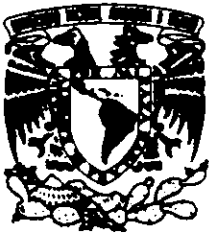


03062



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y DE  
POSGRADO DEL CCH

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS

4  
29.

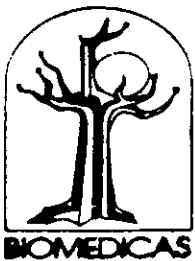


"Análisis de la respuesta de células T de  
pulmón en un modelo de tuberculosis  
experimental en ratón".

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE  
**MAESTRIA EN INVESTIGACION  
BIOMEDICA BASICA**

**P R E S E N T A :**  
Q.F.B. Gejmán Bernal Fernández



266255

México, D. F.

1998

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

PAG.

DESCONTINUA

**A mi hijo Uriel Isaac con todo el amor del mundo**

**A ti Flaca**

## **AGRADECIMIENTOS**

**Amis padres con devoción y respeto**

**A mis hermanos con mucho cariño**

**Juan Manuel, va para ti donde quiera que estes**

A mis amigos y “co-workers”: Chayo, Ismael, Ciro, Hugo, Cristy, Isabel, Martucha, Claudia (uno), Claudia (dos), José, Pepe, Nacho, Alex, Moni, Chamo, Toño, Nancy, Alfredo, Miriam, Erika e Ileana.

A mi comité tutorial:

Dr. Raúl Mancilla por su paciencia, apoyo y dirección.

Dr. Rafael Saavedra por sus consejos e invaluable amistad

Dra. Luz María López por su ayuda y gran disposición

A los miembros del Jurado: Dr. Enrique Ortega Soto, Dra. Ingeborg Becker Fauser, Dr. Raúl Mancilla Jiménez, Dr. Luis Felipe Montaña Estrada y Dr. Vianney Ortiz Navarrete, por su buena disposición y las aportaciones a este trabajo.

## ÍNDICE

<b>RESUMEN</b>	1
<b>INTRODUCCIÓN</b>	3
Historia	4
Aparición de la tuberculosis	4
Etiología Infecciosa	5
La superficie micobacterial	6
Inmunología de la tuberculosis	7
Patogénesis de la tuberculosis pulmonar	8
Infección de tuberculosis por la vía respiratoria	8
Establecimiento de la lesión tuberculosa inicial	8
Daño tisular	9
Licuefacción	11
Tipos básicos de lesiones y enfermedad tuberculosa	13
Mecanismos de inmunidad en tuberculosis	14
Inmunidad mediada por células	14
Efectos benéficos y dañinos de los procesos inmunológicos	14
Inmunidad local	15
Inmunidad sistémica	15
Duración y especificidad de la CMI y su llamado en reinfección	16
Linfocitos T	16
Expresión de moléculas de superficie celular	17
CD3	18
CD4 y CD8	19
CD28	20
CD45R0	22
TCR- $\alpha\beta$ y TCR- $\gamma\delta$	23
Linfocinas y citocinas	24
Respuesta de células T y citocinas en tuberculosis	27
Células T CD4 <sup>+</sup>	27
Células T CD4 <sup>+</sup> de memoria	28
Respuesta Th1 y Th2 en humanos	28
<b>OBJETIVO</b>	29
<b>HIPÓTESIS</b>	29
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	30
Cultivo de <i>Mycobacterium bovis</i> -BCG	30
Cultivo de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	30
Determinación de la viabilidad bacilar con diacetato de fluoresceína	30
Obtención de un extracto proteínico total (EPT) de cultivos de <i>M. tuberculosis</i> y de <i>M. bovis</i> -BCG	31
Purificación de antígenos proteínicos de <i>M. tuberculosis</i>	31
Animales de experimentación	32
Inmunizaciones y obtención de suero anti EPT de ratón	33

Modelo de tuberculosis pulmonar en ratón	33
Inoculación repetida de ratones con <i>M. bovis</i> -BCG muertos por calor	34
Análisis de imagen computarizado	34
Determinación de la carga bacilar	34
Obtención de células de lavados broncoalveolares (LBA) de ratón	35
Obtención de células de bazo de ratón	35
Análisis de células de LBA y esplénicas por citometría de flujo (FACS)	35
Obtención de anticuerpos monoclonales anti-CD3, CD4 y CD8 para citometría de flujo	36
Obtención de anticuerpos comerciales anti-CD28, CD45RO, TCR- $\alpha\beta$ y TCR- $\gamma\delta$ , anti-IgG de ratón, rata y hámster	37
Estudios de inmunoblot	37
ELISA para identificar anticuerpos de la subclase IgG1 e IgG2a	38
Inmunohistoquímica sobre pulmones de ratones del modelo de tuberculosis pulmonar	39
Análisis estadístico	40
<b>RESULTADOS</b>	41
Desarrollo del modelo de tuberculosis pulmonar en ratones	41
Análisis histológico	41
Cinética de la carga bacilar	42
Análisis computarizado de imagen	42
Análisis por inmunoblot de la respuesta inmune humoral de ratones infectados con <i>M. bovis</i> -BCG	44
Análisis de citometría de flujo de células de pulmón y bazo de ratones del modelo de tuberculosis experimental	45
Estudios de ELISA para identificar isotipos de IgG contra antígenos de EPT de cultivos de <i>M. tuberculosis</i> y <i>M. bovis</i> -BCG	48
ELISA para la detección de subclases de IgG con antígenos proteínicos puros de <i>M. tuberculosis</i>	49
Estudios de inmunohistoquímica sobre cortes de pulmón de ratones del modelo de tuberculosis experimental	49
Análisis de inmunoblot para identificar antígenos relacionados con la producción de citocinas	51
<b>SECCIÓN DE GRÁFICAS</b>	53
<b>DISCUSIÓN</b>	75
<b>CONCLUSIONES</b>	81
<b>APÉNDICES</b>	82
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	87



## RESUMEN

Para caracterizar la respuesta inmune contra tuberculosis, se desarrolló un modelo experimental inoculando ratones BALB/c por vía intratraqueal con bacilos de *M. bovis*-BCG. La cinética de la infección fue analizada y se evaluó la carga bacilar (Ziehl Neelsen) cuyo valor máximo se observó a las 4 semanas y la extensión de la enfermedad (análisis de imagen computarizado) donde el porcentaje de inflamación y el tamaño de la lesión fueron mayores a las 8 semanas. Se caracterizó la respuesta inmune humoral por inmunoelectrotransferencia de extractos de *M. tuberculosis* y *M. bovis*-BCG revelados con los sueros de los ratones. No hubo inmunoreactividad en las 2 primeras semanas con ambos extractos; a partir de la cuarta semana se reconocieron bandas de 80 y 100 kD y posteriormente de 120, 110, 70 y 50-55 kD con *M. tuberculosis* y de 80, 90, 75 y 47-45 kD con *M. bovis*-BCG. Las células T fueron identificadas por citometría de flujo en células de lavados broncoalveolares y en bazo; en las células pulmonares se observó que las células CD8<sup>+</sup>, CD28<sup>+</sup> y TCR- $\gamma\delta$ <sup>+</sup> (este último no significativo estadísticamente) se incrementaron de manera significativa, mientras que las CD4<sup>+</sup> disminuyeron concomitantemente. En bazo no hubo cambios significativos. Al observarse una disminución en la carga bacilar, la aparición de inmunoreactividad en el inmunoblot y el incremento de las células CD8<sup>+</sup> en pulmón, a la cuarta semana de infección, estableciéndose el inicio de una fase de resolución de la enfermedad, se investigó por inmunoblot y ELISA la participación de citocinas tipo 1 y 2 por su influencia indirecta en la síntesis de IgG2a e IgG1 respectivamente; se observó que a partir de la cuarta semana, el patrón predominante fue de IgG2a. Posteriormente se intentó identificar antígenos relacionados con la síntesis de estas subclases por ELISA con proteínas purificadas de *M. tuberculosis* (23, 28, 30-31, 38 y 80 kD). El patrón fue similar ya que en la fase resolutoria (8 semanas) se observó un predominio de IgG2a sobre IgG1. Para confirmar lo anterior, se analizaron por inmunohistoquímica los pulmones de los ratones del modelo y se identificó una mezcla de ambos tipos de citocinas con predominio del tipo 1 a la doceava semana. Finalmente se buscó identificar por inmunoblot de extractos de *M. tuberculosis* y *M. bovis*-BCG antígenos relacionados con la producción de IgG1 e IgG2a. Con *M. tuberculosis* a partir de la cuarta semana se identificaron antígenos de 65 y 70 kD por ambas subclases mientras que los de 80, 50 y 30-31 solo por IgG2a. Con *M. bovis*-BCG se reconocieron bandas de 70 y 80 kD y exclusivamente con IgG2a las de 38 y 36 kD. Los

resultados anteriores sugieren que las células CD8<sup>+</sup> y las células productoras de citocinas tipo 1 participan en la fase de resolución en este modelo de tuberculosis experimental.

## INTRODUCCIÓN

*Mycobacterium tuberculosis* es el agente etiológico de la tuberculosis (Tb) (1), no obstante, *M. africanum* y *M. bovis* también producen Tb (2). Ésta es una de las enfermedades infecto-contagiosas más diseminadas en el hombre; aproximadamente una tercera parte de la población mundial (1700 millones) alberga al bacilo y cada año aparecen 8 millones de nuevos casos de enfermedad clínica, muriendo anualmente aproximadamente 3 millones de personas. El espectro de las manifestaciones clínicas de la Tb es amplio. La más común es la forma pulmonar. Fuera del pulmón pueden estar afectados las meninges (generalmente en niños), el riñón, los huesos y prácticamente cualquier órgano de la economía. La tuberculosis es causa de gran sufrimiento tanto para el individuo que la padece como para sus familiares. La magnitud del problema se ha ignorado durante mucho tiempo, no obstante, Tb es la más grande causa de muerte por un solo agente infeccioso en el mundo. Esta enfermedad impide de manera importante el desarrollo social y económico ya que una cuarta parte de los adultos en edad productiva mueren de Tb en países en vías de desarrollo.

Por si fuera poco, 2 nuevos problemas agravan el problema de la Tb: La epidemia del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y la aparición de cepas de *M. tuberculosis* multi-resistentes a fármacos. La infección con el VIH es el factor de más alto riesgo para que una infección endógena latente de Tb se reactive; además, también incrementa el riesgo de que nuevas infecciones de Tb progresen a la enfermedad. La resistencia a las principales drogas usadas contra Tb es un problema creciente, los programas de tratamiento establecidos en algunos países, resultan ineficientes y nutren la emergencia de cepas multi-resistentes.

La magnitud del impacto de la Tb y los altos costos de los tratamientos efectivos, han hecho del control de esta enfermedad, un problema prioritario a nivel nacional e internacional, por lo que, no obstante que los avances han sido muy limitados los apoyos han sido muy importantes para intentar erradicar esta enfermedad (1).

## HISTORIA

### Aparición de la Tuberculosis

En el periodo paleolítico, el hombre era nómada y no se congregaba en grandes grupos por lo que la Tb aparecía esporádicamente y no en forma epidémica. Cerca del año 8000 A.C., el desarrollo de técnicas de agricultura y domesticación permitieron la creación de asentamientos estables, lo que probablemente hizo que la infección se presentara con mayor frecuencia, sin embargo no dejaba de ser rara. Quizá la Tb apareció como enfermedad endémica primero en animales causada por *Mycobacterium bovis*, antes que en el humano. Ya que *Mycobacterium tuberculosis* es capaz de infectar primates se ha considerado la posibilidad de que halla existido primero en primates subhumanos y posteriormente en humanos. La diseminación epidémica comenzó lentamente al crecer la densidad de población. Esta diseminación por el mundo fue causada por viajeros europeos quienes llegaban a sitios lejanos y a sus colonias. Entre 1700 y 1800 la prevalencia de la Tb alcanzó su pico en Europa Occidental y en los Estados Unidos siendo indudablemente la más grande causa de muerte. Posteriormente la Tb se extendió a Europa Oriental, Asia, África y Sudamérica donde causó grandes estragos de 50 a 75 años después, para declinar lentamente. Esto se debió posiblemente a la aparición de individuos resistentes al bacilo tuberculoso.

Existen evidencias de la aparición de Tb en el año 3000 A.C., en el norte de África, en la era pre-dinástica de la cultura Egipcia, ya que se han descubierto figurillas y pinturas mostrando deformaciones óseas características de esta enfermedad. Además, se han encontrado momias que presentan cavernas y fibrosis pulmonares, así como cambios óseos típicos de la Tb. En los indígenas de América del Norte también se han encontrado indicios de Tb anteriores a la inmigración europea. Se han identificado bacilos ácido-alcohol resistentes en una momia en el Perú que data del año 700 D.C. Un reporte muestra cambios óseos típicos de Tb en vértebras de esqueletos humanos de 6 individuos de una población de 290 personas de una comunidad de Ohio que data del año 1275.

En Europa la Tb no alcanzó importancia hasta que la necesidad de cambios medio-ambientales en la Europa Feudal puso de relieve una epidemia llamada "La gran plaga blanca". En 1600 la incidencia de la Tb en Inglaterra se incremento bruscamente y se extendió lentamente hasta la Europa Oriental. En el Oriente no se conocía la Tb hasta hace

relativamente poco (1850 en las islas Hawaianas). En la India, la enfermedad era muy rara en la primera mitad del siglo XIX (3).

## ETIOLOGÍA INFECCIOSA DE LA TUBERCULOSIS

En 1882, Robert Koch hizo una presentación ante la Sociedad Fisiológica de Berlín que cambió radicalmente el pensamiento sobre la tuberculosis y en general sobre las enfermedades infecciosas, fundándose así la ciencia microbiológica. Él describió al bacilo *Mycobacterium tuberculosis* (Bacilo de Koch) y de manera convincente demostró que era el agente causal de la tuberculosis en base a técnicas de tinción, además de que fue capaz de cultivarlo en medios sólidos. De lo anterior se desprende lo que hoy conocemos como los postulados de Koch, donde se señala que para clasificar a una enfermedad como de origen infeccioso, se requiere aislarlo de los tejidos enfermos, cultivarlo *in vitro* y reproducir la enfermedad al administrarlo a un animal apropiado. Lamentablemente en 1890, Koch anunció que los filtrados de cultivos curaban la enfermedad, lo que causó controversia y fue prontamente desacreditado; lo anterior, más la negativa de divulgar la naturaleza y preparación del material administrado propiciaron el descrédito. No obstante, este material parcialmente purificado resultó ser el principal medio para determinar la infección de un individuo, a través de la prueba de la tuberculina. En 1891, Koch realizó experimentos con cobayos, demostrando la adquisición de inmunidad a raíz de una infección primaria y el término “fenómeno de Koch” a sido aplicado a los resultados descritos: Koch notó que cobayos sanos inoculados subcutáneamente con bacilos, morían por una infección diseminada a pesar de que la lesión del sitio de inoculación desaparecía. Sin embargo, una inoculación secundaria de organismos virulentos produjo resultados muy diferentes: no se presentaba la infección diseminada y en el sitio de la inoculación había induración 1 o 2 días después y posteriormente ulceración. Cuando se utilizaron bacilos muertos por calor en la inoculación primaria, se observaron los mismos resultados. Koch notó que un filtrado de cultivo de bacilos estéril, el cual nombró tuberculina, producía una induración cutánea como lo hacía el bacilo completo. Basándose en estas observaciones, Koch propuso el tratamiento de la Tb con tuberculina, lo cual resultó en un fracaso y un descrédito muy grande. (3).

Desde Koch hasta nuestros días se han realizado esfuerzos importantes para erradicar y conocer la naturaleza de la Tb, pero han sido insuficientes pues muchos de los

mecanismos involucrados en la infección por *M. tuberculosis* permanecen sin descubrirse y otros no son del todo comprendidos. Por lo tanto, es claro que se necesita avanzar a pasos agigantados tanto en la investigación como en el control de la Tb.

## LA SUPERFICIE MICOBACTERIAL

Pocos microorganismos tienen la capacidad de sobrevivir dentro de las células fagocíticas, *M. tuberculosis* lo logra posiblemente debido a sus propiedades fisicoquímicas. El bacilo está incluido en una típica membrana citoplasmática formada por una bicapa lipídica la cual se encuentra debajo de un rígido peptidoglicano (PG). Varias proteínas se asocian con el PG y algunas de ellas son inmunogénicas. Hacia el exterior el PG se asocia con uniones fosfodiéster a arabinogalactan (AG), un polímero de arabinosa y galactosa, ácidos micólicos, ácidos grasos largos de cadena ramificada (C<sub>60</sub> a C<sub>90</sub>) anclados a la parte distal del AG. El complejo PG y micolatos del disacárido trialosa (factor cordón) se asocian con el esqueleto de la pared celular. Otro grupo importante de componentes de la pared celular son los acilados de trialosa-2'-sulfato. Esto puede ser importante en la virulencia, ya que la mayoría de las cepas virulentas de *M. tuberculosis* elaboran sulfolípidos ácidos que pueden estar involucrados en la inactivación del fagosoma en el macrófago. Otro componente de la pared celular que se ha estudiado ampliamente es el lipoarabinomano (LAM) que se une a la membrana celular y se piensa que se extiende hasta la superficie. LAM es una mezcla heterogénea de arabinosa y manosa con lipopolisacáridos fosforilados de alto peso molecular. Los ácidos grasos palmitato y tuberculoestearato se presentan en forma de diacilglicerol unido a arabinosa y manosa ramificada con polisacáridos por la vía del fosfatidil-myo-inositol (esta unión no es usual en procariotes) (4).

A continuación, en la Tabla 1, se describen algunas de las proteínas más estudiadas de *M. tuberculosis*: (5)

**Tabla 1.- Proteínas identificadas por AcMo**

Peso Molecular	AcMo	Clona Recombinante	Secuencia Conocida	Proteínas Relacionadas
71000	51A <sub>3</sub> HAT1	Si	Parcial	<i>M. leprae</i> 70000 <i>E. coli</i> dnaK hsp 70
65000	TB78, H105	Si	Completa	<i>M. leprae</i> 65000 <i>E. coli</i> groEL
43000-45000	HG76	No	No	
38000	TB71, TB72 HYT28, HGT 3	Si	No	
35000	H61	Si	No	
32000-33000	HY27	No	No	
28000	H60	Si	No	
23000	D2D	No	No	<i>M. leprae</i> 28000
19000	TB23, F29.47 HYT6, 66	Si	Completa	
14000	F23.49, F24.2 TB68	Si	No	
12000	SA12	Si	N-terminal	

## INMUNOLOGÍA DE LA TUBERCULOSIS

Después del descubrimiento de *M. tuberculosis* por R. Koch, Elias Metchnikoff notó la gran importancia de los fagocitos en la defensa contra las infecciones. La significancia de los linfocitos en la resistencia antimicobacterial no fue reconocida hasta 1945 cuando Chase demostró que la hipersensibilidad retardada contra tuberculina podía ser transferida solo con células viables. A través de experimentos muy elegantes realizados por Lurie y después por Mackanass, se aclaró que la protección contra Tb dependía de la cooperación de los linfocitos y los fagocitos mononucleares, poco después se demostró que esta cooperación estaba mediada por factores solubles, ahora llamadas interleucinas, que son productos de los linfocitos T. Bajo la influencia de interleucinas apropiadas, los fagocitos mononucleares son

activados y de esta manera pueden ejercer funciones efectoras que incluyen la inhibición del crecimiento intracelular del bacilo tuberculoso (6).

## **PATOGÉNESIS DE LA TUBERCULOSIS PULMONAR**

### **Infección de Tuberculosis por la vía respiratoria.**

La Tb comienza cuando el bacilo tuberculoso es inhalado y depositado en un alvéolo (3). Solo las partículas finas que contienen de 1 a 3 bacilos comienzan la infección, ya que éstas se encuentran suspendidas en las vías aéreas que comunican a los espacios alveolares. las partículas bacilares más pesadas (conteniendo mayor número de micobacterias), tropiezan con la superficie mucosa de la nasofaringe y el árbol bronquial, removidas a través de los cilios y eventualmente tragados (7). Una vez que el bacilo se encuentra en el espacio alveolar, los leucocitos polimorfonucleares lo fagocitan, pero como son incapaces de “matar” a la micobacteria, son reemplazados por los macrófagos (8). El macrófago alveolar al ingerirlo, generalmente lo destruye (3). Los macrófagos alveolares son células que han sido activadas inespecíficamente por una variedad de partículas inhaladas, por ingestión de eritrocitos ocasionalmente extravasados y por una posible activación del sistema retículo endotelial, por lo que tienen capacidad microbicida antes de que el bacilo tuberculoso es inhalado, por lo que la inmunidad mediada por células (CMI), en la cual los Ag micobacteriales estimulan específicamente a las células T para activar macrófagos, no está involucrada en la destrucción inmediata del bacilo tuberculoso inhalado (9). La sobrevivencia de la micobacteria depende del inherente poder microbicida del macrófago y de la virulencia genética y fenotípica del bacilo. Un bacilo virulento en un macrófago relativamente débil parece ser capaz de multiplicarse e iniciar la enfermedad, pero un bacilo débil en un macrófago alveolar fuerte es destruido o inhibido antes de que la multiplicación bacilar pueda ocurrir (3).

### **Establecimiento de la Lesión Tuberculosa Inicial**

Si el macrófago alveolar no destruye ó inhibe a la micobacteria fagocitada, ésta se multiplica hasta que el fagocito estalla. Su carga bacilar es ingerida por otros macrófagos alveolares y monocitos que emigran del flujo sanguíneo. Ambos tipos celulares son atraídos por los bacilos liberados, restos celulares y factores quimiotácticos del huésped como el



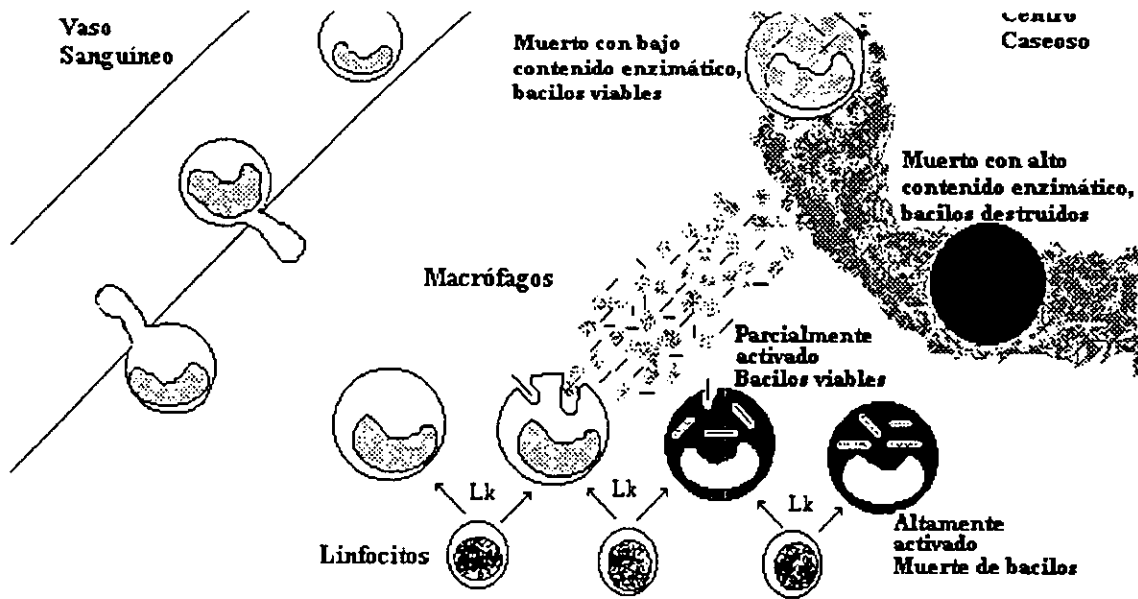
componente del complemento C5a y la proteína quimioatrayente de monocitos (MCP-1). Realmente, los responsables del destino de la lesión temprana son los macrófagos que llegan desde la circulación, ya que los macrófagos alveolares permanecen en la periferia lejos del bacilo, localizado casi siempre en el centro de la lesión.

Los macrófagos inmaduros que llegan de la corriente sanguínea, ingieren los bacilos, después de esto, se da un estado simbiótico en el que ni el bacilo ni el macrófago se hacen daño, el nuevo macrófago no ha sido activado, por ello no puede inhibir o destruir los bacilos y éstos no dañan a los macrófagos porque el huésped no ha desarrollado una respuesta de hipersensibilidad tipo tuberculina. Con el tiempo, más y más bacilos y macrófagos se acumulan en la lesión (3).

### **Daño Tisular**

En esta etapa, la multiplicación logarítmica bacilar se detiene (condiciones anóxicas, pH bajo y la presencia de ácidos grasos inhibidores, aunque el bacilo puede sobrevivir por años en el foco caseoso sólido), el paciente se convierte en tuberculina positivo y la lesión progresa hacia una necrosis caseosa en el centro (3). Durante la 2ª y 4ª semana después de inhalar el bacilo, se desarrollan respuestas inmunes como la hipersensibilidad retardada (DTH) y la CMI. Los macrófagos desarrollan capacidad para eliminar a los bacilos intracelularmente y al mismo tiempo los fagocitos son eliminados por los bacilos o sus productos tóxicos tipo tuberculina, formándose una lesión que consiste de un centro necrótico caseoso rodeado principalmente por macrófagos y linfocitos viables.

Los macrófagos deben estar activados al encontrarse con el bacilo, las citocinas participan en esta activación, además, los fagocitos ingieren células y tejidos necróticos. En la tuberculosis, la acumulación y activación de macrófagos y linfocitos pueden restringir el crecimiento de los bacilos y arrestar la enfermedad (Figura 1).



**Figura 1.-** Activación de macrófagos en la lesión tuberculosa. Los fagocitos mononucleares son atraídos de los vasos sanguíneos y activados localmente por linfocitos y sus linfocinas (Lk) y por ingestión de bacilos, células muertas y restos celulares. Las linfocinas son producidas para activar al macrófago cuando los linfocitos son estimulados por Ag bacilares. Solo los macrófagos activados son capaces de destruir los bacilos tuberculosos.

La mayor necrosis en la lesión tuberculosa ocurre después del desarrollo de la DTH con su asociada infiltración de linfocitos y macrófagos. Esto no es entendido claramente pero se han ofrecido varias explicaciones: a) Algunas linfocinas pueden ser tóxicas a ciertas concentraciones, b) Los compuestos tóxicos de los bacilos (factor cordón) son liberados en grandes cantidades cuando las micobacterias son destruidas por procesos como la DTH y la CMI, c) La isquemia de los vasos sanguíneos trombosados, probablemente incrementan el daño a tejido. Los macrófagos que rodean el centro caseoso producen factores procoagulantes y las células y tejido necrótico del centro caseoso pueden activar el sistema de coagulación, d) Reacciones antígeno-anticuerpo (Ag-Ac), o incluso las proteínas agregadas en tejido necrótico, pueden activar localmente la cascada del complemento y dañar las células del huésped, e) Enzimas hidrolíticas (proteasas y lipasas) liberadas de

macrófagos (y granulocitos) vivos y en desintegración pueden dañar directamente al tejido, f) Intermediarios reactivos del oxígeno ( $H_2O_2$ ,  $O_2^-$ ,  $^1O_2$  y  $OH$ ) liberados de macrófagos (y granulocitos) puede también dañar el tejido cercano y g) el factor de necrosis tumoral (TNF) de macrófagos y linfocitos pueden hacer lo mismo.

Se sabe que la mayoría de la muerte celular y el daño a tejido en tuberculosis se debe a la DTH, directamente (por productos de los macrófagos y linfocitos participantes) o indirectamente (vía la coagulación sanguínea y la subsecuente isquemia) (7). Se piensa que con la muerte de macrófagos no activados en donde los bacilos crecen, el huésped elimina el medio intracelular que es favorable a este crecimiento. Por otro lado, los productos tipo tuberculina pueden jugar un papel muy importante en el proceso caseoso; estos productos y otros Ag son probablemente liberados o secretados por el bacilo en replicación intracelular. La sensibilidad de las células T (DTH) a tales productos quizá ocurre antes que a los principales y más grandes Ag del bacilo, porque la liberación de estos últimos pueden requerir muerte y lisis de los microorganismos (9).

### **Licuefacción**

La licuefacción de los centros caseosos es una de las respuestas más nocivas en esta enfermedad. Este proceso se relaciona con la hidrólisis de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos del tejido caseoso por parte de las enzimas hidrolíticas de los macrófagos (y quizá granulocitos), además de la disminución de los inhibidores de estas enzimas (7).

El material licuado es un excelente medio de cultivo para la micobacteria y (por primera vez en el curso de la enfermedad) el bacilo se multiplica extracelularmente alcanzando altas cantidades. En este punto, el huésped es muy sensible a productos tipo tuberculina, la gran carga antigénica resulta sumamente tóxica al tejido. Las paredes de los bronquios se necrozan y rompen formando una cavidad. Después, los bacilos y el material caseoso licuado son descargados en las vías aéreas alcanzando otras partes del pulmón y el medio externo.

Una lesión caseosa licuada en el pulmón (o en el ganglio linfático hiliar) puede descargar su contenido en rutas aéreas y causar focos neumónicos, bronconeumonía ó incluso neumonía lobular. La extensión de la enfermedad se determina por el número de

bacilos y su viabilidad, la cantidad de productos tipo tuberculina en el material caseoso licuado y la cantidad de este material aspirado a lo largo del árbol bronquial.

La lesión tuberculosa cavitaria puede no sanar durante la vida del paciente. Se puede agrandar, contraer o permanecer más o menos estable. La curación espontánea de la lesión tuberculosa se debe a procesos fibróticos, donde ésta es generalmente incompleta y cantidades variables de material caseoso y fibrocaseoso permanece en la lesión fibrótica. La deposición de calcio es frecuente y ocurre osificación. Una cavidad “sanada” esta libre de micobacterias en raras ocasiones, las que persisten por muchos años en estado latente (3).

Sin embargo, se presentan reactivaciones denominadas tuberculosis post-primaria, que derivan de una reactivación endógena, o bien, de una nueva infección exógena. Existen factores medio ambientales y condiciones de vida que influyen para la reactivación endógena, como: alcoholismo, diabetes, silicosis, desnutrición y estados de inmunosupresión (8).

Con la aparición de agentes antimicobacteriales efectivos, la apertura de estas cavidades ocurre y el tratamiento elimina la mayoría de los bacilos de las cavidades.

La licuefacción es la responsable de la perpetuación de esta enfermedad en el género humano. Entre el gran número de bacilos, se producen cepas mutantes resistentes a agentes antimicobacteriales. Por lo anterior, la tuberculosis se trata con 4 o incluso 5 agentes antimicobacterianos simultáneamente.

Los macrófagos no sobreviven en un material licuado o incluso caseoso, posiblemente porque fueron pasivamente sensibilizados por Ag micobacterianos presentes en altas (letales) concentraciones. Es posible que los macrófagos que entran a esta lesión son “asesinados” por ácidos grasos tóxicos originados por las células huésped y/o los bacilos. Además, los macrófagos activados son ineficientes en el control de la multiplicación extracelular de los bacilos en la cavidad.

Los factores que producen la licuefacción son desconocidos pero se asocian con altos niveles de reactividad a la tuberculina y enzimas hidrolíticas elevadas.

La destrucción de los productos del material caseoso son osmóticamente activos, de este modo, el agua de tejido circundante es absorbido y se crea un excelente medio de cultivo para la micobacteria. Actualmente no se cuenta con agentes terapéuticos que eviten la

licuefacción, pero una apropiada terapia antimicobacteriana puede reducir marcadamente el número de bacilos viables y con el tiempo elimina la enfermedad (3).

### **Tipos Básicos de Lesiones y Enfermedad Tuberculosa**

La mayoría de las infecciones tuberculosas pulmonares en humanos no son aparentes. En tales casos, la inhalación del bacilo tuberculoso causa una lesión muy pequeña que es suficiente para producir una reacción positiva a la tuberculina pero muy pequeña para ser detectada en una radiografía de tórax.

Los tipos de enfermedad y lesiones encontrados en tuberculosis pulmonar humana se enlistan en la Tabla 2.

**Tabla 2.- Tipos básicos de tuberculosis pulmonar**

---

#### **Tipos de lesión**

Caseosa encapsulada, licuada ó nódulos calcificados

Tipos de lesiones proliferativas

Tipos de lesiones exudativas

Cavidades

#### **Tipos de Enfermedad**

Tubérculo pequeño de origen hematógeno: focalmente localizado o difusamente diseminado a lo largo de ambos pulmones (tuberculosis miliar)

Lesiones caseosas licuadas con formación cavitaria y extensión broncogénicas

Lesiones progresivas, localmente destructivas

---

Las lesiones cambian de un tipo a otro, o bien, una composición de varios. También, varios tipos de lesiones pueden coexistir en el pulmón. La tuberculosis es una enfermedad local en la que cada lesión es manejada por el huésped como si no existieran otras lesiones. Además, las lesiones en un área del pulmón, pueden progresar mientras que otras pueden estabilizarse o desaparecer, incluso esto se puede observar en una misma lesión. La enfermedad puede fluctuar entre periodos de exacerbación y remisión (3). También las

lesiones “curadas” o arrestadas ocasionalmente se reactivan, a veces años después, causando una enfermedad media a severa (7).

## **MECANISMOS DE INMUNIDAD EN TUBERCULOSIS**

### **Inmunidad Mediada por Células**

Los términos de CMI, inmunidad celular y resistencia celular adquirida se utilizan indistintamente. Sin embargo, Mackaness y Dannenberg usaron resistencia celular adquirida e inmunidad celular respectivamente, para definir la presencia de macrófagos activados. En contraste, CMI designa una población de linfocitos T (específicos contra Ag micobacterianos) expandidos clonalmente, con o sin números incrementados de macrófagos activados presentes. En otras palabras, representa el potencial para un rápido desarrollo de la resistencia celular adquirida por la expansión de células T específicas. La CMI generalmente (pero no siempre) incluye la presencia de resistencia adquirida, por ejemplo, grandes cantidades de macrófagos activados localmente producidos por las poblaciones expandidas de células T específicas y sus linfocinas (3). La importancia de la linfocinas en Tb incluye factores quimiotácticos para macrófagos y linfocitos y factores activadores de macrófagos (principalmente IFN- $\gamma$ ). La activación y acumulación celular en el lugar de la lesión, puede determinar su destino. Se ha observado que el TNF- $\alpha$  y TNF- $\beta$  probablemente participan en el daño tisular encontrado en esta enfermedad (7).

### **Efectos Benéficos y Dañinos de los Procesos Inmunológicos**

La alta sensibilidad a la tuberculina y la CMI que la acompaña son siempre benéficas para el huésped en el control del desarrollo de la lesión inicial producida por la diseminación exógena o hematógena de bacilos endógenos (lesiones que generalmente contienen pocos bacilos). Las personas fuertemente positivas a tuberculina responden con una acelerada acumulación de macrófagos y linfocitos T específicos antes de que los bacilos y sus Ag alcancen altas concentraciones locales. Por lo tanto, esta respuesta inmune detiene la progresión en las lesiones iniciales antes de que el daño tisular y la necrosis caseosa ocurran.

La alta sensibilidad a la tuberculina es dañina, aún cuando la micobacteria y sus Ag tipo tuberculina están presentes en alta concentración. Después, resulta mucha destrucción y caseación tisular. Las altas concentraciones antigénicas se dan en áreas del pulmón que son

“sembradas” por material caseoso licuado descargado de una cavidad en el árbol bronquial.

Esto también ocurre cuando los bacilos se replican logarítmicamente en macrófagos de huéspedes genéticamente susceptibles o inmunodeficientes

Algunos componentes micobacteriales (probablemente algunas proteínas complejadas con carbohidratos y lípidos) pueden estimular la CMI con mínimo daño a tejidos, mientras que otras proteínas que participan en la reacción a la tuberculina, pueden producir más daño a tejido con menor CMI.

Uno de los retos para los investigadores que están desarrollando nuevas vacunas contra Tb, será purificar componentes del bacilo que produzcan macrófagos mejor activados y menor destrucción de tejido (3).

### **Inmunidad Local**

La resistencia celular adquirida producida por la CMI es un fenómeno local. Los macrófagos entran a la lesión tuberculosa, se activan y desarrollan resistencia adquirida solo localmente con una gran capacidad para eliminar a la micobacteria.

En una lesión tuberculosa en regresión, un macrófago pobremente activado con numerosos bacilos, muere y libera su carga bacilar, después, los macrófagos altamente activados (que se han integrado a la reacción inmune) fagocitan y “asesinan” a los bacilos liberados, con lo que se detiene la progresión de la lesión (3).

### **Inmunidad Sistémica**

Grandes cantidades de linfocitos T con receptores específicos para antígenos micobacterianos están presentes en la sangre y tejidos linfoides de individuos con CMI y DTH que en la sangre y tejidos de individuos no inmunes. Estas células T se han expandido clonalmente durante la exposición a la inmunización. Por lo tanto, en el sitio donde los bacilos están depositados, grandes cantidades de células T se acumulan y producen linfocinas. Esto acelera la acumulación y activación macrofágica para destruir a los bacilos antes que se multipliquen apreciablemente, así, la lesión permanece pequeña y sana rápidamente. Este proceso es el responsable de que una Tb secundaria no progrese en un individuo adulto inmunocompetente.

En individuos inmunes libres de infección la inmunidad sistémica puede ser una subpoblación de células T expandida específicamente. Esta subpoblación causa una lesión aceleradamente en el sitio donde los bacilos tuberculosos son depositados. Además, la inmunidad sistémica es en realidad la capacidad para producir rápidamente inmunidad local (3).

### **Duración y Especificidad de la CMI y su Llamado en Re-infección**

La resistencia celular adquirida disminuye con el tiempo después de la inmunización con *Mycobacterium bovis*-BCG. Tal resistencia puede ser reinducida rápidamente con una completa intensidad por re-exposición a Ag inmunizantes de BCG. De la primera exposición, el huésped retiene grandes cantidades de células T expandidas clonalmente con receptores específicos para estos Ag. En la re-exposición, estas células T producen linfocinas rápidamente y se produce la acumulación y activación de macrófagos.

La inoculación de otro tipo de bacterias intracelulares facultativas no induce la inmunidad contra el bacilo tuberculoso, sin embargo, cuando el macrófago ha sido activado, tiene la capacidad de destruir inespecíficamente microorganismos intracelulares facultativos. La especificidad de la CMI esta sustentada por los linfocitos T, no por los macrófagos, ya que matan patógenos intracelulares facultativos solo inespecíficamente (7).

### **LINFOCITOS T**

Estas células derivan de precursores en el tejido hematopoyético que sufre su diferenciación en el timo (de aquí el nombre de linfocitos derivados del timo, "linfocitos T") y los cuales migran al tejido linfoide periférico y al pool de linfocitos re-circulantes. Las células T se pueden dividir en dos subpoblaciones en base a la expresión del receptor de antígeno de superficie celular (TCR). La mayoría de estas células presentan el TCR con cadenas denominadas  $\alpha$  y  $\beta$  (TCR  $\alpha\beta$ ). La otra subpoblación que representa una pequeña parte de estas células expresan el TCR con las cadenas  $\gamma$  y  $\delta$  (TCR  $\gamma\delta$ ). Entre las células T  $\alpha\beta$ , existen dos sub-linajes reconocidos por la expresión de las moléculas CD4 (linfocitos T CD4<sup>+</sup>) y CD8 (linfocitos T CD8<sup>+</sup>). Estas subpoblaciones celulares se distinguen fundamentalmente en como reconocen Ag, además de mediar diferentes tipos de funciones reguladoras y efectoras.



Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> son las principales células reguladoras del sistema inmune. Esta función depende principalmente de las moléculas de superficie celular y una amplia colección de proteínas pequeñas, denominadas linfocinas. Recientemente se han reconocido células T CD4<sup>+</sup> que al activarse producen principalmente IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10 (células Th2) o en células productoras de IL-2, IFN- $\gamma$  y linfoxina (células Th1). Las células Th2 han demostrado eficiencia en el desarrollo de los linfocitos B a células productoras de Ac, mientras que las células Th1 son inductoras efectivas de la respuesta inmune celular, que involucra una mejor actividad microbicida de monocitos y macrófagos y consecuentemente, una eficiencia incrementada en la lisis de microorganismos intracelulares.

Los linfocitos T también son mediadores importantes de funciones efectoras, algunas de estas son determinadas por el patrón de secreción de citocinas. Estas poderosas moléculas pueden ser tóxicas para las células blanco y pueden movilizar potentes mecanismos inflamatorios. Además, las células T, particularmente las CD8<sup>+</sup>, se pueden desarrollar en linfocitos T citotóxicos (CTL), capaces de lisar eficientemente células blanco que expresan Ag reconocidos por los CTL (10).

## **EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS DE SUPERFICIE CELULAR**

Una gran cantidad de moléculas de superficie aparecen sobre las células T durante los eventos asociados con su activación, diferenciación y proliferación. Esto incluye receptores de linfocinas (por ejemplo, la cadena  $\alpha$  del receptor de la IL-2 (IL-2R); receptores de nutrientes (los receptores de transferrina e insulina), moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) clase II en células T humanas (pero no en ratón) y otras moléculas de superficie celular cuya función es desconocida. Estas proteínas posiblemente participan con diferentes papeles en el crecimiento, diferenciación y función después de la activación. La cinética de aparición de estas proteínas, difieren con otras en el tiempo, que va de minutos hasta incluso horas (cadena  $\alpha$  del IL-2R y CD69) y otras aparecen después de días (VLA-4) de activación.

Además de la aparición de nuevas moléculas de superficie celular, nuevos epítopes antigénicos sobre las moléculas ya existentes indican diferentes mecanismos de regulación funcional de ciertos receptores. Concomitante con la activación de células T, un nuevo epítipo antigénico es detectado sobre la molécula CD2 (epítipo T11<sub>3</sub>), probablemente por el

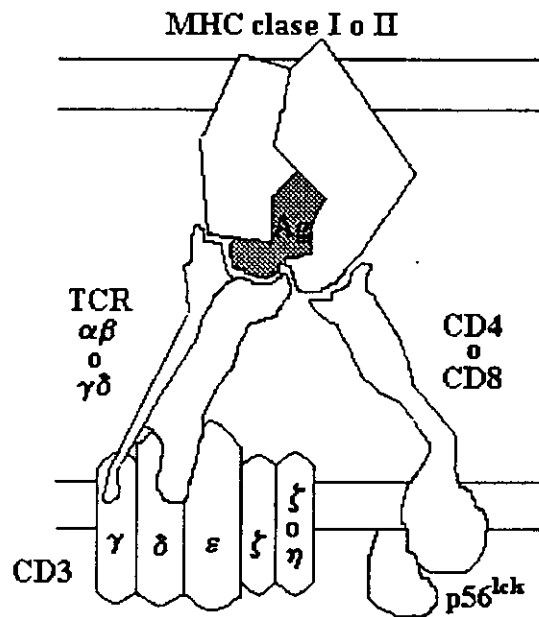
resultado de un cambio alostérico. También, en los linfocitos T activados y algunas subpoblaciones de éstos, expresan una isoforma distinta de 180 kD de la molécula CD45, el CD45RO, en comparación a la isoforma de 220 kD del CD45RA sobre células T no activadas. Esto es el resultado de un splicing alternativo regulado de exones que codifican una porción del dominio extracelular. Estas isoformas distintas pueden tener diferentes ligandos (10).

### **CD3**

El complejo CD3 es parte integral del complejo receptor de células T (TCR), siendo necesario para su expresión y función (figura 2). CD3 comprende por lo menos 5 cadenas polipeptídicas llamadas  $\gamma$  (25<sup>†</sup> y 21<sup>‡</sup> kD),  $\delta$  (20<sup>†</sup> y 28<sup>‡</sup> kD),  $\epsilon$  (20<sup>†</sup> y 25<sup>‡</sup> kD),  $\zeta$  (16<sup>†</sup> y 16<sup>‡</sup> kD) y  $\eta$  (21<sup>†</sup> kD) († humano, ‡ ratón). La asociación entre CD3 y TCR  $\alpha\beta$  o TCR  $\gamma\delta$  ha sido demostrado por ensayos de inmunoprecipitación con AcMo. Se ha demostrado la necesidad de la completa expresión de la totalidad de las cadenas polipeptídicas para la funcionalidad del complejo TCR/CD3.

La función mas probable del CD3 es la de una molécula transductora de señales, ya que su estructura así lo indica; sus grandes dominios citoplasmáticos pueden interactuar con componentes citoplásmicos involucrados en la transducción de señales mientras que los segmentos cortos (3-5 aminoácidos) de las cadenas del TCR  $\alpha\beta$  o TCR  $\gamma\delta$  lo harían difícilmente. Los Ac contra el CD3 son fuertemente mitogénicos bajo condiciones apropiadas inician una variedad de eventos involucrados en la transducción de señales y en la activación.

Un papel adicional, aunque no exclusivo para el CD3, puede ser la regulación negativa del complejo TCR que sigue a la ocupación del receptor. Esto resulta en un estado de anergia temporal lo que puede ser importante en la respuesta fisiológica de las células T al Ag. La modulación del receptor también depende presumiblemente de interacciones entre el TCR y proteínas citoplásmicas (11).



**Figura 2.-** El receptor de antígeno de las células T (TCR). Se ilustra esquemáticamente la interacción del TCR con el antígeno en el contexto de las moléculas del MHC, además de la asociación de las cadenas del CD3. Los marcadores CD4 y CD8 también se ilustran interactuando con las moléculas del MHC y p56<sup>lck</sup>.

### CD4 y CD8

A pesar de que las glicoproteínas (gp) CD4 y CD8 no muestran secuencias cercanas o similitud en su estructura, son homólogos funcionalmente. CD4 y CD8 son expresadas en dos subpoblaciones mutuamente exclusivas de células T maduras. La molécula CD4 es expresada por células [principalmente células T de ayuda (Th) y en una pequeña subpoblación de células T citotóxicas (Tc)] que interactúa con moléculas del MHC clase II, mientras que las CD8 exhiben una expresión recíproca sobre células Tc que reconocen moléculas del MHC clase I.

La gp CD4 es una cadena polipeptídica simple de 55 kD. La porción externa comprende 374 aminoácidos y contiene dos unidades glicano en la porción N-terminal, seguido de una región transmembranal hidrofóbica de 21 aminoácidos y un dominio citoplásmico altamente básico de 40 aminoácidos.

Dos tipos de interacciones de la molécula CD4 han ganado la atención. Primero, CD4 interactúa funcionalmente con moléculas del MHC clase II y esta asociación es importante tanto en la ontogenia tímica y en las funciones de las células T CD4<sup>+</sup> periféricas. Segundo, CD4 actúa como el receptor para la entrada del VIH en linfocitos T.

A diferencia de la molécula CD4, la gp CD8 se expresa en una forma oligomérica en la superficie de las células T. Tanto en humanos como en roedores, está compuesta de dos cadenas, la  $\alpha$  y la  $\beta$ . Las cadenas CD8 $_{\alpha}$  y CD8 $_{\beta}$  murinas también se llaman Lyt-2 y Lyt-3 respectivamente.

La molécula CD8 interactúa con el MHC clase I de la misma manera como lo hace la molécula CD4 con el MHC clase II: para incrementar la avidéz de la interacción célula-célula. Sin embargo, seguramente ésta no es la única función de estas moléculas sobre las células T, además pueden tener una función reguladora. Los Ac contra el CD4 y CD8 sinergizan con Ac anti-CD3 en la activación de las células T. Estos efectos reguladores pueden ser particularmente importantes in vivo. La base bioquímica para el papel regulador del CD4 y CD8 en la activación de la célula T es su asociación con la tirosin-kinasa específica p56<sup>lck</sup>. Esta asociación se da en una proximidad muy cercana con el complejo TCR (figura 2), donde su potencial substrato es la cadena CD3 $\zeta$ . Las propiedades del complejo CD4/p56<sup>lck</sup> difieren de las del CD8/p56<sup>lck</sup> en su respuesta a activadores de la protein kinas C (11).

## **CD28**

El Ag CD28 humano es expresado en un gran porcentaje de las células T periféricas que incluye el 95% de las células T CD4<sup>+</sup> y el 50% de las CD8<sup>+</sup>. El nivel de la expresión del CD28 puede ser mejorado por la activación de las células T. Este marcador de superficie no se expresa en células con TCR- $\gamma\delta$ . Se ha reportado que las células T CD28<sup>+</sup> son las únicas células de sangre periférica que expresan el marcador CD11b. Originalmente se pensó que el CD28 era un marcador exclusivo de linfocitos T, pero se ha demostrado que las células

plasmáticas y las células B activadas por la Ig pueden expresar el CD28 (10). También es expresado en bajo pero detectable nivel en timocitos  $CD4^+ CD8^-$ . Los timocitos maduros  $CD3^+$  tienen altos niveles de CD28 y son similares a los de las células T periféricas (12).

El AcMo 9.3 reacciona con el CD28 en células humanas, reconoce una molécula unida por puentes di-sulfuro que consiste en subunidades de 44 kD fuertemente glicosiladas por análisis de SDS-PAGE. No hay evidencias que indique una asociación bioquímica entre el CD28 y el complejo TCR/CD3. Se ha establecido que la molécula CD28 es un integrante de la familia de los supergenes de las Ig.

Las secuencias del CD28 murino comparte un 67-68% de identidad nucleotídica con su homólogo humano (10).

En estudios de proliferación de células T estimuladas con AcMo anti-CD28, se encontró que incrementa la expresión de la cadena  $\alpha$  del IL-2R (CD25) y la producción de citocinas incluyendo la IL-2, IFN- $\gamma$ , GM-CSF y TNF- $\alpha$ . Recientemente se ha mostrado el incremento en la producción de IL-1, IL-3 e IL-4. El incremento en la producción de citocinas tipo Th1 se debe a la estabilización del ácido ribonucleico mensajero (mRNA) de estas citocinas. El AcMo anti-CD28, también regula la transcripción del gen de IL-2. CD28 puede jugar un papel importante en la patogénesis del VIH (12).

Recientemente se identificó a la molécula B7 (CD80), la cual forma parte de la superfamilia de las Ig y es el receptor de la molécula CD28. La unión CD28-B7 mejora la transcripción de genes de citocinas (12). Este Ag se expresa en células presentadoras de antígeno (APC) profesionales: células B activadas, macrófagos activados y células dendríticas (13). B7 también se expresa a muy bajo nivel en células B y macrófagos no activados, incrementándose su expresión después de la activación con estímulos policlonales, o después de la interacción a través de la Ig de superficie o con IFN- $\gamma$  (10).

En modelos *in vitro*, se ha mostrado que la presentación de Ag en ausencia de la coestimulación, las células T sufren una inactivación funcional o anergia clonal. Este estado está caracterizado por una incapacidad de producir IL-2, además puede producirse la muerte celular inducida por activación.

Se piensa que las señales liberadas por el CD28 representan una "segunda señal" para las células T para aumentar otras vías de activación y producir la proliferación celular y

una incrementada producción de citocinas. La expresión de CD28 se incrementa después de la estimulación con Ac anti-CD3, éster de forbol (PMA) y fitohemaglutinina (PHA) (12).

Adicionalmente, la interacción de CD28/CD80 aumenta la generación de linfocitos T citotóxicos de poblaciones de células T en reposo, los cuales participan en procesos anti-tumorales y de rechazo de trasplantes (14).

## **CD45RO**

CD45 es conocido como el antígeno común de los leucocitos (LCA) y está formado por un grupo de gp de alto peso molecular que se expresan selectivamente en la superficie de todos los leucocitos y células hematopoyéticas progenitoras. El 10% de la superficie de los linfocitos esta ocupada por moléculas de la familia LCA, estos miembros difieren entre sí, en la secuencia proteínica y estructura de carbohidratos. Se expresan sobre subpoblaciones linfocitarias como isoformas que van desde los 180 hasta los 220 kD.

El dominio citoplasmático es altamente conservado entre especies (85%), mientras que el dominio externo es mucho menos conservado (35%). Dos repeticiones en tandem en el dominio citoplásmico de CD45 tienen una similaridad altamente significativa con una proteína tirosin fosfatasa (PTP) placentaria humana ya que CD45 también tiene actividad de PTP.

Los AcMo que reconocen CD45 se dividen en 2 tipos, algunos reconocen epítopos comunes mientras que otros reconocen epítopos restringidos (CD45R), los cuales pueden ser generados por secuencias codificadas por exones variables o modificaciones post-transcripcionales como glicosilaciones. Por ejemplo, el AcMo 2H4, reconoce un epítipo codificado por un exon variable 4 (CD45RA), mientras que el epítipo visto por el Ac anti-CD45 de rata OX-22, es codificado por el exon variable 5 (CD45RB), el AcMo anti-CD45 humano UCHL1 la forma de bajo peso molecular y ve una epítipo codificado por una secuencia en la unión de los exones 3 y 7 (CD45RO). CD45 es también expresado en macrófagos y granulocitos y la estimulación de granulocitos aumenta la cantidad de CD45 expresado de la reserva intracelular. Todas las células B expresan la forma de alto peso molecular. La aparición de esta forma ocurre muy temprano en la diferenciación de las células B, antes del arreglo de genes de las Ig. La molécula CD45 de las células T y B difieren en su estructura de carbohidratos. Los linfocitos T pueden expresar mas de una

forma de esta molécula. Los timocitos inmaduros expresan la forma de menor peso molecular y los maduros, la forma de mayor peso molecular.

Cuando las células T son activadas, se incrementa la expresión del CD45RO, siendo ésta una diferencia con las células no activadas, esta molécula define a las células de memoria/efectoras. También aparecen otras moléculas que incrementan su expresión sobre las células T como el caso del CD2 y CD44. Las células T de memoria participan en respuesta a aloantígenos, proporcionan ayuda a las células B, sobre todo en respuestas secundarias *in vitro*. También, la proliferación secundaria de células T en respuesta a Ag es ampliamente controlada por las células con fenotipo de memoria. En términos de producción de linfocinas, las células con este fenotipo, tienden a parecerse a células tipo Th2 con producción preferencial de IL-4. Aunque no existe nada claro en cuanto a la expresión de marcadores celulares y el patrón de producción de citocinas (10).

### TCR- $\alpha\beta$ y TCR- $\gamma\delta$

El TCR es un heterodímero unido por puentes di-sulfuro. Las cadenas constitutivas ( $\alpha$  y  $\beta$  o  $\gamma$  y  $\delta$ ), son miembros de la familia de los super genes de las Ig. El TCR esta asociado con un grupo de proteínas transmembranales, que colectivamente designan al complejo CD3 que juega un papel crítico en la transducción de señales. Como vimos anteriormente, el complejo CD3 consiste de las cadenas  $\gamma$ ,  $\delta$  y  $\epsilon$ , se asocian además con un homodímero de dos cadenas  $\zeta$  o a un heterodímero de cadenas  $\zeta$  y  $\eta$ . Las cadenas del TCR están organizadas de forma muy parecida a las cadenas de las Ig. Sus porciones N-terminal son variables y sus porciones C-terminal constantes. Además, se usan similares mecanismos de recombinación para ensamblar los genes de la región variable de las cadenas del TCR. También, esta región es codificada por 3 elementos genéticos distintos ( $V_\beta$ ,  $D_\beta$  y  $J_\beta$ ).

Los genes de las cadenas  $\gamma$  y  $\delta$  del TCR son ensambladas de una manera similar excepto que tienen muy pocos genes V que escoger. Las células T  $\gamma\delta$ , en cierto medio ambiente, como en piel y ciertas mucosas, son excepcionalmente homogéneas. Lo anterior ha sugerido que el TCR codificado por estas cadenas  $\gamma\delta$  esencialmente invariables puede ser específico para algunos Ag en una invasión microbial y que la activación de estas células constituye una respuesta inicial que apoya el desarrollo de la respuesta más “sofisticada” de las células T  $\alpha\beta$  (10).

## LINFOCINAS Y CITOCINAS

Como se mencionó anteriormente, muchas de las funciones de las células están mediadas a través de la producción de un grupo de pequeñas proteínas llamadas linfocinas o citocinas. Estas moléculas se cree que son productos principales de las células T, que incluyen la IL-2, IL-3, el factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), IL-4, IL-5, IFN- $\gamma$  y linfotóxina [factor de necrosis tumoral  $\beta$  (TNF- $\beta$ )]. Además, los linfocitos T son capaces de producir otros productos que también lo hacen otros tipos celulares como la IL-6, el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) e IL-10.

Estas proteínas no son productos constitutivos de las células T, sin embargo, son producidas en respuesta a su activación después de la presentación de Ag por las APC en coordinación con la unión de moléculas coestimuladoras, CD28-B7 por ejemplo. No obstante, las citocinas se producen en cantidades muy pequeñas, son extremadamente potentes, con una constante de equilibrio para sus receptores del orden de  $\sim 10^{10} \text{ M}^{-1}$ . Se piensa que estos factores son secretados direccionalmente en el espacio entre la célula T y la APC. Esto sugiere que algunas de estas moléculas actúan en forma parácrina y que tienen acción limitada en cuanto a la distancia a partir de la célula que la produce. Se ha establecido que esto es verdad al menos en algunas de estas moléculas como la IL-2, IL-3, IL-4 e IL-5. Sin embargo, algunas de estas citocinas, actúan probablemente por difusión a través de fluidos extra celulares y la sangre hasta llegar a células blanco distantes, como ejemplo tenemos a la IL-6 y el TNF (10).

Se han descrito subpoblaciones de células T CD4<sup>+</sup> (Th) de ratón, la subpoblación Th1 productora de IL-2, IFN- $\gamma$  y TNF- $\beta$  y la Th2 que produce IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 e IL-13. Posteriormente este mismo patrón de síntesis de citocinas fue determinado en células T CD4<sup>+</sup> humanas, no obstante, la síntesis de IL-2, IL-6, IL-10 e IL-13, no es tan restringido a una subpoblación en particular, como lo es en células de ratón.

Las células Th1 están involucradas en reacciones inflamatorias mediada por células: algunas citocinas Th1 activan funciones citotóxicas e inflamatorias, además inducen reacciones de DTH, donde IFN- $\gamma$  es comúnmente expresado en estos sitios. Las citocinas Th2 fomentan la producción de Ac, particularmente IgE y también mejora la producción y función de



eosinófilos. estas citocinas son comúnmente asociadas con fuertes respuestas alérgicas y de Ac.

La producción de citocinas características de las células Th1 y Th2 son mutuamente inhibitoras para la diferenciación y funciones efectoras del fenotipo recíproco. Las células T que expresan un patrón de síntesis de citocinas mixto se denominan Th0.

En la Tabla 3 se describen algunas infecciones y enfermedades importantes, donde se describe el tipo de respuesta de acuerdo al patrón de síntesis de citocinas y las consecuencias en el curso de los padecimientos:

**Tabla 3.-** Respuesta Th1 y Th2

<b>Protozoarios</b>	<b>Huésped</b>	<b>Respuesta</b>	<b>Comentarios</b>
<i>L. major</i>	M	Th1 Cura	Respuesta Th1 en ratones resistentes, Th2 en susceptibles; anti-IL-4 protege, anti-IFN- $\gamma$ exagera; células Th1 protegen, células Th2 exageran.
<i>L. donovani</i>	H	Th1 Cura?	IL-4 muy alto en leishmaniasis visceral (generalizada) IFN- $\gamma$ más alto en leishmaniasis cutánea (local)
<i>T. cruzi</i>	M	Th1 Protege	Protección con transferencia de células Th1
<i>P. chabaudi</i>	M	Th1 y Th2	Respuesta Th1 proporciona una defensa temprana dependiente de NO, Th2 proporciona defensa tardía dependiente de Ac
<b>Helmintos</b>			
<i>T. muris</i>	M	Th2 Cura	Respuesta Th2 en ratones resistentes, Th1 en susceptibles; anti-IFN- $\gamma$ protege, IL-4 protege, anti-IL-4 exagera
<i>S. mansoni</i>	M	Th2	Huevos de <i>Schistosoma</i> inducen respuesta Th2; respuesta Th2 asociada con granulomas, reducida por tratamiento con IL-12 y anti-IL-4
<b>Virus</b>			
VIH	H	Switch Th1-Th2	Respuesta incrementada de IL-4 y decrementada de IFN- $\gamma$ , en pacientes VIH <sup>+</sup> progresores al SIDA; restaurada por IL-12 o anti-IL-4 <i>in vitro</i> ; dato controversial

Vaccinia	M	Th2 Exacerba	Infección concurrente por <i>Schistosoma</i> debilita la respuesta anti-vaccinia; el virus persiste en granulomas
Influenza Virus	M	Th1 Protege	Clonas Th1 pero no Th2, confieren protección <i>in vivo</i>
<b>Hongos</b> Cándida	M	Th1 Protege	Respuestas Th1 y Th2 correlacionan resistencia y susceptibilidad; anti-IL-4, anti-IL-10 e IL-4R soluble inducen resistencia
<b>Bacterias</b> <i>M. tuberculosis</i>	H	Th1 Protege	IFN- $\gamma$ , pero no IL-4 e IL-5, expresados en fluido pleural, correlacionan con resistencia; IL-10 también es expresado (por macrófagos)
BCG	H	Respuesta Th1	IL-2 e IFN- $\gamma$ son expresados en el sitio de la reacción a tuberculina (DTH)
<i>M. leprae</i>	H	Th1 DTH Th2 Ac	IL-2 e IFN- $\gamma$ expresados en lesiones de lepra tuberculoide (DTH); IL-4, IL-5 e IL-10 expresados en lesiones lepromatosas (Ac)
<i>L. monocytogenes</i>	M	Respuesta Th1	Respuesta Th1 inducida, anti-IFN- $\gamma$ exacerba
<b>Autoinmunidad</b> Esclerosis Múltiple	H	Th1 anti-MBP	Clonas de células T de pacientes con esclerosis múltiple son específicas para MBP y son Th1
Artritis Reumatoide	H	Respuesta Th1	Tejido sinovial de pacientes con artritis reumatoide producen IFN- $\gamma$ pero no IL-4
<b>Alergia</b> Alergia	H	Respuesta Th2	IL-4 e IL-5, pero no IFN- $\gamma$ , detectados en reacciones cutáneas de fase tardía; clonas específicas de alérgeno muestran un fuerte sesgo hacia Th2
Asma atópica	H	Respuesta Th2	Citocinas Th2 detectadas en lavado bronquial; eosinofilia

### Transplantes y embarazo

Rechazo de Transplantes	M	Respuesta Th1	Varias citocinas regulan positivamente en rechazo de hígado; particularmente IFN- $\gamma$
	R	Respuesta Th1	El rechazo correlaciona con niveles más altos de IFN- $\gamma$ y más bajos de IL-4; Terapia con anti-CD4 induce un no rechazo y el opuesto patrón de citocinas
	H	Respuesta Th1?	IL-2 muy alto en aloinjertos de corazón fuertemente rechazados; IL-4 e IL-10 más altos en rechazo medio
Embarazo	H	Th1 Suprimido	CMI inhibida en infecciones y autoinmunidad
	M	Th1 Daña Th2 Protege	Varias citocinas se producen espontáneamente en placenta; IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF y células NK se incrementan la resorción; IL-10 protege

---

Abreviaturas: BCG.- Bacilo de Calmette y Guérin, DTH.- Respuesta de hipersensibilidad retardada, H.- Humano, M.- Ratón, MBP.- Proteína básica de mielina, NO.- Óxido nítrico, R.- Rata, SIDA.- Síndrome de inmunodeficiencia adquirida, VIH.- Virus de inmunodeficiencia humano (15).

## RESPUESTA DE CÉLULAS T Y CITOCINAS EN TUBERCULOSIS

### Células T CD4<sup>+</sup>

La experiencia clínica y experimental muestra un papel dominante más no exclusivo de la células T CD4<sup>+</sup>. Los ratones desprovistos de estas células antes de la infección con BCG son incapaces de controlar el crecimiento micobacterial. Si la eliminación es de células CD8<sup>+</sup>, los resultados son variables. Además la transferencia adoptiva de linfocitos T CD4<sup>+</sup> de animales sensibilizados confiere protección contra Tb. En humanos, las células T CD4<sup>+</sup> son expandidas en el sitio de la infección en la respuesta inmune protectora. La eliminación de esta subpoblacion por el VIH favorece la susceptibilidad y la reactivación tuberculosa, además, se ha reportado que la frecuencia de la micobacteremia se eleva de 4% en pacientes con más de 200 células CD4<sup>+</sup>/ $\mu$ l a 49% en aquellos con 100 o menos células CD4<sup>+</sup>/ $\mu$ l.

Además de la función de ayuda, se ha detectado actividad citolítica de macrófagos y células no fagocíticas infectadas por *M. tuberculosis* por parte de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> (3).

### **Células T CD4<sup>+</sup> de memoria**

Las células T CD4<sup>+</sup> pueden ser divididas en células de memoria y no activadas de acuerdo a la expresión del CD45, CD45RO y CD45RA respectivamente. Las células T de memoria, pero no las no activadas, proliferan en respuesta a Ag de *M. tuberculosis* y producen IFN- $\gamma$ , citocina que activa macrófagos y mejora la actividad antimicrobiana. Lo anterior sugiere que las células de memoria predominan en la defensa inmune local contra Tb (3).

### **Respuesta Th1 y Th2 en humanos**

En pacientes con lepra, las citocinas Th1 (IL-2 e IFN- $\gamma$ ) predominan en las lesiones de los pacientes con lepra tuberculoide quienes montan una respuesta inmune protectora, mientras que las citocinas Th2 (IL-4 e IL-10) son predominantes en lepra lepromatosa con una respuesta inmune deficiente y una gran carga bacilar (16).

Datos publicados sobre la producción de citocinas por clonas de células T en respuesta a *M. tuberculosis* son contradictorios. Algunos reportes indican que la mayoría de las clonas de células T CD4<sup>+</sup> propagadas *in vitro* son tipo Th1 productoras de IFN- $\gamma$  pero bajas concentraciones de IL-4 e IL-5. En contraste, otro estudio demostró que clonas de células T secretan IFN- $\gamma$  e IL-4. También está reportado que algunas clonas producen citocinas Th1 y Th2. Reportes más recientes han mostrado la presencia de mRNA de IL-4, pero no se detectó la proteína en el sobrenadante de los cultivos. Esto puede indicar que las condiciones de cultivo seleccionan subpoblaciones de células T, o bien, que el sistema de traducción no es tan efectivo y el mRNA no llega a proteína (3).

La combinación del IFN- $\gamma$  con TNF- $\alpha$  mejora la actividad anti-microbiana de los macrófagos murinos, posiblemente a través de la producción incrementada de metabolitos reactivos del óxido nítrico (3).

## **OBJETIVO**

Caracterizar las poblaciones celulares participantes en la respuesta inmunitaria en un modelo de tuberculosis pulmonar murino, identificar los antígenos involucrados en la respuesta y correlacionarlos con el daño inflamatorio y el curso de la enfermedad.

## **HIPÓTESIS**

La respuesta inmunitaria protectora contra tuberculosis se asocia con la emergencia de células y citocinas de tipo Th1. En un modelo bifásico de tuberculosis murina, la fase de instalación y de resolución difieren, predominando en la fase de resolución células y citocinas de tipo 1.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### **Cultivo de *Mycobacterium bovis*-BCG.**

La cepa danesa 1331 de *M. bovis*-BCG fue donada por la Gerencia General de Biológicos y Reactivos de la Secretaría de Salud. La bacteria se encontraba como liofilizado de cultivos de bacilos vivos; se reconstituyó en 5 ml de solución salina de fosfatos (PBS), (Apéndice 1) y se inoculó en medio de cultivo líquido sintético de Proskauer y Beck modificado por Youmans (PBY, Apéndice 2) (17), en una campana de seguridad biológica clase II, tipo A/B5, Forma Scientific (IL Diagnostics, Marietta OH). Los cultivos se incubaron durante varias semanas a 37°C, hasta que la bacteria se adaptó y formó una película de crecimiento en la superficie del medio de cultivo. Posteriormente se sembró por asada a un matraz que contenía 50 ml de medio de cultivo PBY-Tween enriquecido con albúmina y glucosa (Apéndice 3) (17), se incubó a 37°C en agitación constante a 75 rpm, durante 4 días, tiempo en el cual, estos cultivos se encuentran en fase logarítmica de crecimiento (17), aunque esto podría ser variable, ya que depende de factores como el tamaño y viabilidad del inóculo, adaptación del bacilo al medio, etc. Es importante hacer notar la rapidez con la que crecen estos cultivos y el hecho que el crecimiento sea disgregado. Se hicieron alícuotas de los cultivos y se almacenaron a -70°C hasta su uso.

### **Cultivo de *Mycobacterium tuberculosis*.**

La cepa de *M. tuberculosis* H37/Rv se obtuvo de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del I.P.N. La bacteria se cultivó en PBY. La siembra se hizo por asada, tomando una fracción de la película formada por el crecimiento de la bacteria. La manipulación se realizó en una campana de seguridad clase II (IL Diagnostics) en condiciones de esterilidad. El manejo de esta micobacteria patógena requiere de cuidados y manejos especiales. En el apéndice 4 se indican las instrucciones para su manejo (3).

### **Determinación de la viabilidad bacilar con diacetato de fluoresceína.**

Para conocer la cantidad de bacilos vivos en los cultivos se utilizó el método del diacetato de fluoresceína (18), que se fundamenta en su reducción a acetato de fluoresceína

por las bacterias metabólicamente activas, las que emitirían así fluorescencia indicando su viabilidad. Se preparó una solución stock de diacetato de fluoresceína (Aldrich Chemical Company, Inc. Milwaukee, WI) en acetona (J.T. Baker Inc. Phillipsburg, NJ). Se incubaron las bacterias con diluciones apropiadas de esta solución e inmediatamente después se examinó la suspensión de células en una cámara de Neubauer (American Optical Scientific Instrument Division, Buffalo, N.Y.) con un microscopio de luz ultravioleta (Nikon Chiyoda-ku, Tokyo, Japan).

### **Obtención de un extracto proteínico total (EPT) de cultivos de *M. tuberculosis* y de *M. bovis*-BCG.**

Después de 6-8 semanas de cultivo se obtuvo el medio de cultivo el cual se filtró por vacío, a través de un papel filtro (Whatman International LTD Maidstone, England) para eliminar el grueso de los bacilos. Posteriormente se pasó por filtros de 1.2, 0.45 y 0.22  $\mu\text{m}$  (Millipore Corporation Bedford, MA.). El filtrado se precipitó con 0.5 g/ml de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (J.T. Baker) en agitación constante toda la noche. Se centrifugó a  $1 \times 10^4$  rpm por 15 min. y el sobrenadante se volvió a precipitar llevándolo a una concentración de 85% de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (19). Los precipitados se juntaron y dializaron contra agua, la cual se cambia cada 8 horas, hasta que la prueba con BaCl (Apéndice 12) resulte negativa. La concentración se determinó por Lowry (20). El EPT se almacenó en alícuotas a  $-20^\circ\text{C}$  hasta su uso.

### **Purificación de antígenos proteínicos de *M. tuberculosis*.**

Con el propósito de identificar antígenos relacionados con la inducción de una respuesta de tipo Th1 y Th2, se realizaron estudios de ELISA con proteínas nativas seleccionadas los cuales se revelaron con anticuerpos anti-IgG1 o IgG2a. Los antígenos seleccionados fueron las proteínas de *M. tuberculosis* de 23, 28, 30-31, 38 y 80 kD. Estos Ag fueron seleccionados por su disponibilidad en el laboratorio del Dr. Mancilla, donde se ha trabajado en su caracterización, habiéndose demostrado ser importantes para la bacteria y/o en la respuesta inmune. Por otra parte, durante este trabajo se encontró por inmunoblot que los Ag de 30-31, 38, y 80 kD eran reconocidos de manera selectiva durante la fase de

resolución de la enfermedad experimental por anticuerpos IgG2a. La purificación de los antígenos de 28, 30-31, 38 y 80 kD se logró a partir del EPT en dos pasos. Primero el EPT se sometió a un fraccionamiento ácido-alcohólico (21). El método de Seibert se ha utilizado en nuestro laboratorio como un paso preparatorio para purificar antígenos micobacterianos (19). Por este procedimiento se obtienen 5 fracciones proteínicas enriquecidas con diferentes Ag. Las proteínas arriba mencionadas se obtuvieron de geles preparativos de PAGE-SDS al 7.5 ó al 10 % (22). Para identificar las bandas por purificar, los geles se tiñeron con acetato de sodio. La banda indicada se cortó y se trató con urea 6M para eluir la proteína (23). Para purificar la superóxido dismutasa (SOD) se utilizó el método de Kusunose (24). El sobrenadante obtenido después de la precipitación de los cultivos de bacterias para la obtención del EPT, se re-precipitó con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  a una concentración final del 85%, en agitación toda la noche a 4°C. Después de centrifugar a  $1.2 \times 10^4$  rpm, el precipitado se disolvió en PBS 30mM. En este precipitado se observó por PAGE-SDS la presencia de una banda de 23 kD la cual se identificó en inmunoblots como la superóxido dismutasa con un anticuerpo monoclonal (Donado por el Dr. J. Ivanyi, Hammersmith Hospital, Londres, U.K.). Este precipitado se sometió a una cromatografía de intercambio iónico en una columna de DEAE-32-Celulosa Dietilaminoetil Celulosa, Intercambiador Aniónico microgranular (Sigma) equilibrada con PBS 30mM. La proteína se eluyó con 10 volúmenes de un gradiente lineal de PBS 0.03-0.1 M, pH 7.9 con flujo de salida de 0.5 ml/min. El pico eluido se concentró en Amicon (Amicon Inc. Beverly, MA) con una membrana de ultrafiltración PM 10. El producto anterior se trató por cromatografía de exclusión molecular en una columna de Sephadex-150, de grano superfino, la cual se equilibró y eluyó con PBS 20mM pH 7.0 y 0.1M de KCl, con un flujo de salida de 0.5 ml/min. Se determinó la densidad óptica (DO) de las fracciones y las que forman el pico se mezclaron y se concentraron en Amicon (Amicon) a través de una membrana de ultrafiltración.

#### **Animales de experimentación.**

En este estudio se emplearon ratones singénicos de la cepa Balb/C de 5-8 semanas con peso promedio de 25 gramos los cuales fueron mantenidos bajo las condiciones normales de laboratorio.



### **Inmunizaciones y obtención de suero anti EPT de ratón**

Se emplearon 30 ratones y se les inocularon 100 µg de EPT disuelto en PBS y adyuvante incompleto de Freund (Gibco Laboratories, Grand Island, NY) en la base de la cola. Después de 2 semanas, se les administró la misma dosis por vía intra-peritoneal en PBS y esto mismo se repitió 2 semanas después. Al cabo de 10 días de la tercera inoculación se anestesió a los ratones y se sacrificaron sangrándolos a blanco, se obtuvo el suero por centrifugación y se almacenó a -20°C hasta su uso.

### **Modelo de tuberculosis pulmonar en ratón.**

Los ratones se anestesiaron con una solución 1:10 de pentobarbital (Smith, Kline & French, México) en PBS; se inyectaron 10 µl de esta solución por gramo de peso por vía intra-peritoneal. El ratón anestesiado se colocó sobre una base en posición de decúbito supino con el cuello extendido con un lazo colocado alrededor de los dos incisivos superiores; se hizo una incisión en la piel del cuello, se separó la fascia muscular pretraqueal, se expuso la traquea y se inocularon  $5 \times 10^5$  bacilos de *M. bovis*-BCG en 100 µl de PBS con una jeringa adaptada a una cánula de plástico. Al grupo control se le inoculó el vehículo (PBW y PBS Tween enriquecido), por la misma vía (25).

Los animales inoculados con *M. bovis*-BCG, se sacrificaron a 1, 2, 4, 8, 12, y 16 semanas. Los grupos de 2 ó 3 ratones por experimento, se anestesiaron como se indica anteriormente, y se sangraron a blanco. Se recolectó la sangre en viales de un ml (Robbins Scientific Corp. Sunnyvale, CA) y se obtuvo el suero, el cual se almacenó a -20°C hasta su uso. Los pulmones de los ratones se perfundieron por vía traqueal con 1.5 ml de una solución de formaldehído (J.T. Baker) al 10% en PBS como fijador (Apéndice 5). La traquea se ligó con un lazo para evitar que salga el líquido, se extrajeron los pulmones y se colocaron en el mismo fijador. Después de la fijación se deshidrataron con etanol en concentración creciente, se incluyeron en parafina y se hicieron micro-cortes de 4 µm en microtomo rotatorio (American Optical) (25). Los cortes se tiñeron con Hematoxilina-Eosina (HE) para el análisis de imagen computarizado y con la técnica de Ziehl-Neelsen (ZN) para determinar la carga bacilar a lo largo del modelo. Algunos cortes se hicieron por congelación y se utilizó Tissue-Tek O.C.T. (Miles Inc. Diagnostics Division, Elkhart, IN)

diluido 1:2 en PBS para perfundir los pulmones como ya se indicó. Posteriormente se extrajeron los pulmones y se colocaron en Tissue-Tec O.C.T. (Miles Inc.) sin diluir y se almacenaron a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

#### **Inoculación repetida de ratones con *M. bovis*-BCG muertos por calor.**

La inoculación con una dosis mayor de bacilos muertos ( $1 \times 10^6$  bacilos) de manera repetida, se realizó para tratar de compensar la desventaja antigénica de la bacteria muerta contra la viva que se encuentra en constante replicación. Los ratones se inocularon con *M. bovis*-BCG muerto por calor (26), de la misma manera que en el inciso **Modelo de tuberculosis pulmonar en ratón**, a los 10 días se repitió la dosis por la misma vía y a los 20 días se le realizó la tercera inoculación, finalmente a los 30 días se sacrificaron. Se obtuvo el suero y se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

#### **Análisis de imagen computarizado**

El análisis morfométrico se realizó con el sistema Histo 2000 (Biocom Paris, France). La operación del sistema se realizó utilizando un microscopio (Nikon) adaptado a una cámara de circuito cerrado que envía la imagen al monitor donde con la ayuda del ratón de la computadora (Hewlett Packard, Miami, FL) se seleccionaron las superficies a medir. Posteriormente, el programa proporcionó el área de las superficies seleccionadas. Este análisis se realizó sobre secciones de pulmones de ratones del modelo de tuberculosis experimental teñidas con HE. Para estimar la cantidad total de tejido, se midió la extensión total de ambos pulmones de la cual se restó el espacio libre de tejido. Enseguida se midió el tejido con reacción inflamatoria (27).

#### **Determinación de la carga bacilar**

Para analizar la cinética de la carga bacilar a lo largo del modelo de tuberculosis experimental, empleamos cortes de pulmones infectados, teñidos con la técnica de ZN y con objetivo de inmersión medimos múltiples granulomas, escogidos al azar totalizando aproximadamente  $2 \times 10^5 \mu\text{m}^2$ . Esto se llevó a cabo con una rejilla micrométrica (E. Leitz Wetzlar, Germany) adaptada al ocular del microscopio (Nikon). Los resultados se expresaron como número de micobacterias/área de inflamación (28).

### **Obtención de células de lavados broncoalveolares (LBA) de ratón.**

Para obtener las células pulmonares de los ratones con tuberculosis experimental se sacrificaron grupos de 10 a 20 animales de cada uno de los tiempos (1, 2, 4, 8, 12 y 16 semanas), los que se manejaron como se explica en **Modelo de tuberculosis pulmonar en ratón** (pag. 34). Después de colocar el lazo en los incisivos superiores, los ratones se sangraron a blanco, se hizo una incisión en el cuello, se separó la fascia muscular pretraqueal, se expuso la traquea y con ayuda de una jeringa y una cánula se inyectó 1 ml de PBS. Inmediatamente después se extrajo el líquido y se vació en un tubo de fondo cónico de 50 ml (Costar Corporation Cambridge, MA) (25, 29).

### **Obtención de células de bazo de ratón.**

A grupos de tres ratones sacrificados para obtener los LBA, se les hizo una incisión en la piel a la altura de la zona hepática, se retiraron los órganos de la zona y se expuso y extrajo el bazo. El órgano se colocó sobre una caja de Petri (Crive México) y con una jeringa y aguja, se perfundieron 2 ml de PBS. Esto se repitió 3 veces cambiando el PBS en cada ocasión y después el bazo se siguió perfundiendo con el PBS recolectado en la caja de Petri, hasta que el órgano perdió su color rojo y quedó flácido (30).

### **Análisis de células de LBA y esplénicas por citometría de flujo (FACS).**

Las células obtenidas de los LBA de los ratones, se centrifugaron a 1500 rpm por 5 min, se resuspendieron en 2 ml de solución lisadora de eritrocitos (Apéndice 6) durante 5 minutos, se lavaron 2 veces con PBS a 1500 rpm durante 5 min. Todas las incubaciones y lavados de esta técnica, se hicieron en PBS para FACS (Apéndice 7). Las células se contaron en cámara de Neubauer (American Optical) y se colocaron de  $5 \times 10^5$  a  $1 \times 10^6$  células por tubo Falcon 2054 (Division Becton Dickinson and Co. Cockeysville, MD). Para la inmunofluorescencia indirecta se incubaron las células con 200  $\mu$ l del sobrenadante si se utilizan hibridomas, ó 1  $\mu$ g/tubo, con Ac comerciales durante 40 min a 4°C en la obscuridad. Se lavaron 3 veces con 2 ml de PBS y se agregaron 100  $\mu$ l del Ac secundario conjugado a FITC. La incubación se llevó a cabo en la oscuridad a 4°C por 40 min. Se lavaron 3 veces y se resuspendieron en 200  $\mu$ l en una solución de PBS-p-formaldehído al

1% (J.T. Baker) recién preparado (Apéndice 8). Las muestras se pueden almacenar a 4°C en la oscuridad hasta por una semana, después de la cual la fluorescencia disminuye considerablemente. Las muestras se leyeron en un citómetro de flujo (Becton Dickinson, San José, CA) (31).

Para el análisis de las células de bazo, se lisaron los eritrocitos como se indicó anteriormente y después se hizo un plaqueo o panning (32), para eliminar linfocitos B ya que la técnica de inmunofluorescencia que se realizó fue indirecta y el segundo Ac se pegaba de manera inespecífica a la Ig de superficie de dichas células, lo que resultaba en un ruido de fondo muy alto. Para eliminar los linfocitos B, se preparó una solución de Ac anti-inmunoglobulina (Anti-Ig) de superficie de ratón desarrollado en conejo (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO), a una concentración de 230 µg/ml. Se cubrieron 3 cajas de Petri de plástico (Crive) con 5 ml del Ac cada una, toda la noche, a 4°C ó una hora a temperatura ambiente; se retiró la solución de anti-Ig (esta solución puede re-usarse de 4 a 6 veces si se mantiene a 4°C), se lavan las cajas de Petri 5 veces con PBS durante 1 min cada vez (si la suspensión celular no esta aún lista, la caja de Petri se puede mantener con PBS a 4°C hasta su uso). Posteriormente, las células se resuspendieron en 5 ml de medio RPMI 1640/HEPES (Gibco BRL Life Technologies Inc. Gaithersburg, MD) (Apéndice 9) para  $\leq 2 \times 10^8$  células y 10 ml para  $4 \times 10^8$  células. La suspensión celular se incubó en una caja forrada del Ac Anti-Ig por 30 min a temperatura ambiente, se agitó ligeramente la caja de Petri 30 seg y se vaciaron las células no adherentes a la segunda caja de Petri, se incubó 30 min y se repitió la acción con la tercera caja de Petri. Las células no adherentes se recuperaron en un tubo, se cuentan en una cámara de Neubauer (American Optical) y se prosigue con la técnica de inmunofluorescencia como se indica anteriormente (31).

### **Obtención de anticuerpos monoclonales anti-CD3, CD4 y CD8 para citometría de flujo.**

Para obtener los AcMo anti-CD3 clona 145-2C11 (33), anti-CD4 clona GK1.5 (34) y anti-CD8 clona 8312.5 (35) de ratón, se crecieron hibridomas hechos en hámster, rata y ratón respectivamente, a partir de alícuotas congeladas proporcionadas por el Dr. Rafael Saavedra. Para descongelar las células, los criotubos (Costar) se incubaron a 37°C. Las

células se lavaron en un tubo cónico de 15 ml, estéril (Costar), con 10 ml de medio DMEM (Gibco), suplementado (Apéndice 10) a 37°C. Después se centrifugó a 1500 rpm por 5 min, eliminando el sobrenadante. Se repitió este procedimiento, resuspendiendo las células en 5 ml de medio suplementado y se cultivaron en una botella de 25 cm<sup>2</sup> (Costar) a 37°C. El cultivo se observó diariamente en un microscopio invertido (Olympus Optical Co; Shibuyta-ku Tokio, Japan), hasta tener una buena proliferación; entonces se hizo una dilución 1:5 en DMEM suplementado y se sembró en una botella de cultivo de 75 cm<sup>2</sup> (Costar) y se siguió monitoreando hasta que se tuvo una buena proliferación, haciendo una nueva dilución 1:2 en DMEM suplementado y sembrándose en una botella de cultivo de 150 cm<sup>2</sup> (Costar). En estas condiciones permanecieron las células hasta que el medio se tornó amarillento y se observó muerte celular (2 o 3 días). Para obtener los AcMo, el contenido de las cajas se pasó a un tubo cónico de 50 ml estéril (Costar), se centrifugó a 1500 rpm 5 min., el sobrenadante se alicuotió y se almacenó a -20°C. Es recomendable que al hacer la primera resiembra, se congelen células en medio apropiado (Apéndice 11), para respaldar una posible contaminación o pérdida de los hibridomas en crecimiento (36).

#### **Obtención de anticuerpos comerciales anti-CD28, CD45RO, TCR $\alpha\beta$ , TCR $\gamma\delta$ , anti-IgG de ratón, rata y hámster.**

Se obtuvieron los AcMo en contra de CD28 (IgG de hámster, clona 37.51), TCR $\alpha\beta$  (IgG de hámster, clona H57-597) y TCR $\gamma\delta$  (IgG de hámster, clona GL3) de los Laboratorios Pharmingen (San Diego, CA, USA). El AcMo anti CD45RO (hecho en rata, clona B011) se obtuvo de los Laboratorios Accurate Chemical & Scientific Corporation (Westbury, NY). Los Ac anti-IgG de hámster, rata y ratón marcados con FITC se obtuvieron de los laboratorios Sigma.

#### **Estudios de Inmunoblot**

Para realizar inmunoblots, el EPT de cultivos de *M. tuberculosis* ó *M. bovis*-BCG se sometió a electroforesis en geles de poliácridamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) (Bio-Rad Laboratories, Inc. Hercules, CA), en condiciones reductoras. La preparación del gel separador es al 10% y la del concentrador al 3% de acrilamida (Bio-Rad)

con 0.05% (V/V) de TEMED (Bio-Rad) y 0.05% (P/V) de persulfato de amonio como polimerizadores. Las muestras se diluyeron 1:1 en coctel de corrida (Apéndice 13) y se hierven 5 min. en baño María. La electroforesis se realizó en amortiguador de corrida (Apéndice 14) a 7.5 mA/gel toda la noche (22). Los geles se tiñeron con azul de Coomasie ó se transfirieron a papel de nitrocelulosa (Bio-Rad). Para ésto, los geles se montaron en una cámara de electrotransferencia (Bio-Rad) con hojas de nitrocelulosa (Bio-Rad) a 1A durante 1 hr en buffer de glicina (Apéndice 15) (37). Posteriormente la membrana de nitrocelulosa se bloqueó con albúmina (BSA) (Sigma) al 1% (Apéndice 16) durante 2 hr a temperatura ambiente. Después de tres lavados de 5 min con PBS más Tween 20 al 0.3%, la membrana se incubó con los Ac o los sueros de los ratones del modelo de tuberculosis experimental. Si el análisis era para revelar la respuesta inmune humoral de los ratones del modelo en contra de los antígenos secretados por *M. bovis*-BCG durante la tuberculosis experimental, los sueros se diluyeron 1:50 (immunoblots con EPT de *M. tuberculosis* o *M. bovis*-BCG). Para conocer la respuesta de subclases de IgG, la dilución del suero fue de 1:500 (immunoblot de EPT de *M. tuberculosis*) ó 1:100 (immunoblot de EPT de *M. bovis*-BCG) en albúmina (Apéndice 16) toda la noche a 4°C. Después se realizaron dos lavados rápidos y tres de 10 min, cada uno en PBS más Tween 20 al 0.3%. Enseguida se incubó con un Ac anti-Ig (IgG, IgA e IgM) de ratón hecho en cabra marcado con peroxidasa (dilución 1:1000 ) (Sigma) durante 2 hr a temperatura ambiente. Después de lavar como en el paso anterior, se añadió el sustrato de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y 4-cloro 1 naftol (Sigma) (Apéndice 17) (19). Cuando en el inmunoblot se analizaron las subclases de IgG, después de la incubación con los sueros y de lavar como ya se indicó, se añadieron los Ac purificados por cromatografía de afinidad, anti-IgG1 o anti-IgG2a de ratón hechos en conejo (Dako Corporation Carpinteria, CA) durante 2 hr a temperatura ambiente. Después se lavó como en el paso anterior y se hizo otra incubación, ahora con un Ac anti-IgG de conejo hecho en cabra marcado con fosfatasa alcalina (Sigma), que se reveló con un sistema para fosfatasa alcalina (Bio-Rad) (Apéndice 18) (25).

### **ELISA para identificar anticuerpos de la subclase IgG1 e IgG2a**

Las placas de 96 pozos (Costar) se incubaron con EPT de cultivos de *M. tuberculosis* y *M. bovis*-BCG o con proteínas puras de *M. tuberculosis*, a una concentración de 5 µg/ml en buffer de carbonatos (Apéndice 19) y se colocaron 100 µl/pozo. La

incubación se realizó a 37°C toda la noche. Se lavaron 3 veces con buffer de lavados (Apéndice 20) durante 3 min. Las placas se bloquearon con 200 µl de PBS + BSA al 1.0% por 1 hr a 37°C. Para el ELISA con EPT se utilizaron los sueros de 1 a 3 experimentos habitualmente de 3 ratones cada experimento. Los sueros fueron diluidos 1:5000 en PBS/BSA al 1% por 1 hr a 37°C. Posteriormente, se realizaron 5 lavados de 3 min cada uno. Después, se incubó con un Ac anti- IgG1 o anti-IgG2a ambos obtenidos de conejo (Dako) diluido 1:2000 en PBS/BSA al 1% por 1 hr a 37°C. Se lavó como en los pasos anteriores y se incubó con un Ac anti-IgG de conejo hecho en cabra marcado con fosfatasa alcalina (Sigma), diluido 1:30000; las placas se lavaron y finalmente se añadió el buffer de di-etanol amina (Apéndice 21) para revelar; después de 30 min, se paró la reacción con 50 µl/pozo de NaOH 2M. Las placas se leyeron en un lector de ELISA, Modelo 3550 (Bio-Rad), a una longitud de onda de 405 nm (38, 39).

#### **Inmunohistoquímica sobre pulmones de ratones del modelo de tuberculosis pulmonar**

Los cortes se obtuvieron como se indicó anteriormente; se fijaron en acetona (J.T. Baker) fría por 3-4 min y se almacenaron a 4°C hasta su uso. Los cortes se rehidrataron con PBS por 10 min; se retiró el exceso de PBS y se incubó 30 min. con PBS/BSA al 3% para bloquear sitios inespecíficos de unión. Se retiró el exceso y se incubó con los Ac Mo anti-IL-2 (IgG2b de rata, clona JES6-5H4) y anti-IFN-γ (IgG1 de rata, clona XMG1.2) de ratón (PharMingen) y con Ac policlonales anti-IL-4 y anti-IL-5 de ratón hecho en cabra (R&D Systems, Minneapolis, MN), dilución 1:50 en PBS/BSA al 3% durante 3 hr a temperatura ambiente. Se lavó exhaustivamente con PBS y se incubó con el Ac secundario anti-IgG de cabra hecho en conejo marcado con peroxidasa (Sigma), dilución 1:100 en PBS/BSA al 3% durante 1 hr a temperatura ambiente, sólo las laminillas incubadas con los Ac anti-IL-4 y anti-IL-5. En el caso de los Ac anti-IL-2 e IFN-γ no fue necesario un Ac secundario porque estos Ac están acoplados a biotina, por lo que después de lavar exhaustivamente se incubó con estreptoavidina-peroxidasa (Zymed Laboratories Inc., San Francisco, CA), dilución 1:40 en PBS durante 1 hr a temperatura ambiente, después se retiró el exceso del reactivo y se lavó con suficiente PBS para añadir el revelador, el cual se preparó con 4-cloro 1 naftol (Sigma) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Sigma) (Apéndice 22) y se incubó 10 min. a temperatura ambiente y en la

obscuridad. La reacción se paró con agua corriente. Se contratiñó con verde de metilo al 1% por 30 segundos, se montó en medio gelatina-glicerina y se observó al microscopio (40, 41). Se seleccionaron 5 campos al azar en los pulmones de dos ratones diferentes y se fotografiaron en un microscopio con equipo de fotografía (Nikon), a un aumento de 20x. Se contaron las células totales y se determinó el porcentaje de las positivas. Se contaron entre 500 y 1000 células por diapositiva.

### **Análisis estadístico**

Con el fin de determinar si las diferencias entre los grupos analizados eran estadísticamente significativas, se emplearon análisis de ANOVA. En los casos en los que dicha prueba detectó la presencia de diferencias significativas entre grupos, los pares de grupos que diferían entre sí fueron identificados por análisis de comparación múltiple de medias de Tukey. El nivel de la significancia estadística seleccionado para todas las comparaciones fue  $p < 0.05$  (42).



## RESULTADOS

### Desarrollo del modelo de tuberculosis pulmonar en ratones

Para desarrollar el modelo de tuberculosis pulmonar en ratón, se hicieron estudios piloto a fin de encontrar las condiciones apropiadas para inducir una enfermedad histológicamente evidente. Inicialmente se probaron dos dosis de inóculo por vía intratraqueal de *M. bovis*-BCG:  $1 \times 10^5$  y  $5 \times 10^5$  ambos en 100  $\mu$ l de PBS. Los grupos de ratones se sacrificaron a 1, 2 y 4 semanas. Después del análisis histológico de los pulmones se determinó que la dosis adecuada era de  $5 \times 10^5$  bacilos.

### Análisis histológico

Enseguida se realizaron los experimentos cuyos resultados se aprecian en la Figura 3, donde se muestra una secuencia de los cambios registrados a 1, 2, 4, 8, 12 y 16 semanas. En 3A se muestra un corte del pulmón de un ratón control teñido con HE. Se observan acúmulos muy discretos de células inflamatorias mononucleares en el intersticio. Se pueden apreciar los alvéolos, bronquios y vasos sanguíneos sin cambios anormales. La Figura 3B representa las lesiones características después de una semana de infección; se pueden observar vasos sanguíneos con sus paredes infiltradas por células mononucleares, principalmente linfocitos. Esta observación, que sugiere migración activa de linfocitos hacia el tejido pulmonar, ha sido ya previamente reportada (43). Además se observó hiperplasia del tejido linfoide asociado al bronquio (no se muestra). En la Figura 3C se observa la aparición de granulomas tempranos a las 2 semanas de infección y en 3D se muestra a mayor aumento la conformación celular de dichas lesiones; se observan acúmulos de macrófagos de citoplasma abundante, claro y granular, rodeados de linfocitos. A las 4 semanas (Figura 3E) se observa una mayor cantidad de lesiones de diversos tamaños que se pueden apreciar y en la Figura 3F se muestra un acercamiento de un granuloma típico de 4 semanas post-infección; en esta etapa los granulomas son de mayor tamaño y los macrófagos ocupan la mayor parte de la lesión. En las Figuras 3G y 3H se aprecia un pulmón de 8 semanas de infección, donde se observa una lesión constituida por macrófagos epitelioides que exhiben un citoplasma abundante, granular y con afinidad por la eosina. A diferencia de los granulomas tempranos los linfocitos han disminuido en número. En la

Figura 3I se ilustra un lesión de 12 semanas, donde la organización original del granuloma se perdió y se aprecian con claridad los mantos de macrófagos epitelioides los que ocupan la mayor parte de la lesión; los linfocitos son escasos. A continuación se muestra una secuencia de la distribución de los bacilos ácido alcohol-resistentes a lo largo del modelo experimental. Por inmersión, en la Figura 3J se muestra un pulmón de 1 semana de infección teñido con Ziehl-Neelsen, observándose un macrófago alveolar infectado por varias micobacterias. En la Figura 3K, también a 1 semana de infección, se observa otro macrófago situado ya en el intersticio pulmonar, el cual contiene una gran cantidad de bacilos. Finalmente, se muestra un granuloma de 4 semanas (3L) en el cual hay macrófagos albergando numerosos bacilos.

### **Cinética de la carga bacilar**

Un parámetro importante para valorar la cinética de la infección en tuberculosis experimental es la determinación de la carga bacilar en los granulomas. El curso de la infección fue muy evidente, ya que a las 4 semanas se observó una gran cantidad de bacilos en las lesiones pulmonares, los cuales disminuyeron gradualmente conforme transcurrió el tiempo y hasta las 16 semanas. Para comprobar numéricamente lo anterior, se midió un área de  $2 \times 10^5 \mu\text{m}^2$  de tejido infectado, es decir, de granulomas con la ayuda de una rejilla micrométrica (E. Leitz) adaptada al ocular del microscopio. Los resultados se muestran en la Figura 4. Se apreció una mayor carga bacilar a las 4 semanas de infección ( $150 \pm 25.2$  bacilos/ $2 \times 10^5 \mu\text{m}^2$ ), la que disminuyó a las 8 semanas ( $32 \pm 9.0$  bacilos/ $2 \times 10^5 \mu\text{m}^2$ ). Esta disminución progresiva de la carga bacilar se mantuvo a las 12 ( $15.3 \pm 4.0$  bacilos/ $2 \times 10^5 \mu\text{m}^2$ ) y 16 semanas ( $20.3 \pm 5.5$  bacilos/ $2 \times 10^5 \mu\text{m}^2$ ). El análisis estadístico mostró una alta significancia ( $p < 0.001$ ) por lo que se realizó la prueba de Tukey que indicó que la diferencia entre la carga bacilar de las 4 semanas y la de los otros tiempos experimentales era altamente significativa, además, las semanas 12 y 16 mostraron una menor carga bacilar estadísticamente significativa con la segunda semana.

### **Análisis computarizado de imagen**

Este análisis indicó que el mayor número de lesiones granulomatosas se observó a las 4 semanas, como se muestra en la Tabla 4. A este tiempo había  $139 \pm 1$  lesiones

granulomatosas por ratón, las que median en promedio  $29.2 \pm 6.51 \mu\text{m}^2$ ; este hallazgo fue coincidente con la mayor carga bacilar observada (Figura 4). Posteriormente, fue evidente una disminución en el número de lesiones, las cuales, sin embargo, tenían un tamaño mayor alcanzando su máximo a las 12 semanas ( $35.5 \pm 22.4 \mu\text{m}^2$ ); hay que señalar que a este tiempo la carga bacilar había disminuido notablemente ( $15.3 \pm 4.0 \text{ bacilos}/2 \times 10^5 \mu\text{m}^2$ ). En lo que concierne a la extensión total de la inflamación pulmonar hubo un crecimiento inicial que alcanzó su máximo a las 4 semanas ( $4.1 \pm 0.56 \%$ ), manteniéndose en esta magnitud hasta las 12 semanas cuando se inició una fase resolutive muy rápida. Al término del experimento había una inflamación residual afectando el  $1.4 \pm 0.49 \mu\text{m}^2$  del total del tejido pulmonar. El incremento en el tamaño de los granulomas y del área total de inflamación parece estar relacionado con un aumento en el número y tamaño de los macrófagos que en las etapas tardías son la célula principal (Figura 3H). En esta etapa los granulomas son diferentes ya que los linfocitos están difusamente distribuidos, mientras que en los granulomas tempranos se localizaban en la periferia rodeando macrófagos y eran más numerosos (Figura 3I).

La Figura 5 muestra la extensión del proceso inflamatorio y el tamaño de los granulomas en  $\mu\text{m}^2$ . Para obtener el porcentaje de inflamación se dividió el área total de tejido pulmonar con inflamación entre el área total del pulmón y se multiplicó por cien. Para determinar el tamaño de los granulomas se dividió el área total de inflamación pulmonar entre el número de lesiones individuales. Este manejo de los datos se hizo para eliminar la posibilidad de que variaciones en el proceso de perfusión y distensión del pulmón por el fijador pudieran dar resultados erróneos. El análisis estadístico (oneway ANOVA) para el porcentaje de inflamación y  $\mu\text{m}^2/\text{lesión}$  indicó que había una  $p=0.038$  y  $p=0.016$  respectivamente. Con la prueba de Tukey se demostró que la diferencia era estadísticamente significativa entre 1 y 12 semanas para ambos parámetros. Estos puntos representan el inicio de la infección y la fase resolutive de la enfermedad.

## Computarizado de Imagen

Semanas	Área Total $\mu\text{m}^2 (\times 10^5)$	Área Inflamada $\mu\text{m}^2 (\times 10^5)$	Área Inflamada %	Número de Granulomas
1	754 $\pm$ 153	2.8 $\pm$ 0.00	0.37 $\pm$ 0.08	53 $\pm$ 19
2	763 $\pm$ 44	14.0 $\pm$ 0.01	1.7 $\pm$ 0.07	52 $\pm$ 18
4	715 $\pm$ 61	29.2 $\pm$ 6.51	4.1 $\pm$ 0.56	139 $\pm$ 1
8	584 $\pm$ 24	22.0 $\pm$ 6.0	3.7 $\pm$ 0.86	99 $\pm$ 38
12	761 $\pm$ 14	35.5 $\pm$ 22.4	4.4 $\pm$ 2.05	85 $\pm$ 44
16	664 $\pm$ 18	1.4 $\pm$ 0.49	2.2 $\pm$ 0.49	80 $\pm$ 28

**Tabla 4.-** Análisis computarizado de imagen de pulmones de ratones infectados con *M. bovis*-BCG. En los cortes de pulmones teñidos con HE se midió el área total del pulmón y las áreas con cambios inflamatorios y se estimó su porcentaje. Así mismo se contaron los granulomas. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SD de 3 experimentos individuales de 2 ratones por tiempo.

### Análisis por inmunoblot de la respuesta inmune humoral de ratones infectados con *M. bovis*-BCG.

Con este estudio, se intentó identificar por inmunoblot antígenos (Ag) que producían una respuesta inmune humoral en los ratones infectados con *M. bovis*-BCG utilizando EPT de *M. tuberculosis* (Figura 6) y de *M. bovis*-BCG (Figura 7). Los inmunoblots fueron revelados con una anti-IgG de ratón marcada con peroxidasa. Con sueros de ratones inoculados con el medio de cultivo en el cual crecieron los bacilos (carril 1) y con sueros de ratones no infectados (carril 2), no hubo reconocimiento antigénico. Con el suero de ratones hiperinmunizados con EPT de *M. tuberculosis* y usando un EPT de *M. bovis*-BCG se observó reconocimiento de aproximadamente 15 bandas. En inmunoblots utilizando EPT de *M. bovis*-BCG, sin embargo, llamó la atención la ausencia de reconocimiento de bandas de bajo peso molecular y en particular de la proteína de 30-31 kD, la cual en inmunoblots con EPT de *M. tuberculosis* fue intensamente reconocida. También se incluyeron sueros de ratones inoculados una (carril 4), dos (carril 5) y tres veces (carril 6), con bacilos muertos por calor a 60°C en baño María (26); estos sueros no

reconocieron ningún antígeno lo cual es sorprendente considerando que los ratones recibieron tres inoculaciones, habiéndose obtenido el suero 10 días después de la última inoculación. La inclusión de este último grupo en el estudio, tuvo por objeto investigar si había diferencias entre la respuesta inmune inducida por bacilos muertos y vivos lo que podría ayudar a identificar antígenos de secreción. Con los sueros de los ratones infectados y en inmunoblots realizados con el EPT de *M. tuberculosis* (Figura 8), no se observó reconocimiento antigénico a la 1a y 2a semanas (carriles A y B). A partir de la octava semana (carril D) y hasta el final del experimento se observó reacción muy intensa con bandas de 80 y de 100 kD. También se observó reconocimiento menos intenso de bandas de 120, 110, 70 y 50-55 kD. En el inmunoblot con EPT de *M. bovis*-BCG (Figura 9) tampoco se observó reconocimiento a la primera (carril A) y segunda (carril B) semanas. A la cuarta semana (carril C) se observó reconocimiento muy intenso de una banda de 80 kD que se mantuvo hasta el final; a las 8 semanas (carril D) se observaron, además, bandas de 90, 75 y 49 kD que se mantienen hasta las 16 semanas de infección (carril F). A las 12 (carril E) y 16 semanas (carril F) llama la atención el reconocimiento muy intenso de un doblete de 47-49 kD; además se aprecian bandas inmunoreactivas débilmente de 63 y 28 kD.

### **Análisis por citometría de flujo de células de pulmón y bazo de ratones del modelo de tuberculosis experimental**

Para conocer los cambios celulares en el pulmón y el bazo a lo largo de este modelo experimental de tuberculosis, se hicieron estudios de citometría de flujo con células de bazo y de LBA. Se mezclaron células esplénicas de 3 ratones normales o de 3 infectados. Para obtener células pulmonares en número suficiente para realizar el análisis de citometría de flujo, fue necesario obtener LBA de 10 a 20 ratones, sobre todo, de animales normales y de ratones con una semana de infección. Los marcadores celulares que se analizaron fueron: CD3, CD4, CD8, (Figuras 10 y 11), CD28, CD45RO, (Figuras 12 y 13), TCR- $\alpha\beta$  y TCR- $\gamma\delta$  (Figuras 14 y 15). Los tiempos de infección analizados fueron 1, 4 y 12 semanas. Los resultados se muestran en la Tabla 5.

En nuestros resultados se observó que los marcadores que mostraron diferencias en su comportamiento en los tiempos analizados a lo largo del modelo, fueron CD8<sup>+</sup>, CD28<sup>+</sup> y TCR  $\gamma\delta$ <sup>+</sup> del pulmón, mientras que las células de bazo no parecieron mostrar diferencia.

alguna. El análisis estadístico realizado (ANOVA) confirmó nuestras observaciones y mostró que los marcadores con diferencias significativas fueron CD8 ( $p=0.005$ ) y CD28 ( $p<0.010$ ) en pulmón. El porcentaje de las células CD8<sup>+</sup> aisladas de ratones con 4 semanas de infección, resultó ser diferentes significativamente a los demás tiempos incluyendo el grupo control. En los animales experimentales sacrificados a una semana, se observó un incremento estadísticamente significativo en el número de células con el marcador CD28, en comparación con el grupo control y con el grupo experimental de 4 semanas. En relación a las células que expresaron el TCR- $\gamma\delta$  en el pulmón, a pesar de que la media del grupo de 1 semana de infección se incrementó casi al doble en comparación a la media del grupo control, el análisis reveló que esta diferencia no resultó ser estadísticamente significativa ( $p=0.115$ ). Este resultado pudo estar relacionado con variaciones experimentales ya que las SD fueron muy grandes en los ratones normales ( $4.98 \pm 2.21$  %) y en los sacrificados a la semana de infección ( $9.01 \pm 3.65$  %). Los estudios de citometría de flujo en células de LBA con anticuerpos en contra de la molécula de linfocitos T CD3, del de la subpoblación CD4, del de memoria CD45RO y en contra de TCR- $\alpha\beta$  no mostraron diferencias significativas entre animales infectados y controles. Los estudios de citometría de flujo no demostraron diferencias significativas en las subpoblaciones celulares del bazo con ninguno de los 7 marcadores analizados.

## CITOMETRÍA DE FLUJO DE CÉLULAS PULMONARES Y DE BAZO.

	Normal n=3	1 Semana n=3	4 Semanas n=3	12 Semanas n=3
CD3	<b>80.65±15.3</b> 86.29±3.29	<b>75.61±9.89</b> 81.90±4.84	<b>62.82±7.88</b> 83.93±14.01	<b>83.98±4.16</b> 61.85±13.15
CD4	<b>70.32±9.57</b> 59.75±0.95	<b>56.11±10.51</b> 52.04±3.30	<b>44.60±9.14</b> 55.77±3.39	<b>58.47±2.52</b> 46.48±8.27
CD8	<b>12.55±5.72</b> 16.95±2.11	<b>18.50±3.61</b> 18.97±2.69	<b>34.60±3.01*</b> 22.64±5.59	<b>22.00±1.87</b> 15.26±1.27
CD28	<b>15.15±8.40</b> 28.48±19.33	<b>49.45±2.97*</b> 42.09±2.32	<b>14.13±10.24</b> 37.78±5.71	<b>27.79±0.37</b> 26.15±2.69
CD45RO	<b>95.60±0.21</b> 96.16±0.15	<b>91.77±2.18</b> 89.67±3.16	<b>89.17±2.74</b> 90.34±7.63	<b>92.82±0.83</b> 77.73±11.19
TCR-αβ	<b>49.00±1.41</b> 82.72±3.46	<b>57.27±12.82</b> 71.97±3.66	<b>57.92±8.58</b> 81.71±11.04	<b>71.53±4.39</b> 65.88±13.24
TCR-γδ	<b>4.98±2.21</b> 3.66±0.48	<b>9.01±3.65</b> 4.41±0.10	<b>4.74±0.59</b> 2.28±1.22	<b>2.87±1.21</b> 3.35±0.19

**Tabal 5.-** Datos representativos de pooles celulares de 2 ó 3 experimentos; para los estudios de pulmón se requirieron LBA de 10 ó 20 ratones. Los estudios con células esplénicas se hicieron con 3 bazos por experimento. Los valores representan la media ± SD de las células marcadas. Los valores en negritas corresponden a los datos obtenidos de células de LBA y los marcados con asterisco mostraron diferencias estadísticamente significativas.

Para reevaluar la significancia de los hallazgos antes descritos, los datos volvieron a ser analizados estadísticamente apareándolos, primero, sin considerar el origen de las células ni el tiempo experimental y haciendo una comparación del efecto de estas 2 variables de manera simultánea. Los resultados de este análisis, mostraron diferencias significativas en las células CD8<sup>+</sup> y TCR αβ<sup>+</sup>. En el caso de las células CD8<sup>+</sup>, donde ya se había observado una diferencia estadísticamente significativa, este nuevo análisis confirmó dicha diferencia

significativa considerando tiempo ( $p=0.002$ ), observándose que el porcentaje de las células  $CD8^+$  en el pulmón a las 4 semanas de infección fue significativamente diferente a todos los demás valores tanto en pulmón como en bazo, con excepción del punto equivalente en bazo. Esto refleja un comportamiento similar en bazo y pulmón, no obstante, esto podría indicar que a las 4 semanas de infección, el pulmón aparentemente tiene un reclutamiento preferencial de estas células. El resultado del análisis de la interacción tiempo-tejido también apoyó nuestras observaciones y tuvo una diferencia estadísticamente significativa ( $p=0.004$ ), de la misma manera, la cuarta semanas es diferente a los demás puntos. En los linfocitos TCR- $\alpha\beta$  pudimos observar una diferencia significativa entre los valores del pulmón en comparación al bazo ( $p=0.004$ ). En el análisis que se describe anteriormente, no hubo diferencias significativas en los porcentajes de las células TCR- $\alpha\beta$ , sin embargo, al analizar comparativamente el bazo y el pulmón si se demostraron diferencias significativas. La comparación con respecto al tiempo y la interacción tejido-tiempo, no mostraron diferencias significativas.

#### **Estudios de ELISA para identificar subclases de IgG contra antígenos de EPT de cultivos de *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium bovis*-BCG.**

El análisis de la cinética de la carga bacilar reveló que a los 2 meses de infección la enfermedad entró a una fase de resolución con disminución progresiva de la carga bacilar (Figura 4). Para investigar si esta fase resolutoria se asociaba a la emergencia de células productoras de citocinas Th1, analizamos la presencia de anticuerpos de las subclases IgG1 e IgG2a, ya que hay reportes que indican que las citocinas de tipo Th1 inducen la síntesis de la subclase IgG2a y las de tipo Th2 la de la subclase IgG1 (44). Se sensibilizaron placas con EPT de *M. tuberculosis* y *M. bovis*-BCG, probándose pools de sueros obtenidos a diferentes tiempos (2 de 1, 3 de 4, 1 de 8, 3 de 12 y 1 de 16 semanas). Como control se usó suero normal de ratón. Se observó que a la semana 1 y al pico de la infección los títulos de IgG1 e IgG2a eran muy bajos sin observarse un predominio de alguna de las subclases. A las 8 semanas, tiempo en el cual la carga bacilar ha disminuido de manera considerable y se está ya en la fase de resolución los títulos de IgG1 e IgG2a se han incrementado considerablemente, sobre todo los de IgG2a. A partir de este tiempo los títulos de IgG1 disminuyen progresivamente para ser iguales a los del ratón normal. En contraste, los títulos



de IgG2a se incrementan progresivamente hasta las 16 semanas. Esto se observó tanto en el ELISA con *M. bovis*-BCG (Figura 16) como en el de *M. tuberculosis* (Figura 17), aun cuando en estas últimas condiciones la predominancia de IgG2a fue más clara.

### **ELISA para la detección de subclases de IgG con Ag proteínicos puros de *M. tuberculosis*.**

Con la intención de identificar Ag relacionados con la inducción de Ac de las subclases IgG2a e IgG1, realizamos estudios de ELISA con proteínas nativas seleccionadas purificadas del sobrenadante de cultivos de *M. tuberculosis*. Dichas proteínas fueron la superóxido dismutasa (23 kD, Figura 18), una proteína de 28 kD (Figura 19) que hemos estudiado en nuestro laboratorio previamente, el complejo de 30-31 (Figura 20) reconocido por su afinidad por fibronectina (19) y por su capacidad para inducir síntesis de interferón- $\gamma$  (45), la glicoproteína de 38 kD (Figura 21) estudiada por nosotros (17) y por otros investigadores (46 y 47) y reconocida por su gran inmunogenicidad y una proteína de 80 kD (Figura 22) la cual, en este trabajo se observó por inmunoblot que podría estar relacionada con la inducción de un perfil de síntesis de citocinas de tipo Th1. Los resultados obtenidos mostraron que los Ag probados exhibieron comportamiento similar en cuanto a la producción de subclases de las inmunoglobulinas. De las Figura 18 a la 22 se aprecia que al inicio del modelo, los Ag fueron reconocidos por las dos subclases probadas, con un ligero predominio de la subclase IgG2a. A las cuatro semanas de infección, con los 5 Ag se observaron absorbancias semejantes para ambas subclases. Una vez que la enfermedad entró en el periodo de resolución (8 semanas), los títulos de Ac IgG2a fueron mayores lo que persistió hasta la semana 16, sobre todo con el Ag de 28 kD.

### **Estudios de inmunohistoquímica sobre cortes de pulmón de ratones del modelo de tuberculosis experimental.**

Para investigar si había un predominio en la síntesis de citocinas de tipo Th1 durante la fase de resolución de la enfermedad, se realizaron ensayos de inmunotinción sobre pulmones de los ratones infectados con el objeto de buscar la presencia de células productoras de IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-4 e IL-5. Los tiempos analizados fueron 1, 4 y 12 semanas. Observamos que en el ratón normal, la síntesis de citocinas fue del tipo Th0, ya que el

número de células productoras de IL-2 ( $46.38 \pm 8.45 \%$ ), IL-4 ( $52.60 \pm 6.52 \%$ ) e IFN- $\gamma$  ( $18.50 \pm 8.22 \%$ ) fue considerable. En los ratones infectados se observó un patrón diferente. A una semana de infección, hubo un patrón de tipo Th1 con un predominio de células productoras de IFN- $\gamma$  e IL-2. A las 4 semanas se notó un patrón de tipo Th0 con porcentajes muy similares entre las células de tipo Th1 y Th0. En la fase de resolución se volvió a un predominio de las células productoras de citocinas Th1. Estos resultados se muestran en la Tabla 6. Los datos mostraron que la producción de citocinas no es excluyente en cuanto a la síntesis del tipo 1 y tipo 2, sin embargo, si apreciamos un claro predominio de la subpoblación Th1 en la 1ª y 12ª semana de infección. En ningún punto analizado se observó que las citocinas Th2 fueran marcadamente superiores a las Th1. Lo anterior apoya la idea que las células productoras de citocinas Th1 son de buen pronóstico en las enfermedades micobacterianas (15).

#### **Inmunohistoquímica para detectar síntesis de citocinas en pulmón**

<b>Citocina</b>	<b>Controles</b>	<b>1 Semana</b>	<b>4 Semanas</b>	<b>12 Semanas</b>
<b>IL-2</b>	46.38 $\pm$ 8.45	26.77 $\pm$ 5.09	24.21 $\pm$ 5.92	29.22 $\pm$ 18.72
<b>IL-4</b>	52.60 $\pm$ 6.52	1.87 $\pm$ 2.36	33.88 $\pm$ 30.18	5.41 $\pm$ 8.61
<b>IL-5</b>	7.30 $\pm$ 3.25	12.98 $\pm$ 24.37	48.68 $\pm$ 35.03	17.32 $\pm$ 20.17
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	18.85 $\pm$ 8.22	79.36 $\pm$ 21.71	59.32 $\pm$ 27.04	58.47 $\pm$ 25.10

**Tabla 6.-** Inmunohistoquímica de cortes por congelación de pulmones de ratones del modelo de tuberculosis experimental. Los valores están dados en porciento de células positivas para cada citocina y representa la media  $\pm$  desviación estándar de 2 animales, cada uno de experimentos independientes. El grupo control constó de un ratón para cada citocina y se contaron 500 a 1000 células/animal.

## **Análisis de inmunoblot para identificar antígenos relacionados con la producción de citocinas.**

Con el fin de identificar Ag relacionados con la producción de Ac de las subclases IgG1 e IgG2a y por lo tanto relacionados con la síntesis de citocinas de tipo Th2 o Th1 respectivamente, se hicieron inmunoblots con EPT de *M. tuberculosis* (Figura 23) y de *M. bovis*-BCG (Figura 24), los cuales fueron incubados con los sueros de los ratones y revelados con Ac anti-IgG1 ó IgG2a de ratón. Los tiempos del modelo que se analizaron en este estudio fueron 1, 4, 8, 12 y 16 semanas. Las bandas antigénicas reconocidas por ambas subclases fueron enumeradas en la Tabla 7. A la primera semana no se observó reconocimiento antigénico en ninguno de los casos. Con el EPT de *M. tuberculosis* se observó lo siguiente. A las 4 semanas hubo reconocimiento de débil a moderado por Ac IgG2a de las bandas de 80, 70, 65 y 50 kD, bandas que no fueron reconocidas por Ac IgG1. A las 8 semanas se observó reactividad intensa de Ac IgG2a con las bandas de 80, 70, 65, 50 y 30-31 kD. De estas bandas sólo las de 70 y 65 kD fueron reconocidas intensamente por Ac IgG1. A las 12 y 16 semanas persistió el reconocimiento intenso por ambas subclases de los antígenos de 65 y 70 kD. A estos tiempos se observó reconocimiento de moderado a intenso de las bandas de 80, 60, 50 y 30-31 kD por Ac IgG2a; estas bandas fueron ignoradas o muy débilmente reconocidas por Ac de subclase IgG1. En los inmunoblots con EPT de *M. bovis*-BCG se observó de poca a nula reactividad en la primera semana. En todos los tiempos experimentales ambas subclases de IgG reaccionaron de manera importante con una banda de 70 kD y débilmente con la banda de 80 kD. Se observó reconocimiento exclusivo por IgG2a de las bandas de 38 kD (4, 8, 12 y 16 semanas) y 36 kD (8 y 12 semanas). Los sueros control obtenidos de ratones normales no tuvieron inmunoreactividad. Las observaciones anteriores se resumen en la Tabla 7.

Tiempo (Semanas)	Ag (kD)	<i>M. tuberculosis</i>		<i>M. bovis</i> -BCG		
		IgG1	IgG2a	IgG1	IgG2a	
1	----	----	----	----	----	
4	80	+/-	++	+	+	
	70	-	++	-	-	
	65	-	++	-	+	
	38	-	-	-	+++	
8	80	+	+++	++	++	
	70	++	+++	+++	+++	
	65	++	+++	+	+	
	63	-	-	+	++	
	50	+/-	+++	-	+	
	38	-	-	+	+++	
	36	-	-	+	+++	
	30-31	+	+++	-	+	
	18	-	-	++	++	
	12	100	-	-	+	++
80		-	+++	+	++	
70		+++	+++	+++	+++	
65		+++	+++	++	+	
63		-	-	+	++	
60		+/-	++	-	+	
50		-	++	-	+	
38		-	-	+	+++	
36		-	-	+	+++	
30-31		-	+++	-	+	
16		100	-	-	+	++
		80	+	+++	++	++
	70	+++	+++	+++	+++	
	65	+++	+++	+	+	
	63	-	+	++	++	
	50	-	++	-	-	
	38	-	-	-	+++	
	36	-	-	++	+	
	30-31	+	+++	-	-	

**Tabla 7.-** Estudios de Inmunoblot con EPT de *M. tuberculosis* y *M. bovis*-BCG incubados con sueros de ratones y revelados con Ac contra IgG1 ó IgG2a. Se muestran los Ag reconocidos por las subclases de IgG y las cruces indican la intensidad del reconocimiento, se aprecia un reconocimiento preferencial por Ac IgG2a, relacionados las células Th1.

**Figura 3.-** Respuesta tisular y localización de bacilos de *M. bovis*-BCG en pulmones de ratones normales e infectados.

Figura 3A.- Tinción con HE en un corte de pulmón de raton normal. Se observa la escasa cantidad de células; objetivo 4X.

Figura 3B.- Tinción con HE en un corte de pulmón de 1 semana de infección. Se aprecia la migración de células de características linfoides a través de los vasos sanguíneos hacia el intersticio pulmonar, objetivo 4X.

Figura 3C.- Tinción con HE en un corte de pulmón de 2 semanas de infección. Se puede apreciar un granuloma; objetivo 4X.

Figura 3D.- Tinción con HE en un corte de pulmón de 2 semanas de infección. Acercamiento de un granuloma temprano formado por linfocitos y macrófagos; objetivo 20X.

Figura 3E.- Tinción con HE en un corte de pulmón de 4 semanas de infección. Se observan varios granulomas de diversos tamaños; objetivo 4X.

Figura 3F.- Tinción con HE en un corte de pulmón de 4 semanas de infección. Acercamiento de un granuloma donde los macrófagos aparecen como el tipo celular predominante en la lesión; objetivo 10X.

Figura 3G.- Tinción con HE en un corte de pulmón de 8 semanas de infección. Se observa como la lesión cambia su estructura, ahora presenta macrófagos con un citoplasma extenso; objetivo 10X.

Figura 3H.- Tinción con HE en un corte de pulmón de 8 semanas de infección. Acercamiento de un granuloma donde se observan los macrófagos epitelioides con su citoplasma granuloso y muy extenso; objetivo 20X.

Figura 3I.- Tinción con HE en un corte de pulmón de 12 semanas de infección. Aquí se muestra un granuloma tardío que perdió su organización original y los macrófagos granulosos y de gran citoplasma ocupan la mayor parte de la lesión; objetivo 20X.

Figura 3J.- Tinción con ZN en un corte de pulmón de 1 semana de infección. Se aprecia la gran cantidad de micobacterias dentro de un macrófago alveolar; objetivo 100X.

Figura 3K.- Tinción con ZN en un corte de pulmón de 1 semana de infección. Se observa un macrófago con numerosas bacterias en su interior en el intersticio pulmonar; objetivo 100X.

Figura 3L.- Tinción de ZN en un corte de pulmón de 4 semana de infección. Se observa un granuloma organizado con las micobacterias dentro de los macrófagos en el centro de la lesión y se pueden apreciar linfocitos en la periferia; objetivo 100X.