

00377



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE CIENCIAS

PARTICIPACIÓN DE LOS NEUTROFILOS EN
LA TUBERCULOSIS PULMONAR
EXPERIMENTAL MURINA

T E S I S

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

P R E S E N T A

Q. C. JORGE ALBERTO BARRIOS PAYÁN

DIRECTOR DE TESIS: DR. ROGELIO HERNÁNDEZ PANDO

MÉXICO, D. F.



COORDINACIÓN

SEPTIEMBRE DE 2004



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.



POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS COORDINACIÓN

UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

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 16 de agosto del 2004, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado de Maestría en Ciencias Biológicas (Biología Experimental) del alumno(a) **Jorge Alberto Barrios Payan**, con número de cuenta 501048831 con la tesis titulada: "**Participación de los Neutrofilos en la Tuberculosis Pulmonar Experimental Murina**", bajo la dirección del(a) **Dr. Rogelio Hernández Pando**

Presidente:	Dra. Annie Pardo Semo
Vocal:	Dra. Clara Inés Espitia Pinzón
Secretario:	Dr. Rogelio Hernández Pando
Suplente:	Dra. Iris Citlali Elvira Estrada García
Suplente:	Dr. Eduardo Sada Díaz

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F. a, 17 de septiembre del 2004


Dr. Juan José Morrone Lupi
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del interesado

Agradezco a las siguientes Instituciones por el apoyo brindado para la realización de este trabajo:

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)
Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán” (INCMNSZ).

El presente trabajo fue realizado en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”, en el Departamento de Patología Experimental.

El autor recibió el apoyo de la beca numero **167205**, otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).

El comité tutorial que evaluó el desarrollo de la tesis estuvo integrado por:
Dr. Rogelio Hernández Pando
Dra. Clara Inés Espitía Pinzón
Dra. Iris Citlali Elvira Estrada García

El comité de sinodales asignado para examinar este trabajo y para la presentación del examen para obtener el grado fue integrado de la siguiente manera:

PRESIDENTE : DRA. ANNIE PARDO SEMO
VOCAL : DRA. CLARA INES ESPITÍA PINZÓN
SECRETARIO : DR. ROGELIO HERNÁNDEZ PANDO
SUPLENTE : DRA. IRIS CITLALI ELVIRA ESTRADA GARCÍA
SUPLENTE : DR. EDUARDO SADA DÍAZ.

A mis padres Jorge y Delfina (MIS JEFES), por darme siempre un apoyo incondicional, por estar ahí cuando los he necesitado; porque siempre han creído en mí, por dejarme soñar y por impulsar mis sueños, por darme siempre el regaño oportuno y el consejo atinado, por enseñarme a valorar las cosas y a luchar por las metas que me he propuesto, por darme el tesoro mas grande que puede existir: el amor de la FAMILIA, porque han sido ante todo MIS AMIGOS, por esto y mucho más, les estaré eternamente agradecido, los quiero mucho.

A mis hermanas Diana y Belén, por darme todo su apoyo y su amor, por hacer que cada momento que he pasado con ustedes, sea maravilloso, por soportar y comprender mi ausencia, por estar ahí..... al pendiente de mí. Son ustedes mi orgullo y lo que yo más quiero. Simplemente GRACIAS.

Este trabajo representa el fruto de todos sus esfuerzos, sus desvelos, sus sacrificios y sus muchas noches en vela preocupándose por mí; no existe algo material que sea lo suficientemente valioso como para pagar una sola de esas noches, mi manera de agradecerles, es hacer que ustedes se sientan orgullosos de lo que han logrado conmigo, forjaron un hombre útil a la sociedad y a nuestro país. Este logro les pertenece.

“USTEDES HAN SIDO, SON Y SERÁN EL CENTRO DE MI UNIVERSO”

LOS QUIERO MUCHO.

Jorge Alberto Barrios Payán.

DEDICATORIAS.

A.:L.:G.:D.:G.:A.:D.:U.: por guiar mis pasos, por darme valor para enfrentar lo desconocido, por cuidar de mí y mis seres queridos cuando no he podido hacerlo yo. GRACIAS.

A Nina, gracias por impulsarme día a día, por ser mi fuerza en los momentos difíciles y ternura en los momentos débiles, por creer en mí y por darme momentos maravillosos a tu lado, te quiero.

A mis hermanos de toda la vida, aunque no llevamos el mismo apellido:

“The Brotherhood”

Manuel Navarrete, Alejandro Pérez, Yaret Cortés, Cesar García, Carlos Sánchez, Nicolás González, Rafael Odilon, Rafael Cabrera, Bernardo Marín, Gualberto Campos, Víctor Hugo, Erick Sevilla (donde quiera que estés), a todos ellos GRACIAS por el apoyo emocional y espiritual que me han brindado desde que los conozco, por todos los momentos vividos y por vivir, y porque siempre que nos reunimos nunca falta la cooperación y camaradería entre nosotros..... “a ver, van 20 varos pa’l cartón”..... “uno, nomás pa’ platicar”. All for one and one for all.

Arnoldo y Héctor, brothers, muchas gracias por su amistad, por seguir conmigo sabiendo que soy “un pierde almas”, y por tantos momentos tan agradables, Arnoldo, gracias por tu amistad, sigue esforzándote no te sientas mal por ser feo, ya nos acostumbramos a verte. Héctor, gracias por dejarme ser tu amigo, no te sientas mal si te dicen que eres feo, tu di que eres diferente. A ambos muchas gracias por ser parte de mi familia.

Mi gato Sméagol, gracias por darme alegría en los momentos de estrés con tus piruetas y tus maullidos, y por hacerme compañía en los momentos de soledad.

“May the force be with us”

AGRADECIMIENTOS.

Al Dr. Rogelio Hernández Pando muchas gracias por todo su apoyo y por la confianza que ha depositado en mí, por sus enseñanzas, porque siempre he encontrado una respuesta cuando lo he buscado, lo admiro y lo respeto. Lo quiero mucho.

A la Dra. Iris Estrada García y a la Dra. Clara Espitia Pinzón, gracias por sus consejos y por las ideas aportadas a este trabajo, no hubiese sido posible realizarlo sin ustedes.

A mi comité de sinodales por sus valiosas aportaciones y la rapidez con que revisaron este trabajo.

A mis compañeros:

Ariadna Fabre, por sus consejos, por convencerme de pasarme al equipo de los buenos, los PUMAS.

Paty Acosta, por sus palabras de aliento y porque sin ella no habría tenido con quien pelear antes de la comida..... a la hora de la comida.....y después de la comida.

Claudia Martínez, por sus enseñanzas y sus consejos, por dejar siempre lleno el refri cuando trabajabas hasta tarde en el laboratorio.

Milena Saqui, por los consejos y la asesoría, y por las ensaladas que donaste a los niños pobres de la calle jardín.

Erendira Ángeles, gracias por aguantar todas las molestias que te he dado con tantos documentos urgentes y de última hora, y por la barbacoa que muy de vez en cuando donabas a los niños pobres de la calle anteriormente mencionada.

Luz Hernández, gracias por los buenos consejos, en especial por el libro que escribiste..... “Final de una beca principio de un matrimonio”.

Javier Rangel, sensei simplemente GRACIAS. Te veo y digo “así quiero ser yo cuando sea grande”.

Enrique Becerril, gracias por los consejos y la ayuda de aspecto técnico.

Diana, gracias por la asistencia técnica, y por disculparme cuando mis solicitudes de equipo y material no iban acompañadas por las respectivas copias rosa, verde y azul.

A los compañeros que no encontraron su nombre en la lista anterior, gracias por perdonar que se me haya olvidado ponerlos.

A todos ustedes muchas gracias.

Jorge Alberto Barrios Payán.

INDICE GENERAL

	Página.
Resumen	1
Introducción	3
Situación actual de la tuberculosis.....	3
Características de <i>M. tuberculosis</i>	3
Entrada <i>M. tuberculosis</i> al macrófago.....	4
La respuesta inmunológica en la tuberculosis.....	5
Mecanismos de evasión.....	5
Morfología de los neutrófilos.....	6
Producción y distribución de los neutrofilos.....	6
Neutrófilos en los tejidos.....	6
Funciones de los neutrófilos.....	7
Ingestión.....	7
Moléculas de adhesión.....	7
Mecanismos bactericidas no oxidativos.....	8
Defensinas.....	8
Familia CAP37.....	9
Familia BPI.....	9
Mecanismos bactericidas oxidativos.....	9
Antecedentes	10
Neutrófilos en la infección por <i>M. tuberculosis</i>	10
Producción de citocinas por neutrófilos.....	10
Justificación	12
Hipótesis	13
Objetivos	14
Objetivo general.....	14
Objetivos específicos (1ª. Fase).....	14
Objetivos específicos (2ª. Fase).....	14
Materiales y Métodos	15
Ratones.....	15
Crecimiento y preparación de las micobacterias.....	15
Determinación de la viabilidad micobacteriana.....	15
Obtención del mAb RB6-8C5.....	15
Materiales.....	16
Preparación del medio de cultivo DMEM.....	16
Para preparar 200 ml de medio DMEM.....	16
Suplementos.....	16
Producción de ascitis conteniendo un mAb.....	17
Purificación del mAb.....	18
Purificación de mAb por precipitación con Sulfato de Amonio.....	18
Materiales.....	18
Método.....	18
Elusión de la proteína RB6-8C5.....	19
Concentración y cuantificación del RB6-8C5.....	19
Análisis FACS para probar la efectividad del mAb RB6-8C5.....	19
Obtención del antígeno micobacteriano soluble.....	20
Infección de ratones Balb/c con <i>M. tuberculosis</i> H37Rv.....	20
Colección de muestras.....	20

Determinación de la carga bacteriana en los pulmones por cuenta de Unidades Formadoras de Colonia (UFC).....	21
Determinación de la respuesta de hipersensibilidad retardada a antígenos micobacterianos solubles.....	21
Estudio morfométrico.....	21
Conjugación de isotiocianato de fluoresceína a anticuerpos.....	22
Material.....	22
Método.....	22
Preparación de Amortiguador de Carbonatos pH 9.5.....	22
Citometría de Flujo.....	22
Resultados	24
Análisis de la capacidad fagocítica de PMN vs. Macrófagos.....	24
Análisis por citometría de flujo de la producción de IL-8.....	24
Unidades Formadoras de Colonias.....	24
Prueba de Hipersensibilidad Retardada.....	24
Análisis Histológico.....	24
Infiltrado intersticial.....	24
Infiltrado perivenular.....	25
Granulomas.....	25
Neumonía.....	26
Discusión	27
Conclusiones	30
Perspectivas	30
Figuras	31
Figura 1.....	31
Figura 2.....	32
Figura 3.....	33
Graficas	34
Bibliografía	46

INDICE DE GRÁFICAS.

Gráfica 1: Ratones infectados con <i>M. tuberculosis</i> , células dobles positivas para IL-1.....	Pág. 34
Gráfica 2: Ratones infectados con <i>M. tuberculosis</i> , células dobles positivas para IL-8.....	Pág. 34
Gráfica 3: Ratones infectados con <i>M. tuberculosis</i> , células dobles positivas para TNF.....	Pág. 35
Gráfica 4: Cinética de células PMN y Macrófagos en ratones inyectados con RB6-8C5.....	Pág. 35
Gráfica 5: Cinética de células PMN y Macrófagos en ratones inyectados con SSF.....	Pág. 36
Gráfica 6: UFC en pulmones de ratones infectados con <i>M. tuberculosis</i> e inyectados con mAb RB6-8C5 y SSF.....	Pág. 36
Gráfica 7: UFC en bazo de ratones infectados con <i>M. tuberculosis</i> e inyectados con mAb RB6-8C5 y SSF.....	Pág. 37
Gráfica 8: Prueba de hipersensibilidad retardada en ratones inyectados RB6-8C5 y SSF.....	Pág. 37
Gráfica 9: Área de inflamación intersticial en ratones inyectados con RB6-8C5 y SSF.....	Pág. 38
Gráfica 10: Neutrófilos en espacio intersticial en ratones inyectados con RB6-8C5 y SSF.....	Pág. 38
Gráfica 11: Macrófagos en espacio intersticial en ratones inyectados con RB6-8C5 y SSF.....	Pág. 39
Gráfica 12: Linfocitos en espacio intersticial en ratones inyectados con RB6-8C5 y SSF.....	Pág. 39
Gráfica 13: Área de inflamación perivenular en ratones inyectados con RB6-8C5 y SSF.....	Pág. 40
Gráfica 14: Neutrófilos en espacio perivenular en ratones inyectados con RB6-8C5 y SSF.....	Pág. 40
Gráfica 15: Macrófagos en espacio perivenular en ratones inyectados con RB6-8C5 y SSF.....	Pág. 41
Gráfica 16: Linfocitos en espacio perivenular en ratones inyectados con RB6-8C5 y SSF.....	Pág. 41
Gráfica 17: Área de granulomas en ratones inyectados con RB6-8C5 y SSF.....	Pág. 42
Gráfica 18: Neutrófilos presentes en granulomas de ratones inyectados con RB6-8C5 y SSF.....	Pág. 42
Gráfica 19: Macrófagos presentes en granulomas de ratones inyectados con RB6-8C5 y SSF.....	Pág. 43
Gráfica 20: Linfocitos presentes en granulomas de ratones inyectados con RB6-8C5 y SSF.....	Pág. 43
Gráfica 21: Porcentaje de PMN presentes los granulomas de ratones inyectados con RB6-8C5 y SSF.....	Pág. 44
Gráfica 22: Porcentaje de Macrófagos presentes en los granulomas de ratones inyectados con RB6-8C5 y SSF.....	Pág. 44
Gráfica 23: Porcentaje de Linfocitos presentes en los granulomas de ratones inyectados con RB6-8C5 y SSF.....	Pág. 45
Gráfica 24: Neumonía en ratones inyectados con el mAb RB6-8C5 y SSF.....	Pág. 45

INDICE DE FIGURAS.

Figura 1. Desarrollo de las diferentes estirpes de células sanguíneas.....	Pág. 31
Figura 2. Migración de PMN al tejido.....	Pág. 32
Figura 3. Histología pulmonar representativa en grupos de ratones inyectados con mAb RB6-8C5 y SSF.....	Pág. 33

ABREVIATURAS.

• α	Alfa
• AG	Arabinogalactana
• ATP	Trifosfato de Adenosina
• β	Beta
• BCG	Bacilo de Calmette-Güerin
• BPI	Proteína Bactericida que incrementa la permeabilidad
• °C	Grados Centígrados
• Ca	Calcio
• CAP	Proteínas Cationicas
• cc	centímetros cúbicos
• C3a	Proteína del Complemento C3a de mayor tamaño
• C3b	Proteína del Complemento C3b de menor tamaño
• C3bi	Proteína del complemento C3b inactiva
• C5	Proteína del complemento C5
• C5a	Proteína del complemento C5a o anafilotoxina
• CD	Grupo de diferenciación
• CD11b	Marcador de superficie para macrófagos.
• CGD	Enfermedad Gránulomatosa Crónica
• CO ₂	Bióxido de Carbono
• CR	Receptor de Complemento
• CSF	Factor Estimulante de Colonias
• Da	Daltons
• DMEM	Medio Mínimo Esencial Dulbecco's
• DNA	Ácido Desoxirribonucleico
• FACS	Clasificador celular activado por fluorescencia
• FITC	Isotiocianato de Fluoresceína.
• FMLP	Peptidos Bacterianos N-Formilados
• g	Gravedades
• G-CSF	Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos
• GM-CSF	Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos y Macrófagos
• GPI	Guanidin Fosfatidil Inositol
• GPLs	Glicopeptidolipidos
• H	Hidrógeno
• HEPES	(N-[2-Hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethanesulfonic acid])
• HIV	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
• H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrógeno
• HOCl	Ácido Hipocloroso
• ICAM-1	Molécula de adhesión intercelular 1
• IgG	Inmunoglobulina G
• IL-1	Interleucina 1
• IL-1 β	Interleucina 1 beta
• IL-1ra	Interleucina 1 receptor antagonista
• IL-3	Interleucina 3
• IL-4	Interleucina 4

• IL-8	Interleucina 8
• IL-10	Interleucina 10
• IL-12	Interleucina 12
• INFα	Interferón alfa
• INFγ	Interferón gamma
• iNOS	Oxido Nítrico Sintetasa inducible
• i.p.	Intraperitoneal
• K_d	Constante de Disociación
• KDa	Kilodaltones
• Kg	Kilogramos
• LAD-I	Deficiencia de Adhesión Leucocitaria tipo I
• LAD-II	Deficiencia de Adhesión Leucocitaria tipo II
• LAMP-1	Proteínas de Membrana Lisosomal tipo I
• LAMP-2	Proteínas de Membrana Lisosomal tipo II
• LTB₄	Leucotrieno B ₄
• M	Molar
• mAb	Anticuerpo monoclonal
• M-CSF	Factor Estimulante de Colonias de Macrófagos
• μg	Microgramos
• mg	Miligramos
• MHC-II	Complejo Principal de Histocompatibilidad Clase II
• min	Minutos
• MIP-1α	Proteína Inflamatoria de Macrófagos 1 alfa
• MIP-1β	Proteína Inflamatoria de Macrófagos 1 beta
• μl	Microlitros
• μm	Micrómetros
• ml	Mililitros
• mM	Milimolar
• MMRc	Receptores de manosa
• mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
• N₂	Nitrógeno
• NADPH	Nicotin Adenin Difosfato reducido
• Na₂CO₃	Carbonato de Sodio
• NaHCO₃	Bicarbonato de Sodio
• nm	nanometros
• NO	Oxido Nítrico
• NO₂	Oxido Nitroso
• O₂	Oxigeno
• O₂⁻	Anion súperoxido
• OH[·]	Radical Hidroxilo
• PBS	Amortiguador Salino de Fosfatos
• PE	Ficoeritrina
• PECAM-1	Molécula de Adhesión de Proteína Celular Endotelial
• PGLs	Glicolípidos fenolitos
• pH	Potencial de Hidrógeno
• PKC	Proteín cinasa C
• PM	Peso Molecular

• PMN	Leucocitos Polimorfonucleares
• PRISTANE	2, 6, 10,14-tetramethylpentadecane
• RB6-8C5	Anticuerpo monoclonal anti-neutrofilos
• RIC	Respuesta Inmune Celular
• RNI	Radicales libres del Nitrogeno
• ROI	Radicales Libres del Oxigeno
• rpm	Revoluciones por minuto
• rRNA	Ácido Ribonuclieco ribosomal
• SAS	Sulfato de Amonio Saturado
• SSF	Solución Salina Fisiologica
• sTNFRII	Receptor soluble tipo II para el TNF- α
• TACO	Proteína de cubierta que contiene triptofano-aspartato
• TGF-β1	Factor de Crecimiento Transformante beta 1
• TNF	Factor de Necrosis Tumoral
• TNFα	Factor de Necrosis Tumoral alfa
• UFC	Unidades Formadoras de Colonias

There is not knowledge that is not power.

Resumen.

En la actualidad, la tuberculosis representa un problema de salud pública a nivel mundial. La Organización Mundial de la Salud declaró a la tuberculosis como un problema de emergencia mundial, debido a que el bacilo es responsable de la aparición de 8 a 12 millones de nuevos casos con tuberculosis activa cada año, produciendo 3 millones de muertes en todo el mundo. Durante las últimas dos décadas, se ha reportado un resurgimiento de la enfermedad tanto en los países desarrollados como en vías de desarrollo.

El género *Mycobacterium* está constituido por organismos con forma de bacilo, cuya principal característica es la presencia de una cubierta, que tiene tres componentes estructurales: la membrana citoplasmática, la pared y una cápsula.

El neutrófilo es un fagocito profesional con un papel crucial en la defensa del huésped contra infecciones por parásitos extracelulares. Datos recientes de modelos en ratón muestran que los neutrófilos también juegan un papel protector en infecciones por parásitos intracelulares.

Los neutrófilos fagocitan patógenos eficientemente y exhiben una potente actividad microbicida mediada por enzimas granulares, péptidos antimicrobianos, proteínas y reactivos intermediarios del oxígeno y nitrógeno. Como una de las más eficientes células fagocíticas del sistema inmune, los neutrófilos restringen, al inicio, la replicación local de numerosos patógenos y con esto retrasan su diseminación sistémica; liberan diversas citocinas y quimiocinas.

Los neutrófilos son células fagocíticas profesionales, que no solo contribuyen innatamente a la eliminación de micobacterias sino también en el establecimiento de una adecuada respuesta de inmunidad celular, por lo tanto la eliminación de estas células en los primeros días de la infección, modificara la respuesta inmunológica generada en contra de *Mycobacterium tuberculosis* en los pulmones.

Con el objetivo de evaluar la cinética de los polimorfonucleares (PMN), su capacidad fagocítica, así como su capacidad de producción de citocinas, se realizó una primera etapa experimental con ratones Balb/c machos de 6 a 8 semanas de edad, a los que se les inoculó 1 millón de micobacterias de la cepa H37Rv, por vía intratraqueal. Se realizaron lavados bronquiales, en los días de sacrificio 1, 2, 3, 7, 14, 21 postinfección; con las células obtenidas en los lavados, se midieron las poblaciones celulares por citometría de flujo; se midió la capacidad fagocítica de macrófagos y PMN, y se evaluó la presencia de citocinas intracelulares en ambas poblaciones.

Con el objetivo de evaluar la participación de los PMN en la tuberculosis pulmonar se realizó una segunda etapa experimental, inyectando a un grupo de ratones un día antes de la infección y cada tercer día después de la infección con un anticuerpo monoclonal citolítico para neutrófilos, otro grupo solamente fue inyectado con solución salina fisiológica (SSF) estéril. Se realizaron lavados bronquiales en los días de sacrificio antes mencionados y por citometría de flujo, se evaluó la cinética de los macrófagos y los PMN en ambos grupos. Se congelaron muestras de pulmón para determinar la carga micobacteriana por el método de conteo de Unidades Formadoras de Colonias (UFC), los pulmones destinados para el análisis histológico fueron perfundidos con alcohol absoluto.

Los resultados muestran que en los primeros días (1 y 2) la capacidad fagocítica de micobacterias, la producción de IL-1, IL-8 y TNF, es mayor en la población de PMN en comparación con la población de macrófagos.

En los experimentos de la segunda etapa, la eliminación de la respuesta inmunológica innata llevada a cabo por los neutrófilos, facilitó la replicación y diseminación de la micobacteria, encontrándose más elevadas las UFC, en comparación con el grupo

control que solo recibió el vehículo (SSF). La prueba de hipersensibilidad retardada (DTH) se modificó en ratones neutropénicos. El análisis histológico demostró que las áreas de inflamación son notablemente menores en ratones neutropénicos, en comparación con los ratones control.

Los resultados obtenidos en estos experimentos resaltan la importancia de los neutrofilos no únicamente como fagocitos profesionales, sino también como células reclutadoras de macrófagos y productoras de citocinas proinflamatorias, que en conjunto contribuyen al control de la replicación y diseminación temprana sistémica de la micobacteria.

INTRODUCCIÓN.

Situación actual de la tuberculosis.

En la actualidad, la tuberculosis representa un problema de salud pública a nivel mundial. La Organización Mundial de la Salud declaró a la tuberculosis como un problema de emergencia mundial, debido a que el bacilo es responsable de la aparición de 8 a 12 millones de nuevos casos de tuberculosis activa cada año, produciendo 3 millones de muertes en todo el mundo. Durante las últimas dos décadas, se ha reportado un resurgimiento de la enfermedad tanto en los países desarrollados como en los en vías de desarrollo^{1,2,3}.

Alrededor de un tercio de la población mundial está infectada con *Mycobacterium tuberculosis*, la mayoría de estas infecciones pasan desapercibidas y solo entre el 5 y 10% se reactivan dando lugar a tuberculosis progresiva⁴. Sin embargo estos porcentajes tienden a elevarse debido a que existen factores que favorecen el establecimiento de la enfermedad como son pobreza, desnutrición, predisposición genética, la falta de un diagnóstico oportuno, la variabilidad en la protección que ofrece la vacunación con el bacilo de Calmette-Güerin (BCG), el surgimiento de cepas multidrogorresistentes y las guerras, que ayudan a que se incremente el índice de reactivación, la tuberculosis es una de las principales infecciones secundarias que se activan en individuos infectados con el virus de inmunodeficiencia humana (HIV)^{5,6}.

Características de *Mycobacterium tuberculosis*.

Las micobacterias se han definido en relación con una propiedad tintórea característica, que depende de la riqueza en lípidos de sus paredes celulares: son relativamente impermeables a varios colorantes básicos; pero una vez que se han teñido, retienen estos colorantes persistentemente. Resisten la decoloración con disolventes orgánicos acidificados, por lo cual se han denominado acidorresistentes. Las micobacterias incluyen desde saprofitos inoos del suelo y las aguas, hasta organismos que son responsables de dos enfermedades humanas devastadoras: la *tuberculosis* y la *lepra*. Ambas se caracterizan por su cronicidad y por causar lesiones granulomatosas de evolución lenta, que originan grandes destrucciones de los tejidos. La lepra afecta fundamentalmente a la piel, y puede causar importantes desfiguraciones, mientras que la tuberculosis se localiza habitualmente en los pulmones pero puede afectar a otros órganos⁷.

El género *Mycobacterium* está constituido por organismos con forma de bacilo, cuya principal característica es la presencia de una cubierta, que tiene tres componentes estructurales: la membrana citoplasmática, la pared y una cápsula⁸. La pared es rica en lípidos, especialmente los ésteres de micolatos, que forman una barrera permeable a moléculas polares. La cápsula, consiste en polisacáridos y proteínas con trazas de lípidos.

La composición molecular y las características estructurales de la pared celular de las micobacterias les confieren poca permeabilidad, y se cree que esto contribuye a la resistencia a varios antibióticos y agentes quimioterapéuticos. La pared también juega un papel importante en la patogenicidad, siendo responsable de la ácido-alcohol resistencia⁹ y de parte de la evasión de la respuesta inmune en las especies patógenas, ya que inactiva varios componentes de ataque del hospedero.

El esqueleto de la pared celular esta compuesta de tres subestructuras covalentemente unidas entre si: la peptidoglicana, la arabinogalactana (AG) y los ácidos micólicos. La peptidoglicana se encuentra unida a la AG a través de un enlace fosfodiéster. El extremo no reductor del polisacárido AG consiste de ramificaciones de penta-arabinosas, estando cerca de un tercio esterificadas cada una con cuatro residuos de ácidos micólicos. Una de las principales características de la pared celular es que hasta un 60% de su peso está constituido por lípidos, incluyendo los ácidos micólicos. Además de los lípidos del esqueleto unidos covalentemente, varios tipos de "lípidos extraíbles", incluyendo glicolípidos con trealosa, glicolípidos fenólicos (PGLs) que contienen fenol-ftiocerol, ésteres de ftiocerol como el ftiocerol de dimicocersato y glicopeptidolípidos (GPLs) también pueden estar presentes.

Entrada de *M. tuberculosis* al macrófago.

Se ha descrito que los bacilos tuberculosos pueden entrar y unirse a una variedad de receptores del huésped, incluyendo los receptores Fcγ y receptores de complemento (con o sin opsonización), tales como CR1 (CD35), CR3 (CD11b/CD18) y CR4 (CD11c/CD18), así como a los receptores de manosa (MMRc), a receptores de proteínas surfactantes, CD14, y receptores tipo Scavenger¹⁰. Se ha propuesto que dependiendo del receptor que use la micobacteria para entrar al macrófago, dependerá a su vez la respuesta inmune celular (RIC). Por ejemplo, el mecanismo de internalización por receptores Fcγ induce la producción de intermediarios del oxígeno, permitiendo la fusión fagosoma-lisosoma; mientras que la entrada de la micobacteria por vía CR3 previene esta activación de la producción de los metabolitos del oxígeno⁶. La expresión del MMRc sobre la superficie celular esta regulada por una variedad de mediadores que juegan un papel importante en la patogénesis de la tuberculosis, se ha mostrado que el interferón gamma (INFγ), regula negativamente la expresión del MMRc, mientras que incrementa la capacidad de las células para matar a los microorganismos¹¹.

Recientemente, se ha descrito un papel esencial del colesterol en la entrada del bacilo tuberculoso al macrófago. Gatfield y Pieters describieron que el colesterol se acumula en sitios en donde entra la micobacteria a la célula hospedera, la ausencia de colesterol en estos sitios inhibe la entrada del bacilo¹². Estos sitios conocidos como Rafts, son microdominios en la membrana plasmática, ricos en colesterol y glucoesfingolípidos, y resistentes a la solubilización en detergentes no iónicos a bajas temperaturas. Diversos estudios han demostrado la participación de los Rafts en la activación de la inmunidad celular^{13, 14, 15}.

Una vez dentro del macrófago se forma una vesícula que recibe el nombre de fagosoma donde se encuentra el material fagocitado. La fusión de los fagosomas con los lisosomas conduce a la formación de los fagolisosomas en los que las enzimas proteolíticas almacenadas en los lisosomas entran en contacto con los microorganismos fagocitados y los destruyen. Dentro de las vacuolas lisosomales existen potentes enzimas hidrolíticas capaces de degradar un amplio rango de macromoléculas incluyendo microorganismos. Estas enzimas actúan óptimamente a un pH ácido, condiciones que se encuentran dentro de los lisosomas, los cuales son los organelos más ácidos encontrados en las células animales: pH 4.5-5.0; este microambiente ácido es mantenido por la H⁺ATPasa vacuolar^{16, 17}.

Los constituyentes tóxicos encontrados dentro de las vesículas ácidas incluyen: hidrolasas lisosomales; radicales libres del Oxígeno (ROI) tales como H₂O₂ y O₂⁻; radicales libres del nitrógeno (RNI) como óxido nítrico (NO) y NO₂¹⁸. La producción

de los RNI por los macrófagos murinos es un importante mecanismo efector contra la variedad de patógenos. El NO es formado por la vía enzimática a partir de la vía L-arginina, controlada por la enzima óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS). A altas concentraciones el NO es tóxico, contribuye significativamente a la muerte intracelular y extracelular de microorganismos¹⁹.

La respuesta inmunológica en la tuberculosis.

Se han caracterizado los perfiles de citocinas, encontrando que las citocinas de tipo 1 tienen un papel importante en la protección, también existe la participación relevante de algunas citocinas proinflamatorias. Una de ellas es el TNF α , que tiene una actividad importante en la protección contra la infección. Hirsch y col. Encontraron una clara inhibición del crecimiento intracelular de *Mycobacterium tuberculosis* en macrófagos alveolares, dirigida por la producción de TNF α .²⁰ La progresión de la infección en el humano está vinculada a la producción de citocinas tipo 2, estas citocinas pueden modular negativamente la expresión de las citocinas de tipo 1, así como algunas otras actividades celulares. Dentro de este grupo, la IL-10 se comporta como una importante reguladora de la respuesta de tipo 1 y de la activación macrofágica. Interfiere con una adecuada activación celular microbicida, afectando negativamente la formación del granuloma mediante la inhibición de síntesis de TNF α y debido a la interrupción del diálogo intercelular. La IL-10 impide la expresión de moléculas coestimuladoras (CD80, CD86), moléculas de adhesión (molécula de adhesión intercelular 1: ICAM-1) y de las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad clase II (MHCII), en las células efectoras. Además la IL-10 regula negativamente la producción de la iNOS e induce la producción del receptor soluble tipo 2 para el TNF α (sTNFRII)²¹.

El establecimiento de un patrón de respuesta dominado por citocinas de tipo 2, se encuentra asociado a la progresión de la infección tuberculosa. Por lo tanto, resulta importante determinar cuáles son los agentes moleculares que desregulan la respuesta de tipo 1, guiándola hacia un perfil tipo 2; pues esto nos permitiría manipularlos para reestablecer un perfil inmunológico protector, el cual podría coadyuvar a disminuir el tiempo para alcanzar la eliminación completa de la micobacteria. Uno de los factores que polariza la respuesta hacia el perfil tipo 2 es la carga antigénica, una dosis antigénica elevada se asocia a la producción de citocinas de tipo 2; mientras que, una dosis de antígeno baja promueve la síntesis de citocinas de tipo 1. Lo anterior, fue encontrado en modelos donde se utilizan antígenos particulados (micobacterias, leishmanias)^{22,23}.

Mecanismos de evasión.

Mycobacterium tuberculosis posee mecanismos específicos para evadir su destrucción. Por ejemplo, los fagosomas que contienen al bacilo vivo, resisten la fusión con los lisosomas al impedir la acidificación de éstos. Los mecanismos moleculares por los cuales el fagosoma micobacterial resiste a la fusión lisosomal, aun no son claros. Varios estudios al respecto, han demostrado que los fagosomas que contienen al bacilo vivo expresan marcadores endosomales tempranos (Rab5), pero pierden otros marcadores que son específicos (Rab7) en estadios tardíos del camino endocítico. Los estadios con *Mycobacterium avium* y *Mycobacterium tuberculosis*, demuestran que las vacuolas que contienen a la micobacteria adquieren proteínas de la membrana lisosomal (LAMP1 y LAMP2) y cathepsina D, pero carecen de la protón ATPasa vesicular, que es la responsable de la acidificación del fagosoma^{24,25}.

Recientemente se describió y se dio a conocer que la “tryptophan aspartate-containing coat protein” o TACO, normalmente es disociada en el curso de la maduración del fagosoma, y que esta disociación es requerida para la subsecuente fusión lisosomal. Ferrari y col., demostraron que TACO es retenida por los fagosomas que contienen al bacilo tuberculoso vivo, pero no en aquellos que contienen bacilos muertos por calor. Estos datos sugieren que *Mycobacterium tuberculosis* retiene a la proteína TACO en el fagosoma como un medio para prevenir la fusión fagosoma-lisosoma y así la destrucción de la micobacteria²⁶.

Morfología de los neutrófilos.

La médula ósea es el sitio de diferenciación y proliferación de las células progenitoras de los neutrófilos y la maduración terminal de los granulocitos neutrofilicos (mieloblasto a neutrófilo segmentado)^{27, 28} (Fig. 1). La proliferación de células precursoras, se da en cinco divisiones que toman lugar únicamente durante las primeras tres etapas de la maduración del neutrófilo (blasto, promielocito y mielocito). Después de la etapa mielocítica, las células no son capaces de realizar la mitosis y entran a un pool de almacenaje en la médula. Después de cinco días, son liberados al torrente sanguíneo, donde circulan por unas horas antes de entrar a los tejidos²⁹.

Producción y Distribución de los Neutrófilos.

Los neutrófilos son producidos en la médula ósea, ellos vienen de células progenitoras y precursoras por un proceso de proliferación celular y maduración. El primer neutrófilo precursor reconocido microscópicamente es el mieloblasto. La secuencia formal de desarrollo del precursor es: mieloblasto → promielocito → mielocito → metamielocito → neutrófilo en banda → neutrófilo segmentado. El término *granulocito* es comúnmente utilizado para referirse a los neutrófilos pero estrictamente hablando incluye a los eosinófilos y basófilos también.

Los neutrófilos maduros son almacenados en la médula ósea antes de liberarse dentro de la sangre. Ellos dejan la circulación al azar, con una media de tiempo de aproximadamente 6 hrs. Esas células después entran a los tejidos y probablemente funcionan por un día o dos antes de su muerte o pérdida dentro del tracto gastrointestinal a través de las superficies de mucosas. El sistema neutropoyético tiene un alto volumen de producción, y este es finamente modulado en estado constante y tiene una gran capacidad a incrementar la producción en respuesta al estímulo inflamatorio³⁰.

Neutrófilos en los Tejidos.

La migración hacia las áreas de inflamación ha sido ampliamente estudiada, pero poco se conoce del lugar de esas células en los tejidos normales. Los neutrófilos normalmente migran hacia el pulmón, cavidad oral, tracto gastrointestinal, hígado y bazo. Pueden perderse neutrófilos en las superficies mucosas o morir en los tejidos y ser degradados por macrófagos. El promedio de vida de un neutrófilo maduro se ha pensado que es muy corto, aunque una célula individual puede sobrevivir hasta 2 semanas³¹. El lapso de vida de un neutrófilo puede ser acortado si este captura una bacteria u otra partícula. Los estímulos quimiotácticos, tales como C5a e IL-8, atraen neutrófilos a las áreas de infección, donde ellos pueden morir en grandes cantidades.

Funciones de los neutrófilos.

La función primaria de los neutrófilos es proteger al hospedero contra infecciones bacterianas. Su función está estrechamente relacionada con los linfocitos y macrófagos, células que también están involucradas en la respuesta a la infección. La exposición de neutrófilos a una variedad de partículas y estímulos solubles, evoca una serie de respuestas, incluyendo quimiotaxis, fagocitosis, degranulación, estimulación de la vía derivada del monofosfato de hexosa, generación de derivados reactivos de oxígeno, liberación de calcio ligado a membrana y reorganización del citoesqueleto.

Ingestión.

Cuando un neutrófilo entra en contacto con una partícula, el pseudópodo fluye alrededor de la partícula, esta extensión se fusiona, y con esto encierra la partícula dentro del fagosoma. La fase de ingestión puede ser desde la extensión para el reconocimiento hasta la fusión final del pseudópodo. La partícula es así encerrada dentro de un fagosoma en el cual los gránulos son rápidamente descargados. El número de partículas ingeridas puede ser eventualmente limitado por la disponibilidad de membrana plasmática. La locomoción no es un prerrequisito para la ingestión: si los neutrófilos chocan con una partícula no secretora de sustancias quimiotácticas, el pseudópodo se forma repentinamente en el punto de contacto y envuelve a la partícula. Las partículas ingeridas gradualmente se mueven hacia el interior de la célula, donde se confunden con el núcleo y los gránulos citoplásmicos cuando la célula se aleja. La formación de un pseudópodo es esencial para la locomoción del neutrófilo. El pseudópodo es requerido también para la ingestión. La fusión de membranas es una característica común de (1) **ingestión**, donde se fusiona el pseudópodo; (2) **degranulación**, donde los gránulos se fusionan con el fagosoma; y posiblemente (3) **locomoción**, donde algunos gránulos pueden fusionarse con la membrana plasmática. El pseudópodo se forma si el neutrófilo se encuentra suspendido en medio líquido o si se encuentra adherido a una superficie, cuando están adheridos a una superficie solamente pueden moverse traslacionalmente. La membrana del neutrófilo se adhiere firmemente a las partículas que ingiere, probablemente esto provee la fuerza de fricción necesaria para mover el pseudópodo alrededor de la partícula³².

Moléculas de Adhesión.

Los neutrófilos circulan en la sangre en un estado no adherente. En la activación el neutrófilo se vuelve más adhesivo, habilitando la marginación hacia la vasculatura mediada por receptores y la subsecuente quimiotaxis y fagocitosis. Un número de proteínas de superficie, las más notables integrinas β_2 y las L-selectinas, han sido identificadas como mediadores de adherencia. Las propiedades de unión de esas moléculas de adherencia dirigen la adhesión transitoria del neutrófilo a las venulas, con el rodamiento característico³³. Las células adherentes son a menudo sensibilizadas, y pueden tener propiedades funcionales substancialmente diferentes comparadas con las células en suspensión. Cuando los neutrófilos están en suspensión, ellos se agregan si son estimulados con factores quimiotácticos, un proceso que es diferente de la adherencia. Una secuencia de eventos moleculares y biofísicos dirigidos a la activación de neutrófilos e incrementar su adherencia durante la respuesta inflamatoria aguda in vivo, se muestra en la Fig. 2.

Un neutrófilo activado entra por venulas post-capilares adyacentes al sitio de la infección y desarrolla interacciones adhesivas transitorias con el endotelio inflamado, por la vía específica de moléculas de adhesión. Las selectinas de células endoteliales

(E-selectina y P-selectina) son induciblemente expresadas por las células endoteliales seguidas de la exposición a citocinas proinflamatorias tales como Factor de Necrosis Tumoral (TNF) y la interleucina 1 (IL-1) (productos de fagocitos mononucleares estimulados con endotoxinas)³⁴. El rodamiento del neutrófilo es un prerrequisito para la transición a una interacción con el endotelio inflamado que es más resistente en condiciones de estrés. La firme adhesión es mediada por unas clases separadas de moléculas cuyo nivel de expresión y afinidad funcional son incrementadas por altas concentraciones locales de estímulos inflamatorios³⁵. Específicamente, sobre las células endoteliales la glucoproteína ICAM-1 (CD54) es inducida por citocinas que incluyen TNF e IL-1. ICAM-1 sirve como un blanco de reconocimiento para la integrina β_2 del neutrófilo, Mac-1 (CD11b/CD 18) y LFA-1 (CD11a/CD18). La relativa afinidad de Mac-1 y LFA-1 por ICAM-1 es incrementada por la exposición de neutrófilos a numerosos estímulos, incluyendo C5a, péptidos bacterianos N-formilados (FMLP), IL-8 (sintetizada por el endotelio inflamado), y LTB₄³⁴. La alta afinidad entre los neutrófilos y las células endoteliales, es dependiente de las integrinas β_2 , promueve la subsecuente migración trasendotelial a través de la membrana basal. Esta migración continúa hacia la matriz extracelular en respuesta a gradientes locales de factores quimiotácticos. Durante la activación neutrofilica, existe una relación recíproca en la membrana plasmática entre la expresión de L-selectina y de β_2 integrina, Mac-1. Los sitios receptores de Mac-1, tienen una expresión basal y afinidad baja, pero aumentan de 10 a 20 veces después de la estimulación. Los cambios en la afinidad y expresión de superficie ocurren en los segundos o minutos siguientes a la estimulación³⁵. Las integrinas CD11/CD18 son vitales para la firme adherencia y transmigración. La completa inhibición de CD18, la cadena β_2 común de las integrinas leucocitarias, reduce profundamente la emigración de neutrófilos a los sitios de inflamación pero conduce a un síndrome de inmunodeficiencia severa llamado Deficiencia de Adhesión Leucocitaria tipo I (LAD I). Otro tipo de deficiencia, LAD II, es relacionado a defectos en síntesis de ligandos de glicoproteína para adhesión de moléculas. La lesión inflamatoria mediada por neutrófilos, que es dependiente de esos eventos adhesivos, puede ocurrir por uno o varios mecanismos: (a) activación de la hiperadherencia neutrofilica integrina-dependiente fomentando la agregación homotípica (mediada por CD11b/CD18) que puede resultar en el entorpecimiento de la circulación en los microvasos, provocando una isquemia distal³⁶, (b) altas concentraciones de estímulos inflamatorios causan degranulación neutrofilica y la liberación de una variedad de proteasas que pueden causar proteólisis destructiva de la matriz extracelular adyacente; y (c) la generación de NADPH oxidasa-dependiente de metabolitos oxidativos provenientes de neutrófilos, principalmente por endotoxinas, citocinas inflamatorias, y/o adhesión de sustrato y estimulación por otros factores de activación, pueden promover directamente lesiones en células endoteliales o promover los efectos destructivos de las proteasas secretadas.

Mecanismos bactericidas no oxidativos.

Defensinas.

De las varias proteínas encontradas en los neutrófilos, las defensinas son las más comunes y las de menor peso molecular. Estas proteínas tienen menos de 4 kD de peso, constituidas por 29-33 aminoácidos y constituyen del 5 al 8 % de las proteínas celulares totales³⁷. Las defensinas tienen una inusual estructura cíclica y aparecen para matar bacterias por ruptura de su membrana exterior, estas, también pueden inducir rupturas de hebras sencillas de DNA en células blanco. Se ha reportado que las defensinas son quimiotácticas para fagocitos³⁸.

Familia CAP37.

Este grupo de proteínas cationicas neutrofilicas, las cuales incluyen catepsina G y azurocidina además de CAP37, partes de secuencias con considerable homología a otras proteasas inflamatorias. CAP37 es ambas bactericida y quimiotáctica³⁷. También aparece una forma parecida a esta proteína, localizada en los gránulos azuròfilos. Una vez afuera del neutrófilo, esta puede estimular la actividad de PKC en las células endoteliales, sin embargo, esta ha sido reportada que participa en la acidificación del fagolisosoma promoviendo la acción antimicrobiana de CAP37.

Familia BPI.

Proteína bactericida que incrementa la permeabilidad (BPI), proteína cationica que lisa bacterias Gram negativas, pertenece a una familia que incluye CAP57 y proteínas de unión a lipopolisacaridos³⁷. Al igual que las defensinas, miembros de la familia BPI han mostrado que también destruyen las membranas bacterianas.

Mecanismos bactericidas oxidativos.

Los neutrofilos activados producen diversos metabolitos del oxigeno con capacidad antimicrobiana, incluyendo aniones superoxidados (O_2^-), H_2O_2 , radicales hidroxilos (OH^\cdot), ácido hipocloroso ($HOCl$) y oxigeno simple. La evidencia indica que esos metabolitos reactivos son generados por un NADPH-oxidasa dependiente, localizado sobre la membrana plasmática, quien reduce el oxigeno molecular a O_2^- . La importancia de la NADPH-oxidasa esta demostrada en individuos con enfermedad granulomatosa crónica (CGD) cuyos neutrófilos no pueden generar O_2^- y los metabolitos relacionados con este. *Staphylococcus aureus* es el patógeno más común en este desorden.

Antecedentes.

Neutrófilos en la infección por *M. tuberculosis*.

El neutrófilo es un fagocito profesional con un rol crucial en la defensa del huésped contra infecciones por parásitos extracelulares. Datos recientes de modelos en ratón muestran que los neutrófilos también juegan un rol protector en infecciones por parásitos intracelulares³⁹. La importancia de los neutrófilos en la defensa del huésped contra microbios intracelulares que causan infecciones crónicas, tales como micobacteria, había sido descartada previamente por dos razones. Primero, el neutrófilo tiene un tiempo de vida corto, y segundo, el bacilo crece dentro de macrófagos, siendo desplazado de la actividad fagocítica de los neutrófilos. Sin embargo, algunos autores han mostrado que los neutrófilos son reclutados persistentemente en los sitios de infección micobacteriana^{40, 41}. Ahora se sabe que esta respuesta de neutrófilos es bifásica, con un momento de máxima emigración en el primer día de infección seguido por un segundo momento alrededor de los días 8 al 15 (estudios en el modelo en ratón del Dr. Rogelio Hernández Pando muestran ese segundo flujo de neutrófilos entre los días 21 y 28 post infección) y este es perdurable hasta el final de la infección. El primer pico es no específico, mientras que el segundo es dependiente de células T⁴¹. La importancia de este flujo de neutrófilos ha sido dirigida por el estudio de respuestas a cepas de micobacterias de diferente virulencia o por la comparación de micobacterias vivas y muertas⁴⁰. Los neutrófilos son las primeras células que arriban en respuesta a la infección con *M. tuberculosis*⁴², estas células juegan un rol crítico en la restricción de la replicación microbiana y la diseminación temprana después de la entrada del patógeno. Para hacer esto los neutrófilos exhiben una doble función. Primero, los neutrófilos fagocitan patógenos eficientemente⁴³ y exhiben una potente actividad microbicida mediada por enzimas granulares, péptidos antimicrobianos, proteínas y reactantes intermediarios del oxígeno y nitrógeno^{44, 45}. Como una de las más eficientes células fagocíticas del sistema inmune, los neutrófilos restringen, al inicio, la replicación local de numerosos patógenos y con esto retrasan su diseminación sistémica. Segundo, los neutrófilos liberan un orden de citocinas y quimiocinas y atraen otras células de la inmunidad innata así como del sistema inmune adquirido^{46, 47}. La migración de macrófagos que sigue el influjo de neutrófilos es el resultado de un factor quimiotáctico liberado por los neutrófilos en respuesta a la micobacteria⁴⁸.

Se ha mostrado que los neutrófilos destruyen cepas virulentas de *Mycobacterium tuberculosis* *in vitro*⁴⁹. Lo cual sugiere que estas células juegan un rol importante en la defensa contra la micobacteria y no deben ser vistos solamente como fagocitos o almacén de enzimas proteolíticas, pues son células capaces de responder a mediadores en su medio ambiente y generar citocinas. La respuesta posterior de los neutrófilos puede ser importante para el reclutamiento de neutrófilos adicionales o para orquestar la respuesta inmune convencional en los sitios de inflamación.

Producción de citocinas por neutrófilos.

Estudios *in vitro* muestran que los aislados frescos de neutrófilos PMN humanos, tienen la capacidad de expresar mRNA para una variedad de proteínas que están involucradas en sus funciones efectoras. Varios grupos han presentado evidencia de que los PMN pueden liberar Factor de Necrosis Tumoral α (TNF α)^{50, 51} interleucina 1 β (IL-1 β)^{52, 53}, la IL-1 receptor antagonista (IL-1ra)⁵³, IL-8^{54, 55, 56}, y factor de crecimiento transformante β 1 (TGF- β 1). También ha sido reportada la habilidad de los PMN de liberar interferón α (INF- α), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF),

factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), IL-3⁵⁷ e IL-12.

A la lista de citocinas producidas por PMN también se agregan las quimiocinas proteínas inflamatorias de macrófagos 1α (MIP-1 α) y MIP-1 β , la habilidad de PMN de secretar MIP-1 α y MIP-1 β , puede ser de considerable importancia ya que estas moléculas son potentes quimioatrayentes para monocitos y subpoblaciones de células T. El hecho de que los PMN produzcan IL-8, el principal quimioatrayente para neutrofilos, sugiere que, una vez que los granulocitos han arribado al sitio de inflamación, ellos pueden promover el reclutamiento posterior de neutrofilos, así como la subsecuente acumulación y activación de monocitos, macrófagos y linfocitos.

Justificación.

En estudios previos se ha demostrado parcialmente el papel que juegan los neutrófilos en la defensa del organismo contra la tuberculosis, suprimiendo la replicación de la micobacteria y evitando su diseminación sistémica, así como también se ha puesto a prueba su capacidad fagocítica y su capacidad de biosíntesis para liberar mediadores proinflamatorios que puedan retroalimentar el sistema y aumentar la respuesta inflamatoria en el sitio de infección. No obstante, la mayoría de los estudios han sido efectuados *in vitro* y los estudios *in vivo* se han hecho empleando vías de inoculación inadecuadas (vía intravenosa) y/o por medio de aerosoles que impiden controlar la dosis infectante.

En nuestro laboratorio se dispone de un modelo de tuberculosis pulmonar murina experimental, plenamente caracterizado a nivel histopatológico, microbiológico e inmunológico. En este modelo se distinguen dos fases: una temprana y otra progresiva. Es en la fase temprana donde se observan dos momentos de máxima emigración de neutrófilos a los pulmones; el primero esta comprendido entre los días 1 y 7, el segundo se observa entre los días 21 y 28 postinfección. En la fase temprana de este modelo se presenta un infiltrado inflamatorio constituido por células mononucleares, en los diferentes compartimentos pulmonares: intersticio, área perivascular y área peribronquial. Es en esta etapa donde se presenta la aparición y maduración de los granulomas.

En la fase progresiva de la tuberculosis murina se presentan áreas neumónicas extensas, zonas de necrosis focal y de fibrosis intersticial. Lo anterior es indicativo de la progresión de la infección y de la incapacidad del sistema inmunológico del ratón para controlarla; la respuesta inmune celular protectora se abate, como lo muestran las pruebas de hipersensibilidad retardada.

Tomando en cuenta el papel dual que tienen los neutrófilos como elementos importantes para la contención de la micobacteria y como células reguladoras de la respuesta proinflamatoria y de inmunidad celular; nos propusimos analizar la capacidad fagocítica de los neutrófilos y la participación de estas células durante la evolución de la tuberculosis pulmonar murina.

Hipótesis.

Los neutrófilos son células fagocíticas profesionales, que no solo contribuyen innatamente a la eliminación de micobacterias sino también en el establecimiento de una adecuada respuesta de inmunidad celular, por lo tanto la eliminación de estas células en los primeros días de la infección, modificara la respuesta inmunológica e histopatológica generada en contra de *Mycobacterium tuberculosis* en los pulmones.

Objetivos.

Objetivo general.

Estudiar la participación de los neutrófilos en la tuberculosis pulmonar experimental murina.

Objetivos específicos (1ª fase).

Determinar la cinética y comparar la capacidad de los neutrófilos en la fagocitosis y eliminación de micobacterias con los macrófagos.

Determinar la producción de citocinas por parte de los neutrófilos activados por *Mycobacterium tuberculosis*.

Objetivos específicos (2ª fase).

Evaluar la respuesta inflamatoria e inmunológica en los pulmones de animales infectados con *Mycobacterium tuberculosis* después de haber eliminado a los PMN a través de la administración de anticuerpos monoclonales citotóxicos específicos.

Materiales y Métodos.

Ratones.

Se emplearon ratones machos Balb/c singénicos, de 8 semanas de edad, libres de patógenos. Mantenidos en condiciones óptimas, en grupos de 10 ratones por microaislador. Durante el proceso de infección se mantuvieron dentro de microaisladores, provistos de filtros como medida de bioseguridad P3. Los ratones fueron aportados y mantenidos en el Bioterio del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán".

Crecimiento y preparación de las micobacterias.

La cepa virulenta de *M. tuberculosis* H37Rv fue crecida en medio Proskauer y Beck modificado por Youmans, a 37° C en una atmósfera de CO₂ al 5%, por tres semanas. El cultivo se mantuvo en condiciones estacionarias. Después de este período, la biomasa bacteriana fue colectada por centrifugación (3500 rpm, durante 20 min.) A las micobacterias sedimentadas, se les agregó un volumen igual de solución salina fisiológica con Tween 80 (SIGMA, St. Louis, MO, USA) al 0.05%, incubándolas bajo las mismas condiciones de crecimiento por 24 horas. Transcurrido este tiempo, la biomasa micobacteriana fue cubierta completamente con perlas de vidrio estériles. Los agregados micobacterianos fueron disgregados con agitación vigorosa por 1 min. y dejándolas reposar otro, este procedimiento fue efectuado con un vortex y se repitió diez veces. Después, la suspensión bacteriana fue centrifugada a 3000 rpm por diez minutos. El proceso de disgregación se repitió nuevamente, bajo las condiciones previamente mencionadas, pero ahora las micobacterias fueron centrifugadas a 1500 rpm por 10 min., para coleccionar una suspensión con bacterias totalmente separadas, presentes en el sobrenadante. El sobrenadante fue coleccionado y centrifugado a 3500 rpm por 20 min. El paquete celular fue lavado dos veces con solución salina fisiológica estéril (SSF) y centrifugado a 3500 rpm. Finalmente después del segundo lavado las micobacterias fueron resuspendidas en un volumen apropiado de SSF estéril. Esta suspensión se destino también para determinar el número de micobacterias viables.

Determinación de la viabilidad micobacteriana.

A partir de la suspensión micobacteriana, se realizaron diluciones seriadas con PBS, pH 7.4 (1:50, 1:100, 1:200). A 25 µl de cada una de las soluciones se les agregaron 25 µl de la solución de trabajo. La solución de trabajo esta compuesta de 12.5 µl de la solución concentrada de diacetato de fluoresceína (5 mg. de diacetato defluoresceína disueltos en 1 ml. de acetona fría, SIGMA, St. Louis, MO, USA) más 1 ml. de PBS. Posteriormente, la suspensión con la micobacteria y el diacetato de fluoresceína, fue depositada en la cámara de Neubauer. El número de micobacterias viables se determinó utilizando un microscopio de fluorescencia, contando las bacterias que procesaron metabólicamente el colorante y tomando en cuenta la dilución correspondiente⁵⁸. La suspensión de micobacterias se ajustó a una concentración de 1×10^7 micobacterias/ml. Antes de la inoculación, la viabilidad fue determinada otra vez, siguiendo el mismo procedimiento.

Obtención del mAb RB6-8C5.

Se utilizaron 60 ratones desnudos de 6 a 8 semanas de edad libres de patógenos, machos ya que estos producen mayor liquido ascítico que las hembras, a estos ratones les fue inoculado el hibridoma que secreta el Anticuerpo Monoclonal RB6-8C5, donado por el Dr. R. Coffman del DNAX Research Institute, Palo Alto, California, el cual es una inmunoglobulina G2b de rata, específica para neutrófilos, el antígeno de RB6-8C5 es expresado en altos niveles en neutrófilos murinos (Hestdal et al.1991). El anticuerpo

monoclonal RB6-8C5 reconoce específicamente, y es capaz de depletar a los neutrofilos cuando es administrado en ratones. Este anticuerpo no depleta macrófagos, células Natural Killer, o linfocitos B o T.

A estos ratones les fue inyectado de 0.5 a 1.0 ml de PRISTANE (2, 6, 10,14-tetramethylpentadecane; Aldrich) intraperitonealmente, el PRISTANE es un aceite que funciona como adyuvante para favorecer el desarrollo del hibridoma, este aceite atrae al peritoneo células inflamatorias, las cuales liberan citocinas y dan las condiciones adecuadas para el buen desarrollo del hibridoma, este aceite se debe inyectar como mínimo una semana antes de inocular el hibridoma o dos semanas antes como máximo.

Materiales.

- Ratones desnudos de 6 a 8 semanas de edad y específicamente libres de patógenos
- PRISTANE (2, 6, 10,14-tetramethylpentadecane; Aldrich)
- Hibridoma RB6-8C5
- Medio DMEM-10 con 10 mM HEPES y 1 mM de piruvato de sodio

Preparación del medio de cultivo DMEM:

Componentes:

- Suero Fetal Bovino. Hyclone al 10 %

Suplementos:

- Penicilina/Estreptomicina
- Glutamina
- Piruvato
- Bicarbonato
- Ac. esenciales
- Beta-mercapto

Para preparar 200 ml de medio DMEM:

- 100 ml de medio DMEM 2x
- 20 ml de suero Hyclone al 10%

Suplementos:

- Penicilina/Estreptomicina 1 ml por cada 100 ml de medio.
- Glutamina 1 ml por cada 100 ml de medio.
- Bicarbonato 1.3 ml por cada 100 ml de medio.
- Piruvato 1 ml por cada 100 ml de medio.
- Ac. esenciales 1 ml por cada 100 ml. de medio.
- Beta-mercapto 1 ml por cada 100 ml de medio.

Se aforo con agua recientemente desionizada, estéril a 200 ml o el volumen que fuese requerido, (cambiar el volumen requerido lógicamente cambia las cantidades de cada componente).

Si el medio va a ser utilizado en ese momento, una vez que sea suplementado se deberá filtrar por una membrana de 0.45 micras, si no es así, se dejara incubar algunos días (4 o 5 días) con su respectiva prueba de esterilidad (Prueba de esterilidad: Tomar 2 ml del medio recién suplementado y se coloca en un tubo de ensaye estéril y se incuba a 37 grados centígrados)

- PBS estéril
- Agujas de calibre 20 o 22 y 18
- Matrazes para cultivo de tejidos de 175 cm²

- Rotor Beckman TH-4 o equivalente
- Tubos cónicos de polipropileno estériles de 15 y 50 ml.
- Baño de agua 56°C

Una vez que se inyectó el PRISTANE fue necesario iniciar la expansión de las células de hibridoma, esta expansión tardó 7 u 8 días para alcanzar la cantidad necesaria de células viables para poder inyectar 1 millón /ml, en cada uno de los ratones desnudos a utilizar.

Una vez terminada la expansión del hibridoma, este debió cosecharse y contarse, para esto se utilizó un pipeteador automático para transferir el cultivo a los tubos de centrifuga cónicos de 50 cc, se centrifugó el cultivo 5 minutos a 1500 rpm (500 x g) en un rotor TH-4 y se descartó el sobrenadante, las células fueron resuspendidas en 50 ml de PBS estéril y centrifugadas 5 minutos a 500 x g, y se descartó nuevamente el sobrenadante, se repitió esta operación dos veces. Después del último lavado las células de hibridoma fueron resuspendidas en 5 o 10 ml de PBS estéril y se prepararon diluciones 1:10 o 1:20 para contar las células en una cámara de Newbauer, después de conocer el número total de células, fue necesario saber el número total de células viables para esto se hizo una dilución volumen a volumen de la suspensión celular y Azul de Tripano, una vez concluido este conteo fue posible calcular que cantidad de PBS estéril debía agregarse a la suspensión celular para poder tener una concentración de 1 millón de células/ml.

Producción de ascitis conteniendo los mAb.

El procedimiento general implica la inducción de inflamación no específica en la cavidad peritoneal de un ratón huésped, usualmente con PRISTANE, y la inyección de células de hibridoma. Las células tumorales entonces crecerán como ascitis tumoral y deberá continuar la secreción de mAb. Eventualmente, el ratón desarrollará una gammapatía monoclonal similar a la enfermedad humana, mieloma múltiple, en donde las proteínas monoclonales alcanzan altos títulos en el suero. Ya que la combinación de la ascitis tumoral y el PRISTANE resulta en un exudado inflamatorio en la cavidad peritoneal, la ascitis deberá contener concentraciones de mAb similares a las que se encuentran en suero.

El hibridoma fue inyectado por vía i.p. en el ratón desnudo, usando una aguja calibre 22, una vez inyectado el hibridoma se esperó de una a dos semanas para la producción de líquido de ascitis.

La recolección de ascitis se hizo inmovilizando al ratón en una mano a manera de tensar la piel abdominal dilatada. Con la otra mano se insertó una aguja calibre 18 uno o dos centímetros dentro de la cavidad abdominal. Entrando en cualquiera de los dos cuadrantes inferiores, izquierdo o derecho, evitando los órganos vitales en los cuadrantes superiores y los vasos principales en la línea media. Cada ratón en promedio produjo entre 2 y 5 ml de líquido de ascitis. Permitiendo que la ascitis caiga gota a gota dentro de un tubo cónico estéril de polipropileno de 15 ml.

La ascitis obtenida se centrifugó 10 minutos en un rotor TH-4 a 2700 rpm (1500 x g) a temperatura ambiente, ya que el fluido ascítico contiene muchos elementos sólidos como células inflamatorias y células de hibridoma, entre otras cosas, las cuales fueron eliminadas por medio de la centrifugación. Se colectó el sobrenadante y se descartó el sedimento. El fluido ascítico se almacenó a 4 °C hasta que toda la colección fue completada (aproximadamente una semana). Para que los ratones reacumularan ascitis se permitió que pasaran 2 o 3 días antes de recolectar líquido de ascitis nuevamente. La ascitis que se obtuvo se procesó como se mencionó anteriormente. Se repitió este

proceso hasta que ya no se obtuvo líquido de ascitis, el fluido no podía ser colectado, o el ratón se convertía en un ratón enfermo. El ratón debía ser sacrificado en este punto. El pool de fluido ascítico colectado en los diferentes días era inactivado por calor 45 min., en un baño maría a 56 °C.

Purificación del Anticuerpo.

El fluido ascítico contiene IgG de ratón no inmunes y en mayor grado los sobrenadantes de cultivos contienen proteínas de suero bovino esas pueden interferir con algunas aplicaciones de los anticuerpos monoclonales. El suero policlonal requiere purificación antes de marcarlo pero esto no es tan crucial con los anticuerpos monoclonales, aunque es posible algunas veces ser necesaria la protección del sitio activo del anticuerpo con un inmunoabsorbente. Sin embargo, la elusión del anticuerpo de este adsorbente puede causar daño adicional, especialmente si el anticuerpo es de muy alta afinidad. El efecto del procedimiento de purificación sobre la inmunoreactividad debería siempre ser probado previamente antes de usarlo.

Ahora hay un número de productos de Proteína G disponibles, incluyendo una forma recombinante de (BDH) que se liga fuerte y únicamente a la IgG de algunas especies de mamíferos.

Purificación de anticuerpos por precipitación con Sulfato de Amonio.

Materiales.

Sulfato de amonio saturado (SAS):

Disolver 1000 g de sulfato de amonio en un litro de agua a 50 grados centígrados.

Reposar toda la noche a temperatura ambiente.

Ajustar pH a 7.2 con amoniaco diluido o ácido sulfúrico.

Fluido ascítico

PBS

Hielo

Tubos de centrifuga.

Método.

1.- Diluir el fluido ascítico 1:2 en PBS en recipiente con hielo.

2.- Adicionar SAS gota a gota a una concentración final de 45% de saturación, homogenizando en todo momento la mezcla de fluido ascítico con el SAS al 45%; centrifugar a 10000 x g, 15 minutos a 4 grados centígrados.

3.- Lavar el precipitado con SAS al 45 % y centrifugar a 10000 g por 15 min. a 4 °C.

4.- Disolver el precipitado en un volumen de PBS igual a la mezcla que se preparó en el paso 1 y centrifugar a 10000 x g, 15 minutos a 4 grados centígrados para poder remover cualquier material insoluble.

5.- Transferir el sobrenadante a un tubo limpio y reprecipitar la Ig usando una concentración final de 40% de SAS.

6.- Centrifugar a 10000 x g, 15 minutos a 4 grados centígrados.

7.- Disolver en un volumen mínimo de PBS (0.5 ml) y dializar contra 5 o 6 litros de PBS a 4 grados centígrados toda la noche.

8.- Centrifugar a 5000 x g, 15 minutos, a 4 grados centígrados, para remover el material insoluble.

9.- Hacer alícuotas de 3 ml y congelar hasta que se utilicen.

Después de la purificación fue necesario incubar el fluido ascítico con la resina (la resina esta compuesta por partículas de sepharosa a las cuales se les adhirió

covalentemente proteína G, la cual tiene gran afinidad por la Inmunoglobulina G) en un tubo de polipropileno estéril (es necesario agregar azida de sodio a una concentración final de 0.05 % con la finalidad de evitar que se contaminen el líquido de ascitis y la resina), el tubo de polipropileno se colocó en un agitador orbital, y se incubó por 48 hrs. a 4°C.

Elusión de los anticuerpos RB6-8C5.

Una vez terminado el periodo de incubación fue necesario desprender el Ab RB6-8C5 de la proteína G, fue necesario empaquetar la resina en una columna para poder lavarla con 1 lt de PBS a 4 °C para eliminar todo el anticuerpo que no se pegó a la proteína G. Para desprender el anticuerpo RB6-8C5 de la Prot. G, se utilizó Glicina a pH 2.5 a 4°C, esta se dejó fluir por la columna gota a gota y este goteo fue recolectado en Tris-buffer pH 7.2-7.5 a 4°C en agitación constante para favorecer la homogenización entre la Glicina y el amortiguador; el RB6-8C5 es una proteína y no puede estar por mucho tiempo en un pH tan ácido debido a que puede sufrir desnaturalización.

La relación que se utilizó de Glicina-Tris fue 1:3.

Tris 1 M pH 7.2 - 7.5 24.22 g/ 200 ml.

Glicina 0.2 M pH 2.5 1.5 g/ 100 ml.

Se utilizaron 50 ml de Glicina y 100 ml. de Tris-buffer aproximadamente para una alícuota de 3 ml de fluido ascítico.

Concentración y cuantificación del RB6-8C5.

Una vez terminada la elusión fue necesario concentrar el anticuerpo, para esto se pasó el eluido a través de una membrana con un PM de 10000 Da, para eliminar el Tris Buffer y la Glicina lo más que sea posible (es necesario reducir el volumen de 150 ml después de la elusión a 5 o 7 ml aproximadamente). Una vez conseguido esto el concentrado fue dializado contra 6 u 8 litros de PBS a 4°C.

Terminada la diálisis se tomó una muestra del concentrado para hacer un corrimiento electroforético en gel de acrilamida, (únicamente se observaron las cadenas pesadas y ligeras del RB6-8C5, en caso de aparecer otra banda sería indicio de contaminación y por lo tanto el anticuerpo no podría ser utilizado, para los fines que se persiguieron en este proyecto).

Una vez que se confirmó la pureza del anticuerpo en el gel de acrilamida, fue necesario cuantificar la proteína para saber qué cantidad de esta teníamos en cada ml del concentrado, para esto se utilizó el método de Folin/Lowry para cuantificación de proteínas.

Análisis FACS para probar la efectividad del mAb RB6-8C5.

Obtenida la cantidad de anticuerpo por ml, procedimos a probar dicho anticuerpo en 20 ratones machos Balb/c de 6 a 8 semanas de edad, se sangró a los 20 ratones y la sangre obtenida fue analizada por medio de un citómetro de flujo Excalibur Becton and Dickinson Cell Sorter (FACS, Mountain View, CA) para obtener los valores de referencia de un ratón normal sano, una vez obtenidos los resultados se le inyectaron a cada ratón por vía intraperitoneal 200 microgramos del anticuerpo RB6-8C5 diluidos en 400 microlitros de solución salina estéril, o PBS estéril, pasadas 20 ó 22 hrs. se volvió a sangrar a los ratones para repetir el análisis de citometría de flujo y con el resultado que arrojó este análisis, se pudo obtener el porcentaje de efectividad del anticuerpo que se produjo.

Los sacrificios se hicieron en los días 1, 2, 3, 7, 14 y 21; sacrificando 5 ratones de cada grupo por cada día de sacrificio, los días de sacrificio se basaron en los días ya establecidos de nuestro modelo murino de tuberculosis pulmonar progresiva.

Los restos de órganos y cuerpo de los ratones se desecharon en bolsas convenientes para ser incinerados.

Obtención del antígeno micobacteriano soluble.

Después de coleccionar la biomasa micobacteriana, el sobrenadante del cultivo de *M. tuberculosis* H37Rv fue filtrado a través de papel whatman No. 1 (Whatman, England) para eliminar los agregados bacterianos. Posteriormente, el sobrenadante fue esterilizado por filtración (Filtro Milipore de 0.22 μm , Millex-GV, Milipore, Watford, UK) y depositado en una bolsa de diálisis con un límite de exclusión de 3500 Da (Spectra /Por, Gardena, CA, USA). Las proteínas solubles micobacterianas fueron concentradas hasta una décima parte del volumen original con sacarosa (J. T. Baker, USA) y dializadas en 1 L de solución salina de boratos por 24 hrs., con el propósito de eliminar el glicerol y otras moléculas de bajo peso molecular. Finalmente, la cantidad de proteína fue determinada por el método de Lowry⁵⁹, ajustando su concentración a 1 mg/ml y almacenándola a -20°C hasta su uso⁶⁰.

Infección de ratones BALB/c con *M. tuberculosis* H37Rv.

En este experimento se utilizaron 60 ratones Balb/c machos de 6 a 8 semanas de edad, a los cuales se les inoculó 1×10^6 de micobacterias vivas y virulentas de la cepa H37Rv, contenidas en 100 microlitros de PBS, por vía intratraqueal. Un grupo de 30 ratones fueron tratados con el mAb RB6-8C5 en la dosis indicada anteriormente, los otros 30 ratones fueron tratados con 400 μl de SSF estéril por vía i.p., ambos grupos recibieron las dosis un día antes y cada tercer día después de la infección.

Los ratones fueron anestesiados con pentotal sódico (56 mg/Kg., administración i.p.) y fijados con masking tape en tablas de unicel forradas con papel aluminio. A nivel del cuello, se depiló a los ratones antes de realizar una pequeña incisión para exponer la tráquea. A cada uno de los ratones se les inocularon 1×10^6 micobacterias vivas y virulentas, contenidas en un volumen de 100 μl . El procedimiento de inoculación se efectuó con una jeringa de insulina, empleando una aguja verde: 21G x 32 mm (0.80 mm). Posteriormente, la incisión fue suturada con seda estéril y los ratones se mantuvieron en posición vertical hasta su completa recuperación^{61, 62}.

Colección de muestras.

Grupos de 5 ratones fueron sacrificados en los días postinfección: 1, 2, 3, 7, 14 y 21 para cubrir la fase temprana de la infección. Los ratones fueron anestesiados con éter etílico y sacrificados por exsanguinación (plexo braquial). El suero fue separado a 3000 rpm por 10 min. En un grupo de cuatro ratones, un pulmón (derecho o izquierdo alternadamente) fue destinado para estudios de citometría de flujo y UFC, el otro pulmón fue perfundido con alcohol absoluto para estudios histológicos. Los pulmones destinados para citometría de flujo fueron procesados al momento, los pulmones destinados para determinar la carga micobacteriana por el método de conteo de UFC fueron inmediatamente congelados en nitrógeno (N_2) líquido y procesándolos a la brevedad. Los pulmones destinados para estudios histológicos, fueron cortados parasagitalmente, para cubrir una mayor superficie pulmonar. Después fueron deshidratados gradualmente en alcohol absoluto, clarificados en xilol (3 cambios) e incluidos en parafina (3 cambios).

Determinación de la carga bacteriana en los pulmones por cuenta de Unidades Formadoras de Colonia (UFC).

El pulmón derecho o izquierdo de cada ratón fue macerado en 3 ml de solución salina estéril, usando un homogenizador de tejidos (POLITRON). Posteriormente, se efectuaron diluciones seriadas decimales, empleando solución salina fisiológica estéril con Tween 80 al 0.05%. Se tomaron 20 μ L de cada dilución y del concentrado, se sembraron por duplicado en medio 7H10 suplementado con ácido oleico, albúmina, dextrosa y catalasa (OADC Difco, Difco Labs, Detroit, MI, USA) y una vez absorbidas en las placas, éstas se invirtieron e incubaron a 37°C, en un atmósfera de CO₂ al 5%, durante 15-21 días. Las colonias micobacterianas fueron identificadas de acuerdo a sus características morfológicas: colonias en bordes irregulares, secas, opacas, rugosas y de color cremoso.

Para la determinación del número de colonias presentes en el pulmón completo se tomaron en cuenta: la dilución, la alícuota, el volumen empleado para el homogenizador pulmonar y tomando en consideración que sólo un pulmón fue homogenizado. Para fines estadísticos se calculó la media y la desviación estándar de un grupo de cuatro ratones por grupo.

Determinación de la respuesta de hipersensibilidad retardada a antígenos micobacterianos solubles.

En los días postinfección establecidos, el grosor del cojinete plantar de los ratones control y del grupo tratado fue medido con un calibrador de ingeniero. Luego se inocularon 200 μ g de antígeno micobacteriano soluble. Posteriormente, a las 24 horas el grosor del cojinete plantar fue medido con un calibrador de ingeniero (código 7308, Mitutoyo, Japan). La diferencia entre el grosor del cojinete plantar a las 24 horas y al tiempo basal, fue multiplicada por 25.4 para obtener el diámetro de induración en micrómetros.

Estudio morfométrico.

A partir de los bloques de parafina se obtuvieron cortes de tejido pulmonar de 4 μ m de grosor usando un micrótopo semiautomático (Leica RM 2145 Milton Keynes, Cambridge, UK). Los tejidos fueron montados en laminillas previamente silanizadas. El silano fue preparado al 2 % en acetona (Sigma, St. Louis, MO, USA). Los portaobjetos limpios se sumergieron por 2 min., en la solución de silano al 2 %, se enjuagaron con agua desionizada y se dejaron secar a temperatura ambiente. Los cortes fueron desparafinados en un horno a 60°C por 10 min. Posteriormente fueron hidratados progresivamente (Xilol, Xilol, Xilol/Alcohol, Alcohol, Alcohol 96 %, Agua) (J. T. Baker, USA).

Para hidratarlos se sumergieron en los xiloles, alcoholes y en agua destilada, durante 5 min. Después del proceso de hidratación, fueron teñidos con hematoxilina – eosina. La medición del infiltrado inflamatorio en los diferentes compartimentos pulmonares (área perivascular y espacio intersticial), así como el tamaño de los granulomas y la superficie de las áreas neumónicas, fue hecha con analizadores de imágenes computarizados (Zidas Zeiss, Carl Zeiss Ltd., Herts, UK; Leica Q Win, Milton Keynes, Cambridge, UK). Las áreas inflamatorias de los diferentes compartimentos pulmonares se determinaron en 10 campos, seleccionados aleatoriamente en grupos de cuatro ratones por tiempo de sacrificio. En el caso del tamaño de los granulomas, éste se estableció por los análisis de todos los granulomas presentes en el corte, alejados de las áreas neumónicas. La superficie neumónica se determinó por medio de la medición del área pulmonar total a la que se le restó el área ocupada por los vasos y los bronquios.

Finalmente, el cociente resultante de la división del área neumónica entre el área pulmonar total corregida, nos aporta el porcentaje de tejido pulmonar afectado por neumonía en cada ratón. En todos los casos se sumaron las mediciones obtenidas de los cuatro ratones y los resultados se expresaron como la media \pm una desviación estándar.

Conjugación de Isotiocianato de Fluoresceína a anticuerpos.

Esta técnica de conjugación de anticuerpos se realizó según lo publicado en la revista *Immunology* 1970. 18: 865-873. Conjugation hoy Fluorescein Isothiocyanate to Antibodies. T.H. The and T. E. W. Feltkamp. Y fue utilizada para marcar el mAb RB6-8C5 para poder utilizarlo en los experimentos con citometría de flujo.

Materiales.

- 1-5 mg de proteína
- FITC (F1628 sigma) isomero I en celite.
- Dimetil Sulfoxido

Método.

- 1.- 1-5 mg de proteína
- 2.- Dializar contra amortiguador de carbonatos 0.1 M pH 9.5
- 3.- Por cada mg de proteína añadir 5 μ l de una solución de FITC en dimetil sulfoxido a una concentración de 100 μ g/ml. (Pesar 1 mg y diluir en 1 ml de dimetil sulfoxido ya que el FITC está al 10% en celite).
- 4.- Añadir lentamente y agitar por dos horas a temperatura ambiente, envolver en papel aluminio.
- 5.- Dializar contra PBS pH 7.2 durante toda la noche.
- 6.- Si no se dializa, pasar sobre una columna hecha de 100 mg de Sephadex G25 y recuperar el primer eluido.

Preparación de Amortiguador de Carbonatos pH 9.5

- 8.6 g de Na₂CO₃
- 17.2 g de NaHCO₃
- Mezclar ambos en un litro de agua y ajustar pH.

Citometria de flujo.

Se realizaron lavados bronquiales con 3 ml., de medio RPMI-Brefeldina-A (RPMI Médium 1640 1x, GIBCO, Invitrogen Corporation, Cat. No. 11835-030), a 3 grupos de ratones infectados intratraquealmente con 1×10^6 de bacilos vivos y virulentos de la cepa H37Rv de *M. tuberculosis*, el primer grupo se infectó y no recibió ningún tratamiento después de la infección, el segundo grupo fue inyectado i.p. con un mAb anti-neutrófilos y el tercer grupo fue inyectado por la misma vía con SSF. Después de los lavados bronquiales se dejó incubar a las células por un tiempo de 4 horas en el mismo medio, después se hicieron lavados con PBS-Albúmina para eliminar el medio RPMI-Brefeldina-A, se pasaron las células a una placa de 96 pozos (Costar, Cell Culture Cluster, V Bottom w/Lid, Catalog number 3894, Cambridge, MA 02140, USA), y se incubaron con los anticuerpos marcadores de superficie CD11b marcado con PE y FITC (Becton Dickinson Co. FITC anti-mouse CD11b. Mat. No. 557396. CD11b PE anti-mouse Cat. No. 57397) para macrófagos y RB6-8C5 marcado con FITC para PMN, por 30 minutos, se realizaron lavados con PBS-Albúmina y se incubó durante 10 minutos con PBS-Albúmina-Saponina, posteriormente se incubaron las células con los anticuerpos para citocina intracelulares, IL-1 (ALF-161 FITC Sc. 12741 Santa Cruz

Biotechnology), IL-8 (Biotinylated Antigen Affinity, Anti-human IL-8, Cat # 500-P28Bt PEPROTECH, INC. Rocky Hill, NJ.), TNF α (Mat. 554419 PE labeled anti-mouse Becton Dickinson Co. and TNF α FITC rat anti-mouse Cat. No. 554418 BD Biosciences Pharmingen), cada uno por 30 minutos y diluidos en saponina, posteriormente se lavaron las células con PBS-Albúmina y se incubaron por 20 minutos. Después de la incubación las células se fijaron con paraformaldehído y se procedió a su lectura en un citómetro Excalibur Becton and Dickinson Cell Sorter (FACS, Mountain View, CA), los resultados obtenidos se analizaron con un programa de computadora llamado WinMDI Versión 2.8 (1993-2000 Joseph Trotter).

Resultados.

Análisis de la capacidad fagocítica de PMN vs. Macrófagos.

Cuando se estudio por citometría el porcentaje de PMN y macrófagos positivos para el anticuerpo anti-BCG, los resultados demostraron que el porcentaje de PMN positivos fue de 17.71% y de 10.70% en el primero y segundo día postinfección respectivamente, mientras que el porcentaje de macrófagos positivos fue del 3.11% en el primer día y de 1.02% en el segundo día postinfección.

Análisis por citometria de flujo de la producción de IL-1, IL-8 y TNF.

En esta primera fase del experimento también se analizo por citometria de flujo la producción de IL-1 por parte de PMN y macrófagos. El porcentaje de PMN positivos a la IL-1 fue el doble al de los macrófagos (Gráfica 1), siendo estadísticamente significativo en el día 1 postinfección. La IL-8 fue expresada predominantemente por los PMN alcanzando un 22.12% de células positivas para esta interleucina, mientras que los macrófagos solamente alcanzaron un 3.67%, la producción de IL-8 disminuye notablemente en los días siguientes siendo prácticamente indetectable al final del experimento (Gráfica 2), también existió diferencia estadísticamente significativa en el día 1 postinfección. El TNF durante las primeras 24 horas fue notablemente producido por los PMN con un 27.67% de células positivas, mientras que los macrófagos fueron positivos en un 10.37% (Gráfica 3), se encontró una diferencia estadísticamente significativa en el día 1.

Unidades Formadoras de Colonias.

En la segunda etapa de este proyecto se eliminó la respuesta protectora innata mediada por los neutrófilos al eliminarlos utilizando el mAb RB6-8C5 un día antes de la infección intra-traqueal con *M. tuberculosis* vivo y virulento (la cinética de los neutrofilos y macrófagos fue monitoreada durante el curso del experimento con citometria de flujo, gráficas 4 y 5). La eliminación de los PMN facilito la replicación y diseminación de la micobacteria, encontrandose más elevadas las UFC en tejido pulmonar y en bazo, en comparación con los ratones control que fueron inyectados exclusivamente con el vehículo SSF (Gráficas 6 y 7).

Prueba de Hipersensibilidad Retardada.

La prueba de hipersensibilidad retardada (DTH) se modificó en ratones neutropénicos, siendo aproximadamente la mitad de la respuesta que presentaron los ratones control a lo largo del experimento (Gráfica 8).

Análisis Histológico.

Infiltrado intersticial.

El análisis histológico demostró que las áreas de inflamación intersticiales son menores en ratones neutropénicos, en comparación con los ratones control tratados con SSF, (Gráfica 9) con una diferencia estadísticamente significativa de 0.012 en el día 7 postinfección.

El análisis histológico nos permitió examinar el tipo de células que componen al infiltrado intersticial, perivenular y granulomas, los resultados fueron los siguientes:

La cantidad de neutrófilos presentes en el espacio intersticial fue considerablemente menor en los ratones tratados con el mAb en comparación con los ratones control

(Gráfica 10) encontrando una diferencia estadísticamente significativa de 0.0009 y 0.009 en los días 2 y 7 respectivamente.

La migración de macrófagos se vio disminuida en los ratones tratados con el anticuerpo monoclonal anti-neutrófilos (Gráfica 11), a lo largo de todo el experimento, encontrando una diferencia estadísticamente significativa de 0.012 en el día 7.

La presencia de linfocitos en el espacio intersticial, se vio afectada en los ratones tratados con el anticuerpo monoclonal, aumentando su cantidad lentamente conforme progresaba la enfermedad, mientras que en los ratones control la migración fue constante y aumento rápidamente, encontrando diferencias estadísticamente significativas en los días 2 y 7, cuyos valores fueron 0.01 y 0.04 respectivamente (Gráfica 12).

Infiltrado perivenular.

Las áreas de inflamación perivenulares son notablemente menores en ratones neutropénicos, a diferencia de las áreas encontradas en los ratones control (Gráfica 13) encontramos una diferencia estadísticamente significativa en los días 1 y 2 postinfección, cuyos valores fueron 0.0000075 y 0.0018 respectivamente.

La población celular de neutrófilos fue notablemente afectada por el anticuerpo anti-neutrófilos, manteniéndose en niveles extremadamente bajos en los primeros días del experimento en comparación con los ratones control cuyo arribo de neutrofilos fue constante en los primeros días, encontramos una diferencia estadísticamente significativa en los días 1 y 2 postinfección, cuyos valores fueron 0.0023 y 0.0022 respectivamente (Gráfica 14).

Los macrófagos presentes en el infiltrado perivenular, fueron ligeramente mayores en los ratones control durante los primeros dos días postinfección, en comparación con los ratones tratados con el anticuerpo monoclonal. La cantidad de macrófagos se fue incrementando alcanzando su acmé en el día 14 y disminuyendo en el día 21 en los ratones control, mientras que en los ratones tratados estos siguieron aumentando alcanzando su acmé en el día 21 postinfección. Encontramos diferencias estadísticamente significativas en los días 1 y 2, cuyos valores fueron 0.003 y 0.016 respectivamente (Gráfica 15).

El infiltrado perivenular compuesto por linfocitos fue aumentando progresivamente en ambos grupos, la diferencia que encontramos, fue que en los ratones que recibieron el anticuerpo anti-neutrófilos la cantidad de linfocitos fue menor que en el grupo que fue inyectado con SSF, encontramos diferencias estadísticamente significativas en los días 1, 2, 7 y 14 cuyos valores fueron 0.025, 0.024, 0.022, 0.028 respectivamente (Gráfica 16).

Granulomas.

El área o tamaño de los granulomas que se encontraron en los pulmones de ratones tratados con el mAb RB6-8C5, fue mas pequeños que los encontrados en ratones control, encontramos una diferencia estadísticamente significativa en el día 21 postinfección (Gráfica 17).

La cantidad de neutrófilos encontrada en los granulomas de ratones tratados con el mAb

fue ligeramente menor que la cantidad encontrada en los granulomas de ratones control tratados con SSF (Gráfica 18). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en este análisis.

La cantidad de macrófagos presentes en los granulomas encontrados en el día 14 fueron muy similares en ambos grupos, por otra parte, en el día 21, la cantidad de macrófagos encontrados en los ratones inyectados con el mAb anti-neutrófilos fue de 167.17 células en promedio en comparación con las 122.75 células encontradas en los ratones inyectados con SSF. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas (Gráfica 19).

El contenido linfocítico en los granulomas encontrados en ambos grupos tuvo una diferencia estadísticamente significativa de 0.020 en el día 14 postinfección, la cantidad de linfocitos encontrada en los granulomas en ambos días 14 y 21, fue mayor en los ratones del grupo control en comparación con los ratones del grupo tratado con el mAb. (Gráfica 20).

Neumonía.

En este experimento también fue posible encontrar pequeñas áreas de neumonía en el día 14 en un ratón que fue inyectado con el mAb anti-neutrófilos RB6-8C5, mientras que el grupo control no presentó neumonía. En ambos grupos experimentales se observó neumonía escasa en el día 21 postinfección (Gráfica 21). La medición del tamaño de las áreas neumónicas, fue hecha con analizadores de imágenes computarizados.

Discusión.

La mayoría de los estudios realizados para conocer el papel que juegan los neutrófilos en el control de las infecciones por parásitos intra y extracelulares, han sido en condiciones *in vitro* o en condiciones *in vivo* utilizando vías de infección no naturales (intravenosa, intraperitoneal). Este estudio se realizó para definir el comportamiento *in vivo* de los neutrófilos en el sitio de la infección (pulmones) comparándolo con los macrófagos y determinar así la importancia de los PMN en el control y diseminación sistémica temprana de la micobacteria.

El neutrófilo es un fagocito profesional con un rol crucial en la defensa del huésped contra infecciones por parásitos intra y extracelulares. No obstante, se ha reportado anteriormente que la función protectora de los neutrófilos no es la de una célula bactericida directa del huésped contra *M. tuberculosis*, pues en estudios previos donde han utilizado una vía de infección diferente (i.p.), no encontraron a la micobacteria asociada con los neutrófilos en la cavidad peritoneal⁶³. En estudios *in vitro* donde han incubado bacterias con neutrófilos aislados de sangre periférica, han demostrado que los neutrófilos son capaces no solo de fagocitar bacterias sino también de inducirles la muerte por medios diferentes, independientes de reactivos intermediarios de oxígeno⁶⁴. También se han hecho estudios utilizando otras bacterias intracelulares como *Francisella tularensis*, *Listeria monocytogenes*, o *Salmonella typhimurium* en infecciones hepáticas, donde demostraron que la función de los neutrófilos es destruir a los hepatocitos infectados para que esos patógenos sean expuestos a los macrófagos⁶⁵.

Los resultados obtenidos en la primera fase de nuestros experimentos mediante el uso de la técnica de citometría de flujo con marcaje intracelular nos reveló que las células neutrofilicas que obtuvimos mediante lavados bronquiales en los ratones infectados intratraquealmente, mostraron positividad al ser marcadas intracelularmente con un anticuerpo anti-BCG, lo cual demuestra que los neutrófilos fagocitan y destruyen micobacterias eficientemente, con una capacidad que supera notablemente a la capacidad que presentan los macrófagos en las primeras 24-48 después de la infección.

Estos resultados, resaltan la importancia de los PMN durante los primeros días de la infección, actuando como células fagocíticas que frenan la proliferación micobacteriana y controlan la diseminación temprana de la micobacteria a todo el organismo.

Anteriormente se pensaba que los neutrófilos por ser células diferenciadas terminalmente, eran incapaces de sintetizar proteínas, pero estudios *in vitro* demostraron que estas células tienen la capacidad de expresar mRNA para una variedad de citocinas que están involucradas en las funciones efectoras de los PMN⁶⁶. Un estudio *in vitro* reveló que los PMN son capaces de expresar moléculas del complejo principal de histocompatibilidad clase II si son tratados con G-CSF, más GM-CSF o IL-3 o INF γ , pudiendo funcionar también como células presentadoras de antígeno⁶⁷. Estudios previos realizados con *M. avium*, muestran que la fagocitosis de esta micobacteria o la exposición a los componentes micobacterianos llevan a los macrófagos a liberar una copiosa cantidad de IL-1⁶⁸. Otros estudios muestran un rol para IL-1 en la resistencia del huésped a un número diverso de patógenos, incluyendo *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, y *Pneumocystis carinii*, aunque el mecanismo exacto de cómo interviene la IL-1 no fue aclarado^{69, 70, 71}.

En estudios previos se coloca a los neutrófilos en un segundo plano como productores de interleucinas, siendo que estos son muy importantes en la producción de estas en los primeros días de la infección con *M. tuberculosis*.

Nuestros resultados mostraron que los PMN presentaron una capacidad de síntesis considerablemente mayor que la de los macrófagos en la producción de citocinas proinflamatorias, específicamente IL-1, IL-8 y TNF. La IL-1 tiene un número diverso de efectos proinflamatorios, los cuales incluyen la activación de linfocitos T y neutrófilos. IL-8 es un potente quimioatrayente de PMN, sugiriendo que, una vez que los PMN llegan al sitio de la infección, ellos pueden promover el subsiguiente reclutamiento de neutrófilos, así como la subsiguiente acumulación y activación de macrófagos y linfocitos. TNF es el mediador principal de la respuesta inflamatoria aguda frente a las bacterias gramnegativas y a otros microorganismos infecciosos y es responsable de muchas de las complicaciones sistémicas de las infecciones graves.

Nosotros creemos que la presencia de neutrófilos que están produciendo eficientemente IL-1, IL-8 y TNF, pueden tener un efecto sinérgico con los productos microbianos que favorecen la activación de otros neutrófilos. La producción de estas citocinas por los neutrófilos en los sitios de inflamación jugará un papel significativo en la subsiguiente evolución de la respuesta inflamatoria vía estimulación autocrina y/o paracrina de otras células inmunológicas o no inmunológicas.

En la segunda fase del proyecto, la importancia del papel protector de los neutrófilos quedó demostrada por la susceptibilidad que presentan los ratones neutropénicos a *M. tuberculosis*.

La eliminación parcial de los neutrófilos durante la primera semana de infección permitió un crecimiento acelerado de *M. tuberculosis* en los pulmones y bazo como lo demuestra la determinación de UFC en ambos órganos. Esto sugiere que los neutrófilos reclutados al sitio de la infección son cruciales para controlar el crecimiento de la micobacteria, la infección aumenta debido al efecto que tiene el mAb RB6-8C5, eliminando parcialmente a los neutrófilos que normalmente se encuentran en el sitio de la infección.

El mecanismo por el cual los PMN controlan el flujo de otras poblaciones leucocíticas puede estar relacionado con la liberación de citocinas tales como IL-8 y MIP-1 α que son quimioatrayentes para PMN, macrófagos y linfocitos^{72, 73}.

En nuestro estudio el reclutamiento de macrófagos y de linfocitos, a los espacios intersticiales y perivenulares, no fue suprimido, solamente fue retardado debido a la falta de citocinas quimiotácticas producto de la depleción neutrofílica, lo que se comprobó en el tamaño de las áreas que fueron analizadas por microscopía durante el análisis histológico; las áreas de infiltrados intersticiales así como las áreas perivenulares, fueron más pequeñas en los ratones inyectados con el mAb RB6-8C5 que los ratones inyectados con SSF.

En otros estudios se ha reportado la especificidad del mAb RB6-8C5 anti-neutrófilos⁷⁴ lisando específicamente a neutrófilos maduros, sin embargo los estudios publicados no presentan datos detallados que sustenten esta interpretación. Otro grupo reportó que el

mAb puede unirse a una significativa proporción de células T de ratón en estado virgen, en ratones infectados con *L. monocytogenes*⁷⁵.

Los resultados obtenidos en nuestro laboratorio no mostraron que el mAb reconociera otro tipo celular diferente a neutrófilos, el mAb fue probado antes de empezar el experimento en ratones Balb/c sanos inyectando 200µg de mAb por vía i.p. y la única población que se vio afectada fue la población neutrofilica (analizado por citometría de flujo) disminuyendo hasta en un 92%, estos resultados coinciden con los datos publicados por Rogers et al. 1993, Appelberg et al. 1994, Conlan y North 1994, quienes publicaron que el mAb no reconoce macrófagos, células NK y células B o T.

Al probar este anticuerpo en nuestro experimento, en ratones infectados con *M. tuberculosis*, los análisis por citometría de flujo e histológicos, mostraron una disminución en la población neutrofilica en los ratones inyectados con el anticuerpo anti-neutrófilos (no se observo una depleción total).

El análisis histológico ayudo a suponer que la migración de las demás poblaciones celulares (macrófagos y linfocitos) en estos ratones sufrió un retraso debido a la carencia de citocinas y factores quimiotacticos que produce la población de neutrófilos como ya lo habíamos mencionado anteriormente. El análisis histológico mostró la especificidad del mAb, durante los primeros tres tiempos de sacrificio (1, 2 y 7 postinfección), después de ese tiempo en el día 14 postinfección, se pierde el efecto neutropenico del mAb, esto se aprecia por las cantidades crecientes de neutrófilos presentes en áreas intersticiales y perivenulares, lo que sugiere que los ratones han desarrollado anticuerpos contra el mAb Rb6-8C5, perdiendo este su eficacia.

El área abarcada por los granulomas en el grupo de ratones inyectados con mAb fue menor que el área del grupo de ratones inyectados con SSF. Aunque el contenido celular de estos fue muy similar en los últimos dos días del experimento. Solamente encontramos una diferencia estadísticamente significativa en la población de linfocitos en el día 14 postinfección. Este retardo del reclutamiento y muy probablemente de la activación linfocitaria pudo haber sido la causa de la disminución consistente de la DTH en los ratones neutropénicos, sugiriendo también que los neutrófilos participan en la generación de la respuesta de inmunidad celular protectora en contra de la micobacteria.

En este modelo experimental generalmente aparecen áreas focales de neumonía en los días 21 o 28 postinfección. En nuestro estudio pudimos encontrar unas pequeñas áreas de neumonía en los ratones inyectados con RB6-8C5 en el día 14, lo cual es muy interesante porque refleja la importancia de los neutrófilos evitando la proliferación local de la micobacteria, el análisis histológico sugiere que al no estar presente esta población celular, la micobacteria pudo inducir la aparición temprana de neumonía.

Los resultados obtenidos en estos experimentos resaltan la importancia de los neutrófilos no únicamente como fagocitos profesionales, sino también como células reclutadoras de macrófagos y productoras de citocinas proinflamatorias, que en conjunto contribuyen al control de la replicación y diseminación temprana sistémica de la micobacteria.

Conclusiones.

- El neutrófilo es una de las primeras células en llegar al sitio de la infección, estos juegan un rol importante en el control de la replicación y diseminación temprana sistémica del bacilo tuberculoso.
- Los neutrófilos reclutados tempranamente al sitio de infección representan una potencial fuente de citocinas, capaces de atraer macrófagos y células T a esos sitios, donde actuando en conjunto pueden resolver la infección.
- La migración de macrófagos y linfocitos al sitio de infección es retrasada por la ausencia de los PMN.
- La ausencia de los PMN eliminándolos durante la primera semana postinfección con un anticuerpo citotóxico, altera la respuesta inmunológica e inflamatoria que se genera en contra de la micobacteria.

Figuras.

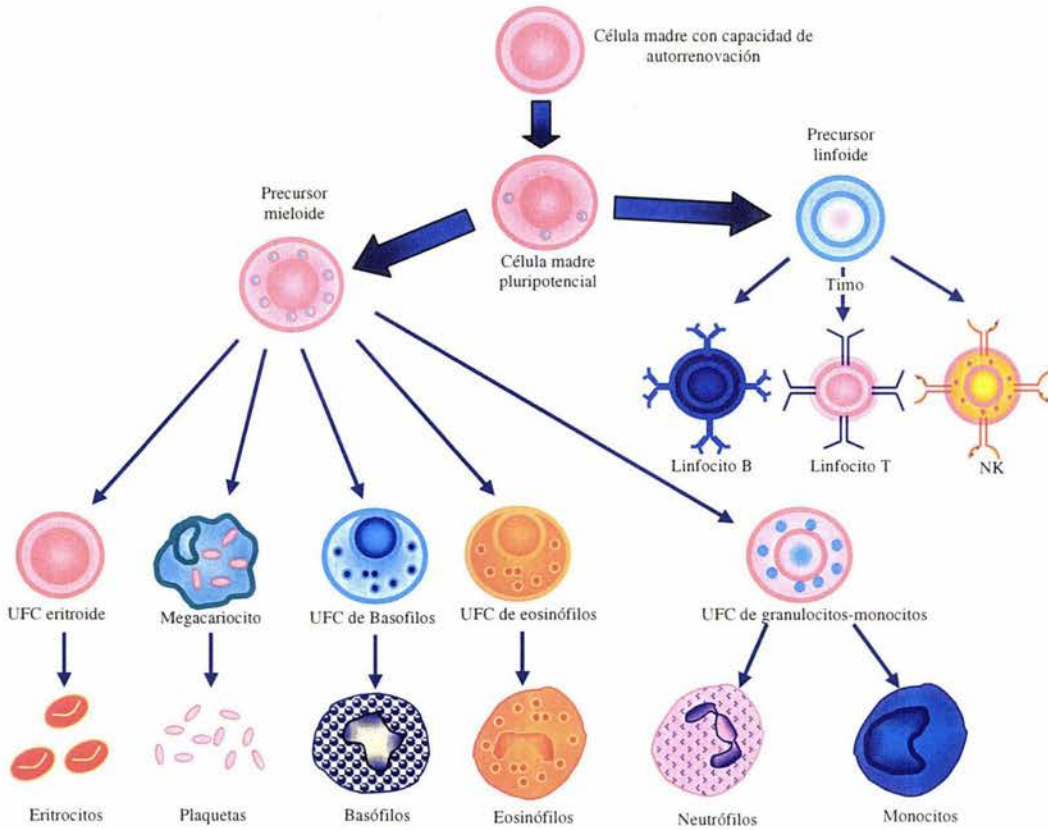


Fig. 1.- Esta figura representa el desarrollo de las diferentes estirpes de células sanguíneas.

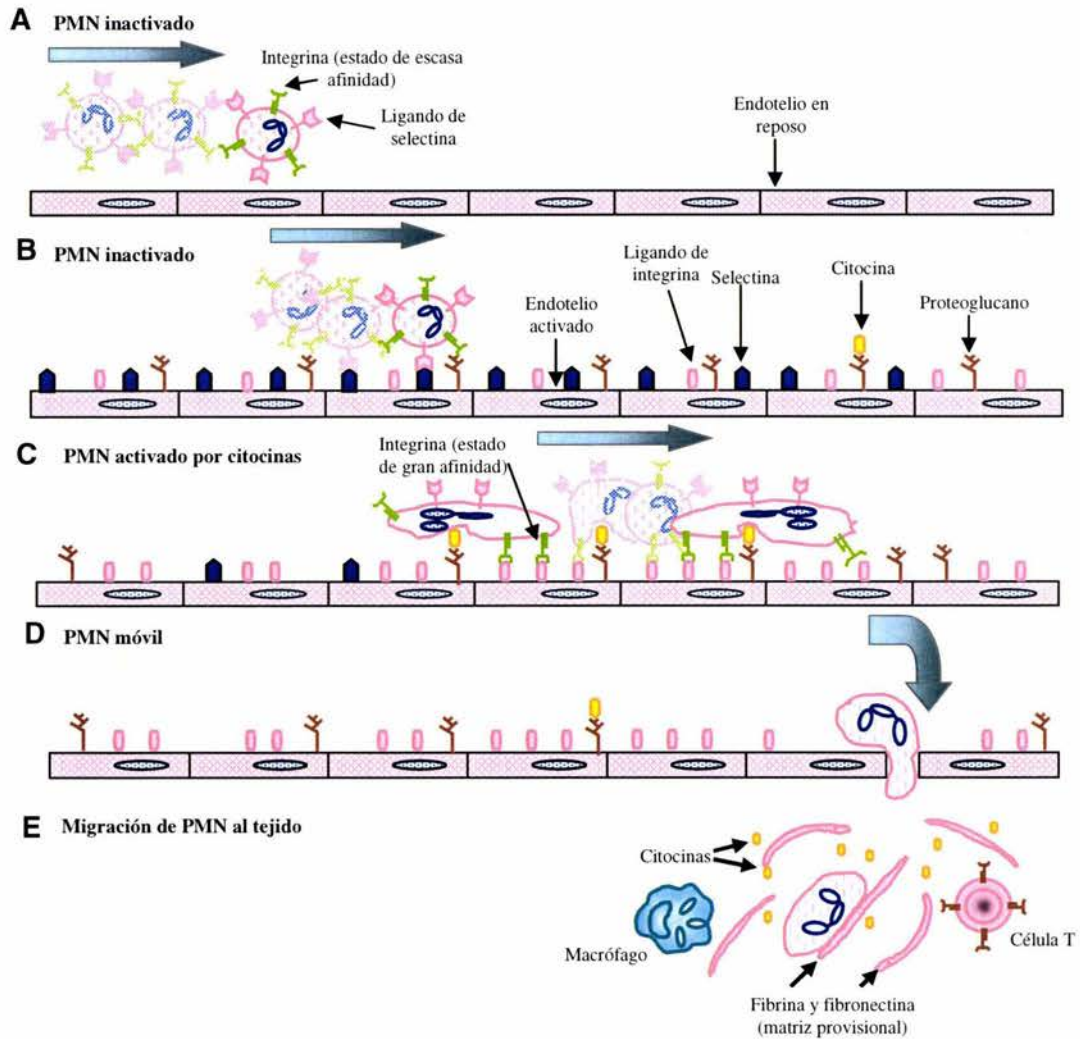


Fig. 2.- Los PMN no se unen al endotelio en reposo (A), sino que experimentan un proceso de rodamiento en el endotelio activado por las interacciones selectina-ligando (B). La activación de los leucocitos conduce a la fijación estable al endotelio (C), seguida de la migración a través del endotelio (D) hasta el sitio extravascular de infección (E).

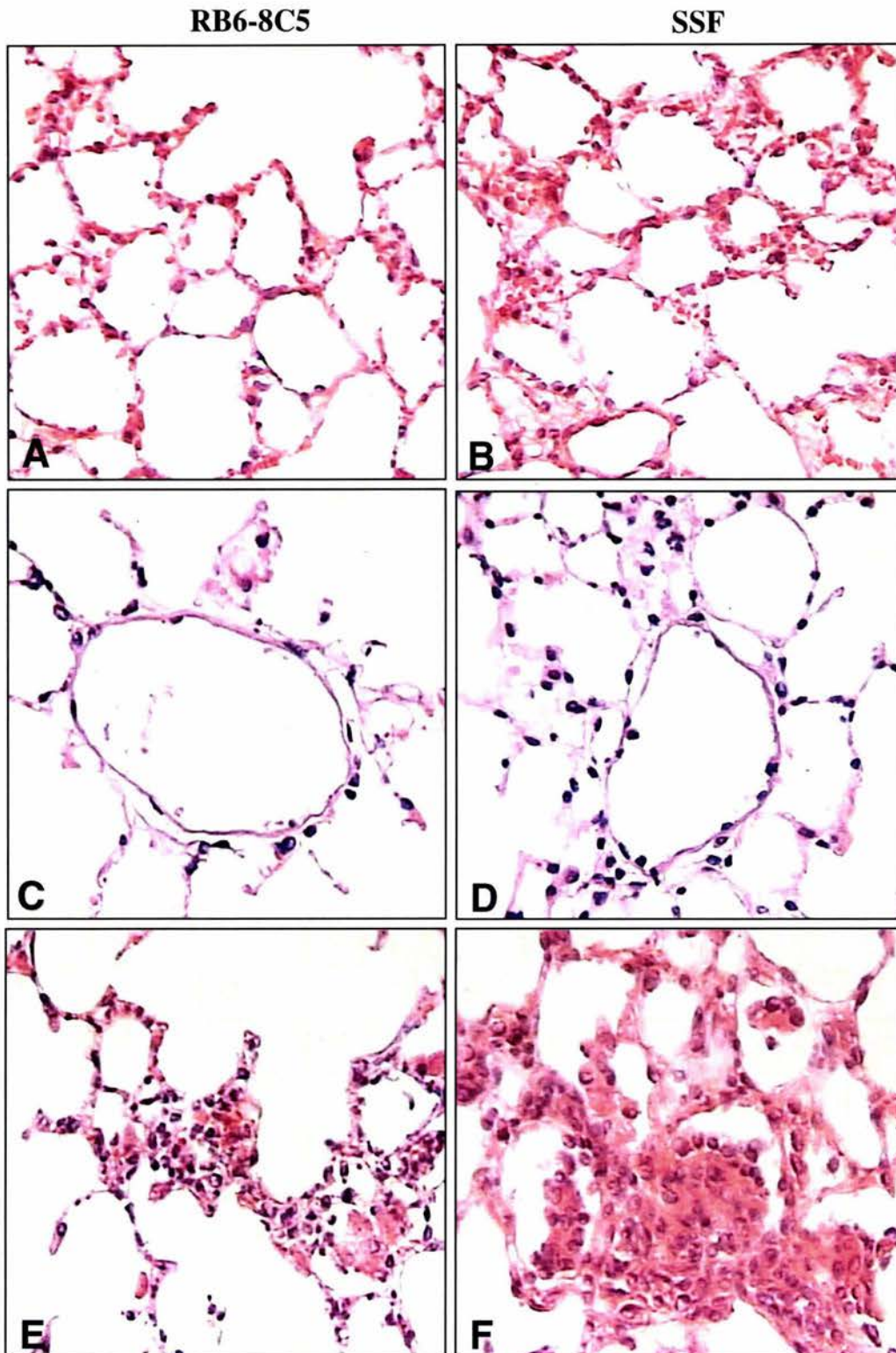
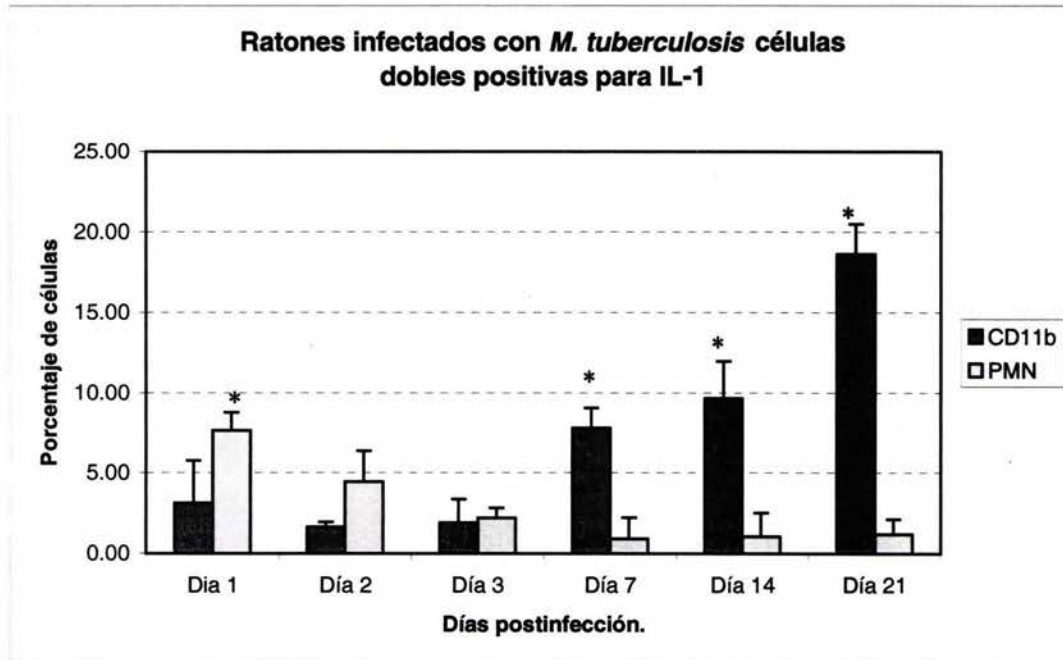
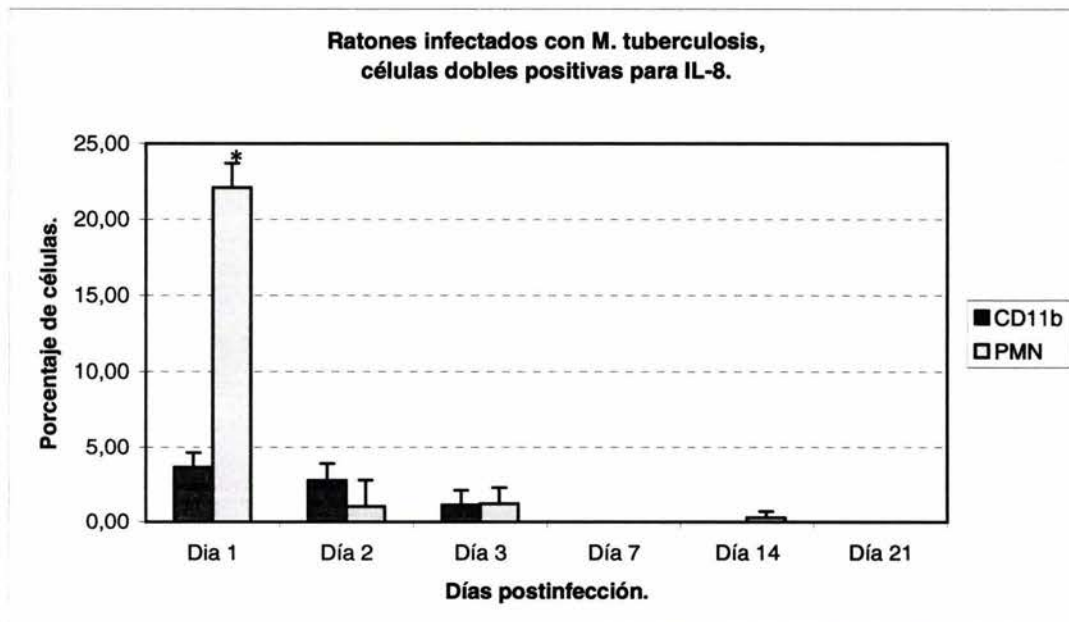


Fig. 3.- Histología pulmonar representativa de ambos grupos de ratones, el grupo de ratones inyectados por vía i.p. con el mAb RB6-8C5 anti-neutrófilos (a, c y e) y el grupo de ratones inyectados con SSF (b, d y f); a y b nos muestran las áreas de infiltrado intersticial en el día 7 postinfección, c y d nos muestran el infiltrado perivascular en el día 2 postinfección, e y f muestran el tamaño de los granulomas que se han formado en el día 21 postinfección.

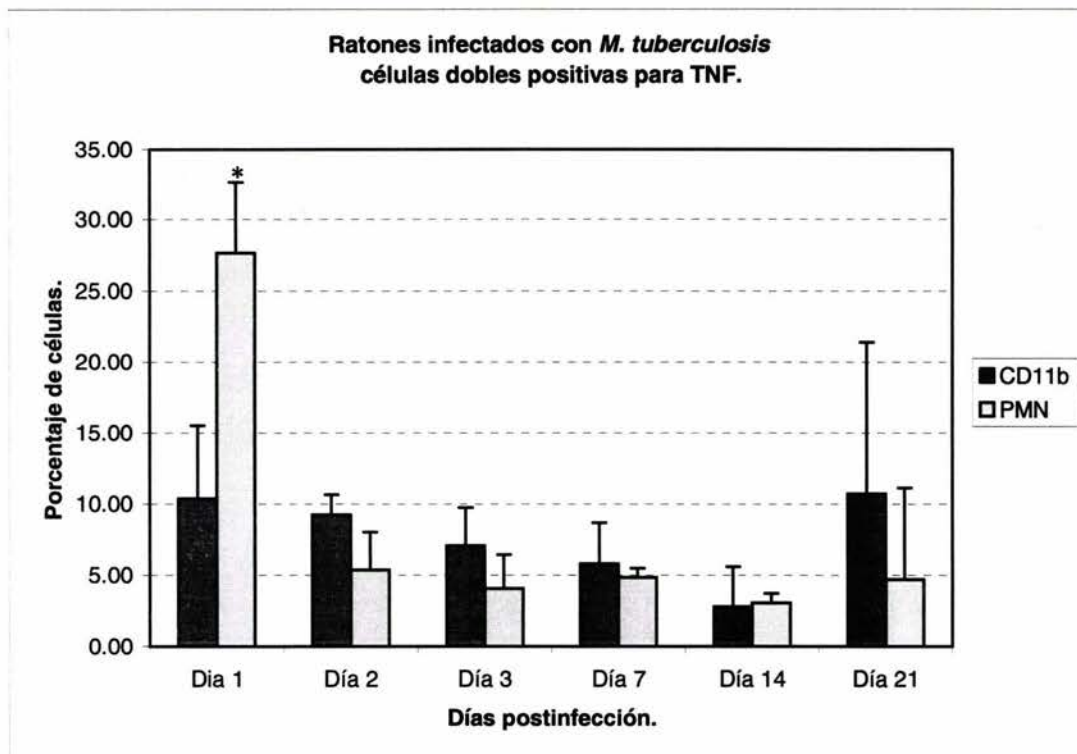
Gráficas.



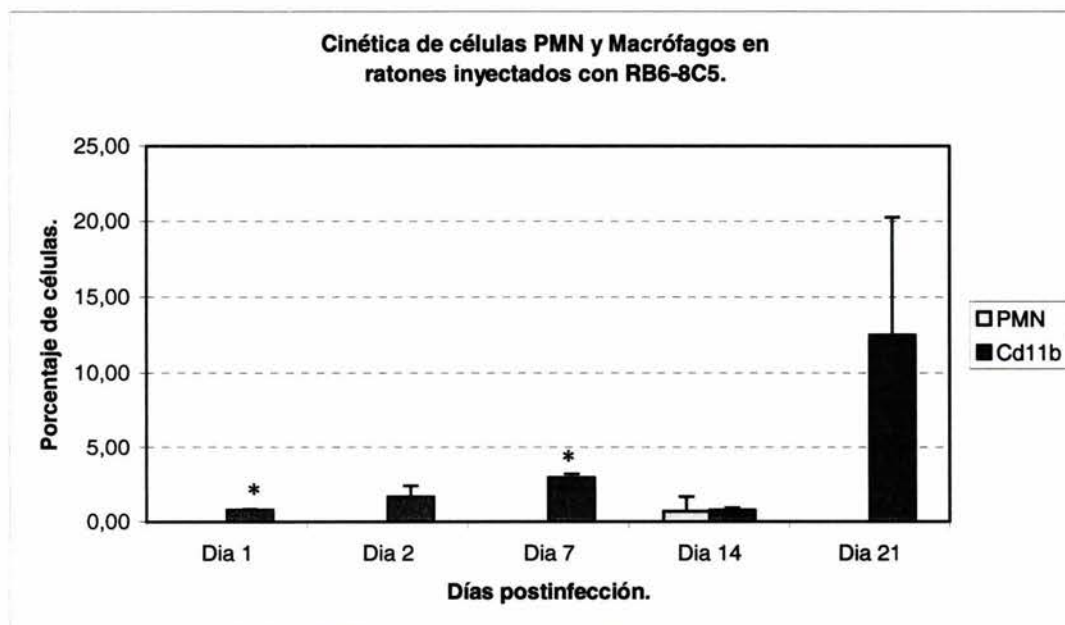
Gráfica 1.- Lavados bronquiales con medio RPMI-Brefeldina en ratones Balb/c infectados intratraquealmente con la cepa de *M. tuberculosis* H37Rv. La gráfica muestra la cinética comparativa de ambas poblaciones, macrófagos (CD 11b) y neutrófilos, en la producción de IL-1 durante el curso de la infección (estos ratones únicamente fueron infectados con la cepa H37Rv y no recibieron ningún tratamiento para eliminar PMN) Los asteriscos representan la significancia estadística ($P < 0.05$).



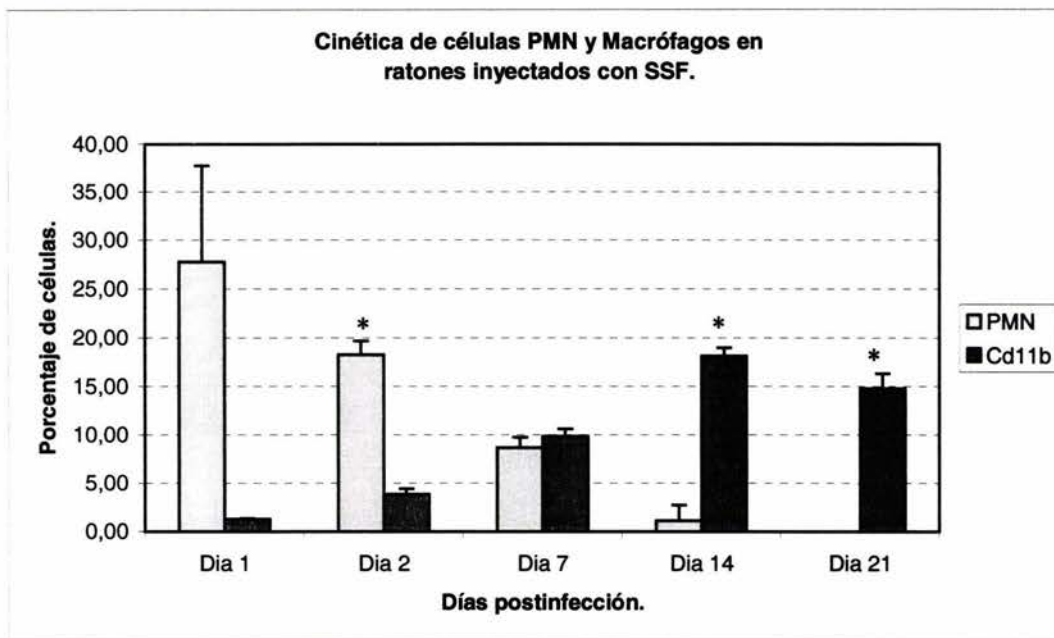
Gráfica 2.- Lavados bronquiales con medio RPMI-Brefeldina en ratones Balb/c infectados intratraquealmente con la cepa de *M. tuberculosis* H37Rv. La gráfica muestra la cinética estudiada por citometría de flujo de ambas poblaciones en la producción de IL-8 durante el curso de la infección. Los asteriscos representan la significancia estadística ($P < 0.05$).



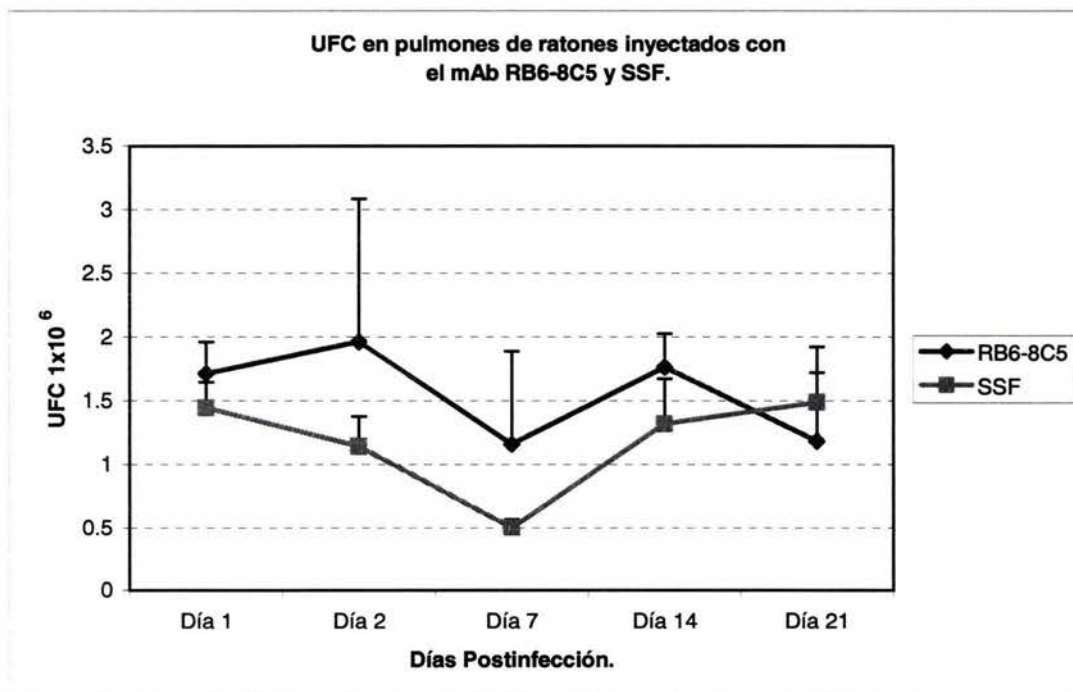
Grafica 3.- Lavados bronquiales con medio RPMI-Brefeldina en ratones Balb/c infectados intratraquealmente con la cepa de *M. tuberculosis* H37Rv. La gráfica muestra la cinética estudiada por citometría de flujo de ambas poblaciones en la producción de TNF durante el curso de la infección. El asterisco representa la significancia estadística ($P < 0.05$).



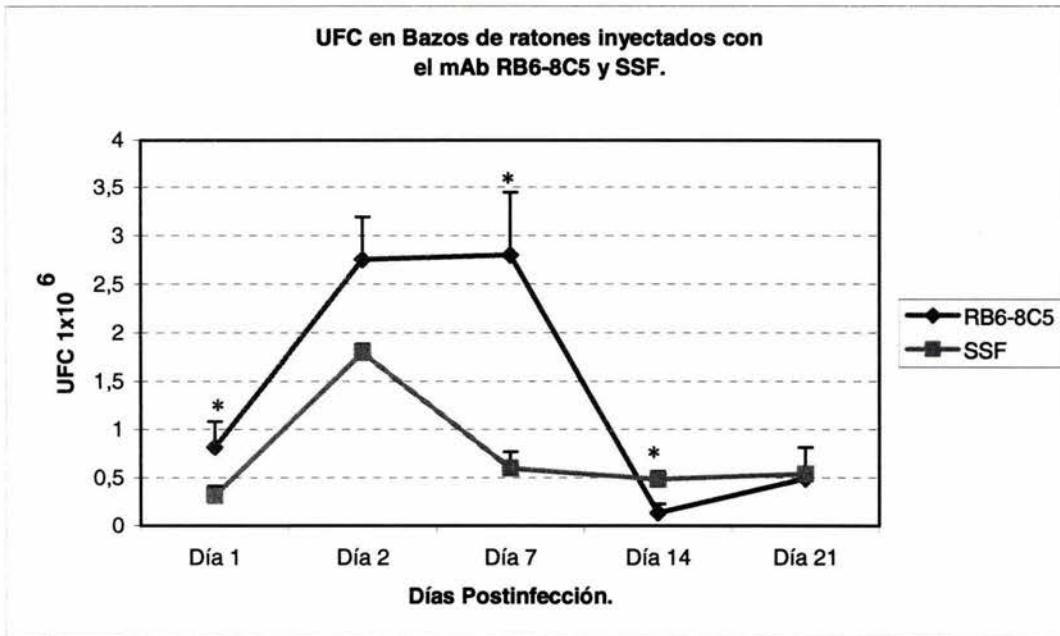
Grafica 4.- Análisis por citometría de flujo de la cinética de células PMN y Macrófagos en ratones Balb/c infectados intratraquealmente con 1 millón de bacilos vivos y virulentos de la cepa de *M. tuberculosis* H37Rv e inyectados por vía i.p. con el mAb anti-neutrófilos RB6-8C5, un día antes de la infección y cada tercer día postinfección. Los asteriscos representan la significancia estadística ($P < 0.05$).



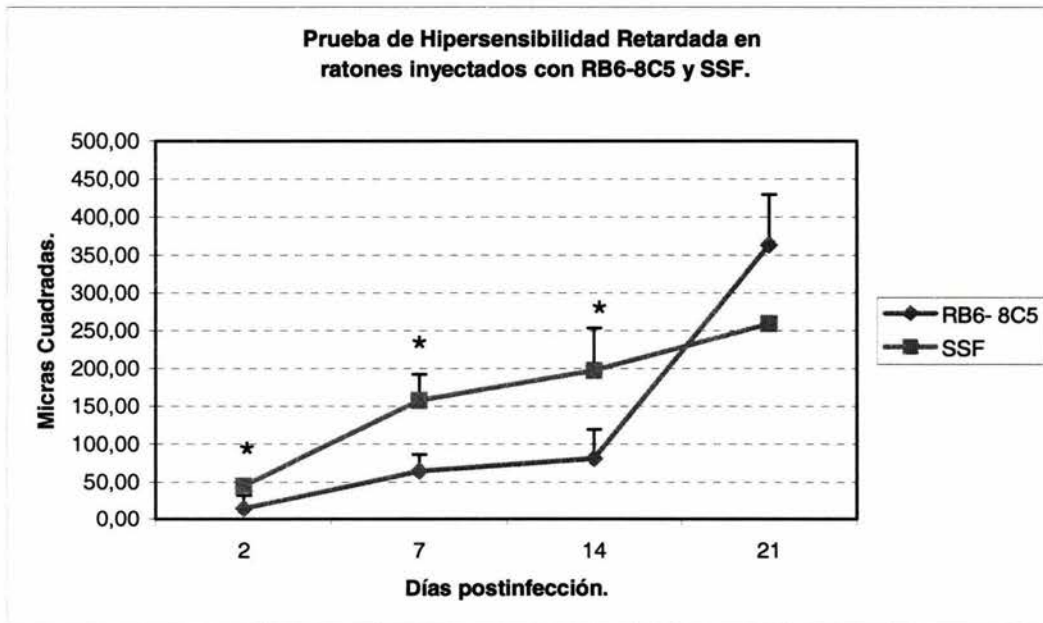
Gráfica 5.- Análisis por citometría de flujo de la cinética de células PMN y Macrófagos en ratones Balb/c infectados intratraquealmente con 1 millón de bacilos vivos y virulentos de la cepa de *M. tuberculosis* H37Rv e inyectados con SSF por vía i.p. un día antes de la infección y cada tercer día postinfección. Los asteriscos representan la significancia estadística ($P < 0.05$).



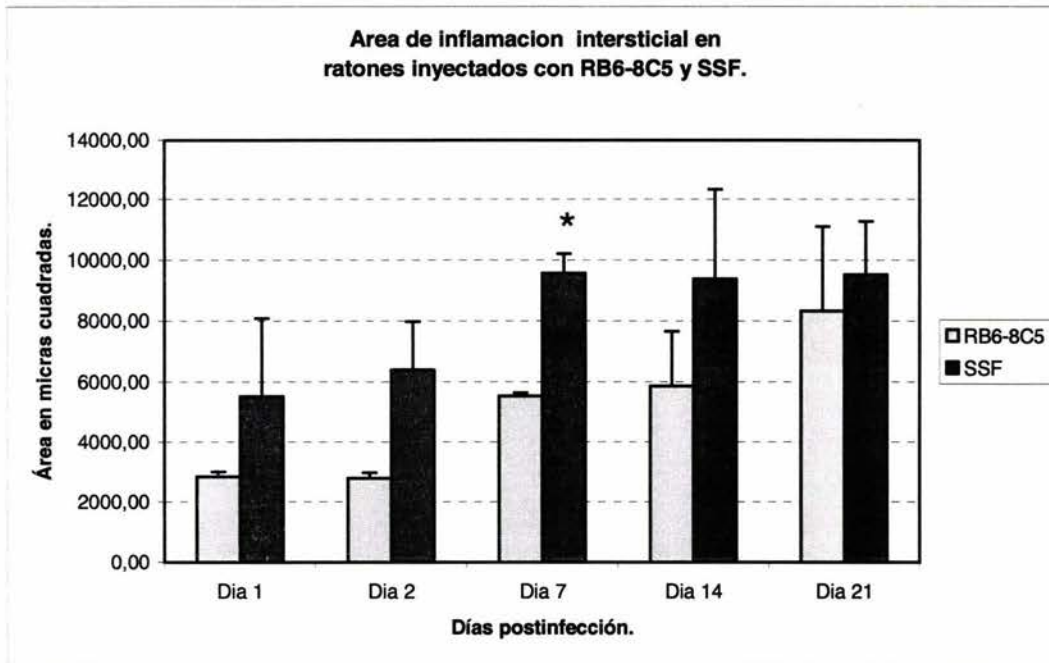
Gráfica 6.- Análisis para determinar la carga bacteriana en pulmones de ratones infectados intratraquealmente con 1 millón de bacilos vivos y virulentos de la cepa de *M. tuberculosis* H37Rv, por el método de conteo de Unidades Formadoras de Colonias. Se tomaron muestras de pulmón de ambos grupos inyectados tanto con el mAb anti-neutrófilos y así como los inyectados con SSF. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas.



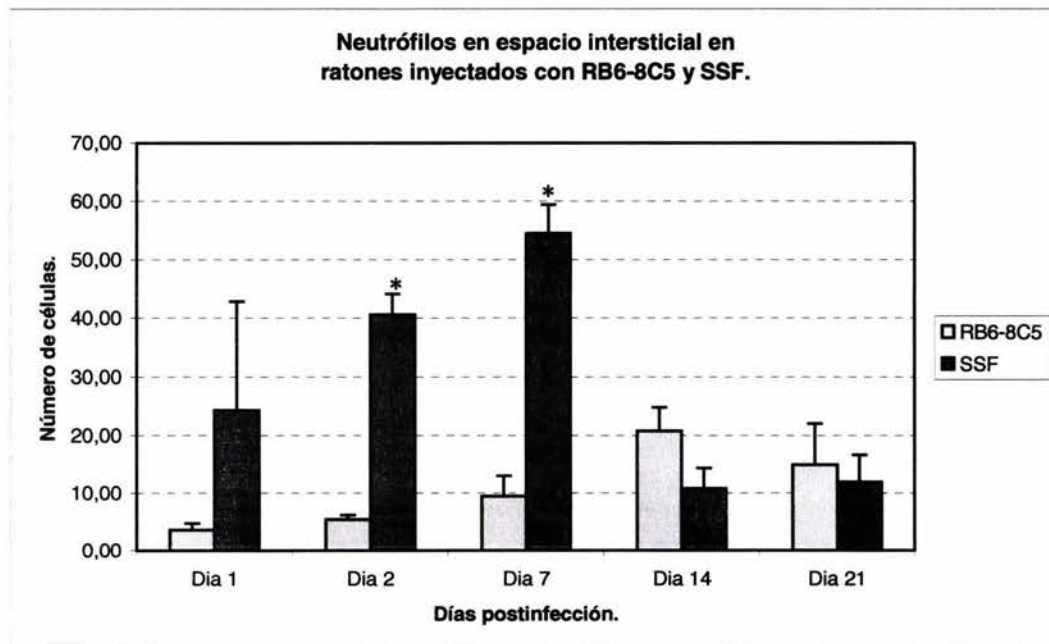
Gráfica 7.- Análisis para determinar la carga bacteriana en bazos de ratones infectados intratraquealmente con 1 millón de bacilos vivos y virulentos de la cepa de *M. tuberculosis* H37Rv, por el método de conteo de Unidades Formadoras de Colonias. Se tomaron muestras de bazo de ambos grupos inyectados tanto con el mAb anti-neutrófilos y así como los inyectados con SSF. Los asteriscos representan las diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$).



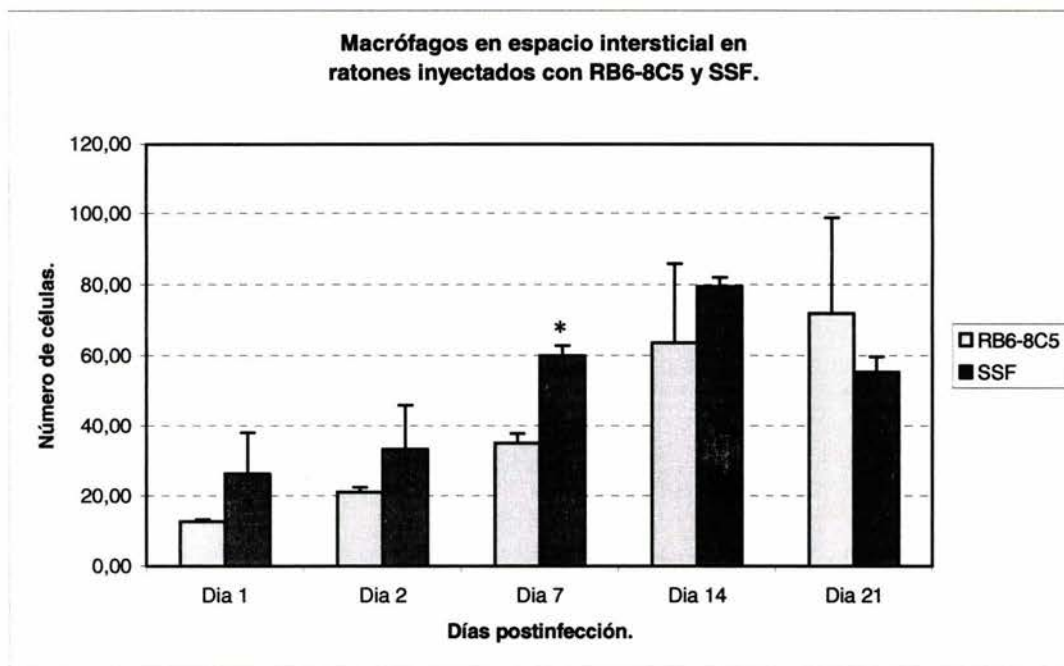
Gráfica 8.- Prueba de hipersensibilidad retardada en ratones Balb/c infectados con 1 millón de bacilos vivos y virulentos de la cepa de *M. tuberculosis* H37Rv. Un grupo de ratones fue inyectado i.p. con el mAb anti-neutrófilos RB6-8C5 y el segundo grupo fue inyectado con SSF por la misma vía. Se inyectaron 20 μ L de antígeno micobacteriano en el cojinete plantar del ratón, la respuesta inflamatoria generada en contra del antígeno micobacteriano se midió con un calibrador de ingeniero. El resultado de la gráfica es en micras cuadradas. Los asteriscos representan la significancia estadística ($P < 0.05$).



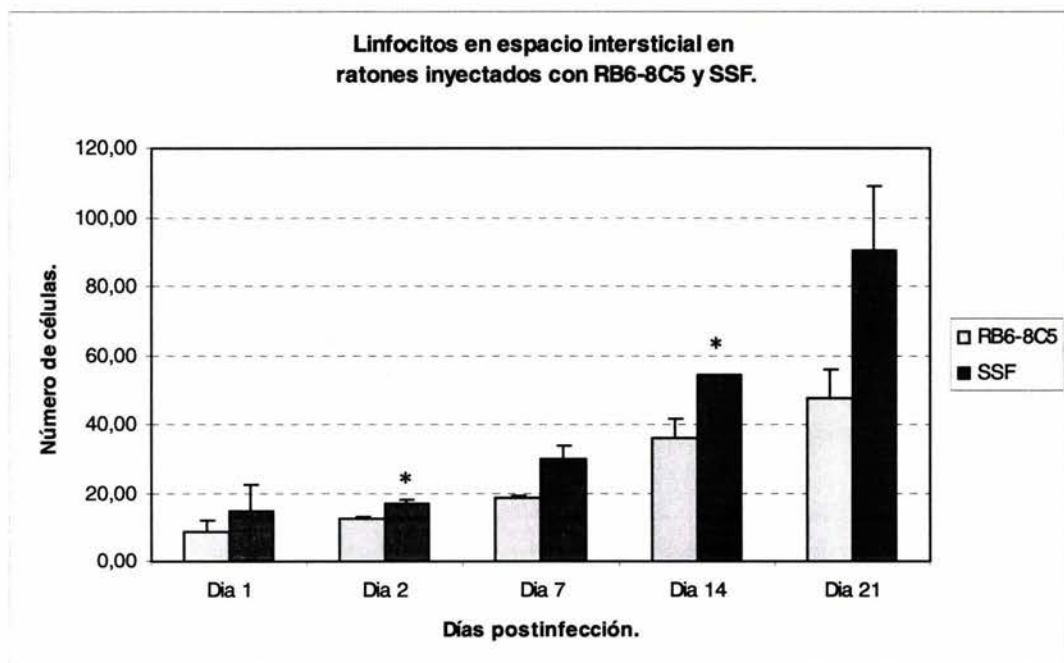
Gráfica 9.- Análisis Histológico en ratones Balb/c infectados con 1 millón de bacilos vivos y virulentos de la cepa *M. tuberculosis* H37Rv, por vía intratraqueal. La gráfica muestra las áreas de inflamación intersticial (en micras cuadradas), en grupos de ratones inyectados con el mAb anti-neutrófilos RB6-8C5 (barras amarillas) y con SSF (barras azules) vía i.p., durante el curso de la enfermedad. El asterisco representa la significancia estadística ($P < 0.05$).



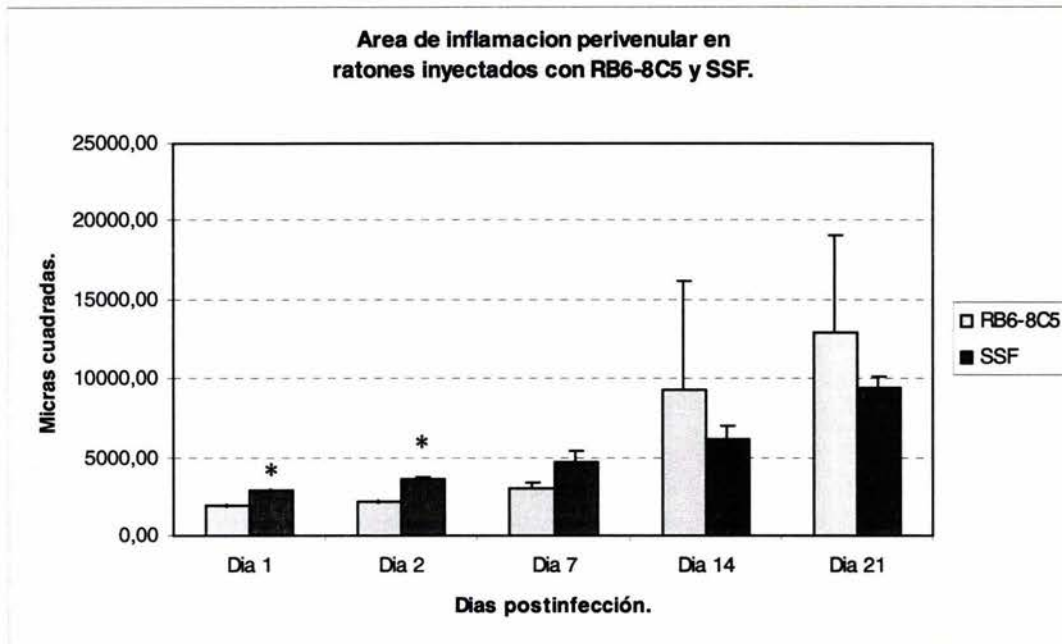
Gráfica 10.- Análisis Histológico en ratones Balb/c infectados con 1 millón de bacilos vivos y virulentos de la cepa *M. tuberculosis* H37Rv, por vía intratraqueal. La gráfica muestra el número de células promedio de neutrófilos, en espacio intersticial en grupos de ratones inyectados con el mAb anti-neutrófilos RB6-8C5 (barras amarillas) y con SSF (barras azules) vía i.p., durante el curso de la enfermedad. El asterisco representa la significancia estadística ($P < 0.05$).



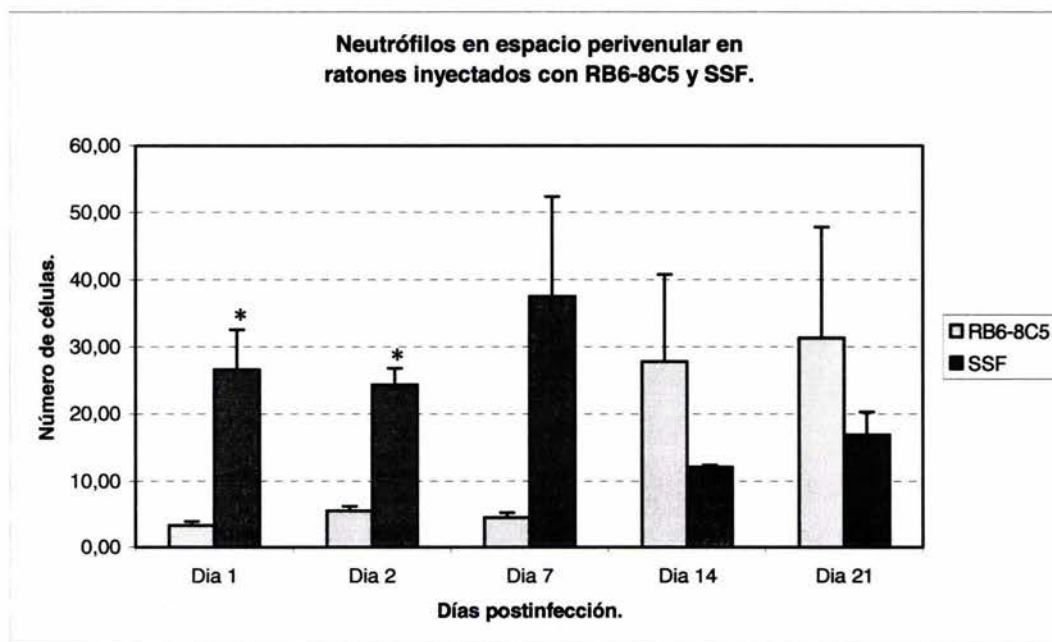
Gráfica 11.- Análisis Histológico en ratones Balb/c infectados con 1 millón de bacilos vivos y virulentos de la cepa *M. tuberculosis* H37Rv, por vía intratraqueal. La gráfica muestra el numero de macrófagos promedio, en espacio intersticial en grupos de ratones inyectados con el mAb anti-neutrofilos RB6-8C5 (barras amarillas) y con SSF (barras azules) vía i.p., durante el curso de la enfermedad. El asterisco representa la significancia estadística ($P < 0.05$).



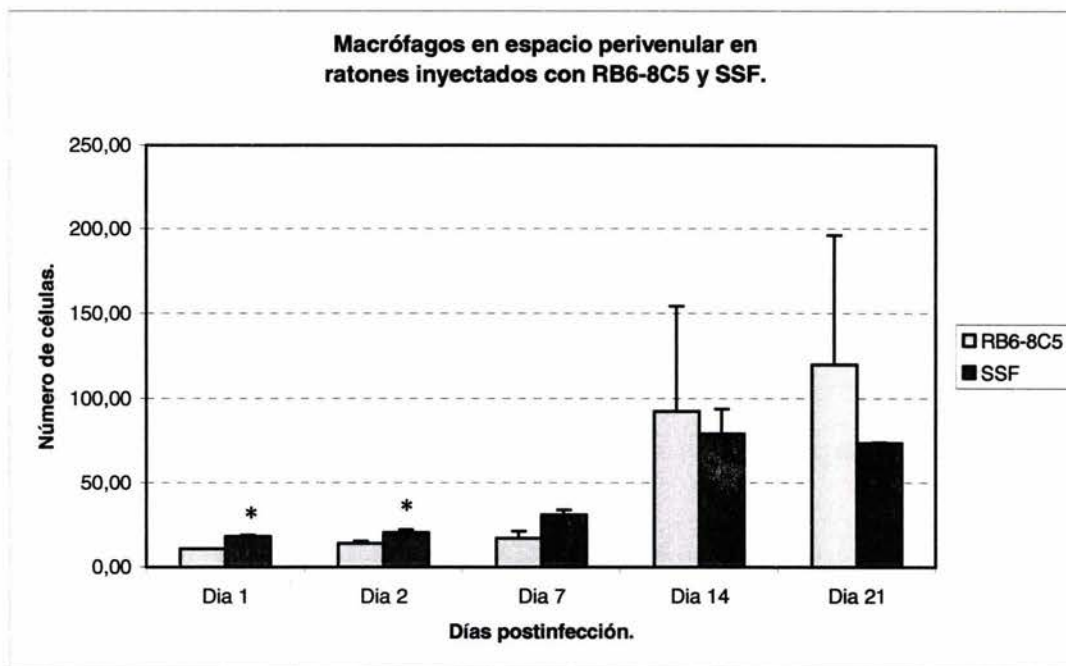
Gráfica 12.- Análisis Histológico en ratones Balb/c infectados con 1 millón de bacilos vivos y virulentos de la cepa *M. tuberculosis* H37Rv, por vía intratraqueal. La gráfica muestra el numero de linfocitos promedio, en espacio intersticial en grupos de ratones inyectados con el mAb anti-neutrofilos RB6-8C5 (barras amarillas) y con SSF (barras azules) vía i.p., durante el curso de la enfermedad. El asterisco representa la significancia estadística ($P < 0.05$).



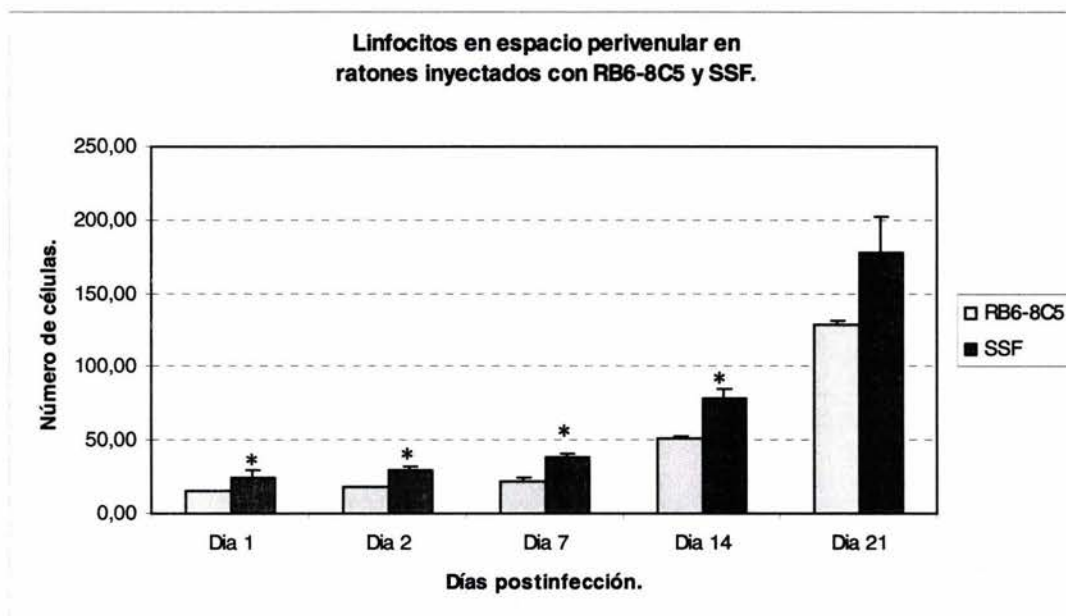
Gráfica 13.- Análisis Histológico en ratones Balb/c infectados con 1 millón de bacilos vivos y virulentos de la cepa *M. tuberculosis* H37Rv, por vía intratraqueal. La gráfica muestra las áreas de inflamación perivenular (en micras cuadradas), en grupos de ratones inyectados con el mAb anti-neutrófilos RB6-8C5 (barras amarillas) y con SSF (barras azules) vía i.p., durante el curso de la enfermedad. Los asteriscos representan la significancia estadística ($P < 0.05$).



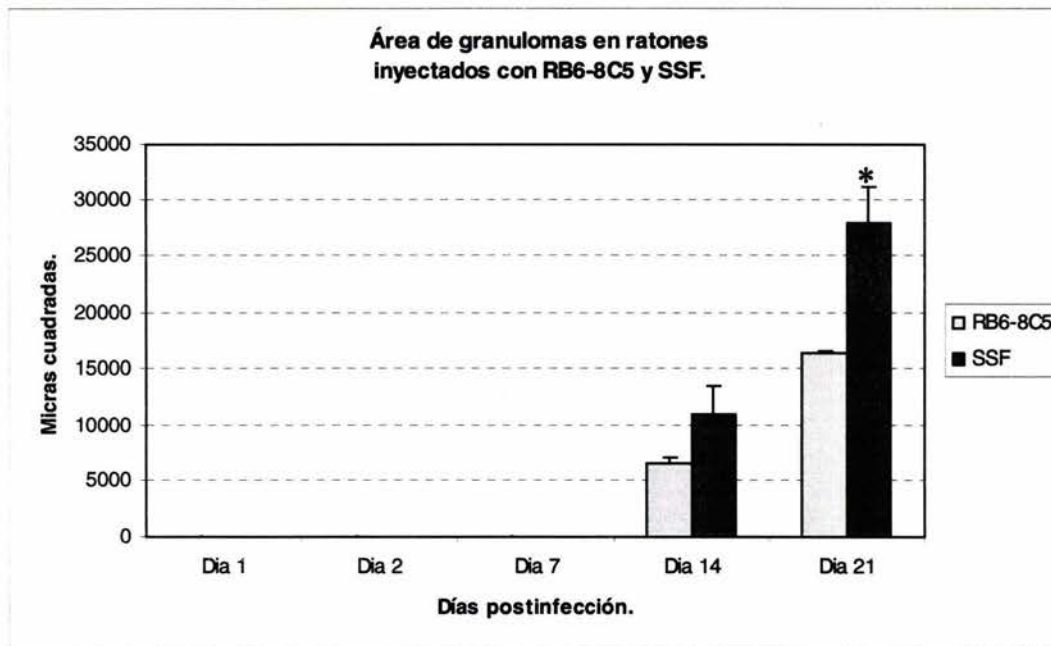
Gráfica 14.- Análisis Histológico en ratones Balb/c infectados con 1 millón de bacilos vivos y virulentos de la cepa *M. tuberculosis* H37Rv, por vía intratraqueal. La gráfica muestra el número de células promedio de neutrófilos, en espacio perivenular en grupos de ratones inyectados con el mAb anti-neutrófilos RB6-8C5 (barras amarillas) y con SSF (barras azules) vía i.p., durante el curso de la enfermedad. Los asteriscos representan la significancia estadística ($P < 0.05$).



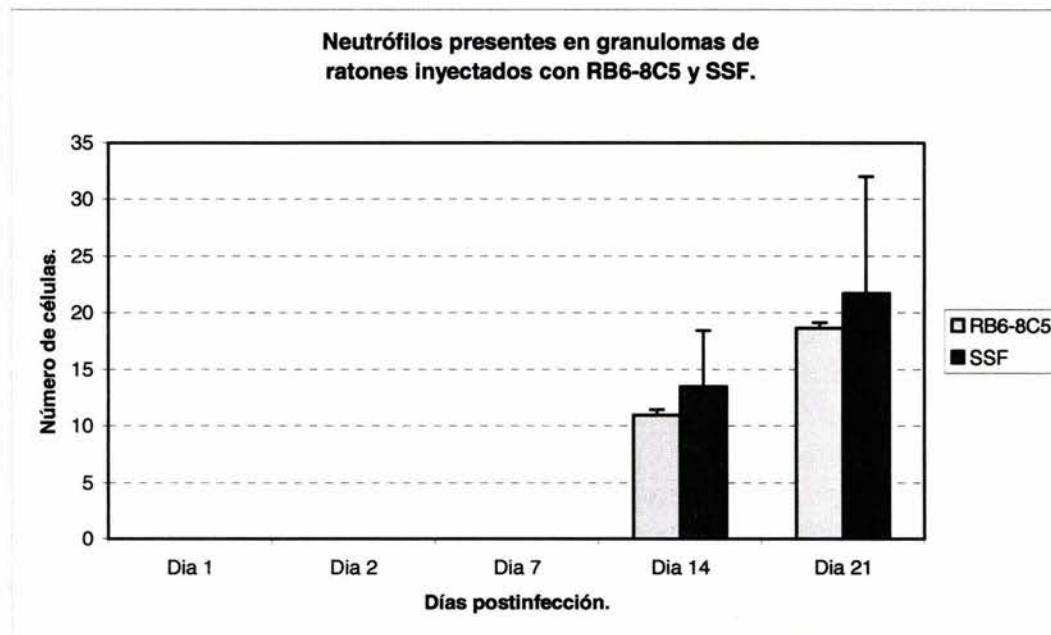
Gráfica 15.- Análisis Histológico en ratones Balb/c infectados con 1 millón de bacilos vivos y virulentos de la cepa *M. tuberculosis* H37Rv, por vía intratraqueal. La gráfica muestra el numero de macrófagos promedio, en espacio perivascular en grupos de ratones inyectados con el mAb anti-neutrófilos RB6-8C5 (barras amarillas) y con SSF (barras azules) vía i.p., durante el curso de la enfermedad. Los asteriscos representan la significancia estadística ($P < 0.05$).



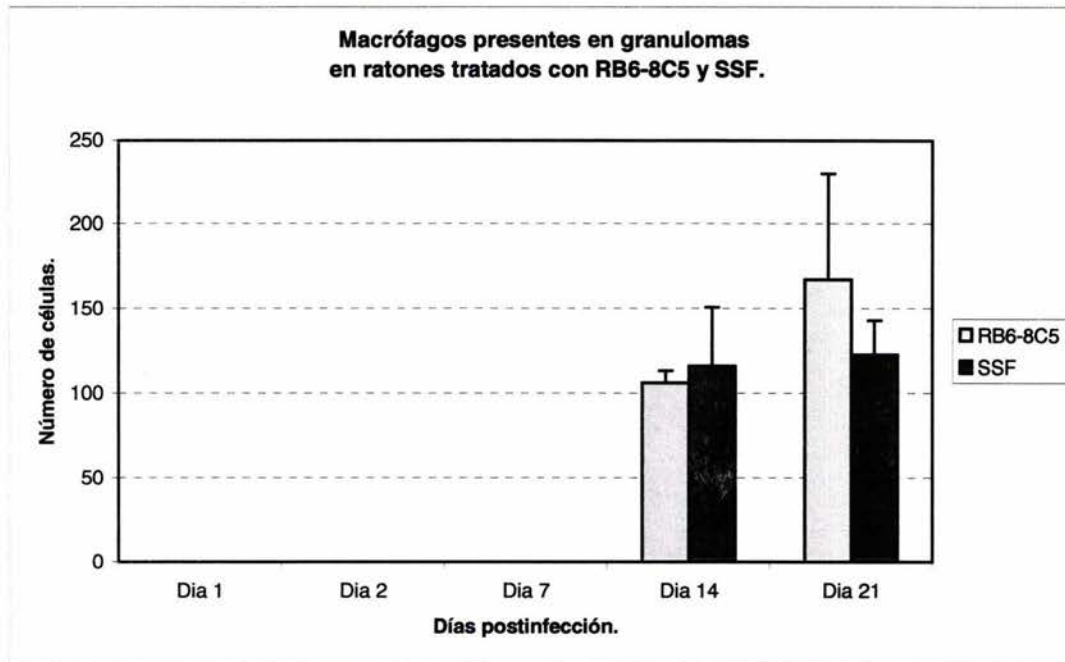
Gráfica 16.- Análisis Histológico en ratones Balb/c infectados con 1 millón de bacilos vivos y virulentos de la cepa *M. tuberculosis* H37Rv, por vía intratraqueal. La gráfica muestra el numero de linfocitos promedio, en espacio perivascular en grupos de ratones inyectados con el mAb anti-neutrófilos RB6-8C5 (barras amarillas) y con SSF (barras azules) vía i.p., durante el curso de la enfermedad. El asterisco representa la significancia estadística ($P < 0.05$).



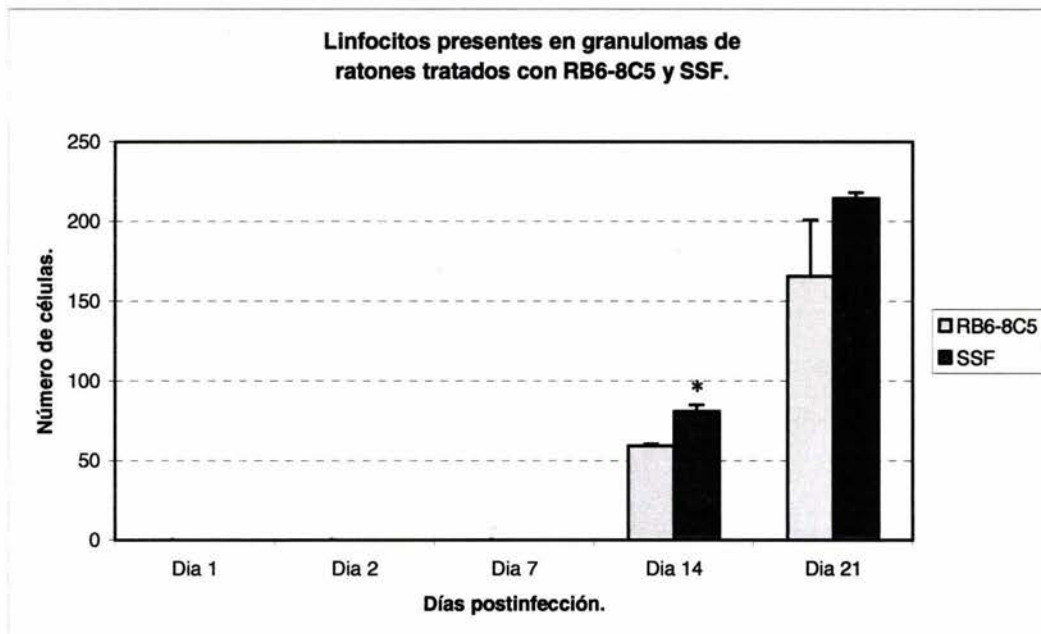
Gráfica 17.- Análisis Histológico en ratones Balb/c infectados con 1 millón de bacilos vivos y virulentos de la cepa *M. tuberculosis* H37Rv, por vía intratraqueal. La gráfica muestra el área que ocupan los granulomas (en micras cuadradas), en grupos de ratones inyectados con el mAb anti-neutrófilos RB6-8C5 (barras amarillas) y con SSF (barras azules) vía i.p., durante el curso de la enfermedad. El asterisco representa la significancia estadística ($P < 0.05$).



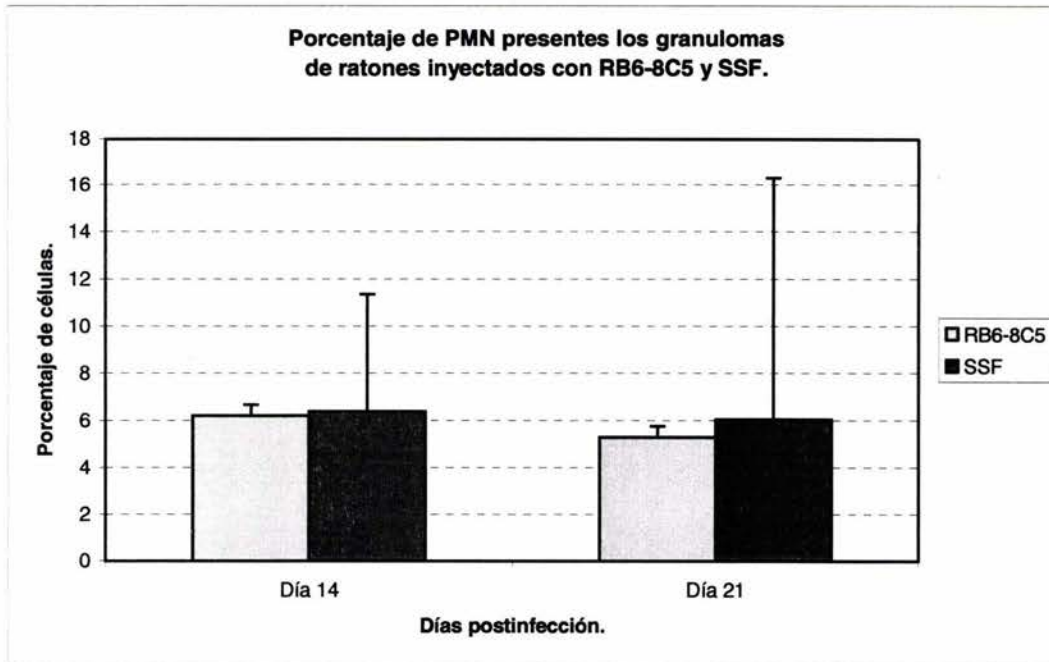
Gráfica 18.- Análisis Histológico en ratones Balb/c infectados con 1 millón de bacilos vivos y virulentos de la cepa *M. tuberculosis* H37Rv, por vía intratraqueal. La gráfica muestra el número de células promedio de neutrófilos encontradas en los granulomas de ratones inyectados con el mAb anti-neutrófilos RB6-8C5 (barras amarillas) y con SSF (barras azules) vía i.p., durante el curso de la enfermedad. En este análisis no se encontró significancia estadística.



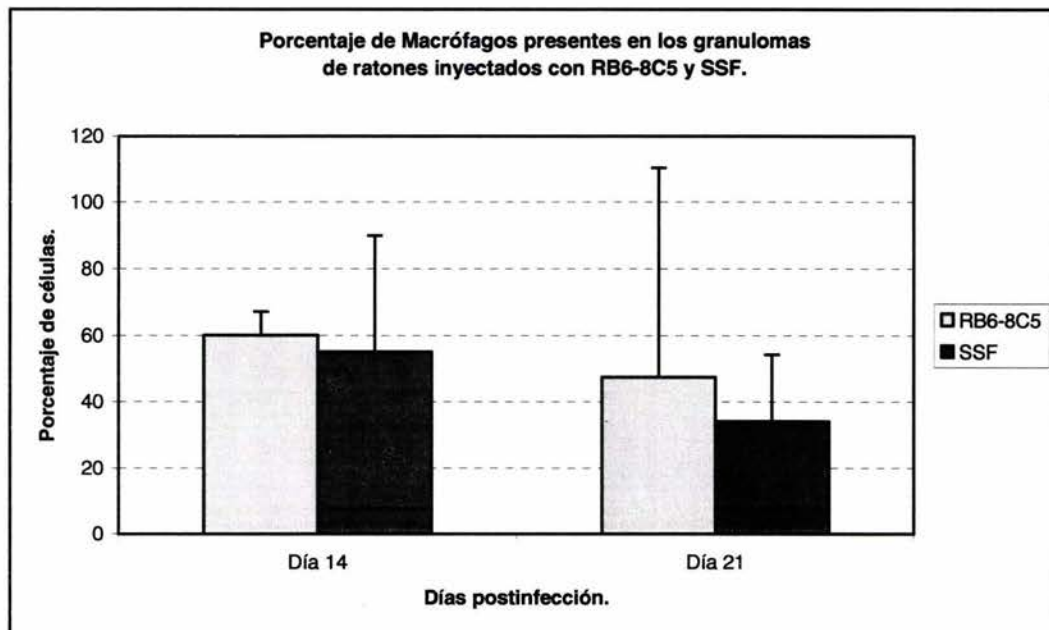
Gráfica 19.- Análisis Histológico en ratones Balb/c infectados con 1 millón de bacilos vivos y virulentos de la cepa *M. tuberculosis* H37Rv, por vía intratraqueal. La gráfica muestra el número de células promedio de neutrófilos encontradas en los granulomas de ratones inyectados con el mAb anti-neutrófilos RB6-8C5 (barras amarillas) y con SSF (barras azules) vía i.p., durante el curso de la enfermedad. En este análisis no se encontró significancia estadística.



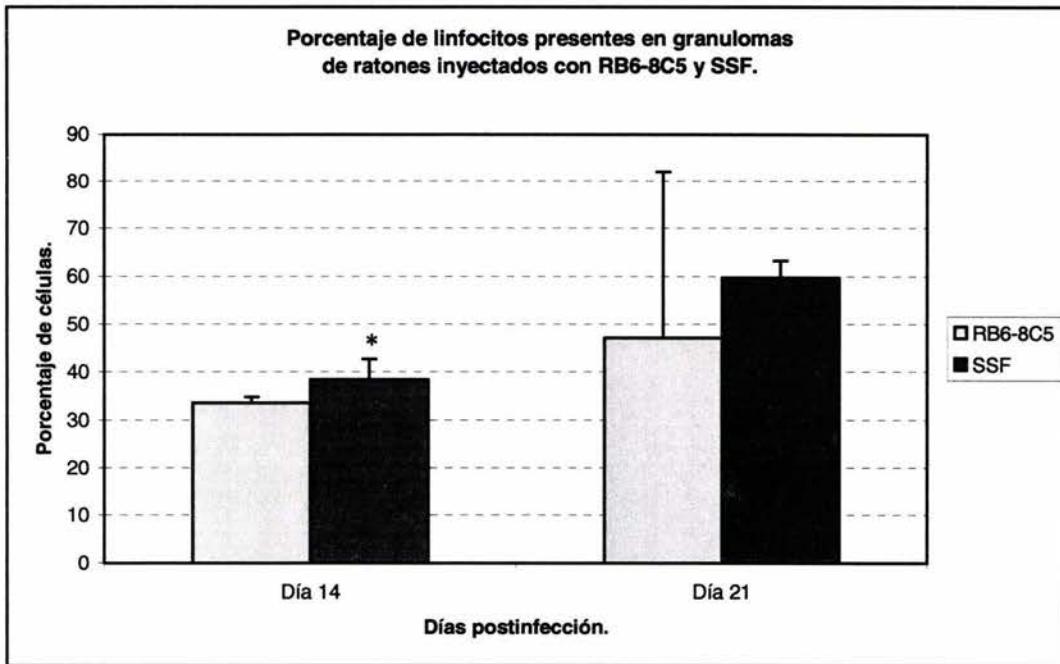
Gráfica 20.- Análisis Histológico en ratones Balb/c infectados con 1 millón de bacilos vivos y virulentos de la cepa *M. tuberculosis* H37Rv, por vía intratraqueal. La gráfica muestra el número de células promedio de linfocitos encontrados en los granulomas de ratones inyectados con el mAb anti-neutrófilos RB6-8C5 (barras amarillas) y con SSF (barras azules) vía i.p., durante el curso de la enfermedad. El asterisco representa la significancia estadística ($P < 0.05$).



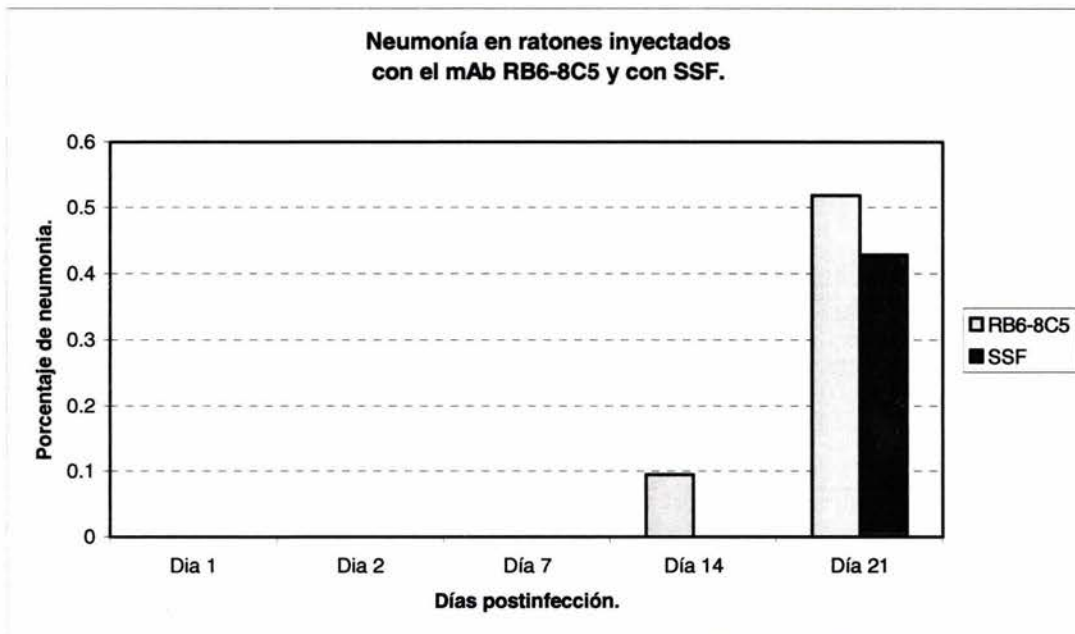
Gráfica 21.- Análisis Histológico en ratones Balb/c infectados con 1 millón de bacilos vivos y virulentos de la cepa *M. tuberculosis* H37Rv, por vía intratraqueal. La gráfica muestra el porcentaje de células promedio de PMN encontrados en los granulomas de ratones inyectados con el mAb anti-neutrófilos RB6-8C5 (barras amarillas) y con SSF (barras azules) vía i.p., durante el curso de la enfermedad. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas.



Gráfica 22.- Análisis Histológico en ratones Balb/c infectados con 1 millón de bacilos vivos y virulentos de la cepa *M. tuberculosis* H37Rv, por vía intratraqueal. La gráfica muestra el porcentaje de células promedio de Macrófagos encontrados en los granulomas de ratones inyectados con el mAb anti-neutrófilos RB6-8C5 (barras amarillas) y con SSF (barras azules) vía i.p., durante el curso de la enfermedad. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas.



Gráfica 23.- Análisis Histológico en ratones Balb/c infectados con 1 millón de bacilos vivos y virulentos de la cepa *M. tuberculosis* H37Rv, por vía intratraqueal. La gráfica muestra el porcentaje de células promedio de Macrófagos encontrados en los granulomas de ratones inyectados con el mAb anti-neutrófilos RB6-8C5 (barras amarillas) y con SSF (barras azules) vía i.p., durante el curso de la enfermedad. El asterisco representa la significancia estadística ($P < 0.05$).



Gráfica 24.- Análisis Histológico en ratones Balb/c infectados con 1 millón de bacilos vivos y virulentos de la cepa *M. tuberculosis* H37Rv, por vía intratraqueal. La gráfica muestra el porcentaje de pulmón ocupado por las áreas neumónicas, encontradas en los grupos de ratones inyectados con el mAb anti-neutrófilos RB6-8C5 (barras amarillas) y con SSF (barras azules) vía i.p., durante el curso de la enfermedad.

Bibliografía.

1. Kochi A. 1994. Tuberculosis distribution, risk factors, mortality. *Immunobiology* 191:325-336.
2. Murray CJ, Styblo K, Rovillon A. 1990. Tuberculosis in developing countries: burden, intervention and cost. *Bull. Int. Union Tuberc* 65:6-24.
3. Neil W. Schluger, William N. Rom 1998. The Host Immune Response to Tuberculosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 157:679-691.
4. Kochi A. 1991. The global tuberculosis situation and the new control strategy of the World Health Organization. *Tubercle* 72:1-6.
5. Sturgill-Koszycki S, Schlesinger PH, Chakraborty P, Haddix PL, Collins HL et al. 1994. Lack of acidification in *Mycobacterium* phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton ATPase. *Science* 263:678-81.
6. Helen L. Collins, Stefan H. E. Kaufman. 2001. *Immunology* 103:1-9.
7. Bernard D. Davis, Renato Dulbecco, Herman N. Eisen, Harold S. Ginsberg, W. Barry Wood, Maclyn McCarty, 1983. *Tratado de microbiología*, pag. 868.
8. Dafné M., P. Drapper. The envelope layers of micobacteria with reference to their pathogenicity. 1998. *Adv. Microbial. Phisyol.* 39:131-203.
9. Barksdale L., Kim K.S. *Mycobacterium*. 1977. *Bacteriol. Rev.* 41:217-372.
10. Hernández A., S.M., M.H. Hirata, R.D.C. Hirata, E. M. Mamizuka, M. Schmal and S. Hocino-Shimizu. Evaluation of Henes-PCR Assay for *Mycobacterium* Detection in Differential Clinical Specimens from Patients with or without Tuberculosis-associated HIV Infection. 2000. *J. Clin. Lab. Anal.* 14:238-245.
11. Fenton M., and Vermullen M. Immunopathology of Tuberculosis: Roles of Macrophages and Monocytes. 1996. *Infect. Immun.*; 64:683-690.
12. Gatfield J., and Pieters J., Essential Role for Cholesterol in Entry of *Mycobacteria* into Macrophages. 2000. *Science* 288:1647-1650.
13. Janes P., Steven C.L., Anthony I.M., and Panagiotis S.K. The role of lipid rafts in T cell receptor (TCR) signaling. 2000. *Immunol*; 12:23-34.
14. Panagiotis S. K., Janzen J., Anthony L.M. and Steven C.L. Cholesterol depletion disrupts lipid rafts and modulates the activity of multiple signaling pathways y T lymphocytes. 2000. *Eur. J. Immunol.* 30:954:963.
15. Cherukury Anu, Dykstra Michelle, and Pierce S. Floating the rafts Hipótesis: Lipid Rafts Play a Role in Immune Cell Activation. 2001. *Immun*; 14:657-660.
16. Flynn JL, Goldstein MM, Chan J, Triebold KJ, Pfeffer K, Lowenstein CJ, Schreiber R, Mar TW, and Bloom BR. Tumor necrosis factor-alpha is required in the protective immune response against *Mycobacterium tuberculosis* in mice. 1995. *Immun.* 2:561-572.
17. Flynn JL, Scanga CA, Tanaka KE and Chan J. Effects of Aminoguanidine on Latent Murine Tuberculosis. 1998. *J. Immunol.* 160:1796-1803.
18. O'Brien L, Carmichael J., Lowrie D., Andrew P. Strains of *Mycobacterium tuberculosis* differs in suceptibility to reactive nitrogen intermediates *in vitro*. 1994. *Infect. Immun.* 62:5187-5190.
19. Hernández-Pando R, Schön T, Orozco EH, Serafín J, and Estrada-García I, Expresión of inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosin durin the evolution of experimental pulmonary tuberculosis. 2001. *Exp. Toxic. Pathol*; 53:257-265.
20. Hirsch, C. S., J. J. Ellner, D. G. Rusell and E. A. Rich. 1994. Complement Receptor Mediated Uptake and Tumor Necrosis Factor Alpha-mediated Growth Inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* by Human Alveolar Macrophages. *J.Immunol.* 152:743.

21. Jacobs, M., N. Brown, N. Allie, R. Gulert and B. Ryffel. 2000. Increased Resistance to Mycobacterial Infection in the Absence of Interleukin 10. *Immunology* 100:494.
22. Bretscher, P. A., G. Wei, J. N. Menon and H. Bielefeldt-Ohmann. 1992. Establishment of Stable, Cell-mediated Immunity that Makes "Susceptible" Mice Resistant to *Leishmania major*. *Science* 257:539.
23. Hernández, P. R. and Rook, G. A. W. 1994. The Role of TNF α in T Cell-mediated Inflammation Depends on the Th1/Th2 Cytokine Balance. *Immunology* 82:26.
24. Xu S., Cooper A., Sturgill-Koszycki S., Van Heyningen T., Chatterjee D., Orme I., Allen P., and Russell D. G. Intracellular trafficking in *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*-infected macrophages. 1994. *J. Immunol* 53:2568-2578.
25. Deretic, V. and R. A. Fratti. *Mycobacterium tuberculosis* phagosome. 1999. *Molecular Microbiology*. 31:1603-1609.
26. Ferrari G., Naito M., Lancen H., and Pieters J. A Coat Protein on Phagosomes Involved in the Intracellular Survival of Mycobacteria. 1999. *Cell* 97:435-447.
27. Bainton DF, Ulyot JL, Farquhar MG: The development of neutrophilic polymorphonuclear leukocytes in human bone marrow: Origin and content of azurophil and specific granules. 1971. *J Exp Med* 134:907.
28. Bainton DF, Farquhar MG: Segregation and packaging of granule enzymes in eosinophilic leukocytes. 1970. *J Cell Biol* 45:54.
29. Jamuar MP, Cronkite EP. The fate of granulocytes. 1980. *Exp Hematol* 8:884.
30. Athens JW. Neutrophilic granulocyte kinetics and granulopoiesis, in Gordon AS (ed): Regulation of Hematopoiesis. New York, Appleton-Century-Crofts. 1970, p 1143.
31. Buescher ES, Gallin JI. Leukocyte transfusions in chronic granulomatous disease: persistence of transfused leukocytes in sputum. 1982. *N Engl J Med* 307:800.
32. Wright SD, Silverstein SC. Phagocytosing macrophages exclude proteins from the zones of contact with opsonized targets. 1984. *Nature* 309:359.
33. Lawrence MB, Springer TA. Leucocytes roll on a selectin at physiologic flow rates: distinction from and prerequisite for adhesion through integrins. 1991. *Cell* 65:859.
34. Zimmerman GA, Prescott SM, McIntyre TM. Endothelial cell interactions with granulocytes: tethering and signalling molecules. 1992. *Immunology Today* 13:93.
35. Kishimoto TK, Jutila MA, Berg EL, Butcher EC. Neutrophil Mac-1 and MEL-14 adhesion proteins inversely regulated by chemotactic factors. 1989. *Science* 245:1238.
36. Anderson DC, Miller LJ, Schmalstieg FC, et al. Contributions of the Mac-1 glycoprotein family to adherence-dependent granulocyte functions: Structure-function assessments employing subunit-specific monoclonal antibodies. 1986. *J Immunol* 137:15.
37. Spitznagel JK. Antibiotic proteins of human neutrophils. 1990. *J Clin Invest* 86:1381.
38. Territo MC, Ganz T, Selsted ME, Lehrer R. Monocyte-chemotactic activity of defensins from human neutrophils. 1989. *J Clin Invest* 84:2017.

39. Appelberg, R., A.G. Castro, and M.T. Silva. 1994. Neutrophils as effectors cells of T-cell-mediated, acquired immunity in murine listeriosis. *Immunology* 83:302-307.
40. Silva, M.T., M.N.T. Silva and R. Appelberg. 1989. Neutrophil-macrophage cooperation in the host defense against mycobacterial infections. *Microb. Pathog.* 6:369-380.
41. Appelberg, R. 1992. T cell regulation of the chronic peritoneal neutrophilia during mycobacterial infection. *Clin. Exp. Immunol.* 89:269-273.
42. Montgomery LG, Lemon W. 1933. The cellular reaction of the pleura to infection whit *Mycobacterium tuberculosis*. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2:429-438.
43. William E. Paul 1999. Inflammation. Lippincott, William and Wilkins. CD-Rom edition.
44. Elsbach P, Weiss J. 1985. Oxygen-dependent and oxygen-independent mechanism of microbicidal activity of neutrophils. *Immunol Lett* 11:159-63.
45. Devi S, Laning J, Luo Y, Dorf ME. 1995. Biologic activities of the beta-chemokine TCA3 on neutrophils and macrophages. *J Immunol* 154: 5376-83.
46. Rosenberg HF, Gallin JI. Inflammation. In: Paul WE, ed. *Fundamental Immunology*. 4th ed. Philadelphia, PA: Lippincott-Raven Publishers, 1051-66.
47. Gallin JI. 1985. Neutrophil specific granule deficiency. *Annu Rev Med* 36:263-74.
48. Antony VB, Sahn SA, Harada RN, Repine JE. 1983. Lung repair and granuloma formation. *Chest* 83(suppl): 95S-96S.
49. Brown AE, Holzer TJ, Andersen BR. 1987. Capacity of human neutrophils to kill *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis* 156:985-989.
50. Loyd, A.R. and Oppenheim, J.J. 1992. *Immunol. Today* 13:169-172.
51. Haziot, A., Tsuberi, B.Z. and Goyert, S.M. 1993. *J. Immunol.* 150:5556-5565.
52. Cassatella, M.A., Bazzoni, F., D'Andrea, A. et al. 1993. *Fundam. Clin. Immunol.* 1:99-106.
53. Malyak, M., Smith M. F., Abel A.A. and Arend, W.P. 1994. *J. Clin. Immunol.* 14:20-30.
54. Cassatella, M. A., Bazzoni, F., Ceska, M., Ferro, I., Baggiolini, M. And Berton, G. 1992. *J. Immunol.* 148:3216-3220.
55. Strieter, R.M., Kasahara, K., Allen, R.M. et al. 1992. *Am. J. Pathol.* 141:397-407.
56. Takahashi, G.W., Andrews, D.F., Lilly, M.B., Singer, J.W. and Alderson, M.R. 1993. *Blood.* 81: 357-364.
57. Kita, H., Ohnishi, T., Y., Weiler, D., Abrams, J.S. and Gleich, G.J. 1991. *J.Exp. Med.* 174:745-748.
58. Jarnagin J.L and Luschinger D. W. 1980. The use of Fluorescein Diacetate and Ethidium Bromide as Stain for Evaluating Viability of Mycobacteria. *Stain Technology* 55:253.
59. Lowry, H. O., N. I. Rosenbrough, A. L. Farr, et al. 1951. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* 93:265.
60. Rojas-Espinosa, O., J. Rangel-Moreno, A. Amador-Jiménez, R. Parra-Maldonado, P. Arce-Paredes and J. Torres-López. 1999. Secretión Antigens of *Mycobacterium tuberculosis*: A Comparison Between a Reference Strain and Seven Wild Isolates. *Arch. Med. Res.* 30:171.
61. Hernández, P. R., H. O Esteves, A. Sampieri, L. Pavón, C. Velasquillo, J. L. Sahd and V. M. Marina. 1996. Correlation between the kinetics of Th1/Th2

- Cells and Pathology in a murine model of experimental pulmonary tuberculosis. *Immunology* 89:26.
62. Hernández, P. R., H. O. Esteves, K. Arriaga, A. Sampieri, J.L. Sahd, V. M. Marina. 1997. Analysis of the Local Kinetics and Localization of interleukin 1 alpha, Tumor Necrosis Factor Alpha and Transforming Growth Factor Beta, during the course of Experimental Pulmonary Tuberculosis. *Immunology*. 156:1722.
 63. Jorge Pedrosa, Bernadette M.Saunders, Rui Appelberg, Ian M. Orme, Manuel T. Silva, and AndreaM. Cooper. 2000. Neutrophils Play a Nonphagocytic Role in Systemic *Mycobacterium tuberculosis* Infection of Mice.
 64. Gerald S. Jones, Harold J. Amirault, and Burton R. Andersen. 1990. Killing of *Mycobacterium tuberculosis* by Neutrophils: An Nonoxidative Process. *The Journal of Infectious Diseases*. 162; 700-704.
 65. Anders Sjöstedt, J. Wayne Conlan and Robert J. North. 1994. Neutrophils Are Critical for Host Defense against Primary Infection with the Facultative Intracellular Bacterium *Francisella tularensis* in Mice and Participe in Defense against Reinfection. *Infection and Immunity*. p. 2779-2783.
 66. Marco A. Cassatella. 1995. The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils. *Immunology Today*. Vol. 16 No. 1, 21:26.
 67. Gosselin, E.J., Wardwell, K., Rigby, W.F.C. and Guyre, P.M. 1993. *J.Immunol*. 151, 1482-1490.
 68. Wallis, R.S., H. Fujiwara, and J.J. Ellner. 1986. Direct stimulation of monocyte release of interleukin-1 by mycobacterial protein antigens. *J. Immunol*. 136: 193-196.
 69. Chen, W., E. A. Havell, L. L. Moldawer, K. W. McIntyre, R. A. Chizzonite, and A. G. Harmsen. 1992. Interleukin-1 an important mediator of host resistance against *Peumocystis carinii*. *J. Exp. Med*. 176: 713-718.
 70. Morissey, P. J., and K. Charrier. 1991. Interleukin-1 administration to C3H/HeJ mice after but not prior to infection increases resistance to *Salmonella typhimurium*. *Infect. Immun*. 59: 4729-4731.
 71. Rogers, H. W., K. C. F. Sheehan, L. M. Brunt, S. K. Dower, E. R. Unanue, and R. D. Schreiber. 1992. Interleukin-1 participates in the development of anti-*Listeria* responses in normal and SCID mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 1011-1015.
 72. Bazzoni, F., M. A. Cassatella, F. Rossi, M. Ceska, B. Dewald, and M. Baggiolini. 1991. Phagocytosis neutrophils produce and release high amounts of neutrophil-activating peptide 1/interleukin 8. *J. Exp. Med*. 173: 771-774.
 73. Kasama, T., R. M. Strieter, T. J. Standifort, M. D. Burdick, and S. L. Kunkel. 1993. Expression and regulation of human neutrophil-derived macrophage inflammatory protein 1 α . *J. Exp. Med*. 178: 63-72.
 74. Tepper, R. I., R. L. Coffman, and P. Leder. 1992. An eosinophil-dependent mechanism for the anti-tumor effect of interleukin-4. *Science (Wash. D.C.)*257:548.
 75. Goosens, P.L., H. Jouin, and G. Milon. 1991. Dynamics of lymphocytes and inflammatory cells recruited in liver during murine listeriosis