UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD

“Inmunoterapia Combinada con Betaglicano Soluble y Ácido Niflúmico para el Tratamiento de la Tuberculosis Experimental Murina”

TESIS
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS MÉDICAS

PRESENTA:

Héctor Aquiles Maldonado Martínez.

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

UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

TEMA **Pag**

TB PULMONAR Y SU IMPORTANCIA COMO PROBLEMA DE SALUD 1

RESPUESTA INMUNE y TUBERCULOSIS 2

RESPUESTA INMUNE INNATA, MACRÓFAGOS Y TUBERCULOSIS 2

RESPUESTA INMUNE ADAPTATIVA Y LINFOCITOS T CD4+ EN LA TUBERCULOSIS 3

SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS T CD4+ EN LA RESPUESTA ANTE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS 5

OTROS ELEMENTOS DE LA RESPUESTA INMUNE EN LA TUBERCULOSIS 7

MODELO MURINO DE TUBERCULOSIS PULMONAR 8

TGFβ Y PGE_2 DOS MEDIADORES IMPORTANTES EN LA FISIOPATOGENIA DE LA TUBERCULOSIS PULMONAR MURINA 12

TGFβ UNA CITOCINA Y FACTOR DE CRECIMIENTO MULTIFUNCIONAL 13

TGFβ EN LA RESPUESTA INMUNE 14

TGFβ COMO ANTIINFLAMATORIO 16

TGFβ Y TUBERCULOSIS 18

PROSTAGLANDINAS 19

SÍNTESIS DE PROSTAGLANDINAS Y SU REGULACIÓN 20

PROSTAGLANDINAS EN LA RESPUESTA INMUNE 22

EFECTOS DE PGE_2 EN PADECIMIENTOS INFECCIOSOS CRÓNICOS Y EN LA TUBERCULOSIS 24

INMUNOMODULADORES EN LA TUBERCULOSIS MURINA 25

INHIBIDORES DE TGFβ 26

INHIBIDORES DE PROSTAGLANDINAS Y PGE_2 27

JUSTIFICACIÓN 29

HIPÓTESIS 29

OBJETIVO GENERAL DEL PROYECTO 29

OBJETIVOS ESPECÍFICOS 30

MATERIAL Y MÉTODOS 30

ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN 30

REPRODUCCIÓN DEL MODELO DE TUBERCULOSIS PULMONAR MURINA 31

DEFINICIÓN DE LOS TRATAMIENTOS 31

VARIABLES 33

COLECCIÓN DE MUESTRAS 34

PRUEBA DE HIPERSENSIBILIDAD RETARDADA 34

DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNETICA DE CITOCINAS 34

DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN TRADUCCIONAL DE CITOCINAS 35

PROCESAMIENTO DE LOS TEJIDOS PARA EL ANÁLISIS HISTOLÓGICO 36

CUENTA BACILAR 37

ANALISIS ESTADÍSTICO 38

TEMA **Pag**

RESULTADOS **39**
RESPUESTA DE DTH EN LOS DIFERENTES
GRUPOS DE TRATAMIENTO **39**
DETERMINACIÓN DE CITOCINAS POR ELISA **40**
DETERMINACIÓN DE CITOCINAS POR RT-PCR **41**
ANALISIS MORFOMÉTRICO DE LAS
ÁREAS DE INFLAMACIÓN GRANULOMATOSA **44**
ANALISIS MORFOMÉRICO DE LAS ÁREAS DE NEUMONÍA **45**
DETERMINACIÓN DE LA CARGA BACTERIANA, CUENTAS DE UFCs **46**
EVALUACIÓN DE LAS ÁREAS DE FIBROSIS PULMONAR **50**

DISCUSIÓN **52**

CONCLUSIONES **56**

PERSPECTIVAS **58**

BIBLIOGRAFIA **59**

INDICE DE FIGURAS

FIGURA **Pag**

Figura I. Elementos de la respuesta inmune protectora en la tuberculosis 9
Figura II. Funciones de TGFβ sobre las células del sistema inmune 17
Figura III. Nomenclatura y síntesis de prostaglandinas..... 21
Figura 1. Intensidad de la reacción de hipersensibilidad tardía..... 39
Figura 2. Concentración de citocinas en homogenizados de pulmón 42
Figura 3. Concentración del ARNm de citocinas en homogenizados de pulmón 43
Figura 4. Áreas inflamación crónica granulomatosa en pulmón..... 44
Figura 5. Porcentaje de áreas neumónicas en pulmón..... 46
Figura 6. Áreas neumónicas en pulmón 47
Figura 7. Unidades formadoras de colonias en homogenizados de pulmón 48
Figura 8. Unidades formadoras de colonias en homogenizados de pulmón 49
Figura 9. Áreas de fibrosis en pulmón..... 49
Figura 10. Porcentaje de áreas neumónicas en pulmón..... 50

ABREVIACIONES POR ORDEN DE APARICIÓN

TB	Tuberculosis
Mtb	Mycobacterium tuberculosis
NK	Células asesinas naturales
IL-12	Interleucina 12
IFNγ	Interferón gama
IL-1	Interleucina 1
FNTα	Factor de necrosis tumoral alfa
NO	Óxido Nítrico
iNOS	Sintetasa inducible de óxido nítrico
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-13	Interleucina 13
IgG2a	Inmunoglobulina de isotipo G clase 2a
IgG3	Inmunoglobulina de isotipo 3
RFcγ	Receptor para la fracción constante de la inmunoglobulina de isotipo G
IL-5	Interleucina 5
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
IgG1	Inmunoglobulina de isotipo G clase 1
IgE	Inmunoglobulina de isotipo E
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa reversa
TGFβ	Factor de crecimiento transformante beta
RNAm	Ácido ribonucleico mensajero
DTH	Reacción de hipersensibilidad retardada
IL-17	Interleucina 17
COX2	Ciclooxigenasa 2
PGE_2	Prostaglandina E_2
UFC	Unidades formadoras de colonias
LAP	Péptido asociado de latencia
LTBP	Proteína de unión al complejo de latencia de TGFβ
ROI	Intermediarios reactivos del oxígeno
MIP-1α	Proteína inhibidora de macrófagos 1 alfa
MIP-2	Proteína inhibidora de macrófagos 2
PPD	Derivado protéico purificado
PGs	Prostaglandinas
TXs	Tromboxanos
LPS	Lipopolisacárido
EGF	Factor de crecimiento epidermoide
EP	Receptor E de prostaglandinas
MAIDS	Síndrome murino de inmunodeficiencia adquirida
ELISA	Ensayo de inmunoadsorción con enzimas ligadas
AINEs	Antiiflamatorios no esteroideos

TB PULMONAR Y SU IMPORTANCIA COMO PROBLEMA DE SALUD

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS), la tuberculosis (TB) es la enfermedad infecciosa con mayor prevalencia a nivel mundial (1, 2). El numero de personas infectadas por Mycobacterium tuberculosis (Mtb), el bacilo causal, se estima entre 2000 y 2500 millones, y aunque sólo 5% de éstas desarrollan la enfermedad, continúa siendo un problema de salud pública a nivel mundial (1, 2). Cada año se informan 10 millones de casos nuevos a nivel mundial y más de dos millones de muertes (1). La aparición de cepas resistentes del bacilo, la coinfección con el virus de la inmunodeficiencia humana y la estrecha asociación con la pobreza, complican aún más la problemática en torno a este padecimiento y dificultan su control (3).

La infección por Mtb puede evolucionar de diferentes maneras. En la mayoría de los sujetos la respuesta inmune es eficiente en contener al bacilo y la infección inicial, o primoinfección, tiene un curso subclínico o se manifiesta como un cuadro inespecífico autolimitado. No obstante aún en estos individuos, el sistema inmune puede contener mas no eliminar por completo el patógeno, y tras la primoinfección, éste último permanece en un estado de latencia que puede prolongarse por el resto de la vida del sujeto (4). De este modo una gran cantidad de personas pueden, sin desarrollar la enfermedad, estar infectadas por el bacilo. La enfermedad activa, clínicamente evidente, que se diagnostica como tuberculosis pulmonar, se produce en la mayor proporción de los casos por reactivación del bacilo en estado latente. Es decir en algún momento de la vida de la persona infectada pero sin enfermedad, el microorganismo deja el estado de latencia posterior a la primoinfección y se multiplica, desarrollando entonces un cuadro de tuberculosis activa. En un pequeño porcentaje de los casos la enfermedad activa se desarrolla a partir de la primoinfección que no puede ser contenida por el sistema inmune.

El bacilo nos presenta pues diferentes escenarios en los que se ha de actuar de forma diferente para poder diseñar estrategias terapéuticas racionales y efectivas contra él. En el caso de la tuberculosis activa, y en particular en la enfermedad pulmonar, un capítulo

importante corresponde a la respuesta inmunológica ante el bacilo que a la luz del conocimiento actual es una respuesta inmune inadecuada. La búsqueda de los factores involucrados en tal tipo de respuesta es critica para clarificar la patogenia de la enfermedad y puede además proporcionarnos opciones terapéuticas más adecuadas.

RESPUESTA INMUNE y TUBERCULOSIS

RESPUESTA INMUNE INNATA, MACRÓFAGOS Y TUBERCULOSIS

Aunque Mycobacterium tuberculosis (Mtb) puede encontrarse extracelular, es primariamente un microorganismo intracelular cuyo hábitat preferido es el macrófago. La fase inicial de la respuesta ante el bacilo corresponde a la inmunidad innata y en ella participan macrófagos, células T NK y neutrófilos (5,6).

La internalización de la micobacteria al macrófago se da a través de la interacción de numerosas moléculas de superficie con la micobacteria. Algunas de éstas interacciones estimulan vías de activación, mientras que otras favorecen la supervivencia intracelular de la micobacteria al inhibir la maduración del fagosoma (7). Existe heterogeneidad en los eventos iniciales de la infección por la micobacteria, aquellas interacciones que medien la activación de los macrófagos permitirá a este fagocito la destrucción del bacilo (5,7) y la adecuada interacción con linfocitos T durante la respuesta adaptativa para el control de la infección.

El macrófago activado tras la fagocitosis del bacilo produce IL-12, citocina importante de la respuesta inmune innata y fundamental en la inducción de la respuesta inmune celular adaptativa frente a micobacterias (8). IL-12 induce en células NK la producción de IFNγ. El INFγ es la principal citocina activadora de macrófagos, y una citocina crítica para el control de la infección como parte de la repuesta inmune innata inicial y más tarde de la respuesta celular adaptativa (7). Se ha demostrado que los ratones "Knock out" para INFγ no son capaces de controlar una dosis subletal de Mtb y sucumben ante ella (9). En el humano,

mutaciones que ocasionan defectos en el receptor tipo I de INFγ incrementan la susceptibilidad a la micobacteria (10). La estimulación del macrófago con INFγ promueve la maduración del fagosoma; a la par que la producción de especies reactivas del oxígeno y nitrógeno, agentes microbicidas indispensables para el control del bacilo en el ratón (4).

Entre las citocinas secretadas por el macrófago activado, también se encuentran IL-1 y FNTα. Ambas son mediadoras de la respuesta inflamatoria aguda que favorecen el reclutamiento celular al sitio de la infección por la micobacteria. Los macrófagos circulantes reclutados en pulmón mediante el efecto de estas citocinas, así como de otros factores aún no bien conocidos, se activan y forman agregados que posteriormente se rodearán de linfocitos T CD4+ y T CD8+ constituyendo lo que conocemos como granulomas. En este patrón de respuesta inflamatoria es distintivo de la tuberculosis y en él son además importantes INFγ y linfotoxina α (11).

RESPUESTA INMUNE ADAPTATIVA Y LINFOCITOS T CD4+ EN LA TUBERCULOSIS

El arribo al pulmón de las células T CD4+ y su presencia en los granulomas marca el inicio de la participación de la siguiente fase de la respuesta inmune ante la micobacteria. La respuesta inmune celular adaptativa.

Además de los macrófagos las células dendríticas residentes en el pulmón tienen también contacto inicial con la micobacteria. Estos dos elementos celulares, y en particular, de forma predominante la célula dendrítica, mediante la presentación de antígeno a células T, y mediante la producción de ciertas citocinas, proveen los elementos necesarios para el establecimiento de la respuesta inmune adaptativa. Las células dendríticas han demostrado ante estímulos inflamatorios inducidos por inhalación bacteriana, incrementar su migración a los ganglios linfáticos regionales, a la vez que son reclutadas a la vía respiratoria nuevas representantes de esta población también con mayor celeridad (4,12,13). Una vez en el ganglio serán importantes en la presentación antigénica a células T y por ende en la

inducción de la respuesta inmune adquirida. Estos fenómenos ocurren en los primeros días de la infección (13,4).

Los linfocitos T, una vez activados tras la presentación antigénica en los ganglios hiliares, migran hacia el pulmón para participar en el control de la infección micobacteriana (13). De este modo, durante los primeros días de la infección, mientras la única que opera en el sitio de la infección es la inmunidad innata, la mayoría de las células obtenidas por lavado bronquial en ratones infectados, son macrófagos, mientras que al final de la segunda semana y hasta el final del cuarto mes de infección predominan los linfocitos T (14). La proporción de linfocitos T CD4+ es semejante a la de linfocitos T CD8+ (14,13). En periodos avanzados de la enfermedad murina se ha informado también predominio de linfocitos CD8+ (14).

La participación de los linfocitos CD4+ en el control de la infección es de primordial importancia. Ratones C57BL/6 infectados por vía intravenosa con Mtb, muestran una fase inicial de la infección con incremento de la carga bacteriana e inician el control de la infección a las tres semanas, no sucumben ante la infección y muestran cargas bacilares relativamente bajas (15). Por el contrario, ratones "Knock out" para CD4, son incapaces de controlar la infección por Mtb y mueren con grandes cargas bacterianas (aproximadamente 100 veces superiores a las de animales control). La importancia de los linfocitos T CD4+ es también evidente en el humano, en el cual pacientes con infección por el virus de la inmunodeficiencia humana son mucho más susceptibles a la infección por el bacilo o su reactivación, debido a su déficit de linfocitos CD4+ (15).

Se considera a los linfocitos T CD4+ como la principal fuente de producción de INF-γ durante la infección por Mtb (15). El INF-γ como ya se ha comentado es un mediador central en la protección frente al bacilo tuberculoso ya que activa los mecanismos microbicidas de los macrófagos reclutados al pulmón, en particular la producción de intermediarios reactivos del nitrógeno. Entre los intermediarios reactivos del nitrógeno se encuentra el óxido nítrico (NO), que al menos en el ratón, juega un papel central. En el contexto de la respuesta inmune frente a microorganismos la enzima responsable de la

producción de óxido nítrico, es la sintetasa inducible de óxido nítrico (iNOS). En ratones “Knock out” para CD4 se ha observado que iNOS, detectada por inmunohistoquímica, se expresa inicialmente en menor cantidad de granulomas que en ratones control (15). Esta diferencia desaparece sin embargo, hacia el fin de la tercera semana de infección. La formación de granulomas muestra un efecto semejante. Los granulomas en los ratones "Knock out" para CD4 se hallan menos organizados y son menos que en los ratones control en los estadios iniciales. Esta diferencia muestra una cinética semejante a la de la expresión de iNOS (15). Así pues el principal papel de los linfocitos T CD4+ en el control de la infección parece ser la producción temprana y en cantidades suficientes de INF-γ que permitan la adecuada activación macrofágica, la promoción de los mecanismos microbicidas y el control temporal de la infección (15).

SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS T CD4+ EN LA RESPUESTA ANTE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS

Los linfocitos T CD4+ como bien sabemos, lejos de constituir una población homogénea incluyen diferentes subpoblaciones con diferente patrón de secreción de citocinas, o con diferentes mecanismos de interacción con otros grupos celulares del sistema inmune, lo que les confieren la capacidad de ejercer diferentes efectos en la respuesta inmune adaptativa. La actividad de ciertas poblaciones es indispensable para combatir diferentes patógenos, y por ello si la respuesta inmune promueve la expansión de poblaciones inadecuadas ante ciertos patógenos, no es posible combatirlos de forma eficaz. Tal parece ser el caso de la respuesta ante el bacilo de bacilo de Koch en las formas activas de tuberculosis.

A este respecto, mucho se ha debatido sobre la participación de dos subpoblaciones con diferente patrón de secreción de citocinas en relación a la respuesta inmune protectora ante la tuberculosis, a saber, los linfocitos T CD4+ Th1 y Th2.

La producción de INF-γ e IL-2 caracteriza los linfocitos Th1, mientras que la producción de IL-4 e IL-13 caracteriza a los linfocitos Th2 (16). Ambas subpoblaciones se desarrollan a partir de los mismos precursores, linfocitos T CD4+ vírgenes sin polarización en su

producción de citocinas, denominados Th0. El desarrollo de las subpoblaciones Th1 y Th2 depende la forma y el microambiente en los que se lleva a cabo la presentación antigénica y activación. La principal citocina inductora de la diferenciación hacia células Th1 es la IL-12 (16). El desarrollo de las células Th2 es parece ser inducida por su parte por IL-4. Una vez que las células T estimuladas han comenzado a diferenciarse hacia una de las dos subpoblaciones, las citocinas que éstas producen amplifican su propio crecimiento y suprimen el de la otra subpoblación Th1 o Th2 según se el caso(16).

Como ya se ha comentado ampliamente INF-γ, es una citocina esencial para el control de la infección por el bacilo y su principal fuente de producción al inicio de la infección por Mtb es precisamente la células T CD4+, y específicamente la célula T CD4+ Th1. Las células Th1 favorecen además otras ramas de la inmunidad protectora ante la micobacteria al promover la diferenciación y activación de linfocitos citotóxicos T CD8+, y la producción de anticuerpos de isotipo IgG2a e IgG3 en el ratón que activan complemento, se unen con gran afinidad a receptores RFcγ, y permiten de esta manera la opzonización bacteriana y la lisis mediada por complemento (16). De esta manera existe acuerdo entre los diferentes grupos que trabajan sobre la inmunología de la tuberculosis en el hecho de que la subpoblación Th1 de los linfocitos T CD4+ constituye el elemento central indispensable en la inmunidad protectora ante Mycobacterium tuberculosis.

Los linfocitos CD4+ de tipo Th2, por su parte, constituyen una población inadecuada para contener a la micobacteria. Estas células producen principalmente IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, y promueven principalmente una respuesta de tipo humoral, en la que predominan además anticuerpos de isotipo IgG1 e IgE. Estas células no promueven de modo efectivo la inmunidad celular requerida para el control de la micobacteria e incluso algunas de las citocinas que producen tienen efectos antagónicos sobre las producidas por células de tipo Th1 (17).

No obstante lo anterior, la participación de los linfocitos T CD4+ de tipo Th2 en la patogenia de la tuberculosis ha sido motivo de debate. Diversos grupos incluyendo el

nuestro han encontrado evidencias de la asociación entre la presencia de tuberculosis y una respuesta de linfocitos Th2. En ratones de la cepa Balb/c se ha informado incremento de la población de linfocitos Th2 tras la aparición inicial de linfocitos Th1 y en fases tardías en la infección. Este incremento además se halla asociado a la reactivación de la enfermedad en infecciones latentes experimentales (18), a una mayor extensión de ésta (14,19) y a datos de progresión (14,19,20). En estudios en humanos se ha asociado este patrón de respuesta en células de sangre periférica con la extensión o presencia de lesiones pulmonares en sujetos enfermos de tuberculosis (21,22). En contraposición, otros autores no corroboran estos hallazgos, y así empleando otras cepas de ratones, aún cuando también encuentran presente esta población de linfocitos Th2 en fases tardías, no es de igual magnitud, ni guarda correlación con la progresión microbiológica de la enfermedad (23,24,25). En el humano algunos grupos también han informado ausencia de un patrón de respuesta con linfocitos Th2 (26).

Pese a la controversia en torno a la participación de un patrón de respuesta de tipo Th2 en la patogenia de la tuberculosis, datos recientes han permitido fundamentar de manera contundente su participación en el daño tisular en la tuberculosis, en específico en la presencia de necrosis y fibrosis (19,20).

Así pues la participación de los linfocitos T CD4+ tipo Th1 constituye el elemento central indispensable en la inmunidad protectora ante Mycobacterium tuberculosis, y aunque los linfocitos T CD4+ tipo Th2 tengan una participación poco clara, no parecen ser un elemento fisiopatogénico clave en la presentación de la enfermedad, mas sí en el daño tisular que característicamente la acompaña.

OTROS ELEMENTOS DE LA RESPUESTA INMUNE EN LA TUBERCULOSIS

Aunque lejos de tener el papel central de los linfocitos T CD4+, los linfocitos T CD 8+ participan también en el control de la infección. La depleción de linfocitos T CD8+ mediante el empleo de anticuerpos selectivos afecta el control de la infección (4). La transferencia de células T CD 8+ en ratones inmunodeficientes confieren protección contra

la diseminación de micobacterias como el bacilo de Calmette-Guerin (27). Aunado a lo anterior, las células T CD 8+ son responsables de la protección transitoria observada en fases tempranas de la infección en ratones viejos (28), y parecen ser más importantes que las células T CD 4+ en el control de la infección en la tuberculosis en estado latente (29). Los linfocitos T CD 8+ pueden producir INF-γ de manera semejante a los linfocitos T CD 4+. Sin embargo, la principal función que se les atribuye es citotóxica. Mediante la lisis de células infectadas del hospedero, las células T CD 8+ pueden exponer bacilos que se hallen dentro de células ineficientes para eliminarlos, como por ejemplo macrófagos inactivados. De forma más reciente se ha observado que células T CD 8+ que expresan granulisina y perforina pueden lisar también directamente a la micobacteria (30).

Al igual que los linfocitos T CD8+ otros linfocitos, sin ser protagonistas, participan en la respuesta inmune contra Mtb, sin embargo para fines de esta tesis y por su papel central, nos enfocaremos en los linfocitos T CD4+ y en los efectos ciertos mediadores sobre ellos a través de modulación con inmunoterapia. Hablaremos de estos mediadores con detalle más adelante. En la figura I se muestran algunos de los más importantes de estos otros linfocitos.

MODELO MURINO DE TUBERCULOSIS PULMONAR

Nuestro grupo dirigido por el Dr. Hernández Pando ha establecido y caracterizado un modelo murino de tuberculosis pulmonar en ratones de la cepa Balb/c. En este modelo se administran $1x10^6$ micobacterias vivas y virulentas de la cepa H37Rv por vía intratraqueal para garantizar que el inóculo se deposite prácticamente en su totalidad en el pulmón. Además este inóculo garantiza se logre una infección progresiva de acuerdo estudios previos realizados en nuestro laboratorio (31).

La caracterización de la cinética bacteriana, de producción de diversas citocinas y de activación de la respuesta inmune celular, así como de evolución histológica y del daño

tisular en esta cepa murina a lo largo del desarrollo de la infección y la enfermedad, han permitido distinguir dos fases experimentales del modelo.

La primera corresponde a la etapa temprana de la enfermedad. Histológicamente se caracteriza por de áreas de infiltrado inflamatorio crónico inespecífico perivascular,

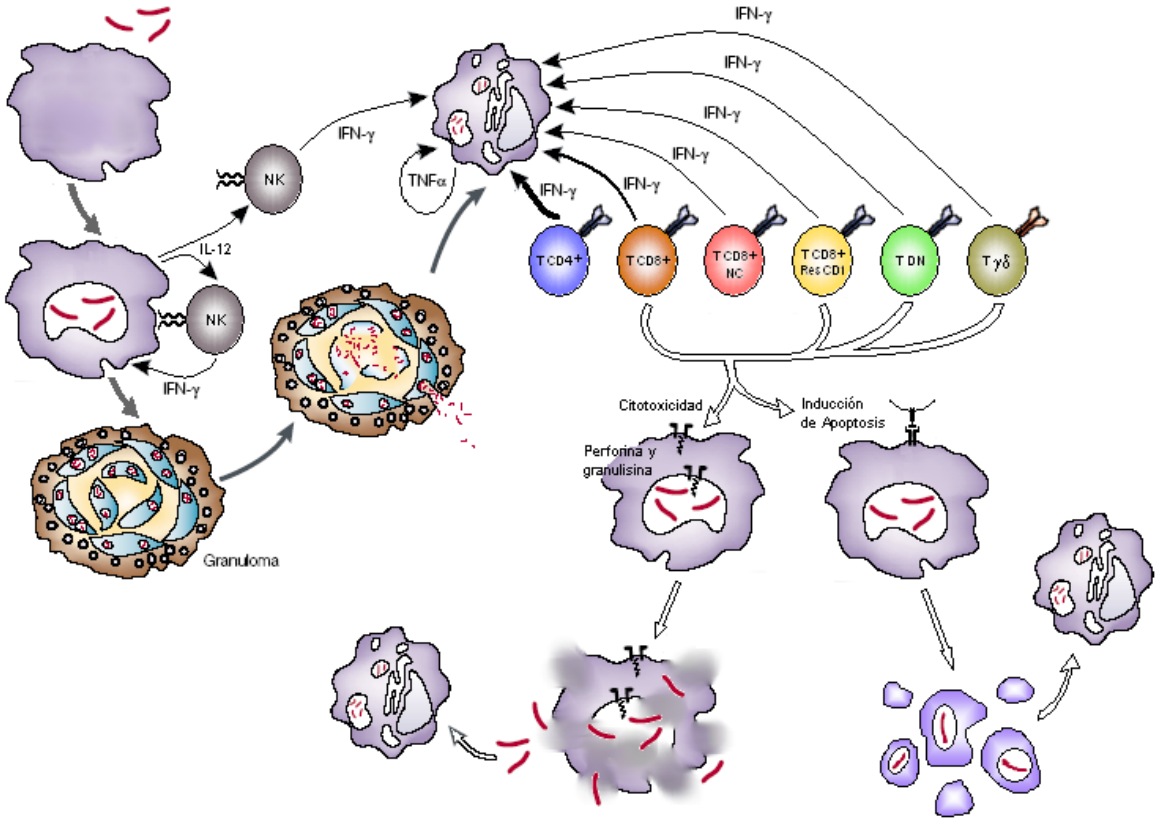


Figura I. Elementos de la respuesta inmune protectora en la tuberculosis.- Se muestran los principales efectores celulares en la inmunidad protectora contra Mycobacterium tuberculosis y sus actividades antimicobacterianas. (Mϕ, Macrófago; NK, células asesina naturales; T CD4+, Linfocitos T CD4+; T CD8+, Linfocitos T CD8+ restringidos por MHC-Clase 1; T CD8+ NC, Linfocitos T CD8+ no convencionales; T CD8+ Res CD1, Linfocitos T CD8+ restringidos por CD1; T DN, Linfocitos T CD4-CD8-; Tγδ, Linfocitos T con receptores TCRγδ) (Modificado de 5)

peribronquial y en ocasiones pleural, así como por el establecimiento, hacia el fin de la segunda semana de infección, de una reacción inflamatoria crónica granulomatosa intersticial y peribronquial (9,14,32). Desde el punto de vista de la producción de citocinas, el análisis citofluorométrico de lavados bronquiales muestra una gran cantidad de células mononucleares, linfocitos entre los que predominan células T CD4+, y macrófagos (14). Los procedimientos de inmunohistoquímica (IHQ) y RT-PCR indican abundante expresión de IL-1α y FNTα, escasa producción de TGFβ, y predominio de linfocitos T CD4+ de tipo Th1 puesto que existe una gran cantidad de células positivas para IL-2 y una gran expresión genética de IL-2 e INFγ que incrementan gradualmente en las áreas de inflamación del tejido pulmonar, a la vez que se observan escasa expresión de RNAm y células positivas para IL-4 (14). De forma congruente con lo anterior se observa una respuesta inmune celular activa dirigida en contra de antígenos micobacterianos que se hace evidente mediante la prueba cutánea de hipersensibilidad (DTH) ante los mismos, que se acompaña de una baja sensibilidad tisular al FNTα (33). Por otra parte en cuanto a los aspectos microbiológicos de la infección, en esta fase inicial se observa una reducción de la carga bacteriana en los primeros días, posteriormente la carga bacilar se incrementa pero se contiene, logrando un control temporal de la infección (32).

La segunda fase en el modelo, abarca el periodo crónico de la infección a partir del día 28. En ésta las imágenes histológicas predominantes cambian, se reduce el tamaño de los granulomas, la reacción inflamatoria toma además la forma de áreas neumónicas en las que los alveolos se hallan ocupados por macrófagos de aspecto espumoso, y aparecen también áreas de necrosis y fibrosis (14,32). La producción de citocinas refleja ahora la presencia de un balance mixto de linfocitos T CD4+ tipo Th1 y Th2, que se manifiesta en la expresión génica aún elevada de INFγ, mas con aumento importante de IL-4. Esta misma cinética se observa con inmunohistoquímica, método por el cual no se encuentran diferencias significativas en el número de células positivas para IL-2 e IL-4 en las áreas de neumonía, a la vez que hay un claro predominio de células productoras de IL-4 en los granulomas conforme avanza la enfermedad (14). Un cambio importante en la producción de citocinas evidente tanto a nivel de expresión génica como de proteínas, es el incremento en la

producción de TGFβ, en contraste con la disminución de IL-1α y FNTα (32). En esta fase se encuentra también producción de IL-17, ausente en la fase aguda, e incremento en la producción de COX2 y PGE_2, producidas de forma discreta en la fase aguda (34). Así mismo en contraposición a lo que ocurre en la fase aguda, la respuesta de DTH es mínima e incrementa la sensibilidad al daño tisular ante FNTα. La progresión microbiológica de la infección es acusada, las cuentas bacterianas son muy elevadas e incrementan de manera progresiva (32). Acompañando a todos estos cambios se observa una alta mortalidad, 70-80% a los cuatro meses de infección (35).

El nuestro es un modelo de tuberculosis pulmonar adecuado para el estudio de la tuberculosis pulmonar humana pues comparte con la enfermedad humana características importantes, no compartidas en su totalidad por otros modelos.

En primer término en nuestro modelo el órgano en donde inicia la infección es el pulmón, modelos que emplean otras vías de inoculación como la intravenosa muestran infección con evolución más rápida en otros órganos como el hígado o el bazo (36, 37). Además la vía de inoculación intratraqueal de nuestro modelo evita el depósito de la micobacteria en otros sitios como puede ocurrir en modelos de tuberculosis pulmonar en los que la inoculación se hace mediante aerosoles; esto permite tener una mayor certeza de la magnitud del inóculo y del sitio de inicio de la infección.

Un segundo punto a considerar es el desarrollo de la infección. En nuestro modelo la infección es persistente y muestra progresión microbiológica. Después del descenso y la estabilidad temporal de la carga bacteriana observados en la fase aguda hay, en la fase crónica, proliferación continua y acusada de la micobacteria que alcanza cuentas cercanas a los 200 millones de UFC (32). En modelos que emplean otras cepas murinas como B6D2, y bacterianas como de la cepa Erdman, inoculada por vía intravenosa ($1x10^5$ bacilos), la carga bacteriana en pulmón alcanza cuentas entre $1x10^5$ y $1x10^6$ UFC y se mantiene entre esos límites al menos hasta poco más allá de los tres meses de infección (37,36). Modelos con

infección aerógena y que emplean la misma cepa bacteriana y ratones C57BL/6 tampoco muestran incremento progresivo de la carga bacilar en la fase crónica de la infección (9).

Desde el punto de vista inmunológico, la progresión de la enfermedad en nuestro modelo muestra también semejanzas con el padecimiento en el humano ya que, hay evidencia de que la enfermedad humana se acompaña también de producción incrementada de TGFβ (38-42,43).

Finalmente, la evolución de la enfermedad es también semejante en nuestro modelo a lo que sucede en el humano. Como reflejo de lo que ocurre con la carga bacteriana, la infección en el modelo murino se manifiesta como una enfermedad de curso progresivo que lleva a la muerte a la mayoría de los animales de experimentación a los 4 meses de infección (14), y en la que los ratones muestran deterioro físico progresivo y pérdida de peso corporal hasta llegar a la caquexia, así como incremento paulatino de las áreas de neumonía, necrosis y fibrosis. La evolución natural de la tuberculosis pulmonar no tratada en el humano es también frecuentemente fatal. De acuerdo a estudios previos a la era antimicrobiana, cerca del 30% de los pacientes morían dentro del año siguiente al diagnóstico, sólo la mitad sobrevivían después de 5 años, y de estos sobrevivientes en 40% la infección continuaban siendo productiva (pacientes bacilíferos) y la enfermedad progresaba de forma lenta como un proceso debilitante y consuntivo (44).

TGFβ Y PGE_2 DOS MEDIADORES IMPORTANTES EN LA FISIOPATOGENIA DE LA TUBERCULOSIS PULMONAR MURINA

Como se ha hecho evidente en la descripción de nuestro modelo murino de tuberculosis pulmonar, un evento clave en la fisiopatogenia de la enfermedad es la pérdida de una respuesta inmune con predominio de linfocitos CD4+ de tipo Th1. Este evento se acompaña del incremento en la expresión y producción de ciertos mediadores como son TGFβ Y PGE_2. Estos dos mediadores, como se analizará a continuación, tiene efectos supresores importantes de la respuesta inmune adaptativa y en particular sobre una respuesta de tipo

Th1, y podrían estar contribuyendo de forma decisiva en la progresión de la enfermedad en este modelo murino.

TGFβ UNA CITOCINA Y FACTOR DE CRECIMIENTO MULTIFUNCIONAL

TGFβ es una potente citocina y factor de crecimiento que participa en numerosos procesos celulares, tisulares y fisiológicos fundamentales como apoptosis; proliferación, migración y adhesión celulares; formación y remodelaje de la matriz extracelular, cicatrización y angiogénesis; desarrollo embrionario, y regulación de la respuesta inmune (45-46). Hay tres isoformas de TGFβ, TGFβ1, TGFβ2 y TGFβ3, cada una codificada por un gen distinto (47). Se sintetizan en forma de precursores, que contienen un propéptido. Antes de su secreción el TGFβ sufre escición del propéptido. Una vez secretado TGFβ se halla inactivo en un complejo latente unido mediante enlaces no covalentes al propéptido denominado ahora 'péptido asociado de latencia' (LAP) y a una glicoproteína denominada 'proteína de unión al TGFβ latente' (LTBP) (48). La activación de TGFβ parece ser un paso crítico en la regulación de su actividad y ocurre por diferentes mecanismo no completamente comprendidos (47, 49, 50). TGFβ ejerce sus efectos al unirse a un complejo receptor formado por los receptores tipo I, II y III. TGFβ se une primero al receptor tipo II, el receptor tipo I se une entonces al complejo. El receptor tipo III o Betaglicano no tiene actividad de señalización intracelular y actúa como facilitador de la unión de TGFβ al receptor tipo II (48, 47). Tanto el receptor tipo II como el tipo I presentan dominios intracelulares con actividad de serin-treonina cinasa y se activan por fosforilación. El receptor tipo II unido a TGFβ induce su autofosforilación y la fosforilación del receptor tipo I (48). El receptor tipo I fosforilado transduce la señal fosforilando mensajeros intracelulares, las proteínas SMAD (48). El complejo activado tiene afinidad por SMAD2 y/o SMAD3, que una vez fosforiladas se separan del complejo receptor y se asocian a SMAD4. El complejo resultante se transloca al núcleo y actúa como factor de transcripción de los genes de respuesta a TGFβ (48, 51). SMAD 6 y7 actúan como supresoras (48).

TGFβ EN LA RESPUESTA INMUNE

TGFβ tiene propiedades inmunorreguladoras potentes y únicas. Es producido por todas las estirpes de leucocitos y por células derivadas de éstos, entre ellas linfocitos, macrófagos y células dendríticas (46). Actúa tanto de forma autocrina como paracrina, y participa en la regulación del reclutamiento celular, proliferación, diferenciación y activación de diferentes células de la respuesta inmune (46). El espectro de efectos mediados por TGFβ es muy amplio y depende de la integración de diferentes estímulos como son: blanco celular y estado de activación del mismo; presencia de otras poblaciones celulares; concentración de TGFβ en el medio y de sus receptores en la célula blanco; y microambiente en el cual se desarrolla esta respuesta incluyendo otras citocinas y expresión de moléculas de matriz extracelular (49, 51). Debido a esta amplia gama de factores que pueden variar la respuesta a TGFβ, en diferentes contextos puede tener incluso efectos antagónicos.

TGFβ participa tanto en la regulación de la respuesta inmune innata como adquirida. La acción sobre macrófagos es un buen ejemplo de cómo TGFβ actúa de forma diferente sobre un mismo blanco celular dependiendo de su concentración. En rangos femtomolares o picomolares es un factor quimiotáctico (52, 53), por el contrario cuando macrófagos peritoneales activados se exponen a esta citocina en rangos nanomolares se suprime en 80% su producción de intermediarios reactivos del oxígeno (ROI) (54). Al igual que los (ROI) el óxido nítrico (NO), también guarda una relación inversa con la producción de TGFβ por reducción de los niveles de la sintetasa inducible de NO (55). El efecto de TGFβ sobre monocitos y macrófagos también refleja la divergencia en actividad de esta citocina en dependencia del estado de activación de la célula. Así, mientras que algunos de los efectos de TGFβ sobre monocitos pudieran promover el fenómeno inflamatorio como la inducción de IL-1 e IL-6, en macrófagos actúa principalmente como un mediador inhibitorio al reducir la expresión de receptores para fagocitosis y para la fracción constante de las inmunoglobulinas, reducir la producción de FNTα, quimiocinas (MIP-1α y MIP-2) y de NO. TGFβ también ejerce efectos indirectos supresores sobre la activación macrofágica al influir, además de en la producción FNTα, también de INFγ (55, 51, 53, 56).

Los linfocitos T como células de la respuesta inmune adquirida también son blanco de TGFβ. Se ha demostrado migración de linfocitos CD4+ y CD8+ in vitro en respuesta a concentraciones femtomolares de TGFβ (53). Se observan además efectos sobre la proliferación y diferenciación de linfocitos T. En este caso al igual que en otros se advierten efectos diferenciales. TGFβ inhibe en células T la producción de IL-2 y la proliferación subsecuente, ante su activación parcial (57, 58). Por el contrario, los efectos en células T sometidas a estímulos suficientes para su activación en presencia de TGFβ, propician proliferación de células T vírgenes particularmente en presencia de niveles bajos de IL-2 condicionados por efecto del propio TGFβ (57, 59, 50). Estas células vírgenes en proliferación presentan marcadores de activación pero no se diferencían a células efectoras Th1 o Th2 (57, 60, 61). Estudios posteriores han mostrado que TGFβ se opone a la diferenciación hacia células Th2 y Th1 al inhibir la expresión de GATA-3 y T-Bet respectivamente. Estas moléculas son factores de transcripción implicados en el desarrollo de estas subpoblaciones de linfocitos (57, 62, 63). La dicotomía de los efectos de TGFβ observada en linfocitos T, como es el caso de su acción sobre células T vírgenes o células T activadas, puede ser al menos en parte explicada por la expresión de sus receptores, la cual incrementa en células T activadas (58, 51).

En contraposición al efecto inhibitorio en la generación de células efectoras a partir de linfocitos T vírgenes, TGFβ favorece la expansión de células efectoras Th1 y Th2 previamente diferenciadas y reestimuladas nuevamente para inducir su producción de citocinas (46 ,57). Este efecto podría depender al menos en parte del bloqueo que TGFβ puede tener sobre la apoptosis en estas poblaciones efectoras (64). Otros autores sin embargo, han encontrado efectos inhibitorios sobre la producción de citocinas en células de memoria Th1, en particular INFγ, y no han observado este mismo efecto sobre células de memoria de tipo Th2 (65, 50). El efecto inhibitorio sobre la producción de INFγ, se observa también in vivo y apoyan la acción contrarreguladora de TGFβ sobre las células efectoras Th1. Más aún, también se ha informado que TGFβ se contrapone al efecto promotor de IL-12 e INFγ en la diferenciación de células Th1 (55, 66). El efecto antagónico es además recíproco y así in vitro INFγ impide la acción inhibitoria de TGFβ sobre linfocitos en etapas

tempranas de la diferenciación hacia células Th1 (57). El efecto supresor de TGFβ hacia IL-12 al parecer es mediado por IL-10 (66) y su reciprocidad se relaciona con el antagonismo entre INFγ y TGFβ (67). Entre los posibles mecanismos para estos fenómenos, se ha observado que INFγ favorece la expresión de SMAD 7 (51, 50). TGF-β es pues una citocina con efectos antagónicos contra IL-12 e INFγ y puede tener impacto en el desarrollo de la respuesta adaptativa de células T CD4+ de tipo Th1. Por el contrario no parece afectar las respuestas de tipo Th2 completamente establecidas (46, 57, 50).

Como ya se ha comentado TGFβ es producido por todas las principales células del sistema inmune y tiene también efecto sobre todas ellas. En particular la participación de esta citocina en la regulación de la actividad algunas de estas células que pudieran tener influencia en la fisiopatogenia de la TB, está siendo estudiada, entre estas células podemos incluir a las células T reguladoras y las células dendríticas. En torno a las primeras aún existe aún controversia y no se comprende bien el papel de TGFβ en su generación y función. En cuanto a las segundas es claro que TGFβ inhibe de diferentes formas su maduración y pudiera estar involucrado de esta forma en la inducción de tolerancia ante antígenos y probablemente en la generación de la respuesta inmunológica ante el bacilo de Koch en la TB. No obstante este aspecto de la respuesta inmunológica ante la TB escapa del objetivo del presente trabajo y por tanto solo se comenta en este apartado. De forma semejante los efectos de TGFβ sobre otras células del sistema inmune sólo se resumen en la figura II.

TGFβ COMO ANTIINFLAMATORIO

Como parte de sus efectos inmunomoduladores, TGFβ parece tener efecto antiinflamatorio in vivo. Este hecho se evidenció con la generación de ratones deficientes, primero TGFβ1 y después de algunas de las moléculas que intervienen en sus cascadas de señalización (68,69). Kulkarni y cols desarrollaron desde la década pasada ratones con disrupción del locus de TGFβ1 (68) que cuando logran completar su desarrollo intrauterino no muestran defectos congénitos aparentes y tienen peso semejante al de ratones control. Su desarrollo durante los primeros 10 a 14 días es también semejante al de ratones control. Sin embargo a

partir de ese momento comienzan a perder peso como parte de un síndrome de consunción que progresa hasta llevarlos a la muerte a las 3 o 4 semanas de vida (68). El estudio histopatológico de los órganos de estos ratones revela infiltración por células inflamatorias, masiva en algunos tejidos, y que genera lesiones inflamatorias en los mismos. El infiltrado inflamatorio en general se compone de macrófagos, linfocitos pequeños, linfocitos grandes

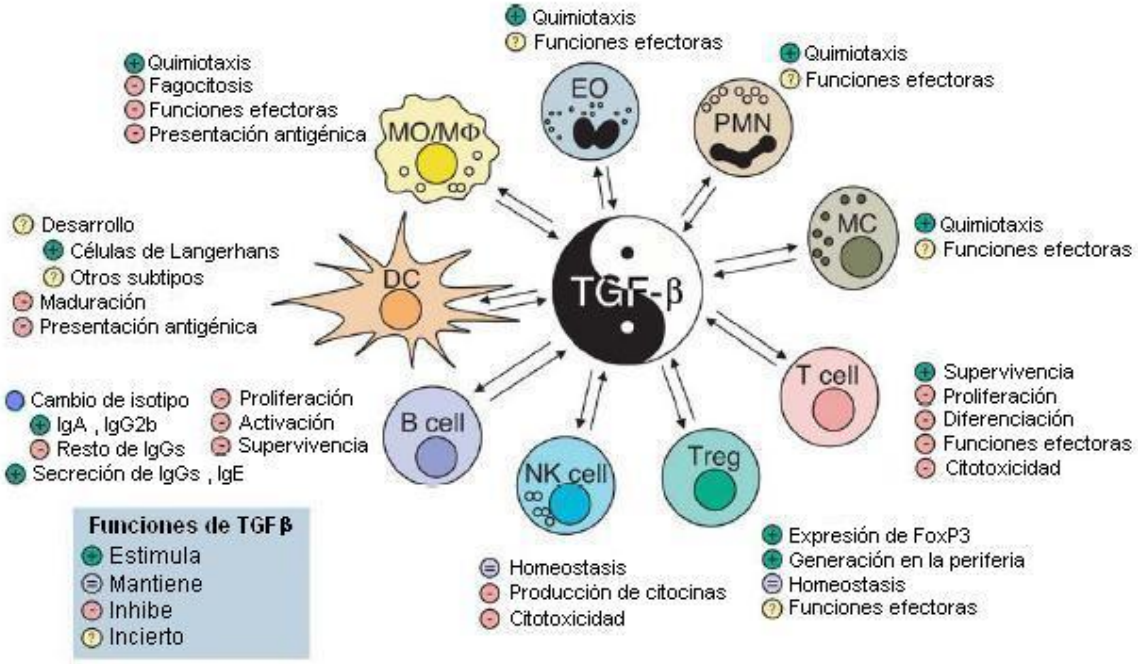


Figura II. Funciones de TGFβ sobre las células del sistema inmune.- Se muestran los principales efectos sobre los principales elementos celulares del sistema inmune. Como se puede apreciar, todos estas células producen y son blanco de los efectos de TGFβ. (MO Monocito, Mϕ Macrófago, EO Eosinófilo, PMN Neutrófilo, MC Célula cebada, LT Linfocito T, Treg Células T reguladoras, NK Células NK, LB Linfocito B, DC Célula dendrítica) (Modificado de 50)

granulares, inmunoblastos y algunas células plasmáticas (68,70). En algunos órganos predominan los neutrófilos. En estudios posteriores otros autores han encontrado además datos histopatológicos y marcadores serológicos que guardan semejanzas con los observados en algunas enfermedades autoinmunes (69, 71, 72). Entre los eventos que pudieran mediar el establecimiento de la respuesta inflamatoria en estos ratones parece estar la elevación de los niveles en plasma de INFγ y NO, que se mantiene a lo largo de la vida, y

se observa aún en ausencia de sintomatología o evidencia histológica de daño inflamatorio (70). Así mismo, la administración de anticuerpos anti-INFγ retraza la caquexia y aumenta la longevidad en estos ratones (70). Toda esta información fundamenta el papel central de TGFβ como antiinflamatorio en paralelo con sus funciones como supresor y citocina inmunomoduladora.

TGFβ Y TUBERCULOSIS

Como se ha mostrado en el apartado anterior TGFβ tiene pues efectos supresores importantes sobre la actividad de linfocitos T y en particular sobre la respuesta de tipo Th1 de linfocitos T CD4+ y sobre INFγ una de sus citocinas características. En concordancia con el papel fundamental de este tipo de respuesta en la respuesta protectora ante la TB, TGFβ parece tener impacto en el desarrollo de la TB activa.

Nuestro grupo en un trabajo previo no publicado bloqueó la actividad de TGFβ con betaglicano soluble en ratones con tuberculosis. Los resultados resultan interesantes ya que se observó reducción significativa en la carga bacteriana y reactivación de la respuesta inmune protectora. Sin embargo la mortalidad no se vio afectada. El análisis morfológico del tejido pulmonar solucionó esta paradoja. La extensión de la áreas neumónicas en los animales en que se bloqueó la actividad de TGFβ fueron muy superiores a las de animales no tratados. Luego, aunque la maniobra terapéutica fue eficaz en ayudar a controlar la carga bacteriana, la ausencia de actividad de TGFβ promovió una respuesta inflamatoria demasiado intensa que llevó a los ratones a la muerte. Este resultado guarda relación con la actividad antiinflamatoria natural del TGFβ que se hace particularmente evidente en los modelos de ratones deficientes en esta citocina (68).

En el humano se ha descrito la expresión genética y producción de TGFβ activo en monocitos de sangre periférica de pacientes con tuberculosis comparados con controles sanos (38). La producción de la citocina por éstas células es además, de acuerdo a otros autores, mayor en pacientes con tuberculosis que en controles sanos, y en pacientes con tuberculosis avanzada comparados con pacientes con tuberculosis moderada (39). En suero

también se han informado niveles incrementados de TGFβ en pacientes con tuberculosis avanzada al contrastar contra pacientes con tuberculosis moderada o contactos sanos (40).

La presencia de TGFβ activo se hace así mismo evidente en el sobrenadante de lavados bronquioalveolares de pacientes adultos con tuberculosis comparados con voluntarios sanos o pacientes con otras neumopatías (41), y a nivel de expresión génica en muestras semejantes al comparar niños con tuberculosis contra niños con otras neumopatías (42). Los tejidos no son excepción en cuanto a la presencia de TGFβ, y de acuerdo con ello, se han publicado informes sobre la expresión por inmunohistoquímica de la citocina en granulomas pulmonares de forma aislada (38,73) o en comparación contra controles (43), y en sitios de tuberculosis activa en piel (74). Otro estudio muestra además que las células mononucleares de sangre periférica de pacientes con tuberculosis al ser estimuladas con PPD (derivado proteico purificado de Mtb) muestran producción incrementada de TGFβ que vuelve a niveles basales tras la antibioticoterapia (75). Finalmente no sólo se ha demostrado la presencia de esta citocina en pacientes con tuberculosis, sino que los niveles de ella también guardan correlación con la extensión de la enfermedad (55).

PROSTAGLANDINAS

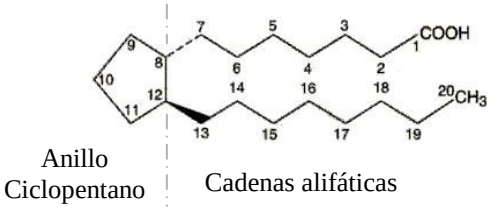
Los prostanoides, que abarcan a las prostaglandinas (PGs) y tromoboxanos (TXs), forman parte de una familia de lípidos bioactivos conocidos como eicosanoides (76,77). La estructura de los prostanoides deriva hipotéticamente del ácido prostanoico que se muestra en la (figura III-A). En las PGs, a esta estructura básica se agregan insaturaciones y diferentes sustituyentes. De acuerdo a los sustituyentes se asignan letras y así hay prostaglandina A (PGA), prostaglandina B (PGB), PGC, PGD, PGE, PGF, PGG, PGH y PGI (figura III-B) (77). Es notable la diferencia estructural y funcional que puede surgir entre dos PGs por la simple localización espacial de estos sustituyentes (34). De la posición de las insaturaciones derivan a su vez tres series de PGs (figura III-C). (77).

En el humano y en general en los mamíferos las PGs se generan principalmente a partir del ácido araquidónico (5,8,11,14-eicosatetraenóico) (34,77). La concentración de ácido araquidónico libre es baja y la síntesis de eicosanoides depende de su liberación a partir de sus fuentes esterificadas como son los fosfolípidos de membrana(77). Tras la liberación del araquidonato, la prostaglandin-endoperóxido-sintasa o ciclooxigenasa (COX) cataliza la conversión del ácido araquidónico en PGG_2 (actividad de ciclooxigenasa) y posteriormente en PGH_2 (actividad de hidroperoxidasa). PGH_2 es el precursor general de las PGs de la serie 2 (34,77). La síntesis de PGs especificas a partir de PGH_2 mediante la acción de prostaglandin-sintasas específicas, sucede en diferentes tejidos de modo preferencial hacia alguna en particular (figura III-D) (77).

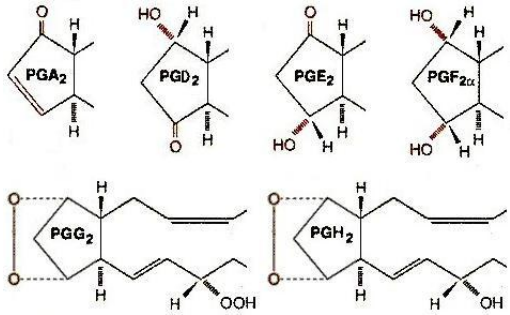
SÍNTESIS DE PROSTAGLANDINAS Y SU REGULACIÓN

Actualmente se reconoce a la COX como la enzima que orquesta la producción de PGs (34). De ésta se han purificado y clonado dos isoformas la ciclooxigenasa 1 (COX1) y la ciclooxigenasa 2 (COX2) (34). El gen de la COX1 humana exhibe características típicas de genes que se expresan constitutivamente. En contraste, el promotor del gen de la COX2 contiene en la región promotora muchos elementos regulatorios (78,34,79). Esta estructura génica guarda relación con la expresión de ambas enzimas. La COX1 se expresa constitutivamente en numerosos tejidos y coordina la producción fisiológica de PGs que regulan procesos importantes como la coagulación, el flujo sanguíneo en el riñón y la citoprotección de la mucosa gástrica (34,80). La COX2 por el contrario no está presente en condiciones basales en diferentes tejidos, y su producción es inducida en ciertas poblaciones celulares (polimorfonucleares, monocitos, macrófagos, fibroblastos, células cebadas, células endoteliales) en respuesta a una gama de estímulos: mitógenos, citocinas, lipopolisacáridos, hormonas, productos bacterianos, suero y transformación oncogénica (81, 34). No obstante esta dicotomía la COX1 también puede incrementar su expresión en los fenómenos inflamatorios (82). La síntesis de la COX2 es promovida en general por la presencia en el microambiente de citocinas proinflamatorias (FNTα, IL-1β), la presencia de productos bacterianos (LPS) y puede ser también inducida por el EGF, el TGFβ, la epinefrina o el anión superóxido (76). En ocasiones, la cooperación sinérgica

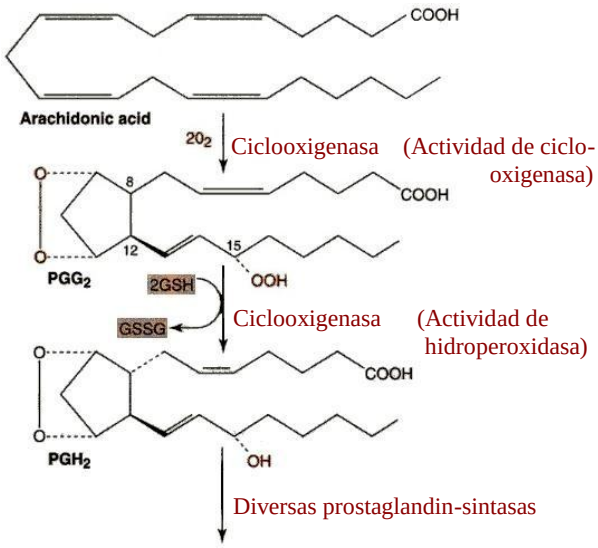
A. Las prostaglandinas son derivados hipotéticos del ácido prostanóico.
Contienen en su estructura un anillo ciclopentano y dos cadenas alifáticas.



B. De la naturaleza de los sustituyentes en el anillo ciclopentano surgen diferentes prostaglandinas que se denominan con letras

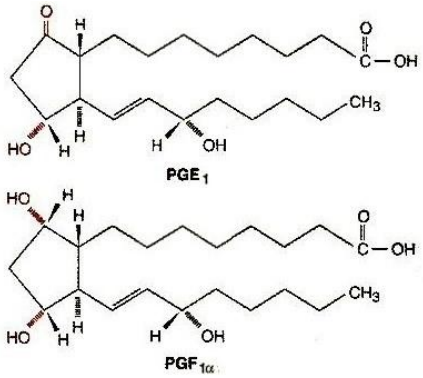


D. Reacciones de síntesis de las prostaglandinas

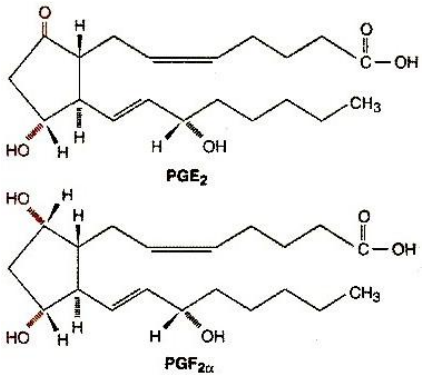


PGA$_2$, **PGD$_2$**, **PGE$_2$**, **PGF$_{2\alpha}$**, **PGI$_2$**, etc.

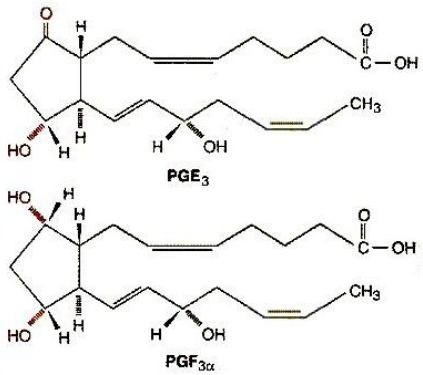
C. De la presencia de insaturaciones en las cadenas alifáticas surgen series de prostaglandinas que se designan con números



Serie PG$_1$ $\Rightarrow$ Doble enlace : trans- Δ^{13}



Serie PG$_2$ $\Rightarrow$ Doble enlace : cis- Δ^{5}, trans- Δ^{13}



Serie PG$_2$ $\Rightarrow$ Doble enlace : cis- Δ^{5}, trans- Δ^{13}, cis- Δ^{17}

Figura III. Nomenclatura y síntesis de prostaglandinas. Se muestran la estructura básica en base a la que se nombran las PGs (A), la designación con letras (B) y números que reciben (C), y las reacciones para su síntesis (D).

entre citocinas promueve una mejoría en la expresión de la COX2 como sucede ante la producción de FNTα, en un microambiente rico en IFNγ (34). A su vez la regulación negativa de la síntesis de COX2 es favorecida por la presencia en el microambiente de citocinas como la IL-4, la IL-10 e IL-13. La inducción de la COX2 dependiente de LPS, es regulada negativamente por estas citocinas en monocitos humanos de sangre periférica (34). No obstante todos estos datos sólo se refieren a la regulación de la COX2, y la producción y efectos de las prostaglandinas como se comentará a continuación dependen además de muchos otros factores.

PROSTAGLANDINAS EN LA RESPUESTA INMUNE

La participación de las PGs en la inflamación y en la respuesta inmune se hizo evidente poco después de su caracterización inicial. Se observó por ejemplo que la administración de éstas aisladas o en combinación, podía reproducir los signos cardinales de la inflamación. Además, se encontraban niveles elevados de éstas en tejidos inflamados. Por estos hechos se les calificó de inicio como mediadores proinflamatorios, sin embargo conforme ha avanzado nuestro conocimiento acerca de estos lípidos bioactivos, ha quedado claro que pueden actuar tanto para promover como para inhibir el proceso inflamatorio (82). Más aún el efecto de diferentes prostanoides, y en particular diferentes PGs varía en función del tipo celular, tejido, mediadores presentes y estado de activación celular.

Entre estas variaciones hallamos cambios dramáticos en el perfil de producción de PGs durante el proceso inflamatorio, por ejemplo en un modelo de pleuritis se observan niveles elevados de PGE_2 durante la etapa inicial del proceso inflamatorio y predominio de PGD_2 en los estadios finales de la respuesta (82).

La expresión, actividad e interacción con diferentes enzimas de las dos isoformas de COX también varía, y esta variación influye en el perfil de PGs. Así, en modelos de respuesta inflamatoria en piel o usando líneas de mastocitos (82, 83), COX1 es la principal mediadora de la producción de prostanoides en los fenómenos iniciales del proceso inflamatorio, y por el contrario la producción de PGD_2 en mastocitos después de las 2 horas depende

primordialmente de la actividad de la COX2 (82, 83). La expresión diferencial de ambas COX por sí sola no explica la generación de diferentes PGs en diferentes etapas del proceso inflamatorio. No obstante Naraba y cols han demostrado, que la actividad de COX2 está acoplada a la actividad de la PGE_2 sintasa, y que resulta en la producción de PGE_2 como prostanoide preferente frente al tromboxano A_2 sin que COX1 participe en este proceso (84). Además algunas sintasas como la PGE_2 sintasa de prostaglandinas son inducibles y pueden ser reguladas por la presencia de mediadores en el medio (84, 85).

El efecto de una misma PG cambia de forma semejante en función de los receptores estimulados. En el caso de la PGE sus receptores EP2 y EP4, pese compartir el mismo sistema de transducción a través de proteínas Gs, han demostrado tener diferentes niveles de expresión, inducción diferencial por ejemplo ante LPS, y determinar diferente fenotipo en los ratones deficientes en ellos (82). Lo que demuestra una regulación independiente de diferentes receptores aún para una misma PG, y que puede influir en los diferentes efectos de diferentes PGs.

En suma podemos decir que el papel de las PGs en la respuesta inflamatoria e inmunológica es complejo y depende no sólo del tipo de PGs presentes, sino de los receptores presentes, de las estirpes celulares efectoras involucradas, del tejido y el microambiente.

Tomando en consideración todo lo anterior, algunas de las funciones importantes de las PGs y en particular de PGE_2 y algunos otros eicosanoides relacionados se comentan enseguida.

Tanto PGE_2 como PGD_2 se han descrito como efectores proinflamatorios en piel, pleura e in vitro como mediadores producidos por células blancas (82). PGE_2 y PGI_2 son potentes vasodilatadores, se hallan presentes en tejidos inflamados en cantidades suficientes para mediar los efectos vasculares de la inflamación, y se han identificado como los promotores de la inflamación en modelos in vivo en piel y tejidos blandos (86, 82). La $PGF_{2\alpha}$ también es un eicosanoide de amplia distribución que media efectos de vasodilatación e incremento

de la permeabilidad en venas postcapilares (87). Por otro lado PGD_2 se ha visto implicada como un mediador central en procesos inflamatorios crónicos como el asma y la dermatitis crónica (88, 89, 90).

En contraste con los efectos proinflamatorios de las PGs, están de igual forma bien demostrados sus efectos antiinflamatorios y sus efectos supresores sobre la respuesta inmune celular, en particular de la PGE_2. Este eicosanoide inhibe algunas respuestas inflamatorias iniciadas por degranulación de células cebadas (91). En el modelo de pleuritis en rata, la resolución del proceso inflamatorio se acompaña de la producción de PGE_2 y su inhibición lo exacerba (92). PGE_2 inhibe la activación y proliferación de linfocitos T mediante su efecto en receptores EP2 (82). También inhibe la producción de INFγ e IL-2, y de esta forma tiene efecto sobre la respuesta de tipo Th1. No obstante, hay datos contradictorios sobre su papel en la producción de citocinas de tipo Th2 (82).

En el caso de los efectos de las PGs sobre la respuesta inmune adaptativa y sobre las funciones de los linfocitos T y B, puede haber también efectos con direcciones contrarias con diferentes mediadores de este grupo (82). En pulmón se han estudiado en el contexto del asma.

EFECTOS DE PGE_2 EN PADECIMIENTOS
INFECCIOSOS CRÓNICOS Y EN LA TUBERCULOSIS

Al igual que TGFβ, también la PGE_2, se ha relacionado con infecciones de curso crónico y en particular con la tuberculosis. Se encuentra elevada en diferentes enfermedades parasitarias como las causadas por Cryptosporidium parvum (93), Toxoplasma gondii (94), Leishmania donovani (95) y major (96), y Trypanosoma cruzi (93,97,98). Y en algunos de estos padecimientos se ha demostrado está involucrada en la inmunosupresión que los acompaña como es el caso de las infecciones por Paracoccidioides brasilensis (99) y la fase aguda de la infección por Trypanosoma cruzi (93). Como parte de esta actividad inmunosupresora, se observa que PGE_2 inhibe la síntesis de IL-2 y su receptor (96), así como la producción de INFγ (100). IL-1 y FNTα son también blancos de los efectos de

PGE_2 con repercusiones semejantes a las que se observan sobre INFγ (101). PGE_2 tiene además efectos sobre leucocitos. En un modelo murino del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (MAIDS), en el cual se infecta a los ratones con el retrovirus de la leucemia murina (RadLV-Rs), se ha documentado anergia de las células T mediada por un incremento en los niveles de PGE_2. Esta anergia revierte con la administración de inhibidores de la producción de PGE_2 (102). En las infecciones micobacterianas se han documentado de forma semejante efectos inmunosupresores de la PGE_2 sobre macrófagos. Mycobacterium avium induce la expresión de las enzimas necesarias para la producción de PGE_2 (78), y a su vez las cepas virulentas de este bacilo atenúan la activación macrofágica mediante la producción de esta prostaglandina (103). De hecho en humanos se ha informado un caso de enfermedad diseminada por Mycobacterium avium en el cual los monocitos del paciente mostraban actividad micobactericida deficiente que se restauraba con indometacina, un antiinflamatorio no esteroideo que bloquea la producción de PGs (104). En el caso particular de la tuberculosis, nuestro grupo ha demostrado que en la tuberculosis pulmonar experimental murina, la fase crónica de la infección se acompaña de niveles elevados de PGE_2 determinados por inmunohistoquímica y ELISA (76). Más aún, al suprimir la producción de PGs, en esa misma fase de la enfermedad, se observó reducción de las áreas neumónicas y de la carga bacteriana, a la vez que incrementó de manera importante el área de los granulomas del tejido pulmonar (76).

INMUNOMODULADORES EN LA TUBERCULOSIS MURINA

Debido a los efectos inmunológicos supresores de TGFβ y PGE_2, su aparente implicación en la tuberculosis murina y humana, y la disponibilidad de inhibidores potentes de su actividad, una potencial intervención inmunomoduladora en tuberculosis sería el bloqueo de estos mediadores. De esta manera, la asociación de betaglicano soluble, como agente bloqueador de la actividad de TGFβ, con antiinflamatorios no esteroideos COX2 selectivos como el ácido niflúmico, podría ser una combinación eficaz para combatir la infección por la micobacteria en nuestro modelo, que además pudiera evitar la presencia de inflamación excesiva observada en la administración aislada de betaglicano soluble.

INHIBIDORES DE TGFβ

Debido a su participación en diferentes procesos fisiológicos y fisiopatológicos, varios autores han empleado la estrategia de bloquear la actividad del TGFβ con fines terapéuticos. Se han empleado anticuerpos contra esta citocina y moléculas con afinidad natural por ella, entre otros. Diferentes moléculas son capaces de unir TGFβ, y bajo determinadas circunstancias "secuestrarlo" de forma que no tenga acceso a sus receptores en la membrana. Entre ellas están el betaglicano, la endoglina, el péptido asociado de latencia (LAP), y la decorina. Las dos primeras son proteínas transmembrana que de forma individual forman complejos con los receptores tipo I y II del TGFβ y que por tanto se consideran como receptores tipo III (105). El tercero como ya se ha comentado es un pro-péptido que deriva del mismo polipéptido que el TGFβ y que se puede mantener unido a él impidiendo que interactúe con sus receptores. La cuarta es un proteoglucano de 45 kd, abundante en la matriz extracelular de tejidos como el cartílago y el tejido conectivo, y que reduce por competitividad la unión de TGFβ en 71% (106).

El betaglicano es un proteoglucano de membrana con cadenas de heparán y condroitin sulfato con peso aproximado de 200 kd, unidas a una proteína central de 100 kd (45, 107). La proporción de condroitin y heparán sulfato varían de una estirpe celular a otra, lo que da heterogeneidad al betaglicano (45). Tiene una cola citoplásmica corta sin dominios que sugieran actividad de señalización intracelular (45, 105, 107). Su expresión abarca una amplia gama de estirpes celulares epiteliales, mesenquimales y neurales (105); y en muchas líneas celulares es la molécula de superficie de unión a TGFβ más frecuente (45). Forma homodímeros (48) y el TGFβ se une a su porción protéica, las cadenas de glucosaminoglucano unidas a ella no son necesarias para esta interacción (107). Las tres isoformas de TGFβ tienen gran afinidad por el betaglicano ($K_D \sim 10^{-10}$ M), cosa que no ocurre con los otros dos receptores que muestran menor afinidad por $TGF\beta_2$. Se ha sugerido que la función del betaglicano sea favorecer la interacción de TGFβ con sus receptores (108). Este efecto se hace particularmente evidente con el $TGF\beta_2$ pues la transfección de betaglicano incrementa de forma importante si sensibilidad a $TGF\beta_2$ en comparación con células control que no poseen betaglicano (108). Por otro lado en cultivos celulares, en la

matriz extracelular y en el suero se puede encontrar una forma de betaglicano no anclada a la membrana (45). Los niveles en suero y matriz extracelular son bajos. No obstante, es posible que también tenga una función fisiológica reguladora sobre la actividad de TGFβ en su forma soluble, al unirse a TGFβ e impedir la interacción con sus receptores (45, 108). In vitro el betaglicano presente en forma soluble en rangos picomolares inhibe la unión de TGFβ a sus receptores en un 80 a 98% (108).

La endoglina al igual que el betaglicano es una proteína de membrana que forma homodímeros y une con alta afinidad TGFβ ($K_D \sim 10^{-10}$ M). No obstante su distribución es más limitada, se expresa principalmente en endotelio; y al igual que los receptores tipo I y II de TGFβ une con muy baja afinidad $TGF\beta_2$ (105, 107).

El betaglicano soluble es pues un potente inhibidor de la actividad de TGFβ, con ventajas sobre otros debido a su potencia y su efecto sobre las tres isoformas (109).

INHIBIDORES DE PROSTAGLANDINAS Y PGE_2

Los fármacos empleados para la inhibición de la actividad enzimática de ciclooxigenasa (COX) son clasificados en cuatro grupos. Un ejemplo clásico de los fármacos del primer grupo es la aspirina, la cual acetila irreversiblemente un residuo de serina en el sitio activo de ambas isoformas (COX1 y COX2). En el segundo grupo, están los fármacos que se comportan como inhibidores competitivos reversibles de ambas isoenzimas (mefenamato e ibuprofeno). El flurbiprofeno y la indometacina, pertenecen al tercer grupo, que causa una inhibición lenta y tiempo dependiente de la COX1 y la COX2. Los fármacos del cuarto grupo, inhiben de manera selectiva a la COX2. Son inhibidores competitivos débiles de la COX1, pero que inhiben a la COX2 mediante un proceso lento y tiempo dependiente (81). Entre éstos se hallan la nimesulida y el ácido niflúmico.

La manipulación farmacológica con drogas anti-inflamatorias no esteroideas, selectivas para cada una de las isoformas puede permitir la manipulación de los efectos de las PGs en contextos específicos como lo sería la inflamación. En un entorno inflamatorio las PGs

participantes derivan de la COX2 inducida por los estímulos ya comentados. Cuando entre sus efectos se cuentan como en el caso de la PGE_2 efectos inmunosupresores, el bloqueo de la producción de PGs pudiera resultar benéfico .

Ejemplos del empleo de AINEs en procesos infecciosos, en los que la PGE_2 tiene participación en la patogenia, se puede observar en micobacterias. En un modelo murino de infección con Micobacterium avium intracellulare, se encuentra que los macrófagos son una fuente generosa de PGE_2. In vitro, la PGE_2 a las concentraciones encontradas in vivo, es capaz de inhibir la proliferación de linfocitos y suprimir la producción de IFNγ previniendo la activación microbicida del macrófago y favoreciendo la persistencia de la infección. Estos efectos fueron contrarrestados por el uso de la indometacina (110). En nuestro modelo de tuberculosis pulmonar murina experimental, en la fase crónica, los niveles de PGE_2 son cuatro veces los observados en la fase aguda. El tratamiento con ácido niflúmico permite la reducción significativa los niveles de PGE_2, a la vez que se reducen la carga bacilar y las áreas de daño tisular representadas por áreas neumónicas (76).

JUSTIFICACIÓN

La tuberculosis continúa siendo un problema de salud publica a nivel mundial. El control de la enfermedad se ve limitado, entre otras causas por la necesidad de tratamientos prolongados que favorecen poco apego de los pacientes a los mismos; por la aparición de cepas resistentes a las diferentes drogas empleadas; y por factores inherentes al hospedero que incrementan la susceptibilidad de éste a la infección como la es infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). La enfermedad se presenta y progresa debido a una respuesta inmune celular deficiente. TGFβ y PGE_2 son mediadores con un papel importante en el abatimiento de la respuesta inmune celular. La modulación de la respuesta inmune constituye una vía alentadora que pudiera modificar favorablemente algunos de los ya expuestos factores limitantes para el control de la enfermedad. El modelo murino de tuberculosis pulmonar ofrece una alternativa válida para el estudio de los fenómenos inmunológicos en esta enfermedad y la aplicación inicial de terapias inmunomoduladoras en forma aislada o como adyuvantes a la antibioticoterapia.

HIPÓTESIS

La reactivación de la respuesta inmune celular en la tuberculosis avanzada, se puede lograr empleando una terapia combinada de Betaglicano soluble y antiinflamatorios no esteroideos, que favorezca además un control eficaz de la tuberculosis pulmonar experimental murina avanzada.

OBJETIVO GENERAL DEL PROYECTO

Evaluar, en el modelo murino de tuberculosis pulmonar en fase avanzada, el efecto de la terapia combinada con betaglicano soluble y antiinflamatorios no esteroideos sobre la respuesta inmune ante la infección, la evolución de la enfermedad y la aparición de algunas de sus potenciales secuelas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1.- Evaluar la efectividad del Betaglicano soluble y los antiinflamatorios no esteroideos en terapia combinada, como agentes promotores de un patrón de respuesta inmune celular adaptativa tipo 1 protectora.

2.- Evaluar la evolución de la enfermedad en los ratones tratados con la inmunoterapia combinada, en comparación con animales control bajo las mismas condiciones experimentales.

3.-Evaluar la evolución de la enfermedad en los ratones tratados con la inmunoterapia combinada más antibioticoterapia, en comparación con animales en los que se administre antibioticoterapia sola o inmunoterapia combinada sola, bajo las mismas condiciones experimentales.

4.-Mediante el empleo de antiinflamatorios no esteroideos, evaluar la supresión de la respuesta inflamatoria exagerada ocasionada por el bloqueo de la actividad del TGFβ durante la fase crónica de la tuberculosis experimental murina.

5.-Evaluar el efecto de la inmunoterapia combinada sobre algunas de las secuelas de la enfermedad una de las cuales es la presencia de fibrosis en el parénquima pulmonar de los ratones con infección crónica.

MATERIAL Y MÉTODOS

ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Se emplearon ratones singénicos Balb/c, machos, con edades de entre 6 y 8 semanas al inicio del estudio, libres de patógenos. Estos animales se obtuvieron del pie de cría del bioterio del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán", y se manejaron durante todo el estudio en cajas con microaisladores conectados a un sistema controlado de presión negativa dentro del área de Patología Experimental del bioterio de este mismo instituto. La alimentación y limpieza de las jaulas se llevaran a cabo mediante sistemas semiautomatizados, y bajo los procedimientos estándar previamente establecidos. El protocolo de este estudio fue aprobado por el comité de ética para la experimentación en animales del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán".

REPRODUCCIÓN DEL MODELO DE TUBERCULOSIS PULMONAR MURINA

Bacilos virulentos de la especie Mycobacterium tuberculosis, cepa H37Rv, se cultivaron en medio Proskauer y Beck modificado, a 37°c, en una atmósfera de CO_2 al 5%, por cuatro semanas. La biomasa bacteriana se colectó por centrifugación, se resuspendió volumen a volumen en solución salina fisiológica con Tween 80 (SIGMA, St. Louis, MO, USA) al 0.05%, y se disgregó con 2 ciclos de sonicado. Las bacterias recuperadas y resuspendieron en solución salina fisiológica (SSF) estéril. Se determinó la cuenta bacilar viable empleando el método de diacetato de fluoresceína en una cámara de Neubauer. Con este dato se ajustó la suspensión de micobacterias a una concentración de $1x10^7$ bacterias/mL. Esta suspensión se preparó justo antes de la inoculación.

Una vez preparada la bacteria, se anestesiaron los ratones mediante la aplicación de pentotal intraperitoneal a dosis de 56 mg/kg. Posteriormente, en una campana de bioseguridad nivel III, se expuso la tráquea y se inyectaron directamente al lumen traqueal 0.1 mL de la suspensión bacteriana ($lxl0^6$ bacilos vivos) Se cerró la incisión con seda estéril y se mantuvo a los animales en posición vertical hasta que hubo desaparecido el efecto anestésico. Se dejó evolucionar la enfermedad 1 mes para alcanzar la fase crónica o avanzada de la misma, y de este modo, poder proceder a la administración los diferentes tratamientos.

DEFINICIÓN DE LOS TRATAMIENTOS

Para lograr el bloqueo de la actividad del TGF-β se empleó betaglicano soluble producido en el Laboratorio de Biología Celular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. En su producción se utilizó cDNA de rata modificado de forma que codificara para una proteína de secreción correspondiente a la porción extracelular del betaglicano, en un sistema de expresión baculoviral en células de insecto (108,109). El producto protéico se purificó después mediante cromatografía por afinidad con iones metálicos fijos de acuerdo a procedimientos previamente estandarizados y probados (111). Finalmente se corroboró se mantuviera la afinidad del betaglicano soluble obtenido mediante ensayos de competición

por unión al ligando (109). Nuestro grupo determinó previamente la dosis de betaglicano soluble que se aplicaría mediante una serie de experimentos piloto. En éstos se administraron tres dosis diferentes de betaglicano soluble en ratones infectados, y se emplearon la medición de la reacción de hipersensibilidad tardía ante antígenos de la micobacteria y la carga bacilar en los pulmones, como parámetros para evaluar la inhibición (datos no publicados). La dosis determinada por este método fue de 30μg dos veces por semana. La administración del betaglicano soluble se hizo por vía intraperitoneal, como vehículo para cada dosis de betaglicano soluble se emplearon 100μl de PBS.

Para inhibir la actividad de PGE_2 se empleó un antiinflamatorio no esteroideo con actividad selectiva para la ciclooxigenasa 2, el ácido niflúmico (Cayman Chemical Co, USA). En estudios previos se probaron tres diferentes drogas COX2 específicas, ácido niflúmico, ácido mefenámico y nimesulida; en tres diferentes dosis, 0.5 mg, 1 mg o 2mg cada 12 hrs. Midiendo la concentración de PGE_2 por ELISA se determinó que el ácido niflúmico a dosis de 0.5 mg cada 12 hrs conseguía la mejor supresión de la producción de esta prostaglandina (76). Se administraron pues por vía intragástrica, con una cánula orogástrica adaptada a una jeringa, dos dosis diarias de 500μg disueltas en 500μl de solución de NaOH al 0.001 M en PBS de acuerdo a lo previamente descrito (34).

En un primer experimento se emplearon sólo estos dos tratamientos. Se realizó un segundo experimento en el que se administró además terapia antifímica con rifampicina 10 mg/kg, isoniacida 10mg/kg, y pirazinamida 30mg/kg. El tratamiento con estas drogas se administró de forma diaria en forma intragástrica también con una cánula orogástrica adaptada a una jeringa de acuerdo a lo previamente descrito (35).

De acuerdo a experimentos previos con este modelo, los resultados obtenidos y su variabilidad, y considerando parámetros semejantes a los evaluados en el presente estudio, se determinó el número mínimo de animales por grupo necesario para encontrar diferencias estocásticas para un nivel de confianza del 95% y con un poder del 80%. De acuerdo al diseño del estudio se empleó un nomograma para la comparación de múltiples tratamientos

(112). El número mínimo adecuado de sujetos experimentales obtenido por éste método fue de 4. Considerando las diferentes pruebas a realizar y buscando obtener ese número de observaciones para cada una de ellas, se determinó infectar 10 ratones por grupo de tratamiento por tiempo de sacrificio. Los grupos de animales para cada grupo experimental se formaron con ratones elegidos al azar que se colocaron en cajas diferentes de modo que esta distribución por grupo de tratamiento y tiempo de sacrificio se mantuvo durante todo el estudio. Se emplearon los siguientes tratamientos. En el primer experimento: a) PBS y solución de NaOH como placebos, b) Betaglicano soluble, c)Ácido niflúmico, y d) Betaglicano soluble y ácido niflúmico. En el segundo experimento: a) PBS y solución de NaOH como placebos, b)Betaglicano soluble y ácido niflúmico, c)Drogas antifímicas, y d)Drogas antifímicas, betaglicano soluble y ácido niflúmico. Se emplearon pues en cada experimento 40 ratones por tiempo de sacrificio y 160 ratones por experimento en total. Todos los tratamientos se administraron en una campana de bioseguridad nivel III.

VARIABLES

De acuerdo a los objetivos se definieron las variables a evaluar: actividad de la respuesta inmune celular, patrón de respuesta inmune celular (tipo Th1 o Th2), progresión histológica de la enfermedad, respuesta microbiológica y secuelas. La actividad de la respuesta inmune celular se evaluó de forma general mediante la respuesta de hipersensibilidad tardía ante antígenos micobacterianos (DTH). Se determinaron además como manifestación específica del patrón de respuesta celular presente, tipo 1 o tipo 2, citocinas representativas mediante RT-PCR en homogenizados de pulmón y mediante ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay). Como marcadores tisulares de la progresión de la enfermedad se midieron las áreas de neumonía, y la extensión de las áreas de inflamación granulomatosa en preparaciones histológicas convencionales teñidas con hematoxilina/eosina (H-E). La respuesta microbiológica se evaluó midiendo la carga bacilar en los pulmones mediante el cultivo de homogeneizados de pulmón. La presencia de secuelas y su magnitud, se evaluaron midiendo las áreas de fibrosis presentes en el tejido pulmonar. Para ello se emplearon también cortes histológicos convencionales, pero se empleó la tinción de Masson que evidencia en color azul las fibras de colágena del tejido fibroso.

COLECCIÓN DE MUESTRAS

Los tratamientos o el placebo se administraron a partir del día 30 de evolución de la infección de acuerdo a los esquemas definidos en párrafos anteriores. Se llevaron a cabo sacrificios a los 15,30,45 y 60 días de administración del tratamiento o el placebo para cada grupo. Se sacrificaron por exanguinación 10 ratones de cada grupo en cada tiempo de sacrificio. Los procedimientos del sacrificio ,descritos previamente (14,32), se realizaron en una campana de bioseguridad nivel III.

Antes del sacrificio se midió la DTH. Al momento del sacrificio se expusieron y disecaron los pulmones. Se pinzó uno de los bronquios principales y se perfundió el pulmón contralateral con etanol absoluto. Se alternó el bronquio pinzado, izquierdo o derecho, de un animal a otro, para evitar obtener en un mismo grupo sólo pulmones derechos o izquierdos para el análisis histológico. Del pulmón restante en cada ratón se eliminaron los ganglios linfáticos de hilio, se congeló en nitrógeno líquido, y se almacenó a –80ºC hasta su uso en la extracción de RNA y proteínas, o para cultivarse.

PRUEBA DE HIPERSENSIBILIDAD RETARDADA

La reacción de hipersensibilidad retardada (DTH) se midió por triplicado el espesor del cojinete plantar de la extremidad posterior izquierda con un calibrador de ingeniero, 24 horas previas al sacrificio de cada ratón. Inmediatamente tras la medición se inyectaron 20 μg de antígenos totales solubles de Mtb (34) en el mismo cojinete plantar. 24 horas más tarde, inmediatamente antes del sacrificio se midió nuevamente por triplicado el espesor del mismo cojinete plantar inyectado. Se calculó el promedio de las mediciones previas a la inyección y el de las posteriores. La diferencia entre ambas mediciones se multiplicó por una constante ya definida (113) para obtener el incremento en espesor del cojinete en micras.

DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNETICA DE CITOCINAS

Para la obtención de RNA y proteínas se emplearon 4 de los pulmones congelados obtenidos para cada grupo y tiempo de sacrificio. El RNA y proteínas se aislaron de los

homogenizados de estos pulmones, usando Trizol de acuerdo a la indicaciones del fabricante (Gibco/BRL, Gaithersburg, MD, USA) (14,32). Debido a la cantidad de RNA obtenida de cada ratón, se reunió el RNA obtenido de los 4 pulmones de cada grupo de tratamiento de cada tiempo de sacrificio en un solo vial. El RNA total se trató con DNAsa pancreática bovina, y luego se llevó a cabo la RT-PCR empleando la transcriptasa inversa del virus de la leucemia murina de Maloney (MMLV) y oligo dT como inciador (Gibco/BRL, Gaithersburg, MD, USA). El RNA híbrido fue eliminado por tratamiento con RNAsa H. El cDNA obtenido se sometió a PCR con iniciadores murinos específicos previamente descritos para FNTα, IL-2, IL-4 e IL-10 (14,32,34). Los productos de la reacción se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida al 6%, acompañados de marcadores estándar de peso molecular de masa y concentración conocidas (low DNA mass ladder, Gibco/BRL, Gaithersburg, MD, USA). De acuerdo a lo previamente descrito, se identificaron las bandas de interés en los geles y se estimó la concentración de RNA inicial para cada citocina por comparación con el marcador de pesos moleculares empleando un sistema densitométrico de análisis de imágenes adaptado a una computadora (ID image analysis software, Kodak Digital Science, Rochester , NY, USA) (14,32,34). La enzima gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa se empleó como control para corroborar la integridad del RNA empleado para la retrotranscripción.

DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN TRADUCCIONAL DE CITOCINAS

Del material restante de la técnica de Trizol después de haber obtenido el RNAm, se precipitó el DNA y se recolectó la fase orgánica remanente, que contiene las fase proteica del homogeneizado. La muestras de cada animal empleadas para esta determinación se mantuvieron y procesaron en forma independiente. La fase recuperada se sometió dos veces, por 24 horas, a diálisis contra duodecil sulfato de sodio (SDS) al 0.1% y 0.01% (SIGMA, St. Louis, MO, USA), empleando membranas de diálsis con límite de exclusión de 3500 Da. Se realizó entonces la cuantificación de proteínas por la técnica de Bradford contra una curva estándar de albúmina sérica bovina (BSA) (34). Se ajustó la concentración de proteínas de cada muestra a 1 mg/mL y se generaron alícuotas. Las alícuotas se analizaron por el método de ELISA con pares de anticuerpos monoclonales específicos para

IFN-γ, IL-2 e IL-4 (Pharmingen, San Diego, CA, USA), y para FNTα con anticuerpos monoclonal de captura y policlonal de detección (Pharmingen, San Diego, CA, USA) (14,32). Para determinar la concentración de las citocinas en las muestras se emplearon curvas estándares por duplicado de proteína recombinante de la citocina correspondiente. La detección se realizó con anticuerpos biotinilados, complejo avidina-peroxidasa y ortofenilendiamina (SIGMA, St. Louis, MO, USA) como cromógeno para el revelado (14,32). Se obtuvieron las concentraciones de citocinas de las muestras expresadas en pg/mL por mg de proteína total al medir las densidades ópticas a 492 nm e interpolar en la curva tipo de citocina recombinante.

PROCESAMIENTO DE LOS TEJIDOS PARA EL ANÁLISIS HISTOLÓGICO

Para el análisis histológico se empleó, de cada ratón sacrificado, el pulmón perfundido con etanol durante el sacrificio. Los pulmones empleados se dejaron fijar por 24 hr en etanol absoluto tras el sacrificio. Posteriormente se cortaron por un plano sagital a la mitad. De cada pulmón una mitad se almacenó hasta el final del experimento, mientras que la otra se procesó por los métodos estándar para obtener finalmente bloques de parafina y cortes histológicos convencionales que se tiñeron con H-E o con la tinción de Masson (114). Las preparaciones teñidas con H-E se emplearon para evaluar la extensión de la neumonía y de la inflamación crónica granulomatosa, mientras que las teñidas con Masson para la medición de áreas de fibrosis. Se consideraron como áreas neumónicas las áreas del tejido pulmonar en que los alvéolos se hallaban obliterados en más del 75% de su superficie por la presencia de material eosinófilo de aspecto proteináceo y células inflamatorias, ya fueran éstas neutrófilos, linfocitos o macrófagos. Se consideraron granulomas o áreas de inflamación crónica granulomatosa, aquellas en que el patrón alveolar del parénquima pulmonar se hallaba sustituido por áreas sólidas moderadamente bien delimitadas de tejido compuesto por macrófagos de aspecto epitelioide y acompañados en su periferia por una cantidad variable de linfocitos. Se consideraron áreas de fibrosis aquellas áreas del intersticio pulmonar que se observaran teñidas con azul en las preparaciones con tinción de Masson.

Para hacer las mediciones se emplearon algoritmos previamente desarrollados en el software de análisis de imágenes Qwin Leica Versión 1.0 (Leica imaging systems, Milton Keynes, UK). En un microscopio adaptado a una computadora (Leica, Milton Keynes, UK). Las imágenes empleadas para medir neumonía se capturaron con el objetivo 4x, se midió área pulmonar total (sin abarcar áreas de sección de bronquios y vasos) y áreas neumónicas, y se calculó el porcentaje que representaban las áreas de neumonía. Los granulomas se midieron empleando el objetivo 20x. Se analizaron todos los granulomas encontrados en tres campos al azar, y tomando en cuenta el área pulmonar total de esos tres campos (sin abarcar áreas de sección de bronquios y vasos), se obtuvo en μm^2 el área de granulomas por cada 100000 μm^2 de área pulmonar. Las áreas de fibrosis se midieron empleando la misma estrategia pero en estos casos se empleó el objetivo 10x.

CUENTA BACILAR

El resto de los pulmones congelados obtenidos para cada grupo y tiempo de sacrificio se utilizaron para determinar la carga bacilar. Cada pulmón se homogenizó en 3 mL de solución salina isotónica, empleando un homogenizador de tejidos (Polytron, Kinematica, Lucerna, Suiza). A partir del homogenizado inicial se hicieron 4 diluciones seriadas 1:10. Se sembraron por duplicado 20µl del homogenizado inicial y de cada dilución en medio Middlebrook 7H10 (Difco, Difco Labs, Detroit, MI, USA) al que se agregó un aditivo rico en ácido oléico, albúmina, catalasa y dextrosa (OADC) (Difco, Difco Labs, Detroit, MI, USA). Los medios se prepararon en el laboratorio y se sometieron a prueba de esterilidad antes de su uso. Los cultivos se incubaron a 37ºC en una atmósfera de CO_2 al 5% por 21 días. A partir del día 14 de incubación y hasta que transcurrieron los 21 días, se revisaron periódicamente las placas y se contó en un microscopio estereoscópico el número de unidades formadoras de colonias (UFC) para cada muestra. Se tomó en cuenta en cada muestra sólo la dilución que mostrara entre 30 y 300 UFC, y en cada caso se calculó el promedio de las cuentas obtenidas para las dos siembras de esa dilución.

ANALISIS ESTADÍSTICO

Para determinar las pruebas estadísticas adecuadas a utilizar se probó la homogeneidad de varianza para los resultados de cada una de las variables en cada uno de los tiempos de sacrificio empleando el estadístico de Levene. En aquellos casos en que se demostró había homogeneidad de varianza se utilizó la prueba de ANOVA de una vía para hacer las comparaciones entre diferentes grupos de tratamiento en cada tiempo de sacrificio. Cuando la prueba de ANOVA arrojó diferencias, se realizó la comparación de cada grupo de tratamiento contra el control con la prueba la de Bonferroni. Se empleó este estadístico, aún a pesar de ser conservador, con la intención de realizar comparaciones no sólo entre cada grupo de tratamiento y el control, sino para comparar también el tratamiento combinado contra el resto de los tratamientos. En los casos en que no se encontró homogeneidad de varianza se usó el estadístico de Kruskal-Wallis y para las comparaciones pareadas subsiguientes la prueba de Dunn. En cualquiera de las dos situaciones se consideró estadísticamente significativa la diferencia entre los grupos comparados con una $p \geq 0.05$.

RESULTADOS

RESPUESTA DE DTH EN LOS DIFERENTES GRUPOS DE TRATAMIENTO

La intensidad de la reacción de DTH, ofrece una alternativa para evaluar la magnitud de la respuesta celular evocada en el animal. Se midió esta reacción en los diferentes grupos de tratamiento y en los controles, y encontramos que la intensidad de la reacción de DTH en los ratones con el tratamiento combinado fue mayor en todos los tiempos de sacrificio que el observado en los animales control, el incremento fue además estadísticamente significativo. Los grupos que recibieron de modo independiente betaglicano o ácido niflúmico mostraron incremento en la reacción de DTH en todos los tiempos de sacrificio con respecto al control aunque sólo fue estadísticamente significativo para el betaglicano a

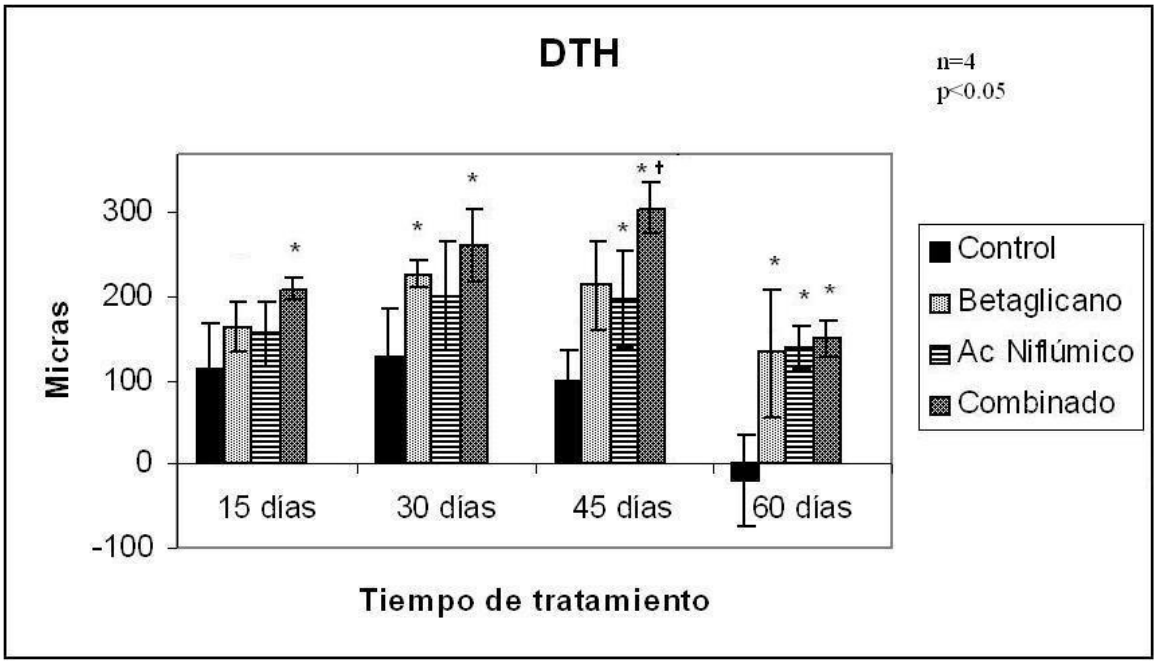


Figura 1. Intensidad de la reacción de hipersensibilidad tardía. Se muestran los resultados de las mediciones realizadas en los pulpejos plantares de los grupos de ratones control ■, tratados con betaglicano ▩, con ácido niflúmico ▤, y con la combinación de ambos agentes inmunomoduladores ▩ . Los asteriscos (*) indican diferencias estadísticas ($p \leq 0.05$)con el grupo control, y la cruz † diferencias con otro u otros de los grupos de tratamiento.

los días 30 y 60 de tratamiento, y a los días 45 y 60 para el ácido niflúmico (figura 1). Adicionalmente en el día 45 de tratamiento el grupo que recibió la combinación de ácido niflúmico y betaglicano, mostró reacción de DTH significativamente mayor que el grupo que recibió solamente ácido niflúmico (figura 1). Esto no se repitió al hacer otras comparaciones entre los tres grupos que recibieron tratamiento, ni a los 45, ni a los 60 días del mismo (figura 1).

Un dato que llama la atención es la presencia de una intensidad negativa de reacción de DTH en el grupo control a los 60 días de tratamiento (figura 1). Esto implica un menor espesor del pulpejo plantar tras la inyección del antígeno en estos ratones. La razón para esta disminución puede ser la presencia de necrosis (fenómeno de Koch) en el tejido, sin embargo esto no se corroboró histológicamente.

DETERMINACIÓN DE CITOCINAS POR ELISA

Como se ha comentado en nuestro modelo en la fase crónica de la infección se observa una respuesta inmune celular de tipo Th1 deficiente. Una respuesta inmune celular efectiva con predominio de citocinas del perfil tipo Th1, permite controlar la infección y a la vez es necesaria para ese efecto. Se midieron por ELISA las concentraciones de INFγ e IL-2, citocinas características del perfil tipo 1 para determinar el efecto de los tratamientos en la reactivación de la respuesta inmune con este tipo de patrón. El FNTα se produce en consecuencia a la respuesta inflamatoria y en un contexto de respuesta tipo Th1 favorece la activación macrofágica y control de la enfermedad. Se evaluó también empleando esta metodología.

El perfil de respuesta celular de tipo Th2, por su parte, aunque no ha demostrado tener impacto en la evolución microbiológica de la enfermedad en otros modelos, en el nuestro acompaña a los fenómenos de evolución de la enfermedad en la fase crónica. Se midió pues también IL-4 mediante esta técnica para observar el efecto de los tratamientos sobre la respuesta de tipo Th2 en los ratones.

Encontramos que las concentraciones de INFγ e IL-2 fueron superiores en todos los diferentes tiempos de tratamiento en los grupos tratados en comparación al grupo control, sin embargo no en todos los casos se alcanzó significancia estadística. Las concentraciones

de INFγ en los grupos tratados con betaglicano sólo y con la combinación de ácido niflúmico y betaglicano mostraron diferencias estadísticas al compararlas con las del grupo control a los 15, 30 y 60 días de tratamiento. Para IL-2 sólo se encontraron diferencias entre esos mismos grupos y el control a los días 30 y 60 de tratamiento (figura 2). No se observaron otras diferencias con significancia estadística y en particular no las hubo entre ambos grupos de tratamiento en ninguno de los tiempos.

Las diferencias en la expresión a nivel protéico de FNTα fueron menos constantes. Sólo se observaron a los días 45 y 60 de tratamiento y en el grupo tratado con betaglicano y ácido niflúmico con respecto al control (figura 2).

Por el contrario al efecto observado en las citocinas comentadas en los dos párrafos anteriores, la presencia de IL-4 se vió disminuida en los grupos tratados con betaglicano soluble y la combinación de betaglicano soluble y ácido niflúmico, con respecto al control. Esta diferencia es estadísticamente significativa y se mantuvo en todos los tiempos de sacrificio. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre estos dos grupos de tratamiento con respecto a esta citocina (figura 2).

Estos resultados muestran, en la relación de los niveles tisulares de las citocinas IL-2 e INFγ contra IL-4, un claro predominio en las primeras dos en los animales tratados. El predominio de estas citocinas en los pulmones de los animales bajo tratamiento define el entorno de la respuesta como de tipo Th1, ya que son características de un perfil de respuesta inmune adaptativa de este tipo. Por el contrario y de acuerdo a lo ya observado con anterioridad en nuestro modelo, en los animales control, sin tratamiento, se mantiene el predominio de la IL-4, característica de un perfil de respuesta inmune de tipo Th2.

DETERMINACIÓN DE CITOCINAS POR RT-PCR

Dado que la expresión de citocinas puede ser modulada a nivel de la expresión genética o posteriormente y no sólo a nivel de la traducción en proteínas, se evaluó la presencia de los ARNm para algunas de las citocinas determinadas por ELISA, específicamente para IL-2 y FNTα. Los resultados muestran nuevamente predominio de IL-2 en los grupos tratados con betaglicano y con betaglicano más ácido niflúmico al compararlos contra el control en los días 30, 45 y 60 de tratamiento (figura 3). El predominio es aún mayor en los tratados con

betaglicano soluble sólo, que en los animales tratados con betaglicano soluble y ácido niflúmico en el día 30. Las concentraciones son semejantes en estos mismos grupos al día 45 de la intervención terapeútica, y hacia el día 60 el predominio es ahora mayor en el

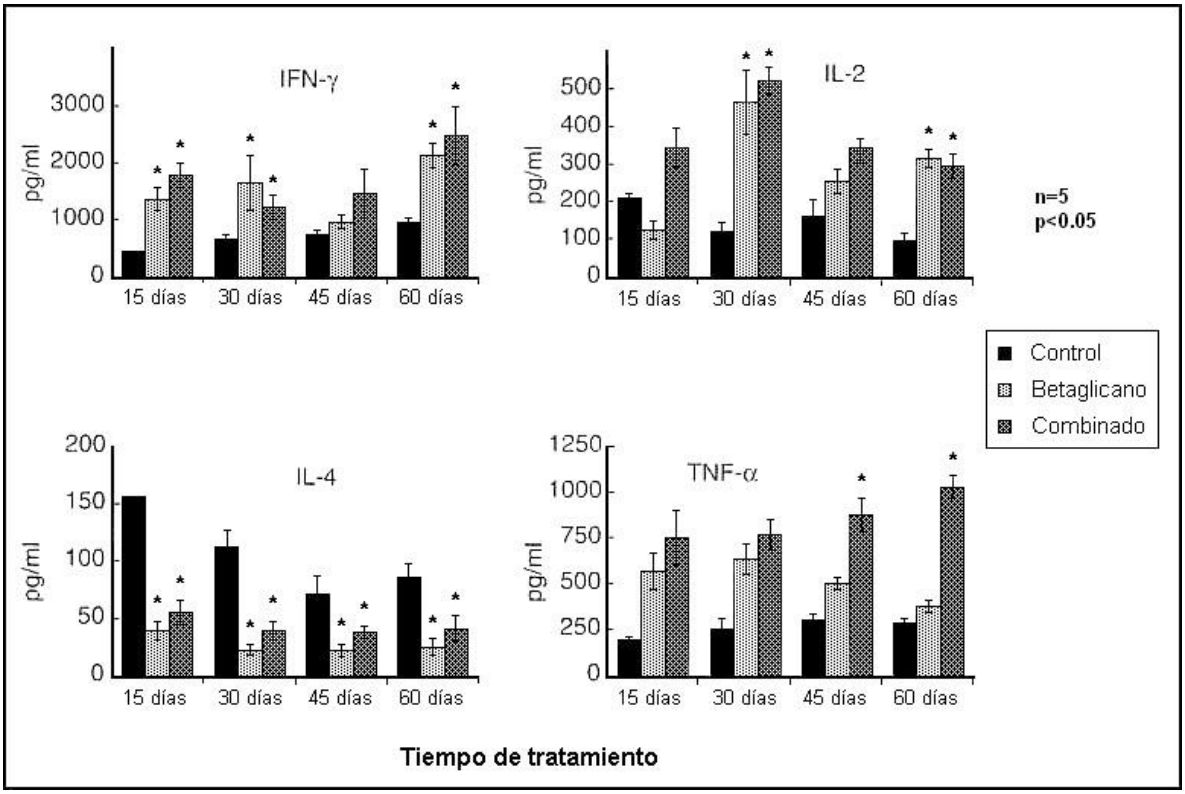


Figura 2. Concentración de citocinas en homogenizados de pulmón. Se muestran los resultados de las determinaciones por ELISA de las concentraciones de IL-2, INFγ, FNTα e IL-4 en los grupos de ratones control ■, tratados con betaglicano ▩, y con la combinación de ambos agentes inmunomoduladores ▩. Los asteriscos (*) indican diferencias estadísticas ($p \leq 0.05$)con el grupo control.

grupo que recibió betaglicano soluble y ácido niflúmico (figura 3). En el día 15 la concentración de ARNm para IL-2 predomina, en comparación a los animales control, en los animales tratados con betaglicano soluble sólo pero no en los tratados con ambos inmunomoduladores (figura 3). Por su parte las concentraciones del RNAm para FNTα también son mayores en ambos grupos tratados en referencia a los controles, aunque en este caso aún mayores en el grupo tratado únicamente con betaglicano soluble en todos los tiempos de tratamiento (figura 3).

Para el caso de estas determinaciones no es posible establecer si la diferencias son estadísticamente significativas dado que las mediciones se realizaron sobre muestras únicas, resultado de la reunión del RNAm extraído para todos los ratones de cada grupo. No obstante, las diferencias comentadas entre tratados y controles son amplias, del doble o más en el peor de los casos.

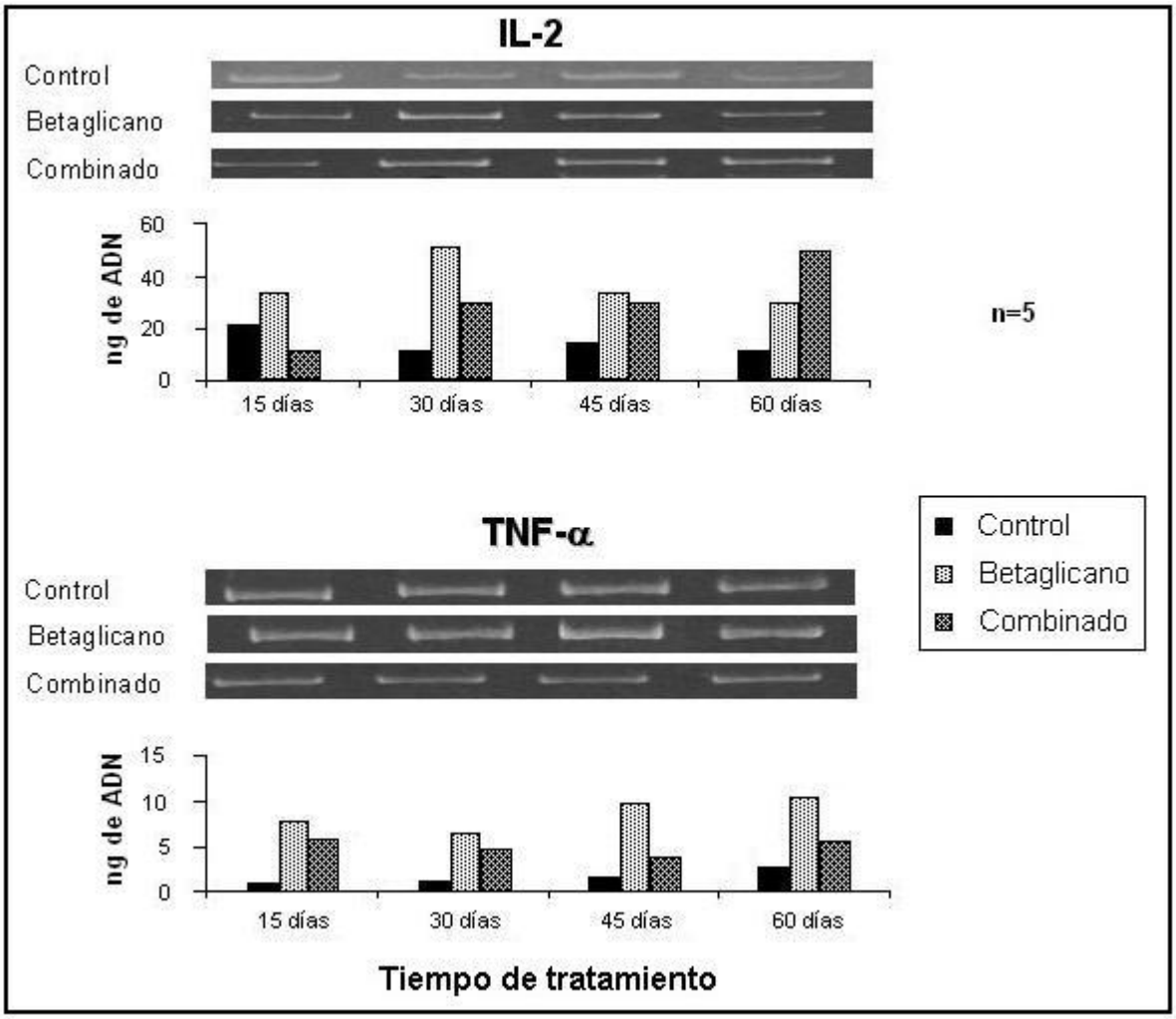


Figura 3. Concentración del ARNm de citocinas en homogenizados de pulmón. Se muestran los resultados de las determinaciones de las concentraciones del ARNm de IL-2 y FNTα obtenidos por RT-PCR en los grupos de ratones control ■, tratados con betaglicano ▩, y con la combinación de ambos agentes inmunomoduladores ▩.

ANÁLISIS MORFOMÉTRICO DE LAS ÁREAS DE INFLAMACIÓN GRANULOMATOSA

La inflamación crónica granulomatosa es característica de la respuesta protectora ante micobacterium tuberculosis. Se midieron pues las áreas de inflamación granulomatosa en el pulmón y se observó que estas fueron muy superiores en los animales tratados con ácido niflúmico, betaglicano, y ambos agentes en combinación, al compararlas con las encontradas en animales control en los días 45 y 60 de aplicación de las maniobras

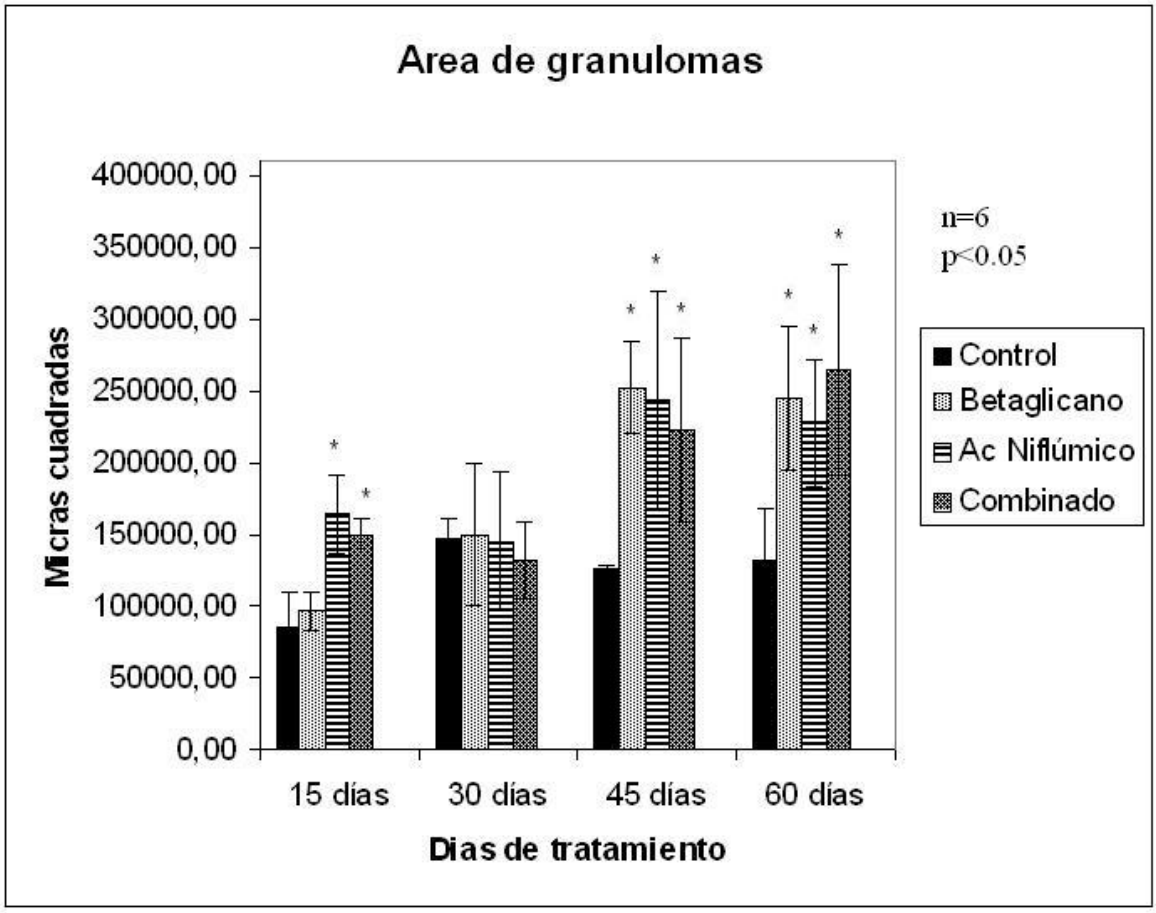


Figura 4. Áreas inflamación crónica granulomatosa en pulmón. Se muestran los resultados del análisis morfométrico realizado sobre cortes histológicos de pulmón, expresados como área de inflamación granulomatosa por cada 10^5 μm^2 de tejido pulmonar en los grupos de ratones control ■ , tratados con betaglicano ▦, con ácido niflúmico ▬, y con la combinación de ambos agentes inmunomoduladores ▩. Los asteriscos (*) indican diferencias estadísticas ($p \leq 0.05$)con el grupo control.

terapéuticas (figura 4). Las diferencias mostraron significancia estadística entre cada grupo tratado y el control en los días ya mencionados, más no se observaron tales diferencias entre esos tres grupos de tratamiento.

Al día 15 de tratamiento únicamente los grupos tratados sólo con ácido niflúmico, y con la combinación de betaglicano y ácido niflúmico, mostraron diferencias con el control. En esta fecha de sacrificio el grupo tratado sólo con betaglicano, se comportó de manera semejante al control, motivo por el cual mostró diferencias estadísticamente significativas con los otros dos grupos de tratamiento al igual que el control (figura 4).

ANALISIS MORFOMÉRICO DE LAS ÁREAS DE NEUMONÍA

El avance clínico de la tuberculosis tanto en el humano como en el ratón tiene paralelo en el daño observado en el tejido pulmonar. De esta forma para evaluar el avance en cuanto a daño tisular de la enfermedad, en su forma de neumonía, se midieron las áreas neumónicas en los diferentes grupos de ratones. Este cambio mostró menos contrastes que el área de granulomas. Al día 15 de tratamiento los tres grupos en los que se aplicaron maniobras terapéuticas mostraron menor porcentaje del área de sección pulmonar afectada por neumonía, sin embargo sólo para los grupos que recibieron el tratamiento con betaglicano y el combinado la diferencia fue estadísticamente significativa (figura 5). En los días 30 nuevamente los tres grupos mostraron menor porcentaje que los animales control, mas ninguna de estas diferencias fue estadísticamente significativa (figura 5). Al día 45, los animales tratados sólo con betaglicano y sólo con ácido niflúmico mostraron mayor porcentaje de neumonía que los controles, mientras que los que recibieron tratamiento combinado mostraron menor porcentaje que el grupo control. Ninguna de estas diferencias fueron significativas en el análisis estadístico (figura 5). El otro tiempo de sacrificio en que se observaron diferencias estocásticas fue el correspondiente a los 60 días de tratamiento. En éste, los animales tratados sólo con betaglicano mostraron porcentajes estadísticamente mayores de neumonía que los controles, mientras que los que recibieron tratamiento combinado, porcentajes estadísticamente menores. Los animales tratados sólo con ácido niflúmico mostraron también porcentajes mayores de neumonía que los controles, pero que no alcanzaron la significancia estocástica (figura 5). Las diferencias comentadas entre el

grupo control, y los tratados también son evidentes al observar montajes de los cortes de pulmón al día 60. Es particularmente llamativa la mejoría del grupo tratado con la inmunoterapia combinada al compararlo con el control, es también notable el incremento en áreas neumónicas en el grupo tratado sólo con betaglicano en contraste con el grupo control (Figura 6).

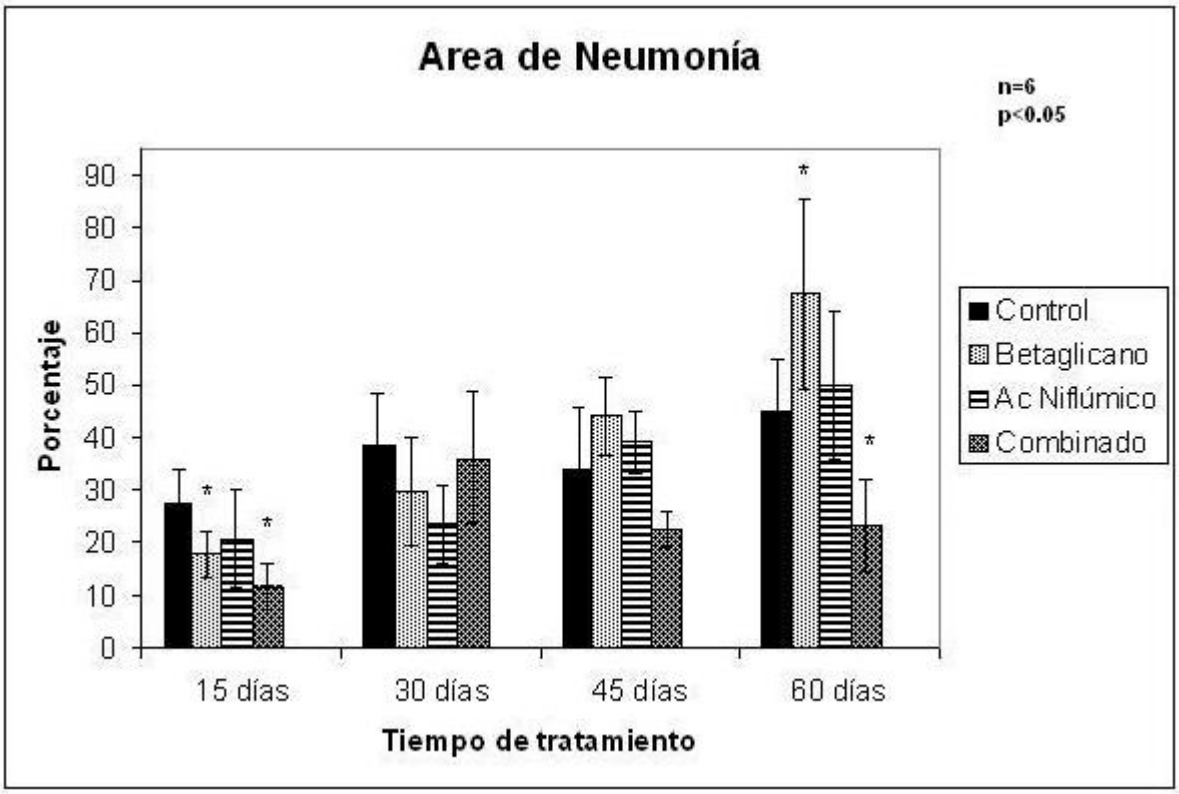


Figura 5. Porcentaje de áreas neumónicas en pulmón. Se muestran los resultados del análisis morfométrico realizado sobre cortes histológicos de pulmón expresados como porcentaje del área total pulmonar afectada por neumonía en los grupos de ratones control ■ , tratados con betaglicano ▨ , con ácido niflúmico ▤ , y con la combinación de ambos agentes inmunomoduladores ▩ . Los asteriscos (*) indican diferencias estadísticas ($p \leq 0.05$)con el grupo control.

DETERMINACIÓN DE LA CARGA BACTERIANA, CUENTAS DE UFCs

Dado que el corolario de todo tratamiento antibacteriano es la eliminación del patógeno, se evaluó la carga bacilar determinando UFC en tejido pulmonar de los diferentes grupos de

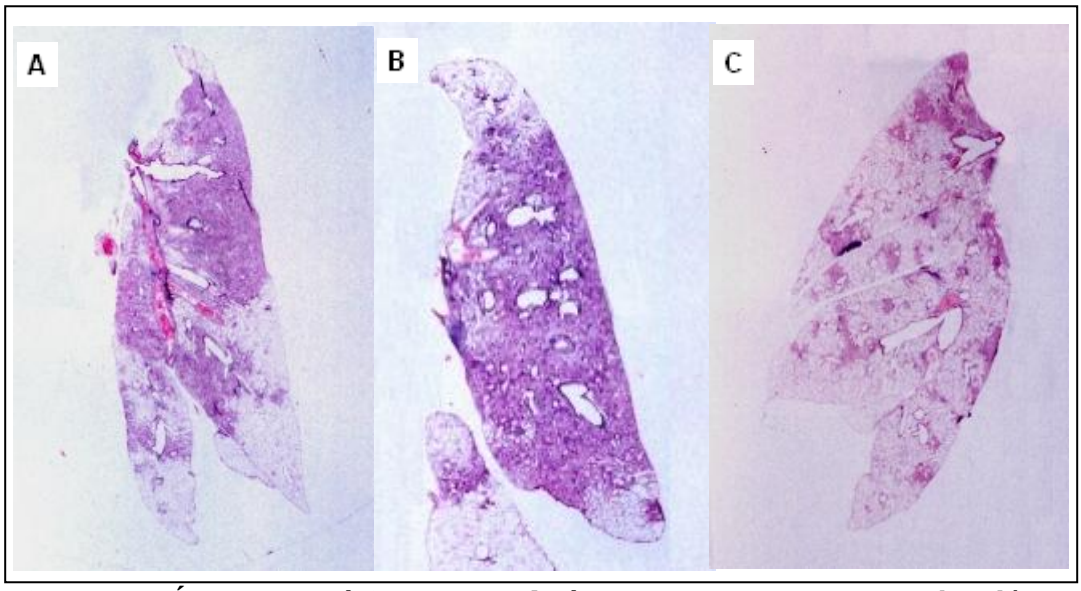


Figura 6. Áreas neumónicas en pulmón. Se muestran cortes histológicos convencionales teñidos con Hematoxilina-Eosina de los grupos control (A), tratado sólo con Betaglicano (B) y que recibieron el tratamiento combinado (C). Las áreas de aspecto sólido, más intensamente teñidas, corresponden al parénquima pulmonar consolidado por neumonía.

animales. Al igual que con la neumonía, se encontraron contrastes más discretos entre los ratones control y los de algunos grupos de tratamiento, que en otros de los parámetros evaluados.

El grupo tratado sólo con betaglicano mostró cargas bacterianas significativamente menores que el grupo control a los 30 y 60 días de tratamiento (Figura 7). En los días 15 y 45 este mismo grupo mostró cargas apenas inferiores a las del grupo control. El grupo tratado con ácido niflúmico no mostró diferencias significativas con respecto al grupo control (Figura 7). En contraste con este último grupo el que recibió betaglicano más ácido niflúmico mostró cargas bacilares menores que el grupo control en todos los tiempos de sacrificio, que además fueron significativas desde el punto de vista del análisis estadístico (Figura 7). La utilidad de la combinación de ácido niflúmico y betaglicano para reducir la carga micobacteriana es pues evidente, aún en comparación con la administración independiente de cada uno de estos dos inmunorreguladores.

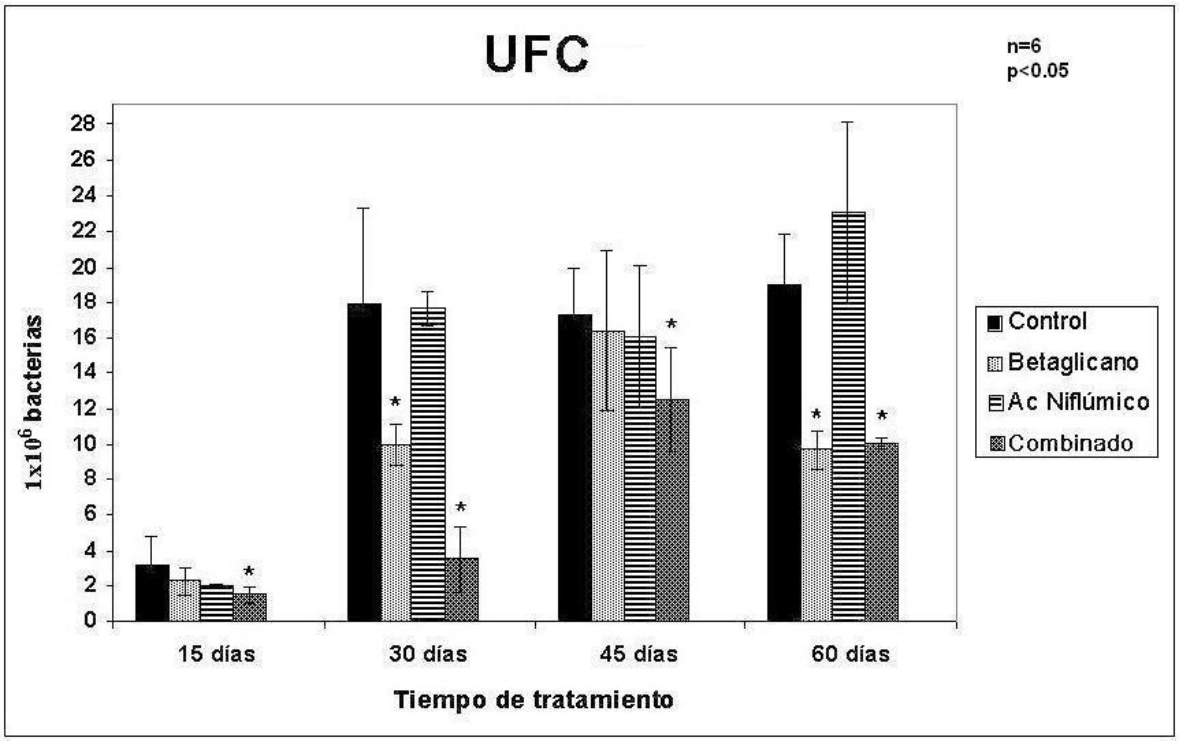


Figura 7. Unidades formadoras de colonias en homogenizados de pulmón. Se muestran los resultados del cálculo de las unidades formadoras de colonias presentes en los homogenizados del tejido pulmonar de los grupos de ratones control ■, tratados con betaglicano ▨, con ácido niflúmico ▤, y con la combinación de ambos agentes inmunomoduladores ▩. Los asteriscos (*) indican diferencias estadísticas ($p \leq 0.05$)con el grupo control.

Como ya se ha mencionado, en un segundo experimento se agregó al tratamiento con los inmunomoduladores la administración de drogas antifímicas. La evolución de la carga bacteriana en los tres grupos tratados en este experimento fue hacia la disminución progresiva, y mostraron a partir del día 30 de tratamiento cargas significativamente menores que el grupo control (Figura 8). Una evolución aún mejor se observa en el grupo tratado con los dos inmunomoduladores y las drogas antifímicas, que mostró, a diferencia de los otros dos tratamientos, diferencias significativas con respecto al control desde el día 15 de tratamiento (Figura 8). Además al día 30 de tratamiento, esta terapia inmunomoduladora-antibiótica muestra reducción estadísticamente significativa con respecto al tratamiento antibiótico convencional. Posteriormente en los días 45 y 60 la carga bacilar es semejante

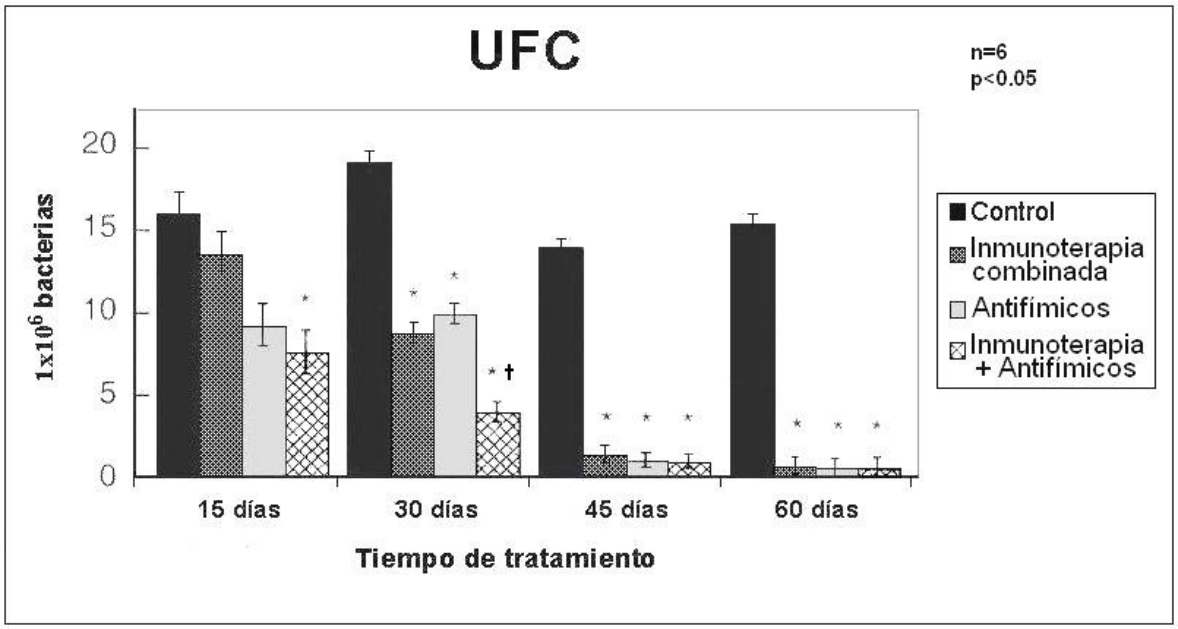


Figura 8. Unidades formadoras de colonias en homogenizados de pulmón. Se muestran los resultados del cálculo de las unidades formadoras de colonias presentes en los homogenizados del tejido pulmonar del segundo experimento, en el cual se emplearon, además del tratamiento inmunomodulador, antifímicos. Los grupos son de ratones control ■, tratados con betaglicano y ácido niflúmico ▩, tratados con antifímicos ▢, y con la combinación de inmunomoduladores y antifímicos ⊠. Los asteriscos (*) indican diferencias estadísticas ($p \leq 0.05$)con el grupo control.

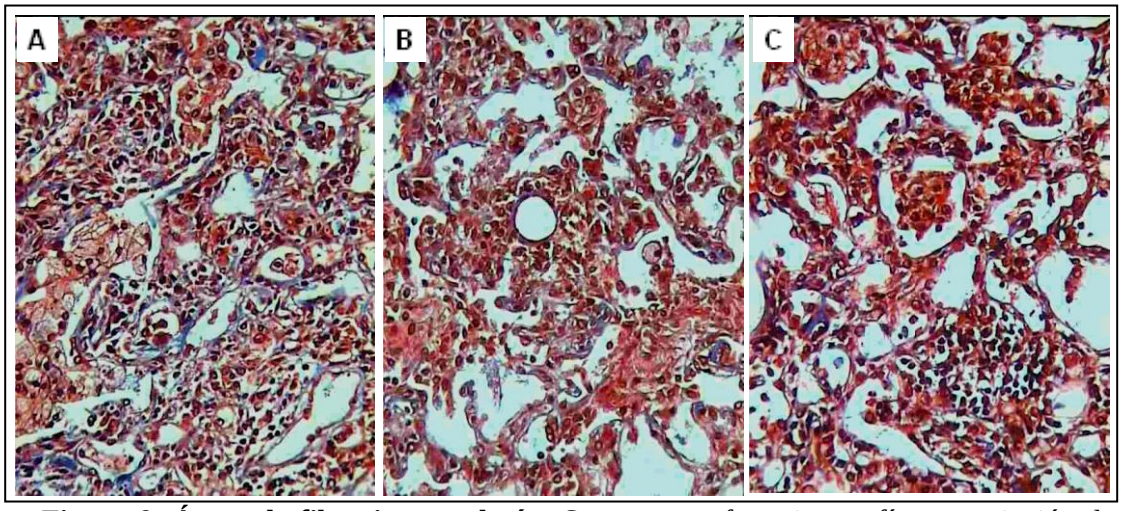


Figura 9. Áreas de fibrosis en pulmón. Se muestran fotomicrografías, con tinción de Masson, del tejido pulmonar de los grupos control (A), tratado con betaglicano (B) y que recibió inmunoterapia combinada (C). En azul se observa la colágena depositada en el tejido que es evidentemente mayor en el grupo control que en los otros dos.

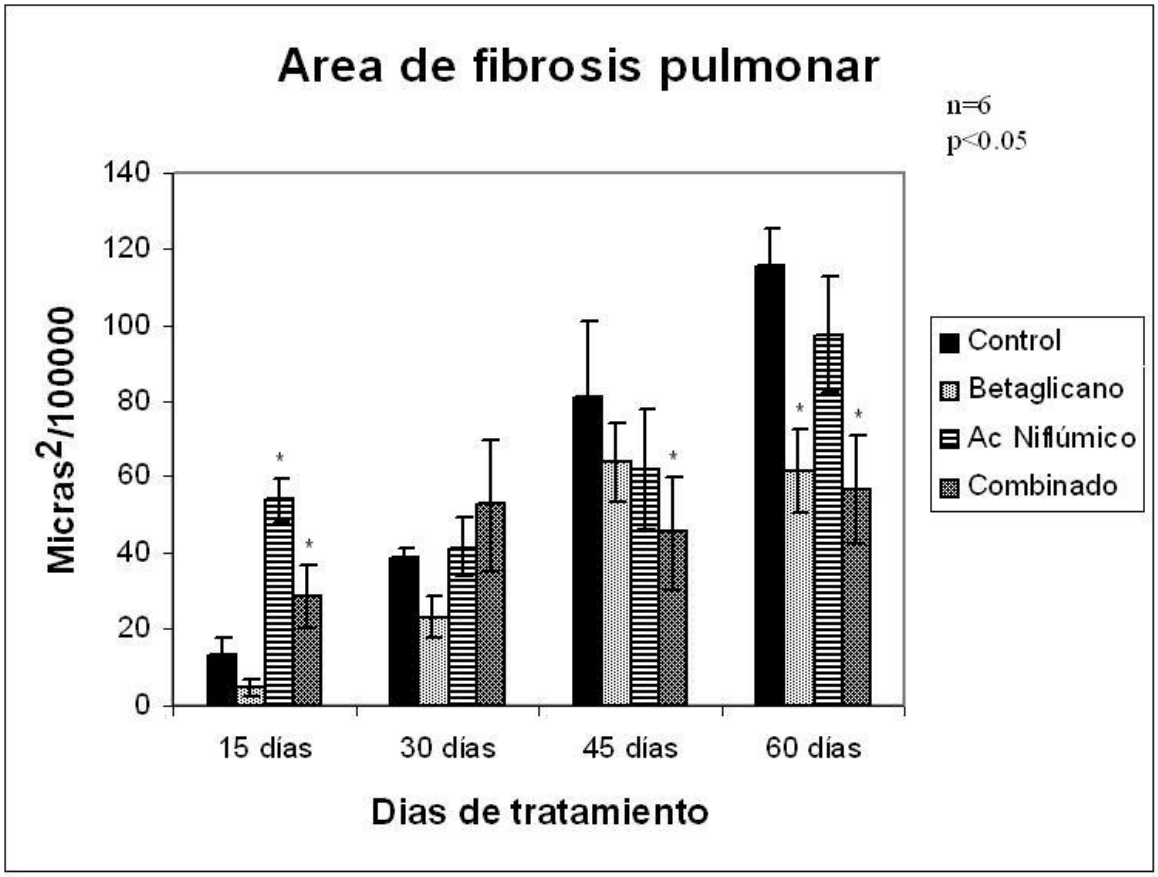


Figura 10. Porcentaje de áreas neumónicas en pulmón. Se muestran los resultados del análisis morfométrico realizado sobre cortes histológicos de pulmón expresados como área pulmonar afectada por fibrosis, por cada $1x10^5$ micras cuadradas de tejido pulmonar, en los grupos de ratones control ■, tratados con betaglicano ▩, con ácido niflúmico ▤, y con la combinación de ambos agentes inmunomoduladores ▩. Los asteriscos (*) indican diferencias estadísticas ($p \leq 0.05$)con el grupo control.

en los tres grupos de tratamiento. Si en conjunto analizamos estos datos, el tratamiento inmunomodulador-antibiótico es eficiente y logra aparentemente mayor reducción de la carga bacteriana en menor tiempo (Figura 8).

EVALUACIÓN DE LAS ÁREAS DE FIBROSIS PULMONAR

La fibrosis constituye un marcador de la progresión del daño tisular en la tuberculosis y en especial del daño crónico. Las áreas de fibrosis mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos tratados y el control en los días 15, 45 y 60 de tratamiento.

En el día 15 los grupos que recibieron sólo ácido niflúmico o el tratamiento combinado presentaron mayor extensión del proceso de fibrosis que la observada en el grupo control (Figura 10). Hacia el día 45 de tratamiento la relación se invirtió y los tres grupos de tratamiento mostraron menos fibrosis que el control (Figura 10), aunque esta diferencia sólo fue estadísticamente significativa para el grupo que recibió tratamiento combinado. Al día 60 el grupo tratado sólo con ácido niflúmico, aunque aún con menor fibrosis que el grupo control, ya no mostró una reducción estadísticamente significativa. Los otros dos grupos tratados continuaron, en esta última fecha de sacrificio, mostrando una reducción estadísticamente significativa, y de hecho más acentuada que la observada en el día 45. Las fotos histológicas evidencían también estas diferencias (Figura 9).

DISCUSIÓN

Como ya se ha comentado la tuberculosis es la enfermedad infecciosa de mayor prevalencia a nivel mundial de acuerdo a la OMS, y una enfermedad en la que se plantean nuevos retos ante la emergencia de cepas multirresistentes y ante su asociación con la pandemia de VIH-SIDA. Estos nuevos retos requieren nuevas estrategias para el control y tratamiento de la TB y de ahí nuestro interés en explorar la inmunomodulación como una alternativa.

Mediante el estudio del desarrollo de la enfermedad en modelos animales, se han logrado identificar algunas de las características importantes en la respuesta inmune que permiten contener la enfermedad. A saber, la presencia de una respuesta inmune celular efectiva, con patrón tipo Th1 en la que es reelevante la participación del INFγ. La evolución de la enfermedad en personas con alteraciones de esta citocina, han mostrado la reelevancia de este tipo de respuesta también en el humano.

Del mismo modo el estudio del desarrollo de la enfermedad activa en modelos animales que presentan semejanzas importantes con la enfermedad activa en el humano, como es nuestro modelo de tuberculosis pulmonar, nos ha permitido además identificar formas inadecuadas de respuesta inmune presentes en los animales enfermos. El impacto de algunas características de éstas respuestas inadecuadas sobre el desarrollo de la enfermedad, como la presencia de niveles elevados de TGFβ o PGE_2, aún no ha sido bien estudiada pese a la evidencia en numerosas publicaciones de su efecto depresor sobre la respuesta inmune celular protectora en la TB y su presencia tanto en modelos murinos de TB como en el humano.

En este estudio hemos demostrado que TGFβ y PGE_2 participan en la fisiopatogenia de la infección en su fase crónica en nuestro modelo murino, y que la asociación de betaglicano soluble con antiinflamatorios no esteroideos COX2 selectivos es efectiva para combatirla. A su vez nuestros resultados confirman que el efecto de estos dos mediadores es depresor sobre la respuesta inmune celular, protectora en la tuberculosis, pues el bloqueo de la actividad de éstos: 1)reactiva la inmunidad celular manifestada mediante la reacción de DTH, 2)reestablece un patrón de respuesta inmunológica de tipo Th1 como lo demuestra el patrón de expresión de citocinas a nivel de RNAm y proteína, 3)restablece el patrón de

respuesta tisular observado en la fase aguda de control de la enfermedad, 4)revierte la neumonía, manifestación tisular de la progresión de la enfermedad; 5)reduce de forma muy importante la carga bacilar en el pulmón, y 6)limita el daño fibrótico observado como parte de la evolución de la enfermedad.

El efecto depresor sobre la respuesta inmune de TGFβ y PGE_2 es un evento muy importante en el desarrollo de la TB pulmonar, tal como lo demuestran nuestros resultados, pues la respuesta microbiológica y tisular a su bloqueo, se presentan en paralelo con la reactivación de un patrón de respuesta celular de tipo Th1. En particular el INFγ muestra una cinética muy congruente con la observada en la extensión de las áreas de neumonía o granulomas, y de mayor paralelismo que la de otras citocinas y que la de DTH. Así mismo el efecto sobre la respuesta granulomatosa del bloqueo de ambos mediadores por separado y en combinación es particularmente notoria en el segundo mes de tratamiento, estos resultados son congruentes en particular con las etapas de mayor producción de PGE_2 como hemos publicado con anterioridad (76). Además de la extensión de las áreas de inflamación granulomatosa la organización de los granulomas es también evidentemente mejor (figura 9), como se observa en una respuesta de tipo Th1 en contraposición a una respuesta mixta Th1/Th2 o Th2 (19). Estudios recientes sobre otros elementos de la respuesta inmune como son las células T reguladoras y su participación en la TB reafirman el papel central de TGFβ en esta enfermedad infecciosa al mostrar que el efecto supresor de esta población celular sobre la respuesta inmune en un modelo murino de TB pulmonar, está mediada por TGFβ (115). Nuestros datos aunados a los otros estudios como el referido contribuyen firmemente a fundamentar el papel primordial de estos mediadores como inmunomoduladores, que en la escena de la infección por Mtb adoptan un papel fisiopatogénico.

Los resultados de este trabajo abren a nuestros ojos también nuevas áreas por explorar con respecto a la participación individual de TGFβ y PGE_2 en la TB. Si bien con la terapia combinada se esperaba obtener reducción de las áreas neumónicas observadas con la administración de betaglicano aislado (Figuras 5 y 6), no queda claro cual es el mecanismo para este efecto. Algunos estudios en otras patologías como el asma que cursan también con inflamación crónica apuntan a la participación de diferentes PGs en los fenómenos de daño

inmunológico y de inflamación crónica, como son PGE_2 y PGD_2 respectivamente (82, 88-90). Es probable que en nuestro caso sea este mismo hecho lo que permite que al inhibir la actividad de la COX obtengamos un efecto inmunomodulador a la vez que antiinflamatorio.

Uno de los puntos de gran interés en este trabajo es la respuesta microbiológica. En particular en cuanto a ella, se realizaron dos fases diferentes de reto. En una inicial se comparó la administración de los imunomoduladores de forma aislada y en combinación contra el grupo control que recibió placebos. En la segunda se añadieron a la terapéutica antifímicos para comparar su efecto contra el de la inmunoterapia, así como para evaluar la posibilidad de sinergia entre inmunomodulación y antimicrobianos.

Se observó reducción estadísticamente significativa de la carga bacilar con la inmunoterapia combinada en ambas fases del reto, así como con la administración de antifímicos en la segunda fase. No obstante los resultados obtenidos tras la administración conjunta de inmunoterapia combinada y antifímicos superan a los de cada uno de estos tratamientos en forma aislada. Lo más notorio de la diferencia entre el comportamiento de la carga bacilar en los dos grupos previos y éste es la velocidad de descenso. Durante los primeros 30 días de tratamiento los animales con inmunoterapia combinada y antifímicos muestran reducción más dramática de la carga bacilar que los otros grupos tratados. Esta diferencia es además estadísticamente significativa a los 30 días de tratamiento. Esa característica de esta modalidad de tratamiento pudiera ser de enorme importancia, ya que lo prolongado de los tratamientos antifímicos es una de las principales causas de su abandono, con la consiguiente falla terapéutica y generación de cepas resistentes. Habrá que corroborar este hecho con estudios diseñados más específicamente para ese fín.

Otra área no bien explorada previamente en la que impacta la inmunoterapia combinada es en el daño crónico causado por la tuberculosis, en partícular la fibrosis. La inmunoterapia combinada mostró también, reducción estadísticamente significativa de la fibrosis pulmonar con respecto al grupo control, particularmente al segundo mes de tratamiento. La fisiopatología de los procesos inflamatorios crónicos se acompaña de fibrosis, resultado de algunos de los eventos inmunológicos del mismos (87) y por tanto en padecimientos como la TB podemos etiquetarla como un evento inmunopatológico. Así, la inmunoterapia combinada, más allá de sólo contribuir a controlar el crecimiento bacteriano mejora el

entorno de la respuesta inmune permitiendo efectos en marcadores tisulares incluso de daño crónico como lo es la fibrosis pulmonar. Los dos mediadores blanco en este estudio, TGFβ y PGE_2, pueden favorecer el desarrollo de un patrón de respuesta inmunológica adaptativa de tipo Th2, característica en nuestro modelo murino y que parece compartir la tuberculosis humana. En este caso el efecto sobre el daño tisular crónico bien se puede explicar por el efecto de la terapia sobre estos mediadores por dos vías relacionadas entre sí. La primera, el bien conocido efecto profibrótico del TGFβ. La segunda, como se ha establecido previamente, el efecto sobre el desarrollo de una respuesta inmune con patrón tipo Th2 que en ciertos modelos se ha demostrado causa el daño crónico en la infección por Mycobacterium tuberculosis (19).

En resumen se observan efectos importantes de la inmunoterapia combinada en la activación de la respuesta inmune celular, mediante la promoción de un patrón de respuesta inmune local en el pulmón de tipo Th1, con respuesta inflamatoria de tipo granulomatoso activa en contra de la micobacteria, y que impacta de manera eficiente en el control microbiológico de la enfermedad, en los marcadores tisulares de evolución de la enfermedad y de daño crónico de la misma. Se requieren aún mas estudios sobre diferentes papeles que han ido emergiendo sobre estos mediadores y la fisiopatogenia de la TB, que aunados al los hechos ya fundamentados con este y otros trabajos, nos permitan una más completa compresión de la fisiopatogenia de la enfermedad, la participación de TGFβ y PGE_2 en ella y las posibles intervenciones terapéuticas derivadas.

CONCLUSIONES

La tuberculosis como enfermedad infecciosa crónica es actualmente un problema de salud a nivel mundial. Entre algunas de las limitantes para controlar la enfermedad se hallan los prolongados tiempos de tratamiento antibiótico necesarios, la emergencia de condiciones clínicas prevalentes que favorecen el desarrollo de la enfermedad como el VIH-SIDA, la aparición de cepas multidrogo resistentes, y la asociación de la pobreza y sus condiciones sociodemográficas acompañantes con el desarrollo de la infección. Desde el punto de vista biológico la respuesta inmune puede ser eficiente en controlar pero no en erradicar la infección y esto permite una alta prevalencia de sujetos con infección latente. El desarrollo de respuestas inmunológicas inadecuadas para el control de la infeccion, que favorecen la depresión de una respuesta inmune celular activa con patrón de tipo Th1 y de la producción temprana en cantidades adecuadas de INFγ, subyace en gran parte la progresión de la enfermedad. Entre los factores que pueden tener este efecto sobre la respuesta inmune se encuentran dos mediadores identificados en cantidades elevadas en la fase progresiva crónica de la enfermedad en nuestro modelo murino, que son TGFβ y PGE_2. Existe evidencia de que estos factores y en particular TGFβ, también se encuentran elevados en la enfermedad humana. Además de deprimir la respuesta protectora ante la tuberculosis, estos factores pueden promover un patrón de respuesta de tipo Th2 que promueva el daño crónico observado en la enfermedad. Al evitar la actividad de estos mediadores empleando betaglicano soluble y ácido niflúmico se logra la reactivación de la respuesta inmune celular mediante la promoción de un patrón de respuesta inmune local en el pulmón de tipo Th1, acompañada de respuesta inflamatoria de tipo granulomatoso activa en contra de la micobacteria en este mismo órgano, y con impacto eficiente en la carga micobacteriana de la enfermedad, así como en los marcadores tisulares de evolución de la enfermedad y de daño crónico de la misma. Aunque existen otros factores de la respuesta inmune que modifican sutilmente la interacción entre respuesta citocínica, tisular y antimicrobiana, la inmunoterapia combinada con estos dos agentes es eficiente, y su efecto es comparable al obtenido como la terapia antifímica convencional. La administración conjunta de inmunoterapia combinada con antifímicos logra además reducir con mayor celeridad que la

antibioticoterapia convencional, la carga bacteriana. El efecto aquí demostrado de los inmunomoduladores administrados en este estudio u otros disponibles con actividad sobre los mismos mediadores, abre una posible nueva vertiente en la terapéutica antifímica. Un aspecto a resaltar en este tipo de terapia es su impacto no sólo directo sobre el crecimiento bacteriano, sino sobre el daño crónico tisular.

Evidentemente aún es necesario extrapolar estos hallazgos a la aplicación clínica en la enfermedad humana, así como el refinar la aplicación de agentes semejantes a los utilizados en este estudio para su administración en pacientes.

PERSPECTIVAS

-Conducir estudios específicamente diseñados para comparar las cinéticas en el tiempo de la evolución microbiológica de la enfermedad, en las terapias con antifímicos y con antifímicos más inmunoterapia, que permitan a su vez cuantificar el beneficio en la reducción del tiempo de tratamiento en esta última, y diseñar régimenes adecuados para su aplicación en humanos.

-Conducir estudios específicamente diseñados para cuantificar el efecto de la inmunoterapia sobre daño crónico (fibrosis), en comparación con las terapias convencionales.

-Conducir estudios que exploren la participación de otros vectores de la respuesta inmune involucrados en estos patrones de respuesta que puedan explicar la pérdida de paralelismo en la relación entre perfil citocínico, respuesta tisular y evolución microbiológica de la enfermedad, y que puedan evidenciar nuevas áreas de intervención que coadyuven al éxito de la inmunoterapia.

-Explorar a fondo la participación en la patogenia de esta enfermedad, por mecanismos semejantes a los expuestos en el marco teórico de esta tesis, de elementos de la respuesta inmune que se relacionan con el efecto supresor de TGFβ y PGE_2, como son las células T reguladoras.

BIBLIOGRAFIA

1.Anon. Global tuberculosis control. WHO Report 2002. Organización Mundial de la Salud, Ginebra, Suiza, p 181.

2. Raviglione MC, Snider DE, Kochi A. Global epidemiology of tuberculosis. Morbidity and mortality of a worldwide epidemic. JAMA, 1995;273:220.

3. Pablos-Méndez A, Raviglione MC, Laszlo A, Binkin N, Rieder HL, Bustreo F, Cohn DL, Lambregts-Van Weezenbeek CSB, Kim SJ, Chaulet P, Nunn P. Global surveillance for antituberculosis-drug resistance, 1994-1997. N Engl J Med, 1998; 338:1641.

4. Flynn JL, Chan J, Immunology of tuberculosis. Annu Rev Immunol 2001,19:93-129

5. Kaufmann S, How can immunology contribute to the control of tuberculosis? Nature Reviews Immunology 2001, 1:20-30.

6. Barrios J, Participación de los neutrófilos en la tuberculosis pulmonar experimental murina. Tesis de maestría; Facultad de Ciencias, UNAM; División de Patología Experimental, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán".

7. Collins H., Kaufmann S., The many faces of host responses to tuberculosis. Immunology 2001, 103:1-9.

8. Abbas AK, Lichtman AH et Pober JS. *Inmunidad frente a los microorganismos* en Inmunología Celular y Molecular, 4ª edición, España, McGraw-Hill – Interamericana de España, 2002, pag 360-364.

9. Cooper AM, Dalton DK, Orme IM et al., Disseminated tuberculosis in interferon γ gene disrupted mice. J Exp Med, 1993; 178:2243-2247.

10.Newport MJ, Huxley CM, Levin M et al., A mutation in the interferon-γ-receptor gene and susceptibility to mycobacterial infection. NEJM 1996; 335:1941-1949.

11. Roach DR, Briscoe H, Britton WJ et al., Secreted lymphotoxin-α is essential for the control of an intracellular bacterial infection. J. Exp.Med. 2001,193(2):239-246.

12. Holt P, Antigen Presentation in the lung. Am J Respir Crit Care Med 2000, 162:S151-S156

13. Feng CG, Bean AGD, Britton WJ et al. Increase in gamma interferon-secreting CD8+, as well as CD4+, T cells in lungs following aerosol infection with Mycobacterium tuberculosis. Infect Immun, 1999, 67(7):3242-3247

14. Hernández-Pando R, Orozco H, Sampieri A, et al. Correlation between kinetics of Th1/Th2 cells and pathology in a murine model of experimental pulmonary tuberculosis. Immunology 1996;89:26-33.

15. Caruso AM, Serbina N, Flynn JL et al. Mice deficent in CD4 T cells have only transiently diminished levels of INF-γ, yet succumb to tuberculosis. J Immunol. 1999, 162: 5407-5416

16.Abbas AK, Murphy KM, Sher A. Functional diversity of helper T lymphocytes. Nature, 1996, 383: 787-793.

17. Rojas-Espinoza O. Inducción de las respuestas inmunitarias en Inmunología (de memoria), 2ª edición, México, Ed Médica Panamericana, 2001, pag 88-91.

18.Howard AD and Zwilling BS. Reactivation of tuberculosis is associated with a shift from type 1 to type 2 cytokines. Clin Exp Immunol, 1999;115:428-434.

19.Wangoo A, Sparer T, Young DB, et al. Contribution of Th1 and Th2 cells to protection and pathology in experimental models of granulomatous lung disease. J Immunol, 2001; 166:3432-3439.

20.Hernández-Pando R, Aguilar D, Graham R et al. Pulmonary tuberculosis in Balb/c mice with non-functional IL-4 genes: changes in the inflammatory effects of TNFα and in the regulation of fibrosis. Eur J Immunol, 2004; 34(1): 174-83.

21.Seah GT, Scott GM and Rook GAW. Type 2 cytokine gene activation and its relationship to extent of disease in patients with tuberculosis. J Infect Dis, 2000;181:385-389.

22. Van Crevel R, Karyadi E, van der Meer JWM, et al. Increased production of interleukin 4 by CD4+ and CD8+ T cells from patients with tuberculosis is related to the presence of pulmonary cavities. J Infect Dis, 2000;181:1194-1197.

23. Orme IM, Roberts AD, Abrams JS, et al. Cytokine secretion by CD4 T lymphocytes acquired in response to mycobacterium tuberculosis infection. J Immunol, 1993;151:518-525.

24.North RJ. Mice incapable of making IL-4 or IL-10 display normal resistance to infection with Mycobacterium tuberculosis.

25.Jung YJ, LaCourse R, North RJ et al. Evidence inconsistent with a negative influence of T helper 2 cells on protection afforded by a dominant T helper 1 response against Mycobacterium tuberculosis lung infection in mice. Infect Immun, 2002;70(11):6436-6443.

26.Lin Y, Zhang M, Barnes P, et al. Absence of a prominent Th2 cytokine response in human tuberculosis. Infect Immun, 1996; 64(4):1351-1356.

27.Feng CG, Britton WJ. CD4+ and CD8+ T cells mediate adoptive immunity to aerosol infection of Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin. J Infect Dis, 2000,181(5):1846-1849.

28.Turner J, Frank AA,Orme IM. Old mice express a transient early resistance to pulmonary tuberculosis that is mediated by CD8 T cells. Infect Immun, 2002;70(8):4628-37

29.Urdahl KB, Liggitt D, Bevan MJ. CD8+ T cells accumulate in the lungs of Mycobacterium tuberculosis-infected Kb-/-Db-/- mice, but provide minimal protection. J Immunol, 2003,170(4):1987-1994

30.Stenger S, Hanson DA, Modlin RL et. Al. An antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin. Science, 1998, 282:121-125.

31.Arriaga AK, Orozco EH, Hernández-Pando R, et al. Immunological and pathological comparative analysis between experimental latent tuberculous infection and progressive pulmonary tuberculosis. Clin Exp Immunol 2002; 128:229-237.

32.Hernández-Pando R, Orozco H, Madrid-Marina V et al. Analysis of the local kinetics and localization of interleukin-1α, tumour necrosis factor-α and transforming growth factor-β, during the course of experimental pulmonary tuberculosis. Immunol, 1997; 90:607-617.

33.Hernández-Pando R, and Rook GAW. The role of TNF-α in T-cell-mediated inflammation depends on the Th1/Th2 cytokine balance. Immunol, 1994; 82:591-595.

34.Rangel J, El papel de la PGE_2 en la inmunopatogenesis de la tuberculosis pulmonar murina. Tesis de doctorado. Departamento de Inmunología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas IPN; División de Patología Experimental, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”.

35. Fabre A, Efecto inmunoterapéutico del factor de transferencia murino combinado con drogas antifímicas en la tuberculosis. Tesis de doctorado. Departamento de Inmunología, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas IPN; División de Patología Experimental, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”.

36.Orme IM, Collins FM. Protection against Mycobacterium tuberculosis infection by adoptive immunotherapy. Requirement for T cell-deficient recipients. J Exp Med, 1983; 158:74-83.

37.Orme IM. The kinetics of emergence and loss of mediator T lymphocytes acquired in response to infection with Mycobacterium tuberculosis. J Immunol, 1987; 138(1):293-298.

38.Toossi Z, Gogate P, Ellner JJ et al. Enhanced production of TGF-beta by blood monocytes from patients with active tuberculosis and presence of TGF-beta in tuberculous granulomatous lung lesions. J immunol, 1995; 154(1):465-73.

39.Dlugovitzky D, Bay ML, Bottasso OA. Influence of disease severity on nitrite and cytokine production by peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from patients with pulmonary tuberculosis (TB). Clin Exp Immunol, 2000; 122(3):343-349.

40.Fiorenza G, Rateni L, Dlugovitzky DG, et al. TNF-alpha, TGF-beta and NO relationship in sera from tuberculosis (TB) patients of different severity. Immunol Lett, 2005; 98(1):45-48.

41.Bonecini-Almeida MG, Ho JL, Lapa e Silva JR, et al. Down-modulation of lung immune responses by interleukine-10 and transforming growth factor β (TGF-β) and analysis of TGF-β receptors I and II in active tuberculosis. Infect Immun, 2004; 72(5): 2628-2634.

42.Aubert-Pivert EM, Chedevergne FM, de Blic JM et al. Cytokine transcripts in pediatric tuberculosis: a study with bronchoalveolar cells. Tuber Lung Dis, 2000; 80(6): 249-258.

43.Bai X, Wilson SE, Chan ED et al. Morphometric analysis of Th(1) and Th(2) cytokine expression in human pulmonary tuberculosis. Tuberculosis (Edinb), 2004; 84(6): 375-385.

44. Kasper D, Braunwald E, Fauci A et al. *Tuberculosis* in Harrison's Principles of Internal Medicine, 16a edición, USA, McGraw-Hill Companies Inc, 2005, pags 953-966.

45.Massagué J. The transforming growth factor-β family. Annu Rev Cell Biol, 1990; 6:597-641.

46.Letterio JJ, Roberts AB. Regulation of immune responses by TGF-β. Annu Rev Immunol, 1998; 16: 137-161.

47.Epstein FH, Blobe GC, Schiemann WP, Lodish HF. Role of transforming growth factor β in human disease. NEJM, 2000; 342(18):1350-1358.

48.Massagué J. TGF-β signal transduction. Annu Rev Biochem, 1998; 67:753-791.

49.Wahl SM, Chen W. Transforming growth factor-β-induced regulatory T cells referee inflammatory and autoimmune diseases. Arthritis Res Ther, 2005; 7(2):62-68.

50. Lin MO, Wan YY, Flavell A et al. Transforming growth factor-β regulation of immune responses. Annu Rev Immunol, 2006; 24:99-146.

51.Wahl SM, Swisher J, McCartney-Francis N, Chen W.TGF-β the perpetrator of immune suppression by regulatory T cells and suicidal T cells. J Leukoc Biol, 2004; 76:15-24.

52.Wahl MS, Hunt DA, Sporn MB et al. Transforming growth factor type β induces monocyte chemotaxis and growth factor production. PNAS, 1987; 84:5788-5792.

53.Espevik T, Figari I, Palladino MAJr, et al. Inhibition of cytokine production by cyclosporin A and transforming growth factor β. J Exp Med, 1987; 166: 571-576.

54.Tsunawaki S, Sporn MB, Ding A et Nathan C. Deactivation of macrophages by transforming growth factor-β. Nature, 1988; 334: 260-262.

55.Toossi Z et Ellner JJ. The Role of TGFβ in the pathogenesis of human tuberculosis. Clin Immunol Immunopathol, 1998; 87(2):107-114.

56.Bright JJ et Sriram S. TGF-β inhibits IL-12-induced activation of Jak-STAT pathway in T lymphocytes. J Immunol, 1998; 161: 1772-1777.

57.Gorelik L et Flavell RA. Transforming growth factor-β in T-cell biology. Nature Rev Immunol, 2002; 2: 46-53.

58.Kehrl, Wakefield LM et Fauci AS et al. Production of transforming growth factor β by human T lymphocytes and its potential role in the regulation of T cell growth. J Exp Med, 1986; 163:1037-1050.

59.Rich S, Van Nood N et Lee HM. Role of alpha 5 beta 1 integrin in TGF-beta 1-costimulated CD8+ T cell growth and apoptosis. J Immunol, 1996; 157(7): 2916-2923.

60.Swain SL, Huston G, Tonkonogy A et Weinberg A. Transforming growth factor-beta and IL-4 cause helper T cell precursors to develop into distinct effector helper cells that differ in lymphokine secretion pattern and cell surface phenotype. J Immunol, 1991, 147(9): 2991-3000.

61.Schmitt E, Hoehn P et Germann T. T helper type 1 development of naïve CD4+ T cells requires the coordinate action of interleukine-12 and interferon-γ and is inhibited transfroming growth factor-β. Eur J Immunol, 1994; 24:793-798.

62.Gorelik L, Fields PE et Flavell RA. Cutting edge: TGF-β inhibits Th type 2 development through inhibition of GATA-3 expression. J Immunol, 2000, 165:4773-4777.

63.Gorelik L, Constant S et Flavell RA. Mechanism of transforming growth factor β-induced inhibition of T helper type 1 differentiation. J Exp Med, 2002; 195(11):1499-1505.

64.Zhang X, Giangreco L et Swain SL. Control of CD4 effector fate: Transforming growth factor β1 and interleukin 2 synergize to prevent apoptosis and promote effector expansion. J Exp Med, 1995; 182: 699-709.

65.Ludviksson BR, Seegers D, Resnick AS et Strober W. The effect of TGF-beta 1 on immune responses of naive versus memory CD4+ Th1/Th2 T cells. Eur J Immunol, 2000; 30(7): 2101-2111.

66.Kitani A, Fuss IJ, Strober W et al. Treatment of experimental (trinitrobenzene sulfonic acid) colitis by intranasal administration of transforming growth factor (TGF)-β1 Plasmid: TGF-β1-mediated suppression of T helper cell type 1 response occurs by interleukine (IL)-10 induction and IL-12 receptor β2 chain downregulation. J Exp Med, 2000; 192(1): 41-52.

67.Marth T, Strober W, Seder RA et Kelsall BL. Regulation of transforming growth factor –β production by interleukine-12. Eur J Immunol, 1997; 27: 1213-1220.

68.Kulkarni AB, Huh CG, Karlsson S et al. Transforming growth factor β1 null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early death. PNAS, 1993; 90: 770-774.

69.Lucas PJ, Kim SJ, Melby S et Gress RE. Disruption of T cell homeostasis in mice expressing a T cell-specific dominant negative transforming growth factor β II receptor. J Exp Med, 2000; 191(7): 1187-1196.

70.McCartney-Francis N et Sharon Wahl. Dysregulation of INF-γ signaling pathways in the absence of TGF-β1. J Immunol, 2002; 169: 5941-5947.

71. Dang H, Geiser AG, Letterio JJ, Talal N et al. SLE-like autoantibodies and Sjogren's syndrome-like lymphoproliferation in TGF-beta knockout mice. J Immunol, 1995; 155(6): 3205-12.

72.Letterio JJ, Geiser AG, Roberts AB, et al. Autoimmunity associated with TGF-β1-deficiency in mice is dependent on MHC class II antigen expression. J Clin Invest, 1996; 98: 2109–2119.

73.Aung H, Toossi Z, Rich EA et al. Expression of transforming growth factor-beta but not tumor necrosis factor-alpha, interferon-gamma, and interleukin-4 in granulomatous lung lesions in tuberculosis. Tuber Lung Dis, 2000; 80(2):61-67.

74.Jayasankar K, Shakila H, Ramanathan VD et al. Biochemical and histochemical changes pertaining to avtice and healed cutaneous tuberculosis. Br J Dermatol, 2002; 146(6): 977-982.

75.Hirsch CS, Toossi Z, Ellner JJ et al. Depressed T-cell interferon-gamma responses in pulmonary tuberculosis: analysis of underlying mechanisms and modulation with therapy. J Infect Dis, 1999; 180(6): 2069-2073.

76.Rangel J, Estrada I, García ML, Hernández-Pando, et al. The role of prostaglandin E2 in the immunopathogenesis of experimental pulmonary tuberculosis. Immunol, 2002; 106: 257-266.

77.Herrera E. *Eicosanoides: metabolismo y papel funcional* en Bioquímica: aspectos estructurales y vías metabólicas, volúmen 1, 2ª Edición, España, Ed. Interamericana McGraw-Hill, 1991, pp 735-760.

78.Pathak SK, Bhattacharyya A, Basu J, et al. Toll-like receptor 2 and mitogen- and stress-activated kinase 1 are effectors of Mycobacterium avium-induced cyclooxygenase-2 expression in macrophages. J Biol Chem, 2004; 279(53): 55127-55316.

79.Serhan CN, Haeggström JZ, et Leslie CC. Lipid mediator networks in cell signaling: update and impact on cytokines. FASEB J, 1996; 10:1147-1158.

80.O´Neill GP et Ford-Hutchinson AW. Expression of mRNA for cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in human tissues. FEBS Lett, 1993; 330(2):156-160.

81.Kurumbail RG, Stevens AM, Stallings WC, et al. Structural basis for selective inhibition of cyclooxigenase-2 by anti-inflammatory agents. Nature, 1996; 384(19): 644-648.

82. Tilley SL, Coffamn TM et Koller BH. Mixed messages: modulation of inflammation and immune responses by prostaglandins and thromboxanes. J Clin Invest, 1002; 108:5-23.

83. Reddy ST et Herschman HR. Prostaglandin synthase-1 and prostaglandin synthase-2 are coupled to distinct phospholipases for the generation of prostaglandin D_2 in activated mast cells. J Biol Chem, 1997; 272(6):3231-7.

84. Naraba H, Murakami M, Oh-ishi S et al. Segregated Coupling of Phospholipases A2, Cyclooxygenases, and Terminal Prostanoid Synthases in Different Phases of Prostanoid Biosynthesis in Rat Peritoneal Macrophages. J Immunol, 1998; 160:2974-2982.

85. Jakobsson PJ, Thoren S, Morgenstern R, et Samuelsson B. Identification of human prostaglandin E synthase: a microsomal, glutathione-dependent, inducible enzyme, constituting a potential novel drug target. PNAS, 1999; 96:7220–7225.

86. Murata T, et al. Altered pain perception and inflammatory response in mice lacking prostacyclin receptor. Nature,1997; 388:678–682.

87. Kumar V, Abbas AK et Fausto N.*Infectious Diseases* enRobbins and Cotran Pathologic Basis of Disease 7a edición, USA, Elsevier Saunders, 2005, pag 381-388

88. Liu MC, Hubbard WC, Lichtenstein LM et al. Immediate and late inflammatory responses to ragweed antigen challenge of the peripheral airways in allergic asthmatics. Cellular, mediator, and permeability changes. Am Rev Respir Dis, 1991; 144(1):51-8.

89. Satoh T, Moroi R, Nakamura M et al. Prostaglandin D_2 plays an essential role in chronic allergic inflammation of the skin via CRTH2 receptor. J Immunol, 2006; 177:2621-2629.

90. Fujitani Y, Kanaoka Y, Urade Y et al. Pronounced Eosinophilic Lung Inflammation and Th2 Cytokine Release in Human Lipocalin-Type Prostaglandin D Synthase Transgenic Mice. J Immunol, 2002; 168:443-449.

91. Raud J, Dahlen SE, Hedqvist P et al. Enhancement of acute allergic inflammation by indomethacin is reversed by prostaglandin E_2: apparent correlation with in vivo modulation of mediator release. PNAS, 1988; 85:2315–2319.

92. Langenbach R, Loftin CD, Lee C et Tiano H. Cyclooxygenase-deficient mice. A summary of their characteristics and susceptibilities to inflammation and carcinogenesis. Ann N Y Acad Sci, 1999; 889:52-61.

93.Michelin MA, Silva JS, et Cunha FCQ. Inducible cyclooxygenase released prostaglandin mediates immunosuppression in acute phase of experimental Trypanosoma cruzi infection. Exp Parasitol, 2005; 111: 71-79.

94.Yong EC, Chi EY, et Henderson Jr WR. Toxoplasma gondii alters eicosanoid release by human mononuclear phagocytes: role of leukotrienes in interferon gamma-induced antitoxoplasma activity. J Exp Med, 1994; 180: 1637-1648.

95.Reiner NE, et Malemud CJ. Arachidonic acid metabolism by murine peritoneal macrophages infected with Leishmania donovani: in vitro evidence for parasite-induced alterations in cyclooxigenase and lipooxygenase pathways. J Immunol, 1985; 134: 556-563.

96.Cillari E, Liew FY, et Lelchuk R. Suppression of interleukine-2 production by macrophages in genetically susceptible mice infected with Leishmania major. Infect Immun, 1986; 54: 386-394.

97.Freire-de-Lima CG, Nascimento DO, Lopes MF et al. Uptake of apoptotic cells drives the growth of a pathogenic trypanosome in macrophages. Nature, 2000; 403, 199-203.

98.Pinge-Filho P, Tadokoro CE, et Abrahamsohn IA. Prostaglandins mediate suppression of lymphocyte proliferation and cytokine synthesis in acute Trypanosoma cruzi infection. Cell Immunol, 1999; 193(1): 90-98.

99.Michelin MA, Figueiredo F, Cuhna FQ, Involvement of prostaglandins in the immunosuppression occurring during experimental infection by Paracoccidiodes brasiliensis. Exp Parasit, 2002; 102: 170-177.

100.Katamura K, Shintaku N, Furusho K, et al. Prostaglandin E2 priming of naive CD4+ T cells inhibits acquisition of ability to produce INF-γ and IL-2, but not IL-4 and IL-5. J Immunol, 1995; 155: 4604-4612.

101.Renz H, Gong JH, Gemsa D et al. Release of tumor necrosis factor-α from macrophages. Enhancement and suppression are dose-dependent regulated by prostaglandin E2 and cyclic nucleotides. J Immunol, 1988; 141: 2388-2393.

102.Rahmouni S, Aandahl EM, Moutschen M, et al. Cyclo-oxygenase type 2-dependent prostaglandin E_2 secretion is involved in retrovirus-induced T-cell dysfunction in mice. Biochem J, 2004; 384: 469-476.

103.Tse H, Josephy SI, Cooper et al. Activation of the mitogen-activated protein kinase signaling pathway is instrumental in determining the ability of Mycobacterium avium to grow in murine macrophages. J Immunol, 2002; 168: 825-833.

104.Ridgway D, Wolff L, Kirkpatrick C et al. Indomethacin-sensitive monocyte killing defect in a child with disseminated atypical mycobacterial disease. J Clin Immunol, 1991; 11: 357-362.

105.Wrana JL, Attisano L, Massagué J, et al. TGFβ signals through a heterodimeric protein kinase receptor complex. Cell, 1992; 71: 1003-1014.

106.Hirsch CS, Ellner JJ, Blinkhorn R, et Toosi Z. In vitro restoration of T cell responses in tuberculosis and augmentation of monocyte effector function against Mycobacterium tuberculosis by natural inhibitors of transforming growth factor β. PNAS, 1997; 94: 3926-3931.

107.López-Casillas F, Wrana JL et Massagué J. Betaglycan presents ligand to the TGFβ singnaling receptor. Cell, 1993; 73: 1435-1444.

108.López-Casillas F, Payne HM, Andrés JL et Massagué J. Betaglycan can act as a dual modulator of TGFβ access to signaling receptors: Mapping of ligand binding and GAG attachment sites. J Cell Biol, 1994; 124: 557-568.

109.Vilchis-Landeros MM, Montiel JL, López-Casillas F et al. Recombinant soluble betaglycan is a potent and isoform-selective transforming growth factor-β neutralizing agent. Biochem J, 2001; 355:215-222.

110.Edwards III CK, Hedegaard HB, Past MJ et al. Chronic infection due to Mycobacterium avium intracellulare in mice: association with macrophage release of

prostaglandin E_2 and reversal by injection of indometacin, muramyl dipeptide or interferon-γ. J Immunol, 1986; 136(5): 1820.

111.Porath, J., and B. Olin. 1983. Immobilized metal ion affinity adsorption and immobilized metal ion affinity chromatography of biomaterials. Serum proteins affinities for gel-immobilized iron and nickel ions. Biochemistry. 22:1621-1630.

112. Day SJ, Graham DF. Sample size and power for comparing two or more treatment groups in clinical trials. BMJ, 1989;299(6700):663-5

113.Hernández-Pando R, Orozco H, Rook GAW et al. Adrenal changes in murine pulmonary tuberculosis; a clue to pathogenesis? FEMS Immunol Med Microbiol, 1995; 12:63-72.

114.Prophet E, Mills B, Arrington JB et Sobin LH. Métodos histotecnológicos, Registro de Patología de los Estados Unidos de América, 1995, Washington, D.C., pp 27-60 y 129-135.

115.Mason CM, Porretta E, Zhang P et Nelson S. CD4+ CD25+ transforming growth factor-beta-producing T cells are present in the lung in murine tuberculosis and may regulate the host inflammatory response. Clin Exp Immunol, 2007;148(3):537-45.