



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTINFLAMATORIO DE CDIP-2 Y ANTIMICROBIANO DE CDAP-4, PÉPTIDOS DERIVADOS DE LA QUIMIOCINA CCL13 EN UN MODELO MURINO DE TUBERCULOSIS EXPERIMENTAL.

TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:
OSCAR JOSÉ SALINAS DÍAZ



MÉXICO, D.F.

2011



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

Presidente: Prof. Alejandro Camacho Cruz
Vocal: Prof. Enrique Ortega Soto
Secretario: Prof. Eduardo García Zepeda
1º Suplente: Prof. Gonzalo Castillo Rojas
2º Suplente: Prof. Santiago Ávila Ríos

El presente trabajo fue desarrollado en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, en el Departamento de Inmunología, dentro del laboratorio a cargo del Dr. Eduardo García Zepeda.

ASESOR DEL TEMA

Dr. Eduardo García Zepeda

SUSTENTANTE

Oscar José Salinas Díaz

INDICE

1. INTRODUCCIÓN	8
1.1 SISTEMA INMUNE	8
1.2 ÓRGANOS LINFOIDES	9
1.3 RESPUESTA INMUNE INNATA	11
1.4 RESPUESTA INMUNE ADAPTATIVA	13
1.5 QUIMIOCINAS	17
1.5.1 Familia CC	21
1.5.2 Familia CXC	22
1.5.3 Familia XC	22
1.5.4 Familia CX3C	23
1.6 RECEPTORES DE QUIMIOCINAS	23
1.7 FUNCIONES DE LAS QUIMIOCINAS	25
1.7.1 Homeostasis	25
1.7.2 Inflamación	27
1.7.3 Actividad antimicrobiana	32
1.8 TUBERCULOSIS	34
1.8.1 <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	34
1.8.2 Tuberculosis en la actualidad	36
1.8.3 Patogénesis de la tuberculosis en el humano	37
1.9 MODELO MURINO DE INFECCIÓN CON TUBERCULOSIS	40

1.9.1	Fase temprana	41
1.9.2	Fase avanzada o progresiva	42
1.10	LAS QUIMIOCINAS Y LA TUBERCULOSIS	43
2.	ANTECEDENTES	46
3.	JUSTIFICACIÓN	48
4.	HIPÓTESIS	49
5.	OBJETIVO GENERAL	49
5.1	Objetivos particulares	49
6.	METODOLOGÍA	51
6.1	Preparación de las micobacterias	51
6.2	Infección pulmonar murina con <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv y MDR	51
6.3	Diseño experimental	52
6.4	Análisis histológico del pulmón de ratón	54
6.5	Cuantificación de IFN- γ e IL-4 en suero sanguíneo	55
6.6	Curva de supervivencia de los ratones	55
6.7	Cuantificación de UFC's de pulmón	56
7.	RESULTADOS	57
7.1	La administración de la combinación de los péptidos CDIP-2 y CDAP-4 tiene un efecto en la supervivencia del ratón infectado con <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv	57

7.2	La administración de CDIP-2 y CDAP-4 disminuye el número de UFCs en los pulmones del ratón infectado con <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv	58
7.3	La administración de CDIP-2 y CDAP-4 disminuye el infiltrado inflamatorio en los pulmones del ratón infectado con <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv	59
7.4	El tratamiento con los péptidos CDIP-2 y CDAP-4 no tiene influencia en la producción de las citocinas IFN- γ e IL-4 en el suero de ratones infectados con <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv	61
7.5	La administración de la combinación de los péptidos CDIP-2 y CDAP-4 tiene un efecto en la sobrevivencia del ratón infectado con <i>Mycobacterium tuberculosis</i> MDR	63
7.6	La administración de CDIP-2 y CDAP-4 disminuye el número de UFCs en los pulmones del ratón infectado con <i>Mycobacterium tuberculosis</i> MDR	64
7.7	La administración de CDIP-2 y CDAP-4 disminuye el infiltrado inflamatorio en los pulmones del ratón infectado con <i>Mycobacterium tuberculosis</i> MDR	66
7.8	El tratamiento con los péptidos CDIP-2 y CDAP-4 no tiene influencia en la producción de las citocinas IFN- γ e	

IL-4 en el suero de ratones infectados con <i>Mycobacterium tuberculosis</i> MDR	67
8. DISCUSIÓN	69
9. CONCLUSIONES	76
10. PERSPECTIVAS	78
APÉNDICE I. METODOLOGÍAS EXPERIMENTALES	79
APÉNDICE II. REACTIVOS Y SOLUCIONES	84
APÉNDICE III. ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS	86
11. REFERENCIAS	87

ABREVIATURAS

BCG	Bacille Calmette-Guerin
BCR	B cell Receptor
BSA	Bovine Serum Albumin
CAMP	Cationic Anti-Microbial Peptide
CBS	Carbonate Buffer Solution
CDAP-4	Chemokine Derived Antimicrobial Peptide 4
CDIP-2	Chemokine Derived Inhibitory Peptide 2
CCL	CC Chemokine Ligand
CCR	CC Chemokine Receptor
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
GM-CSF	Granulocyte Monocyte Colony Stimulating Factor
GPCR	G Protein Coupled Receptor
HRP	Horseradish Peroxidase
IFN γ	Interferon Gamma
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleukine
iNOS	Inducible Nitric Oxide Synthase
IT	Administración intratraqueal
LPS	Lipopolysaccharide
M-CSF	Macrophage Colony Stimulating Factor
MALT	Mucose Associated Lymphoid Tissue
MAM	Microbial Associated Molecule
MDR	Multi Drug Resistant strain
MCP	Monocyte Chemoattractant Protein
PAMP	Pathogen Associated Molecular Pattern
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PBS	Phosphate Buffer Solution
PRR	Pattern Recognition Receptor
ROS	Reactive Oxygen Species
SS	Solución Salina Isotónica
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine
TB	Tuberculosis
TCR	T cell Receptor
TGF- β	Tumor Growth Factor Beta
TNF α	Tumoral Necrosis Factor Alpha
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana
XDR	Extensively Drug Resistant strain

1. INTRODUCCIÓN.

1.1 SISTEMA INMUNE.

La inmunidad se refiere a una condición que otorga resistencia contra agentes patógenos y el sistema inmune es el que permite mantener al cuerpo en homeostasis, el cuál está formado por un conjunto de tejidos, células y moléculas especializados que impiden de manera coordinada la entrada, diseminación y proliferación de agentes patógenos, así como el daño ocasionado por otros agentes externos, además de permitir la tolerancia hacia lo propio.[1, 2]

Las células que lo componen principalmente son los leucocitos, una población heterogénea de células clasificadas en granulocitos y células mononucleares; otras estirpes celulares como el endotelio, epitelio y células musculares participan de forma activa con el sistema inmune liberando o expresando en su superficie factores requeridos que estimulan la respuesta inmune. Otra parte de las células que participan en dicha respuesta, se organiza para formar tejidos y órganos denominados órganos linfoides [3].

Por otro lado las moléculas solubles que forman parte del sistema inmune son las encargadas de regular las funciones celulares, por medio de la unión a sus receptores específicos [4].

1.2 ÓRGANOS LINFOIDES.

El sistema linfoide se compone por dos grupos de órganos: los primarios que son la médula ósea y el timo, en los que se desarrollan y maduran los linfocitos a partir de sus precursores, a este proceso se le denomina linfopoyesis. En la médula ósea, los linfocitos se originan a partir de células hematopoyéticas pluripotenciales, las cuales pueden diferenciarse en diferentes linajes celulares como el linfoide y el mieloide. Existen principalmente dos clases de linfocitos, los linfocitos B que se desarrollan en la médula ósea y en el hígado fetal; y los linfocitos T que maduran en el timo [3].

Los órganos linfoides secundarios son aquellos en los que la respuesta inmune adaptativa sucede y donde se mantienen los linfocitos, estos órganos son los ganglios linfáticos, el bazo, el tejido linfoide asociado a mucosas (MALT) y las placas de Peyer en el intestino. El tejido linfoide asociado a mucosas, es una agrupación no encapsulada situada en la lámina propia y submucosa del intestino, en la submucosa del aparato respiratorio y en la submucosa del aparato genito-urinario [5].

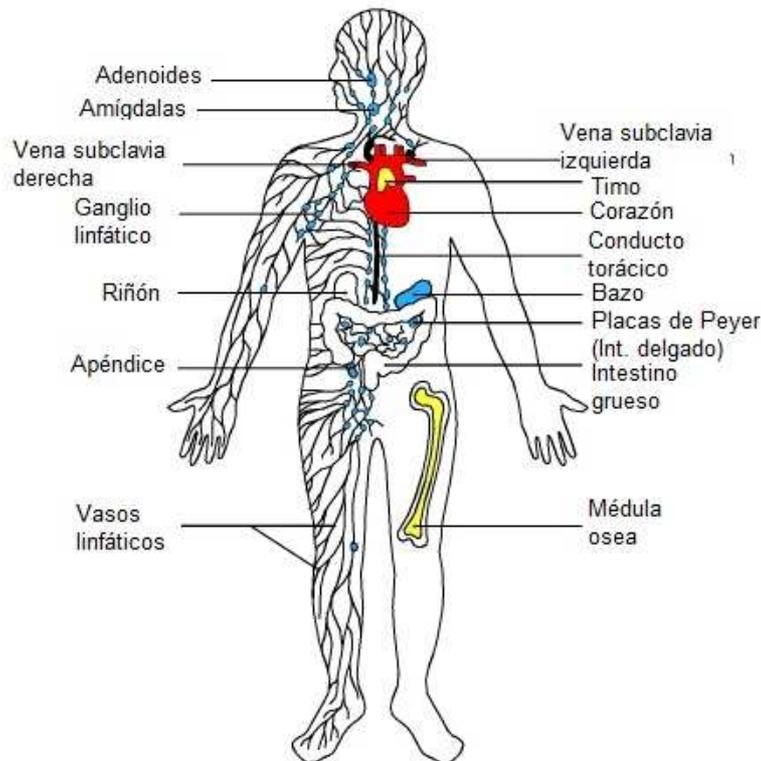


Figura 1.1 Esquema de la localización de los órganos linfoides primarios y secundarios [1].

Los linfocitos circulantes de la sangre, antígenos y células dendríticas de tejidos periféricos llegan a los ganglios linfáticos mediante los conductos o vasos linfáticos. Los ganglios linfáticos presentan dos vías: la de entrada o conductos linfáticos aferentes, vénulas del endotelio alto y arterias postcapilares; y la de salida, conductos linfáticos eferentes. Histológicamente pueden distinguirse dos zonas en los ganglios linfáticos la corteza y la médula. La corteza puede dividirse en paracorteza o zona de células T y un área superficial de linfocitos B [6].

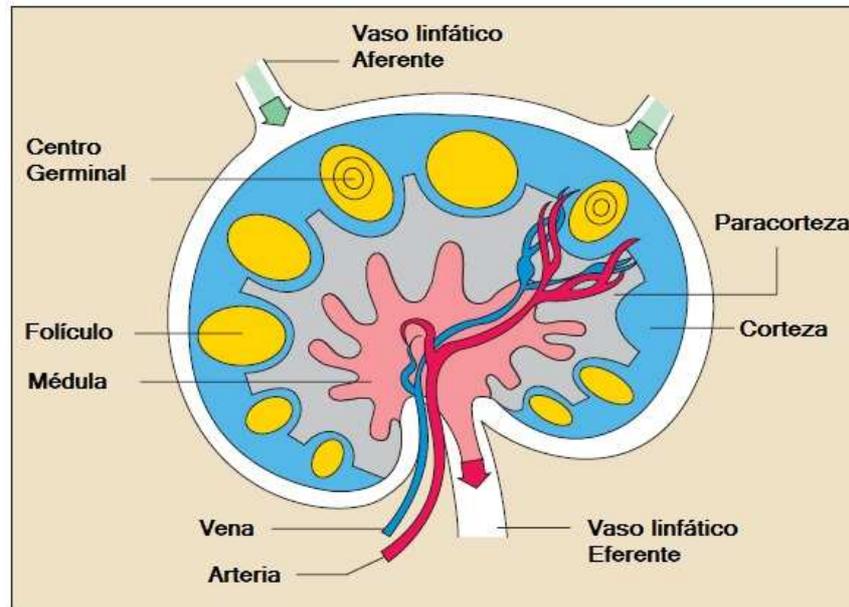


Figura 1.2 Morfología del ganglio linfático. Los linfocitos T se concentran en la paracorteza, mientras que los linfocitos B siguen su desarrollo en los centros germinales [7].

El bazo filtra la sangre de forma similar a como los ganglios filtran la linfa captando antígenos del torrente sanguíneo, las arteriolas del bazo están rodeadas de linfocitos T y B formando estructuras similares a las presentes en los ganglios linfáticos [2].

1.3 RESPUESTA INMUNE INNATA.

Es la primera línea de defensa del cuerpo contra patógenos. Está constituida por barreras mecánicas como la piel, la mucosa respiratoria y gastrointestinal. También cuenta con barreras químicas como el pH ácido del tracto gastrointestinal, enzimas y péptidos antimicrobianos, así

mismo, participan diversos componentes humorales y celulares. Se basa en el reconocimiento de estructuras moleculares conservadas presentes en los patógenos, estas moléculas se conocen como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) también denominadas moléculas asociadas a microorganismos (MAMs), que representan los blancos de reconocimiento por parte de la respuesta innata, a través de un grupo limitado de receptores codificados en la línea germinal, se les conoce como receptores que reconocen patrones (PRRs), y no es transferible. Entre las principales funciones de los PRRs está la opsonización, activación del complemento, cascadas de coagulación, fagocitosis, apoptosis y cascadas de señalización que llevan a una respuesta proinflamatoria [8].

Las células de la respuesta innata comprenden un diverso grupo de células de origen hematopoyético, algunas de las cuáles son residentes de los diferentes tejidos del cuerpo como los macrófagos y las células dendríticas; el resto son células como neutrófilos, eosinófilos y monocitos que circulan en la linfa y sangre para sensar la presencia de patógenos, además de tener la capacidad de reclutarse rápidamente a los sitios de infección [1].

1.4 RESPUESTA INMUNE ADAPTATIVA.

Es un sistema de protección presente en los vertebrados, que provee de una reacción, específica contra patógenos, sus receptores y moléculas no están codificados en la línea germinal como la respuesta innata, es transferible e inducible. La respuesta consiste de la fase de reconocimiento, activación, efectora y retorno a la homeostasis. La respuesta adaptativa tiene la capacidad de generar memoria inmunológica para contactos posteriores con el antígeno [1].

Debido a la limitada diversidad de los PRRs, y que los patógenos tienden a tener altas tasas de mutación en su genoma, pueden escapar fácilmente de la respuesta inmune. Además, la habilidad para algunos patógenos como los virus de poder replicarse intracelularmente hace difícil su detección y eliminación. La inmunidad adaptativa es una respuesta biológica altamente sofisticada que involucra los anticuerpos y los receptores de los linfocitos T como sistemas de reconocimiento en respuesta a las altas tasas de mutación de los patógenos y a la replicación intracelular. Estos receptores antígeno específicos están expresados en los linfocitos, la población celular clave en la respuesta adaptativa [1, 2].

Los anticuerpos representan una amplia gama de proteínas producida por una subpoblación de linfocitos denominados linfocitos B. Estas moléculas también conocidas como inmunoglobulinas son expresados

como receptores de superficie durante el desarrollo del linfocito B en la médula ósea; cada linfocito expresa diferentes copias de un mismo anticuerpo, por lo que se dice que cada linfocito B es antígeno específico. Cuando el linfocito B es estimulado por el contacto con su antígeno específico, este se divide y se diferencia en célula plasmática y linfocito B de memoria. Las células plasmáticas regresan a la médula ósea donde secretan anticuerpos hacia la sangre en grandes cantidades. A diferencia de las células de la respuesta inflamatoria, los linfocitos B pueden combatir a distancia las infecciones a través de la producción de anticuerpos, pero, a pesar de la efectividad de los anticuerpos, estos no pueden atravesar la membrana plasmática, para unirse y subsecuentemente destruir a los patógenos intracelulares. Las inmunoglobulinas están presentes de forma soluble (anticuerpos) en el suero y otros fluidos, o ancladas a la membrana de los linfocitos B (receptor de linfocitos B o BCR por sus siglas en inglés). Los anticuerpos poseen una estructura básica con forma de Y, están constituidos por cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L), unidas entre sí por puentes disulfuro. Tanto las cadenas pesadas como ligeras, tienen una región variable con actividad de unión al antígeno denominada Fab y otra región sin propiedades de unión a antígeno denominada cristalizable o Fc. Se han descrito dos tipos de cadenas ligeras κ y λ , que pueden asociarse a cualquiera de las cinco

clases de cadenas pesadas μ , δ , γ , α y ϵ . El tipo de cadena pesada determina la clase o isotipo de anticuerpo IgG, IgM, IgE, IgA o IgD. La variación dentro de los isotipos de IgG e IgA permiten diferenciar cuatro subtipos de anticuerpos IgG en humanos: IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 y en el ratón IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3; mientras que del isotipo IgA: IgA1 e IgA2 en humanos. La clase o isotipo de anticuerpo determina su capacidad para alcanzar el sitio de infección y los mecanismos efectores para el control de la infección [5].

La diversidad de los anticuerpos, está dada por una compleja serie de eventos que incluyen recombinación y mutaciones somáticas. Como consecuencia de esta alta diversidad, los anticuerpos pueden reconocer virtualmente cualquier estructura molecular, ya sea de origen biológico o sintético [5].

Los linfocitos T son otro subgrupo de células del sistema inmune que le permiten reconocer y destruir patógenos intracelulares. Al igual que los linfocitos B, los linfocitos T expresan un receptor antígeno específico en la superficie de su membrana, denominado TCR. Los linfocitos T tienen un diverso repertorio de TCRs, que en su estructura, son muy semejantes a las inmunoglobulinas, aunque son codificados por diferentes genes, a través de un proceso similar de recombinación somática. A diferencia de los anticuerpos, los TCRs no son secretados y son incapaces de reaccionar con antígenos solubles, por lo cual

requieren de la presentación de antígenos a través de un mecanismo denominado "presentación de antígeno", en el cual las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) o antígeno humano de leucocitos (HLA) se unen a antígenos peptídicos, para posteriormente estimular el TCR de los linfocitos T [1].

Hay dos clases de MHC, el de clase I que se expresa en casi todas las células nucleadas del organismo, y presenta péptidos (9-11 aminoácidos) intracelulares a los linfocitos T que expresan el marcador de superficie CD8. El MHC de clase II, presenta péptidos (11-20 aminoácidos) derivados de proteínas extracelulares que previamente fueron endocitadas y degradadas [1].

La inmunidad adaptativa es caracterizada por su especificidad y el desarrollo de la selección clonal de una variedad de linfocitos con receptores específicos generados a partir del rearreglo de genes. Para detectar, eliminar y recordar un amplio número de agentes patógenos, el sistema inmune adaptativo debe ser capaz de distinguir entre un número infinito de diferentes antígenos, que en ocasiones están estrechamente relacionados. La diversidad y especificidad de los receptores de los linfocitos T y B es generada por un pequeño grupo de genes (V,D y J) que aleatoriamente se ensamblan para dar la posibilidad de un infinito número de combinaciones durante el desarrollo de los linfocitos. Este procedimiento es denominado reordenamiento de V(D)J.

La diversidad de los anticuerpos se debe a las múltiples mutaciones en el reordenamiento de los genes, conocido como el proceso de hipermutación somática [2, 9].

La diversidad total de anticuerpos que puede generar un individuo se conoce como repertorio de anticuerpos, equivale aproximadamente a 10^{16} especificidades diferentes, esto a su vez refleja todos los posibles clones de linfocitos B capaces de sintetizar y secretar inmunoglobulinas en respuesta a un antígeno específico [2].

1.5 QUIMIOCINAS.

Las quimiocinas son una amplia familia de proteínas cuya actividad principal se relaciona con el tráfico leucocitario a los sitios donde ocurre el proceso inflamatorio, hoy en día, se sabe de su participación en la homeostasis, activación, maduración y localización de los leucocitos. Algunas quimiocinas también participan en procesos como la angiogénesis y en el desarrollo de otros órganos no linfoides, incluso algunas quimiocinas tienen actividad antimicrobiana [10, 11].

Las quimiocinas son proteínas con peso molecular de 8 a 12kDa, actualmente se han descrito más de 50. Las quimiocinas son producidas por células de diferentes linajes, de manera constitutiva o como

consecuencia de un estímulo, por ello suelen clasificarse arbitrariamente como quimiocinas constitutivas o proinflamatorias [12].

Las quimiocinas originalmente se nombraron en base a su función o con nombres ligados a las circunstancias en que fueron descubiertas. En la actualidad la nomenclatura de las quimiocinas se basa en la clasificación por familias como CCL, CXCL, y CX₃CL seguida de un número, por ejemplo CCL13 antes MCP-4, CCL11 antes eotaxina, donde "L" se refiere a ligando, y en la nomenclatura de receptores de quimiocina esta "L" es sustituida por una "R".

Las quimiocinas se agrupan en cuatro grupos, cada una definida por la localización de los dos primeros residuos de cisteína del extremo amino terminal de la quimiocina, los cuales forman puentes disulfuro con otros dos residuos de cisteína, estos puentes dan forma a la estructura terciaria característica de las quimiocinas. De acuerdo a la posición de estos residuos, las quimiocinas se dividen en cuatro familias: CC, CXC, C, CX₃C; la X indica la presencia de un aminoácido cualquiera entre las dos cisteínas, estas diferencias estructurales se relacionan directamente con sus diferentes funciones biológicas [13].

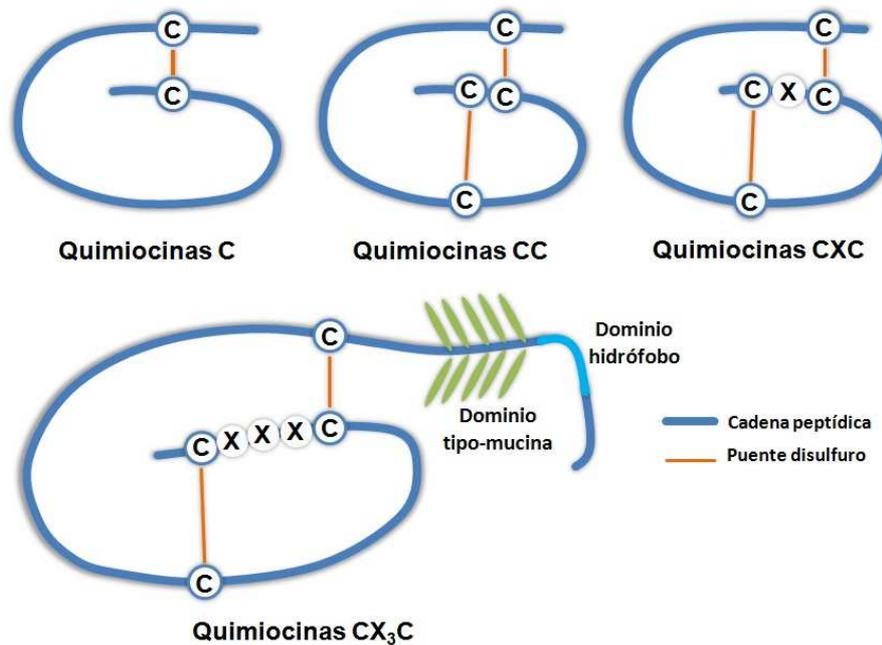


Figura 1.3 Representación de la estructura de los diferentes tipos de quimiocinas. Las quimiocinas se agrupan en subfamilias de acuerdo a la presencia de dos residuos de cisteína ubicados en el extremo amino terminal de su estructura primaria.

Actualmente, se sabe que una quimiocina puede unirse a diversos receptores de quimiocina, al igual que un receptor de quimiocina puede unir diferentes ligandos, por lo que tienen diversas funciones durante la respuesta inmune, dependiendo del receptor al que se unan y de la célula en que este expresado el mismo [14].

Tabla 1.1 Las quimiocinas y sus receptores.

Familia	Quimiocina	Receptor
CC	CCL1	CCR8
	CCL2	CCR2
	CCL3	CCR1, CCR5
	CCL3L1	CCR1, CCR5
	CCL4	CCR5
	CCL4L1	CCR5
	CCL4L2	CCR5
	CCL5	CCR1, CCR3, CCR5
	CCL7	CCR1, CCR2, CCR3
	CCL8	CCR2, CCR3, CCR5
	CCL11	CCR3
	CCL13	CCR2, CCR3
	CCL14	CCR1, CCR5
	CCL15	CCR1, CCR3
	CCL16	CCR1, CCR3, CCR5, CCR8
	CCL17	CCR4
	CCL18	?
	CCL19	CCR7
	CCL20	CCR6
	CCL21	CCR7
	CCL22	CCR4
	CCL23	CCR1
	CCL24	CCR3
	CCL25	CCR9
	CCL26	CCR3
	CCL27	CCR10
	CCL28	CCR3, CCR10
	CXC	CXCL1
CXCL2		CXCR2
CXCL3		CXCR2
CXCL4		CXCR3B
CXCL4L1		?
CXCL5		CXCR2
CXCL6		CXCR1, CXCR2
CXCL7		CXCR2
CXCL8		CXCR1, CXCR2
CXCL9		CXCR3
CXCL10		CXCR3
CXCL11		CXCR3
CXCL12		CXCR4
CXCL13		CXCR5
CXCL14		?
CXCL16		CXCR6
CXCL17		?
XC	XCL1	XCR1
	XCL2	XCR1
CX3C	CX3CL1	CX3CR1

1.5.1. Familia CC.

Este grupo de quimiocinas se encuentra codificado en el cromosoma 17q11-21 y en el 9p13, está conformado por 29 quimiocinas, CCL1 a CCL28 incluyendo CCL3L1, CCL4L1 y CCL4L2, excluyendo CCL6 y 9. Este grupo de quimiocinas actúa preferentemente activando monocitos, linfocitos, eosinófilos y basófilos, por lo que su participación en los procesos crónicos inflamatorios es importante. Las quimiocinas activan sus receptores a través del extremo amino terminal; en algunos experimentos se encontró que la adición de un aminoácido en el extremo amino terminal no influye en la unión a su receptor, sin embargo, puede modificar la potencia de la respuesta como en el caso de CCL5 y CCL2. En el caso de CCL2, la escisión de un aminoácido en el extremo amino terminal produce un cambio sobre la especificidad celular, en este caso CCL2 activa preferentemente eosinófilos sobre basófilos. En el caso de CCL3 y CCL4 la escisión de un aminoácido aumenta su eficiencia en la activación de su receptor.

Además de la quimiotaxis, las quimiocinas CC, como CCL3 tienen la propiedad de mediar la proliferación hematopoyética en sinergia con otros factores de crecimiento como GM-CSF y M-CSF [13].

1.5.2. Familia CXC.

Las quimiocinas CXC se encuentran codificadas en el cromosoma 4q12-13 y en el 4q21. Este grupo de quimiocinas puede dividirse en dos subgrupos en base a los tres primeros residuos que preceden al motivo CXC: el subgrupo ELR (ácido glutámico, lisina y arginina) y el subgrupo no-ELR. Las quimiocinas del subgrupo ELR son CXCL1 a CXCL8, excepto CXCL4 que es parte del subgrupo no-ELR conformado por CXCL9 a CXCL17. Las quimiocinas CXC ELR quimioatraen y activan a los neutrófilos a través de los receptores CXCR1 y CXCR2. Dentro de las quimiocinas CXC, CXCL8 tiene alta afinidad por los receptores CXCR1 y CXCR2 a diferencia de las demás quimiocinas ELR. Las quimiocinas similares a CXCL8 actúan como poderosos factores angiogénicos. Adicionalmente se ha demostrado el potencial angiostático de las quimiocinas similares a CXCL4, CXCL9 y CXCL10, que inhiben el crecimiento de tumores [13].

1.5.3. Familia XC.

Este grupo de quimiocinas está integrado únicamente por dos miembros, XCL1 y XCL2. Este grupo de quimiocinas se caracteriza por tener dos de las cuatro cisteínas que están presentes en el resto de las quimiocinas. Los genes que codifican para estas quimiocinas se encuentran en el cromosoma 1. Estas quimiocinas tienen actividad

quimioatrayente limitada a linfocitos T CD8+ activados y de sangre periférica, también sobre los linfocitos T CD4+ y sobre las células NK [13].

1.5.4. Familia CX3C.

Este grupo, está conformado por un miembro, CX3CL1, también conocido como fractalcina o neurotactina, tiene alta afinidad por el receptor CX3CR1. Esta quimiocina tiene un dominio tipo mucina, que le permite anclarse a la membrana celular o estar soluble como glicoproteína, mismo que podría permitir la presentación directa de la quimiocina en las células, sin necesidad de la presentación de los Glicosaminoglicanos (GAGs). Diversos estudios han demostrado que CX3CL1 juega un papel importante en la inflamación del sistema nervioso central [13].

1.6 RECEPTORES DE QUIMIOCINAS.

Son proteínas que pertenecen a la familia de los receptores acoplados a proteínas G o GPCRs (de sus siglas en inglés), también conocidos como receptores de siete dominios transmembranales. Estos receptores se definen por su capacidad de unirse a las quimiocinas de manera específica y transducir una respuesta celular [15].

Los receptores de quimiocina se expresan preferencial y diferencialmente en las células del sistema inmune, es decir, algunos de estos receptores se expresan constitutivamente en algunos tipos celulares, mientras que en otros son inducibles. Además de participar en el tráfico leucocitario, y en la quimiotaxis, también participan en el desarrollo de los sistemas: cardiovascular, gastrointestinal, nervioso e inmune [13].

A la fecha se conocen cerca de 20 receptores de quimiocina del tipo GPCRs, los cuales se clasifican de acuerdo al tipo de quimiocina al que se unen; se sabe que un tipo de quimiocina puede unirse con diferente afinidad a varios de estos receptores, además este tipo de receptores pueden formar multímeros modificando la respuesta celular inducida [15].

Las quimiocinas se pueden unir a otros receptores extracelulares no convencionales, denominados GAGs o glicosaminoglicanos cuya función es estabilizar el gradiente de concentración de las quimiocinas en orden de regular la quimiotaxis en los diferentes tejidos [5].

Por otro lado, existe un tercer tipo de receptor para las quimiocinas, se les denomina receptores decoy, en este grupo de receptores esta, DARC o también conocido como el antígeno Duffy del sistema de clasificación sanguíneo, D6 y CCX-CKR. Los receptores decoy internalizan a las quimiocinas y las secuestran en endosomas sin producir efectos o

señales, por lo que su función se relaciona con el aclaramiento de quimiocinas en los sitios donde ocurre la inflamación[13].

1.7 FUNCIONES DE LAS QUIMIOCINAS.

Después de su descubrimiento, y la importancia de su papel como reguladores de la migración celular, las quimiocinas han sido ampliamente estudiadas y se les ha relacionado con diferentes procesos biológicos como la homeostasis, el desarrollo de la respuesta Th1 y Th2, la angiogénesis y la angiostasis, la inflamación, metástasis y el desarrollo de órganos linfoides [10].

1.7.1. Homeostasis y desarrollo.

La homeostasis se refiere al estado en el cual un organismo está en balance de sus funciones y componentes, en cuanto, al sistema inmune, una infección podría romper dicho balance.

Diferentes estudios han revelado la participación de diversas quimiocinas en la hematopoyesis y en el desarrollo de órganos, sin embargo, la evidencia *in vivo* basada en los estudios en ratones knockout provee de datos contrastantes en el efecto hematopoyético de algunas quimiocinas y sus receptores. Por ejemplo, CCL3 inhibe el ciclo celular, reduciendo el número total de células progenitoras de médula

ósea cuando se administra en ratones. En los ratones knockout del receptor CCR1, el de mayor afinidad para CCL3, muestran una potenciada mieloproliferación y movilización leucocitaria hacia el torrente sanguíneo. CXCL12 que se expresa en médula ósea, promueve la proliferación de precursores de linfocitos B y moviliza la emigración de los precursores hematopoyéticos hacia la médula ósea durante la embriogénesis. Los ratones deficientes de CXCL12 o de su receptor CXCR4 mueren perinatalmente, con defectos en la linfopoyesis de células B y en la mielopoyesis, pero, los ratones que carecen de CXCL12 o CXCR4 sufren otras anomalías más severas como el desarrollo incompleto del septo cardíaco ventricular y desarrollo defectuoso del cerebelo.

El timo es el órgano de mayor importancia para el desarrollo de linfocitos T, en el cual se expresan diferentes quimiocinas con propiedades linfoatrayentes, tales como CCL25, CCL17, CCL21, CCL19 y CXCL12. El desarrollo de los linfocitos T en el timo, involucra diferentes pasos de migración, empezando por el influjo de las células precursoras de linfocitos T de la corteza, hacia la médula, seguido de la liberación de los linfocitos maduros a la circulación. Las quimiocinas dirigen este proceso por medio de una combinación y cambio en el patrón de expresión en los linfocitos T en los diferentes estados de maduración y producción de quimiocinas en el microambiente. CCL25 es producida por

las células dendríticas y actúa como quimioatrayente de linfocitos T inmaduros, por lo que CCL25 dirige el flujo de los linfocitos T inmaduros hacia el timo donde las células son seleccionadas y maduras. Otras quimiocinas dirigen el desarrollo de los órganos linfoides secundarios, Los ratones knock-out de CXCL13 o su receptor CXCR5, son deficientes en los ganglios periféricos y las Placas de Peyer, aunque tienen un desarrollo normal de los ganglios mesentéricos. Ambos tipos de ratones presentan una desorganizada microarquitectura en el bazo, sin segregación de las áreas de linfocitos T y B en la pulpa blanca [10, 13, 16].

1.7.2. Inflamación.

Los eventos que llevan a la respuesta inflamatoria, inician con el reconocimiento por parte de los leucocitos del sitio donde se produjo el daño y el subsecuente reclutamiento de células efectoras al mismo. En este sentido, se ha demostrado que las quimiocinas participan en el reclutamiento específico de las diferentes subpoblaciones de leucocitos que se encargan de remover los microbios invasores de las células o tejidos dañados, y de repararlos, en procesos inflamatorios agudos o crónicos, promoviendo la infiltración y activación de las células inflamatorias hacia los sitios afectados. Diversas quimiocinas de la familia CC, incluyendo CCL3 y CCL5 son expresadas durante la

septicemia, promoviendo el efecto proinflamatorio, mediando el influjo específico de leucocitos. Los miembros de la familia CXC están implicados en la patogénesis de la respuesta sistémica inflamatoria. En la neumonía bacteriana, la infiltración de neutrófilos es mediada por quimiocinas tipo CXC, para la eliminación de los microorganismos invasores, por ejemplo, la quimiocina murina KC, homóloga de la quimiocina CXCL1 humana, aumenta la resistencia hacia el patógeno *Klebsiella pneumoniae*. [14, 16]

En asma, la submucosa de las vías aéreas menores, es infiltrada por células mononucleares, eosinófilos y mastocitos ocasionando hiperplasia de las glándulas productoras de moco y fibrosis subepitelial. En los modelos animales, la cinética de la producción de CCL2, CCL11, CCL17 y CCL22 se correlaciona con el reclutamiento en vías aéreas de leucocitos que expresan los receptores específicos para estas quimiocinas. En la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC) hay una limitación del flujo de aire derivada de una inflamación crónica por el infiltrado de neutrófilos, macrófagos y linfocitos T CD8⁺ productores de IFN- γ que expresan CXCR3, receptor de CXCL10, sugiriendo que CXCR3 regula el infiltrado inflamatorio Th1 patogénico durante la inflamación crónica de los pulmones. La neutralización de CXCL10 contribuye a inhibir la inflamación alérgica de vías aéreas. Por lo tanto CXCR3 entre otras

quimiocinas participan en la inflamación del pulmón que no necesariamente es dominada por la respuesta Th1.[14, 16]

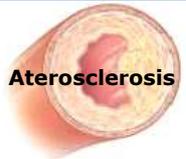
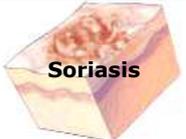
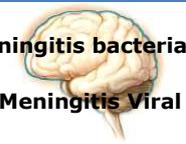
La aterosclerosis es una enfermedad inflamatoria en la que las quimiocinas juegan un papel importante en el reclutamiento leucocitario, la angiogénesis y la proliferación de células de músculo liso vasculares y su migración para formar placas. Las lesiones ateroscleróticas expresan CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL8 y CXCL8, su fuente principal son las células del endotelio, del músculo liso y los leucocitos infiltrados. CCL2 y su receptor CCR2 juegan un papel importante en la aterosclerosis. CCL2 es esencial para el reclutamiento de monocitos, tiene actividad angiogénica e induce la proliferación y migración de células de músculo liso. Los niveles de colesterol en plasma, la hipertensión y la diabetes estimulan la liberación de quimiocinas liberadas por las lesiones ateroscleróticas. También, la adhesión de los leucocitos al endotelio aumenta la liberación de quimiocinas favoreciendo el desarrollo de la aterosclerosis. En el humano, algunos polimorfismos del gen del receptor CX3CR1 confieren protección contra la aterosclerosis; en ratones ApoE que manifiestan aterosclerosis, cruzados con ratones CX3CR1^{-/-} las lesiones ateroscleróticas se ven severamente reducidas, con una disminución en el reclutamiento de macrófagos.

En otras enfermedades como las artritis reumatoide (AR), caracterizada por una combinación de células asociadas a la respuesta Th1 (linfocitos

T, neutrófilos, monocitos) en el espacio sinovial de las articulaciones, en asociación a la destrucción del cartílago y la remodelación del hueso. Las quimiocinas producidas en las articulaciones inflamadas atraen a los leucocitos a través de la barrera endotelial para mantener activo el proceso de la AR. En los pacientes con AR se detectan altas concentraciones de CXCL8, CXCL5 y CXCL1 en suero, fluidos sinoviales y tejidos sinoviales; estas quimiocinas atraen neutrófilos promoviendo la angiogénesis. Las quimiocinas CCL2, CCL3 y CCL5 también se expresan en la AR, atrayendo monocitos. Por otro lado, CXCL12 se expresa en el sinovio con artritis reumatoide, incrementando la acumulación de linfocitos T CD4 y la disposición de CXCR4 en el sitio de inflamación. Además, CXCL12 bloquea la activación de linfocitos T inducida por apoptosis, incrementando la acumulación de linfocitos T en el sinovio reumatoide. Por otro lado CXCL12 podría inducir la migración de células dendríticas de la sangre hacia el área reumatoide, lo que la implica en un papel perjudicial de la respuesta autoinmune.

De esta manera las quimiocinas y sus receptores se ven implicados en la regulación de los diferentes procesos inflamatorios patológicos antes mencionados, ente otros más como las Esclerosis Múltiple [14, 16].

Tabla 1.2 Participación de las quimiocinas y sus receptores en diversas enfermedades inflamatorias. Modificada de Luster, 1998 [14].

Enfermedad Inflamatoria	Infiltrado	Quimiocinas
 <p>Síndrome de distrés agudo respiratorio Asma Neumonía bacteriana Sarcoidosis</p>	<p>Neutrófilos Eosinófilos, Linfocitos T, Monocitos, Basófilos Neutrófilos Linfocitos T, Monocitos</p>	<p>CXCL8, CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5 CCL2, CCL13, CCL3, CCL11, CCL5 CXCL8, CXCL5 CXCL10</p>
 <p>Glomerulonefritis</p>	<p>Monocitos, Linfocitos T, Neutrófilos</p>	<p>CCL2, CCL5, CXCL10</p>
 <p>Artritis reumatoide Osteoartritis</p>	<p>Monocitos, neutrófilos</p>	<p>CCL3, CCL2, CXCL8, CXCL5 CCL4</p>
 <p>Aterosclerosis</p>	<p>Linfocitos T, Monocitos</p>	<p>CCL2, CCL13, CXCL10</p>
 <p>Enfermedad inflamatoria intestinal</p>	<p>Monocitos, Neutrófilos, Linfocitos T, Eosinófilos</p>	<p>CCL2, CCL3, CCL11, CXCL10, CXCL8</p>
 <p>Soriasis</p>	<p>Linfocitos T, Neutrófilos</p>	<p>CCL2, CXCL10, CXCL9, CXCL2, CXCL8</p>
 <p>Meningitis bacteriana Meningitis Viral</p>	<p>Neutrófilos, Monocitos Linfocitos T, Monocitos</p>	<p>CXCL8, CXCL1, CCL2, CCL3, CCL4 CCL2, CXCL10</p>

1.7.3. Actividad antimicrobiana.

La capacidad del sistema inmune para responder apropiadamente y erradicar las infecciones microbianas depende de los diferentes factores que lo integran. Entre estos factores hay un grupo de pequeñas proteínas o péptidos, cuya expresión y producción es inducida por patógenos o estímulos inflamatorios. Las quimiocinas son parte de este grupo y como se ha señalado anteriormente, su papel es el de reclutar y activar a los leucocitos, por otro lado, están los péptidos catiónicos antimicrobianos (CAMPs, de sus siglas en inglés) que inactivan a las bacterias, hongos y virus invasores. Ambos grupos de moléculas han sido estudiados de manera individual, pero recientemente, se ha descubierto que algunos de sus miembros comparten la actividad de reclutamiento de linfocitos y de inactivación de patógenos. En las plaquetas de conejo y de humano, se sabe que su actividad antimicrobiana se debe a las quimiocinas. Ahora se sabe que existen dos péptidos antimicrobianos, derivados de CXCL7 dentro de las plaquetas. Adicionalmente, se demostró que la quimiocina CXCL7 completa tiene actividad antimicrobiana contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Cryptococcus neoformans* al igual que CXCL4 y CCL5, que adicionalmente tuvieron actividad contra *Candida albicans*.

Diferentes quimiocinas han demostrado tener actividad antimicrobiana ya sea completas, o en péptidos derivados de su estructura primaria. Por ejemplo, se identificó que CXCL8 de manera íntegra no tiene actividad antimicrobiana, pero los péptidos derivados del extremo carboxilo terminal de su estructura primaria tienen actividad en contra de diversas bacterias Gram positivas y Gram negativas, pero no contra levaduras como *C. albicans* (Ver tabla 1.3)[17].

Tabla 1.3 Actividad antimicrobiana de las quimiocinas [18].

Quimiocina		Actividad antimicrobiana
Familia	Miembro	Patógeno
CXC	CXCL1	<i>E. coli, S. aureus</i>
	CXCL2	<i>E. coli, S. aureus</i>
	CXCL3	<i>E. coli, S. aureus</i>
	CXCL4	<i>E. coli, S. aureus, C. neoformans, C. albicans</i>
	CXCL9	<i>E. coli, S. aureus, L. monocytogenes</i>
	CXCL10	<i>E. coli, S. aureus, L. monocytogenes</i>
	CXCL11	<i>E. coli, S. aureus</i>
	CXCL12	<i>E. coli, S. aureus</i>
	CXCL13	<i>E. coli, S. aureus</i>
	CXCL14	<i>E. coli, S. aureus</i>
XC	XCL1	<i>E. coli, S. aureus</i>
CC	CCL1	<i>E. coli, S. aureus</i>
	CCL5	<i>E. coli, S. aureus, C. neoformans, C. albicans</i>
	CCL8	<i>E. coli</i>
	CCL11	<i>E. coli, S. aureus</i>
	CCL13	<i>E. coli, P. aeruginosa</i>
	CCL17	<i>E. coli, S. aureus</i>
	CCL18	<i>E. coli, S. aureus</i>
	CCL19	<i>E. coli</i>
	CCL20	<i>E. coli, S. aureus</i>
	CCL21	<i>E. coli, S. aureus</i>
	CCL22	<i>E. coli, S. aureus</i>
	CCL25	<i>E. coli, S. aureus</i>
	CCL28	<i>P. aeruginosa, S. mutans, K. pneumoniae, S. pyogenes, S. aureus, C. albicans</i>

1.8 TUBERCULOSIS.

La tuberculosis es una enfermedad infecto contagiosa provocada por el microorganismo denominado *Mycobacterium tuberculosis*. La tuberculosis ha estado presente a lo largo de la historia del hombre, actualmente ha recobrado importancia médica debido a que han aparecido cepas resistentes a los antibióticos de primera y segunda línea, además de que suele ser una enfermedad oportunista en pacientes inmunosuprimidos [19].

1.8.1. *Mycobacterium tuberculosis*.

Las bacterias del género *Mycobacterium* tienen forma de bacilo, no producen esporas y no son móviles. Filogenéticamente pertenecen al subgénero de los actinomicetos y en su genoma tienen un alto contenido de secuencias de Guanina Citosina (GC). Su pared celular está constituida principalmente de ácido micólico, que le sirve como fuente de carbono.

Durante el crecimiento de la micobacteria, la composición lípidica de su pared celular varía según la disponibilidad de nutrientes. La consistencia cerosa de la pared celular de la micobacteria le confiere características de hidrofobicidad, resistencia a la abrasión de ácidos, resistencia a algunos antibióticos, además de algunas propiedades inmunológicas

distintivas. Esta característica también se asocia con su lento crecimiento y la capacidad de tomar nutrientes del medio.

A pesar de la similitud entre las especies del género *Mycobacterium*, sólo un poco porcentaje afecta a los organismos vertebrados superiores, el resto sobrevive en el ambiente sin afectar a otros seres vivos. Algunas especies como *M. leprae* o *M. lepraemurium* son incultivables *in vitro*, ya que requieren del medio intracelular para su crecimiento, a diferencia del complejo *M. tuberculosis*.

Dentro del complejo de *M. tuberculosis* las especies patógenas para el humano están representadas principalmente por las especies *M. tuberculosis*, *M. africanum* y *M. canetti*, mientras que *M. bovis* y *M. microti* son patógenas para algunos animales, sin embargo, pueden contagiar al humano.

Al igual que en el resto de los actinomicetos el LPS está presente en la membrana plasmática de *Mycobacterium tuberculosis*, así mismo están presentes proteínas transmembranales que tienen la capacidad de monitorear la concentración de moléculas en el ambiente, así como enzimas metabólicas involucradas en la generación de energía, división celular y replicación de DNA.

La pared celular de *M. tuberculosis* es la responsable de la morfología y estructura del bacilo, su composición es única entre los procariotes, contiene peptidoglicano unido covalentemente al arabinogalactano, que

mediante esterificación se une a cadenas de ácidos grasos de peso molecular variable como el ácido micólico (60 a 90 átomos de carbono). Esta propiedad es variable entre el género *Mycobacterium* lo que la convierte en una herramienta para la identificación de la especie.

La micobacteria posee una pseudo-cápsula externa a la pared celular compuesta de lípidomanano y lípidoarabinomanano específica para cada especie, así como proteínas que están involucradas en el proceso de la formación de la pared celular y porinas hidrófilas que permiten el paso de los nutrientes solubles en agua a través de la pared celular.

La pared celular de la micobacteria carece de la membrana externa típica que distingue a las Gram negativas, sin embargo, la composición lípidica de su pared celular difiere de la composición característica de peptidoglucano que distingue a las Gram positivas, por esta razón el cristal violeta no se fija en la pared celular y las micobacterias apenas parecen fantasmas vistas al microscopio [20].

1.8.2. Tuberculosis en la actualidad.

Según la Organización Mundial de la Salud se dice que en la actualidad, cerca de un tercio de la población mundial está infectada con el bacilo que produce la tuberculosis, de la cual sólo el 5% llega a presentar la enfermedad debido a padecimientos que inmunosuprimen al hospedero, como la infección por el virus del VIH.

Por otro lado, debido al prolongado tiempo de tratamiento con antibióticos que reciben las personas con tuberculosis y que en consecuencia algunos de los enfermos no concluyen el tratamiento, las micobacterias han desarrollado resistencia a los antibióticos, derivando en la aparición de cepas de micobacterias resistentes al tratamiento con isoniazida y rifampicina, denominadas multi-fármaco resistentes o MDR (de sus siglas en inglés) incluso se ha reportado la existencia de cepas super resistentes o XDR (de sus siglas en inglés extensively drug resistance), es decir, que son capaces de resistir al tratamiento con fármacos antituberculosos de segunda línea como la kanamicina [20, 21].

1.8.3. Patogénesis de la tuberculosis en el humano.

La tuberculosis es una enfermedad que se transmite por medio de partículas de aerosol exhaladas por un individuo infectado, por lo que el pulmón es el órgano primario donde se aloja, pero puede infectar cualquier otro órgano. La constitución genética, el estado físico y de salud de las personas, influye en la predisposición al desarrollo de la tuberculosis, por lo tanto, algunos individuos pueden resolver la infección de manera autolimitante, mientras que otros desarrollan la enfermedad debido a alguna deficiencia en su sistema inmune.

La patogénesis de la tuberculosis es el resultado de la interacción entre la virulencia de *M. tuberculosis* y el sistema inmune del hospedero. En un individuo inmunocompetente que no ha tenido contacto previo con el bacilo, la patogénesis se basa en el desarrollo de la inmunidad celular específica que confiere resistencia al organismo y resulta en la hipersensibilidad del tejido a los antígenos de la micobacteria. Las características patológicas de la tuberculosis como los granulomas y la cavitación son el resultado de la hipersensibilidad destructiva del tejido que es parte de la respuesta inmune del hospedero. Debido a que ambos procesos son regulados por las mismas células efectoras, la aparición de hipersensibilidad en el tejido, también significa la adquisición de inmunidad del hospedero.

El desarrollo de la tuberculosis en el humano, comienza una vez que la micobacteria ha sido fagocitada por los macrófagos, a través de la interacción del receptor de manosa del macrófago y los receptores del complemento que reconocen diversos componentes de la pared de *M. tuberculosis*. En el endosoma *M. tuberculosis* es capaz de manipular el pH endosomal y arrestar su maduración, impidiendo la formación del fagolisosoma y permitiendo así la proliferación de la micobacteria. Esta fase primaria de la enfermedad es caracterizada por la proliferación bacilar en los macrófagos alveolares y espacios aéreos. A pesar de la

bacteremia, muchos pacientes permanecen asintomáticos o tienen síntomas moderados parecidos a la gripe común.

El desarrollo de la inmunidad celular ocurre aproximadamente 3 semanas después de la exposición. Los antígenos procesados son llevados hacia los ganglios linfáticos y son presentados a través del MHC II (Major Histocompatibility Complex II, de sus siglas en inglés) por las células dendríticas a los linfocitos T CD4⁺. Bajo la influencia de los macrófagos productores de IL-12, los linfocitos T CD4⁺ secretan citocinas proinflamatorias Th1, como IFN- γ que a su vez facilita la activación de macrófagos.

Los macrófagos también secretan citocinas reguladoras como TNF, para reclutar monocitos y formar el granuloma, además los macrófagos expresan la enzima iNOS (inducible Nitric Oxide Synthase), que es la responsable del aumento de los niveles de óxido nítrico y otras especies reactivas de oxígeno en el sitio de la infección. En consecuencia, el desarrollo de una respuesta celular tipo Th1 es esencial para la protección del hospedero. Por lo tanto, la infección primaria con *M. tuberculosis* induce hipersensibilidad y resistencia, además de cicatrices que pueden contener bacilos viables por mucho tiempo, quizás el tiempo de vida del hospedero [19, 21].

1.9 MODELO MURINO DE INFECCIÓN CON TUBERCULOSIS.

En el campo científico existen diferentes modelos animales para evaluar la respuesta inmune en contra de la infección con tuberculosis, como la infección experimental en ratones, conejos y cobayos. Actualmente el empleo de ratones de la cepa BALBc ha sido una herramienta importante en el estudio de esta enfermedad infecciosa debido a la poca variabilidad en la respuesta inmune y de la variación genética de la cepa. La vía de infección también puede influir en el tipo de respuesta inmune, por lo que la infección intratraqueal asegura que la mayoría de las micobacterias queden depositadas en el pulmón. Por otro lado, para asegurar la infección y el desarrollo de la tuberculosis, se emplean dosis altas de micobacterias 1×10^6 y 2.5×10^5 , esto debido a que el ratón no es un hospedero natural de las micobacterias.

El modelo de infección experimental con tuberculosis en el ratón, se caracteriza por tener dos fases: la primera o fase temprana en la que predomina la respuesta celular tipo Th1 y la segunda o fase tardía en la que la respuesta celular se caracteriza por la presencia de linfocitos Th2 [21, 22].

1.9.1. Fase temprana.

La fase temprana de la infección se caracteriza por la presencia de infiltrado inflamatorio en la zona peribronquial y perivascular de los pulmones. El infiltrado inflamatorio está formado principalmente por macrófagos y linfocitos. El cúmulo de macrófagos y linfocitos T forman una estructura ovoide o circular denominada granuloma, característica de la histopatología de la tuberculosis, esta estructura es la encargada de delimitar el crecimiento de la micobacteria en los pulmones. Los granulomas aparecen a partir de la segunda semana de infección y en el día 21 alcanzan su máxima madurez.

Durante la fase temprana de la infección, los linfocitos T secretan citocinas proinflamatorias como IFN- γ e IL-2 características de la respuesta celular tipo Th1. La secreción de IFN- γ activa los macrófagos e induce la producción de la enzima iNOS, que es importante para la destrucción de las micobacterias, mientras que IL-2 induce la proliferación linfocitaria lo que permite el control temporal de la infección. Por otro lado los macrófagos producen IL-1 y TNF- α que en conjunto estimulan la expresión de IL-2 y su receptor, además de la activación de macrófagos, permitiendo el control temporal de la infección [21].

1.9.2. Fase avanzada o progresiva.

Esta fase se presenta a partir de la octava semana de infección y se caracteriza por el incremento de micobacterias, así como de las áreas neumónicas, necrosis y fibrosis intersticial. En esta fase de la infección, los linfocitos T secretan citocinas tipo Th2 como las interleucinas 4, 5, 6, 10 y 13. La secreción de IL-4 induce la diferenciación de linfocitos B productores de anticuerpos, que no se consideran protectores, mientras que en conjunto con IL-10 y la IL-13, neutraliza la respuesta inflamatoria Th1. Debido a la aparición de los linfocitos Th2 se considera que el efecto protector de los linfocitos Th1 es disminuido y por lo tanto hay una desviación de la respuesta celular hacia una respuesta humoral, contribuyendo al progreso de la enfermedad. A su vez, los macrófagos sufren cambios morfológicos que afectan su respuesta debido a la gran cantidad de micobacterias que fagocitan y a la presencia de vacuolas con material bacteriano, principalmente lipoarabinomano, un constituyente de la pared celular de las micobacterias, que es muy eficiente en la inactivación de los macrófagos. Además los macrófagos vacuolados disminuyen la producción de IL-1, TNF- α y de la iNOS, así como incrementan la producción de citocinas antiinflamatorias como la IL-10 y el TGF- β , este último induce la proliferación de fibroblastos y la síntesis de colágeno, lo que genera fibrosis en el pulmón.

La inclinación de la respuesta celular hacia una respuesta Th2 favorece el desarrollo de áreas neumónicas en el pulmón y culmina con la muerte del ratón debido a una insuficiencia respiratoria [21].

1.10 LAS QUIMIOCINAS Y LA TUBERCULOSIS.

Como se ha descrito anteriormente, cuando el pulmón es infectado por *Mycobacterium tuberculosis*, diversas células del sistema inmune migran en el pulmón hacia el sitio donde ocurre la infección para formar el granuloma. El granuloma es una estructura que se encarga de delimitar la infección y la propagación del bacilo, pero en la actualidad se desconoce el mecanismo preciso por el cual se forma o se mantiene, sin embargo, se ha descrito que las quimiocinas juegan un papel importante en el reclutamiento celular.

En este sentido, sabemos que el tráfico leucocitario, es un proceso comprendido por diferentes pasos incluyendo el rodamiento, adhesión y migración a través del endotelio hacia los tejidos. Este proceso, es regulado por diferentes moléculas como las adhesinas, integrinas, selectinas, las quimiocinas y sus receptores. Las quimiocinas son una familia de moléculas que actúan como señales constitutivas para la formación de tejidos, así como actúan de manera inducible, en

respuesta al estrés fisiológico como el estímulo inflamatorio, como podría ser una infección.

Diversos estudios se han centrado en analizar la participación de las quimiocinas y sus receptores en la tuberculosis, se ha encontrado que en los macrófagos alveolares de pacientes enfermos de tuberculosis hay una elevada expresión de CCL2, CCL3 y CCL5, comparado con la expresión en monocitos de sangre periférica de estos pacientes. Por otra parte, en el modelo murino se ha reportado la expresión de CCL2, CCL3, CCL7, CCL12, CXCL2 y CXCL10 en el pulmón de ratones infectados, así como en cultivos de macrófagos estimulados con diferentes cepas virulentas de *M. tuberculosis*. También se ha demostrado la expresión de CXCL8 y CCL2 en infecciones *in vitro* de la línea celular A549 (células del endotelio alto de pulmón). Las células murinas pleurales del mesotelio, estimuladas con BCG e IFN- γ recombinante, expresan CCL2 y CCL4 en una manera dosis dependiente. Los granulocitos obtenidos de sangre de pacientes con tuberculosis producen CXCL8 y CXCL1 en respuesta al lipidoarabinomano de *M. tuberculosis*. En células epiteliales bronquiales de pacientes con tuberculosis IFN- γ , estimula la expresión y producción de CXCL9, CXCL10 y CXCL11. En la caracterización de la expresión *in vivo* de las quimiocinas, se ha demostrado que en lavados bronquioalveolares hay niveles elevados de

CCL2, CCL5, CCL7, CCL12, CXCL8 y CXCL10 en pacientes con tuberculosis, y la sobre-expresión de CCL5 puede estar relacionada con el número de células presentes en los lavados bronquioalveolares.

La coinfección de *M. tuberculosis* y VIH incrementa la expresión en monocitos de CCR5 y CXCR4 en respuesta a *M. tuberculosis*. Así mismo, se cree que esto incrementa la infección por el virus. En estudios en los que se estimula sangre completa con lipidoarabinomano de *M. tuberculosis* la expresión de CCR5 y CXCR4 aumenta. Por otro lado, la coinfección con VIH disminuye la producción de CCL3 y CCL5 en PBMC (monocitos de sangre periférica, de sus siglas en inglés), aumentando el número de receptores libres, lo que permite al virus unirse a la célula e interferir en el reclutamiento leucocitario necesario para la formación del granuloma y el control del crecimiento de la micobacteria [23].

2. ANTECEDENTES.

En el laboratorio donde se desarrollo este trabajo, se lleva a cabo el estudio de la biología de las quimiocinas, particularmente se estudia a la quimiocina CCL13, denominada originalmente MCP-4 (de sus siglas en inglés, Monocyte Chemoattractant Protein 4). La quimiocina CCL13 está conformada por 75 aminoácidos y tiene un peso molecular de 8.6 kDa aproximadamente; tiene afinidad sobre los receptores CCR1, CCR2 y CCR3. Ejerce su actividad quimioatrayente sobre linfocitos T activados, monocitos, eosinófilos y basófilos [24].

Para definir las secuencias de péptidos involucradas en la función de CCL13, se sintetizaron diferentes péptidos a partir de su estructura primaria. Con base a que CCL13 ha sido relacionada con enfermedades alérgicas inflamatorias como el asma y la rinitis alérgica, se probaron los diferentes péptidos sintéticos, con el fin de caracterizar su papel en la modulación de las funciones mediadas por quimiocinas *in vivo* e *in vitro*. Los resultados de este trabajo demostraron que un péptido denominado CDIP-2 (de sus siglas en inglés, Chemokine Derived Inhibitory Peptide 2) tiene actividad antagonista de la quimiotaxis *in vitro* utilizando líneas celulares monocíticas. Además CDIP-2 redujo el infiltrado perivascular y peribronquial, y la sobreproducción de moco en un modelo murino de

inflamación alérgica pulmonar inducido por ovoalbúmina. Así mismo tiene efecto antagonista de la inflamación en otros modelos de ratón, como el de peritonitis y el de bolsa de aire [25].

Por otra parte, se ha demostrado que las quimiocinas tienen actividad antimicrobiana, y CCL13 es el único miembro de la subfamilia de las quimiocinas MCP que ha demostrado tener dicha propiedad. Por lo que, para determinar los residuos de aminoácidos involucrados en la actividad antimicrobiana de CCL13, se probaron los diferentes péptidos sintéticos, contra diferentes cepas bacterianas incluyendo *Pseudomonas aeruginosa*. Como resultado de este trabajo se observó que un péptido denominado CDAP-4 (de sus siglas en inglés, Chemokine Derived Antimicrobial Peptide 4), disminuyó la viabilidad *P. aeruginosa in vitro*, utilizando el método de cuantificación de ATP, por luminiscencia y el número de unidades formadoras de colonias (UFCs). Además, mediante microscopía electrónica de transmisión, se observaron interrupciones en la pared celular y vaciamiento del contenido intracelular de las bacterias, después de ser tratadas con el péptido. Mediante estudios de modelación por computadora, se observó que CDAP-4 tiene una distribución de carga positiva, una característica determinante para la actividad microbicida de los péptidos antimicrobianos naturales[26].

La evidencia anterior sugiere que CDIP-2, y CDAP-4 pueden emplearse como agentes terapéuticos en procesos inflamatorios asociados a infección.

3. JUSTIFICACIÓN.

La resistencia a los diferentes fármacos disponibles en el mercado para el tratamiento de la tuberculosis, los efectos adversos derivados del uso prolongado de los mismos y el aumento en la susceptibilidad de los pacientes inmunosuprimidos para desarrollar la enfermedad, ha provocado que la tuberculosis resurja como una enfermedad de importancia mundial. Por otro lado, en la patología de la tuberculosis la neumonía es una de sus principales complicaciones, que puede llegar a ser mortal. Así mismo, la aparición de cepas resistentes a los fármacos de primera y segunda línea, ha llevado a la comunidad científica al desarrollo de nuevos agentes terapéuticos para el tratamiento de la tuberculosis [19-21].

En este trabajo se plantea la utilización del péptido inhibitorio CDIP-2, para disminuir el infiltrado inflamatorio asociado a la infección por *M. tuberculosis*, en combinación con el péptido antimicrobiano CDAP-4 para controlar el crecimiento de la micobacteria en el pulmón, en un modelo murino de infección con tuberculosis.

4. HIPÓTESIS.

La administración combinada de los péptidos CDIP-2 y CDAP-4 en un modelo murino de infección con *Mycobacterium tuberculosis* disminuirá el infiltrado inflamatorio y el número de micobacterias viables.

5. OBJETIVO GENERAL.

Estudiar el efecto producido por la administración de los péptidos CDIP-2 y CDAP-4 en un modelo murino de infección con *Mycobacterium tuberculosis*.

5.1 Objetivos particulares.

- a) Evaluar el efecto en la supervivencia de los ratones infectados con la cepa experimental *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, tratados con CDIP-2 y CDAP-4.
- b) Evaluar el efecto en la supervivencia de los ratones infectados con la cepa resistente a fármacos *Mycobacterium tuberculosis* MDR, tratados con CDIP-2 y CDAP-4.
- c) Determinar el efecto de la administración de CDIP-2 y CDAP-4 sobre el número de UFCs en el pulmón de los ratones infectados con *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv.

- d) Determinar el efecto de la administración de CDIP-2 y CDAP-4 sobre el número de UFCs en el pulmón de los ratones infectados con *Mycobacterium tuberculosis* MDR.
- e) Evaluar el efecto de la administración de CDIP-2 y CDAP-4, en el infiltrado inflamatorio del pulmón de ratón infectado con *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv.
- f) Evaluar el efecto de la administración de CDIP-2 y CDAP-4, en el infiltrado inflamatorio del pulmón de ratón infectado con *Mycobacterium tuberculosis* MDR.
- g) Cuantificar la citocina tipo Th1 IFN- γ , y la citocina tipo Th2 IL-4, en el suero de los ratones infectados con *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv.
- h) Cuantificar la citocina tipo Th1 IFN- γ , y la citocina tipo Th2 IL-4, en el suero de los ratones infectados con *Mycobacterium tuberculosis* MDR.

6. METODOLOGÍA.

6.1 Preparación de las micobacterias.

Se utilizaron micobacterias congeladas a -70°C . Para reactivarlas se disgregaron y suspendieron en medio de cultivo Middlebrook líquido y se incubaron en agitación durante 14 días a 37°C , de acuerdo a los procedimientos de seguridad del laboratorio de patología experimental del Instituto Nacional de Nutrición. Después de haber crecido las micobacterias, se contaron, y se realizó el ajuste necesario para obtener 250,000 bacterias en $100\mu\text{L}$ de vehículo. Las cepas de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv y MDR fueron proporcionadas por el laboratorio del Dr. Rogelio Hernández del Instituto Nacional de Nutrición Salvador Zubirán.

6.2 Infección pulmonar murina con *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv y MDR.

El procedimiento de infección se llevo a cabo en el bioterio del Instituto Nacional de Nutrición, de acuerdo a los procedimientos de seguridad del mismo. Antes de la infección, los ratones fueron sedados con un anestésico inhalatorio comercial (Sevorane, Laboratorios Abbott ®). Una vez sedado el ratón, se le introdujo una cánula a través de la tráquea

para depositar la suspensión micobacteriana en los pulmones. Cada ratón fue infectado con 100 μ L de una suspensión con 2500 UFCs/ μ L.

6.3 Diseño experimental.

El modelo animal utilizado en este trabajo, se caracteriza por presentar dos fases de la enfermedad: la primera o fase temprana en que la inflamación induce la formación de granulomas y la segunda o fase avanzada que difiere por la presencia de neumonía en todo el tejido.

Para realizar este experimento, se utilizaron 80 ratones machos, de 4-6 semanas de edad, de la cepa BALBc obtenidos del Instituto Nacional de Nutrición. La mitad de los ratones fueron infectados con *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv y el resto fueron infectados con *Mycobacterium tuberculosis* MDR. De cada uno de los grupos de ratones, 10 fueron tratados únicamente con el vehículo (solución salina), 10 fueron tratados con CDIP-2 a una concentración de 50 μ g/ μ L, a otros 10 se les administró CDAP-4 a una concentración de 50 μ g/ μ L, y otros 10 fueron tratados con una combinación de los péptidos CDIP-2 y CDAP-4, a una concentración de 50 μ g/ μ L cada uno.

A cada ratón le fueron administradas 5 dosis del tratamiento correspondiente cada 72 horas durante 12 días por la vía intratraqueal (IT). Al final del tratamiento los ratones fueron sacrificados y disectados para llevar a cabo el análisis experimental correspondiente. Todas las

muestras de tejidos y sangre fueron almacenadas a -70°C , excepto aquellos utilizados para histología. Todos los ratones fueron tratados bajo condiciones de esterilidad y seguridad, en el bioterio del Instituto Nacional de Nutrición. En el siguiente esquema se resume el protocolo empleado para el desarrollo de este trabajo:

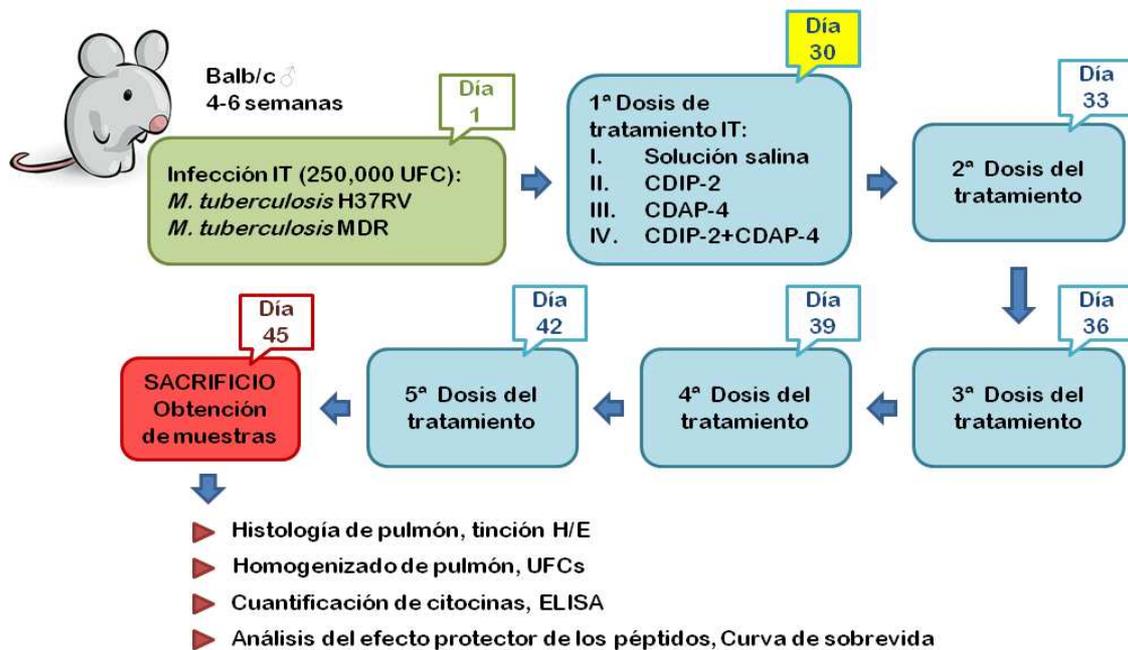


Figura 6.1 Esquema resumido de la estrategia experimental. En el primer día los ratones fueron infectados con la cepa H37Rv o MDR; 30 días después se inició el tratamiento vía IT con CDIP-2, CDAP-4 o Solución Salina. El tratamiento se administró cada tercer día, y en el día 15 los ratones fueron sacrificados para el análisis experimental.

6.4 Análisis histológico del pulmón de ratón.

Para evaluar el efecto de los péptidos sobre el infiltrado inflamatorio debido a la infección con *Mycobacterium tuberculosis*, después de sacrificado el ratón, se extrajo un pulmón y se preservó en paraformaldéhidro al 4%, posteriormente fue embebido en parafina para hacer los cortes en el micrótopo. La tinción utilizada para el análisis histológico fue Hematoxilina-Eosina (HE). Después de realizados los cortes se realizó el análisis morfométrico mediante microscopia simple y la herramienta "Measure" del programa de cómputo ImageJ v.1.44®. El análisis morfométrico consistió en medir la superficie total del corte histológico de pulmón, el cual se considero como el 100% del área, posteriormente el corte fue dividido en cuadrantes del mismo tamaño y en cada uno se midió la superficie de las áreas neumónicas, es decir, las áreas del tejido afectadas por la inflamación severa debida a la tuberculosis. Finalmente se sumaron las superficies neumónicas, se hizo la relación de estas respecto al total de la superficie del corte histológico y esto se considero como el porciento de área neumónica.

6.5 Cuantificación de IFN- γ e IL-4 en suero.

La cuantificación de las citocinas IL-4 e IFN- γ , fue realizada mediante un ensayo de ELISA tipo sándwich utilizando kits comerciales de la marca BioLegend. Cada ensayo fue estandarizado de acuerdo a la curva de calibración indicada en el inserto del kit comercial. Cada una de las muestras fue determinada por duplicado.

6.6 Curva de sobrevivencia de los ratones.

Esta curva se realizó registrando el deceso de los ratones cada día durante el periodo de administración del tratamiento con CDIP-2 y CDAP-4.

6.7 Cuantificación de Unidades Formadoras de Colonias en pulmón.

Para determinar el efecto sobre las UFCs de pulmón, se tomo una parte del pulmón congelado y se disgrego en 2mL de PBS con Tween al 10% de concentración. A partir de este tubo homogenizado (concentrado) se tomaron 50 μ L de muestra y se realizaron 4 diluciones seriadas de 1 en 10 partes. Posteriormente se pusieron 10 μ L de cada concentrado y cada dilución, sobre placas con medio Middlebrook solidificado con agar como se muestra en la figura 6.2. Cada concentrado y dilución de cada

muestra se plaqueo por duplicado. Finalmente las placas fueron incubadas a 37°C durante 14 días, tiempo después del cual se realizó el conteo de UFC's con un microscopio simple.

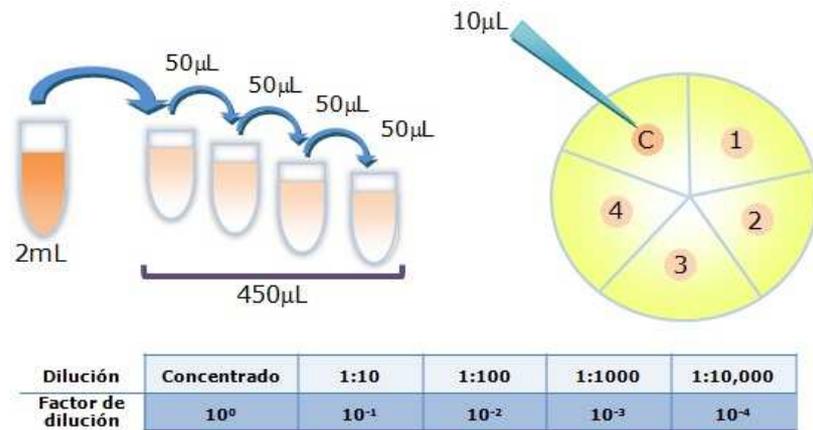


Figura 6.2 Esquema del procedimiento para la preparación de las diluciones del homogenizado de pulmón para la cuantificación de UFCs.

Para determinar el número de UFCs, se utilizó el método de conteo en placa, y el siguiente algoritmo:

$$UFCs_{total} = No. Colonias_{placa} \times 10^6 \times Factor\ de\ dilución \times 2\ pulmones$$

7. RESULTADOS

7.1 La administración de la combinación de los péptidos CDIP-2 y CDAP-4 tiene un efecto en la sobrevivencia del ratón infectado con *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv.

Para determinar si la administración de CDIP-2 o CDAP-4 mejora la resistencia y sobrevivencia de los ratones, se registró el número de ratones muertos durante el tratamiento con los péptidos y se realizó una curva con el porcentaje de sobrevivencia.

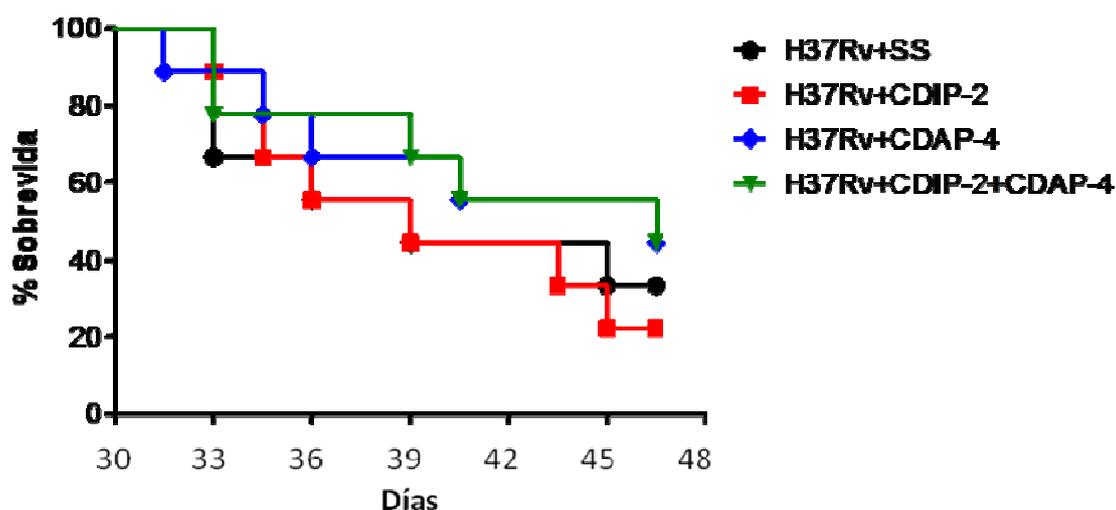


Figura 7.1 Curva de sobrevivencia de los ratones infectados con la cepa H37Rv de *M. tuberculosis*. Resultados representativos de un experimento. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba Chi cuadrada (X^2).

En la figura 7.1 se puede observar que sobrevivió el 44% de los ratones tratados con la combinación de CDIP-2 y CDAP-4, al igual que los

ratones tratados con CDAP-4, respecto al grupo control del cual sobrevivió el 33% al final del experimento. Además se observó que solo sobrevivió un 22% de los ratones tratados con CDIP-2.

7.2 La administración de CDIP-2 y CDAP-4 disminuye el número de UFCs en los pulmones del ratón infectado con *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv.

Para evaluar el efecto antimicrobiano de CDIP-2 y CDAP-4, en las UFCs de los pulmones de ratón infectados con *M. tuberculosis* H37Rv, se homogenizaron los pulmones infectados y mediante la técnica de conteo en placa se determinó el número de UFCs.

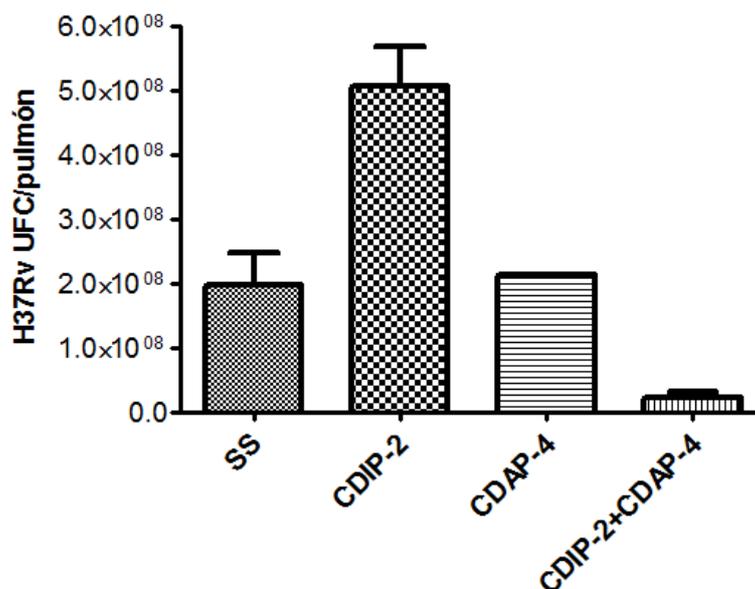


Figura 7.2 UFCs totales de pulmón infectado con *M. tuberculosis* H37Rv. Gráfico representativo de un experimento, cada muestra se

sembró por duplicado. El análisis estadístico se realizó mediante una prueba de ANOVA, con una $p < 0.05$.

En la figura 7.2 se puede observar, que los ratones tratados con la combinación de CDIP-2 y CDAP-4, hay un crecimiento de 2×10^7 UFCs, en comparación a los ratones tratados con solución salina, en los cuales el crecimiento fue aproximadamente de 1.98×10^8 UFCs, lo que representa una disminución en el número de micobacterias viables. Por otro lado, en los ratones tratados con CDAP-4 no hubo diferencia en el número de UFCs respecto a los ratones del grupo control, y en los ratones tratados con CDIP-2 hay un aumento en el número de UFCs.

7.3 La administración de CDIP-2 y CDAP-4 disminuye el infiltrado inflamatorio en los pulmones del ratón infectado con *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv.

Para evaluar el efecto de CDIP-2 y CDAP-4 en el infiltrado inflamatorio de los pulmones de ratón infectados con *M. tuberculosis* H37Rv se realizaron cortes histológicos de pulmón y se tiñeron por la técnica de Hematoxilina-Eosina, posteriormente los tejidos fueron analizados mediante el software ImajeJ v.1.44® para estimar el porcentaje de tejido afectado por la neumonía.

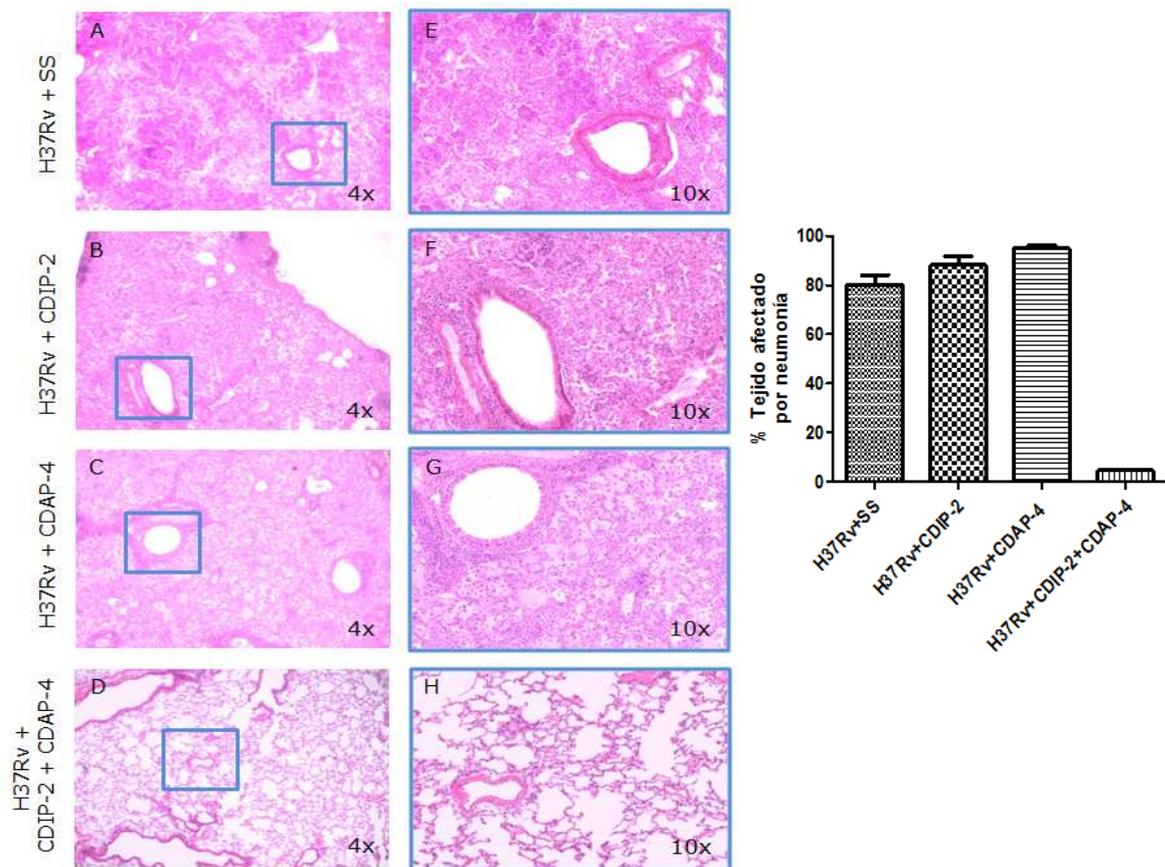


Figura 7.3 CDIP-2 y CDAP-4 tienen un efecto sobre el infiltrado inflamatorio del pulmón infectado con *M. tuberculosis* H37Rv. Micrografías representativas de un experimento, vistas con el objetivo 4x (A, B, C, D) y 10x (E, F, G, H). El porcentaje de tejido afectado por neumonía se obtuvo del promedio de n=4 para SS, CDIP2+CDAP-4; n=3 para CDIP-2 y CDAP-4. El análisis estadístico se realizó mediante una prueba de ANOVA con una $P < 0.05$.

En la figura 7.3 A, B, C y D se puede observar que en los pulmones de los ratones tratados con la combinación de CDIP-2 y CDAP-4 hay una menor proporción de tejido afectado con neumonía, en comparación con el grupo de ratones tratados con solución salina. Esto se pudo

corroborar al hacer el gráfico del por ciento de áreas neumónicas de cada grupo; en dicho gráfico se puede observar que los ratones tratados con la combinación de CDIP-2 y CDAP-4 tienen un 4.7% de afectación por neumonía a diferencia de los ratones tratados con solución salina, en los que el por ciento de área neumónica es del 80%. En cuanto a los ratones tratados con CDIP-2 y los ratones tratados con CDAP-4 no se observo una diferencia significativa en la disminución del infiltrado inflamatorio respecto al grupo control.

7.4 El tratamiento con los péptidos CDIP-2 y CDAP-4 no modifico la producción de las citocinas IFN- γ e IL-4 en el suero de ratones infectados con *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv.

Para determinar si la administración de CDIP-2 y CDAP-4 tienen efecto en la producción de las citocinas IL-4 e IFN- γ , se utilizó el ensayo de ELISA para cuantificar estas citocinas en el suero de los ratones infectados con *M. tuberculosis* H37Rv.

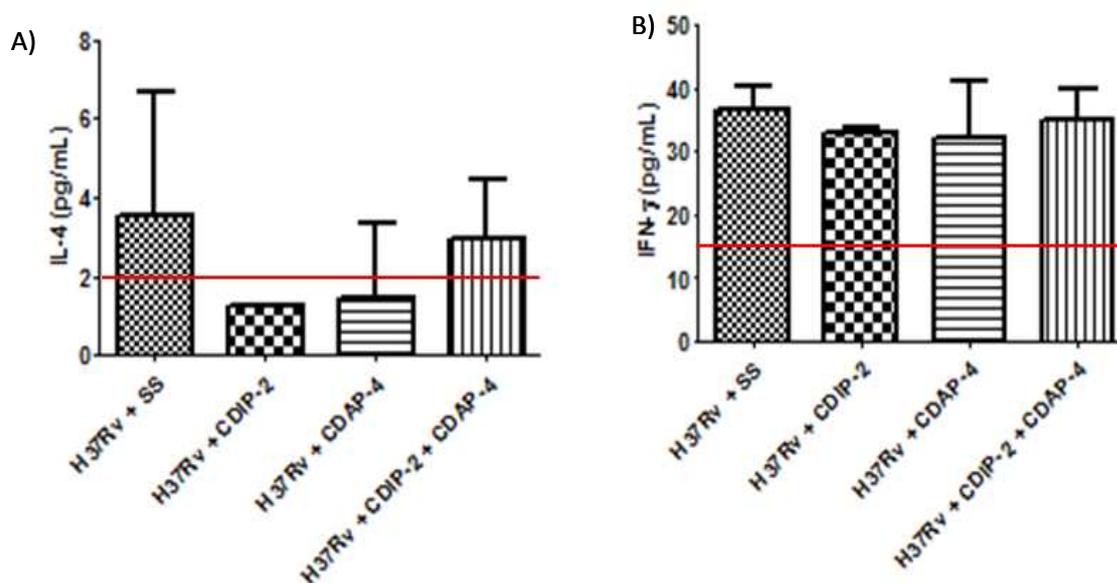


Figura 7.4 Efecto de la aplicación de CDIP-2 y CDAP-4 en la producción de las citocinas IFN- γ e IL-4. Gráfico de los resultados representativos de un experimento. A) Concentración sérica de IL-4, B) Concentración sérica IFN- γ . El análisis estadístico se realizó mediante la prueba de ANOVA y una $p < 0.05$, la línea horizontal roja, representa el límite de detección para cada citocina (ver apéndice I).

En la figura 7.4 se puede observar que para los ratones tratados con la combinación de CDIP-2 y CDAP-4, los tratados con CDIP-2, los tratados con CDAP-4, no se encontró una diferencia significativa respecto de los ratones tratados con solución salina, debido a que el método utilizado no fue lo suficientemente sensible para determinarla. Por otro lado, se pudo cuantificar IFN- γ en el suero de los ratones infectados con H37Rv, sin embargo, no se detectaron diferencias entre los ratones tratados con la combinación de CDIP-2 y CDAP-4, los tratados con CDIP-2 y los que

recibieron CDAP-4 como tratamiento, con respecto al grupo de ratones que únicamente se les administró solución salina.

7.5 La administración de la combinación de los péptidos CDIP-2 y CDAP-4 tiene un efecto en la supervivencia del ratón infectado con *Mycobacterium tuberculosis* MDR.

Al igual que en los ratones infectados con *M. tuberculosis* H37Rv, se registró el número de ratones muertos debido a la infección con *M. tuberculosis* MDR durante la administración de los diferentes tratamientos y hasta la conclusión de los mismos.

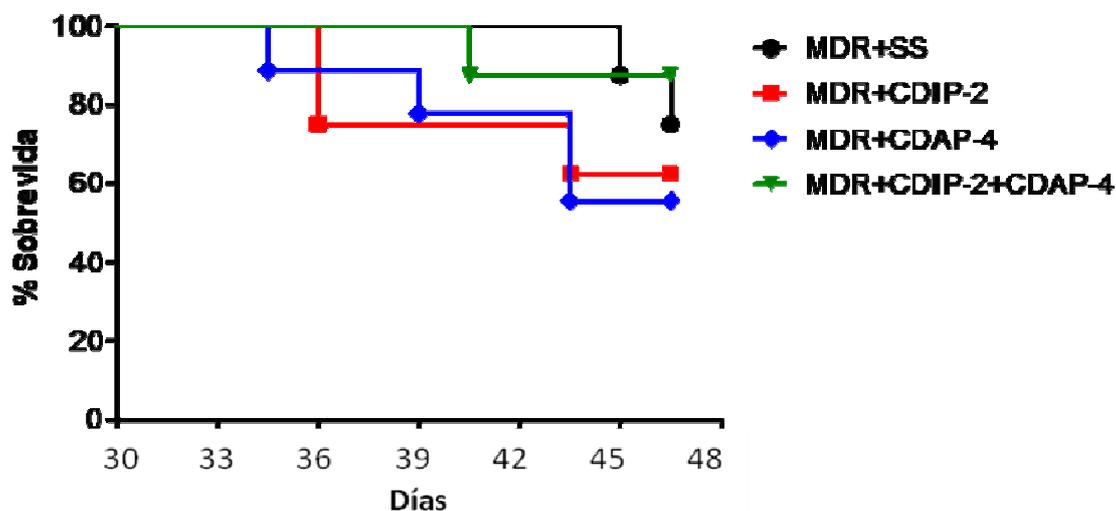


Figura 7.5 Curva de supervivencia de los ratones infectados con la cepa H37Rv de *M. tuberculosis*. Resultados representativos de un experimento. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba Chi cuadrada (X^2).

En la figura 7.5 se puede observar que al final del experimento sobrevivió el 88% de los ratones tratados con CDIP-2 y CDAP-4, mientras que del grupo control sobrevivió el 75%. Respecto a los ratones tratados con CDIP-2 y los tratados con CDAP-4 sobrevivió el 56%.

7.6 La administración conjunta de CDIP-2 Y CDAP-4 disminuye el número de UFCs en los pulmones del ratón infectado con *Mycobacterium tuberculosis* MDR.

El número de micobacterias viables se determinó utilizando el método de conteo en placa de UFCs de la misma manera que se utilizó para determinar las UFCs viables de los ratones infectados con *M. tuberculosis* H37Rv.

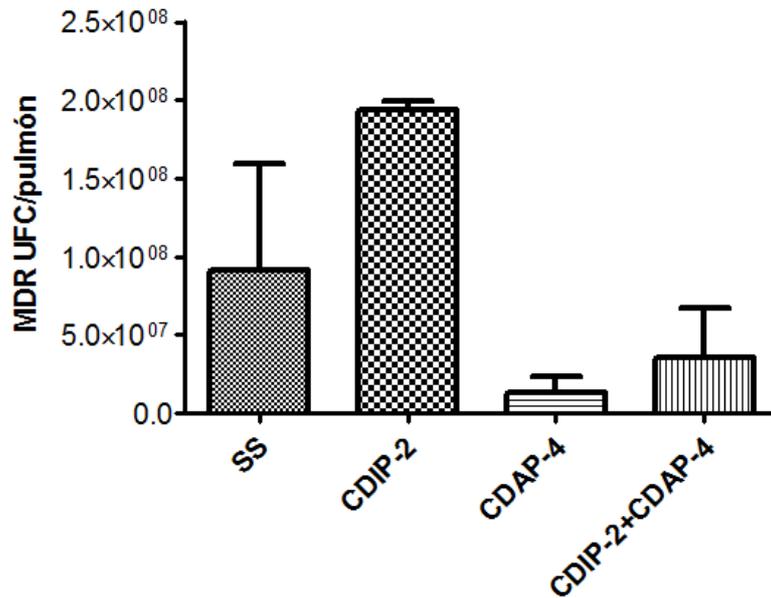


Figura 7.6 UFCs totales de pulmón infectado con *M. tuberculosis* H37Rv. Gráfico representativo de un experimento, cada muestra se sembró por duplicado. El análisis estadístico se realizó mediante una prueba de ANOVA, con una $p < 0.05$.

En la figura 7.6 se puede observar que los ratones tratados con la combinación de CDIP-2 y CDAP-4, y los tratados únicamente con CDAP-4 tienen 3.6×10^7 y 1.3×10^7 UFCs respectivamente, en comparación con los ratones tratados con solución salina cuyo número de UFCs fue cercano a 9.1×10^7 . Por otro lado, crecieron 1.9×10^8 UFCs en el homogenizado de pulmón de los ratones tratados con CDIP-2, es decir, el doble de los ratones tratados con solución salina.

7.7 La administración de CDIP-2 Y CDAP-4 disminuye el infiltrado inflamatorio en los pulmones de ratón infectado con *Mycobacterium tuberculosis* MDR.

Se realizó la tinción de Hematoxilina-Eosina para analizar los cortes histológicos del pulmón con tuberculosis, posteriormente mediante el programa de cómputo ImajeJ v.1.44® se determinó el porcentaje de área neumónica.

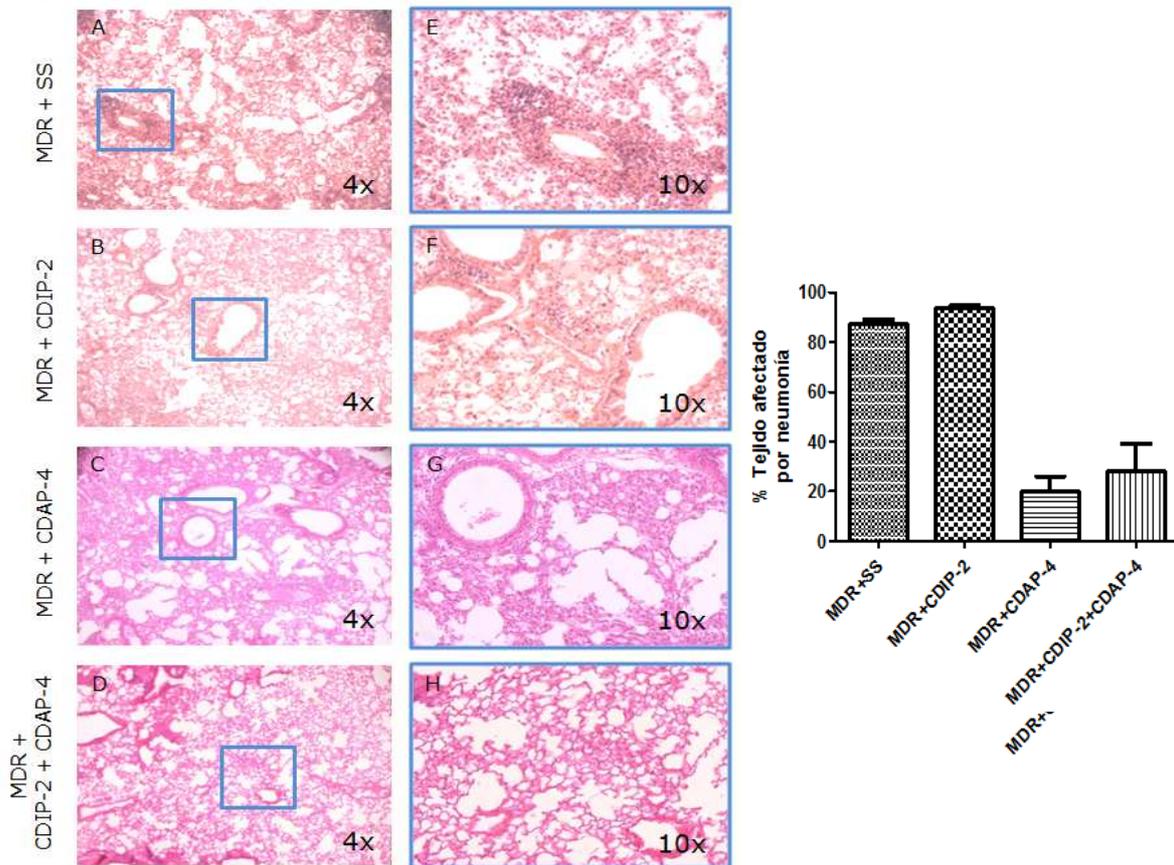


Figura 7.7 CDIP-2 y CDAP-4 tienen un efecto sobre el infiltrado inflamatorio del pulmón infectado con *M. tuberculosis* MDR. Micrografías representativas de un experimento, vistas con el objetivo 4x (A, B, C, D) y 10x (E, F, G, H). El porcentaje de tejido afectado por neumonía, se obtuvo del promedio de n=4 para CDAP-4 y CDIP-2 + CDAP-4; n=5 para CDIP-2 y SS. El análisis estadístico se realizó mediante una prueba de ANOVA y una $P < 0.05$.

En la figura 7.7 A, B, C y D se puede observar que el tejido de pulmón afectado por la neumonía, dentro de los cuadros azules y en la

ampliación de 10X se puede observar la inflamación peribronquial en los diferentes tratamientos, por lo que se realizó el análisis morfométrico para poder comparar el efecto de los péptidos en el infiltrado inflamatorio. En el gráfico de la figura 7.7 se puede observar que los ratones tratados con la combinación de los péptidos CDIP-2 y CDAP-4 y los ratones tratados solamente con CDAP-4 presentan 30 y 20 % de áreas neumónicas, respectivamente, 2 veces menos en comparación con el grupo control que presentó un 90% de áreas neumónicas. El péptido CDIP-2 presentó aproximadamente un 90% de áreas neumónicas en el tejido.

7.8 La aplicación de la combinación de los péptidos CDIP-2 y CDAP-4 no tiene efecto en la producción de las citocinas IFN- γ e IL-4 en el suero de ratones infectados con *Mycobacterium tuberculosis* MDR.

Para determinar el efecto en la producción de las citocinas IL-4 e IFN- γ en los ratones infectados con *M. tuberculosis* MDR, se realizó la cuantificación de estas citocinas en suero.

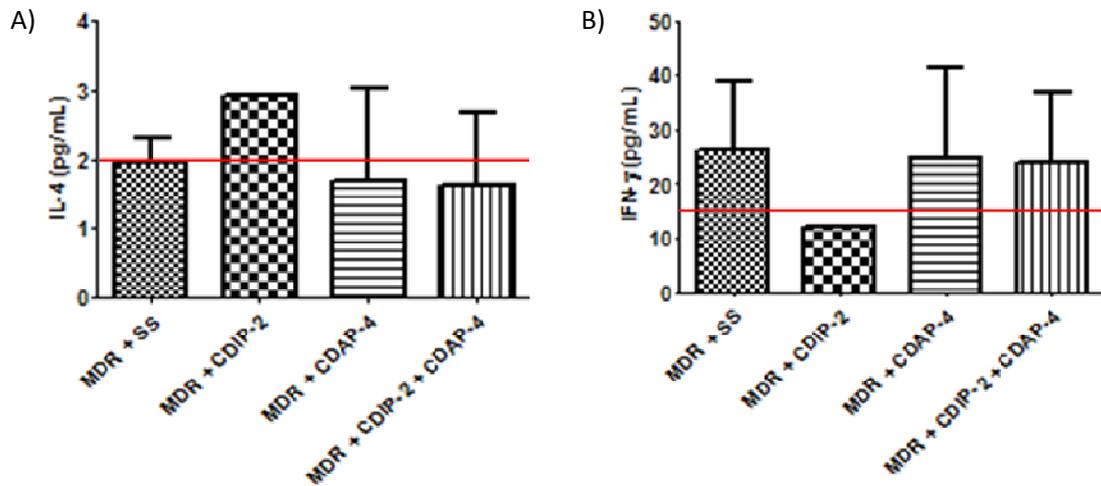


Figura 7.8 Efecto de la aplicación de CDIP-2 y CDAP-4 en la producción de las citocinas IFN- γ e IL-4. Gráfico de los resultados representativos de un experimento. A) Concentración sérica de IL-4, B) Concentración sérica IFN- γ . El análisis estadístico se realizó mediante la prueba de ANOVA y una $p < 0.05$.

En la figura 7.8 A y B se puede observar que no existe una diferencia significativa en la producción de IL-4 e IFN- γ (ver apéndice I) en los ratones infectados, muy probablemente, porque el método de cuantificación no fue lo suficientemente sensible para poder determinar una diferencia en la producción de estas citocinas, en los ratones tratados con CDIP-2 y CDAP-4, respecto a los tratados con solución salina.

8. DISCUSIÓN

La producción de mediadores inflamatorios en la infección por *M. tuberculosis*, en ocasiones resulta en la exacerbación de la inflamación y se produce neumonía, que puede llegar a ser mortal [22], por ello es importante el desarrollo de nuevas terapias, que por un lado ayuden a disminuir el infiltrado inflamatorio en los pacientes con neumonía, y por otro ayuden a disminuir el número de micobacterias viables.

En el presente trabajo se analizaron dos modelos de infección para evaluar el efecto de la administración de la combinación de CDIP-2 y CDAP-4, un grupo de ratones infectados con la cepa experimental *M. tuberculosis* H37Rv y otro grupo de ratones infectados con la cepa resistente a fármacos *M. tuberculosis* MDR obtenida de un aislado clínico. Inicialmente, en los resultados obtenidos para el grupo de ratones tratados con el péptido CDIP-2, infectados con la cepa H37Rv y los infectados con la cepa MDR, no hubo diferencias significativas en la cantidad de infiltrado inflamatorio respecto a los ratones tratados con solución salina. En experimentos previos se demostró que CDIP-2 tiene actividad antagonista en la inflamación [25], por lo que los resultados de este trabajo sugieren que la actividad antagonista CDIP-2 sobre receptores de quimiocina como CCR1 CCR2 y CCR3, pudiera disminuir el reclutamiento de los linfocitos T o monocitos al sitio donde ocurre la

infección. El resultado de esta inhibición, afectaría la maduración del granuloma y por lo tanto, el control sobre el crecimiento de las micobacterias; intrínsecamente se observó un aumento en el número de UFCs en los ratones infectados con la cepa H37Rv y en los infectados con la cepa MDR.

En los ratones infectados con la cepa MDR y tratados con CDAP-4, se obtuvieron aproximadamente la mitad del número de UFCs respecto al grupo control, y en el caso de los ratones infectados con la cepa H37Rv el número de UFCs fue casi 10 veces menos comparado con el grupo control. En experimentos previos realizados en el laboratorio, se describió la actividad antimicrobiana *in vitro* de CDAP-4 con cepas experimentales y cepas obtenidas de aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* [26]. Cabe mencionar que en el presente trabajo, se evaluó por primera vez la actividad antimicrobiana de CDAP-4 en un modelo *in vivo*, por lo que resulta interesante que en los resultados obtenidos, se observa que CDAP-4, conserva su actividad en el modelo experimental utilizado en este trabajo. También es importante mencionar, que *Mycobacterium tuberculosis* es un patógeno cuya pared celular está compuesta principalmente por lipidoarabinomanano y ácidos micólicos, que hacen hidrófoba a la pared celular de la micobacteria, lo que tendría un efecto sobre la actividad antimicrobiana de CDAP-4, cuya actividad antimicrobiana está ligada a su carga catiónica [26, 27].

Por otra parte, se observó que los ratones infectados con la cepa MDR tienen un 20% de neumonía, comparado con el 80% del grupo control, sin embargo, en los ratones infectados con la cepa H37Rv no se observaron diferencias significativas en el infiltrado inflamatorio respecto al grupo control, esto sugiere que a pesar de la actividad antimicrobiana de CDAP-4, la inflamación persiste en el pulmón, quizás debido a la presencia de antígenos micobacterianos que pudieran estimular la respuesta inmune y favorecer un microambiente de mediadores proinflamatorios, tales como citocinas y quimiocinas que activan y reclutan a los leucocitos.

Por otro lado, se ha descrito que las cepas resistentes a fármacos anti-tuberculosis se generan debido a mutaciones aleatorias en su genoma, debido principalmente a la aplicación inadecuada de las terapias farmacológicas. Estas mutaciones, proporcionan alteraciones en las proteínas blanco de los fármacos, disminuyendo o anulando el efecto de estos [27, 28]. Los resultados de este trabajo, demuestran que las diferencias existentes entre la cepa H37Rv y la cepa MDR, influyen en la susceptibilidad de cada una al tratamiento con CDAP-4, ya que se observó que el número de UFCs de la cepa MDR es 16 veces menor, en comparación con las UFCs obtenidas de la cepa H37Rv. Esto sugiere que alguna de las moléculas que componen la pared celular de *M.*

tuberculosis MDR, es el blanco para que el efecto antimicrobiano de CDAP-4 sea más potente, en comparación con la cepa H37Rv.

En los ratones tratados con la combinación de CDIP-2 y CDAP-4, observamos que para los ratones infectados con la cepa H37Rv la inflamación es del 4.6% en comparación con el 80.3% de inflamación en pulmón de los ratones tratados con solución salina. Mientras que, en los ratones infectados con la cepa MDR, el infiltrado inflamatorio fue del 28% respecto al 87.2% de los ratones del grupo control. El número de UFCs en los ratones infectados con la cepa H37Rv fue 2.12×10^7 , casi 10 veces menos respecto al grupo control en el que se obtuvieron 1.98×10^8 , mientras que en los ratones infectados con la cepa MDR se obtuvieron 3.6×10^7 UFCs, dos veces menos respecto al grupo control, en el que se observó un crecimiento de 9.1×10^7 UFCs. Los resultados obtenidos, sugieren que el tratamiento con la combinación de CDIP-2 y CDAP-4 tiene un efecto sinérgico que favorece la disminución del infiltrado y la eliminación de las micobacterias, es decir, si CDAP-4 disminuye la carga bacilar debido a su efecto antimicrobiano, habría una menor proliferación de las micobacterias, y la activación del sistema inmune sería menor. Por otro lado, el efecto de CDIP-2 pudiera evitar la exacerbación de la respuesta inflamatoria, previniendo la neumonía y el progreso de la tuberculosis a través de una acción antagonista sobre receptores de quimiocina como CCR1, 2 o 3.

La neumonía es una condición patológica que puede ser mortal en la tuberculosis. En este trabajo se observó que los ratones tratados con solución salina e infectados con la cepa H37Rv y los infectados con la cepa MDR de *M. tuberculosis*, presentaron neumonía al final del experimento, es decir, después de los 30 días post-infección y 15 días post-tratamiento. Durante el desarrollo de este experimento, se observó una diferencia en la sobrevivencia de los ratones del grupo control, tratados con solución salina, respecto a los tratados con la combinación de CDIP-2 y CDAP-4, puesto que en los ratones infectados con la cepa H37Rv sobrevivieron un 33% respecto al 44% que sobrevivió con la combinación, mientras que, en el caso de los ratones infectados con la cepa MDR, sobrevivió el 75% del grupo control comparado con el 88% de los ratones que sobrevivieron debido al tratamiento con la combinación de CDIP-2 y CDAP-4. Estos resultados sugieren que la sobrevivencia de los ratones se puede relacionar con la disminución en el infiltrado inflamatorio y disminución en el número de UFCs observados en el pulmón, y en consecuencia disminuye la posibilidad de desarrollar neumonía y la mortalidad de los individuos infectados.

En cuanto a la sobrevivencia de los ratones tratados con CDIP-2 o CDAP-4, solo para el caso de los ratones infectados con la cepa H37Rv y tratados únicamente con CDAP-4, se observó una sobrevivencia del 44%, de manera similar a lo observado en el grupo tratado con CDIP-2

y CDAP-4, lo que correlaciona con la disminución en la inflamación que se observó en los cortes histológicos de estos ratones y la acción directa de CDAP-4 contra *M. tuberculosis*.

La producción de citocinas Th1 como IFN- γ favorece la activación de macrófagos y a su vez la producción de ROS, así como la formación del granuloma, controlando el crecimiento de las micobacterias, mientras que la producción de citocinas Th2 como IL-4, favorecen la respuesta humoral no protectora contra la tuberculosis [22]. Por esta razón, evaluamos el efecto de la administración de CDIP-2 y CDAP-4 en la producción de IFN- γ e IL-4, en el suero de los ratones infectados con la cepa H37Rv y los infectados con la cepa MDR. Sin embargo, en los resultados obtenidos, no se observaron diferencias significativas en la producción de estas citocinas, pero no podemos descartar que la producción de estas citocinas, pudiera estar modulada localmente, debido a que la administración del tratamiento fue vía intratraqueal, por lo que en experimentos futuros sería necesario evaluar la producción de estas citocinas en el pulmón.

Entre los péptidos antimicrobianos naturales, las defensinas juegan un papel importante en el control del crecimiento de *M. tuberculosis* en el pulmón, como es el caso de la β -defensina humana 2 (hBD2, de sus siglas en inglés), que incluso se ha caracterizado por tener actividad quimioatrayente [29]. Los resultados de este trabajo sugieren que el

péptido antimicrobiano CDAP-4, pudiera regular el crecimiento de la micobacteria de manera similar a la defensina hBD2 durante la infección con *Mycobacterium tuberculosis*. Por otro lado, en los resultados de este trabajo, se observó que CDIP-2, en combinación con CDAP-4 disminuyen la inflamación en el pulmón, no así, en los ratones tratados únicamente con CDIP-2. Esto sugiere que la acción antagonista de CDIP-2 en la inflamación a través de los receptores de quimiocina, pudiera estar afectando a una población leucocitaria necesaria en el control de la inflamación, a diferencia de la acción quimioatrayente de hBD2, que estaría favoreciendo el reclutamiento de linfocitos T, debido a esto, sería necesario hacer un conteo diferencial de las células presentes en el infiltrado inflamatorio de los ratones tratados con CDIP-2 y CDAP-4.

9. CONCLUSIONES

Se pudo comprobar que la administración de CDIP-2 y CDAP-4 tiene un efecto en el infiltrado inflamatorio y antimicrobiano de ratones infectados con *Mycobacterium tuberculosis*, obteniendo los siguientes resultados:

- I. En los ratones infectados con *M. tuberculosis H37RV* y los infectados con la cepa MDR, la administración de CDIP-2 y CDAP-4 disminuyó el infiltrado inflamatorio en comparación con los grupos control.
- II. El tratamiento con CDIP-2 y CDAP-4 también disminuye el número de micobacterias viables en los ratones infectados con *M. tuberculosis H37RV* y los infectados con la cepa MDR, respecto a los grupos control.
- III. Adicionalmente se observó que la administración de CDIP-2 y CDAP-4 tiene un efecto en la sobrevivencia en los ratones infectados con *M. tuberculosis H37RV* y los infectados con la cepa MDR debido a que al final del experimento fue mayor el porcentaje de ratones que sobrevivieron cuando fueron tratados con ambos péptidos.
- IV. No se pudo encontrar algún efecto de CDIP-2 y CDAP-4 sobre la producción de las citocinas IL-4 e IFN- γ en el suero de la sangre

de los ratones infectados con *M. tuberculosis* H37Rv, así como para los infectados con *M. tuberculosis* MDR.

- V. Por otra parte, al comparar el número de UFCs para ambos modelos de infección, los resultados sugieren que la cepa MDR, fue más susceptible al tratamiento con la combinación de CDIP-2 y CDAP-4, respecto a la cepa H37Rv.

10. PERSPECTIVAS

Es necesario determinar por medio de la técnica de ELISA o PCR la expresión de las citocinas Th1 y Th2, como IFN- γ e IL-4, en el pulmón del ratón ya que estas son las principales mediadoras de la formación del granuloma y de la neumonía. Así mismo, sería necesario evaluar diferentes dosis de administración de los péptidos y ampliar el número de animales empleado en cada experimento.

APÉNDICE I. METODOLOGÍAS EXPERIMENTALES

Determinación de IL-4

El ensayo de ELISA para cuantificar IL-4 en el suero de los ratones, se realizó, utilizando el kit de la marca BioLegend (Cat. 431102) y placas NUNC Maxisorp de 96 pozos con fondo plano. El procedimiento fue el siguiente:

1. Se fijó el anticuerpo de captura colocando 100 μ L de una dilución 1:200 del anticuerpo, en búfer de carbonatos (CBS, ver apéndice II). Se incubó la placa toda la noche.
2. Se lavó la placa 4 veces, con una disolución de Tween al 0.05% en PBS (PBS-Tween, ver Apéndice II).
3. Posteriormente, se agregaron 200 μ L del búfer de ensayo (Ver apéndice II). Se selló la placa y se incubó por 1 hora a temperatura ambiente, en agitación constante (200rpm).
4. Se preparó la curva de calibración del ensayo utilizando el estándar de IL-4 provisto en el Kit. Las concentraciones fueron las siguientes: 125, 62.5, 31.3, 15.6, 7.8, 3.9, 2.0 pg/mL. Las diluciones se hicieron en el búfer de ensayo.
5. Antes de agregar las muestras de suero y las diluciones del estándar, se lavó la placa 4 veces con la disolución de PBS-Tween.

6. Se agregaron 100 μ L de la dilución del estándar en cada pozo. Para la concentración de 2.0pg/ μ L de IL-4, se agregaron 100 μ L del búfer de ensayo. Se agregaron 10 μ L de cada muestra en 90 μ L de búfer de ensayo, en cada pozo.
7. Se selló la placa y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente.
8. Se lavó la placa 4 veces con PBS-Tween y se agregaron 100 μ L del anticuerpo de detección diluido 1:200 en búfer de ensayo, se selló la placa y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente.
9. Se lavó la placa 4 veces con PBS-Tween.
10. Se agregaron 100 μ L de la solución Avidina-HRP (Ver Apéndice II), en cada pozo. Se selló la placa y se incubó por 30min a temperatura ambiente, en agitación.
11. Se lavó la placa 5 veces con PBS-Tween.
12. Se agregaron 100 μ L del sustrato TMB y se incubó la placa durante 30 minutos a temperatura ambiente, en la oscuridad.
13. La reacción se paró con 100 μ L de H₂SO₄ 2N.
14. La placa se leyó a 450nm después de 10 minutos de haber parado la reacción.

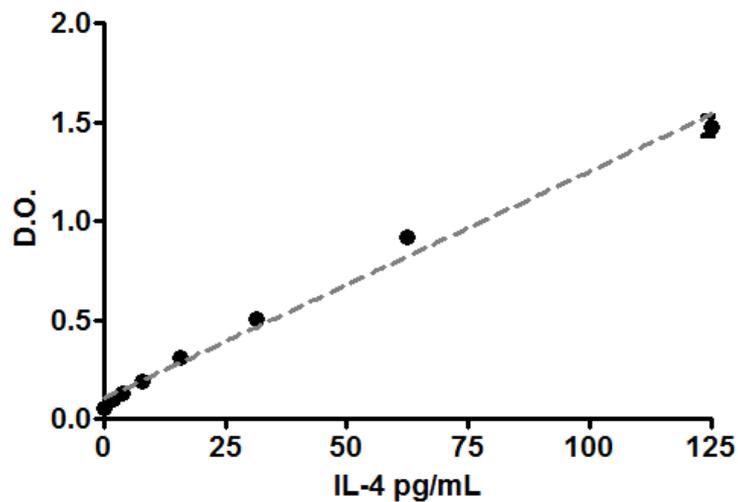


Figura A.I.1 Curva de calibración para el ensayo de ELISA para cuantificación de IL-4 en suero sanguíneo de ratón. $R^2=0.9992$

Determinación de IFN- γ

El ensayo de ELISA para cuantificar IFN- γ en el suero de los ratones, se realizó utilizando el kit de la marca BioLegend (Cat. 430802) y placas NUNC Maxisorp de 96 pozos con fondo plano. El procedimiento fue el siguiente:

1. Se fijó el anticuerpo de captura colocando 100 μ L de una dilución 1:200 del anticuerpo, en búfer de carbonatos (CBS). Se incubó la placa toda la noche.
2. Se lavó la placa 4 veces, con una disolución de Tween al 0.05% en PBS (PBS-Tween).

3. Posteriormente, se agregaron 200 μ L del búfer de ensayo. Se selló la placa y se incubó por 1 hora a temperatura ambiente, en agitación constante (200rpm).
4. Se preparó la curva de calibración del ensayo utilizando el estándar de IFN- γ provisto en el Kit. Las concentraciones fueron las siguientes: 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.3, 15.6 pg/mL. Las diluciones se hicieron en el búfer de ensayo.
5. Antes de agregar las muestras de suero y las diluciones del estándar, se lavó la placa 4 veces con la disolución de PBS-Tween.
6. Se agregaron 100 μ L de la dilución del estándar en cada pozo. Para la concentración de 15.6pg/ μ L de IFN- γ , se agregaron 100 μ L del búfer de ensayo. Se agregaron 10 μ L de cada muestra en 90 μ L de búfer de ensayo, en cada pozo.
7. Se selló la placa y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente.
8. Se lavó la placa 4 veces con PBS-Tween y se agregaron 100 μ L del anticuerpo de detección diluido 1:200 en búfer de ensayo, se selló la placa y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente.
9. Se lavó la placa 4 veces con PBS-Tween.
10. Se agregaron 100 μ L de la solución Avidina-HRP en cada pozo. Se selló la placa y se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente, en agitación.

11. Se lavó la placa 5 veces con PBS-Tween.
12. Se agregaron 100 μ L del sustrato TMB y se incubó la placa durante 30 minutos a temperatura ambiente, en la oscuridad.
13. La reacción se paró con 100 μ L de H₂SO₄ 2N.
14. La placa se leyó a 450nm después de 10 minutos de haber parado la reacción.

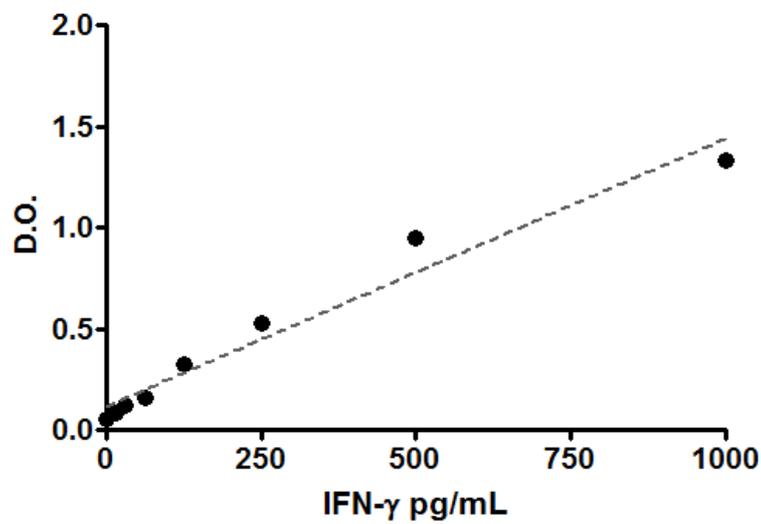


Figura A.I.2 Curva de calibración para el ensayo de ELISA para cuantificación de IFN- γ en suero sanguíneo de ratón. $R^2=0.9954$

APÉNDICE II. REACTIVOS Y SOLUCIONES

CDIP-2 y CDAP-4

Los péptidos utilizados para la realización de este trabajo fueron sintetizados y liofilizados por la empresa Genscript, en New Jersey, USA.

CDIP-2: Está compuesto por 19 aminoácidos, su secuencia comprende del aminoácido 19 al 37, de CCL13: KISLQRLKSYVITTSRCPQ.

CDAP-4: Está compuesto por 19 aminoácidos, su secuencia comprende del aminoácido 56 al 75, de CCL13: KWVQNYMKHLGRKAHTLKT.

Ambos péptidos fueron suspendidos en agua inyectable para ser almacenados a -70°C . (Las dosis a administrar fueron diluidas en Solución Salina Isotónica).

PBS 1X

En 1L de agua destilada, disolver: 8.0g NaCl, 1.16g Na_2HPO_4 , 0.2g KH_2PO_4 , 0.2g KCl. Ajustar pH a 7.4

CBS 1X

En 1L de agua destilada, disolver: 8.4g NaHCO_3 , 3.56g Na_2CO_3 . Ajustar pH a 9.5

Búfer de ensayo

Preparar una disolución al 1% de BSA (Bovine Serum Albumin) en PBS, disolviendo 1g de BSA en 100mL de PBS 1X.

PBS-Tween

Preparar una disolución al 0.05% de Tween 20, disolviendo 50mL de Tween 20 en 1L de PBS 1X.

Disolución Avidina-HRP

Para una placa, diluir 12 μ L del concentrado de Avidina-HRP 1:1000 en 11.99mL de búfer de ensayo.

APÉNDICE III. ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Figuras

- 1.1** Esquema de la localización de los órganos linfoides primarios y secundarios.
- 1.2** Morfología del ganglio linfático
- 1.3** Representación de la estructura de los diferentes tipos de quimiocinas.
- 6.1** Esquema resumido de la estrategia experimental.
- 6.2** Esquema del procedimiento para la preparación de las diluciones del homogenizado de pulmón para la cuantificación de UFCs.
- 7.1** Curva de sobrevivencia de los ratones infectados con la cepa H37Rv de *M. tuberculosis*.
- 7.2** UFCs totales de pulmón infectado con *M. tuberculosis* H37Rv.
- 7.3** Cortes histológicos de pulmón de ratón infectado con *M. tuberculosis* H37Rv, teñidos por la técnica Hematoxilina-Eosina.
- 7.4** Efecto de la aplicación de CDIP-2 y CDAP-4 en la producción de las citocinas IFN- γ e IL-4.
- 7.5** Curva de sobrevivencia de los ratones infectados con la cepa H37Rv de *M. tuberculosis*.
- 7.6** UFCs totales de pulmón infectado con *M. tuberculosis* H37Rv.
- 7.7** Cortes histológicos de pulmón de ratón infectado con *M. tuberculosis* MDR, teñidos por la técnica Hematoxilina-Eosina.
- 7.8** Efecto de la aplicación de CDIP-2 y CDAP-4 en la producción de las citocinas IFN- γ e IL-4.
- A.I.1** Curva de calibración para la cuantificación de IL-4 en sangre
- A.I.2** Curva de calibración para la cuantificación de IFN- γ en sangre

Tablas:

- 1.1** Las quimiocinas y sus receptores, sus fuentes principales de producción.
- 1.2** Participación de las quimiocinas y sus receptores en diversas enfermedades inflamatorias.
- 1.3** Actividad antimicrobiana de las quimiocinas.

11. BIBLIOGRAFÍA

1. Moser, M. and O. Leo, *Key concepts in immunology*. Vaccine, 2010. **28 Suppl 3**: p. C2-13.
2. Janeway, C., *Immunobiology : the immune system in health and disease*. 6th ed. 2005, New York: Garland Science. xxiii, 823 p.
3. Davies, H., *Immune System*, in *Encyclopedia of life sciences*. 2003.
4. Parkin, J. and B. Cohen, *An overview of the immune system*. Lancet, 2001. **357**(9270): p. 1777-89.
5. Abbas, A.K., A.H. Lichtman, and S. Pillai, *Cellular and molecular immunology*. 6th ed. 2007, Philadelphia: Saunders Elsevier. viii, 566 p.
6. Janeway, C.A., Jr. and R. Medzhitov, *Introduction: the role of innate immunity in the adaptive immune response*. Semin Immunol, 1998. **10**(5): p. 349-50.
7. Kelly, J., *Lymph Node*, lymphNode.jpg, Editor. 2007, National Institute of Allergy and Infectious Diseases
8. Janeway, C.A., Jr. and R. Medzhitov, *Innate immune recognition*. Annu Rev Immunol, 2002. **20**: p. 197-216.
9. Zinkernagel, R.M., *On differences between immunity and immunological memory*. Curr Opin Immunol, 2002. **14**(4): p. 523-36.
10. Rossi, D. and A. Zlotnik, *The biology of chemokines and their receptors*. Annu Rev Immunol, 2000. **18**: p. 217-42.
11. Durr, M. and A. Peschel, *Chemokines meet defensins: the merging concepts of chemoattractants and antimicrobial peptides in host defense*. Infect Immun, 2002. **70**(12): p. 6515-7.
12. Rot, A. and U.H. von Andrian, *Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokines grammar for immune cells*. Annu Rev Immunol, 2004. **22**: p. 891-928.
13. Manel Juan, R.C., *Chemokines and Chemokine Receptors*, in *Encyclopedia of Life Sciences*. 2009, John Wiley & Sons.
14. Luster, A.D., *Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation*. N Engl J Med, 1998. **338**(7): p. 436-45.
15. Ono, S.J., et al., *Chemokines: roles in leukocyte development, trafficking, and effector function*. J Allergy Clin Immunol, 2003. **111**(6): p. 1185-99; quiz 1200.
16. Yingying Le, Y.Z., Pablo Iribarren, Ji Ming Wang, *Chemokines and Chemokine Receptors: Their Manifold Roles in Homeostasis and Disease*. Cellular & Molecular Immunology, 2004. **1**(2): p. 95-104.
17. Ganz, T., *Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(9): p. 710-20.
18. Yoshie, O., *Antimicrobial and related activities of chemokines*. Chemokine Biology – Basic Research and Clinical Application, 2006. **1**.
19. Rook, G.A. and R. Hernandez-Pando, *The pathogenesis of tuberculosis*. Annu Rev Microbiol, 1996. **50**: p. 259-84.
20. Palomino Juan C., C.-L.S., Ritacco V., *Tuberculosis 2007 From Basic Science to Patient Care*. 1st. ed. 2007: BourcillierKamps.
21. Hernández-Pando R., O.H., Aguilar-León D., López Casillas F., Rook G., *Inmunopatología de la tuberculosis pulmonar experimental*. Mensaje Bioquímico, 2004. **28**: p. 129-153.

22. Hernandez-Pando, R., et al., *Correlation between the kinetics of Th1, Th2 cells and pathology in a murine model of experimental pulmonary tuberculosis*. Immunology, 1996. **89**(1): p. 26-33.
23. Algood, H.M., J. Chan, and J.L. Flynn, *Chemokines and tuberculosis*. Cytokine Growth Factor Rev, 2003. **14**(6): p. 467-77.
24. Garcia-Zepeda, E.A., et al., *Human monocyte chemoattractant protein (MCP)-4 is a novel CC chemokine with activities on monocytes, eosinophils, and basophils induced in allergic and nonallergic inflammation that signals through the CC chemokine receptors (CCR)-2 and -3*. J Immunol, 1996. **157**(12): p. 5613-26.
25. Mendez-Enriquez, E., et al., *CDIP-2, a synthetic peptide derived from chemokine (C-C motif) ligand 13 (CCL13), ameliorates allergic airway inflammation*. Clin Exp Immunol, 2008. **152**(2): p. 354-63.
26. Martinez-Becerra, F., et al., *Analysis of the antimicrobial activities of a chemokine-derived peptide (CDAP-4) on Pseudomonas aeruginosa*. Biochem Biophys Res Commun, 2007. **355**(2): p. 352-8.
27. Chiang, C.Y., R. Centis, and G.B. Migliori, *Drug-resistant tuberculosis: past, present, future*. Respirology, 2010. **15**(3): p. 413-32.
28. Sheno, S. and G. Friedland, *Extensively drug-resistant tuberculosis: a new face to an old pathogen*. Annu Rev Med, 2009. **60**: p. 307-20.
29. Rivas-Santiago, B., et al., *Human {beta}-defensin 2 is expressed and associated with Mycobacterium tuberculosis during infection of human alveolar epithelial cells*. Infect Immun, 2005. **73**(8): p. 4505-11.