

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA**

**Efecto de los antígenos de *Mycobacterium tuberculosis* en la  
activación de linfocitos T regionales**

---

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
BIÓLOGO**

**P R E S E N T A**

**JONATHAN VENEGAS FLORES**

**Director de tesis:  
Dr. Leopoldo Flores Romo**

**LOS REYES IZTACALA EDO. DE MEXICO.**

**AGOSTO 2010**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**El presente trabajo se realizó en el  
Laboratorio de Inmunología Celular del  
departamento de Biología Celular  
del CINVESTAV-IPN.**

**El proyecto fue apoyado por el  
Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología  
COMECYT.**

*Todo el mundo trata de realizar algo grande, sin darse cuenta de que la vida se compone de cosas pequeñas*

*Lucio Anneo Séneca*

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Leopoldo Flores Romo, quien no sólo me abrió las puertas de su laboratorio y me permitió desarrollar una investigación, sino que también compartió sus conocimientos y experiencias haciendo de mi estancia la más placentera.

Al Dr. Aarón Silva Sánchez, quien me mostro lo fascinante que es el mundo de la inmunología, quien me ayudo día tras día, experimento tras experimento, de quien aprendí a ser paciente y objetivo, quien me mostro que la ciencia va más allá de la simple adquisición del conocimiento de las cosas, me enseñó que a través de la ciencia se pueden generar lazos de fraternidad. Gracias.

A mis compañeros de laboratorio del CINVESTAV, Selene, Elisa, Luis, Miguel, Juanita, Rosario, quienes siempre me apoyaron y orientaron en mi vida profesional y personal.

A la Dra. Iris Estrada y al Técnico Carlos quienes nos proporcionaron el lisado de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv para el desarrollo de dicha investigación.

Al comité de sinodales formado por, la Dra. Leticia Moreno Fierros, al Dr. Luis Ignacio Terrazas Valdés y a la Dra. Miriam Rodríguez Sosa, por sus atinados comentarios en la revisión del presente trabajo, en especial al Dr. Ricardo Mejía Zepeda, por compartir su amistad y conocimientos a lo largo de mi desarrollo académico.

A ti que me diste tu tiempo, que compartiste tu esencia, que me regalaste la vida, a ti que me cuidaste, te agradezco por el amor brindado, por el apoyo concedido, por la dicha aclamada, hoy cumplo una meta en mi vida y por eso doy gracias a esa persona querida.

**Gracias Mamá.**

Por el sacrificio hecho, por tus consejos brindados, por creer en mí, por todo lo que me has dado.

**Gracias Papá.**

A mi hermano por ser un ejemplo a seguir, por ser un apoyo incondicional, por ser un amigo, por darme ánimos, por creer en mí, por enseñarme a querer más.

A mi hermana por demostrarme que siempre se puede salir adelante.

Gracias por darme la oportunidad de ser parte de ti, gracias por rescatarnos de la ignorancia y marginación a tantos de tus discípulos, gracias por ser mi casa, porque gracias a ti generaciones tras generaciones, tenemos fe en el futuro y siempre serás la esperanza de miles de jóvenes. Porque sin ti no sería lo que soy y siempre te llevare en mi sangre y en mí ser.

**VIVA LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

A mi amada escuela, que me llena de orgullo ser parte de ella y que gracias a ti, puedo abrirme paso en este camino de incertidumbre y poner en alto tú nombre

**GRACIAS FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA**

A mis amigos de la carrera, Taco, Omar, Nec y Erick, quienes han estado no sólo en los momentos buenos de mi vida, (en las expediciones, reuniones, cumpleaños, etc.) Sino que principalmente me han extendido su mano en los momentos difíciles, y quienes forman parte más allá de una simple amistad, una hermandad.

A mis amigas, Tania, Nancy (Prima), Fernanda, Andrea, Wendy, Brenda, quienes siempre me han brindado su apoyo incondicional en toda ocasión.

A todos aquellos que de alguna forma han sido parte de esta aventura fantástica en mi vida y contribuyeron a mi formación personal y profesional.

## ÍNDICE

ÍNDICE.....	6
RELACIÓN DE FIGURAS.....	8
RELACIÓN DE TABLAS.....	10
ABREVIATURAS.....	11
RESUMEN .....	12
ABSTRACT .....	12
INTRODUCCIÓN.....	13
A. Tuberculosis.....	13
B. Género <i>Mycobacterium</i> y <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	14
B. 1. Morfología y características generales .....	14
C. Clasificación.....	14
D. Complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	16
E. Composición de la envoltura de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	17
E. 1 Membrana plasmática.....	17
E. 1.1 Lipoarabinomananas (LAM).....	17
E. 2 Pared Celular.....	18
E. 3. Cápsula.....	19
F. Respuesta inmune contra <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	20
F. 1. Respuesta inmune innata.....	20
F. 1.2. Inducción de la respuesta inmune adaptativa.....	21
F. 2. Linfocitos T citotóxicos.....	22
F. 3. Linfocitos T cooperadores.....	23
F. 4. Granuloma.....	26
G. Factores de virulencia y mecanismos de evasión de la Respuesta inmune.....	27
H. JUSTIFICACIÓN.....	30
I. OBJETIVOS.....	30
J. HIPÓTESIS.....	30
K. MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
K. 1. Ratones y descripción de los grupos de estudio.....	31
K. 2. Obtención del lisado de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	31

K. 3. Inmunización.....	33
K. 4. Obtención de órganos y de la suspensión celular.....	34
K. 5. Tinción de marcadores de activación y citometría de flujo.....	35
L. RESULTADOS.....	36
L. 1. Los antígenos de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> inducen un retraso en la expresión del marcador de activación CD69 en linfocitos T (CD4+) de pulmón y ganglios linfáticos.....	38
L. 2. Los antígenos de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> inducen un retraso en la expresión de Granzima B en linfocitos T (CD4+) de bazo.....	40
L. 3. Los antígenos de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> no tienen efecto en la expresión del marcador de activación CD69 en linfocitos T (CD8) de bazo, pulmón y ganglios linfáticos.....	42
L. 4. Los antígenos de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> inducen un retraso en la expresión de Granzima B de linfocitos T (CD8) de bazo y ganglios linfáticos.....	44
M. DISCUSIÓN.....	46
N. CONCLUSIONES.....	51
O. ANEXOS.....	52
O. 1. Anexo I Preparación de soluciones y reactivos.....	52
O. 2. Anexo II Anticuerpos y otros reactivos.....	53
O. 3. Anexo III Tinción extracelular e Intracelular .....	53
O. 4. Anexo IV Obtención del lisado de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	54
P. REFERENCIAS.....	56

## RELACIÓN DE FIGURAS

<b>FIGURA 1.</b> Incidencia a nivel mundial de Tuberculosis (OMS 2007).....	14
<b>FIGURA 2.</b> Árbol filogenético del complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	16
<b>FIGURA 3.</b> Estructura de la membrana plasmática.....	18
<b>FIGURA 4.</b> Pared Celular de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	19
<b>FIGURA 5.</b> Posibles eventos suscitados en respuesta a la infección con <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	21
<b>FIGURA 6.1</b> Eventos inmunológicos específicos que ocurren en la infección por <i>Mycobacterium tuberculosis</i> en seres humanos (PARTE I ).....	24
<b>FIGURA 6.2</b> Eventos inmunológicos específicos que ocurren en la infección por <i>Mycobacterium tuberculosis</i> en seres humanos (PARTE II).....	25
<b>FIGURA 7.</b> Curso de la infección de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> en el pulmón de ratones silvestres con genes suprimidos incapaces de producir IFN- $\gamma$ , NOS2, Células T $\alpha\beta$ , MHC Clase I, MHC Clase II y Células T $\gamma\delta$ .....	26
<b>FIGURA 8.</b> Patología del Granuloma.....	27
<b>FIGURA 9.</b> Imágenes representativas de la selección de linfocitos en suspensiones celulares de pulmón, analizados por citometría de flujo. Diagrama de puntos a) y densidad b), de ratones inoculados con PBS-BSA, donde se observa el tamaño (FSC) vs la complejidad interna de granularidad (SSC), así como la población de linfocitos T seleccionada (circulo rojo).....	36
<b>FIGURA 10.</b> Imágenes representativas de la selección de linfocitos en suspensiones celulares de pulmón, analizados por citometría de flujo. A) Diagrama de densidad que muestra la relación que existe de la complejidad celular (SSC) vs el marcador CD3-FITC B) Diagrama de densidad donde se muestra la relación de linfocitos CD8+ y CD4+, vs CD4-PerCP.....	37
<b>FIGURA 11.</b> Histogramas representativos de la activación de linfocitos A)T CD4 + y B) CD8+ por CD69. ....	37
<b>FIGURA 12.</b> Cinética de expresión de CD69 en los Linfocitos T CD4+ de bazo (S), pulmón (L) y ganglios linfáticos, popliteos (P) y mediastinales (M). La expresión de CD69 fue analizada a las 2, 4, 6, 12 y 24 hrs. En ratones inmunizados con lisado de Mtb H37Rv, LPS y PBS.....	40
<b>FIGURA 13.</b> Cinética de expresión de Granzima B en los Linfocitos T CD4+ de bazo (S), pulmón (L) y ganglios linfáticos, popliteos (P) y mediastinales	

(M). La expresión de Granzima B fue analizada a las 2, 4, 6, 12 y 24 hrs. En ratones inmunizados con lisado de Mtb H37Rv, LPS y PBS.....42

**FIGURA 14.** Cinética de expresión de CD69 en los Linfocitos T CD8+ de bazo (S), pulmón (L) y ganglios linfáticos, popliteos (P) y mediastinales (M). La expresión de CD69 fue analizada a las 2, 4, 6, 12 y 24 hrs. En ratones inmunizados con lisado de Mtb H37Rv, LPS y PBS.....43

**FIGURA 15.** Cinética de expresión de Granzima B en los Linfocitos T CD8+ de bazo (S), pulmón (L) y ganglios linfáticos, popliteos (P) y mediastinales (M). La expresión de CD69 fue analizada a las 2, 4, 6, 12 y 24 hrs. En ratones inmunizados con lisado de Mtb H37Rv, LPS y PBS.....45

## RELACIÓN DE TABLAS

<b>TABLA 1. Clasificación del Género <i>Mycobacterium tuberculosis</i> de acuerdo a su velocidad de crecimiento y producción de pigmentos en presencia o ausencia de luz.....</b>	<b>15</b>
<b>TABLA 2. Descripción de los grupos de estudio.....</b>	<b>30</b>
<b>TABLA 3. INHIBICIÓN DE DIFERENTES PROTEASAS MEDIANTE LAS TABLETAS DEL INHIBIDOR COMPLETE PROTEASA.</b> Concentraciones dadas para cada tableta de complete mini diluida en 50 ml de h <sub>2</sub> O. la actividad proteolítica se determinó con el sustrato universal de la proteasa. cuando las extracciones de aislamientos solo son necesarias en el rango de pH ácido, basta con incluir pepstatin con complete minipermitte garantizar aspártico (ácido) la inhibición de la proteasa. todos los experimentos se realizaron a temperatura ambiente. ....	<b>33</b>

## ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
Ag	Antígenos
AG	Arabinogalactanos
BAW	Lavado bronquio alveolar
BCG	Bacilo de Calmette-Guerin
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
GLP	Glicopeptidoglicanos
HIV	Human Immunodeficiency Virus
IL	Interleucina
IFN- $\gamma$	Interferón gamma
LAM	Lipoarabinomanana
LM	Lipomananas
LcT	Linfocito T
Lc $\gamma\delta$	Linfocitos gamma delta
MHC-I	Complejo Principal de Histocompatibilidad Clase I
MHC-II	Complejo Principal de Histocompatibilidad Clase II
Mtb	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
OMS	Organización Mundial de la Salud
PAMPs	Pathogen Associated Molecular Patterns
PBS	Solución Salina de Fosfatos
PG	Peptidoglicanos
SSF	Solución Salina Fisiológica
sMtb	Lisado de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
TACO	<i>tryptophane aspartate containing coat protein</i>
TB	Tuberculosis
TGF- $\beta$	Factor de Crecimiento Transformante beta
TNF- $\alpha$	Factor de Necrosis Tumoral alfa
RI	Respuesta inmune

## **RESUMEN**

La respuesta inmune generada durante la Tuberculosis pulmonar progresiva está compuesta principalmente por linfocitos T CD4+ específicos productores de interferón gamma (IFN- $\gamma$ ), que inducen la activación de macrófagos capaces de eliminar al bacilo. Sin embargo la infección con *Mycobacterium tuberculosis* no es eliminada y la bacteria persiste crónicamente en el pulmón. Aunque existe evidencia que sugiere que el establecimiento de *Mycobacterium tuberculosis* se debe a que esta bacteria puede alterar el inicio de la respuesta inmune y producir un retraso en la producción de IFN- $\gamma$  por los LcT específicos, los mecanismos y componentes involucrados en la inducción de dicho retraso no se han determinado. En este trabajo estudiamos el efecto de los componentes celulares de *Mycobacterium tuberculosis* sobre la función y activación tempranas de linfocitos T CD4+ y CD8+.

## **ABSTRACT**

During progressive pulmonary Tuberculosis the protective immune response is produced by the expansion of specific IFN- $\gamma$  producing T cells which are capable of activating resident macrophages and induce bacterial killing.

In spite of T cell responses the bacilli are not completely eliminated and persist chronically in infected lungs. Experimental evidence suggests that *Mycobacterium tuberculosis* establishment is dependent on the delay of immune responses during early phases of infection, although the components and mechanisms that promote such delay are not determined. In this work we studied the effect of Mycobacterial cellular components on the early activation and function of T cells.

## INTRODUCCIÓN

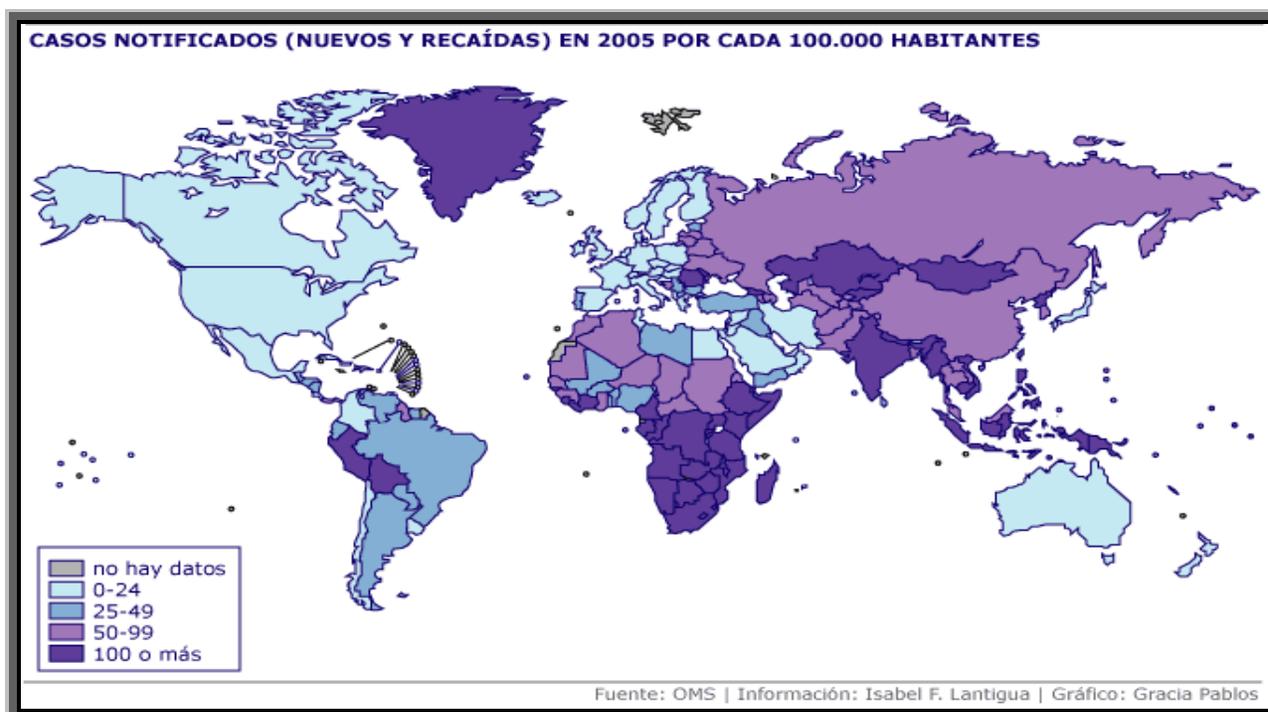
### A. Tuberculosis

La tuberculosis (TB) es la enfermedad con más mortalidad en la historia de las enfermedades de origen infeccioso <sup>1</sup>, y es causada por el bacilo ácido-alcohol resistente *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb). De acuerdo con las cifras de la Organización Mundial de la Salud (OMS), aproximadamente la tercera parte de la población mundial está infectada por Mtb <sup>1,2</sup> de los cuales sólo el 10% desarrolla Tuberculosis pulmonar, lo que equivale a 8 millones de casos nuevos y 2 millones de muertes por año.

Además se estima que alrededor de 15 millones de personas están coinfectadas con Mtb y HIV <sup>3</sup>. Por lo anterior, la OMS ha declarado a la TB como uno de los principales problemas de salud a nivel mundial.

La TB es una epidemia que sigue potencializándose a pesar de las medidas de control. El fracaso en el tratamiento se debe principalmente al acceso restringido a los medicamentos, la aparición de cepas resistentes a los antibióticos y la limitada cobertura de los programas de control <sup>4</sup>.

En la actualidad esta enfermedad tiene una incidencia significativa en todos los continentes, especialmente en países tercer mundistas (Fig.1). La principal estrategia para prevenir la tuberculosis pulmonar ha sido mediante la vacunación con la cepa atenuada *Mycobacterium bovis* BCG (Bacilo de Calmette-Guerin). Sin embargo esta sólo ha demostrado ser eficaz para prevenir las formas extrapulmonares (tuberculosis meníngea y cutánea) <sup>4</sup> en niños, mientras que en adultos la capacidad de conferir protección contra la tuberculosis pulmonar es variable e insuficiente <sup>5, 6</sup>.



**Fig. 1** Incidencia a nivel mundial de Tuberculosis (OMS 2007)<sup>1</sup>

## **B. Género *Mycobacterium* y *Mycobacterium tuberculosis***

### **B. 1. Morfología y características generales**

El género *Mycobacterium* está integrado por bacilos largos o curvos de 3 a 5  $\mu\text{m}$  de longitud, son microorganismos inmóviles, no esporulados y presentan abundantes gránulos citoplasmáticos<sup>7-9</sup>. Los miembros del género *Mycobacterium* tienen una composición única de la pared celular, debido a que los ácidos micólicos representan más del 50% de su peso seco, confiriendo una resistencia a la desecación y a las soluciones de tipo ácido-alcohol. La resistencia a los componentes ácido-alcohol hace que la detección de este género mediante la tinción de Gram no sea adecuada por lo que se requiere el empleo de una tinción como la desarrollada por Ziehl-Neelsen<sup>8</sup>.

## **C. Clasificación**

El género *Mycobacterium* es el único miembro de la familia *Mycobacteraceae* que pertenece al orden *Actinomycetes* la cual se caracteriza por tener en su ADN un contenido de G+C entre el 62-70%<sup>9</sup>. En 1950, Timpe y Runyon propusieron una clasificación para el género *Mycobacterium* la cual se basa en la velocidad de crecimiento (rápido o lento, según sea superior o inferior a una semana), producción de pigmento en presencia o ausencia de luz (fotocromógeno, escotocromógeno y no

cromógeno) y características morfológicas de las colonias. En la tabla 1 se presenta la clasificación actualizada de Runyon<sup>9</sup>, incluyendo a los miembros del género *Mycobacterium* con mayor importancia para el humano.

**Tabla 1. Clasificación del género *Mycobacterium* de acuerdo a su velocidad de crecimiento y producción de pigmentos en presencia o ausencia de luz. Modificada Springer *et al.*, (1996)<sup>10</sup>.**

Grupos y Subgrupos	Especies de micobacterias	Patología
<b>I. Fotocromógeno de crecimiento lento</b>	<i>M. kansasii</i> ( <i>M. lipophilum</i> ) <i>M. asiaticum</i>	Pulmonar, Ganglionar, Meníngea, Osteoarticular, Urogenital.
<b>II. Escotocromógeno de crecimiento lento</b> a b c	<i>M. lactis</i> <i>M. scrofulaceum</i> ( <i>M. marianum</i> ) <i>M. goodii</i> ( <i>M. aquae</i> ) <i>M. flavescens</i> <i>M. szulgai</i> <i>M. ulcerans</i> <i>M. xenopi</i> <i>M. simiae</i> ( <i>M. habana</i> )	Ganglionar, Pulmonar, Osteoarticular, Cutánea, Urogenital.
<b>III. No cromógenos de crecimiento lento.</b>	<i>M. tuberculosis</i> <i>M. bovis</i> ( <i>M. bovis</i> BCG) <i>M. africanum</i> <i>M. avium</i> <i>M. intracellulare</i> <i>M. gastri</i> <i>M. nonchromogenicum</i> <i>M. terrea</i> ( <i>M. novum</i> ) <i>M. triviale</i> <i>M. haemophilum</i> <i>M. shimodei</i>	Pulmonar, Renal, Osteoarticular, Meníngea, Intestinal, Ganglionar, Cutánea.
<b>IV. Fotocromógeno de crecimiento rápido</b>	<i>M. marinum</i> ( <i>M. balnei</i> )	Cutánea, Articular
<b>V. Escoto cromógenos de crecimiento rápido</b> a b c	<i>M. engbaekii</i> <sup>2</sup> <i>M. acapulcense</i> <sup>3</sup> <i>M. aurum</i> <i>M. gilvum</i> <i>M. duvalii</i> <i>M. neoaurum</i> <i>M. gadium</i> <i>M. phlei</i> <i>M. smegmatis</i> <i>M. vaccae</i> <i>M. parafortuitum</i> <i>M. thermoresistibile</i>	Pulmonar, Renal, Osteoarticular, Meníngea, Intestinal, Ganglionar, Cutánea.
<b>VI. No cromógenos de crecimiento rápido</b>	<i>M. fortuitum</i> ( <i>M. peregrinum</i> ) <i>M. chelonae</i> <i>M. chitae</i>	Cutánea, pulmonar, osteoarticular, ocular, meníngea.

#### D. Complejo *Mycobacterium tuberculosis*

Dentro del género *Mycobacterium*, en las especies no cromógenas de crecimiento lento, existe un conjunto de micobacterias que se caracterizan por tener una similitud del 99.9% en el genoma y secuencias idénticas de la subunidad ribosomal<sup>11,12</sup>. A este conjunto de Micobacterias se le denominó complejo *Mycobacterium tuberculosis*, el cual está formado por las especies, *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. microtii*, *M. canettii* y *M. bovis*. Se asume que las especies que forman este complejo derivan de un ancestro común (Fig. 2), aunque estas difieren en el fenotipo, tropismo y patogenicidad. Por ejemplo, *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. canettii* son patógenos específicos de humanos, *M. microtii* puede infectar roedores y *M. bovis* posee un amplio espectro infectivo.

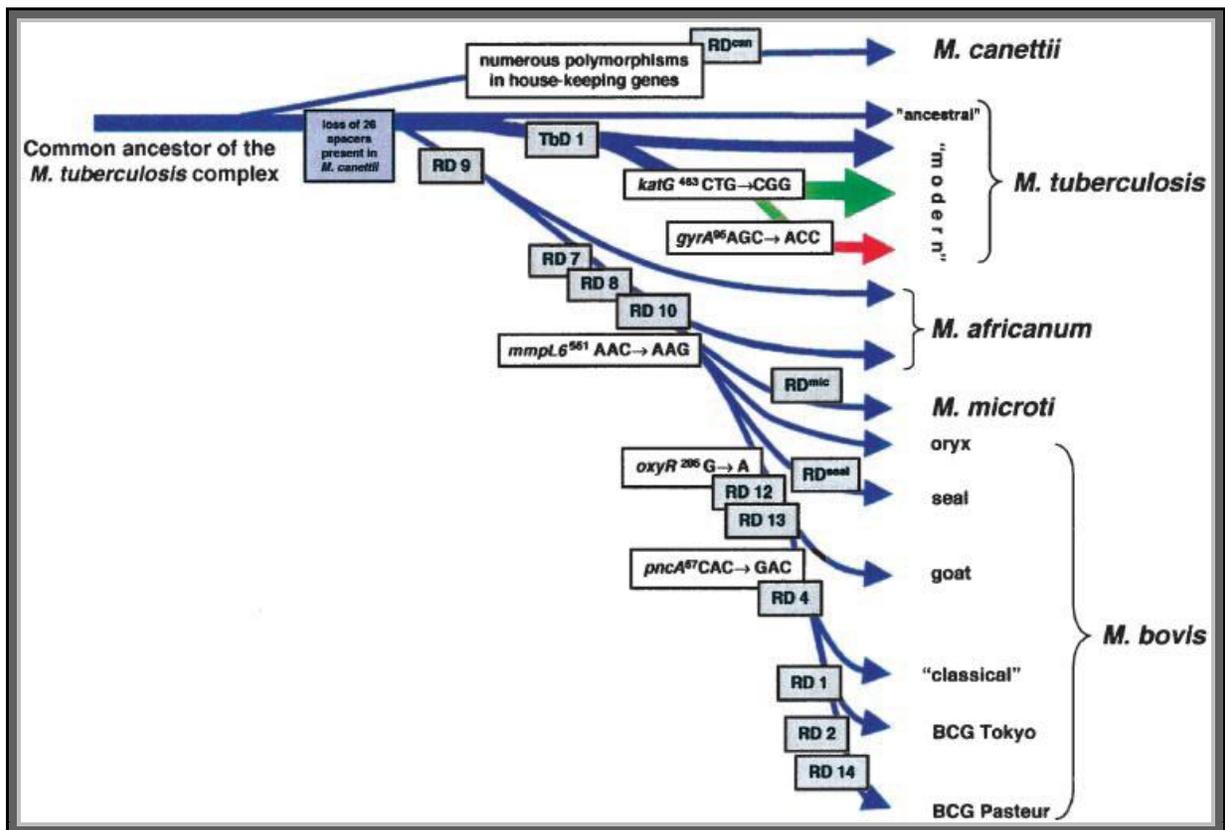


Fig 2. Árbol filogenético del complejo *Mycobacterium tuberculosis* Sreevatsan et al.<sup>12</sup>

## **E. Composición de la envoltura de *Mycobacterium tuberculosis***

La conformación estructural de la envoltura de Mtb es similar a las bacterias Gram (+). Esta se compone de diversas capas de peptidoglicanos y arabinomananas las cuales tienen funciones significativas para la sobrevivencia de la micobacteria. Los principales componentes y sus funciones se describen a continuación.

### **E. 1 Membrana plasmática**

La membrana de Mtb tiene la función de protección osmótica y transporte selectivo de iones y moléculas. Está constituida por una bicapa lipídica sobre la que se asocian proteínas y algunos lipopolisacaridos como lipoarabinomananas (LAM) y lipomananas (LM). También presenta estructuras agrupadas de fosfolípidos como fosfatidil-inositol-manosidos (PIM), fosfatidilgliceroles, cardiolipinas y fosfatidiletanolaminas (PE)<sup>5</sup>. Se ha visto que los PIM juegan un papel importante como adhesinas entre la micobacteria y la célula huésped, permitiendo la unión al macrófago por medio del Receptor a Manosa (MR) y facilitando su fagocitosis<sup>13</sup> (Fig. 3).

#### **E. 1.1 Lipoarabinomanana (LAM)**

El LAM es una importante biomolécula de la pared celular que se encuentra presente en todas las especies de las micobacterias. Se considera que LAM atraviesa toda la estructura del bacilo<sup>14</sup>.

Los extremos de LAM en especies patógenas y de crecimiento lento (Mtb y *M. bovis*) generalmente terminan en residuos de manosa (ManLAM), a diferencia de las cepas de crecimiento rápido (*M. smegmatis*) que terminan en el residuo fosfo-inositol (AraLAM)<sup>15</sup>.

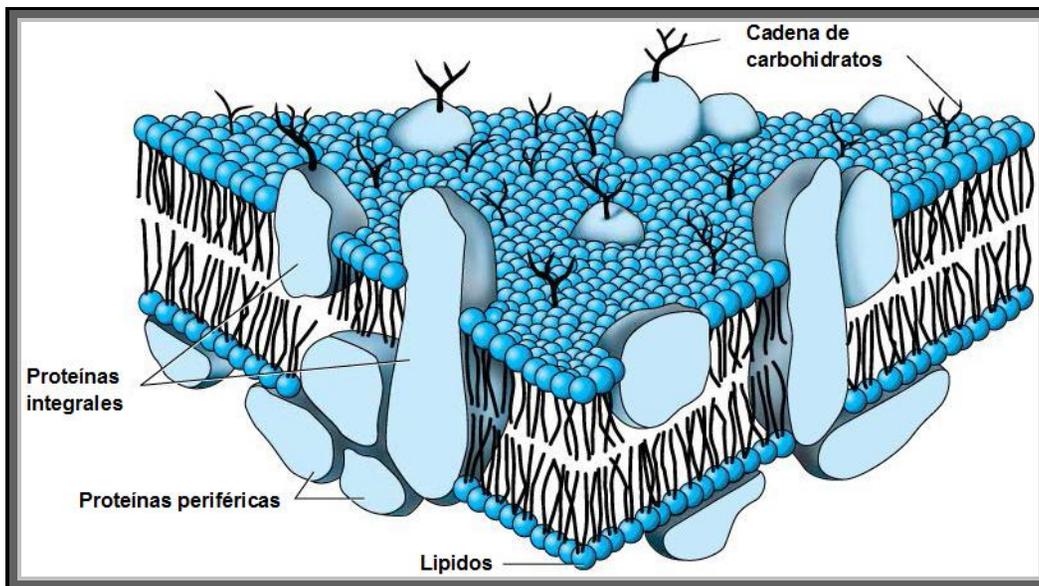


Fig. 3 Estructura de la membrana plasmática<sup>16</sup>

## E. 2. Pared Celular

A diferencia de la membrana plasmática, la pared celular proporciona soporte mecánico y protección a la desecación debido a que está constituida por moléculas hidrofílicas principalmente peptidoglicanos (PG), arabinogalactanos (AG) y ácidos micólicos. El esqueleto de la pared celular se encuentra asociado mayoritariamente a lípidos hidrofóbicos y glicolípidos de forma no covalente<sup>17</sup>.

De acuerdo a su composición química la pared celular se ha dividido en tres capas.

**Capa interna:** La capa interna de la pared micobacteriana se encuentra formada por peptidoglicanos (PG), el cual está constituido por unidades repetitivas de N-acetil glucosamina unidas a ácido N-acetil murámico mediante enlaces  $\beta 1 \rightarrow 4$ , las cuales se encuentran unidas a tetra péptidos (L-alanina, D-alanina, D-glutámico, lisina) por ácido murámico<sup>18</sup> (Fig. 4).

**Capa media:** En la mayoría de las micobacterias el arabinogalactano (AG) representa aproximadamente el 35% de la pared celular<sup>18</sup>. Se ha demostrado que la estructura de AG está compuesta exclusivamente de D-galactofuranosas y D-arabinofuranosas<sup>19</sup> (Fig.4).

**Capa externa:** Está conformada por una estructura glicolípida. Los ácidos micólicos son ácidos  $\alpha$ -ramificados y  $\beta$ -hidrolizados de alto peso molecular ( $C_{70}$ - $C_{90}$ ) que se encuentran presentes en todas las especies de micobacterias<sup>20</sup> (Fig. 4).

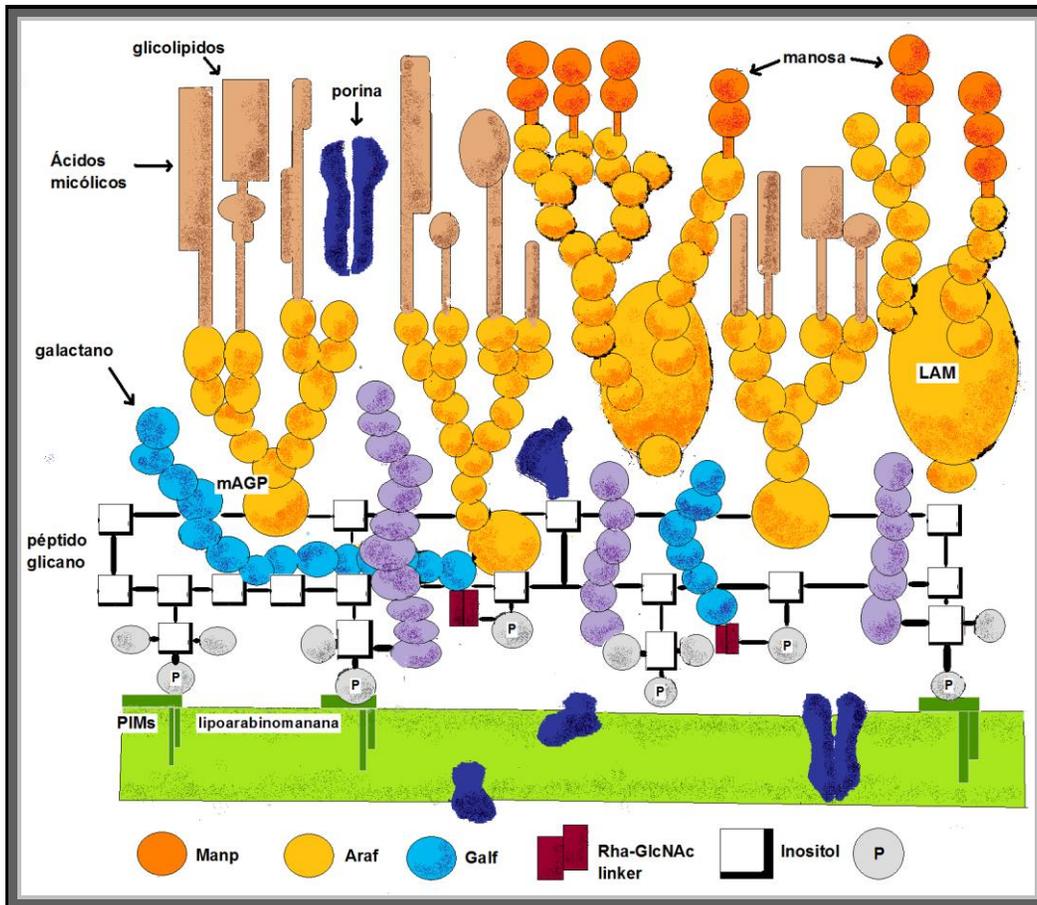


Fig. 4 Pared Celular de *Mycobacterium tuberculosis*<sup>18, 19</sup>

### E. 3. Cápsula

Existe una capa externa a la pared celular en todas las especies de micobacterias, denominada cápsula. La cápsula constituye la interfase entre la micobacteria y el huésped<sup>21</sup>, una de sus funciones es controlar los componentes que pueden alcanzar el interior de la bacteria, además protege del ataque por agentes antimicrobianos y puede modular la respuesta inmune del huésped<sup>14</sup>.

Se han descrito algunos componentes presentes en la cápsula, como los glicolípidos que tienen un efecto inhibitor sobre las actividades antimicrobiales de los macrófagos, los glicopeptidoglicanos (GLP) que desempeñan un papel fundamental en la supervivencia de las micobacterias dentro del macrófago y que inhiben la proliferación *in vivo* e *in vitro* de células esplénicas mononucleares<sup>13, 22</sup>.

## **F. Respuesta Inmune contra *Mycobacterium tuberculosis***

### **F. 1. Respuesta Inmune Innata**

La ruta natural de entrada del bacilo es a través de la inhalación de la micobacteria que ha sido expulsada durante la tos o en los estornudos de individuos infectados<sup>23, 24</sup>, una vez que el bacilo llega al alveolo, se desencadenan una serie de mecanismos dirigidos a su eliminación. El resultado del encuentro del bacilo con la respuesta inmune puede tener tres posibles situaciones, I) que la respuesta inmune sea efectiva llevando a la eliminación y muerte del bacilo, II) que la micobacteria no sea eliminada totalmente y comienza a multiplicarse ocasionando una manifestación clínica, III) el sistema inmune puede impedir el crecimiento del bacilo sin causar eliminación total<sup>24, 25</sup> (Fig.5).

Los macrófagos alveolares, células dendríticas y células epiteliales del pulmón son la primera línea de defensa con la que tiene contacto Mtb ya que estos pueden reconocer las estructuras invariables de patógenos (PAMPs) a través de los receptores<sup>24</sup>. En particular los receptores tipo toll (en particular TLR2 y TLR4), que reconocen lípidos asociados a proteínas y carbohidratos<sup>26</sup>, inducen la fagocitosis de la micobacteria y la activación del macrófago (estallido respiratorio, secreción de citocinas). Sin embargo, Mtb puede escapar al ambiente hostil generado por las especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, evitando la maduración del fagolisosoma.

En células dendríticas los antígenos micobacterianos que son reconocidos a través de TLR2 y TLR4, inducen las vías de activación de ERK1/2 y p38 MAPK, las cuales tienen una función esencial en la expresión de TNF- $\alpha$  e IL-6 durante la infección<sup>26</sup>. Estas proteínas que son secretadas por las células dendríticas tanto de ratones como de humanos, conducen a la activación de la inmunidad innata, provocando inflamación, regulación y activación de la respuesta inmunitaria adaptativa<sup>27</sup>.

Uno de los posibles mecanismos de evasión utilizados por la micobacteria, es un aparente retraso en la migración de las células dendríticas al ganglio mediastinal. Por ejemplo; se ha visto que la llegada de células dendríticas al ganglio mediastinal ocurre hasta el día 14 post-infección<sup>28</sup>, al igual que la aparición de linfocitos T (productores de interferón- $\gamma$ ) en el pulmón hasta la tercera semana de infección<sup>28</sup>.

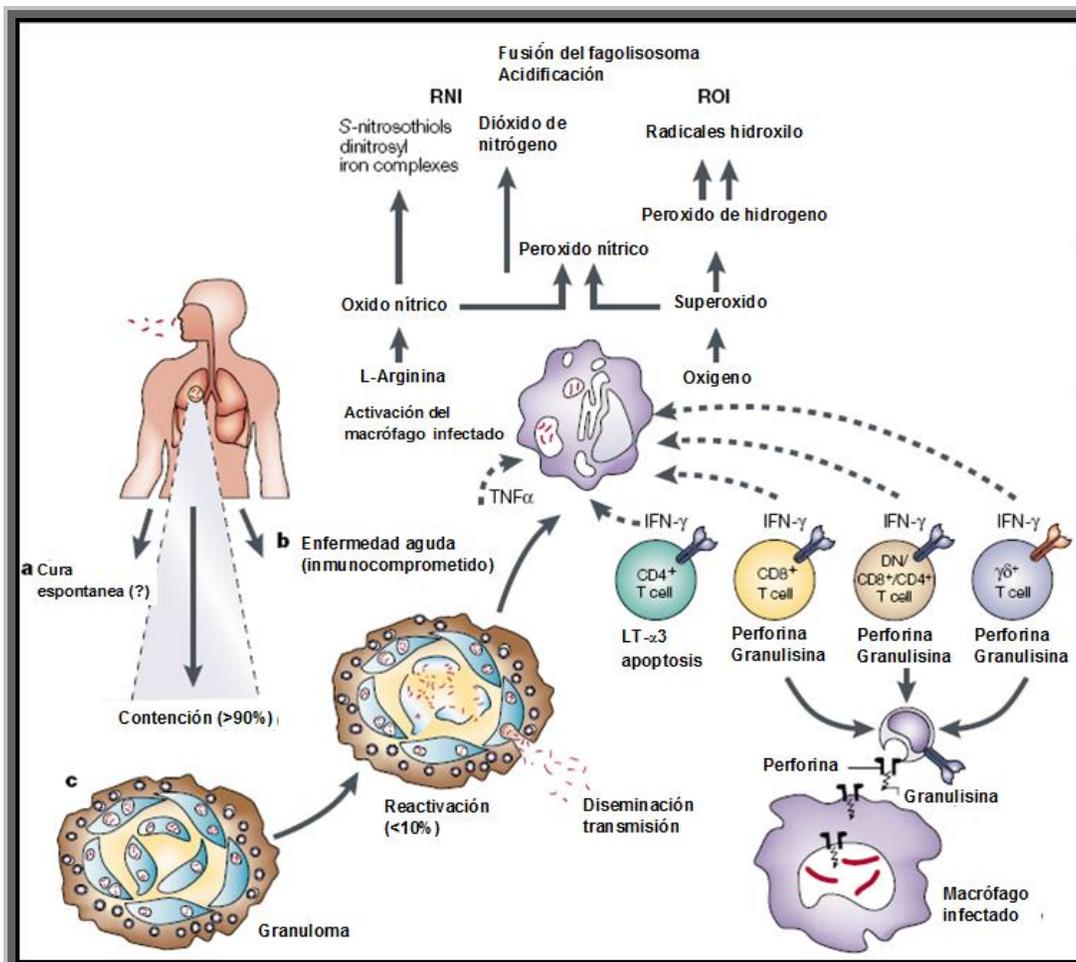


Fig.5. Posibles eventos suscitados en respuesta a la infección con *Mycobacterium tuberculosis*

## F. 1.2. Inducción de la Respuesta Inmune Adaptativa

En la respuesta inmune adaptativa contra Mtb, la producción del IFN- $\gamma$  por los linfocitos T y la acumulación de macrófagos activados son importantes para el control de la infección. También pueden participar los linfocitos T citotóxicos que eliminan células infectadas, la producción de linfocitos T $\gamma\delta$ , los linfocitos B y anticuerpos (Fig. 6.1, 6.2).

Los linfocitos T $\gamma\delta$  se encuentran asociados a mucosas, estos pueden reconocer antígenos lipídicos<sup>29</sup>, como fosfatidilinositoldimánósidos, glucosamonomicolato y lipoarabinomanana (LAM)<sup>30</sup>, restringiendo a esta subpoblación celular a respuestas contra antígenos lipídicos<sup>31</sup>.

Se ha reportado que individuos sanos que están en contacto con pacientes tuberculosos, por ejemplo el personal de salud, presentan un porcentaje superior de linfocitos T $\gamma\delta$  en comparación con individuos no expuestos<sup>32</sup>. Sin embargo, el comportamiento de la infección en ratones deficientes de linfocitos T $\gamma\delta$  es idéntica a la

cinética observada en ratones silvestres. Por lo que se sugiere, que el reconocimiento de los antígenos micobacterianos por linfocitos  $T\gamma\delta$  no es de gran importancia para la eliminación del bacilo<sup>32</sup> (Fig. 7).

Ya que Mtb es un patógeno intracelular, no se ha considerado que los linfocitos B y los anticuerpos sean importantes en la respuesta inmune en contra de la infección. Sin embargo se ha observado que los ratones deficientes en linfocitos B, desarrollan daño tisular y carga bacteriana mayor que en el grupo de ratones silvestres. También la transferencia de anticuerpos anti-LAM, disminuye la carga bacteriana en ratones infectados<sup>32</sup>.

## F. 2. Linfocitos T citotóxicos

Los linfocitos T CD8+ reconocen antígenos micobacterianos en moléculas MHC-I, se ha demostrado que la micobacteria libera antígenos al citoplasma y de esta forma son procesados para ser presentados por el MHC-I<sup>33,34</sup>. Se ha visto que en ratones deficientes en moléculas de MHC-I, es decir carentes de linfocitos T CD8+, la carga bacteriana incrementa ligeramente (Fig. 7).

Cuando el linfocito T CD8+ es activado por la célula dendrítica, se produce  $IFN-\gamma$ , (papel que será descrito en la siguiente sección)<sup>35</sup> y se produce la exocitosis de gránulos enzimáticos.

Dichos gránulos pueden contener enzimas como la perforina, granzima y granulicina.

**Perforina:** Es una proteína de tipo globular perteneciente a la familia de las proteasas, la cual actúa en la membrana celular provocando una mayor permeabilidad y degradación que permiten el paso de solutos con mayor facilidad.

**Granzima:** Particularmente la Granzima B, es una proteasa que intracelularmente tiene la capacidad de inducir apoptosis a través de la activación de las caspasas y liberación de citocromo C de la mitocondria.

**Granulicina:** Es una enzima tipo saposina, que actúa en la membrana celular, degradando la glucosilceramida y esfingomiélin, lo que conduce a un incremento en la concentración de ceramida que está involucrada en la inducción de apoptosis<sup>36</sup>.

Estos mecanismos conducen a la muerte de la célula blanco y a la posible eliminación de los bacilos intracelulares<sup>36</sup> (Fig. 6. 2).

### F. 3. Linfocitos T cooperadores

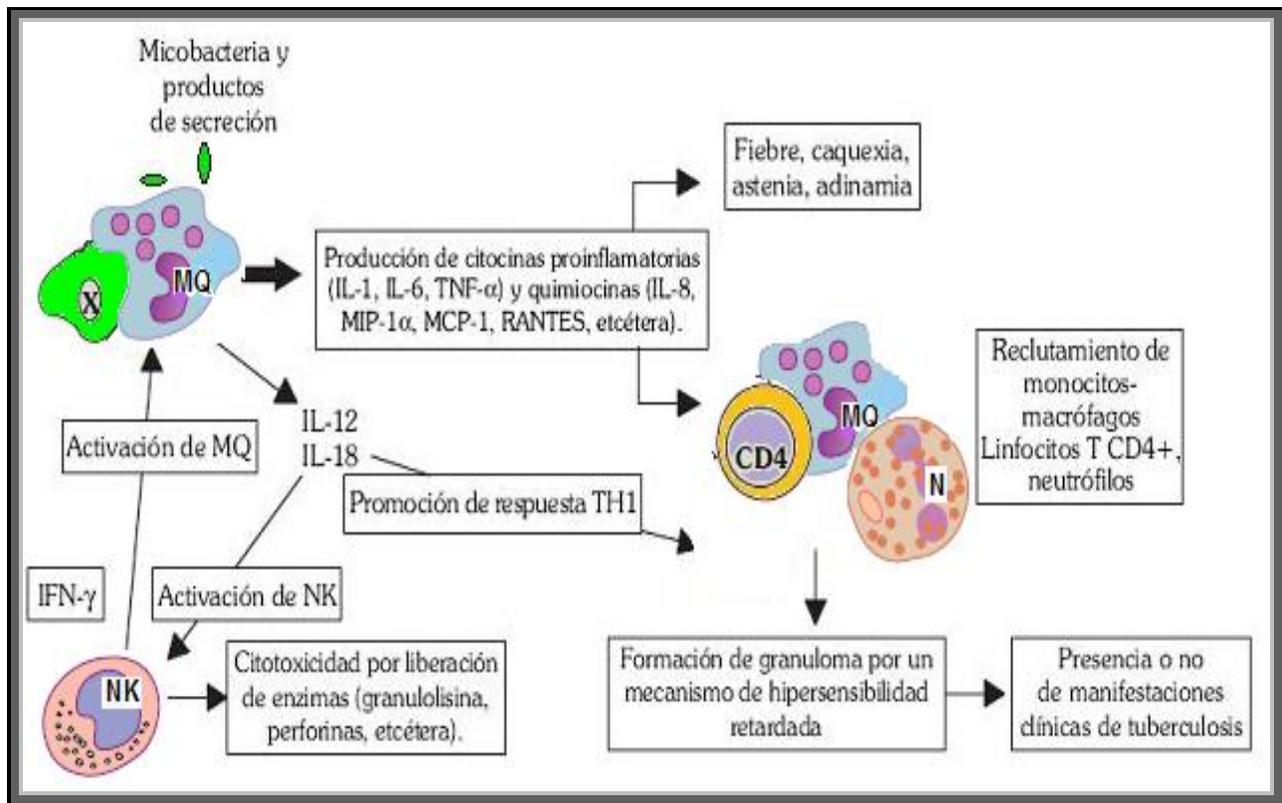
La respuesta inmune contra Mtb está mediada principalmente por linfocitos T CD4+, que reconocen antígenos micobacterianos asociados al MHC-II<sup>37</sup>. Los linfocitos T cooperadores activados producen grandes cantidades de IL-2, TNF- $\beta$  e IFN- $\gamma$  promoviendo la activación y proliferación de macrófagos y linfocitos T CD8+ y T $\gamma\delta$ <sup>38, 39</sup>. Además, el IFN- $\gamma$  puede inhibir la secreción de citocinas de tipo Th2 (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13), las cuales favorecen la respuesta inmune humoral. En el modelo murino de la tuberculosis experimental durante la fase crónica de la infección, se observa un incremento en la concentración de IL-4, favoreciendo a la sobrevivencia de la micobacteria (Fig. 6.1).

Además en ratones deficientes en células T CD4+, se observa el mayor incremento en la carga bacteriana en el pulmón, en comparación con los ratones silvestres y los deficientes en linfocitos T CD8+, por lo que se considera que los linfocitos T CD4+, son la subpoblación más importante para el control de la enfermedad (Fig. 7).

Se ha observado que el mecanismo efector más importante para controlar la infección con Mtb es el IFN- $\gamma$ , ya que es un promotor de la activación de macrófagos e induce la expresión de la óxido nítrico sintasa (iNOS) cuyo producto, como el óxido nítrico (NO), son altamente tóxicos.

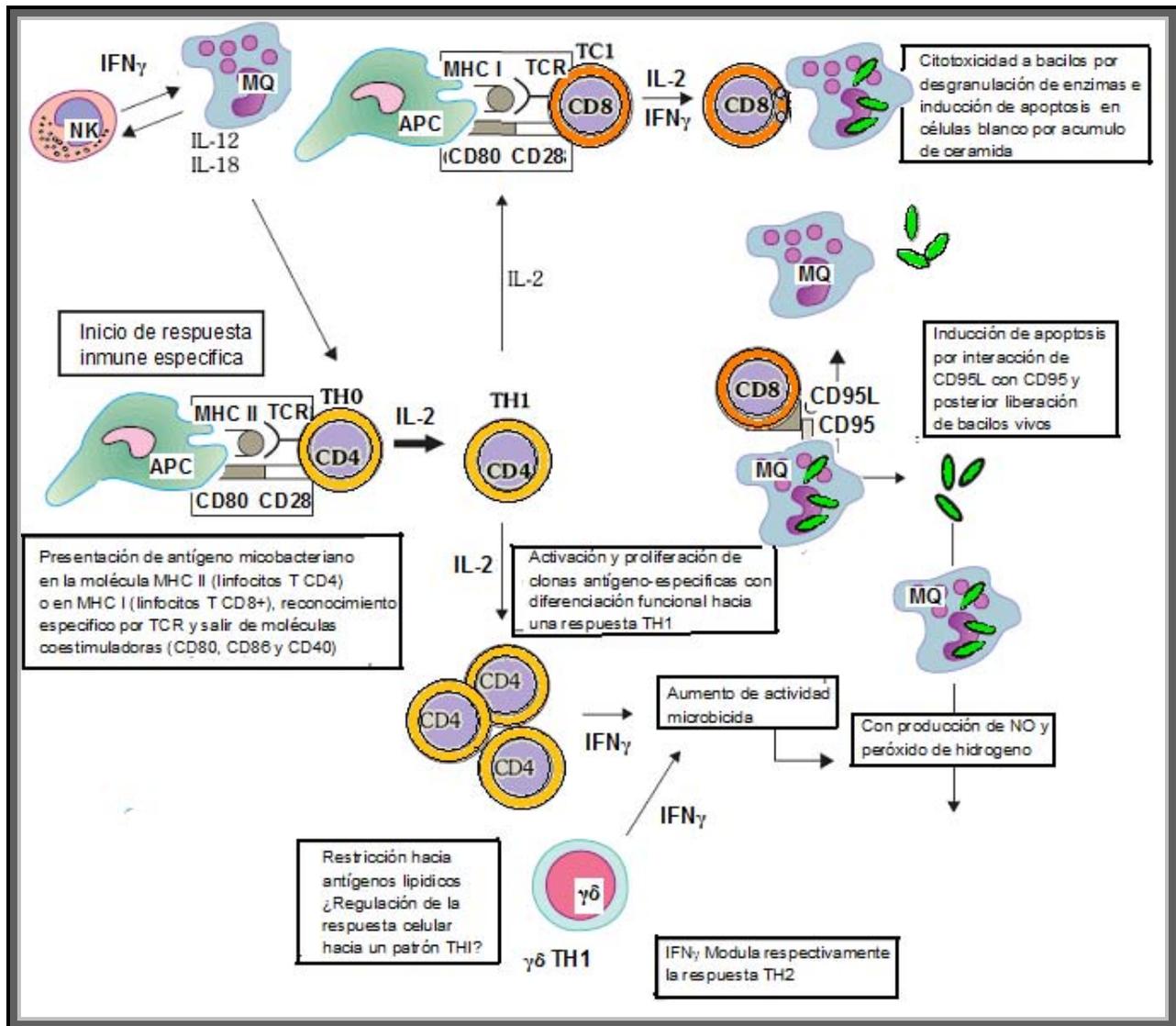
En humanos se han descrito algunas inmunodeficiencias en la producción de IFN- $\gamma$  (IFN- $\gamma$  e IL-12r)<sup>38,39</sup> asociada con susceptibilidad a infecciones mediadas por Mtb y *Salmonella typhi*.

La importancia del IFN- $\gamma$  contra la infección con Mtb se comprobó en ratones deficientes en IFN- $\gamma$  o iNOS en los cuales la concentración bacteriana en el pulmón presenta niveles mayores que los ratones deficientes en linfocitos TCD4+, TCD8+ y T $\gamma\delta$  (Fig. 7).



**Fig. 6.1** Eventos inmunológicos específicos que ocurren en la infección por *Mycobacterium tuberculosis* en seres humanos. (PARTE I)

X: célula epitelial-endotelial; MQ: macrófagos; NK: células NK; N: neutrófilos; IL (interleucina); TNF-  $\alpha$ : factor de necrosis tumoral; MIP-1  $\alpha$ : proteína alfa inflamatoria alfa; MCP-1: proteína quimiotactica monocitos; RANTES: regulated on activation normal T-cell expressed and secreted.



**Fig. 6.2** Eventos inmunológicos específicos que ocurren en la infección por *Mycobacterium tuberculosis* en seres humanos. (PARTE II)

CPA: célula presentadora de antígeno; MHC: complejo mayor de histocompatibilidad; TCR: receptor de linfocito T; CD4: linfocitos T CD4+; CD8: linfocitos TCD8+; TC1: linfocitos T citotóxico de tipo 1 (clasificación por patrón de citocinas); MQ: macrófago; IL: interleucina; IFN- $\gamma$ : interferón gamma; TH: linfocito T cooperador;  $\gamma\delta$ : linfocito T gamma-delta; NO: óxido nítrico.

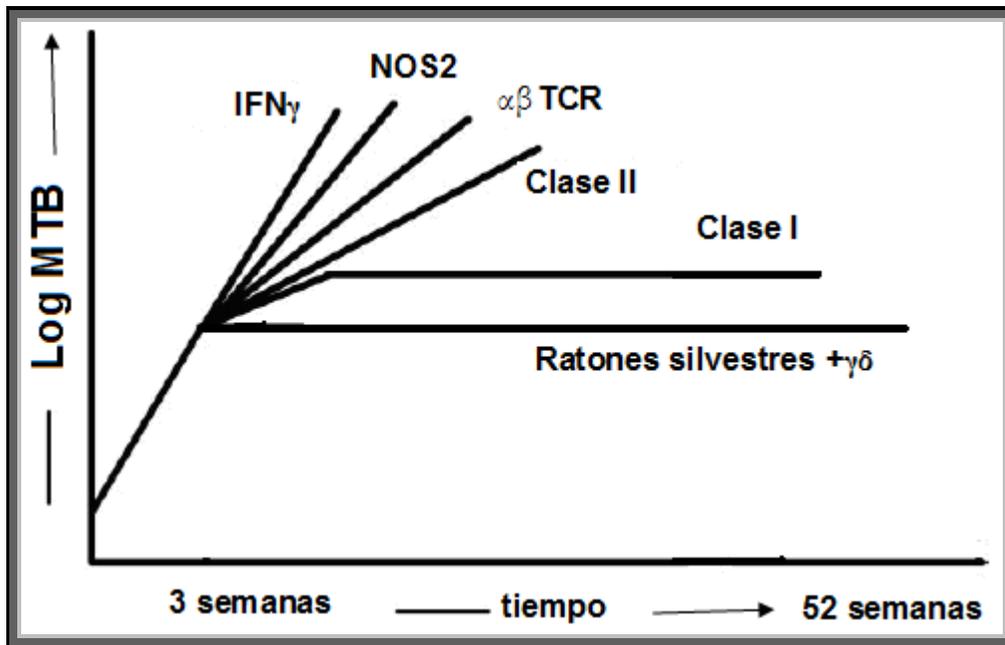


Fig. 7 Curso de la infección de *Mycobacterium tuberculosis* en el pulmón de ratones incapaces de producir IFN- $\gamma$ , NOS2, células T $\alpha\beta$ , MHC Clase I, MHC Clase II o células T  $\gamma\delta$ <sup>60</sup>.

#### F. 4. Granuloma

Los mecanismos celulares antes descritos no siempre son suficientes para la eliminación de la bacteria. La permanencia de Mtb induce un estado proinflamatorio crónico, incrementando la producción de TNF $\alpha$ , en comparación con el TGF- $\beta$ . La producción de estas citocinas conducen al reclutamiento y la sucesiva acumulación de neutrófilos, macrófagos, natural killers (NK), linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> al sitio de infección, el pulmón<sup>40-42</sup>. Estas células forman una estructura organizada alrededor del núcleo de las células infectadas. En la parte central se presenta una capa de macrófagos activados (células espumosas), y alrededor se acumulan linfocitos T efectores y macrófagos no activados. Debido a la constante producción de TGF- $\beta$ , induce la formación de una estructura fibrosa de colágeno con una matriz extracelular que delimita la periferia de esta estructura conocida como granuloma<sup>43-46</sup>.

En la etapa tardía, el núcleo del granuloma pierde vascularidad y comienza a necrosarse, facilitando rupturas en la pared del granuloma y que los bacilos sean liberados hacia las vías respiratorias propiciando así el ciclo de transmisión<sup>42-44</sup>.

En humanos con la forma activa de tuberculosis pulmonar se conocen las zonas necróticas del granuloma como área caseosa y en etapas más tardías como cavidades (Fig. 8).

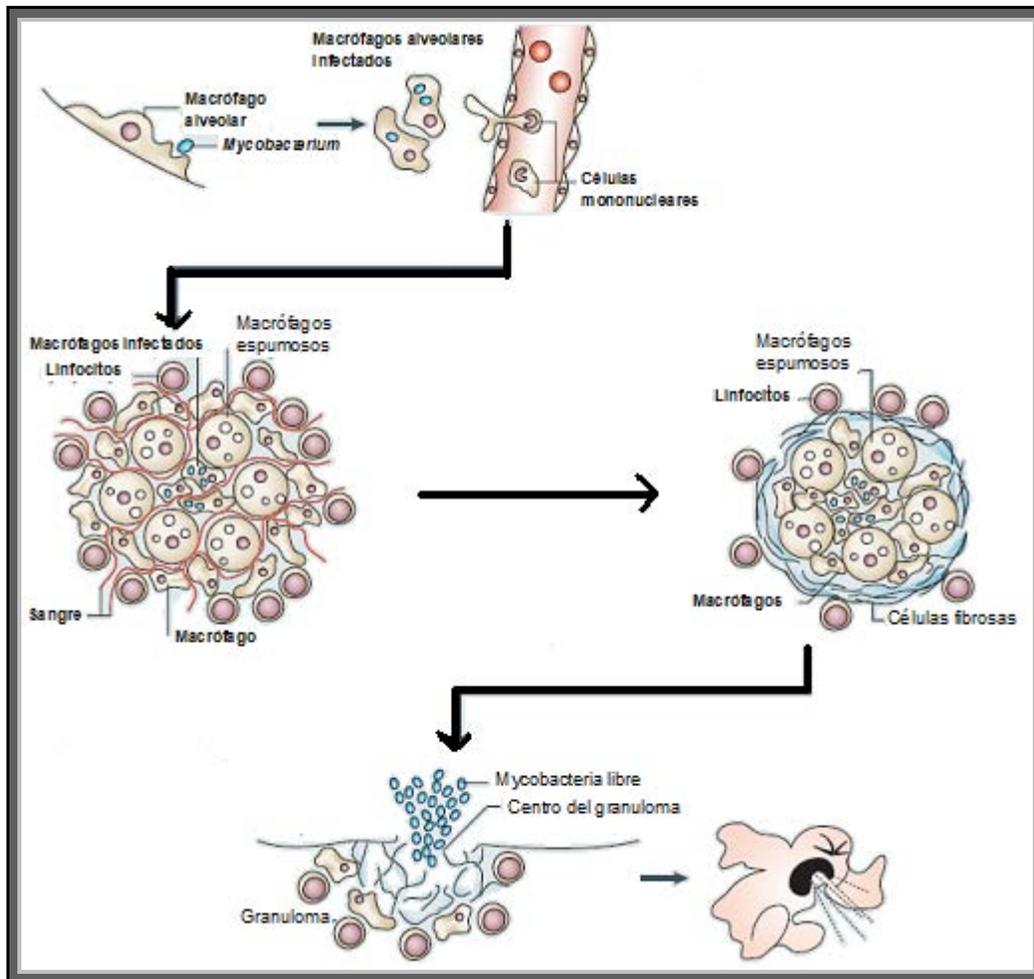


Fig. 8 Patología del Granuloma

### G. Factores de virulencia y mecanismos de evasión de la Respuesta Inmune

Mtb es una bacteria que ha desarrollado mecanismos de evasión del sistema inmune valiéndose no sólo de los componentes capsulares anteriormente descritos, sino que además presenta otros factores moleculares asociados a la virulencia, por ejemplo; la participación de la ureasa intracelular de Mtb, la cual genera amonio e inhibe la acidificación del lisosoma y evita la fusión fagosoma-lisosoma<sup>47</sup>, permitiendo que la micobacteria sobreviva y se divida en los macrófagos y células dendríticas<sup>30, 48, 49</sup>.

De los componentes de la pared celular que participan en la evasión del sistema inmune, se ha sugerido que el LAM está ligado al proceso de unión e internalización de las micobacterias virulentas al macrófago, a través de receptores de manosa (MR)<sup>14</sup>. El ManLAM de la cepa virulenta de Mtb H37Rv se une estrechamente al MR, mientras que el mismo polisacárido de la cepa atenuada H37Ra, o el PI de *M. smegmatis*, se une débilmente al MR.

En conjunto tanto PI como el AM de la estructura de LAM presentan un amplio espectro de funciones inmunoregulatoras, como la inhibición de la activación de los macrófagos murinos mediada por interferón  $\gamma$ , y el secuestro de radicales libres de oxígeno que son altamente citotóxicos para la micobacteria<sup>50</sup>.

El Dimicolato de trehalosa (TDM), que se encuentra en la pared celular de Mtb<sup>51</sup>, afecta la capacidad de supervivencia de cepas de BCG en el pulmón del ratón. Las cepas a las que se les han extraído el TDM, tiene una supervivencia notablemente inferior a la de la misma cepa no deslipidificada<sup>52</sup>. De igual forma al inocular TDM a ratones infectados con BCG aumenta su capacidad infectiva, causando rápidamente la muerte del animal<sup>53</sup>. Las cepas avirulentadas como H37Ra, poseen una menor cantidad de TDM en su envoltura celular en comparación al que se encuentra en la cepa virulenta H37Rv<sup>51</sup>.

Otra de las estrategias de la micobacteria utilizada para la evasión del sistema inmune, es la retención de una proteína denominada TACO (tryptophane aspartate-containing coat protein), esta proteína forma parte de la cubierta del fagosoma y es liberada antes de la fusión con los lisosomas. Mtb después de ser fagocitada impide la liberación de la proteína TACO, previniendo así la fusión con los lisosomas y permitiendo que la micobacteria sobreviva dentro de los macrófagos<sup>54, 55</sup>.

A su vez las micobacterias virulentas pueden inhibir la acidificación del fagosoma, a través de la exclusión de la enzima protón ATPasa, previniendo así la maduración y la actividad citotóxica que depende de la producción de óxido nítrico<sup>7, 8, 54, 55</sup>.

Las proteínas secretadas por Mtb H37Rv, están relacionadas con la virulencia de la micobacteria, un ejemplo de estas proteínas son las codificadas en la región RD1 (del

inglés, region of differentiation). La región RD1 tiene un tamaño de 9.5 Kpb y contiene alrededor de nueve genes que codifican gran parte del sistema de secreción tipo 7, dicho sistema no se presenta en la cepa atenuada BCG.

En particular ESAT-6, que es uno de los metabolitos secretados por el sistema de secreción tipo 7 el cual participa en la manipulación de la respuesta inmune. En macrófagos humanos ESAT-6, es reconocido por TLR2 e inhibe la producción de IL-12 mientras que en linfocitos T inhibe la producción de IFN- $\gamma$  <sup>56-58</sup>.

## H. JUSTIFICACIÓN

La tuberculosis es la enfermedad con más mortalidad en la historia de las patologías infecciosas, por tanto la investigación para conocer la patogénesis de la enfermedad es de suma importancia. Recientemente se ha descrito que Mtb induce un retraso en la respuesta de linfocitos T, aunque se han descrito algunos de los mecanismos involucrados, el efecto que tienen los componentes de la Micobacteria sobre las etapas tempranas de la respuesta de linfocitos T *in vivo* no ha sido estudiado.

## I. OBJETIVOS

### Objetivo general:

- Determinar el efecto de los antígenos micobacterianos sobre la activación de linfocitos T *in vivo*.

### Objetivos particulares:

- Medir la activación temprana *in vivo* de linfocitos T CD4+ y T CD8+ en presencia de antígenos Micobacterianos mediante la expresión de CD69 a las 2, 4, 6, 12 y 24 horas en pulmón y ganglios mediastinales.
- Evaluar la función citotóxica *in vivo* de los linfocitos T CD4+ y T CD8+ en presencia de antígenos Micobacterianos mediante la expresión de Granzima B intracelular a las 2, 4, 6, 12 y 24 horas en pulmón y ganglios mediastinales.
- Determinar el efecto de los antígenos Micobacterianos sobre la memoria inmunológica que presentan los linfocitos T CD4+ y T CD8+ en pulmón y ganglios mediastinales.

## J. HIPOTESIS

La activación *in vivo* de linfocitos T, en pulmón y ganglios mediastinales, inducida por la inoculación de Ag micobacterianos será más lenta que la inducida por Ag no micobacterianos.

## K. MATERIALES Y METODOS

### K. 1 Ratones y descripción de los grupos de estudio

Se utilizó un modelo murino, ratones machos de la cepa C57BL/6 la cual está caracterizada como una cepa productora de respuestas tipo Th1. Los ratones fueron inmunizados vía intranasal con los antígenos descritos en la tabla 2. Los grupos utilizados en este estudio fueron:

Tabla 2. Descripción de los grupos de estudio

Grupo	Administración (dosis)	Notas
1	PBS (40µL/ratón)	Se utilizó como control negativo en el experimento
2	Lipopolisacarido (LPS) (10µg/ratón)	Se utilizó como control positivo en el experimento.
3	Lisado de Mtb H37Rv (30µg/ratón). Una dosis	Respuesta primaria
4	Lisado de Mtb H37Rv (30µg/ratón). Dos dosis	Respuesta de memoria. Las dosis se administraron con una semana de diferencia.

Cada grupo estaba formado por 10 ratones y los tiempos de análisis fueron a las 2, 4, 6, 12 y 24 horas después de la inmunización.

### K. 2. Obtención del lisado de Mtb

Se cosechó (Mtb H37Rv) de la placa stock y se sembró en una caja de agar soya tripticaceína, se incubó de 24 a 48 horas a 37 °C y condiciones de CO<sub>2</sub> al 5%, posteriormente se tomó una asada de la placa de agar y se colocó en 5 mL de caldo de soya-tripticaceína en agitación y se incubó a 37°C durante 24 horas (Anexo IV).

Se colocaron los 5 mL de caldo con bacteria en un matraz con 50 mL de caldo de soya tripticaceína, dejando en agitación a 120 rpm durante 24 horas a 37 °C, posteriormente

se colocaron los 50 mL de caldo con Mtb H37Rv en 950 mL de caldo de soya tripticaceína, y se dejó en agitación (Anexo IV).

Se colectó la bacteria en tubos 1L y se centrifugó a 8000 rpm durante 30' en la centrifuga sin freno, una vez centrifugado se procedió a un lavado con PBS 1X estéril (Anexo IV).

Al final se obtuvo una sola pastilla de Mtb H37Rv en un volumen final de 15 a 20 mL de PBS 1X estéril, y se conservó en hielo a 4 °C. (Se procedió al armado de la prensa francesa) (Anexo IV).

Se colocó un inhibidor de proteasas (Complete mini, De Roche) en la solución que se vertió en la prensa y se llevo a cabo el prensado, en la tabla 3, se presenta las concentraciones de las mezclas para cada inhibidor de proteasas por cada 50 mL.

Una vez obtenido el lisado se colocó en hielo y se hicieron alícuotas de 1 mL, las cuales fueron centrifugadas a 1200 rpm durante 15' a 4 °C, el sobrenadante se recuperó y se alicuotó nuevamente a 1 mL, posteriormente se determinó la cantidad de proteína concentrada en las alícuotas mediante NanoDrop 2000 spectrophotometer a 280 nm (Anexo IV).

Las alícuotas utilizadas del lisado de Mtb para la presente investigación fueron adquiridas del laboratorio de la Dra. Iris Estrada. La obtención del lisado de Mtb se realizo bajo los estándares de bioseguridad nivel 3, ya que Mtb es considerado como un patógeno del grupo 3.

**Tabla 3. Inhibición de diferentes proteasas mediante las tabletas del inhibidor Complete Proteasa.**

Concentraciones dadas para cada tableta de Complete mini diluida en 50 ml de H<sub>2</sub>O. La actividad proteolítica se determinó con el sustrato universal de la proteasa. Cuando las extracciones de aislamientos solo son necesarias en el rango de pH ácido, basta con incluir pepstatin con Complete Tab- permite garantizar aspártico (ácido) la inhibición de la proteasa. Todos los experimentos se realizaron a temperatura ambiente.

Concentración de la proteasa	Tipo de proteasa	% de inhibición inmediatamente después de agregar Complete Tabletás	% de inhibición 60 min después de agregar Complete Tabletás
Quimiotripsina 1.5 µg/ml	Serina	97%	97%
Termolisina 0.8 µg/ml	Metalo	99%	100%
Papaína 1 µg/ml	Cisteína	95%	73%
Pronasa 1.5 µg/ml	Mezcla	88%	99%
Extracto pancreático 1.5 µg/ml	Mezcla	87%	99%
Tripsina 0.002 µg/ml	Serina	93%	73%

### K. 3. Inmunización

Se anestesia, por vía intraperitoneal, con 150 µL de pentobarbital sódico diluido 1:10 (1mg de pentobarbital/250gr/ratón).

Una vez que el ratón se encontró en estado de anestesia total, se le administraron por vía intranasal 30 µg de lisado de Mtb H37Rv en un volumen final de 40 µL. Se realizó el mismo procedimiento de anestesia e inmunización a los grupos control y LPS (10 µg/250gr/ratón).

En el caso del grupo que se le administraron dos dosis de lisado de Mtb la segunda inmunización fue una semana después de la primera inmunización en ambas ocasiones se inmunizó por vía intranasal.

#### **K. 4 Obtención de órganos y de la suspensión celular**

A las 2, 4, 6, 12 y 24 horas los ratones fueron sacrificados. Para la extracción de los pulmones fue necesario realizar la perfusión del pulmón y el lavado bronquio-alveolar (se utilizó una jeringa de 13 mm de calibre y se perfundió la vena cava, posteriormente se lavo con 1ml de PBS vía intratráqueal, y se recupero el PBS con la jeringa, con el fin de eliminar los leucocitos circulantes y macrófagos presentes en los espacios alveolares. Este proceso fue de mucha importancia ya que las poblaciones antes mencionadas podrían interferir en el análisis de la activación de linfocitos T<sup>59</sup>.

La extracción de los demás órganos se realizó sin ningún procedimiento extra.

Después de extraídos los ganglios mediastinales, ganglios inguinales, bazo y pulmones, se colocaron en una placa de 6 pozos con (FBS-PBS 2%) y se disgregaron las células de los órganos como se describe a continuación:

**Ganglios mediastinales e inguinales:** Se colocaron los ganglios sobre el esmeril de un portaobjetos, y con el esmeril de otro portaobjetos se disgregaron los ganglios por fricción. La suspensión celular se recuperó pipeteando FBS-PBS 2% sobre ambos portaobjetos y recibiendo la suspensión en una caja de 6 pozos. Posteriormente se filtró la suspensión y se llevó a 10 mL de FBS-PBS 2% en un tubo falcon de 15 mL.

**Bazo:** Con una organza se envolvieron los bazos y con ayuda de un émbolo se disgregó el órgano, la suspensión celular se colectó con ayuda de una micropipeta y se colocó en un tubo de 10 mL. Después se lisaron los eritrocitos agregando 1 mL de buffer de lisis (Anexo I) durante un minuto. El buffer de lisis se eliminó agregando 5 mL de FBS-PBS 2% y centrifugando a 2200 rpm por 5 minutos, evitando así la lisis de los leucocitos. El botón de células obtenido se resuspendió en 10 mL de FBS-PBS 2%.

**Pulmón:** Sobre un tubo de 15 mL, se cortó el pulmón con ayuda de unas tijeras de disección de tal manera que se obtengan pedazos finos de pulmón. Luego se hizo pasar el tejido a través de una jeringa de calibre 23 para obtener la suspensión celular. Finalmente se filtró la suspensión celular a través de una organza y se llevó a 10 mL de FBS-PBS 2%.

### **K. 5. Tinción de marcadores de activación y citometría de flujo**

La suspensión celular de los órganos se centrifugó a 2200 rpm por 5 minutos y el botón celular se resuspendió en solución de bloqueo (Anexo II) para evitar la unión inespecífica de los anticuerpos fluorocromados a los receptores de Fc.

La solución de bloqueo se lavó centrifugando a 2200 rpm durante 3 minutos. A partir de ese momento todos los lavados se realizaron de la misma manera.

Para determinar la activación de Linfocitos T se realizó la tinción extracelular de marcadores poblacionales y de activación (CD3, CD4, CD69) (Anexo III). Para esto se incubaron las muestras con las diluciones de los anticuerpos fluorocromados (Anexo II) y se incubaron por 15' a 4°C. Posteriormente se lavó el exceso de anticuerpo y los botones celulares se resuspendieron en 200  $\mu$ L de solución amortiguadora para FACS.

Para la determinación de la expresión de Granzima B intracelular se realizó primero la tinción extracelular con los anticuerpos anti-CD3 y anti-CD4, después se llevó a cabo la tinción intracelular, permeabilizando con 100  $\mu$ L de Cytifix/Cytoperm, (Anexo III) durante 12' a 4 °C. Después de la permeabilización las células se lavaron con Permash y finalmente, (Anexo III) se resuspendieron las células en 50  $\mu$ L de anticuerpo anti-Granzima B (1:400) y se incubó por 15' a temperatura ambiente. Se lavó el exceso de anti-Granzima B y las células se resuspendieron en 200  $\mu$ L de solución amortiguadora para FACS.

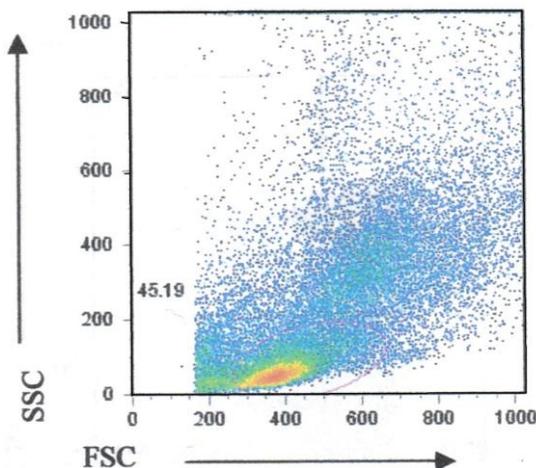
Las muestras se leyeron en el equipo FACS-Calibur de BD y fueron analizadas con el programa FlowJo.

## L. RESULTADOS

En esta investigación analizamos el efecto de los antígenos micobacterianos sobre la activación temprana (2-24 horas) de linfocitos T *in vivo*. Para esto se inmunizaron ratones machos C57BL/6 con un lisado de Mtb H37Rv vía intranasal y se midió la cinética de expresión de CD69 como indicador de activación temprana y de Granzima B intracelular, como marcador de citotoxicidad. La activación de linfocitos T se midió localmente, en pulmón y ganglios mediastinales, sistémicamente, en bazo, y distalmente, en ganglios popliteos.

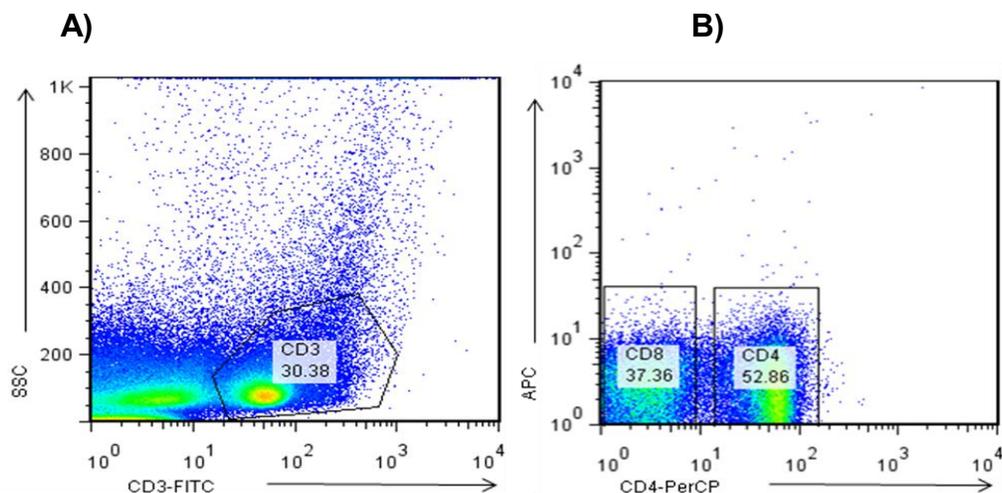
También se midió el efecto de los antígenos micobacterianos sobre la respuesta inmune de memoria, analizando la respuesta de linfocitos T, en ratones que fueron inmunizados dos veces con el lisado de micobacteria. Además comparamos estas respuestas de linfocitos T, con la respuesta inducida por el LPS de *Salmonella typhi*, y con los linfocitos T de ratones a los que sólo se les administró PBS.

A partir de las muestras leídas en el citómetro de flujo para observar el estado de activación de LcT a través del marcador CD69, se utilizó un diagrama de puntos o de densidad para seleccionar la región de linfocitos (Fig.9)



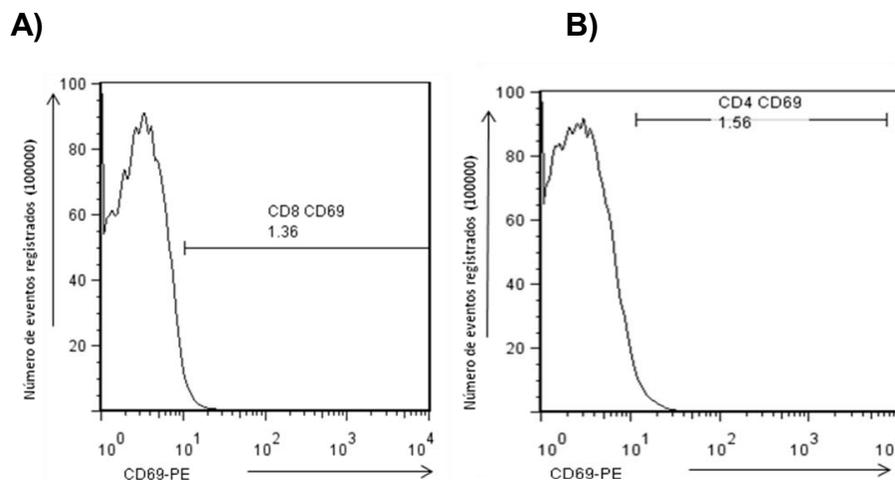
**Fig. 9.** Imágenes representativas de la selección de linfocitos en suspensiones celulares de pulmón, analizados por citometría de flujo. Diagrama de puntos a) y densidad b), de ratones inoculados con PBS-BSA, donde se observa el tamaño (FSC) vs la complejidad interna de granularidad (SSC), así como la población de linfocitos T seleccionada (circulo rojo).

Posteriormente de la región seleccionada de linfocitos, fue comparada la complejidad interna (SSC), contra CD3-FITC (Fig. 10, A). De la región seleccionada del diagrama (hexágono negro), seleccionada fue comparada la población de linfocitos CD4+ y CD8+, contra CD4-PerCP (Fig. 10,B).



**Fig. 10. Imágenes representativas de la selección de linfocitos en suspensiones celulares de pulmón, analizadas por citometría de flujo. A)** Diagrama de densidad que muestra la relación que existe de la complejidad celular (SSC) vs el marcador CD3-FITC **B)** Diagrama de densidad donde se muestra la relación de linfocitos CD8+ y CD4+, vs CD4-PerCP

Las regiones seleccionadas de linfocitos CD4+ y CD8+ fueron diseñadas en formas de histogramas para su posterior análisis (Fig. 11)



**Fig. 11. Histogramas representativos de la activación de linfocitos A)T CD4 + y B) CD8+ por CD69.**

### **L. 1 Los antígenos de Mtb inducen un retraso en la expresión del marcador de activación CD69 en linfocitos T CD4+ de pulmón y ganglios poplíteos.**

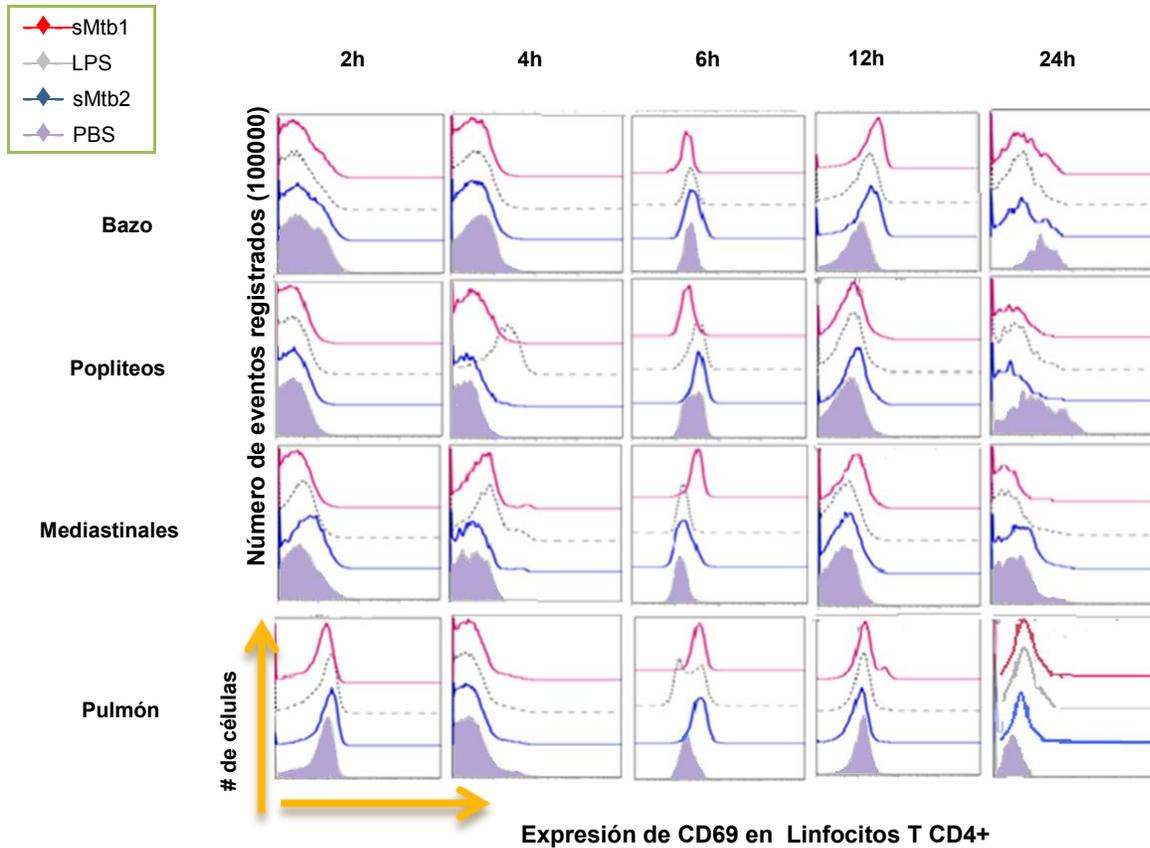
En el análisis de activación celular (CD69) encontramos que en el pulmón los linfocitos T CD4+ de ratones inmunizados con dos dosis de lisado de micobacteria (respuesta de memoria) o LPS presentaron una cinética similar con respecto al grupo control (PBS), en las que se observó diferencias en la expresión de CD69 de ambos grupos a las 6 horas después de la inmunización con respecto al grupo PBS.

En el caso del grupo que fue inmunizado una vez con lisado de micobacteria pudimos observar que 2 horas después de la inmunización, la expresión de CD69 se encontró por debajo de los niveles basales con respecto al grupo inmunizado con LPS. Sin embargo, 6 horas después de la inoculación se observó un incremento en la expresión de CD69. Doce horas después de la inmunización el único grupo que mantuvo la expresión de CD69 fue el estimulado con una dosis de lisado de Mtb. Los grupos inoculados con dos dosis de antígeno micobacteriano y LPS no mostraron cambios en comparación con el grupo de PBS (Fig. 12).

En ganglios mediastinales, sólo el grupo que se inoculó con dos dosis de lisado de micobacteria expresaron CD69 en linfocitos T CD4+ 2 horas después de la inoculación. Cuatro horas después de la inmunización, los linfocitos T CD4+ de los ratones que fueron inoculados con LPS mostraron un pico de expresión de CD69 más amplio en comparación al grupo inmunizado con una dosis de lisado de micobacteria. Es hasta las 6 horas después de la inmunización que los linfocitos T CD4+ de ratones que recibieron una dosis del lisado de micobacteria expresaron CD69. Mientras que el grupo inoculado con LPS redujo la expresión en comparación con el grupo control de PBS a las 6 horas después de la inmunización. Doce horas después de la inmunización el único grupo que mantuvo su expresión de CD69 es el que recibió una dosis de lisado de micobacteria. Los grupos inoculados con LPS y dos dosis de lisado de micobacteria no presentaron diferencias en comparación con el grupo de PBS. Veinticuatro horas después de la inmunización se incrementó la expresión de CD69 en el grupo que fue inoculado con dos dosis del lisado de micobacteria (Fig. 12).

En ganglios popliteos la expresión de CD69 se observó a las 4 horas en donde los linfocitos T CD4+ expresaron CD69 únicamente en el grupo que fue estimulado con LPS presentando una reducción 6 horas después de la inmunización, con respecto al grupo control. En el caso del grupo que fue inmunizado una vez con lisado de micobacteria pudimos observar que 6 horas después de la inmunización, la expresión de CD69 se encontró por debajo de los niveles basales con respecto a los grupos control. Doce horas post inmunización la expresión de CD69 regresó a un nivel basal junto con los grupos de LPS y lisado de Mtb2. Veinticuatro horas todos los grupos que fueron inmunizados presentaron expresión de CD69 por debajo de los niveles basales con respecto al grupo control. (Fig. 12)

En el bazo no se observó incremento en la expresión de CD69 en linfocitos T CD4+ en ninguno de los grupos en el lapso de 2 a 6 horas. A las 12 horas posterior a la inmunización, el grupo inoculado con una dosis de lisado de Mtb, presentó un ligero incremento en la expresión de CD69. A las 24 horas después de la inmunización los grupos que se les administró LPS o antígenos micobacterianos presentaron una reducción de la expresión de CD69 en comparación con el grupo de PBS (Fig. 12).



**Fig. 12. Cinética de expresión de CD69 en los Linfocitos T CD4+ de bazo, pulmón y ganglios linfáticos, popliteos y mediastinales. La expresión de CD69 fue analizada a las 2, 4, 6, 12 y 24 hrs. En ratones inmunizados con lisado de Mtb H37Rv, LPS, y PBS.**

**L. 2. Los antígenos de Mtb inducen un retraso en la expresión del marcador de Granzima B en linfocitos T CD4+ de bazo.**

En el análisis de la cinética de pulmón, encontramos que tanto los antígenos micobacterianos como el LPS, no indujeron expresión de Granzima B en las primeras horas post inoculación. Sólo el grupo que fue inoculado una vez con lisado de micobacteria incrementó la expresión a las 12 horas, posteriormente regresó a su estado basal (Fig. 13).

En ganglios mediastinales sólo el grupo inmunizado con dos dosis de antígenos micobacteriano presentó un leve incremento en la expresión de Granzima B a las 2 y 12 horas después de la inoculación (Fig. 13).

En ganglios popliteos el grupo tratado con una dosis de antígeno micobacteriano presentó un incremento en la expresión de Granzima B a las 4 horas, posteriormente disminuyó hasta llegar a un estado basal. En el caso del grupo inoculado con dos dosis de antígenos micobacterianos presentó un leve incremento en la expresión de Granzima B observado 2 y 4 horas, posteriormente la expresión se redujo por debajo de los niveles basales.

La cinética del grupo inoculado con LPS presenta un incremento en Granzima B a las 4 horas y después cae por debajo de los niveles basales (Fig. 13).

En el bazo observamos que tanto el grupo inmunizado una vez con lisado de Mtb y LPS no tuvieron incremento en la expresión de Granzima B con respecto al grupo PBS. Sin embargo, el grupo que se inmunizó con dos dosis de lisado de Mtb (respuesta de memoria) tuvo una expresión de Granzima B a las 6 horas después de la inmunización, aunque a las 12 y 24 horas que la expresión de Granzima B disminuye por debajo de los niveles basales, con respecto a los grupos PBS, LPS y lisado de Mtb una vez (Fig. 13).

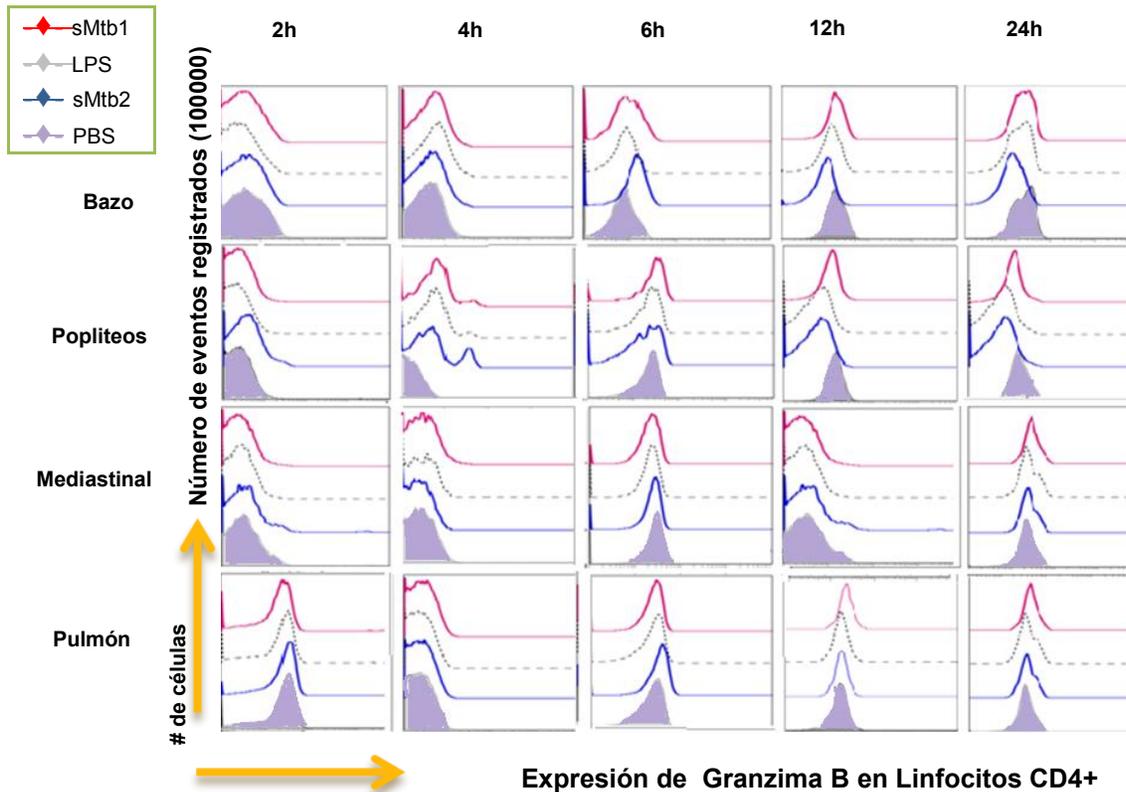


Fig. 13. . Cinética de expresión de Granzima B en los Linfocitos T CD4+ de bazo, pulmón y ganglios linfáticos, popliteos y mediastinales. La expresión de Granzima B fue analizada a las 2, 4, 6, 12 y 24 hrs. en ratones inmunizados con lisado de Mtb H37Rv, LPS, y PBS

**L. 3. Una dosis de los antígenos de Mtb no tiene efecto en la expresión del marcador de activación CD69 en linfocitos T CD8+ de bazo, pulmón y ganglios linfáticos.**

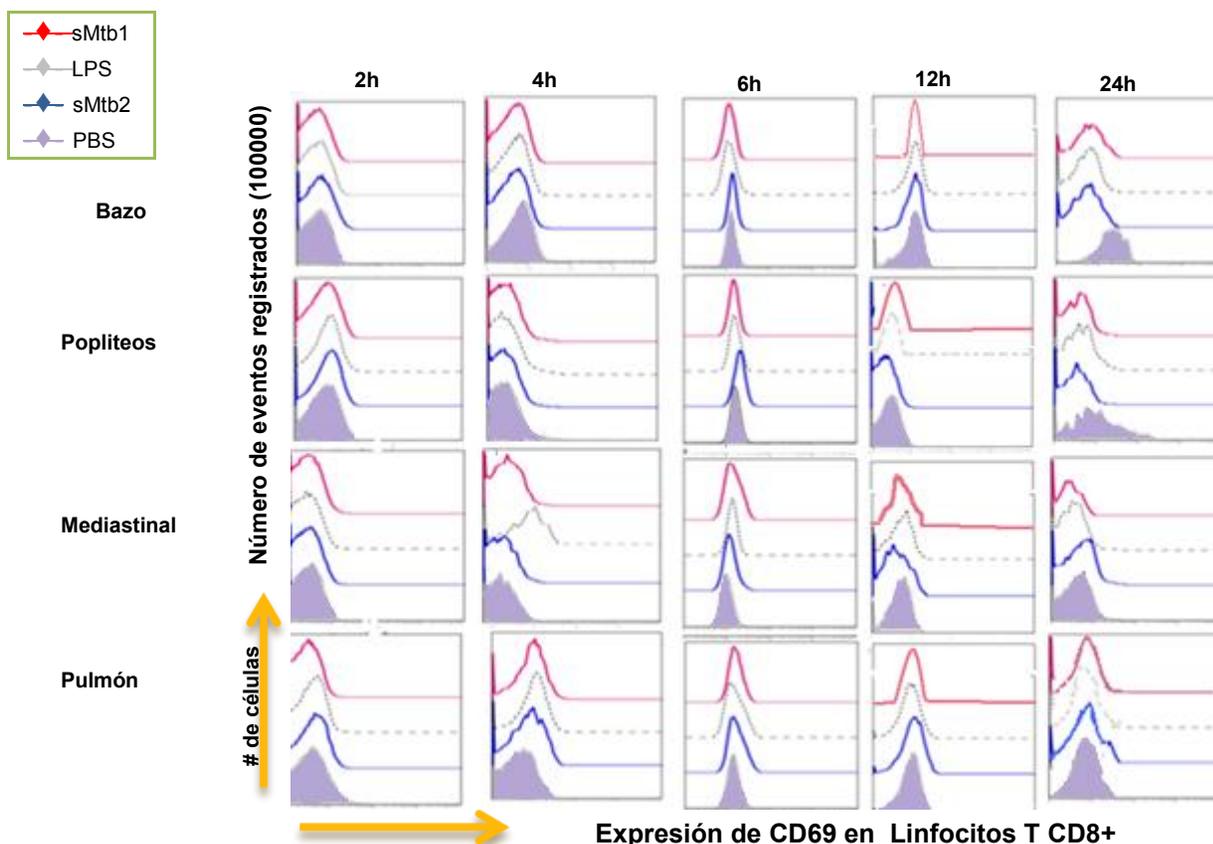
En el análisis realizado de la expresión del marcador de activación temprana CD69, encontramos que para linfocitos T CD8+ del pulmón, se observó la cinética, donde sólo se observó un pico de expresión a las 4 horas después de la inmunización en los grupos que fueron inoculados con antígenos micobacterianos o LPS (Fig. 14).

En ganglios mediastinales el grupo que fue inoculado con una dosis del lisado de micobacteria no presentó expresión del marcador CD69. Sin embargo el grupo inmunizado con dos dosis de antígenos micobacterianos presentó un leve incremento

en la expresión del marcador CD69 a las 24 horas después de la inmunización. En el caso del grupo que se le administró LPS mostró una expresión a las 4 horas y posteriormente regresó a su estado basal (Fig. 14).

En ganglios poplíteos sólo el grupo tratado con dos dosis de lisado de micobacteria presentó una leve expresión del marcador de activación temprana CD69 a las 6 horas posteriores a la inmunización. Veinticuatro horas después de inmunizados todos los grupos inmunizados disminuyeron sus niveles por debajo del grupo PBS (Fig. 14).

En bazo, sólo se observó que los grupos que fueron inmunizados con lisado de micobacteria o LPS, tuvieron una reducción en la expresión de CD69 a las 24 horas (Fig. 14).



**Fig. 14.** Cinética de expresión de CD69 en los Linfocitos T CD8+ de bazo, pulmón y ganglios linfáticos, poplíteos y mediastinales. La expresión de CD69 fue analizada a las 2, 4, 6, 12 y 24 hrs. En ratones inmunizados con lisado de Mtb H37Rv, LPS, y PBS

#### **L. 4 Los antígenos de Mtb inducen la expresión de Granzima B de linfocitos T CD8+ de bazo y ganglios linfáticos.**

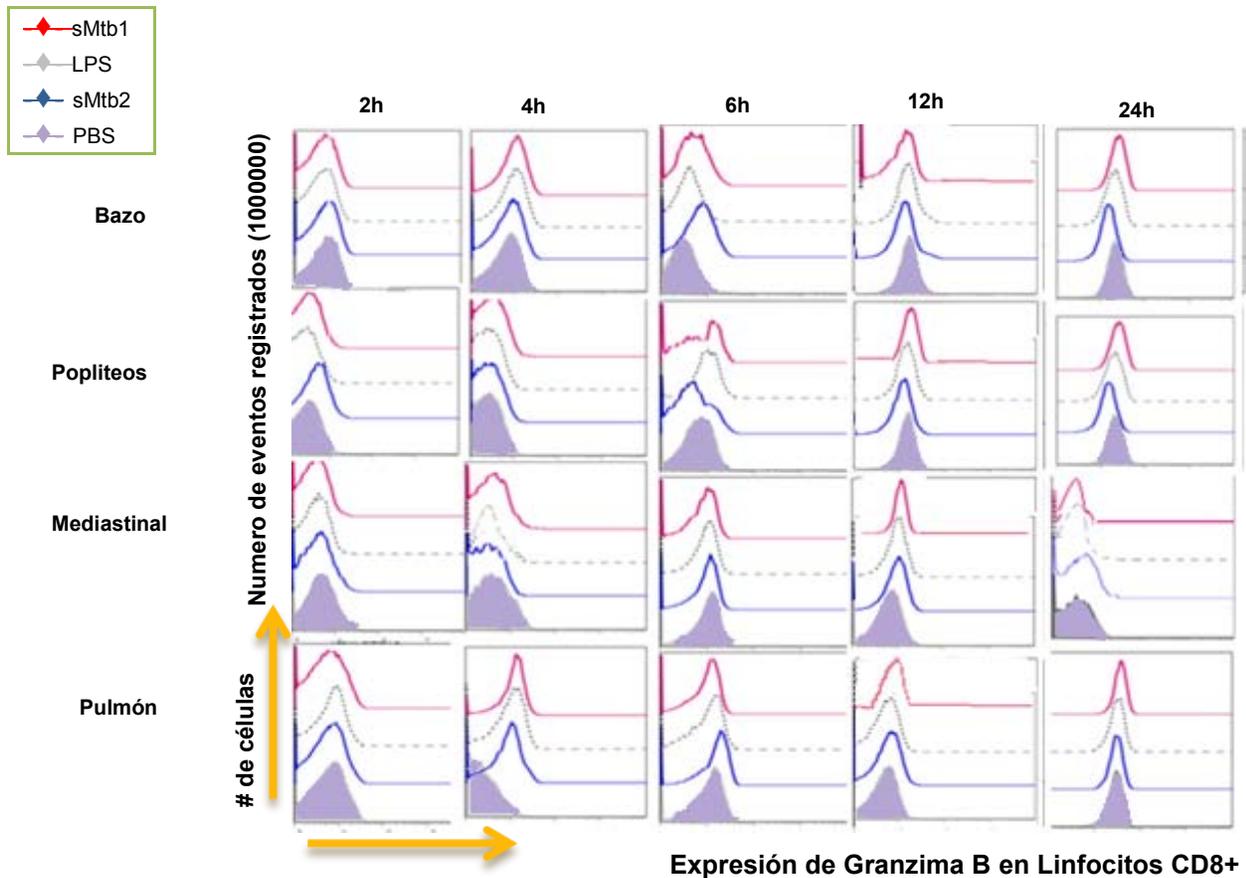
En el pulmón, el análisis de la cinética de expresión de Granzima B observamos que el grupo inoculado con una dosis de lisado de micobacteria presentó un aumento en la expresión de Granzima B a las 4 horas, posteriormente disminuyó hasta llegar a los niveles basales. El grupo tratado con dos dosis de lisado de micobacteria tuvo un incremento en la expresión de Granzima B a las 4 y 6 horas. El grupo inmunizado con LPS sólo tuvo un incremento en la expresión de Granzima B a las 4 horas reduciéndose posteriormente hasta sus niveles basales (Fig. 15).

En ganglios mediastinales el grupo inoculado con una dosis de lisado de micobacteria no presentó expresión de Granzima B. En el caso del grupo inmunizado con LPS solo presentó un aumento en la expresión de Granzima B a las 12 horas post infección. En el grupo que fue inmunizado con dos dosis de lisado de Mtb (respuesta de memoria), se observó un incremento en la expresión de Granzima B a las 12 y 24 horas después de la inmunización (Fig.15).

En ganglios popliteos el grupo inmunizado con una dosis de lisado de micobacteria tuvo un incremento en la expresión de Granzima B a las 6 horas después de la inmunización, posteriormente los niveles se redujeron a un estado basal. En el caso del grupo que se inmunizó con dos dosis de antígenos de Mtb presentó una leve expresión de Granzima B a las 2 horas, posteriormente se redujo hasta llegar a un nivel basal, siendo hasta las 24 horas después de la inmunización que la expresión se redujo por debajo de los niveles basales con respecto a los grupos LPS, lisado de Mtb y PBS. En el caso del grupo inoculado con LPS no se observó incremento en la expresión de Granzima B. (Fig. 15).

En bazo, la cinética de expresión de Granzima B mostró que el grupo que fue inoculado con una dosis de lisado de micobacteria tuvo dos incrementos en la expresión de Granzima B, una a las 6 y otra a las 24 horas después de la inoculación. En el grupo que fue inoculado con dos dosis de lisado de micobacteria, se observó un incremento

en la expresión de Granzima B a las 6 horas, posteriormente la expresión se redujo hasta un nivel basal, con respecto al grupo inmunizado con PBS. En el caso del grupo inoculado con LPS no tuvo cambios en la expresión de Granzima B. (Fig. 15)



**Fig. 15** Cinética de expresión de Granzima B en los Linfocitos T CD8+ de bazo, pulmón y ganglios linfáticos, popliteos y mediastinales. La expresión de Granzima B fue analizada a las 2, 4, 6, 12 y 24 hrs. en ratones inmunizados con lisado de Mtb H37Rv, LPS, y PBS

## M. DISCUSIÓN

Durante la respuesta inmunológica contra Mtb participan una gran cantidad de poblaciones celulares. Aunque los linfocitos T CD4+ son fundamentales contra la TB, estudios en humanos y animales sugieren la colaboración de otras poblaciones celulares como los linfocitos T CD8+ y  $\gamma\delta$ + para el control y eliminación de la enfermedad<sup>60,61</sup>.

El éxito en la eliminación del bacilo depende de la correcta integración entre ambos tipos de respuesta inmune (innata y adquirida). Sin embargo el desarrollo de la TB pulmonar o extrapulmonar, puede ser influido por la virulencia del bacilo y el estado previo del individuo. Tanto los factores de virulencia como los componentes capsulares de Mtb comprometen la eficacia de la respuesta inmunológica alterando el equilibrio entre la inmunidad inespecífica y la específica, conduciendo en algunos casos a un retraso en la activación de linfocitos T.

Se sabe que la respuesta generada por los linfocitos T  $\gamma\delta$  contra Mtb se genera en los primeros días de contacto con el bacilo, mientras que la respuesta generada por los linfocitos T CD4+ y CD8+ se reportan hasta la primera semana después del contacto con la micobacteria<sup>62,63</sup>. En el 2000 Henry Boom y colaboradores demostraron que en ratones C57BL/6 infectados con *Mycobacterium bovis* generan una respuesta de linfocitos T CD4+, CD8+ y  $\gamma\delta$ + en el parénquima pulmonar con un máximo en el número de células alrededor de la cuarta semana post infección<sup>64</sup>. Aunque se han descrito algunos de los mecanismos y el efecto de los componentes de Mtb involucrados en el retraso de la respuesta de linfocitos T no se ha estudiado el efecto sobre las etapas tempranas de la respuesta de linfocitos T *in vivo*.

En esta investigación encontramos que la activación celular (CD69) a nivel local (pulmón), el grupo de células de linfocitos T CD4+ de ratones que fueron inmunizados con LPS, muestran la activación de linfocitos T CD4+-CD69 a las 6 horas después de la inoculación, aunque la expresión de CD69 en ganglios mediastinales se observó a las 2 y 4 horas después de la inmunización, la activación a nivel distal (ganglios popliteos) se observó a las 4 horas posteriormente se redujo hasta llegar por debajo de los niveles

basales. Sin embargo a nivel sistémico (bazo) la activación de linfocitos T CD4<sup>+</sup>-CD69 se observó hasta las 12 horas después de la inmunización.

En el caso de los linfocitos T CD4<sup>+</sup>-CD69 que fueron extraídos de ratones inmunizados con dos dosis de lisado de micobacteria (respuesta de memoria) se observó una cinética de activación similar al grupo inoculado con LPS, ya que a nivel local (pulmón) se muestra una activación de linfocitos T CD4<sup>+</sup>-CD69 a las 6 horas después de la inmunización, aunque la activación de linfocitos T CD4<sup>+</sup>-CD69 en ganglios mediastinales se observó a las 2 horas post inmunización, la migración de las células presentadoras de antígeno a nivel distal (ganglios popliteos) requiere de mayor tiempo ya que no se observó expresión de CD69. Sin embargo la activación de LT CD4<sup>+</sup> a nivel sistémico se observó a las 12 horas después de la inmunización.

Estos resultados sugieren que la activación de LT por LPS o dos dosis de sMtb ocurre de manera temprana (2-6 horas) a nivel local (ganglios mediastinales). Es posible que la cinética observada se deba a que los antígenos inoculados podrían estar induciendo la migración de células dendríticas mediante el reconocimiento de PAMPs, y estas células dendríticas podrían estar presentando antígenos asociados a los linfocitos T presentes en los órganos linfoides induciendo la activación.

En el caso de la respuesta primaria (una dosis de lisado de micobacteria) contra Mtb H37Rv a nivel local (pulmón) se observa que a las 2 horas después de la inmunización la expresión de CD69 se encuentra por debajo de los niveles basales con respecto al grupo control, por lo que podemos inferir que a las 2 horas después de la inmunización existe un retraso en la activación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> de pulmón. Este comportamiento sugiere varias posibilidades: a) que el LAM presente en la pared celular de Mtb posiblemente no permitan la activación (expresión de moléculas de coestimulación) de macrófagos y células dendríticas impidiendo la presentación de antígeno micobacteriano a células T, b) que Mtb inhiba la fusión del fagosoma con el lisosoma mediante la retención de la proteína TACO evitando la presentación de antígenos a Linfocitos T.

De igual forma la presentación de antígenos micobacterianos para generar una respuesta primaria contra Mtb H37Rv a nivel distal (ganglios popliteos) podría estar siendo afectada ya que a las 6 horas después de la inmunización, la expresión de CD69

disminuye por debajo de los niveles basales en comparación al grupo control, generando así un retraso en la activación de linfocitos T CD4+ de ganglios popliteos.

La contribución de linfocitos T CD8+ en el control de la TB es muy importante, ya que son capaces de secretar citocinas como IL-2, necesaria para la expansión clonal y diferenciación de células T<sup>65-68</sup>, y llevan a cabo una importante actividad citotóxica contra la infección de Mtb<sup>69,70</sup>.

En los resultados obtenidos no observamos diferencias en la activación de linfocitos T CD8+ (expresión de CD69) inducida por los diferentes antígenos utilizados. La respuesta generada por antígenos no micobacterianos (LPS) a nivel local se observa a las 4 horas en el caso del pulmón y de las 4 a las 6 horas después de la inmunización en ganglios mediastinales, mientras que a nivel distal (ganglios popliteos) y sistémico no se observó activación de linfocitos T CD8+. En el grupo que se inmunizó con antígenos micobacterianos (respuesta de memoria y respuesta primaria) se observó activación de linfocitos T CD8+ a nivel local a las 4 horas después de la inmunización. Sin embargo a nivel distal (ganglios popliteos) y a nivel sistémico (bazo) el incremento en la expresión de CD69 es mínimo.

Estos resultados sugieren varias posibilidades: a) que para que se genere la activación de linfocitos T CD8+ por antígenos micobacterianos, se necesitan de antígenos más inmunogénicos y que presenten epítomos específicos, dichos antígenos no estaría presentes en el lisado de micobacteria utilizado. b) La concentración de moléculas de coestimulación presenten en APC (como las células dendríticas) no es suficiente para activar a las células T CD8+ *naïve* (las cuales requieren de una mayor cantidad de moléculas de coestimulación que las células T CD4+ para activarse<sup>71-74</sup>). c) La activación de células T CD8+ dependen de la presencia de células T CD4+, ya que estas compensan una estimulación inadecuada de las células T CD8+ *naïve* por parte de las células presentadoras de antígeno profesionales. La célula T CD4+ activada puede activar a células presentadoras de antígeno para que expresen más señales coestimuladoras.

La acción citotóxica de células T, es dada principalmente por la expresión de gránulos enzimáticos de células T CD8+ llevando a la muerte de las bacterias que infectan

macrófagos. Uno de los componentes de los gránulos citotóxicos que inducen la muerte celular es la Granzima B <sup>75,76</sup>.

En este trabajo determinamos la expresión de Granzima B para determinar la posible funcionalidad de los linfocitos T en etapas tempranas de la activación. En la respuesta generada a nivel local (pulmón y ganglios mediastinales) por antígenos no micobacterianos (LPS), se observa activación de linfocitos T CD4+-Granzima B hasta las 24 horas después de la inmunización. En ganglios popliteos se observó la expresión de Granzima B en linfocitos T CD4+ a las 4 horas después de la inmunización. Sin embargo a nivel sistémico (bazo) no observamos la expresión de granzima B.

En el grupo inmunizado con dos dosis de lisado de Mtb (respuesta de memoria) se observó que la respuesta generada a nivel local (pulmón y ganglios mediastinales) se observa una leve activación de linfocitos T CD4+-Granzima B a las 6 y 24 horas después de la inmunización. A nivel distal (ganglios popliteos) los antígenos de Mtb indujeron una activación de linfocitos T CD4+ a las 2 y 4 horas y a nivel sistémico a las 6 horas post inmunización. En el caso de la respuesta primaria (una dosis de lisado de Mtb) a nivel local (pulmón) se observó activación de linfocitos T CD4+ hasta las 12 horas. Esto podría interpretarse como un posible retraso en la activación de los linfocitos T CD4+ ya que la expresión de Granzima B en LT CD4+ inducida por el LPS se observó hasta las 24 horas después de la inmunización. Es posible que el LPS no sea un antígeno que induzca la expresión de Granzima B en LT por lo que sería interesante comparar la respuesta primaria inducida por sMtb con otro antígeno asociado con la expresión de Granzima B (antígenos virales).

En el caso de la expresión de Granzima B intracelular, la respuesta generada por LPS a nivel local (pulmón) se observó a las 4 y a las 24 horas después de la inmunización. Sin embargo, a nivel distal (ganglios popliteos) se observa una leve expresión de Granzima B en linfocitos T CD8+ a las 6 horas post inmunización. Aunque a nivel sistémico no se observó activación de linfocitos T CD8+. En comparación con lo observado en el grupo inmunizado con LPS, el grupo que recibió una dosis de sMtb no presentó diferencias. Sin embargo el grupo que recibió dos dosis de sMtb presenta una leve activación en el pulmón hasta las 6 horas después de la inmunización. En el caso del bazo se observa una leve activación de linfocitos T CD8+ a las 6 horas, pero la memoria inmunológica a las 24 horas después de la inmunización se observa ligeramente por debajo de la

respuesta primaria generada por una dosis del lisado de Mtb H37Rv por lo que podría interpretarse que a las 24 horas después de la inmunización existe un retraso en la activación de linfocitos T CD8+-Granzima B.

Este comportamiento lo podemos atribuir al hecho de que la activación de linfocitos T CD8+ dependen de la presencia de linfocitos T CD4+ ya que estas pueden estimular la activación de células presentadoras de antígeno profesional que tengan una alta producción de moléculas de coestimulación, la capacidad de secretar IL-2 que son necesarias para la diferenciación y expansión clonal de los linfocitos T CD8+<sup>71-74</sup>.

## N. CONCLUSIONES

- La administración intranasal de antígenos de Mtb H37Rv induce un retraso en la activación de linfocitos T CD4+ en el pulmón a las 2 horas y en ganglios poplíteos a las 6 horas después de la inmunización.
- Una dosis de lisado de Mtb H37Rv induce la expresión de Granzima B en linfocitos T CD8+ en bazo a las 24 horas después de la inmunización.
- Una dosis de lisado de Mtb H37Rv inducen la expresión de Granzima B en linfocitos T CD4+ en ganglios poplíteos a las 2 horas y en bazo a las 6 horas después de la inmunización.
- La expresión de Granzima B en LT CD8+, se observó en ganglios poplíteos a las 6 horas después de la inmunización con una dosis de lisado de Mtb H37Rv.
- Dos dosis de lisado de Mtb inducen expresión de Granzima B en LT CD8+, a las 6 horas después de la inmunización en bazo.
- La activación *in vivo* de linfocitos T CD4+ en pulmón, inducida por la inoculación de los Ag de *Mycobacterium tuberculosis*, es más lenta que la inducida por Ag no micobacterianos.

## **O. ANEXOS**

### **O. 1 Anexo I. Preparación de soluciones y reactivos**

#### **a) Solución Salina Fisiológica (SSF)**

- 0.9g de NaCl
- Disolver y llevar a 100 mL con H<sub>2</sub>O destilada

#### **b) Solución Amortiguadora de Fosfatos (PBS) 1X**

- NaCl.....8.0g
- KCl.....0.2g
- NaHPO<sub>4</sub>.....1.15g
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.....0.25g

Aforar a 900mL, ajustar el pH a 7.4 y aforar a 1000mL

#### **c) Solución Amortiguadora de FACS**

- Albúmina Sérica Bovina (BSA).....0.1 %
- Azida de Sodio.....0.01 %
- PBS 1X..... cbp 100 mL

#### **d) Solución de lisis**

- NH<sub>4</sub>Cl.....0.8g
- NaHCO<sub>3</sub> (Stock 0.1 M).....1 mL
- Na EDTA (Stock 0.1 M).....100 μL

Aforar con 100 mL de PBS 1X

#### **e) Solución anestésica (Anestosal) Pentobarbital sódico**

- 10μL de pentobarbital sódico
- 90μL de SSF

## O. 2 ANEXO II. Anticuerpos y otros reactivos

### a) Anticuerpos

- $\alpha$ -CD69-PE: BD Pharmigen cat. 553237 1:200
- $\alpha$ -CD3-FITC: BD Pharmigen cat. 553062 1:400
- $\alpha$ -CD4-PerCP: BD Pharmigen cat. 553052 1:400
- $\alpha$ -raton,humano,rata Granzima B SC-1969 1:400
- $\alpha$ -Chivo-PE: BD Thermo Scientific cat. 31860 1:400
- Cytofix / Cytoperm: BD Pharmigen cat. 554722 lot. 74776
- Solución de bloqueo: Biogenex cat. HK085-5K

### b) Otros reactivos

- Lipopolisacarido (LPS) *Salmonella enterica* Sigma cat. 6261
- Anestesal (pentobarbital sódico) *Pfizer* 0136-3-110
- Complete mini, EDTA-free (tabletas) cat. 11836170001

## O. 3 ANEXO III. Tinción extracelular e intracelular

### Tinción Extracelular

- Colocar 200 $\mu$ L de las células en una placa de 96 pozos en V (5x10<sup>6</sup> células/por pozo, usar 3x10<sup>6</sup> células/por pozo).
- Centrifugar la placa durante 3' a 2000 rpm. (892g)
- Decantar el sobrenadante
- Lavar las células con 200 $\mu$ L de solución amortiguadora para FACS (2% FBS en PBS)
- Centrifugar la placa y decantar
- Resuspender las células en 100 $\mu$ L de solución bloqueadora (CD16/32, dilución 1:100 en solución amortiguadora para FACS),
- Incubar por 12' – 15' a 4°
- Centrifugar la placa y decantar
- Lavar una vez con solución amortiguadora para FACS.
- Resuspender las células con 50 $\mu$ L de  $\alpha$ -CD3-FITC,  $\alpha$ -CD69-PE,  $\alpha$ -CD4-PerCP
- Incubar durante 20' a 4°
- Centrifugar la placa y decantar

- Lavar 2 veces con 200 $\mu$ L de solución amortiguadora para FACS.
- Centrifugar la placa y decantar
- Agregar 200 $\mu$ L de solución amortiguadora para FACS y transferir a tubos para citómetro.

### **Tinción intracelular**

- Después de los 2 lavados con solución amortiguadora para FACS, lavar con 150 $\mu$ L de (FBS-PBS al 2%).
- Centrifugar la placa y decantar
- Adicionar 100 $\mu$ L de Cytofix/Cytoperm, resuspender. Este paso es tóxico para las células
- Incubar las células durante 12' a 4°
- Centrifugar la placa y decantar
- Lavar las células con Permwash (dilution 1:10 in H<sub>2</sub>O)
- Centrifugar la placa y decantar
- Resuspender las células en 50 $\mu$ L del anticuerpo intracelular (dilución del anticuerpo se uso permwash)
- Incubar por 15' a temperatura ambiente
- Lavar con Permwash
- Centrifugar la placa y decantar
- Resuspender en 200 $\mu$ L de solución amortiguadora para FACS y transferir a los tubos de FACS.

### **O. 4 ANEXO III. Obtención del lisado de Mtb**

1. Cosechar bacteria (*Mycobacterium tuberculosis* H37Rv); de la placa con la estirpe bacteriana o semilla y sembrarla en una caja de agar soya tripticaceína, dejar crecer de 24-48 horas a 37°C y condiciones de CO<sub>2</sub> al 5% .
2. Tomar una asada de la placa de agar y colocarla en 5 mL de caldo soya tripticaceína en agitación a 120 rpm, 24 horas a 37°C.
3. Colocar los 5 mL de caldo con bacteria en un matraz con 50 mL de caldo soya tripticaceína, se deja en agitación 120 rpm, 48 horas a 37°C.

4. Se colocan los 50 mL de caldo con bacteria en 950 mL de caldo soya tripticaceína nuevamente y se deja en agitación a 120 rpm, 48 horas a 37°C.
5. Se colectan en diferentes tubos el litro de caldo soya tripticaceína con bacteria resultante en varios tubos y centrifugar 5-8000 rpm (dependiendo del volumen) por 30 minutos en la centrífuga sin freno.
6. Al término de la centrifugación acumular las pastillas obtenidas en los diferentes tubos y realizar varios lavados con PBS 1X estéril o solución salina estéril para eliminar el resto de caldo soya tripticaceína (los residuos entre lavados se desechan en un matraz con lysol al 3%).
7. Al final se obtiene como resultado una sola pastilla en un volumen final de 15-20 mL de PBS 1X o solución salina estéril, se conserva en hielo a 4°C.
8. Antes de pasar el volumen de bacteria que se quiere lisar en la prensa francesa es necesario que la prensa se arme, colocando el pistón dentro del cilindro y colocándolo invertido, se puede vaciar lo que se requiere romper en el tubo que se forma entre el pistón y el cilindro.
9. Se coloca un inhibidor de proteasas (complete mini De Roche), en la solución que se va a utilizar, se disuelve y se vierte en la prensa.
10. Se coloca el cilindro en la prensa y se le aplica una presión de 1900 gr, se obtiene la solución y se hace pasar 2-3 veces, bajo la misma presión.
11. Una vez obtenido el lisado se coloca en hielo y para un mejor manejo se hacen alícuotas de 1 mL, se centrifugan a 1200 rpm durante 15 minutos a 4°C.
12. Se recupera el sobrenadante y se alícuota nuevamente en 1 mL, la pastilla obtenida se desecha.
13. Se determino la cantidad de proteína en las alícuotas por The Thermo Scientific Nano Drop 2000 spectrophotometer a 280 nm.

## P. REFERENCIAS

1. Anon. *Global Tuberculosis Control. WHO Report 2001*. 181 (World Health Organization, Geneva, 2001).
2. WHO. World Health Organization Report Infectious Diseases 2000. Overcoming Antimicrobial Resistance. WHO/CDS/2000. ([www.who.int/infectious-disease-report-2000](http://www.who.int/infectious-disease-report-2000))
3. McShane, H. 2005. Co-infection with HIV and TB: double trouble. *Int. J. STD AIDS* 16:95-100
4. WHO. World Health Organization. *Global Tuberculosis Control. WHO Report 2001*. WHO/CDS/TB/2001.275. Geneva: WHO, 2001. ([www.who.int](http://www.who.int)).
5. Besra, G.S., Morehouse, C.B., Rittner, C.M., Waechter, C.J., y Brennan, P.J., (1997). Biosynthesis of mycobacterial lipoarabinomannan. *J Biol Chem* 272: 18460-18466.
6. WHO. World Health Organization. *Global Tuberculosis Control. WHO Report 2002*. WHO/CDS/TB/2001.275. Geneva: WHO, 2002. ([www.who.int](http://www.who.int)).
7. Arthur M. and Dannenberg, J. (1991). Delayed-type hypersensitivity and cell-mediated immunity in the pathogenesis of tuberculosis. *Immunol. Today* 12, 228-233.
8. Gafiel, J. and Pieters, J. (2000) Essential role for cholesterol in entry of mycobacteria into macrophages. *Science* 288, 1647-1650.
9. Wayne, L. G. y Kubica, G.P. (1986). Family Mycobacteriaceae. In *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Holt, J. G. Sneath, P.H.A., Mair, N.S. y Sharpe, M.E. (eds) Williams and Wilkins, Baltimore. pp. 1435-1457.
10. Springer, B., Wu, W., Bodmer, T., Haase, G., Pfyffer, G. E. Kroppenstedt, R. M., Schroder, K. H., Elmer, S., Kilburn, J. O., Kirschner, P., Telenti, A., Coyle, M. B. y Bottger, E. C. (1996). Isolation and characterization of a unique group of slowly growing mycobacteria: description of *Mycobacterium lentiflavum* sp. nov. *J. Clin. Microbiol.* **34**: 1100-1107.
11. Boddingtonhaus, B., Rogall, T., Flohr, T., Blocker, H. & Bottger, E. C. (1990) *J. Clin. Microbiol.* **28**, 1751-1759.

12. Sreevatsan, S., Pan, X., Stockbauer, K. E., Connell, N. D., Kreiswirth, B. N., Whittam, T. S. & Musser, J. M. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 9869–9874.
13. Vergne I. y Daffé, M. (1998). Interaction of mycobacterial glycolipids with host cells. *Front. Biosci.* 3, d865-876.
14. Daffé, M. Y Etienne, G. (1999). The capsule of *Mycobacterium tuberculosis* and its implications for pathogenicity. *Tubercle lung Dis.* 79: 153-169.
15. Daffé, M. y Draper, P. (1998). The envelope layers of mycobacteria with reference to their pathogenicity. *Adv Microb. Physiol.* 39: 131-203.
16. Robert K. Murray *et al.* 2003. Harper's Illustrated Biochemistry twenty-sixth edition McGraw-Hill, p.p. 421.
17. Lederer, E., Adam, A., Ciorbaru, R., Petit, J.F. y Wietserbin, J. (1975). Cell walls of mycobacteria and related organisms; chemistry and immunostimulant properties. *Miol. Cell. Biochem.* 7:87-104.
18. Draper, P. (1982). The anatomy of mycobacteria. En: *The Biology of Mycobacteria*. Ratledge, C. & Stanford, J. (eds), Academic Press, Londres. Vol. 1, pp 9-52.
19. Chatterjee, D. (1997). The mycobacterial cell wall: structure, biosynthesis and sites of drug action. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 1: 579-588.
20. Asselineau, J. y Lederer, E. (1950). Structure of the mycolic acid of mycobacteria. *Nature.* 166:782-783.
21. Chapman, G. B., Hanks, J., H. y Wallace, J. H. (1959). An electron microscope study of the disposition and fine structure of *Mycobacterium lepraemurium* in mouse spleen *J. Bacteriol.* 77: 205-211.
22. Puzo, G. (1990). The carbohydrate- and lipid- containing cell wall of mycobacteria, phenolic glycolipids: structure and immunological properties. *Crit. Rev. Microbiol.* 17: 305-327.
23. Riley RL, Mills CC, Nyka W, Weinstock N, Storey PB, Sultan LU, et al. *Aerial dissemination of pulmonary tuberculosis: a two-years of contagion in a tuberculosis ward, 1959.* *Am J Epidemiol* 1995; 142:3-14.
24. Schulger NW, Rom W. *The host immune response to tuberculosis.* *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157: 679-691.

25. Dannenberg A. *Roles of cytotoxic delayed-type hypersensitivity and macrophage-activating cell-mediated immunity in the pathogenesis of tuberculosis.* Immunobiology 1994; 191:461-473.
26. Jung SB, Yang CS, Lee JS, Shin AR, Jung SS, Son JW, Harding CV, Kim HJ, Park JK, Paik TH, Song CH, Jo EK. The Mycobacterial 38-kilodalton glycolipoprotein antigen activates the mitogen-activated protein kinase pathway and release of proinflammatory cytokines through Toll-like receptors 2 and 4 in human monocytes. Infect Immun 2006; 74(5): 2686-2696.
27. Rivas-Santiago B, Schwander S, Sarabia C, Diamond G, Klain-Patel M, Hernández-Pando R, Ellner J, Sada E. Human b-defensin-2 is expressed and associated with *Mycobacterium tuberculosis* during infection of human alveolar epithelial cells. Infect Immun 2005; 73(8):4505-4511.
28. Flynn JL, Goldstein MM, Triebold KJ, Koller B, Bloom BR. Major histocompatibility complex class I-restricted T cells are required for resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. Proc Natl Acad Sci USA 1992; 89: 12013–12017.
29. Blacwell JM. Structure and function of the natural-resistance-associated macrophage protein (Nramp-1), a candidate protein for infectious and autoimmune disease susceptibility. Mol Med Today 1996; 2: 205-211.
30. Moody D, Reinhold B, Guy M, Beckman E, Frederique D, Furlong S, et al. Structural requirements for glycolipid antigen recognition by CD1b-restricted T cells. Science 1997; 278: 283-286.
31. Fairhurs R, Wang C, Sieling P, Modlin R, Braun J. CD1-restricted T cells and resistance to polysaccharide-encapsulated bacteria. Immunology Today 1998; 19: 257-259.
32. Ueta C, Tsuyuguchi I, Kawasumi H, Takashima T, Toba H, Kishimoto S. Increase of  $\gamma\delta$ T cells in hospital workers who are in close contact with tuberculosis patients. Infect Immun 1994; 62: 5434-5441.
33. Canaday D, Ziebold C, Noss E, Chervenak K, Harding C, Boom W. Activation of human CD8<sup>+</sup> alpha beta TCR<sup>+</sup> cells by *Mycobacterium tuberculosis* via an alternate class I MHC antigen-processing pathway. J Immunol 1999; 162:372-379.

34. Mazzaccaro R, Gedde M, Jensen E, Van Santen H, Ploegh H, Rock K, et al. Major histocompatibility class I presentation of soluble antigen facilitated by Mycobacterium tuberculosis infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 11786-11791.
35. Smith S, Malin A, Pauline T, Atkinson S, Content J, Huygen K, et al. Characterization of human Mycobacterium bovis bacille Calmette-Guerin-reactive CD8+ T cells. *Infect Immun* 1999; 67: 5223-5230.
36. Krensky AM. Granulysin: a novel antimicrobial peptide of cytolytic T lymphocytes and natural killer cells. *Biochem Pharmacol* 2000; 59: 317-320.
37. Ramachandra L, Chu R, Askew D, Noss EH, Canaday DH, Potter NS, et al. Phagocytic antigen processing and effects of microbial products on antigen processing and T-cell responses. *Immunol Rev* 1999; 168: 217-239.
38. Klaus P, Daniela W, Schondelmaier S, Kabelitz D. Primary activation of V $\gamma$  9-expressing gd T cells by M. tuberculosis. Requirement for Th1-Type CD4 T cell help and inhibition by IL-10. *J Immunol* 1994; 152: 4984-4992.
39. Wesch D, Marx S, Kabelitz D. Comparative analysis of alpha beta and gamma delta T cell activation by Mycobacterium tuberculosis and isopentenyl pyrophosphate. *Eur J Immunol* 1997; 27: 952-956
40. Algood, H. M., Chan, J. & Flynn, J. L. Chemokines and tuberculosis. *Cytokine Growth Factor Rev.* **14**, 467–477 (2003).
41. Flynn, J. L. & Chan, J. What's good for the host is good for the bug. *Trends Microbiol.* **13**, 98–102 (2005).
42. Ulrichs, T. & Kaufmann, S. H. New insights into the function of granulomas in human tuberculosis. *J. Pathol.* **208**, 261–269 (2006).
43. Dheda, K. *et al.* Lung remodeling in pulmonary tuberculosis. *J. Infect. Dis.* **192**, 1201–1209 (2005).
44. Kaplan, G. *et al.* Mycobacterium tuberculosis growth at the cavity surface: a microenvironment with failed immunity. *Infect. Immun.* **71**, 7099–7108 (2003).
45. Tsai, M. C. *et al.* Characterization of the tuberculous granuloma in murine and human lungs: cellular composition and relative tissue oxygen tension. *Cell. Microbiol.* **8**, 218–232 (2006).

46. Ulrichs, T. *et al.* Differential organization of the local immune response in patients with active cavitary tuberculosis or with non progressive tuberculoma. *J. Infect. Dis.* **192**, 89–97 (2005).
47. Clemens, D. L., Lee, B. Y. y Horwitz, M. A. (1995). Purification, characterization, and genetic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* urease, a potentially critical determinant of host-pathogen interaction. *J. Bacteriol.* **177**:5644-5652.
48. Anand, P.K. and D. Kaul. 2005. Down regulation of TACO gene transcription restricts mycobacterial entry/survival within human macrophages. *FEMS Microbiol. Lett.* **250**:137-144.
49. Ordway, D., M. Henao-Tamayo, I.M. Orme, and M. Gonzalez-Juarrero. 2005. Foamy macrophages within lung granulomas of mice infected with *Mycobacterium tuberculosis* express molecules characteristic of dendritic cells and antiapoptotic markers of the TNF receptor-associated factor family. *J. Immunol.* **175**:3873-3881.
50. Besra, G. S., y Chatterjee, D. (1994). Lipids and carbohydrates of *M. tuberculosis*. En: *Tuberculosis: Pathogenesis, Protection and Control*. Bloom, B.R. (ed), Washinton. Pp. 285-306.
51. Middlebrook, G., Dubos, R. J. y Pierce, C. (1947). Virulence and morphological characteristics of mammalian tubercle bacilli. *J. Exp. Med.* **82**:175-184.
52. Silva, C. L., Ekizlerian, S.M. y Fazioli, R. A. (1985). Role of cord factor in modulation of infection caused by micobacteria. *Am. J. Pathol.* **118**:238-247.
53. Bloch, H. y Noll, H. (1953). Studies on the virulence of tubercle bacilli. Variation in the virulence effect elicited by Tween 80 and thiosemicarbazone. *Br. J. Exp. Pathol.* **97**: 1-16.
54. Barnes, P. and Wize, B (2000). Editorial: Type 1 cytokines and pathogenesis of tuberculosis. *Am J. Respi. Crit. Care Med.* **161**, 1773-1774.
55. Hansch, H; Smith, D.; Mielke, M.; Hahn, H; Bancroft, G. and Ehlers, S. (1996). Mechanims of granuloma formation in murine *Mycobacterium avium* infection: the contribution of CD4<sup>+</sup> T cells. *Int. Immunol.* **8**,1299-1310.
56. Cole, S. T., R. Brosch, J. Parkhill, T. Garnier, C. Churcher, D. Harris, S.V. Gordon, K. Eigenmeir, S. Gas, C. E. Barry III, F. Tekala, K. Badcock, D. Basham, D. Brown, T. Chillingworth, R. Conner, R. Davies, K. Devlin, T. Feltwell, S.

- Gentles, N. Hamlin, S. Holroyd, T. Hornsby, K. Jagels, A. Krogh, J. McLean, M. S, L. Murphy, K. Oliver, J. Osborne, M. A. Quail, M.-A. Rajandream, J. Rogers, S. Rutter, K. Seegar, J. Skelton, R. Squares, J. E. Sulston, K. Taylor, S. Whitehead, and B. G. Burrell. 1998. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 393:537–544.
57. Skjot, R. L. V., T. Oettinger, I. Roswknrands, P. Ravn, I. Brock, S. Jacobsen, and P. Andersen. 2000. Comparative evaluation of low-molecular-mass proteins from *Mycobacterium tuberculosis* identifies members of the ESAT-6 family as immunodominant T-cell antigens. *Infect. Immun.* 68:214–220.
58. Wesch D, Marx S, Kabelitz D. Comparative analysis of alpha beta and gamma delta T cell activation by *Mycobacterium tuberculosis* and isopentenyl pyrophosphate. *Eur J Immunol* 1997; 27: 952-956.
59. Majlessi, L., P. Brodin, R. Brosch, M. J. Rojas, H. Khun, M. Huerre, S. T. Cole, and C. Leclerc. 2005. Influence of ESAT-6 secretion system 1 (RD1) of *Mycobacterium tuberculosis* on the interaction between mycobacteria and the host immune system. *J. Immunol.* 174:3570-3579.
60. North, R and Jung, Y-J (2004) Immunity of tuberculosis. *Annu. Rev. Immunol.* 22, 599-623.
61. Boom, W. H. (1996). The role of T-cell subsets in *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Infect. Agents. Dis.* 5, 73-81.
62. Martin, F. and Kearney J. F. (2002) Marginal-zone B cells. *Nature reviews.* 2, 323-333.
63. Uezu, K; Kawakami, K; Miyagi, K; Kinjo, Y.; Ishikawa, H and Saito, A. (2004). Accumulation of  $\gamma\delta$  T cell in the lung and their regulatory roles in Th1 response and host defense against pulmonary infection with *Cryptococcus neoformans* *J. Immunol.* 172, 7629-7634.
64. Fulton, S. A.; Martin, T. D.; Redline, R. W. and Boom, W. H. (2000) Pulmonary immune Responses during primary *Mycobacterium bovis-Calmette-Guérin* infection in C57B1/6 mice. *Am. J. Respir. Cell. Moll. Biol.* 22, 333-343.
65. Serbina, N. V., and J. L. Flynn. 1999. Early emergence of CD8<sup>+</sup> T cells primed for production of type 1 cytokines in the lungs of *Mycobacterium tuberculosis* infected mice. *Infect. Immun.* 67:3980.

66. Feng, C. G., A. G. Bean, H. Hooi, H. Briscoe, and W. J. Britton. 1999. Increase in interferon-secreting CD8, as well as CD4, T cells in lungs following aerosol infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* 67:3242.
67. Lewinsohn, D., M. Alderson, A. Briden, S. Riddell, S. Reed, and K. Grabstein. 1998. Characterization of human CD8 T cells reactive with *Mycobacterium tuberculosis*-infected antigen presenting cells. *J. Exp. Med.* 187:1633.
68. Lewinsohn, D. M., A. L. Briden, S. G. Reed, K. H. Grabstein, and M. R. Alderson. 2000. *Mycobacterium tuberculosis*-reactive CD8 T lymphocytes: the relative contribution of classical versus nonclassical HLA restriction. *J. Immunol.* 165:925.
69. Serbina, N. V., C.-C. Liu, C. A. Scanga, and J. L. Flynn. 2000. CD8 cytotoxic T lymphocytes from lungs of *Mycobacterium tuberculosis*-infected mice express perforin in vivo and lyse infected macrophages. *J. Immunol.* 165:353.
70. Cho, S., V. Mehra, S. Thoma-Uszynski, S. Stenger, N. Serbina, R. Mazzaccaro, J. L. Flynn, P. F. Barnes, S. Southwood, E. Celis, et al. 2000. Antimicrobial activity of MHC class I restricted CD8 T cells in human tuberculosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:12210.
71. Schoenberger, S. P., Toes, R. E., van der Voort, E. I., Offringa, R., and Melief, C. J. T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions. *Nature (Lond.)*, 393: 480–483, 1998.
72. Bennett, S. R., Carbone, F. R., Karamalis, F., Flavell, R. A., Miller, J. F., and Heath, W. R. Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signalling. *Nature (Lond.)*, 393: 478–480, 1998.
73. Ridge, J. P., Di Rosa, F., and Matzinger, P. A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4 T helper and a T-killer cell. *Nature (Lond.)*, 393:474–478, 1998.
74. Mintern, J. D., Davey, G. M., Belz, G. T., Carbone, F. R., and Heath, W. R. Cutting edge: precursor frequency affects the helper dependence of cytotoxic T cells. *J. Immunol.*, 168: 977–980, 2002.
75. Cooper, A.M., C. D'Souza, A.A. Frank, and I.M. Orme. 1997. The course of *Mycobacterium tuberculosis* infection in the lungs of mice lacking expression of either perforin or granzyme mediated cytolytic mechanisms. *Infect. Immun.* 65:1317–1320.

**76.** Laochumroonvorapong, P., J. Wang, C.C. Liu, W. Ye, A.L. Moreira, K.B. Elkon, V.H. Freedman, and G. Kaplan. 1997. Perforin, a cytotoxic molecule which mediates cell necrosis, is not required for the early control of mycobacterial infection in mice. *Infect. Immun.* 65:127–132.