizará el análisis histológico y morfométrico por medio de la determinación en micras cuadradas de la inflamación perivascular, peribronquial e intersticial, así como el tamaño de los granulomas y el porcentaje de afección neumónica con la utilización del analizador de imágenes Zidas de Carl Zeiss y el Leica Qwin.

METODOLOGÍA PRUEBA DE SENSIBILIDAD

Un dia previo al sacrificio se mide el grosor del cojinente plantar del raton y se inyecta 40 µl de sobrenadante del cultivo de micobacteria, que se encuentra a una concentración de 1 µg en 2 µl. A las 24 horas se mide de nuevo el grosor del cojinete plantar. Se resta la medición final menos la inicial, se promedia y se obtiene un resultado en micras. Esta prueba es un simil de la prueba PPD.

METODOLOGÍA DE CROMATOGRAFÍA

Para analizar noradrenalina con detección electroquímica se siguió la técnica descrita por Saligaut et al (30). Que consiste en homogenizar el tejido en una solución antioxidante para evitar la oxidación de las catecolaminas (ácido perclórico con metabisulfito de Sodio), esta solución se coloca en el cromatógrafo que tiene una fase liquida la cual es inyectada a traves de electrodos a alta presión. Estos electrodos detectan cambios en la polaridad y mediante estos cambios detectan componentes quimicos. El aparato es calibrado con soluciones de norepinefrina, dopamina y serotonina a distintas concentraciones predeterminadas, se realiza una correlación lineal y se calculan las concentraciones en el tejido.

ESTUDIO DE MANIPULACIÓN FARMACOLÓGICA

Dado que las células del sistema inmune reciben inervación simpática y que las catecolaminas son capaces de modular la respuesta inmunológica, la eliminación de la aferencia simpática puede ser un procedimiento útil para evaluar la actividad del sistema nervioso sobre el inmunológico. La simpatectomía puede realizarse de diferentes maneras, por ejemplo en excisión quirúrgica de la inervación adrenérgica en un órgano especial, sin embargo éste es un método poco práctico debido a la respuesta inmunosupresora inducida por el stress quirúrgico. Una técnica más practica y útil es la simpatectomía química la cuál consiste en destruir las terminaciones nerviosas adrenérgicas mediante la administración de 6-OHDA la cuál es una neurotoxina que destruye selectivamente las terminaciones nerviosas noradrenérgicas, sin destruir los somas neuronales (27). Esto se logra mediante la administración intraperitoneal de 6-Hidroxidopamina hidrobromada a razón de 100mg/kg de peso del ratón, diluido en 1ml de sol salina (29).

Se realizarán dos experimentos por separado en los cuales se contará con 3 grupos experimentales:
Grupo 1: Animales se les inyectará vía intraperitoneal 100mg/kg de 6-OHDA, semanalmente para mantener la simpatectomia. Con esta dosis de 6-OHDA se ha demostrado que se produce denervación hasta en un 90% (28,29). Una vez pasada la fase simpaticomimetica se procede a inocular quince días después de la primera dosis de 6-OHDA.
Grupo 2: Animales se les inyectará vía intraperitoneal semanalmente dosis de el vehículo (solución salina con ácido ascorbico) de la 6-OHDA como control. Seran inoculados quince dias después de la primera dosis. En estos experimentos se realizarán las determinaciones descritas previamente.
Grupo 3: Animales control que serán inyectados igual que el grupo 2 sin ser infectados, pero se realiza la traqueostomia.

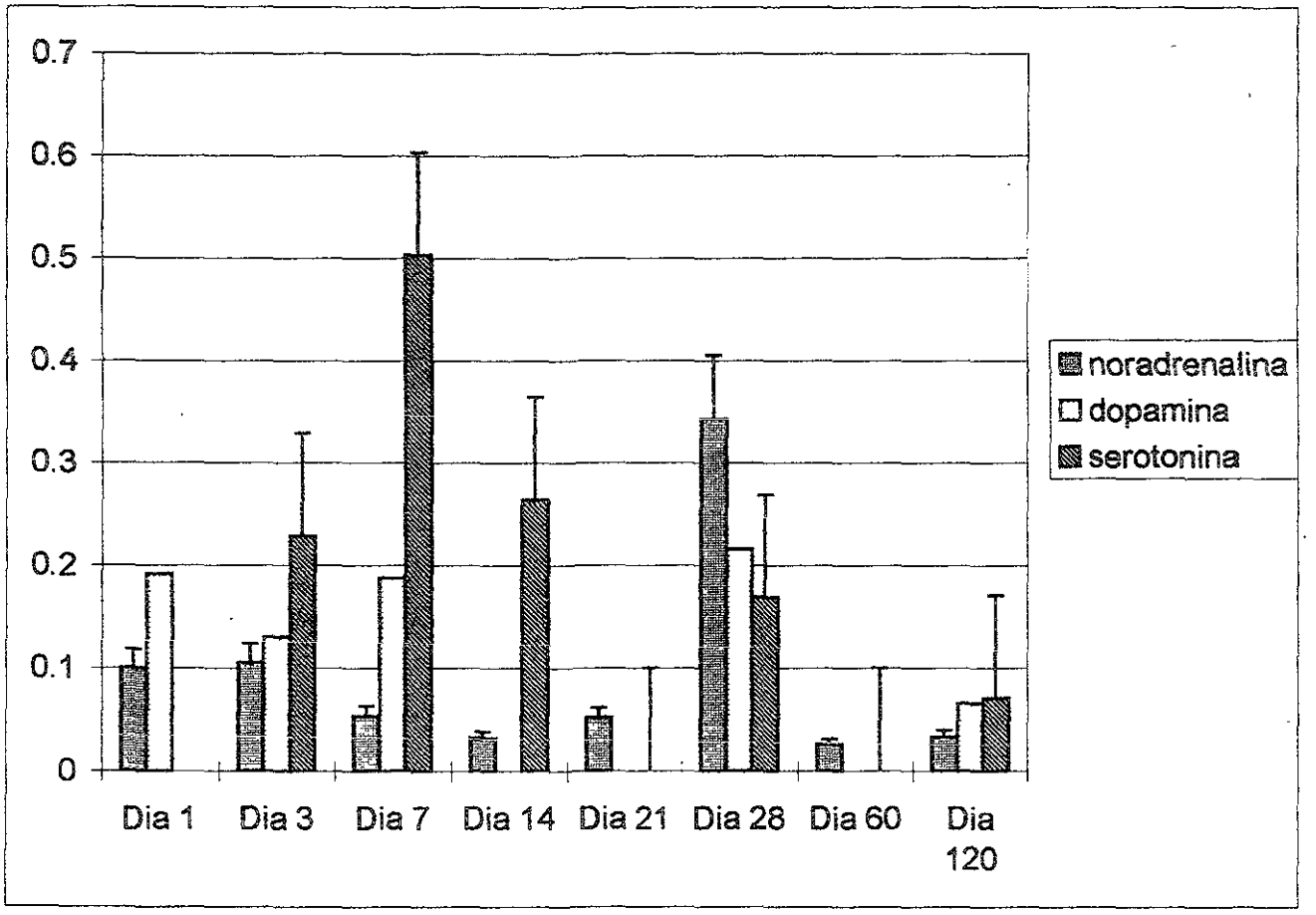
Se realizaran curvas de morfometría, control de pesos y pruebas de hipersensibilidad.

RESULTADOS

Como estudio piloto se realizaron análisis de noradrenalina , dopamina y serotonina en homogeneizados pulmonares a traves de HPLC.

Se encontraron cantidades considerables de las tres distintas catecolaminas en los pulmones con TB.

Se finalizo la primera fase con la determinación de catecolaminas de ratones con tuberculosis tanto en fase aguda como crónica.



De las tres sustancias que se midieron las que presentaron cambios interesantes, son la norepinefrina y la serotonina. La dopamina no muestra cambios durantes las distintas fases de la TB.

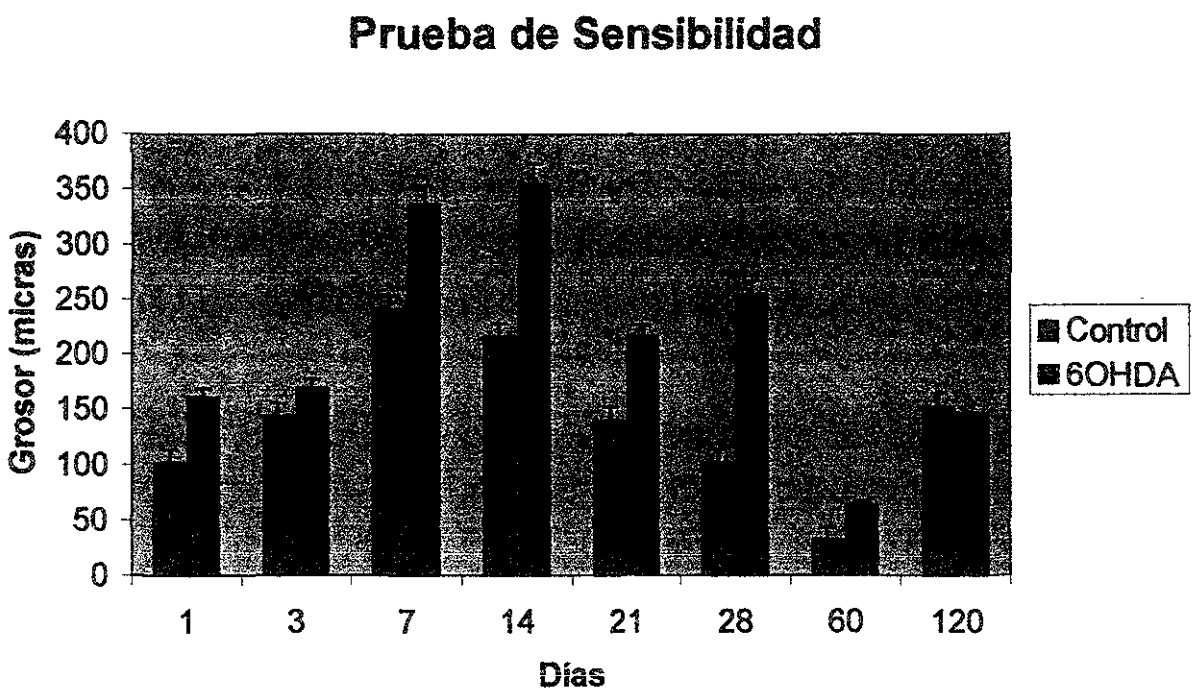
La norepinefrina (NE) presenta un pico el día 28 que es cuando se observa el cambio de fase TH1 a TH2.

La serotonina muestra un pico el día 7 que es cuando esta en decremento la respuesta inflamatoria.

Se inicio el segundo experimento ya con ratones simpatectomizados versus ratones con tuberculosis.

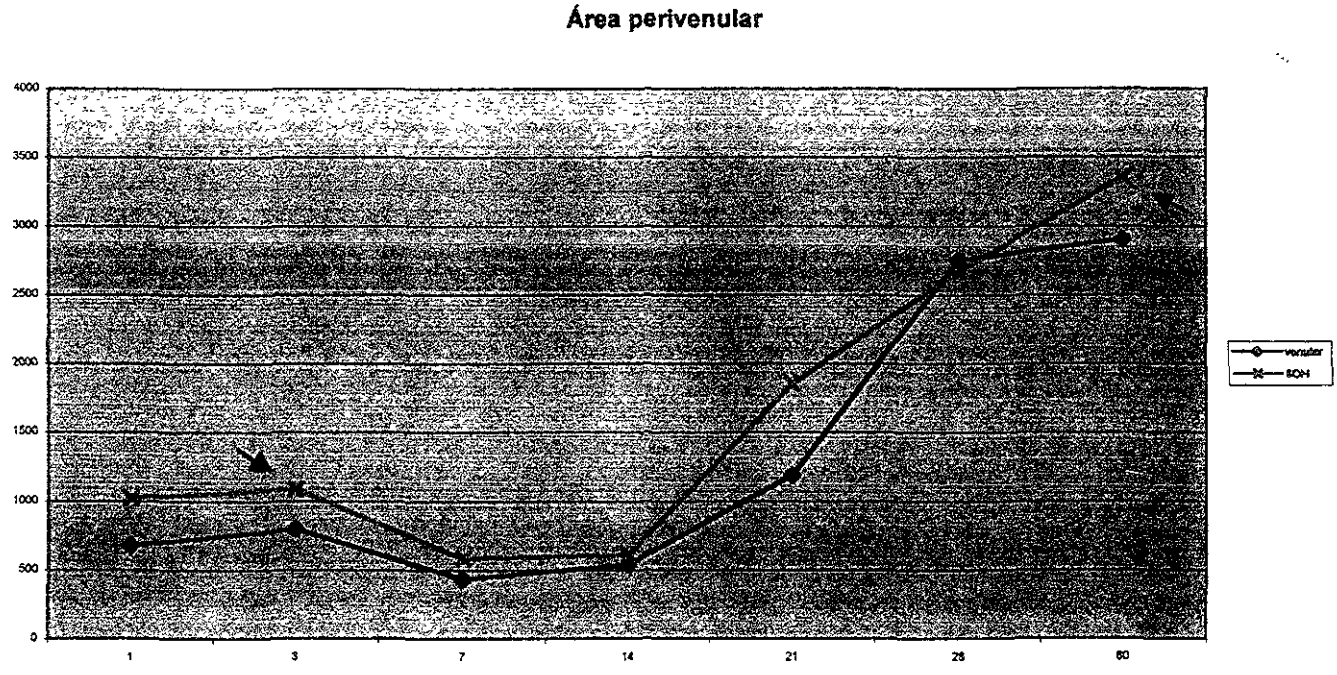
ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

Se realizaron pruebas de sensibilidad para cada día de sacrificio



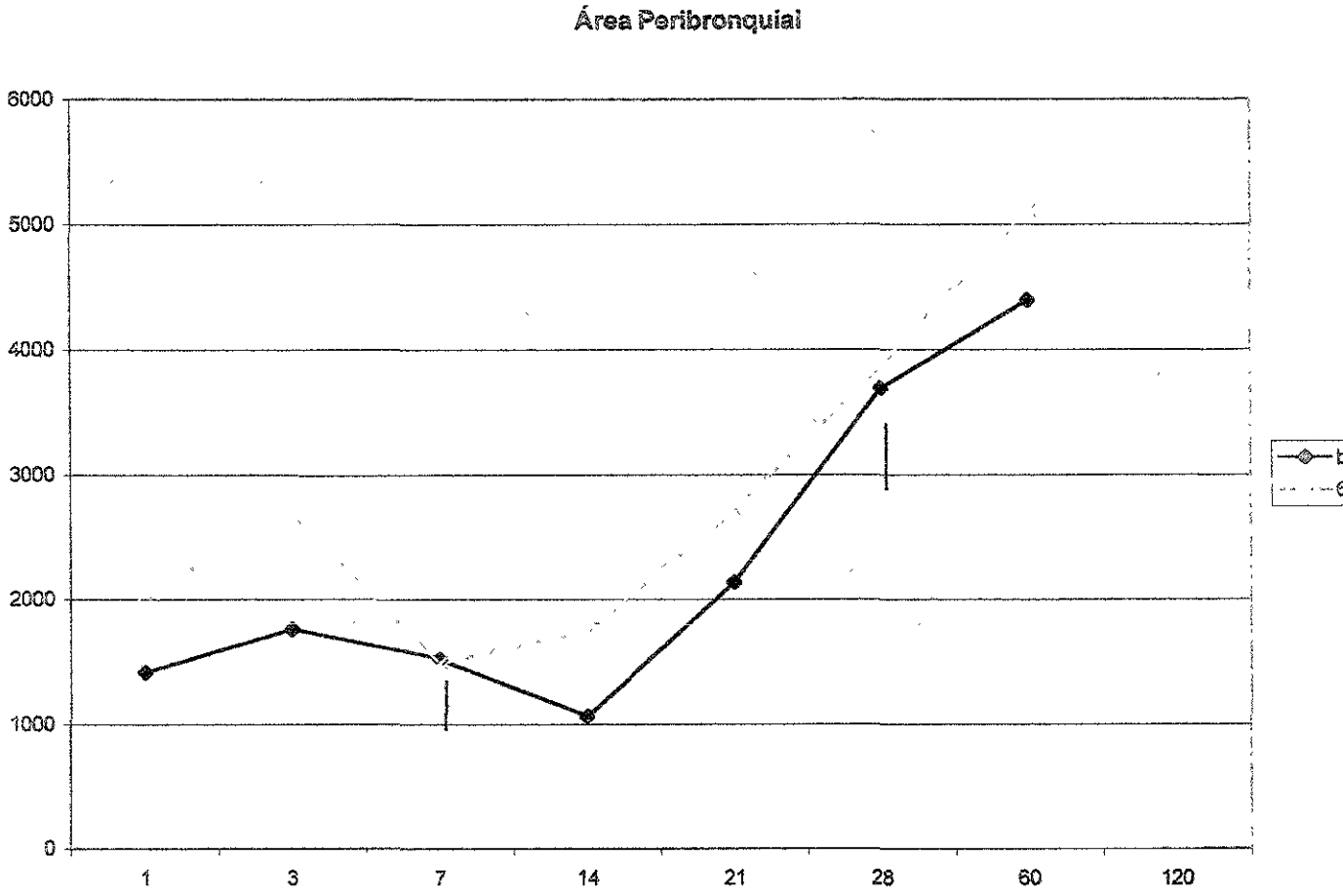
Se realizaron pruebas de hipersensibilidad en ratones simpatectomizados y se observa que sobre todo en la fase aguda hay una mayor respuesta en los ratones simpatectomizados.

El análisis morfológico consistió en medir a traves del programa Qleica las áreas de inflamación perivenulares, peribronquiales e intersticiales.



Al comparar las áreas perivenulares se puede ver donde hay flecha que las diferencias son significativas los días 1,3,21 y 60.

Se compararon los 10 ratones por cada grupo y día de sacrificio. A continuación se muestra la grafica del área peribronquial.

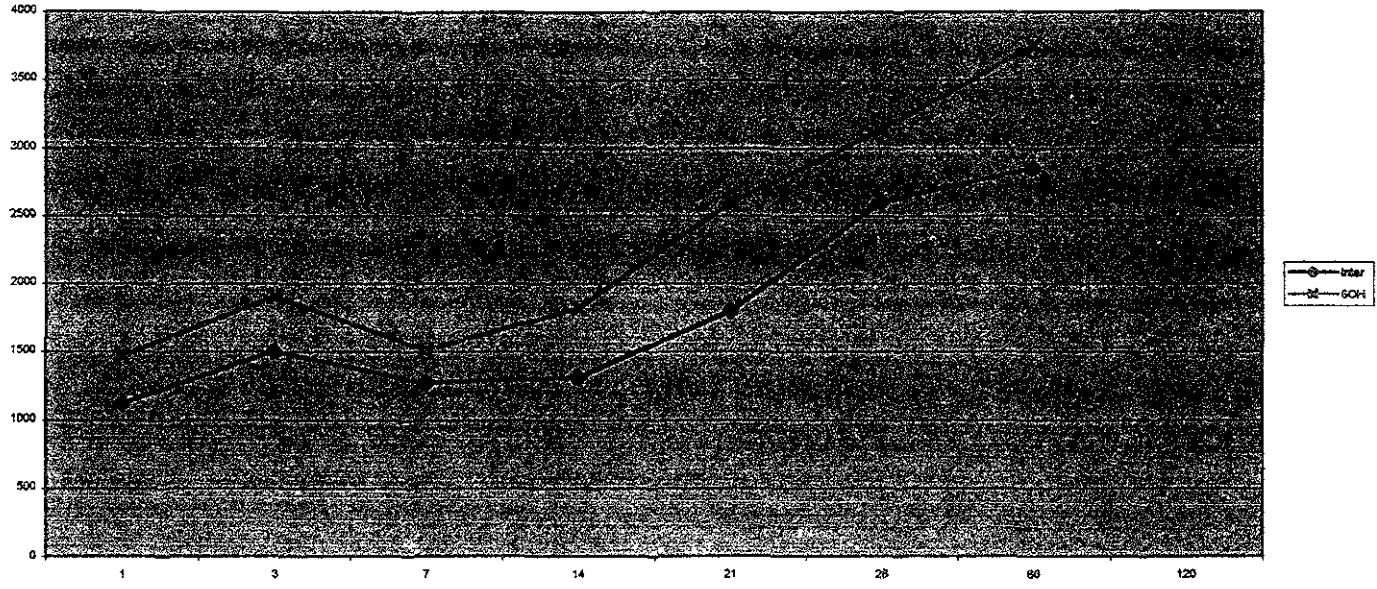


Se observa que en los días donde hay una línea no hay diferencias significativas cuando se realiza una prueba "t".

Los días restantes en cuanto respecta al área peribronquial se observa diferencias biológicamente y estadísticamente significativas.

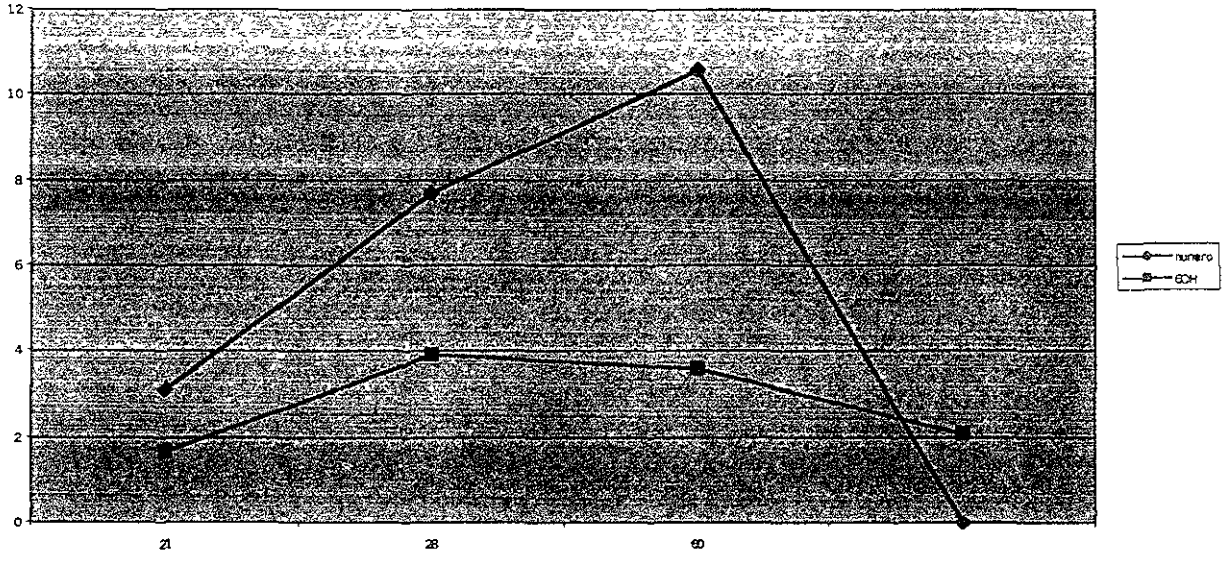
El área intersticial presenta una mayor respuesta inflamatoria lo que coincide con la prueba de hipersensibilidad

Área Intersticial

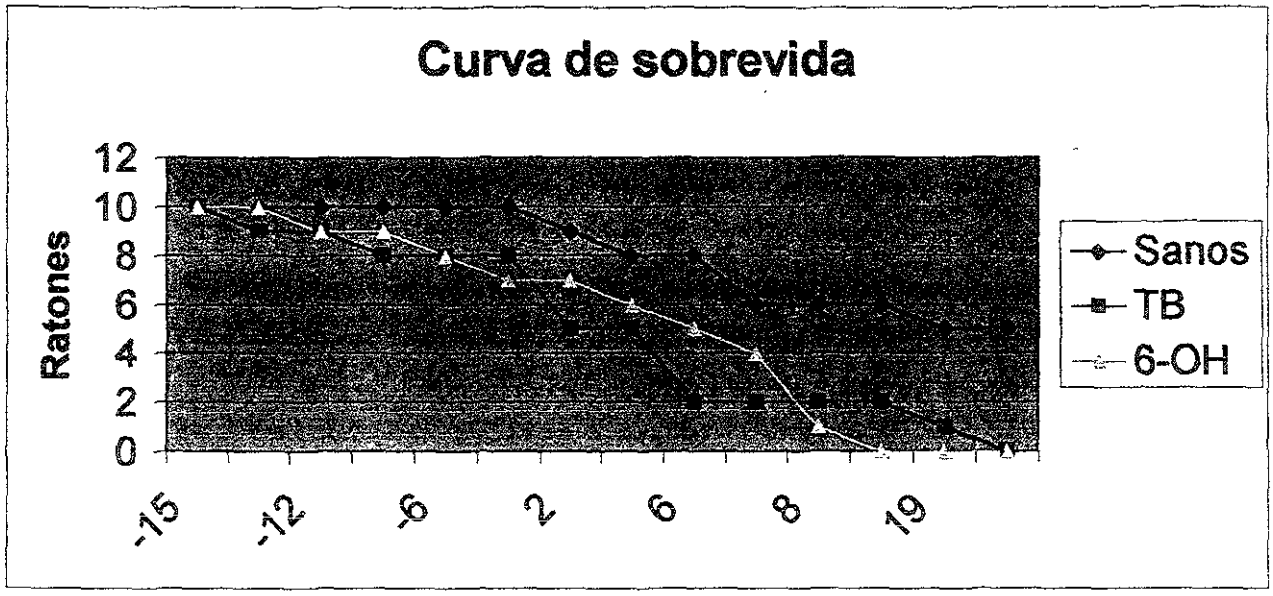


Se midieron tres áreas intersticiales en cada pulmón y aunque la celularidad del infiltrado cambia, siendo en un inicio una mezcla de linfocitos y polimorfonucleares, luego desaparecen los polimorfonucleares y se empieza a observa un infiltrado con macrófagos, esto sucede alrededor del día 14 y para el día 21 los macrófagos se observa espumosos y se empiezan a formar los granulomas.

Número de Granulomas



Se observa que los ratones simpatectomizados forman un menor número de granulomas. Se realizó la medición del área de granuloma, pero no se encontraron diferencias significativas.

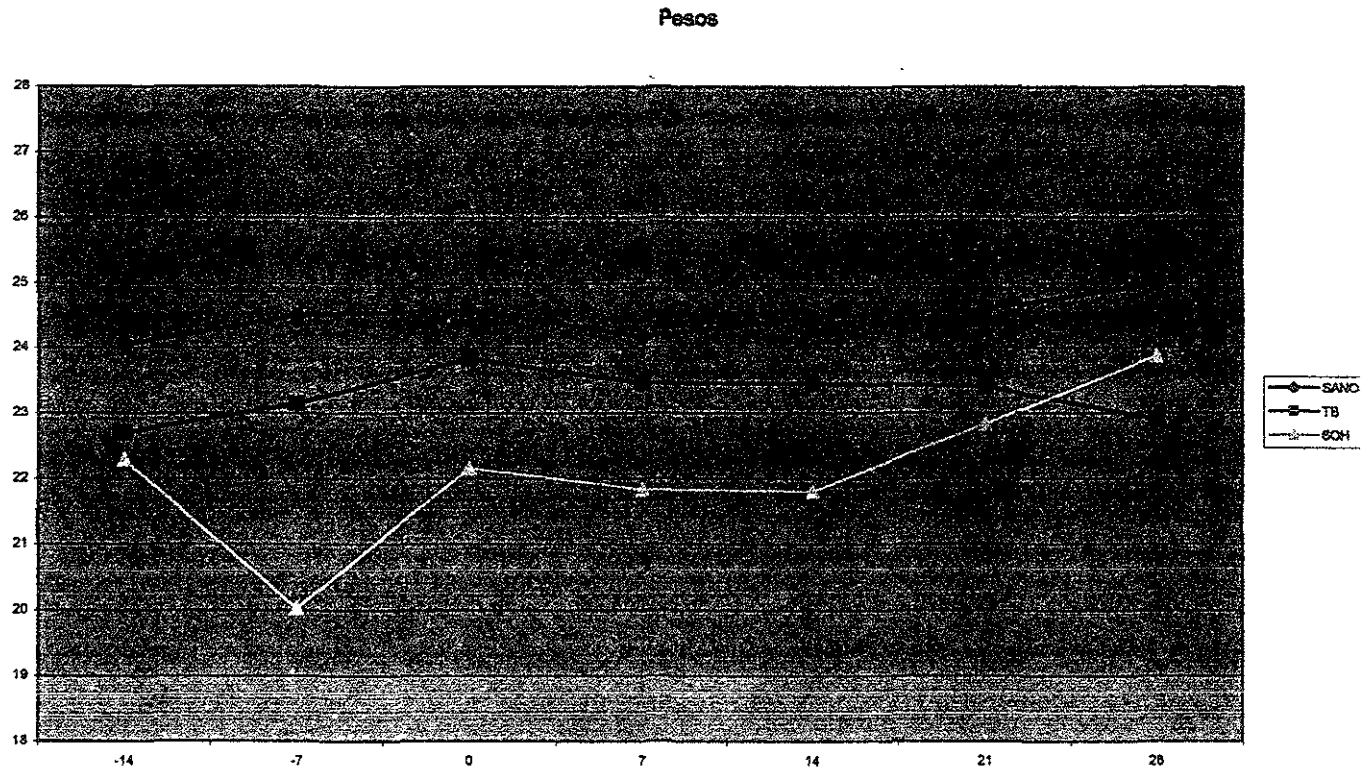


Se trato de definir si la mortalidad en los grupos era diferente y no se encontraron diferencias entre los tuberculosos y los simpatectomizados

Debido a la dificultad que presenta demostrar la simpatectomía química, los ratones en su mayoría presentan cambios conductuales e inmediatamente después de la inyección con 6OH se observa piloerección.

Se decidió medir los pesos como una medida indirecta de los cambios conductuales como son perdida de apetito. Otra posibilidad era la medición de frecuencia cardiaca pero este parámetro cambia con la mera manipulación del animal.

Los pesos se midieron a partir de la primera inyección, y se continuo cada semana, pesando un promedio de 50 ratones por grupo. Se suspendió el pesaje debido a que las diferencias al mes de infección ya no eran significativas.



Se puede apreciar que durante la primera semana los ratones simpatectomizados pierden peso, pero lo recuperan durante la semana posterior. Encontrando que para el día cero que significa el día de inoculación con TB ya no encontramos diferencias significativas entre los grupos y esto se mantiene durante el primer mes de infección.

DISCUSIÓN

Los resultados presentados en esta tesis muestran primero que con el análisis por HPLC de los pulmones con TB se observan cambios en las concentraciones de norepinefrina y serotonina. Estos cambios tienen que ser comparados con ratones sanos y con ratones simpatectomizados, pero lo que se puede definir es que hay dos picos importantes, uno el día 7, que es cuando todos los parámetros morfométricos se encuentran en su punto mas bajo. Otro día importante es el 28 que por lo general se asocia con el cambio de fase TH1 a TH2 y es en este día donde se observa el mayor pico de norepinefrina.

La prueba de sensibilidad se realiza en el cojinete plantar del raton y es un símil de la prueba de PPD. Se observa que sobre todo en la fase aguda hay una mayor respuesta en los animales simpatectomizados.

Los datos morfométricos confirman esta tendencia, aunque no es claro en todos los compartimientos analizados, se puede afirmar que en general hay una mayor área inflamatoria en los animales con 6OH. Esto es muy evidente cuando observamos la gráfica de área intersticial.

El experimento no esta diseñado para definir sobrevida, debido a los sacrificios programados, pero lo que se grafico fueron los primeros 10 ratones balb-c que se murieran en cada grupo. Observamos que no hay diferencias entre el grupo de tuberculosos y simpatectomizados.

La medición del peso se lleva acabo de forma convencional para administrar la dosis correcta de 6OH o la cantidad adecuada de vehículo (vitamina C). Como era de esperar los ratones simpatectomizados bajaron de peso durante la primera semana.

Lo que no se esperaba era que recuperaran el peso y sobre todo de manera tan acelerada, la recuperación de peso mas llamativa es durante la segunda semana, antes de inocularlos con TB. A pesar de la recuperación de peso los ratones simpatectomizados mantienen un déficit de peso durante la mayor parte del experimento, aunque este déficit no sea estadísticamente significativo al compararlo conta los otros grupos con ANOVA.

BIBLIOGRAFÍA

1.- Koch A. The global tuberculosis situation and the new control strategy of the World Health Organization. Tubercle 1991.72:1-3
2.- Rook GAW, Hernandez-Pando R. The pathogenesis of tuberculosis. Annu Rev Microbiol 1996. 50:259
3.- Koch R. Fortsetzung ber ein Heilmittel gegen Tuberculosis. Dtsch Med 1881.17:101-102
4.-Anderson MC . On Koch's treatment. Lancet 1891.1:651-52
5.-Edwards D, Kirkpatrick C. The immunology of mycobacterial diseases. Am Rev Respir Dis 1986.134:1062-67
6.-Goldstein MM, Pfeiffer K. Tumor necrosis factor alpha is required in the protective immune response against tuberculosis in mice. Immunity 1995.2:561-72
7.-Cerrottini JC, McDonald HR. Interleukin 1 depended induction of both interleukin 2 secretion and receptor expression by thymoma cells. Immunol 1986.137:1226-32
8.-Hernández-Pando R, Arriaga K, Orozco H, Panduro CA, Madrid MV. The response of hepatic acute phase protein during experimental pulmonary tuberculosis. Rev Exp Mol Pathol 1998.65:25-36
9.-Hernández-Pando R, Orozco H, Honour J, Rook GAW. Adrenal changes in murine pulmonary tuberculosis. A clue to pathogenesis?. FEMS Immunol Med Microbiol 1995.12:63-72
10.- Hernandez-Pando R, Rook GAW, The role of TNF-alfa in T-cell-mediated inflammation depends on the Th1/Th2 cytokine balance, Immunology 1994.82, 591-95
11.-Hernández-Pando R, Orozco H, Pavón L, Madrid MV. Correlation between the kinetics of Th1/Th2 cells and pathology in a murine model of experimental pulmonary tuberculosis. Immunology 1996.89:26-33
12.- Hernández-Pando R, Orozco H, Arriaga AK, Madrid MV. Analisys of the local kinetics and localization of interleukin 1 alpha, tumor necrosis factor alpha and transforming growth factor beta during the course of experimetal pulmonary tuberculosis. Immunology 1997.90: 507-516
13.- Hernández-Pando R, Pavón L, Arriaga AK, Orozco H, Madrid MV, Rook GAW. Pathogenesis of tuberculosis in mice exposed to low and high doses of mycobacterial saprophyte before infection. Infect Immun 1997.6: 84
14.- Hernández- Pando R, Streber ML, Orozco H, Arriaga K, Pavón L, Marti O, Lightman S, Rook GAW. Emergent therapeutic properties of combination of glucocorticoid and anti.glucocorticoid steroids in tuberculous Balb/c mice. Enviado a publicación.
16.-Phipps R, Stein S, Roper R. A new view of prostaglandin E regulation of the immune response. Immunol Today 1991.12:349-52
17.-Madden KS, Sanders VM, Felten DL. Cathecolamine influences and sympathetic neural modulation of immune responsivness. Annu Rev Pharmacol Toxicol 1995.35:417-48
18.-Williams JM, Peterson RG, Shea PA, Sympathetic inervation of murine thymus and spleen: evidence for a functional link between de nervous and immune systems. Brain Res Bul 1981.6:83
19.-Sanders VM, Street NE, Fuchs BA. Differential expression of the beta receptor by subsets of T-helper lymphocytes. FASEB J 1994. 8:A 114
20.- Espitia C, Sciuto E. Botasso O. Hernández-Pando R. Mancilla JR. High antibody levels to the mycobacerial fibronectin- binding antigen. In tuberculosis and lepromatous leprosy. Clin Exp Immunol 1990.97.362-67.
21.- Espitia C, Mancilla JR. Identification, Isolation and partial characterization con M. Tuberculosis glycoprotein antigens. Clin Exp Immunol 1989. 77:378-82.

22.- Jarnagin JL, Luschinger DW. The use of fluorescein diacetate and ethidum bromide as a stain for evaluating viability of mycobacteria. Stain Technology 1980. 55:235-258.
23.- Hernández-Pando R, Orozco H, Pavón L, Madrid MV. Correlation between the kinetics of Th1/Th2 cells and pathology in a murine model of experimental pulmonary tuberculosis. Immunology 1996.89:26-33
24.- Hernández-Pando R, Orozco H, Arriaga K, Madrid MV. Analysis of the local Kinetics and localization of interleukin 1 alpha, tumor necrosis factor alpha andr transforming growth factor beta during the course of experimental pulmonary tuberculosis. Immunology 1987 . 90:507-16.
25.- Hernández-Pando R, Pavón L, Arriaga AK, Orozco H, Madrid MV, Rook GAW. Pathogenesis of tuberculosis in mice exposed to low and high doses of mycobacterial saprophyte before infection. Infect Immun 1997.6: 84-90.
26.-Williams JM, Peterson RG, Shea PA, Sympathetic inervation of murine thymus and spleen: evidence for a functional link between de nervous and immune systems. Brain Res Bul 1981.6:83
27.- Kostrzewa RM, Jacobowitz DM, Pharmacological Actions of 6-Hidroxydopamine, Pharmacol Rev 26, 199-288 (1974)
28.-Kostrzewa RM, Moynihan J, Felten D. The role of the innervation of the lymphoid tissue in the regulation of the Th1/Th2 dichotomy. En Steroid Hormones and the T-cell cytokine profile.
29.- Kruszewska B, Felten SY, Moynihan JA. Alterations in cytokine and antibody production following chemical sympathectomy in two strains of mice. J Immunology 1995.155:4613-200
30.- Saligaut C, Chretien P, Daoust M, Moore N, Boismare F. Dynamic characteristics of dopamine, norepinephrine and serotonin metabolism in axonal endings of rats hypothalamus and striatum during hypoxia: a study using HPLC with electrochemical detection. Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol 1986:8;343-9.