

**“Producción de Intermediarios Reactivos de
Nitrógeno en cultivo de células mononucleares de
cabras expuestas al BCG de *M. bovis*, suplementadas
con 1,25 Dihidroxitamina D3”**

AURORA MARTÍNEZ ROMERO

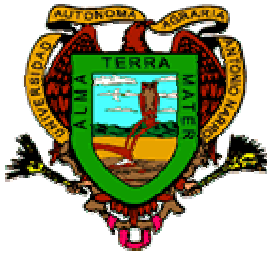
TESIS

**Presentada como requisito parcial para obtener
el grado de**

DOCTOR EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO**

UNIDAD LAGUNA



Subdirección de Posgrado

Torreón, Coahuila, México.
Diciembre de 2006



ISBN 978-84-690-8621-6

Reservados todos los derechos
© Aurora Martínez Romero
Universidad de La Rioja

Logroño, 2007

Universidad de La Rioja
Biblioteca Universitaria
C/ Piscinas s/n
26006 LOGROÑO
LA RIOJA – ESPAÑA

E-mail: dialnet@unirioja.es
Página web: dialnet.unirioja.es

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO**

SUBDIRECCIÓN DE POSGRADO

**“Producción de Intermediarios Reactivos de
Nitrógeno en cultivo de células mononucleares de
cabras expuestas al BCG de *M. bovis*, suplementadas
con 1,25 Dihidroxitamina D3”**

POR

AURORA MARTÍNEZ ROMERO

Elaborada bajo la supervisión del Comité Particular de Asesoría y
aprobada como requisito parcial, para optar al grado de:
DOCTOR EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

Asesor principal _____
Dr. Rafael Rodríguez Martínez

Asesor: _____
Dr. Raúl Villegas Vizcaíno

Asesor: _____
Dr. Pedro Antonio Robles Trillo

Asesor: _____
Dr. Joel López Pérez

Asesor: _____
Dr. Rómulo Bañuelos Valenzuela

Dr. Jerónimo Landeros Flores
Subdirector de Posgrado

M. C. Gerardo Arellano Rodríguez
Jefe del Departamento de Posgrado

Torreón, Coahuila. México

Diciembre de 2006

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA
ANTONIO NARRO**

SUBDIRECCIÓN DE POSGRADO

**“Producción de Intermediarios Reactivos de
Nitrógeno en cultivo de células mononucleares de
cabras expuestas al BCG de *M. bovis*, suplementadas
con 1,25 Dihidroxitamina D3”**

POR

AURORA MARTÍNEZ ROMERO

Elaborado bajo la supervisión del Comité Particular de Asesoría y
aprobada como requisito parcial, para optar al grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

Asesor

Dr. Rafael Rodríguez Martínez

Torreón, Coahuila. México

Diciembre de 2006

AGRADECIMIENTOS

Con la ayuda de Dios, los sueños se cumplen..... a cualquier edad.

Sherry Buchanon

Primero agradezco a Dios por haberme concedido la gracia de llegar hasta este momento. A mis padres Paco y Lupita, por haberme dado la vida y la oportunidad de haberme enviado a la escuela.

A ti mi amado esposo José Luis, solo con tu amor y apoyo, fue posible realizar este trabajo, gracias a Dios por permitirnos realizar y concluir juntos esta gran aventura.

A mis queridos hijitos Andy, Paulita y Josecito, mil gracias por su comprensión, que con su inocencia y gran amor son la base de mi esfuerzo.

Especial agradecimiento al señor caprinocultor C. Guadalupe Maciel Sarmiento y familia, de Tlahualilo, Durango, por habernos proporcionado todas las facilidades para trabajar con sus animales.

Gracias al C. P. Rubén Calderón Luján, Rector de la Universidad Juárez del Estado de Durango (UJED), a la M. E. María de Jesús Cedillo Gómez, Directora de la Facultad de Ciencias Químicas de la UJED, a la Q.F.B. Sandra Isabel Hernández González jefa del laboratorio, a todo el personal de laboratorio y administrativo, gracias por la confianza y apoyo brindado, así como por las facilidades concedidas en el uso de las instalaciones en días y horas inhábiles.

Un merecido agradecimiento al M. S. P. José de Jesús de Alba Romero por darnos la oportunidad de hacer uso de su equipo e instalaciones, en su

laboratorio de Análisis Clínicos, en Gómez Palacio, Durango, así como a todo su personal, mil gracias por la confianza manifestada.

A mis queridos asesores Dr. Miguel Arenas Vargas, Dr. Rafael Rodríguez Martínez, Dr. Raúl Villegas Vizcaíno, Dr. Joel López Pérez, MC José Luis Corona Medina, gracias por ese interés de querer formar investigadores de calidad.

Al jurado de la presente investigación, por su apreciable tiempo. A mis adorados compañeros de este maravilloso programa de Postgrado de la UAAAN, en especial a la MC Margarita Yolanda Mendoza Ramos, a todos gracias por sus valiosas observaciones a los productos emanados de este proyecto.

Por su meritoria contribución en el análisis estadístico, al MC José Ramón Hernández Salgado catedrático e investigador de la Universidad Autónoma Chapingo, un sincero reconocimiento.

Gracias, al Dr. Jesús Vásquez Arroyo por permitirnos su equipo de laboratorio.

A la Q.F.B. Guillermina Chanes Tovar y a su personal del laboratorio de la Clínica Hospital ISSSTE de Gómez Palacio, Durango, por darnos la disposición de hacer uso de su equipo e instalaciones.

Por su amable disponibilidad en apoyo al presente trabajo, a la Dra. Maricela del Rocio González Martínez, por el acceso al servicio a publicaciones científicas proporcionado por el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS).

Especial e infinito agradecimiento a mi querido trabajo, en la Facultad de Ciencias Químicas de la UJED, que me permitió tener recursos para llevar a feliz término la presente investigación.

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a mi papacito, Sr. C. Francisco Martínez López, quien me estimuló siempre a seguir adelante, quien fue el motor de mi esfuerzo, el mejor padre del mundo, que con su inmenso amor hizo de mi una persona responsable. *“Te perdí, mi mejor amigo, una parte de mí se fue contigo, pero todo lo que ambos compartimos en el tiempo, se quedó en mí. No heredé tu sabiduría, pero sí, todo tu amor y tu amor a la vida. Siempre trataré de ser la mitad de lo que tú fuiste”.*

Especial dedicatoria a mi amado esposo C. Dr. José Luis Ortega Sánchez, *“mi vida, ha sido un honor compartir mi vida contigo y con nuestros queridos hijos que Dios nos concedió la gracia de tener y además, tuve la virtud de que me dieras la oportunidad de concluir mis estudios de Licenciatura, Maestrías y ahora el grado de Doctorado. Podré olvidar lo que me has dicho alguna vez, pero nunca olvidaré lo que me has hecho sentir”.*

A quienes otorgo una dedicatoria especial, a mis queridos y adorados hijos:

A mi hijita Andy, Dra. Andrea Margarita, mi hijita Paulita y mi hijito Josecito.

Hijos míos, la batalla por la vida no siempre la gana el hombre más fuerte, el hombre que gana, es aquel que cree poder hacerlo. *“Piensen en grande y sus hechos crecerán, piensen que pueden y podrán, todo está en el estado mental, el éxito comienza con la voluntad del hombre”.*

A mi mami Lupita, a mis adorados hermanos Yolanda, Paquito, Monty, Jorgito y a mi querida C. P. Kenny. A mi suegritos Rafael y Eustolia, cuñados y sobrinos.

A mis inolvidables maestros y amigos.

PREFACIO

*Cuando por los años no puedas
correr, trota; cuando no puedas
trotar, camina; cuando no puedas
caminar, usa el bastón.
¡¡Pero no te detengas!!!*

Héctor Álvarez

El documento consta de cinco capítulos correspondientes a la introducción, revisión de literatura, materiales y métodos, resultados y discusión.

La idea de realizar el presente proyecto de investigación, inicia al visualizar la problemática existente acerca del resurgimiento de la tuberculosis. Esta obra enfrenta un problema de fundamental importancia para quienes trabajamos sobre los problemas que aquejan la salud. Este texto representa una revisión exhaustiva destinada a la enseñanza de la tuberculosis y dirigida a estudiantes de licenciatura, postgrado y en general a profesionales en el área de la salud.

La elaboración de este proyecto inicia con la construcción de un perfil de búsqueda con palabras clave, las cuales fueron cada vez más específicas para llevar a cabo la búsqueda, selección y acopio de información, emanados de *journals* con factor de impacto.

Como criterios de selección se consideró la solidez científica, originalidad, actualidad e información oportuna. Esta obra estuvo antecedida por un arduo proceso de trabajo académico de investigación con la finalidad de lograr desarrollar una serie de productos orientados en un principio a un objeto de estudio “tuberculosis latente”, elaborados con base en el análisis e interpretación de los artículos recuperados “*in extenso*”. Este objeto de estudio

poco a poco se fue delimitando hasta llegar a especificarlo en el diagnóstico de tuberculosis latente mediante moduladores de la respuesta inmune.

En cada tema se realizó un análisis e interpretación de la información recuperada, construyendo pensamientos científicos al hacer paráfrasis.

La recuperación de documentos se realizó principalmente con el administrador de información EndNote. Así como también, con *American Society for Microbiology* (ASM) que comprende 12 *journals* en microbiología, HighWire Press® una división de la biblioteca de la Universidad de Stanford con 999 *journals* y 1 442 827 artículos “free” en PDF *on line*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (PNAS) indexado en: *Index medicus*, *PubMed Central*, *Current Contents*, *Medline*, SPIN, JSTOR, ISI *Web of Science*, and BIOSIS.

También se tuvo acceso a publicaciones electrónicas en línea del servicio proporcionado por el IMSS. Seguridad y solidaridad social. Dirección de prestaciones médicas, a OVID, Medic Latina, Catálogo bibliográfico IMSS, DOYMA, *SpringerLink*, ProQuest y EBSCO.

El protocolo de investigación constó de introducción, material y métodos, derivados de los productos generados: revisión de hechos, problemas y procedimientos, durante el tiempo del desarrollo de la parte experimental, se procesaron las respectivas revisiones a la revisión de resultados, análisis e interpretación de resultados.

Una vez concluidos los procesos de indagación y experimentación se abordó el proceso de comunicación científica generando la presente tesis y tres artículos

originales; así como, la elaboración de un *review*. De los ensayos para coloquios realizados surgió un artículo de revisión.

La elaboración de los artículos de revisión, estuvieron realizados bajo los principios de sintetizar y expresar las aspiraciones del individuo sobre sí mismo, considerando la posibilidad de trascender en la comunidad científica.

En la presente tesis, también se incluye un capítulo con resultados complementarios a los que aparecen en los artículos seguido de una Discusión, literatura citada en la tesis, una lista de abreviaturas, un glosario de términos y una sección de anexos en donde se muestra en detalle la metodología realizada en la parte experimental, los resultados obtenidos durante dicho proceso y los productos elaborados para su publicación.

Con la elaboración de este producto se divulga información de interés sobre la tuberculosis, para informar a los profesionales de salud pública sobre los avances que la comunidad científica dedicada al objeto de estudio "Tuberculosis", ha desarrollado durante los últimos años, porque solo con la cooperación conjunta de los diferentes sectores de la población, podremos controlar e incluso erradicar dicha enfermedad.

Se deben promover y coordinar esfuerzos de los diferentes países por conservar la salud, combatir las enfermedades, prolongar la vida y estimular el desarrollo físico, mental y social de sus habitantes.

El autor desea testimoniar especial agradecimiento y admiración al Dr. Raúl Villegas Vizcaíno por sus valiosas aportaciones a la elaboración de la presente obra.

El poder del hombre es ilimitado cuando no está sujeto a la pereza, y cuando confía en el feliz resultado de lo que quiere con todas sus fuerzas.

Arnold

RESUMEN

“Producción de Intermediarios Reactivos de Nitrógeno en cultivo de células mononucleares de cabras expuestas al BCG de *M. bovis*, suplementadas con 1,25 Dihidroxitamina D3”

POR

Aurora Martínez Romero

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA

ANTONIO NARRO

UNIDAD LAGUNA

2006

ASESORES: Dr. Miguel Arenas Vargas

Dr. Rafael Rodríguez Martínez

Dr. Raúl Villegas Vizcaíno

Dr. Pedro Antonio Robles Trillo

Dr. Joel López Pérez

Dr. Rómulo Bañuelos Valenzuela

Diferentes estudios han planteado que la exposición a la vacuna bacilo Calmette-Guérin (BCG) de *M. bovis* altera la respuesta inmune específica, causando un incremento de la respuesta inmune mediada por células Th1 y una estimulación de la respuesta inmune Th2. Se ha planteado que el principio activo de la vitamina D, la 1,25 Dihidroxitamina D3 [1,25(OH)₂D3] ha resultado ser un potente regulador de la respuesta inmune. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la 1,25(OH)₂D3 sobre la inducción en la síntesis de

Intermediarios reactivos de nitrógeno (RNI) en cabras expuestas al BCG de *M. bovis*. Se planteó un estudio de tipo experimental, longitudinal y comparativo. Se seleccionaron 12 animales de ganado caprino raza *sannen*, de 20 a 24 meses de edad. Se realizaron cinco muestreos, previo a la inoculación (cero días), 3, 7, 14 y 21 días después de aplicar los tratamientos. Se obtuvieron las células mononucleares por el método Ficoll-Hypaque. Los RNI, nitritos y nitratos (NO_2^- y NO_3^-) fueron cuantificados por ELISA. En el tratamiento, vacuna BCG de *M. bovis*, la concentración fluctuó entre 10.84 y 17.06 $\mu\text{M/l}$. Con la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, entre 13.93 a 25.38 $\mu\text{M/l}$. En el combinado, vacuna BCG+ $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, de 12.64 a 28.29 $\mu\text{M/l}$. La determinación de NO_3^- fue entre 17.77 y 64.27 $\mu\text{M/l}$, 20.94 a 57.35 $\mu\text{M/l}$ y de 16.41 a 80.94 $\mu\text{M/l}$, respectivamente. Estadísticamente, el efecto de variación de la concentración de NO_2^- y NO_3^- fue significativa ($P<0.01$) por el factor periodo y por el efecto de interacción tratamiento-periodo. La $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ estimuló la síntesis de NO_3^- indicando, que por sí sola es un buen modulador de la replicación micobacterial y en el tratamiento con la vacuna BCG de *M. bovis* incremento como resultado al tratamiento con $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. La exposición a la vacuna BCG de *M. bovis* con el tratamiento con $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ fue capaz de incrementar la respuesta NO_2^- y NO_3^- en los animales expuestos.

259 páginas

Palabras clave: Vacuna BCG de *M. bovis*, 1,25-Dihidroxitamina D3, nitritos, nitratos, cabras.

ABSTRACT

“Production of reactive nitrogen intermediates in mononuclear cell cultures
of *M. bovis* BCG-exposed goats, supplemented with
1,25-Dihydroxyvitamin D₃”

BY

Aurora Martínez Romero

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA

ANTONIO NARRO

UNIDAD LAGUNA

2006

ADVISERS: Dr. Miguel Arenas Vargas
Dr. Rafael Rodríguez Martínez
Dr. Raúl Villegas Vizcaíno
Dr. Pedro Antonio Robles Trillo
Dr. Joel López Pérez
Dr. Rómulo Bañuelos Valenzuela

Different studies have raised that the exhibition to the *M. bovis* bacillus Calmette-Guerin (BCG) vaccine alters the specific immune response, it causing an increase of the immune response mediated by Th1 cells and an stimulation of the immune response Th2. Has been considered that the active principle of vitamin D, the 1,25 Dihydroxyvitamin D₃ [1,25(OH)₂D₃], it has turned to be a powerful regulator of the immune response. The aim of this study was to evaluate the effect of the 1,25(OH)₂ D₃ on the induction in the synthesis of

reactive nitrogen intermediates (RNI) in *M. bovis* BCG-exposed goats. An experimental, longitudinal and comparative study was planned. Twelve animals of goat cattle 20-to 24-month-old *sannen* selected themselves. Five samplings were made, previous to the inoculation (zero days), 3, 7, 14 and 21 days after applying the treatments. The mononuclear cells by the Ficoll-Hypaque method were obtained. The RNI, nitrites and nitrates (NO_2^- and NO_3^-) were quantified by ELISA. In the treatment, BCG vaccine of *M. bovis*, concentration fluctuated between 10.84 and 17.06 $\mu\text{M/l}$. With 1,25(OH)₂ D3, between 13.93 to 25.38 $\mu\text{M/l}$. In combined, BCG vaccine+1,25(OH)₂ D3, from 12.64 a 28.29 $\mu\text{M/l}$. Determination of NO_3^- was between 17.77 and 64.27 $\mu\text{M/l}$, 20.94 to 57.35 $\mu\text{M/l}$ and from 16.41 to 80.94 $\mu\text{M/l}$, respectively. Statistically, variation effect of the concentration of NO_2^- and NO_3^- was significant ($P < 0.01$) by the factor period and the effect of interaction treatment-period. The 1,25(OH)₂ D3 stimulated the NO_3^- synthesis indicating, that by itself it is a good modulator of the micobacterial replication and in the treatment with *M. bovis*-BCG vaccine increased like result to the treatment with 1,25(OH)₂ D3. The exhibition to *M. bovis*-BCG vaccine with the treatment with 1,25(OH)₂ D3 was able to increase answer NO_2^- and NO_3^- in exposed animals.

259 pages

Key words: *M. bovis*-BCG vaccine, 1,25 Dihydroxyvitamin D3, nitrites, nitrates, goats.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	IV
DEDICATORIA	VI
PREFACIO	VII
RESUMEN	XI
ABSTRACT	XIII
ÍNDICE	XV
ÍNDICE DE CUADROS	XVII
ÍNDICE DE FIGURAS	XVIII
LISTA DE ABREVIATURAS	XX
CAPÍTULO I	1
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO II	12
REVISIÓN DE LITERATURA	12
<i>Composición de la micobacteria</i>	12
<i>Latencia y reactivación de Mycobacterium</i>	23
<i>Respuesta inmune frente a Mycobacterium</i>	27
<i>Células presentadoras de antígenos (APC)</i>	34
<i>Mecanismo de destrucción a través de intermediarios reactivos de nitrógeno (RNI) y óxido nítrico (NO)</i>	36
<i>Función de la respuesta inmune en la producción de óxido nítrico (NO)</i>	41
<i>Mecanismo de sobrevivencia de Mycobacterium en macrófagos</i>	47
<i>Interleucinas (IL)</i>	53
<i>Receptor Toll-like (TLR)</i>	57
<i>Complemento (C') y sus receptores</i>	60
<i>Opsoninas y colectinas</i>	63
<i>Inmunoglobulinas (Ig's) y sus receptores</i>	66
<i>Linfocitos T CD4+/CD8+</i>	68
<i>Interferón-gamma (IFN-γ)</i>	75
<i>Transformación blastoide de linfocitos</i>	80
<i>Mecanismo de acción de la inmunidad inducida por la vacuna BCG</i>	82
<i>Métodos de diagnóstico de tuberculosis</i>	89
<i>Baciloscopia</i>	90
<i>Análisis inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA)</i>	91
<i>Prueba cutánea de la tuberculina (Mantoux)</i>	95
<i>Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)</i>	96
<i>Citometría de flujo</i>	100
<i>Otras estrategias de diagnóstico para tuberculosis</i>	102
<i>Consideraciones bioéticas</i>	110
<i>Tratamiento para tuberculosis</i>	111
<i>Síntesis de la 1,25-Dihidroxitamina D3 y sus receptores</i>	119
<i>La vitamina D y el sistema inmune</i>	127
<i>La vitamina D como agente quimiopreventivo contra diversas enfermedades</i>	136

<i>La vitamina D y su efecto en la tuberculosis</i>	143
<i>La 1,25-Dihidroxitamina D3 regula la liberación de intermediarios reactivos de nitrógeno</i>	146
CAPÍTULO III	151
MATERIALES Y MÉTODOS	151
<i>Selección de animales</i>	151
<i>Tratamientos</i>	152
<i>Muestreo</i>	152
<i>Exposición a la vacuna BCG de Mycobacterium bovis</i>	153
<i>Tratamiento con 1,25 dihidroxivitamina D3</i>	153
<i>Procedimiento para la obtención de las células mononucleares a partir de sangre total por el</i> <i>metodo de Ficoll-Hypaque</i>	153
<i>Viabilidad Celular</i>	155
<i>Transformación Blastoides de Linfocitos</i>	156
<i>Congelación y descongelación de células mononucleares</i>	157
<i>Detección y cuantificación de intermediarios reactivos de nitrógeno (RNI) (NO₂⁻/NO₃⁻) por ELISA</i>	157
<i>Análisis estadístico</i>	159
CAPÍTULO IV	160
RESULTADOS.....	160
<i>Datos generales de la población en estudio</i>	160
<i>Niveles de intermediarios de nitrógeno reactivo (RNI): nitratos (NO₃⁻) y nitritos (NO₂⁻)</i>	160
CAPÍTULO V	170
DISCUSIÓN	170
REFERENCIAS.....	181
GLOSARIO DE TÉRMINOS	208
ANEXOS	231

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1.	Efecto de la variación de tratamientos en cuanto a la determinación de Nitritos (NO_2^-) en macrófagos.....	162
Cuadro 2.	Efecto de la variación de tratamientos en cuanto a la determinación de Nitratos (NO_3^-) en macrófagos.....	162
Cuadro 3.	Efecto de la variación de tratamientos en cuanto a la determinación de Nitratos (NO_3^-) en sobrenadantes de cultivo.....	165
Cuadro 4.	Efecto de la variación de tratamientos en cuanto a la determinación de Nitratos (NO_3^-) en sobrenadantes de cultivo con el estimulante LPS.....	166
Cuadro 5.	Efecto de la variación de tratamientos en cuanto a la determinación de Nitritos (NO_2^-) en sobrenadantes de cultivo con el estimulante LPS.....	168

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Incidencia de tuberculosis bovina en México.....	6
Figura 2.	Estados y regiones del país en donde se mantenía bajo control y erradicación la TBB hasta 1998.....	7
Figura 3.	Clasificación de los estados o regiones por el departamento de agricultura de los Estados Unidos (USDA) en relación a la tuberculosis bovina.....	9
Figura 4.	Estructura de la pared celular de <i>Mycobacterium</i>	20
Figura 5.	Fases de la infección con <i>M. tuberculosis</i>	33
Figura 6.	Reacción catalizada por óxido nítrico sintasa (NOS). La reacción involucra la formación del intermediario N-hidroxil-L-arginina. Una parte de NADPH es consumido por el NO formado.....	45
Figura 7.	Fotobiogénesis y mecanismo de síntesis de la forma activa de la 1,25-Dihidroxitamina D3.....	121
Figura 8.	Obtención de células mononucleares de sangre periférica.	154
Figura 9.	Medias de cuadrados mínimos y errores estándar de la concentración de nitritos en cultivo de células (macrófagos) al aplicar diferentes tratamientos para incrementar la respuesta del sistema inmune en cabras...	163
Figura 10.	Medias de cuadrados mínimos y errores estándar de la concentración de nitratos en cultivo de células (macrófagos) al aplicar diferentes tratamientos para incrementar la respuesta del sistema inmune en cabras...	164
Figura 11.	Medias de cuadrados mínimos y errores estándar de la concentración de nitratos en sobrenadantes de cultivo al aplicar diferentes tratamientos para incrementar la respuesta del sistema inmune en cabras.....	166
Figura 12.	Medias de cuadrados mínimos y errores estándar de la concentración de nitratos en sobrenadantes de cultivo, con el estimulante LPS al aplicar diferentes tratamientos para incrementar la respuesta del sistema inmune en cabras.....	167

Figura 13. Medias de cuadrados mínimos y errores estándar de la concentración de nitritos en sobrenadantes de cultivo, con el estimulante LPS al aplicar diferentes tratamientos para incrementar la respuesta del sistema inmune en cabras.... 168

LISTA DE ABREVIATURAS

Ab	Anticuerpo (antibody)
ADN	Ácido desoxiribonucleico (desoxiribonucleic acid-DNA)
AFB	Bacilo ácido resistente (acid fast bacilli)
AG	Arabinogalactana (arabinogalactan)
Ag	Antígeno (antigen)
AHR	Hipersensibilidad de la vía aérea (airway hypersensitivity-responsiveness)
AIDS	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida-SIDA (acquired immunodeficiency syndrome)
AM	Arabinomanana (arabinomannan)
APC	Célula presentadora de antígeno (antigen-presenting cells)
AraLAM	Lipoarabinomanana con unidades de arabinosa- ara-lipoarabinomanana (ara-lipoarabinomannan)
ART	Terapia antiretroviral (anti-retroviral therapy)
ATP	Adenosin trifosfato (adenosine triphosphate)
BCG	Bacilo Calmette-Guérin (bacillus Calmette-Guérin)
BCG EFD	Bacilo Calmette-Guérin liofilizado con frío (extended freeze-dried bacille Calmette-Guérin)
BCG HK	Bacilo Calmette-Guérin desactivado con calor (heat-killed bacille Calmette-Guérin)

C'	Complemento (complement)
C1q	Fracción C1q del Complemento (Complement C1q fraction)
cAMP	Adenocina monofosfato cíclica (cyclic adenosine monophosphate)
CD	Grupo de diferenciación- conjunto de diferenciación celular (ligando de Fas) (cluster of differentiation)
CFSE	éster succinimidilcarboxifluoresceína (ester succinimidilcarboxyfluoresceína)
β -CK	Quimioquinas- <i>beta</i> (quimioquinas- <i>beta</i>)
COX	Enzima ciclooxygenasa (cyclooxygenase enzyme)
CR	Receptor "n" del complemento (Complement-n-receptor)
CSF	Factor estimulante de colonias (stimulating factor colony)
DAT	2,3-di-O-acetiltrealosa (2,3-di-O-acetiltrehalose)
DCs	Células dendríticas (dendritic cells)
DOTS	Tratamientos Directamente Supervisados de Corta Duración (directly observed therapy shortcourse)
DR	Repetición corta directa (direct short repeticion)
DRE-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa-elemento repetitivo doble (double repetitive element polymerase chain reaction)
DTH	Hipersensibilidad tipo retardada (delayed-type hipersensitivity)
ELISA	Análisis inmunoabsorbente ligado a enzimas (enzyme-linked immunosorbent assay)
ELISPOT	Análisis inmunospot ligado a enzimas (enzyme-linked immunospot)
EMB	Etambutol (ethambutol)

ESAT	Prueba antigénica secretoria primaria (early secretory antigenic target-secretion system)
Fc	Originalmente el fragmento cristizable de la inmunoglobulina; en la actualidad porción no Fab de una inmunoglobulina o fragmento cristalino
FcRs	Receptor para el fragmento Fc (Fc receptor)
FDA	Administración de alimentos y drogas (Food and Drug Administration)
FSC	Dirección de la luz incidente (Forward scatter)
GM	Granulocito-macrófago (granulocyte-macrophage)
GM-CSF o G-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocito-macrófago (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor)
GPI	Glicosilfosfatidilinositol (glycophosphatidylinositol)
GPL	Lípido glicopéptido (glycopeptid lipid)
HAART	terapia antiretroviral altamente activa (highly active antiretroviral therapy)
HPLC	Cromatografía de líquidos de alto rendimiento (high performance liquid chromatography)
ICAM	Molécula de adhesión intercelular (intercellular adhesion molecule)
IDT	Prueba intradérmica (intracutaneous test)
IFN- γ	Interferón- <i>gamma</i> (<i>gamma</i> -interferon)
IFN- γ R	Receptor de interferón- <i>gamma</i> (<i>gamma</i> -interferon receptor)

Ig's	Inmunoglobulinas (immunoglobulins)
IgG	Inmunoglobulina G (<i>gamma</i>) (inmunoglobulina G)
HIV	Virus de la inmunodeficiencia humana-VIH (human immunodeficiency virus)
IL	Interleucina (interleukin)
IL-12R	Receptor de interleucina-12 (Interleukin-12 receptor)
IM	Indometicina (indomethacin)
i.n.	Intranasal
INH	Isoniazida (isoniazid)
INIFAP	Instituto Nacional de Investigaciones Forestales (National Institute of Forest Investigations)
iNOS	Sintetasa de óxido nítrico inducible (inducible nitric oxide synthase)
ITAM	Motivos de activación de inmunorreceptores basados en tirosina (immunoreceptor tyrosine-based activation motifs)
ITIM	Motivos de inhibición de inmunorreceptores basados en tirosina (immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs)
i.v.	Intravenosa (intravenous)
LAM	Lipoarabinomanana (lipoarabinomannan)
LCR	Reacción en cadena de la ligasa (ligase chain reaction)
LDL	Lípidos de baja densidad
Linfocitos B	Linfocitos B (B-lymphocyte)
Linfocitos T	Linfocitos T (T-lymphocyte)
LM	Lipomanana (lipomannan)

LPS	Lipopolisacárido (endotoxina) (lipopolysaccharide –endotoxin)
LTBI	Infección latente de tuberculosis
MAC	Complejo <i>Mycobacterium avium</i> (<i>Mycobacterium avium</i> complex)
ManLAM	Lipoarabinomanana con unidades de manosa
MAPc	Proteína cinasa activada por mitógenos (mitogen-activated protein kinase)
m-ARN	Ácido ribonucleico-mensajero (ribonucleic acid-messenger – mRNA)
MDR	Cepas resistentes a múltiples medicamentos (multidrug resistant strains)
MGIT®	Método fluorescente (fluorescent Bactec MGIT)
MHC	Complejo principal de histocompatibilidad (major histocompatibility complex)
MIC	Concentración mínima inhibitoria-CMI (minimum inhibitory concentration)
m-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa-multiplex (multiplex-polymerase chain reaction)
MR	Receptor manosa (mannose receptor)
NF-κB	Factor nuclear de transcripción (transcription nuclear factor)
NK	Células citocidas naturales (killer cells, natural)
NO	Óxido nítrico(nitric oxide)
NOS	Oxido nítrico sintasa (nitric oxide synthase)
OMS	Organización Mundial de la Salud (World Health Organization-WHO)

PAMPs	Patrones moleculares asociados al patógeno (pathogen-associated molecular patterns)
PBMC	Células mononucleares de sangre periférica (peripheral blood mononuclear cells)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (polymerase chain reaction)
PCR-tiempo real	Reacción en cadena de la polimerasa-tiempo real (real-time polymerase chain reaction assay)
PGE ₂	Prostaglandina E ₂ (prostaglandin E ₂)
PHA	Fitohemaglutinina (phytohemagglutinin)
PPD	Derivado proteico purificado (purified protein derivatives)
PZA	Pirazinamida (pyrazinamide)
QFT®	QuantiFERON-TB® Test
RFLP	Fragmentos de restricción de longitud polimorfa (restriction fragment length polymorphism)
RIF	Rifampicina (rifampicin)
Rif	Rifampin (rifampin)
RNI	Intermediarios reactivos de nitrógeno (reactive nitrogen intermediates)
ROI	Intermediarios reactivos de oxígeno (reactive oxygen intermediates)
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa transcriptasa reversa (reverse transcriptase-polymerase chain reaction)
s.c.	Subcutánea (subcutaneous)
SDS	Dodecil sulfato de sodio (sodium dodecyl sulfate)

SP-A	Proteína surfactante-A (surfactant protein-A)
SP-D	Proteína surfactante-D (surfactant protein-D)
SRs	Receptor <i>Scavenger</i> (<i>Scavenger</i> receptor)
SSC	Luz dispersada en ángulo recto (Side scatter)
STAT	Traductor de señales y activador de la transcripción (signal transducer and activator of transcription)
TB	Tuberculosis (tuberculosis)
TBB	Tuberculosis bovina (bovine tuberculosis)
Tc	Linfocito T citotóxico (T-lymphocyte cytotoxic)
TDM	Dimicolato-6,6-trealosa (Trehalose-6,6-dimicolate)
TCR	Receptor de célula T (T cell receptor)
TGF-β	Factor transformante- <i>beta</i> (transforming growth factor-β)
Th 1	Célula T cooperadora (subgrupo 1) o subpoblación de células T colaboradoras [T-helper cell (subset 1)]
Th 2	Célula T cooperadora (subgrupo 2) o subpoblación de células T colaboradoras [T-helper cell (subset 2)]
TLRs	Receptor Toll-like (Toll-like receptors)
TNF α	Factor de necrosis tumoral- <i>alfa</i> (tumor necrosis factor- <i>alpha</i>)
TST	Prueba de la tuberculina (tuberculin skin test)
VD3	Vitamina D3
VDR	Receptor de la Vitamina D (D vitamin receptor)
1,25(OH) $_2$ D3	1,25 Dihidroxitamina D3 (1,25 Dihydroxyvitamin D3)

CAPÍTULO I

Introducción

La Tuberculosis (TB) sigue siendo a nivel mundial, uno de los principales problemas de salud, resulta de la infección con algún bacilo tuberculoso incluido dentro del género *Mycobacterium*, *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti* y *M. canettii*.

M. bovis a diferencia de *M. tuberculosis* es la especie más común en el ganado bovino y en los animales silvestres, éstos al ser reservorios de *M. bovis* han hecho mas difícil su erradicación (Cornejo, Sahagun-Ruiz *et al.* 1998; Waters, Nonnecke *et al.* 2001; Parsons, Brosch *et al.* 2002; Waters, Nonnecke *et al.* 2003; Waters, Palmer *et al.* 2003). *M. tuberculosis* es el agente causal de TB en humanos (Palmer, Waters *et al.* 2006; Tufariello, Mi *et al.* 2006).

La TB es una enfermedad infecciosa aguda o crónica que resurgió significativamente en muchas partes del mundo, por la coinfección con el virus de inmunodeficiencia humana (HIV), la aparición de la resistencia a los fármacos antituberculosos, la inmigración desde zonas de alta prevalencia y las deficiencias en las medidas de salud pública (Davies y Grange 2001; Hasegawa, Miura *et al.* 2002; Gago, Kurth *et al.* 2006).

Cada año, se estima que dos millones de infantes están expuestos *in útero* al HIV tipo 1 (Van Rie, Madhi *et al.* 2006).

El complejo *M. tuberculosis* incluye, entre otros miembros, el agente causal de la Tuberculosis bovina (TBB), esta enfermedad de animales domésticos

contribuye significativamente al riesgo de la salud humana, principalmente en países en vías de desarrollo (Vitale, Reale *et al.* 2006). *M. bovis* y el agente causal de la TB caprina, *Mycobacterium caprae*, subespecie que, aunque primero fue aislada de las cabras, se ha determinado que no es restringida solo para ganado caprino (Aranaz, Cousins *et al.* 2003).

La TB afecta al ser humano y a una gran variedad de animales domésticos y silvestres causando grandes pérdidas económicas (Kanaujia, Motzel *et al.* 2004; Aldwell, Baird *et al.* 2005).

En 1921, como medida preventiva, Calmette y Guérin (Dietrich, Mollenkopf *et al.* 2002), desarrollaron una vacuna viva contra la TB causada por el patógeno bacterial intracelular *M. tuberculosis*; esta vacuna, conocida como bacilo Calmette-Guérin (BCG) es una cepa atenuada de *M. bovis* desarrollada a través de una técnica simple sometiendo a una cepa virulenta de *M. bovis* a un cultivo seriado *in vitro* durante 13 años (Collins, Wilson *et al.* 2002) y ha sido usada contra la TB en todo el mundo (Bastos, Dellagostin *et al.* 2002); además, es la única vacuna disponible contra la TB (McKinney, Honer zu Bentrup *et al.* 2000; Boon, Li *et al.* 2001; Brill, Li *et al.* 2001; Breuss, Helbling *et al.* 2002; Kennedy, Welsh *et al.* 2002).

El *Mycobacterium* es un problema global de salud pública, su detección y monitoreo son esenciales para controlar su diseminación (Awomoyi, Marchant *et al.* 2002; Taggart, Hill *et al.* 2004). Por lo que, es prioridad internacional mejorar la vacuna para combatir la enfermedad (Bardarov, Bardarov Jr *et al.* 2002).

Actualmente, el resurgimiento de la TB ha intensificado los esfuerzos de investigaciones dirigidas a examinar la defensa del hospedero y los mecanismos patogénicos de la infección de *M. tuberculosis*, el cual es el agente etiológico primario de la TB y que causa aproximadamente de 7-8 millones de nuevos casos al año, siendo responsable de dos millones de muertes anualmente (Caccamo, Barera *et al.* 2003; Capuano, Croix *et al.* 2003; Casali, White *et al.* 2006).

Los individuos con infección latente de TB (LTBI) tienen un riesgo de 2 a 23% de desarrollar la reactivación de la enfermedad más tardíamente (Flynn, Scanga *et al.* 1998; Miyazaki, Chaisson *et al.* 1999; Ameixa y Friedland 2002; Schluger 2002), esta población constituye un reservorio significativo de TB, por lo que se estima que un tercio de la población tiene LTBI (Hasegawa, Miura *et al.* 2002; Junqueira-Kipnis, Turner *et al.* 2004; Lewinsohn, Gennaro *et al.* 2004).

La mayoría de la población LTBI es asintomática y son no contagiosos; sin embargo, representan reservorios importantes para la reactivación de la enfermedad (Tufariello, Mi *et al.* 2006) y para individuos inmunocomprometidos, el riesgo de reactivación representa de 2 a 23%.

De hecho, identificar individuos con la LTBI sería crucial para eliminar la TB porque se daría un tratamiento específico antes de que se desencadene la TB (Avgustin, Kotnik *et al.* 2005). La LTBI es asintomática, pero es un riesgo de contraer la enfermedad en el futuro (Wilkinson, Kon *et al.* 2006). La identificación de estos individuos es un paso esencial para controlar y eliminar la TB (Porsa, Cheng *et al.* 2006).

En el año 2001, en la isla de Taiwan se reportaron 14,486 casos de LTBI, dando una proporción de 64.9 por 100,000 habitantes (Chen 2002). No obstante, de haber implementado desde hace más de 50 años el Programa Nacional de TB (Jou, Chiang *et al.* 2005).

Estudios clínicos patológicos han mostrado que el lóbulo apical del pulmón en humanos sin TB activa contiene el bacilo de Koch, este dato apoya el concepto de que la TB crónica en adultos, particularmente el adulto mayor, es causada por la reactivación del bacilo viable en el foco persistente en el ápice pulmonar (Flynn, Scanga *et al.* 1998; Mukherjee, Daifalla *et al.* 2004).

Si no se desarrollan esfuerzos para controlar la TB, para el año 2020 aproximadamente habrá 1000 millones de nuevos casos, de los cuales morirán de 35 a 70 mil individuos en el mundo (Taggart, Hill *et al.* 2004). Durante el período de 1994 a 2003 se han descrito las características epidemiológicas de casos no cerrados de TB en el área de las Américas (Brudey, Filliol *et al.* 2006). Para poder controlarla, se debe diagnosticar la presencia de las células T, ya que son las primeras en determinar el curso de la enfermedad o en detener la infección (Lazarevic, Myers *et al.* 2003); aunque, la destrucción del bacilo es difícil en periodos cortos de tiempo (Cardona, Amat *et al.* 2005), si se hace un diagnóstico rápido, temprano, y preciso será un elemento muy importante como medida de salud global para el control de la TB (Fulton, Reba *et al.* 2002; Avgustin, Kotnik *et al.* 2005).

La TB es una enfermedad zoonótica, que se puede adquirir por vía digestiva al ingerir leche u otros productos lácteos sin pasteurizar (Coker, McKee *et al.* 2006). En México, la prevalencia de TB es alta (45 casos por 100,000

habitantes) y ahora esta prevalencia está combinada con la proporción resistencia-medicamentos (Sifuentes-Osornio, Bobadilla-del-Valle *et al.* 2003). México es exportador de carne y ganado en pie, lo cual representa un fuerte ingreso a los productores nacionales.

Cuando se detectan animales infectados se toman medidas sanitarias que impiden el paso de animales a los EUA. Esto trae como consecuencia descontrol en el mercado interno, disminución de precios y sobrepastoreo. Por otra parte, la Ley Sanitaria indica que los animales detectados con TB deben ser sacrificados.

En la batalla contra la TB existe la posibilidad de regular la respuesta inmune del hospedero a fin de conseguir un mejor control de la enfermedad, a partir de la acción de algunas citocinas. Un diagnóstico oportuno señalaría la presencia del bacilo en su periodo de latencia, permitiendo proporcionar un tratamiento adecuado antes de que se desencadene la enfermedad, ya que el incremento a nivel mundial de las cepas resistentes a múltiples medicamentos (MDR) representa una amenaza para los programas de control de la TB (Mistry, Iyer *et al.* 2002).

Sin embargo, se siguen haciendo estudios acerca de la resistencia a los antimicobacterianos en donde se determinó que la resistencia a la isoniazida (INH) y la rifampicina (RIF) han mostrado una declinación y estabilidad durante el tiempo que duró el estudio (Al-Tawfiq, Al-Muraikhy *et al.* 2005), mientras que, es importante reconocer que aún siguen las investigaciones concernientes al surgimiento de nuevos medicamentos antituberculosos, solos o combinados

con la dosificación y tiempos adecuados para su efectividad (Launay-Vacher, Izzedine *et al.* 2005).

Según datos del Servicio nacional de sanidad, inocuidad y calidad agroalimentaria (SENASICA), la Dirección general de salud animal (DGSA) y la Dirección de vigilancia epidemiológica, el 10 de Diciembre de 2004 reportaron la situación zoonosanitaria en los estados de la República Mexicana e informó que la TBB en Coahuila estaba en “erradicación” desde el 20 de julio de 1998 y en Durango se reportó como área en “control”.

En la **figura 1**, se reporta la incidencia de TBB en México durante los años 1996-2003.

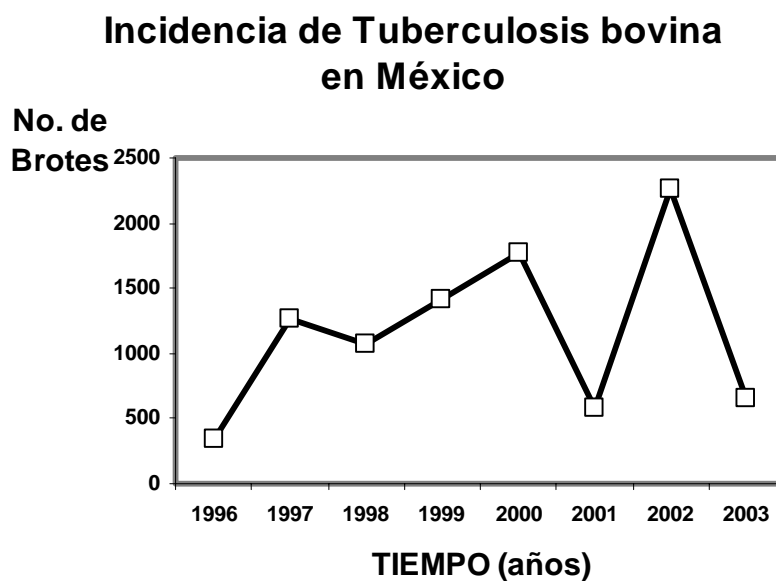


Figura 1. Incidencia de tuberculosis bovina en México.

(DIVE-DGSA® 2004)

El objetivo de la dirección general de salud animal es controlar y erradicar la TBB del territorio nacional, en la **figura 2** se visualiza a nivel nacional los estados y regiones en donde se mantenía bajo control y erradicación la TBB (NOM-031-ZOO-1995 Campaña Nacional contra la TBB. Publicada en el Diario Oficial de la Federación el 8 de marzo de 1996 y modificada el 27 de agosto de 1998).

Para lo cual, ha establecido las estrategias siguientes: La estrategia en zonas de baja prevalencia (ganado de carne) son: el diagnóstico y sacrificio de animales positivos, la cuarentena de los hatos infectados, la vigilancia epidemiológica en rastros y mataderos y la constatación de hatos libres. En zonas de mediana y alta prevalencia (ganado lechero y doble propósito) son: el diagnóstico, sacrificio o segregación de reactores, cuarentena de predios positivos, vigilancia en rastros, aplicación de medidas de bioseguridad y el manejo de hatos infectados.



Figura 2. Estados y regiones del país en donde se mantenía bajo control y erradicación la TBB hasta 1998.

SENASICA® 2006 Todos los Derechos Reservados

contacto@senasica.sagarpa.gob.mx

El día 26 de mayo de 2005 se dio a conocer a los ganaderos de Durango el cierre de fronteras por las autoridades del Departamento de agricultura de los Estados Unidos (USDA), la situación ganadera local enfrentó serios problemas no sólo económicos, sino de tipo administrativo, en la **figura 3** se observa la clasificación de los estados o regiones por el USDA en relación a la TBB.

Sin embargo, la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, el 12 de Diciembre de 2005 reportó que en la región lagunera la TBB estaba bajo “control”.

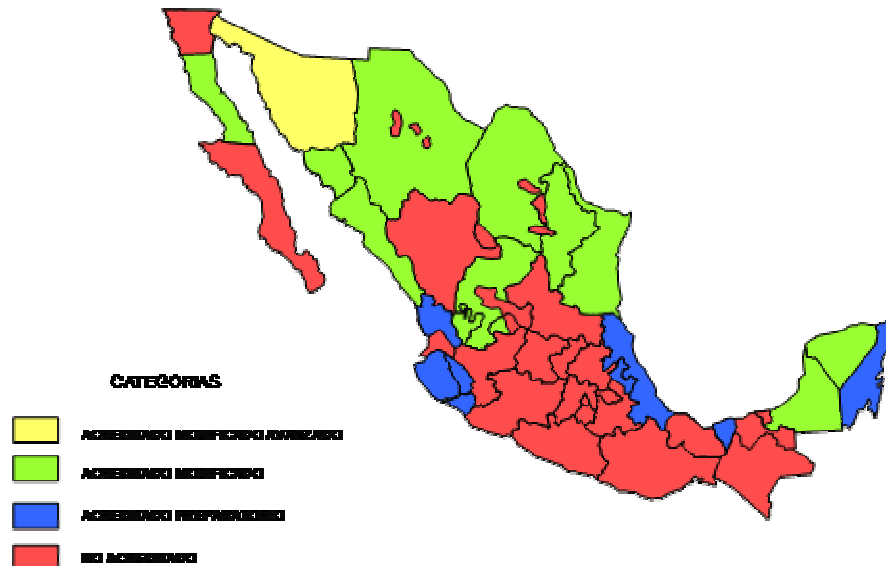
En el mes de febrero de 2006 SAGARPA publicó la situación zoonosanitaria en los estados de la República Mexicana reportando a los estados de Coahuila y Durango como zonas en “erradicación” en TBB.

El 3 de octubre salió un comunicado de la Secretaría de agricultura y ganadería de Durango, que “hay en un 65% de posibilidades de recuperar estatus ganadero y exportar a Estados Unidos”.

El 9 de octubre la Unión ganadera regional de Coahuila alertó que el USDA planea frenar la importación de ganado bovino por la frontera de Coahuila, al detectar animales infectados de TB.

Tuberculosis bovina

Clasificación de los Estados o Regiones por el
Departamento de Agricultura de los Estados Unidos



Clasificación de los Estados o Regiones por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) en relación a Tuberculosis bovina

Estados o Regiones de origen	Clasificación de USDA	Requisitos de movilización para exportación a los EUA de Bovinos Castrados
Norte de Sonora	Acreditado Modificado Avanzado	No requiere pruebas de tuberculina
Sur de Sonora Aguascalientes (A) Baja California (A) Campeche (A) Coahuila (A) Chihuahua (A)	Jalisco (A1)-Zacatecas (A) Nuevo León(A) Sinaloa Tamaulipas Yucatán	Requiere prueba de tuberculina al lote a movilizar
Colima Jalisco (A2) Jalisco (A3) Nayarit (A)	Veracruz (A) Puebla (A1, A2) Quintana Roo Tabasco (A)	Acreditado Preparatorio
Requiere prueba de tuberculina al hato de origen y al lote a movilizar.		
Aguascalientes (B) Baja California (B) Baja California Sur Campeche (B) Chiapas Chihuahua (B1, B2, B3) Coahuila (B1 y B2) Coahuila (La Laguna) Distrito Federal Durango Durango (La Laguna) Guerrero Guerrero Hidalgo	Jalisco (B) Nayarit (B) Nuevo León(B) México Michoacán Morelos Oaxaca Puebla (B) Querétaro San Luis Potosí Tabasco (B) Tlaxcala Veracruz (B) Zacatecas (B)	No Acreditado
Movilización para exportación solo a sacrificio inmediato		

Figura 3. Clasificación de los estados o regiones por el departamento de agricultura de los Estados Unidos (USDA) en relación a la tuberculosis bovina.

El 23 de octubre de 2006, David Avitia Torres, presidente de la Unión ganadera regional de Durango (UGRD) informó que las pérdidas que sufrió el sector ganadero de Durango, por el cierre de fronteras americanas durante un año y cinco meses, alcanzaron una cifra de 400 millones de pesos y alrededor de 250,000 cabezas de ganado que no pudieron ser comercializados.

Ahora la UGRD, en coordinación con el gobierno del estado, la SAGARPA y el Gobierno federal, vigilarán de manera estrecha los envíos que se hagan del estado de Durango hacia el vecino país del norte. Las estrategias de la campaña son las siguientes:

1. Difusión y promoción de la campaña.
2. Capacitación de personal.
3. Diagnóstico de campo (Probar al 100 % de los hatos).
4. Aplicación de cuarentenas en hatos infectados.
5. Eliminación e indemnización de reactores.
6. Inspección en rastros para confirmar y detectar nuevos casos.
7. Control de la movilización.
8. Reconocimiento y protección de regiones de baja prevalencia.
9. Certificación de hatos libres de la enfermedad.
10. Seguimiento epidemiológico.

La TBB ha resultado costosa para los productores de ganado así como también para las agencias reguladoras gubernamentales, por lo que buscando alternativas de diagnóstico, en medicina veterinaria se utiliza el ensayo de proliferación de linfocitos *in vitro* en respuesta a un mitógeno o a un antígeno específico, para evaluar la inmunidad mediada por células en diversas especies

de animales domésticos (Waters, Palmer *et al.* 2003), uno de los indicadores inmunológicos que se están utilizando es la producción de óxido nítrico (NO), interferón-*gamma* (IFN- γ) e interleucinas (IL) (Waters, Palmer *et al.* 2002).

Por lo que, es imprescindible realizar el diagnóstico de la LTBI mediante moduladores inmunológicos para poder aislar a los animales afectados y poder eliminarlos antes de que se desencadene la enfermedad y lleguen a diseminar al agente etiológico de la TB.

Al no erradicarse la TBB existe el riesgo de darse la infección en humanos, el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) hizo una estimación del número de casos y muertes de TB pulmonar, por lo que se reportaron 499 casos en el año 2004 y 324 en el 2005; en el año 2004 la SSA reporta 1,980 casos de TB humana y 1,570 casos en el 2005; según la vigilancia epidemiológica de los casos acumulados hasta la semana 7 del año 2005.

CAPÍTULO II

Revisión de Literatura

Composición de la micobacteria

Mycobacterium es un género de bacterias aerobias, muchas especies de las cuales pueden sobrevivir en el interior de los fagocitos y provocar enfermedad. La pared micobacteriana se localiza por debajo de la cápsula separada por un espacio periplásmico. La característica química más sorprendente de las micobacterias, es su alto contenido de lípidos (20 y 40% de su peso seco), en pared celular tiene 60% de lípidos de su peso seco, esto explica el carácter hidrófobo de los organismos y la hace refractaria al ataque por hidrólisis enzimática, por lo que la pared celular define las características de la micobacteria (Chen, German *et al.* 2006).

Es una efectiva barrera frente a muchos de los agentes antimicrobianos y está constituida por el complejo macromolecular formado por ácidos micólicos-arabinogalactano-peptidoglucano (mAGP). Una clave importante para los eventos de la micobacteria patógena es la estructura inusual de la pared celular y su interacción con el sistema inmune (Sharma, Gupta *et al.* 2006).

La envoltura de la bacteria consta de tres componentes principales: una membrana plasmática unida mediante enlace covalente al ácido micólico, un complejo de peptidoglucanos llamado proteína cinasa activada por mitógenos (MAPc) que son moléculas unidas a la arabinogalactana (AG) y una cápsula rica en polisacáridos (Monahan, Betts *et al.* 2001), esta superficie compleja de

la micobacteria le permite interactuar con diversos receptores de los macrófagos, lo que permite a la bacteria gran capacidad de adaptación a la sobrevivencia intracelular.

La envoltura celular de *Mycobacterium* es única y esta asociada con su patogeneicidad, tiene arabinogalactanmicolato covalentemente unido al peptidoglicano de la pared celular vía enlace fosfodiéster y un glicolípido libre llamado dimicolato trehalosa (TDM), el cual se acumula en la superficie celular (Takayama, Wang *et al.* 2005). *Mycobacterium* tiene proteínas ocultas que son una fuente rica de inmunógenos (Brodin, Majlessi *et al.* 2006), pero aún, muchos de ellos no se han entendido.

Esto provee a la célula de una capa densa de lípidos que protege al bacilo tuberculoso de químicos nocivos y del sistema inmune del huésped. Los ácidos micólicos son los constituyentes principales de la pared celular (Takayama, Wang *et al.* 2005) y son componentes muy importantes del patogénico *Mycobacterium*.

Los ácidos micólicos son ácidos grasos β -hidroxi con una cadena larga α -alkil. Ellos existen como una serie homóloga de ácidos grasos diferenciados por unidades de masa atómica 28 (unida al Carbono 2) y caracterizados por ácidos grasos hidrófobos de cadenas formadas por C_{54} a C_{63} con C_{22} a C_{24} . Han sido encontradas tres distintas clases estructurales de ácidos micólicos y son ácidos- α , metoxi y ceto-ácidos micólicos.

Los anillos ciclopropano de los ácidos micólicos contribuyen a la integridad estructural de la compleja pared celular, estos anillos protegen al bacilo del

stress oxidativo; por lo tanto, la estructura de los ácidos micólicos determina el grado de protección que *Mycobacterium* tiene en contra del medioambiente hostil del huésped.

La supresión de ceto-micolato permite la restricción en el desarrollo de este mutante en los macrófagos. Entonces, la distribución y la estructura fina de los ácidos micólicos determinan la virulencia del *Mycobacterium* (Takayama, Wang *et al.* 2005).

La síntesis de ácidos micólicos es el blanco de los medicamentos antituberculosos como INH, ethionamida y thiocarlida (Takayama, Wang *et al.* 2005), este dato sugiere que todas las reacciones sobre la vía de la síntesis y proceso de los ácidos micólicos son blancos viables para el descubrimiento de nuevos medicamentos antituberculosos.

Un lípido característico de las micobacterias conocido como “*cord factor*” es el factor cuerda o parte del ftiocerol dimicocerosato (DIM) que es un micósido identificado como *trehalosa 6,6-dimicolato*, el factor cuerda es la molécula mixta que se encuentra en la capa periférica de la envoltura y es el mayor componente de la pared celular característico del bacilo tubérculo es muy útil para el serodiagnóstico rápido de TB pulmonar.

Es abundante en todas las micobacterias patógenas. Recibe ese nombre porque en los cultivos, los microorganismos forman agregados semejantes a cordones. Esta molécula presenta pequeñas variaciones en ciertos grupos químicos, las que son características en las diversas especies de micobacterias y cepas. El factor cuerda esta formado por un complejo de tres macromoléculas: peptidoglicano, AG y micolatos.

En condiciones normales el factor cuerda estimula la actividad de la enzima que hidroliza al dinucleótido de nicotinamida y adenina (NADasa) en el hospedero, lo que trae como consecuencia la disminución de la cantidad de la coenzima NAD. Esta coenzima es común en las reacciones catabólicas de óxido-reducción y la ausencia de NAD interrumpe la cadena respiratoria en la mitocondria de las células.

El factor cuerda es inmunogénico y se ha intentado usarlo en la prevención de la TB; además, su naturaleza química favorece la inflamación crónica y ocasiona la formación de granulomas en el pulmón. El factor cuerda fue extraído de las cepas virulentas con éter de petróleo. El TDM ejerce efectos tóxicos y granulomagénicos en ratón, los glicolípidos y ceras, incluyendo ácidos micólicos y dimicocerosato ptiocerosol, resisten la degradación y acumulación en tejidos crónicamente infectados, de este modo se prolonga el efecto que ejerce en el sitio de la infección (Rhoades, Hsu *et al.* 2003).

La formación del granuloma es producto de una serie de mecanismos de la respuesta inmune que da por resultado una activación y diferenciación de los macrófagos, mediada principalmente por el factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- α), conteniendo la diseminación de la bacteria. El factor cuerda también se ha asociado a la inhibición de la fusión de los lisosomas con los fagosomas en los macrófagos, fenómeno que se considera clave para la sobrevivencia de *Mycobacterium* en los macrófagos.

Se ha evaluado si el anticord (anticuerpo del factor) es útil para el diagnóstico de TB ocular (Sakai, Matsuzawa *et al.* 2001). La trehalosa es la D-glucosa- α 1, 1',D-glucósido.

El DIM es una molécula que contiene trehalosa, es un ácido graso de 35 carbonos y tiene sustituciones con grupos metilos y dos ácidos grasos (ácidos micocerósicos). Esta molécula es característica de las cepas patógenas y forma una barrera que impide la permeabilidad en la envoltura de las micobacterias.

Entre los lípidos extraídos con disolventes orgánicos neutros se encuentran las ceras (ésteres de ácidos grasos con alcoholes) y los glucolípidos, denominados también micósidos (compuestos lípidos solubles y los cuales los lípidos y los carbohidratos se hallan enlazados por uniones covalentes). Las micobacterias presentan una gran diversidad de estructuras glicosiladas complejas con enlace de tipo O-glicosídico. Algunos de estos conjugados son de importancia estructural como el peptidoglicano y los polisacáridos. El primero es una molécula estructural y el segundo protege la bacteria de la lisis por el C'.

Los sulfolípidos de trehalosa o sulfátidos, son ácidos micólicos unidos al disacárido trehalosa, pero sustituidos por grupos sulfato. Se localizan en la periferia de la pared celular y parecen ser factores de virulencia, son moléculas que facilitan que la bacteria escape a la acción de los macrófagos inhibiendo la fusión del fagosoma con el lisosoma, lo cual puede explicar el éxito como parásitos intracelulares.

También, las micobacterias tienen la capacidad de producir cantidades significativas de amoniaco, el bacilo tuberculoso puede evadir el ambiente

tóxico dentro de la vacuola lisosomal, inhibiendo la formación del fagolisosoma y disminuyendo la potencia de las enzimas intralisosomales vía la alcalinización.

Dos enzimas que pertenecen al metabolismo del amoníaco, la ureasa micobacteriana y la glutamino sintetasa, han sido asociadas a la interrupción de la fusión fagolisosomal y a la sobrevivencia micobacteriana (Harth, Clemens *et al.* 1994; Harth y Horwitz 1999).

Los lípidos de la membrana externa son los componentes micobacterianos que interactúan con el hospedero, y afectan los enlaces hacia los receptores de los macrófagos, estos lípidos micobacterianos también propician la respuesta inflamatoria, los manósidos fosfatidilinositol y lipoarabinomanana (LAM) son detonantes de la producción de citocinas y quimiocinas (CK) de las células mononucleares (Rhoades, Hsu *et al.* 2003).

Un mecanismo de la pared celular es la arabinosilación de lipomanana (LM) a LAM, un lipoglicano de la pared celular que evade la respuesta proinflamatoria del huésped (Sharma, Gupta *et al.* 2006); esta arabinosilación, es catalizada por una arabinosiltransferasa codificada por el gen *embC*. Los lípidos de la pared celular están asociados a carbohidratos (glicolípidos), fosfolípidos glicosilados y carbohidratos complejos sustituidos con ácido micólico y péptidos. Las porciones glicosiladas de estas moléculas son importantes en la interacción con los componentes de la respuesta inmune innata y específica del hospedero.

La membrana celular tiene las características biológicas y bioquímicas de cualquier membrana, aunque en las micobacterias los derivados de los fosfolípidos se caracterizan por estar altamente glicosilados dando lugar a

moléculas como la LAM, que tiene un papel fundamental en la patogénesis de la TB.

Los sulfolípidos de trehalosa son los responsables de la tinción acidorresistente de las bacterias con el colorante rojo carbolfuscina, por lo que a estos microorganismos también se les llama bacilos acidorresistentes. Estos sulfolípidos se unen a los receptores “basurero” de clase A (ScR) o “receptores *scavenger*” en macrófagos, lo que favorece la entrada de la bacteria a la célula hospedera; además, evita la maduración del fagosoma del macrófago cuando esta infectado por la micobacteria porque inhiben a la proteína C cinasa y como consecuencia de esto, también se ve inhibida la producción de NO y de citocinas proinflamatorias (Tan y Parker 2003).

Los glicolípidos son trehalosas acetiladas son abundantes en la cápsula de las micobacterias y se clasifican en: fenoglicolípidos, glicopeptidolípidos y lipooligosacáridos (Draper 1998). El fenoglicolípidos tiene una porción sacarídica altamente inmunogénica y está presente en las cepas patógenas de micobacterias. Estas moléculas le proporcionan propiedades antigénicas en la cápsula de *Mycobacterium* y se asocian con la patogénesis de la TB; por esta razón se utilizan en el serodiagnóstico de la enfermedad.

Los glicopeptidolípidos son antígenos muy abundantes en la cápsula, presentan diferencias antigénicas entre especies de micobacterias. Están compuestas por moléculas de fenol-tiocerol esterificado con dos ácidos grasos multiramificados (micocerósico o tioceránico) y a diferencia de todos los anteriores, los residuos sacarídicos están O-metilados y asociados a la morfología lisa de algunas

cepas de micobacterias. Tienen un papel importante en la sobrevivencia intracelular de las micobacterias.

Se ha observado *in vivo* e *in vitro* que los glicopeptidolípidos inhiben la proliferación de células mononucleadas estimuladas con mitógenos. Los glicolípidos lipooligosacáridos son aquellos constituidos por ácidos grasos de cadena larga con un núcleo sacarídico de poliacil trehalosa y un alto contenido de manosa. La cantidad y tipo de residuos de carbohidratos dan lugar a una variedad de lipooligosacáridos capsular, siendo antigénicamente diferentes. Estas diferencias tienen valor taxonómico y diagnóstico (Brennan y Nikaido 1995).

La LAM es un componente de la pared celular micobacteriana altamente inmunogénico y puede estar asociado con la producción de NO en los macrófagos (Roach, Chatterjee *et al.* 1994). La pared celular atípica, otorga a *Mycobacterium* la resistencia a la deshidratación, a los ácidos y álcalis (**Figura 4**).

Los componentes micobacterianos LAM y el fenolicoglicolípidos-I son potentes destructores de los radicales de oxígeno (Chan, Fujiwara *et al.* 1989).

Los lipoglicanos del BCG propician la formación de citocinas inflamatorias y de Intermediarios reactivos de nitrógeno (RNI) en los macrófagos que han fagocitado las microesferas cubiertas de lípidos (Rhoades, Hsu *et al.* 2003).

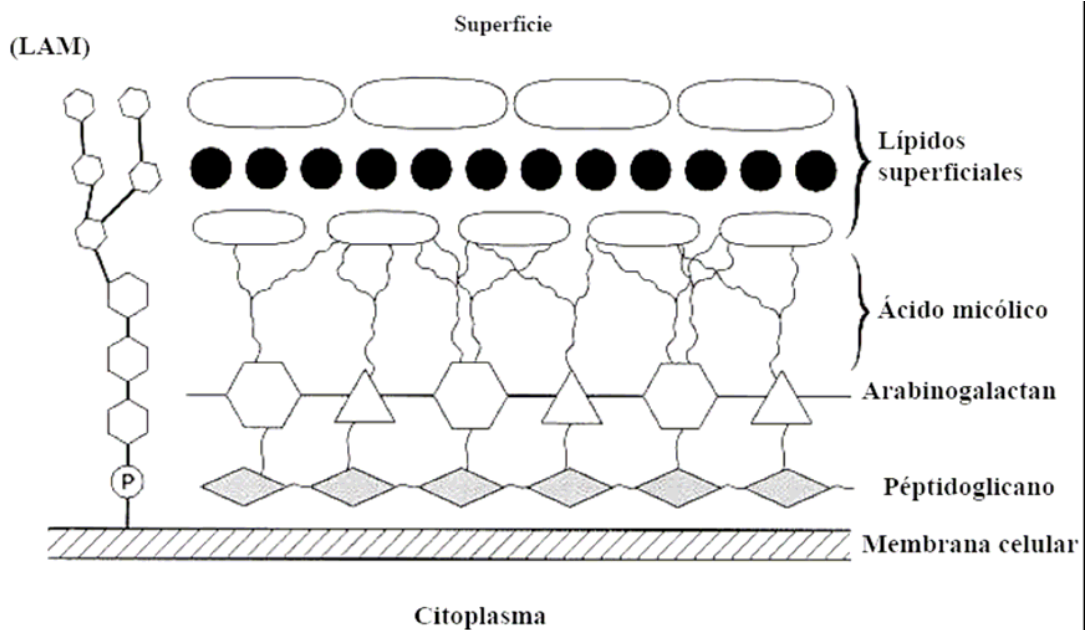


Figura 4. Estructura de la pared celular de *Mycobacterium*.

Otro micósido de interés es la *cera D* de elevado peso molecular, es un peptidoglucolípid, contiene ácidos micólicos y un glucopéptido, la mezcla de *cera D* y proteínas de bacilo tuberculoso induce una hipersensibilidad de tipo retardado a la tuberculina, mientras que la proteína sola es débilmente inmunogénica. La fracción fosfátida no purificada tiene la interesante propiedad de evocar una respuesta celular semejante a la del bacilo tuberculoso, incluyendo la necrosis caseosa (latín, *caseus*, «queso») en la que el tejido necrótico permanece semisólido con la consistencia de un queso, con el tiempo este tejido se vuelve fibroso o calcifica.

Hay evidencias que sugieren que el grupo de diferenciación celular (CD) CD14 requiere de la participación conjunta del receptor de manosa para producir una respuesta en macrófagos activados por la LAM de micobacterias (Ziegler-

Heitbrock y Ulevitch 1993). Además, existen diversos receptores en el macrófago con los que pueden actuar estas complejas moléculas glicosiladas, CD14 que es una proteína de membrana unida a un glicano con fosfatidilinositol que puede interactuar con un complejo con LAM con unidades de arabinosa (AraLAM) en el extremo terminal, unida a una molécula de CD14 soluble, estas dos moléculas a su vez se unen a proteína soluble análoga al CD14 llamada proteína de unión al lipopolisacárido (LPS) (Ziegler-Heitbrock y Ulevitch 1993; Bernardo, Billingslea *et al.* 1998).

El CD14 también participa en la respuesta quimiotáctica para la AraLAM (Bernardo, Billingslea *et al.* 1998), este complejo se une con alta afinidad al CD14 de membrana y es capaz de activar al macrófago (Thomas, Kapoor *et al.* 2002).

La LAM es un lipoglicano de 17 kDa compuesto de tres dominios, un núcleo polisacárido formado por unidades de D-manana, D-arabinomanana, un dominio formado por fosfatidilinositol anclado a membrana y un polisacárido terminal no reducidos que contienen el disacárido beta-D-Araf(1-2)-alfa-D-Araf; LAM inhibe la proliferación de células T humanas, desecha los radicales libres de oxígeno, bloquea la activación transcripcional de genes que inducen el IFN- γ , inhibe la actividad de la proteína cinasa, y altera la expresión de las citocinas por macrófagos, LAM también está implicada en la inducción de fiebre, en la necrosis de tejido, y en la formación de la cavidad pulmonar (Glatman-Freedman, Mednick *et al.* 2000), es un glicosilfosfatidilinositol (GPI) de rara

estructura glicana que domina en la membrana celular (Rook, Seah *et al.* 2001; Rook, Seah *et al.* 2001).

La interacción de la micobacteria con diversos receptores también activa señales hacia el citoplasma para la translocación de factores nucleares como NF- κ B, la estimulación por mitógenos fosforilan algunas proteínas cinasas como la p38 de la vía de las MAP-cinasa (Tenner, Robinson *et al.* 1995). Se ha analizado que la activación de esta proteína p38, es necesaria para la inducción de la expresión de genes que permiten la sobrevivencia de la micobacteria en citoplasma como el gen *ifn-b* (O'Riordan, Yi *et al.* 2002). Actualmente, se determinó que el gen *H37Rv* de *M. tuberculosis* es el agente causal de la TB (van Beilen, Smits *et al.* 2005).

El carbohidrato Arabinomanana (AM) es un componente de la cápsula micobacterial, también llamada “espacio capsular” y puede ser una fracción inmunológicamente importante, éste se encuentra entre la membrana fagosomal de la célula infectada y la pared del *Mycobacterium* adjunto (Navoa, Laal *et al.* 2003).

Las micobacterias tienen en su superficie moléculas altamente glicosiladas como: los peptidoglicanos unidos a través de puentes fosfodiéster a la AG, un polímero de arabinosa y galactosa, pero el principal componente de la pared celular es la LAM anclado a la membrana celular de la micobacteria y que se extiende a lo largo de la superficie y es de gran importancia porque se le ha asociado a la patogénesis de la TB. Para infectar al macrófago las micobacterias se valen de algunos receptores para componentes glicosilados.

Se ha analizado la respuesta de los anticuerpos hacia AM y se ha evaluado si éstos hacia AM representan una respuesta inmunológica diferente a la de otros polisacáridos micobacteriales que contienen arabinosa, mostrando heterogeneidad de los anticuerpos hacia AM en términos de especificidad, reactividad cruzada y la expresión del determinante antigénico; particularmente como resultado de la enfermedad, AM es antigénicamente diferente de LAM a pesar del hecho de que ambos contienen arabinosa y manosa, por lo que se requiere definir la presencia de subclases de anticuerpos hacia AM en suero y correlacionarlos con el curso de la enfermedad (Ferguson, Voelker *et al.* 1999; Glatman-Freedman, Mednick *et al.* 2000; Navoa, Laal *et al.* 2003).

Las características estructurales de la envoltura le proporcionan a la micobacteria resistencia a agentes microbicidas, fármacos y a la destrucción por calor. Los componentes de la pared celular contribuyen a la virulencia, persistencia dentro de los macrófagos y a la regulación de la respuesta inmune del hospedero (Chen, German *et al.* 2006). El establecimiento de la infección también depende de la interacción inicial entre los componentes de superficie de las micobacterias con los receptores de la célula hospedera.

Latencia y reactivación de Mycobacterium

Las consecuencias de la ingestión o inhalación del bacilo tuberculoso dependen de la virulencia del organismo y de la resistencia del huésped. Por una parte, los organismos con poca virulencia pueden eliminarse sin dejar secuelas y por otra parte, el bacilo puede crecer en los macrófagos y extracelularmente, se

disemina ampliamente y causa enfermedad progresiva, que resulta mortal después de algunos meses.

Tras la inhalación del bacilo tuberculoso, la lesión inicial aparece como un nódulo en el parénquima pulmonar (Casali, White *et al.* 2006), denominado tubérculo (latín, *tuberculum*, «nódulo pequeño»). Estas lesiones se estabilizan y pueden mantener bacilos vivos durante determinado período de tiempo, constituyendo la LTBI. Las condiciones inmunosupresoras como las ocasionadas por el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) incrementan notablemente el riesgo de reactivar la LTBI (Flynn, Scanga *et al.* 1998; Miyazaki, Chaisson *et al.* 1999). Sin embargo, aún no están bien definidos todos los factores que afectan en la etiología, pero se piensa que están relacionados con la capacidad de invasión y adaptación del *Mycobacterium* a su célula huésped (Flynn y Chan 2001), porque es un patógeno intracelular facultativo que tiene la capacidad de permanecer en el interior de los macrófagos del hospedero (Ameixa y Friedland 2002; Schluger 2002).

Recientemente, se ha determinado que el curso de la infección de la TB es dependiente de ambos factores, tanto del hospedero como del patógeno y el incremento en la incidencia de la enfermedad es debida a su coexistencia con el SIDA, en donde después surge la asociación de manifestaciones reumáticas (Colmegna, Koehler *et al.* 2006). Además, la mortalidad es muy elevada entre los niños cuando padecen la coinfección SIDA-TB, los cuales requieren tratamientos prolongados y posiblemente, una profilaxis secundaria, también se

encontró que tres de cinco cultivos de casos positivos involucraron cepas resistentes y uno fue en un caso nuevo de TB (Kitajima, Kaji *et al.* 2006).

En la mayoría de los individuos, una variedad de factores, como la edad, estrés, desnutrición, alcoholismo, infecciones recurrentes y cáncer pueden subsecuentemente ocasionar la adquisición de la inmunosupresión, resultando en la reactivación de la micobacteria latente y el desarrollo de la enfermedad. Durante el curso de la infección con *M. tuberculosis*, la mayoría de los adultos inmunocomprometidos son incapaces de desarrollar una respuesta inmune e inflamatoria que controle la proliferación micobacterial, y aunque esos individuos continúan albergando micobacterias viables, los signos clínicos de la TB no son desarrollados (Bouchonnet, Boechat *et al.* 2002).

Actualmente, en un estudio realizado en la ciudad de Samara, Moscú; se determinó que los tres factores de riesgo determinantes para tener la TB pulmonar son el consumo de leche cruda, la diabetes y vivir con un familiar con TB (Coker, McKee *et al.* 2006). En adición, se ha observado la elevada frecuencia de la TB en los receptores de trasplante renal, lo que origina la presencia de la infección entre la población (Hernandez-Hernandez, Alberu *et al.* 2006).

Aunque la TB es una enfermedad tratable, el uso inadecuado de terapias frecuentemente permite el desarrollo de resistencia a los medicamentos, esa resistencia fenotípica de la micobacteria latente podría ser debida al hecho de que el blanco antimicobacterial es principalmente la función relacionada al crecimiento, así como a la síntesis de pared celular (Boon y Dick 2002), esto

debido a que los lípidos de la pared celular micobacterial son candidatos ideales para cada mediador, la cual esta cubierta por una capa asociada no covalente de glucolípidos y ceras (Rhoades, Hsu *et al.* 2003).

Diversos estudios han demostrado que la micobacteria intracelular es capaz de adquirir y metabolizar los nutrientes dentro del fagosoma micobacterial, en la infección primaria los bacilos se multiplican muy lentamente en los pulmones y causan únicamente una leve inflamación, los macrófagos alveolares contienen la infección y las bacterias que sobreviven en los pulmones pueden reactivarse, después de 6 a 8 semanas de la infección se afectan los ganglios linfáticos regionales y se activan las células T CD4+, éstas células T producen IFN- γ que activa a los macrófagos y aumenta su capacidad para destruir las bacterias fagocitadas, el TNF producido por las células T y los macrófagos también participan en la inflamación local y en la activación de los macrófagos (Peteroy-Kelly, Venketaraman *et al.* 2003).

Las micobacterias son aerobios obligados; sin embargo, una amplia evidencia de estudios de modelos animales y humanos sugiere que el bacilo encuentra un microambiente hipóxico en la enfermedad activa así como en la LTBI y se ha demostrado que en una supresión gradual de oxígeno en un cultivo, el bacilo se adapta a la hipoxia y la viabilidad se mantiene durante períodos prolongados, por lo tanto, el bacilo puede causar infección persistente a pesar de las quimioterapias; actualmente, se requieren de 6 a 9 meses de tratamiento para curar a los pacientes con TB (Boon y Dick 2002).

Aunado a esto, se ha reportado que las micobacterias, se establecen dentro del tejido del hospedero, adaptando su metabolismo a la fuente disponible de carbohidratos, nitrógeno y energía requeridos para la persistencia del *Mycobacterium* (Fritz, Maass *et al.* 2002). Las citocinas tipo 1 dependientes de la inmunidad son importantes en la defensa del hospedero humano contra los patógenos intracelulares (Lagranderie, Nahori *et al.* 2003; Lichtenauer-Kaligis, de Boer *et al.* 2003).

La capacidad del bacilo de la TB para mantenerse viable en los macrófagos, esta asociada a las células que intervienen en la eliminación de los patógenos y parece ser la clave de la persistencia de la infección micobacterial, el bacilo permanece dentro de los macrófagos debido a los componentes de la pared celular que inhiben la función de los lisosomas con las vacuolas fagocíticas (Tomioka, Sato *et al.* 2002; Weatherby, Zwilling *et al.* 2003).

Respuesta inmune frente a Mycobacterium

La principal defensa del huésped frente a las micobacterias es la inmunidad celular. La inmunidad celular es primordial en la protección contra TB, la investigación se ha enfocado a definir los antígenos de *M. tuberculosis*, ya que esto puede conducir al investigador a proporcionar una inmunidad efectiva y entender la función de varias poblaciones celulares en las interacciones hospedero-patógeno (Laal, Samanich *et al.* 1997). La respuesta inmune controla, pero no elimina al patógeno.

El desarrollo de la inmunidad celular adquirida es crítico para el control de la infección de *M. tuberculosis* (Wozniak, Ryan *et al.* 2006).

Una respuesta inmune celular, conocida como célula T cooperadora-subgrupo-1 (Th-1), con elevados niveles de IFN- γ se considera como decisivo para la defensa del hospedero contra la micobacteria (Stienstra, van der Graaf *et al.* 2001). Los pacientes con la enfermedad úlcera Burulli parecen presentar anergia tipo Th-1, con producción baja de IFN- γ contra *M. ulcerans* y *M. bovis* y una tipo Th2, que involucra las IL (IL-4, IL-5 e IL-10) citocina modelo mRNA (Gooding, Johnson *et al.* 2002), sugiriendo que la sobrerregulación Th-2 es mediada por Th1 (Stienstra, van der Graaf *et al.* 2001). La IL-10 puede facilitar ambas respuestas inmunes la Th-2 y Th1 (Cottrez, Hurst *et al.* 2000).

Las células T CD8 de patógenos específicos expresan CK que atraen células inflamatorias hacia los sitios de la infección (Harty, Tvinnereim *et al.* 2000).

Se ha determinado que el TNF- α tiene una función esencial en prevenir la reactivación de la LTBI, regulando la expresión pulmonar de factores inmunológicos específicos que limita la respuesta patológica del huésped (Mohan, Scanga *et al.* 2001).

Las células que contienen *M. tuberculosis* son notablemente más sensibles a la muerte por TNF- α ; no obstante, se ha sugerido que la reducción en el número de bacilos solo se ha logrado por la apoptosis del monocito infectado, no por el modo necrótico de citólisis, la apoptosis inducida por ATP promueve la muerte de *M. tuberculosis* virulento dentro del macrófago, como lo hace la apoptosis inducida por el ligando Fas, y la apoptosis inducida por peróxido de hidrógeno,

la apoptosis también causa efectos micobactericidas (Rook, Seah *et al.* 2001), esta apoptosis también previene la liberación de componentes intracelulares y la velocidad de la infección micobacterial secuestrando los patógenos dentro de los cuerpos apoptóticos.

La diferenciación de las células Th1 se efectúa por las secreciones de quimoquinas- *beta* (β -CK) que funciona en la activación de las células T y en la agrupación de las células mononucleares hacia el sitio de la infección (Saukkonen, Bazydlo *et al.* 2002).

Se ha observado que la respuesta inmune hacia *M. tuberculosis* en animales ha mostrado tener similitud con el sistema inmune humano, incluyendo la activación de las células T CD4, de las citocinas como IL-12 y del TNF- α , además las células T CD4+ se diferencian en células efectoras Th1 bajo la influencia de la IL-12, producida por los macrófagos y las células dendríticas (DCs) (Capuano, Croix *et al.* 2003).

La respuesta inmune Th1 se cree es necesaria para la protección contra patógenos micobacteriales, tales como *M. tuberculosis* y *M. bovis*, esos patógenos intracelular facultativos residen en células mononucleares, lo cual les permite evadir la respuesta inmune del hospedero, se requiere de la respuesta inmune celular coordinada para controlar la infección (Hovav, Mullerad *et al.* 2003).

Las células T son las primeras en influenciar el curso de la enfermedad o en detener la infección, la continua activación de estas células conduce a la formación de granulomas con necrosis central, denominada necrosis caseosa,

causada por los productos de los macrófagos tales como enzimas lisosómicas que producen intermediarios reactivos de oxígeno (ROI) (Lazarevic, Myers *et al.* 2003).

El granuloma consiste en macrófagos y células gigantes, células T, células B y fibroblastos. El microorganismo puede estar en un estado inactivo sin replicarse, limitado por la respuesta inmune, o metabólicamente alterado con ciclos replicativos infrecuentes o limitados. La alteración de la respuesta inmune puede resultar en la reactivación y replicación del bacilo, con necrosis y daño al tejido pulmonar.

Un mecanismo microbicida que utilizan los macrófagos y neutrófilos activados es la conversión catalítica de oxígeno molecular en radicales libres oxihalogenúricos, que son agentes oxidantes muy reactivos que destruyen los microorganismos. El principal sistema generador de radicales libres es el sistema de la oxidasa fagocítica, ésta es una enzima multisubunitaria que se ensambla en los macrófagos activados en la membrana plasmática y en la membrana fagolisosómica.

La función de esta enzima consiste en reducir el oxígeno molecular a productos ROI, como los radicales superóxido, utilizando la forma reducida de fosfato de dinucleótido de nicotinamida adenina (NADPH). El superóxido experimenta una dismutación enzimática hacia peróxido de hidrógeno, que es usado por la enzima mieloperoxidasa para convertir los iones halogenuro (normalmente no reactivos) en ácidos hipohalogenosos que son tóxicos para las bacterias.

El proceso por el cual los ROI se producen se denomina estallido respiratorio. El TNF y el LPS pueden sensibilizar a los neutrófilos para producir grandes

cantidades de ROI en respuesta a otros activadores, como los péptidos de *N*-formilmetionil bacterianos y las CK.

Las citocinas como IFN- γ e IL-2 están presentes con la respuesta inmune Th1 y fueron observadas en orina después del tratamiento con BCG y se ha demostrado su importancia en la inmunidad frente a las bacterias intracelulares (Nadler, Luo *et al.* 2003). Además, el IFN- γ es el efector primario de la función de las células T del CD4+, se piensa que la producción de IFN- γ y otras citocinas son suficientes para activar al macrófago, las cuales pueden controlar o eliminar los organismos intracelulares (Caccamo, Barera *et al.* 2003). También el IFN- γ como el TNF- α , son capaces de activar mecanismos microbicidas en macrófagos infectados necesarios para el control de la infección intracelular (Lagranderie, Nahori *et al.* 2003).

La infección de TB es expandida por vía aérea y puede establecer la infección con o sin lesiones visibles primarias. La primera respuesta inmune que se manifiesta rápidamente es el desarrollo de la respuesta celular Th1. en el 90 a 95% de los individuos, la infección se mantiene latente, la cual probablemente se refleja por el DNA de *M. tuberculosis* que puede ser detectado por el uso de la prueba PCR *in situ*, en tejido con poco infiltrado celular (Rook, Dheda *et al.* 2005).

En la minoría de los individuos, hay un desarrollo progresivo de la enfermedad y en la mayoría se localiza la lesión en el ápice pulmonar, en donde la proporción de ventilación sanguínea es mayor, en la **figura 5** se muestran las fases de la infección con *M. tuberculosis*. Sin embargo, en la mayoría de la gente infectada

la enfermedad se mantiene latente durante décadas, aunque puede ser reactivada cuando un individuo esta inmunocomprometido, particularmente por coinfección con HIV.

La enfermedad progresiva es caracterizada por pérdida de peso, toxicidad del TNF, cavitación y fibrosis, frecuentemente diagnosticado a través del IFN- γ producido por las células Th1 (Rook, Dheda *et al.* 2005).

Recientemente, se ha determinado que la citocina modelo mARN podría por lo tanto, indicar cualquier preponderancia de Th2 o la inmunosupresión mediada por la IL-10 (Westenbrink, Stienstra *et al.* 2005) y se ha confirmado que la inmunidad hacia *Mycobacterium* es predominantemente celular (Avgustin, Kotnik *et al.* 2005).

Las células Th maduran desde un estado precursor Th0 al fenotipo Th1 o al Th2 (Dovedi, Kirby *et al.* 2005).

La TB es un desorden granulomatoso y la respuesta inmune celular tiene una función dentro del mecanismo de defensa, en la cual las células T CD4+ se expanden en la TB pleural, en donde dominan las células Th1 y son lo suficientemente activadas para producir citocinas Th1 (Okamoto, Hasegawa *et al.* 2005). Diversos estudios reportan que la pleuritis tuberculosa es una enfermedad dominante en células tipo Th1 y en la pleuritis maligna predominan las células tipo Th2 (Chen, Yang *et al.* 2001).

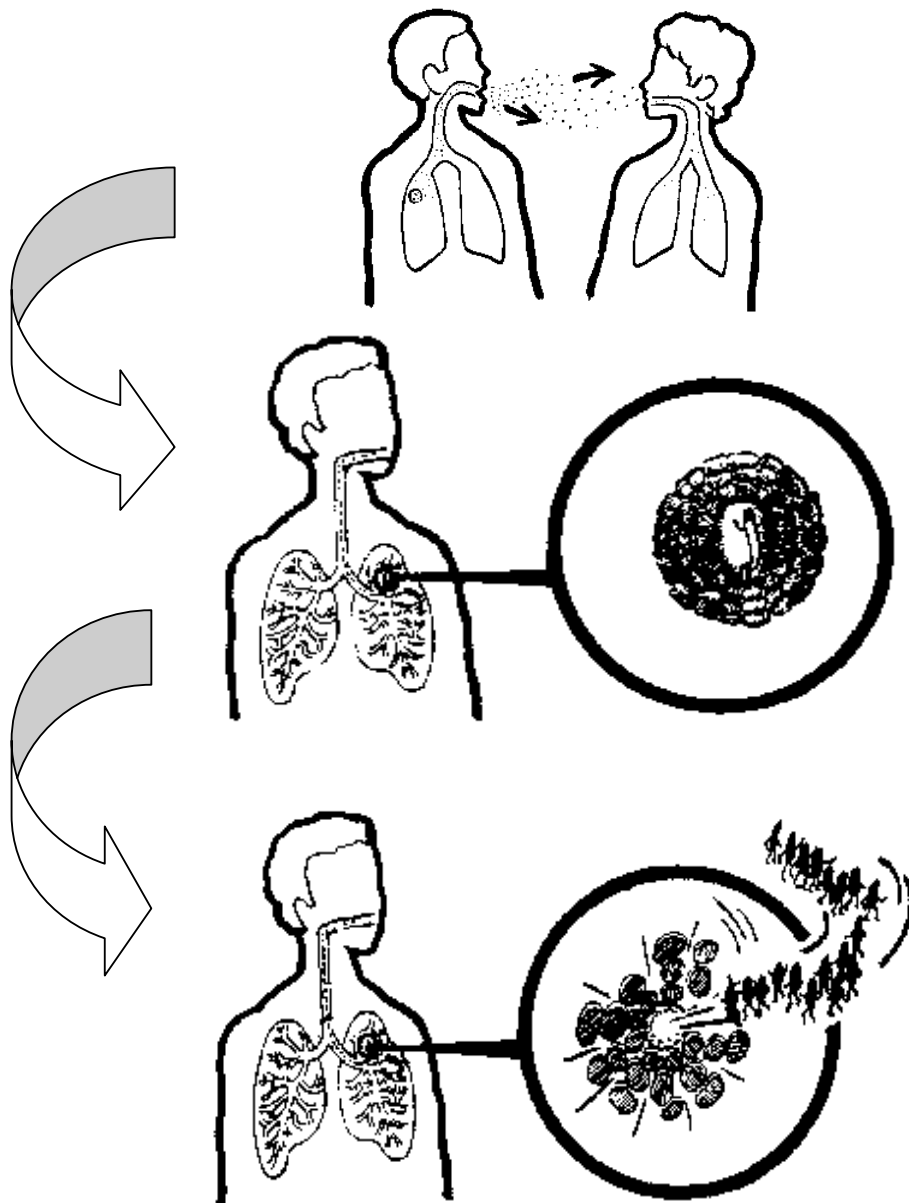


Figura 5. Fases de la infección con *M. tuberculosis*.

(Rook, Dheda *et al.* 2005)

Recientemente, se ha determinado que la citocina modelo mARN podría por lo tanto, indicar cualquier preponderancia de Th2 o la inmunosupresión mediada por la IL-10 (Westenbrink, Stienstra *et al.* 2005) y se ha confirmado que la

inmunidad hacia *Mycobacterium* es predominantemente celular (Avgustin, Kotnik *et al.* 2005).

Las células Th maduran desde un estado precursor Th0 al fenotipo Th1 o al Th2 (Dovedi, Kirby *et al.* 2005).

La TB es un desorden granulomatoso y la respuesta inmune celular tiene una función dentro del mecanismo de defensa, en la cual las células T CD4+ se expanden en la TB pleural, en donde dominan las células Th1 y son lo suficientemente activadas para producir citocinas Th1 (Okamoto, Hasegawa *et al.* 2005). Diversos estudios reportan que la pleuritis tuberculosa es una enfermedad dominante en células tipo Th1 y en la pleuritis maligna predominan las células tipo Th2 (Chen, Yang *et al.* 2001).

Recientemente, se reporta que las concentraciones de las citocinas que inducen el IFN- γ como la IL-12 e IL-18, las CK, IFN- γ e IFN- γ inducible son más elevadas en la TB pleural que en la pleuritis maligna; además se sabe que la IL-12 induce la respuesta Th1 en células T CD4+ indiferenciadas y esto apoya el dominio de las células Th1 (Okamoto, Kawabe *et al.* 2005).

Células presentadoras de antígenos (APC)

Las APC son células que exponen en su superficie fragmentos peptídicos de antígenos proteicos, asociados a moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) y activa las células T específicas de los antígenos. Además de presentar complejos péptido-molécula del MHC, las APC también

deben expresar moléculas coestimuladoras para activar óptimamente a los linfocitos T.

Las DCs son APC con una capacidad única para inducir la respuesta inmune primaria son células accesorias inmunitarias derivadas de la médula ósea presentes en los tejidos epiteliales y linfoides que se caracterizan desde el punto de vista morfológico por finas proyecciones membranales y actúan como APC para los linfocitos T no estimulados; además, son importantes para el inicio de las respuestas inmunitarias adaptativas a los antígenos proteicos (Banchereau y Steinman 1998).

En adición, las DCs capturan y transfieren la información del mundo exterior hacia las células del sistema inmune adaptativo y no son sólo críticas para la inducción de la respuesta inmune primaria, también son importantes en la inducción de la tolerancia inmunológica, así como para la regulación del tipo de respuesta inmune por células T (Banchereau y Steinman 1998).

Sólo los macrófagos, las DCs y las células B son reconocidas como APC, pero otros tipos de células pueden funcionar como APC en condiciones especiales (Takamatsu, Denyer *et al.* 2002). Sin embargo, las DCs son las más potentes APC (Ismaili, Rennesson *et al.* 2002), y los neutrófilos podrían funcionar como APC para antígenos micobacterianos y para producir CK las cuales incrementan el agrupamiento de linfocitos T (Fulton, Reba *et al.* 2002).

La respuesta innata adquirida de las células T es necesaria para el control de la infección micobacteriana en los pulmones y evidencias considerables indican que la inmunidad mediada por células T antígeno específico es requerida durante el control de la infección por la micobacteria patógena (Bouchonnet,

Boechat *et al.* 2002). De aquí que las células T $\gamma\delta$ requieren de las APC para el reconocimiento del antígeno y para la activación antígeno específico; se sabe que, solo los monocitos mononucleares como los macrófagos, las DCs-Langerhans y las células B son reconocidas como APC (Takamatsu, Denyer *et al.* 2002).

Los granulomas inducidos experimentalmente con agentes micobacteriales permiten el desarrollo de citocinas tipo 1 y la expresión de CK, el IFN- γ induce a los macrófagos y DCs para producir IFN- γ inducible (Fuller, Flynn *et al.* 2003).

Recientemente, se ha determinado que las DCs pueden capturar una serie de agentes infecciosos y presentar sus antígenos a los linfocitos T, las DCs expresan, entre otros receptores, las DC específicas como la molécula de adhesión intercelular (ICAM-3) y el receptor no-integrina (DC-SIGN), la lectina tipo C, la cual contiene lectina tipo C, la cual contiene en el exterior manosa dependiente de calcio (Naarding, Ludwig *et al.* 2005).

Mecanismo de destrucción a través de intermediarios reactivos de nitrógeno (RNI) y óxido nítrico (NO)

La principal función efectora de los neutrófilos y los macrófagos es destruir los microorganismos fagocitados mediante la función de los lisosomas con los fagosomas y la producción de moléculas microbicidas. Cuando los neutrófilos y los macrófagos se activan intensamente, pueden lesionar los tejidos normales del huésped liberando.

El lisosoma es un organelo vacuolar complejo de la vía endocítica tardía. Dentro del lisosoma existen enzimas hidrolíticas potentes capaces de degradar un

amplio rango de macromoléculas. Estas enzimas actúan óptimamente en un pH ácido, de hecho, el lisosoma es el órgano más ácido en las células animales (4.5-5.0), este medio ácido es mantenido por la bomba de protones dependiente de ATP, las H⁺-ATP-ases vacuolares (Mellman, Fuchs *et al.* 1986; Chicurel, Garcia *et al.* 1988).

El NO surgió con prominencia como un mediador fisiológico cuando se comprobó que era idéntico al factor relajante derivado del endotelio.

La producción de NO es esencial para la muerte intracelular del bacilo tuberculoso en los macrófagos ya que el NO actúa como un agente microbicida para destruir a los microorganismos ingeridos, el inductor de sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS) es esencial en la activación de las células T y se asocia claramente con el IFN- γ , el TNF- α y a la respuesta del NO por los macrófagos alveolares (Waters, Nonnecke *et al.* 2001), es producido por los células mononucleares de sangre periférica (PBMC) inducidos por *Mycobacterium* de ganado infectado con *M. bovis* (Waters, Palmer *et al.* 2003).

La elevada producción de NO por los macrófagos activados, es regulada bajo la activación por agentes apropiados tales como el IFN- γ y el TNF- α , generan NO y los RNI vía óxido nítrico sintasa (NOS2) usando L-arginina como sustrato. Los RNI juegan un papel protector en la infección tuberculosa aguda y crónica persistente (MacMicking, Xie *et al.* 1997).

Se ha detectado inmunohistoquímicamente un elevado nivel de expresión de NOS2 en macrófagos obtenidos por lavado pulmonar alveolar de individuos con TB pulmonar activa. Además, se ha observado que el nivel de NO exhalado

aumenta en los pacientes con TB (Nicholson, Bonecini-Almeida Mda *et al.* 1996; Wang, Liu *et al.* 1998).

El NO es formado por la deaminación del aminoácido L-arginina por la NOS (Burgner, Rockett *et al.* 1999).

El NO es producido por la acción catalítica de NOS, de la cual son tres enzimas sus miembros principales iNOS, NOS óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) y óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS) (Choi, Rai *et al.* 2002).

Las características de estas tres isoformas de la enzima NOS son: la enzima nNOS se localiza en fuentes celulares humanas, en neuronas, médula densa renal, en la glia y en astrocitos; su presencia es constitutiva, su activación incrementa el Ca^{2+} permitiendo el enlace a calmodulina (Burgner, Rockett *et al.* 1999).

La eNOS se localiza en la membrana (inactiva) y en citosol (activa), se encuentra en células humanas, como las del endotelio y músculo liso; su presencia es constitutiva (Burgner, Rockett *et al.* 1999).

La iNOS es una enzima inducible y se localiza en citosol. Se encuentra en las siguientes células: macrófagos, monocitos, leucocitos, endotelio, músculo liso, neutrófilos, epitelio retinal pigmentado, astrocitos, microglia, hepatocitos, células de Küpffer (macrófagos del hígado), fibroblastos y mesangio. Su presencia es inducible. Su activación es independiente de la inducción de Ca^{2+} , siempre enlaza calmodulina (Burgner, Rockett *et al.* 1999).

El NO es un radical gaseoso libre que sirve para múltiples propósitos biológicos, como la transducción del mensaje intracelular, la regulación del flujo sanguíneo, la neurotransmisión y la citotoxicidad (Moncada, Palmer *et al.* 1991).

Una de sus múltiples funciones es su formación por una iNOS en la mayoría de las células, particularmente en los macrófagos y los neutrófilos, lo que genera un poderoso sistema antimicrobiano (Green, Scheller *et al.* 1994; Nicholson, Bonecini-Almeida Mda *et al.* 1996; Stenger 2001). Sin embargo, la inducción de iNOS no permite la eliminación completa de *M. tuberculosis*, *in vivo*, es posible que los ROI y RNI puedan inhibir la replicación (bacteriostáticos) pero no la erradicación de la bacteria (bactericidas) (Firmani y Riley 2002; Weatherby, Zwilling *et al.* 2003).

Mientras que, el NADPH se dedica a la destrucción de los microorganismos extracelulares captados por fagocitosis y atrapados dentro de la vacuola fagocítica, el mecanismo NO puede operar contra microbios, que invaden el citosol; por lo tanto, la mayoría de las células no fagocíticas que son infectadas por microorganismos están dotadas de iNOS.

El efecto inducible de iNOS sobre en los macrófagos alveolares humanos puede estar asociado con el componente de la pared celular de las micobacterias conocido como LAM y se sugiere que los componentes de la pared celular del BCG deberían ser de clínicamente útiles para intensificar los mecanismos de defensa de los macrófagos alveolares humanos a través de la producción de NO (Nozaki, Hasegawa *et al.* 1997).

El TNF- α y el NO son dos componentes esenciales en la defensa del hospedero frente al *Mycobacterium* (Waters, Palmer *et al.* 2003).

Además, el control de la infección pulmonar a un nivel de estado de latencia se ha asociado con la expresión continua de la inmunidad mediada por Th1 y con

la expresión continua de iNOS por los macrófagos (Jung, Ryan *et al.* 2003). Adicionalmente, IFN- γ , TNF- α y el factor estimulador de colonias granulocito-macrófago (GM-CSF) activan a los macrófagos para resistir el crecimiento de patógenos intracelulares por el incremento en la producción de mayores moléculas efectoras antimicrobiales induciendo especies de oxígeno reactivo y NO (Weatherby, Zwilling *et al.* 2003).

Esta aseveración concuerda con los estudios realizados acerca de que los inhibidores de la producción de NO agravan la infección de la TB en cuanto a histopatología y en carga bacteriana (Rook, Seah *et al.* 2001). Por lo tanto, la activación de iNOS y el NO resultante contribuyen grandemente a eliminar los organismos invasores, ya que la síntesis de NO es resultado de muchos factores inmunológicos incluyendo TNF- α , IL-1 e IFN- γ , los cuales, frente a una endotoxemia incrementan la generación de NO (Yao, Li *et al.* 2003). Aunado a esto, se ha encontrado que el IFN- γ es el mediador crítico en la producción de NO (Roy, Sharma *et al.* 2004).

En experimentos realizados en ratones *knockout*, se ha identificado al gen *NOS2* como un componente potencialmente importante en la defensa del hospedero contra la TB (MacMicking, North *et al.* 1997). En adición, se ha encontrado que la proteína *NOS2* se expresa en macrófagos alveolares en pacientes con TB (Nicholson, Bonecini-Almeida Mda *et al.* 1996).

El NO es un poderoso mecanismo microbicida para las micobacterias que se han adaptado a vivir dentro del macrófago. Su mecanismo de acción es a través de la degradación de los grupos prostéticos Fe-S de ciertas enzimas de

transporte electrónico, el agotamiento del hierro y la producción de radicales ·ONOO tóxicos.

Se han administrado a pacientes con TB 80 ppm durante 72 h de NO por vía de administración inhalada y se comprobó que el NO puede acelerar la desinfección por vía aérea para la TB pulmonar (Long, Jones *et al.* 2005).

En la actualidad, se sabe que el gen *N-ramp* vinculado con la resistencia a microbios como el BCG, los cuales pueden residir en un hábitat intracelular, expresa una proteína que forma un canal transmembranoso que participaría en el transporte de NO a través de las membranas lisosómicas. Adicionalmente, los lipoglicanos del BCG propician las citocinas inflamatorias y son RNI en los macrófagos que han fagocitado las microesferas cubiertas de lípidos (Rhoades, Hsu *et al.* 2003).

Función de la respuesta inmune en la producción de óxido nítrico (NO)

La activación de los macrófagos que destruyen a la micobacteria, ocurre a través de la respuesta inmune celular. Las enzimas lisosomales y los ROI se producen en el interior de los fagolisosomas y el NO se produce en el citosol y se difunde en el interior de los fagolisosomas, donde se activa por el pH ácido. El NO es un factor inmune que detiene la replicación micobacteriana *in vivo* y tiene una función, en conjunción con la baja concentración de oxígeno en tejidos, de iniciar y mantener el estado de latencia.

Existen dos tipos de respuesta inmune, la Th1 y la Th2. La respuesta Th1 lleva al control de infecciones de microorganismos intracelulares (Lagranderie, Nahori *et al.* 2003; Lichtenauer-Kaligis, de Boer *et al.* 2003), la inmunidad mediada por Th1 juega un papel crucial en la defensa del hospedero contra *M. tuberculosis*, controla la síntesis excesiva de citocinas proinflamatorias y el subsecuente daño del tejido y podría contribuir a la promoción de la sobrevivencia micobacterial (Bafica, Scanga *et al.* 2005).

Esta respuesta se traduce en la activación de los macrófagos y depende de una activación adecuada de linfocitos, en particular de células colaboradoras con marcador CD4, productoras de IFN- γ , el mediador más importante en la defensa contra *Mycobacterium*.

Los macrófagos y las células T CD4+ son dos tipos de células particularmente relevantes durante la respuesta antitubercular. El IFN- γ producido por el antígeno específico y los macrófagos que activan las células T CD4+ conducen a la producción de NO, esencial para la muerte intracelular del bacilo tubérculo (Waters, Nonnecke *et al.* 2003). Los cambios de transcripción bacteriana medida al inicio de de la respuesta inmune mediada por Th1, son inducidas comúnmente, directa o indirectamente, por la generación de NO por macrófagos infectados, por contribuir a la creación de poco oxígeno medioambiental (Shi, Jung *et al.* 2003).

El IFN- γ se relaciona con la IL-2 y con el TNF- α (Peteroy-Kelly, Venketaraman *et al.* 2003), así como también la IL-12, esta citocina proinflamatoria juega un

papel crítico en inducir la respuesta del hospedero hacia *M. tuberculosis*, así como, de otros patógenos intracelulares (Bafica, Scanga *et al.* 2005).

El IFN- γ activa al macrófago para que produzca radicales libres de oxígeno y nitritos (NO_2^-) con actividad antimicrobiana. Por otra parte, la respuesta inmune Th2 se caracteriza por la producción de diferentes citocinas como IL-4 e IL-10 que activan linfocitos B para producir anticuerpos, activan eosinófilos y bloquean la actividad bactericida de los macrófagos.

El IFN- γ , el GM-CSF y el TNF- α activan a los macrófagos para resistir el crecimiento de patógenos intracelulares e incrementar la producción de diversas sustancias antimicrobianas, como los productos ROI, NO y enzimas lisosomales (Weatherby, Zwilling *et al.* 2003).

Una función esencial del IFN- γ es activar a los macrófagos, resultando en un incremento de la fagocitosis, la expresión del MHC clase I y II, y la inducción de IL-12, NO y producción de superóxido, los cuales son importantes en la eliminación de patógenos intracelulares, la función exacta de IFN- γ en la diferenciación Th1 ha sido controversial, ya que un gran número de sistemas *in vitro* e *in vivo* han estado en conflicto con respecto a las acciones de IFN- γ en las células T CD4+ (Feng, Bean *et al.* 1999).

Además del sistema de la oxidasa fagocítica, los macrófagos cuentan con un segundo sistema de generación de radicales libres, la iNOS, ésta es una enzima citosólica que no existe en los macrófagos en reposo, pero puede inducirse en respuesta al LPS en combinación con IFN- γ . Otro mecanismo antimicrobiano importante en los macrófagos es la producción de RNI a través

de la vía dependiente de L-arginina. En experimentos realizados en ratones se ha podido correlacionar la producción de los macrófagos de RNI con capacidad destructora contra micobacterias.

La iNOS cataliza la conversión de arginina en citrulina, y se libera NO que se difunde libremente (**figura 6**).

Se ha reportado que en la TB pulmonar activa, en linfocitos periféricos hay ausencia de IFN- γ , pero IL-10 elevada, esto demuestra una respuesta Th2; por el contrario, en individuos sin datos clínicos de enfermedad, pero con derivado proteico purificado (PPD+) presentan una respuesta Th1 importante con proliferación de linfocitos con antígenos de *Mycobacterium*.

Los ensayos *in vitro* con los antígenos, PPDa, PPDb, o mitógeno, detectan el IFN- γ producido por PBMC, implica el IFN- γ inducido por el antígeno, el NO, y la producción de TNF- α de bovinos con *M. bovis* (Waters, Palmer *et al.* 2003). Sin embargo, la producción no específica de nitratos (NO₃⁻) en cultivos de PBMC puede ser problemático para el desarrollo de una prueba de diagnóstico para NO. El BCG, cepa atenuada de *M. bovis*, es transportador de proteínas recombinantes, proporciona antígenos para ser reconocidos por el sistema inmune (Buddle, Skinner *et al.* 2002; Waters, Palmer *et al.* 2003).

Recientemente, en EUA se ha demostrado que no se ha podido erradicar la TBB debido a las importaciones mexicanas de ganado que se realizan, Ray Waters y Match Palmer, quienes trabajan en el centro *Bacterial Diseases of Livestock Research Unit*, han desarrollado un proceso económico y fácil para el diagnóstico de TBB, que puede infectar al humano, aves, y bovinos,

especialmente a la mayoría de los mamíferos, incluyendo animales silvestres. Ellos diagnostican la TBB con la determinación de NO, esta prueba detecta la presencia de NO_2^- , que es un indicativo de la producción de NO en cultivos de una muestra de sangre.

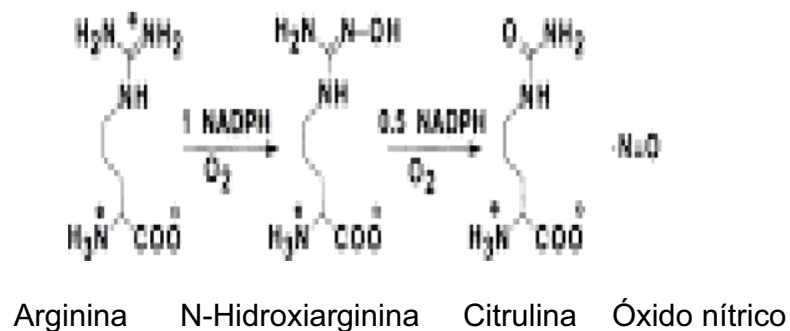


Figura 6. Reacción catalizada por óxido nítrico sintasa (NOS). La reacción involucra la formación del intermediario N-hidroxi-L-arginina. Una parte de NADPH es consumido por el NO formado.

(Wang, Rousseau *et al.* 1994)

Se sabe que *Mycobacterium* persiste en los macrófagos dentro de los granulomas, distintas lesiones representadas por un área central necrótica por células inflamatorias que consiste de macrófagos epiteliales, células multinucleadas, células T, B y ciertas zonas de fibroblastos, la formación del granuloma es importante en la defensa del hospedero contra bacterias intracelulares y otro tipo de antígenos (Choi, Rai *et al.* 2002).

La formación de granulomas tuberculosos es compleja, dependiente de la migración y activación de células inmunes, iniciada por la expresión de citocinas y CK en respuesta a antígenos micobacteriales (Choi, Rai *et al.* 2002).

Aunado a esto, se ha demostrado que las células del epitelio alveolar tienen un papel activo en la inmunidad innata hacia *Mycobacterium* por la elaboración de NO en respuesta tanto a la infección con la micobacteria como también en presencia de componentes micobacterianos en el entorno (Roy, Sharma *et al.* 2004).

Se ha demostrado, por inmunohistoquímica y por microscopía inmunoelectrónica la presencia de iNOS y de nitrotirosina en biopsias de nervios dérmicos con *Mycobacterium leprae* (Schon, Hernandez-Pando *et al.* 2004). En adición, la nitrotirosina, la cual es el producto final de la reacción de iNOS, ha sido detectada en los pulmones de ratones, y el nivel detectado fue muy similar al de tejidos teñidos (Brown, Jacobs *et al.* 2005).

Mientras que, el ensayo IFN- γ usa anticuerpos monoclonales para especies específicas, la prueba nueva usa un método de detección que comúnmente es sensible para el diagnóstico en varios mamíferos. Esto es posible porque el NO₂⁻ es un químico detectado fácilmente dentro de las muestras de todas las especies. IFN- γ , al contrario de los NO₂⁻, difiere entre especies, así que son necesarios nuevos reactivos para cada especie probada (Firmani y Riley 2002).

Se ha sugerido que *M. tuberculosis* tiene gran habilidad para resistir la toxicidad de RNI (Shi y Ehrt 2006).

La TBB puede expandirse de mamífero a mamífero a través del contacto con saliva, secreciones nasales, orina y heces fecales, esto ocurre cuando los animales silvestres entran a las áreas donde se encuentra el ganado. La prueba del NO debe de realizarse a todos los animales que se utilicen con la finalidad

de exportación y así asegurarse que la enfermedad no ha sido detectada, y más aún si los animales provienen de un país donde la TB es endémica.

Mecanismo de sobrevivencia de Mycobacterium en macrófagos

El macrófago es una célula fagocítica asentada en los tejidos derivada de los monocitos que desempeña importantes funciones en las respuestas de inmunidad adaptativa e innata. Los macrófagos son activados por productos microbianos tales como la endotoxina y las citocinas producidas por las células T tales como el IFN- γ .

Los macrófagos activados fagocitan y destruyen a los microorganismos, secretan citocinas proinflamatorias y presentan antígenos a las células Th. Los macrófagos pueden adoptar diferente morfología en diferentes tejidos, como la microglia del sistema nervioso central, las células de Kúpffer en el hígado, los macrófagos alveolares en el pulmón y los osteoclastos en el hueso.

M. tuberculosis es la bacteria patógena más devastadora de la humanidad, porque las micobacterias son conocidas por su sobrevivencia y replicación dentro de los macrófagos, se asume que tienen estrategias que facilitan su asociación con los fagocitos (Stokes, Norris-Jones *et al.* 2004), la cápsula debe estar involucrada en la interacción inicial de la micobacteria con fagocitos hospederos tales como los macrófagos y neutrófilos, dentro de los hospederos mamíferos *M. tuberculosis* es comúnmente encontrado dentro de los macrófagos.

M. tuberculosis es un patógeno intracelular bien equipado, como lo evidencia su habilidad natural para adaptarse y residir dentro de los fagosomas macrófagos humanos (Haydel y Clark-Curtiss 2006).

Se ha estudiado que la eliminación de *Mycobacterium* por activación de los macrófagos es el principal mecanismo de eliminación de la bacteria (Tadesse y Shannon 2005).

Los macrófagos están entre las primeras células del hospedero que confrontan los microbios y son células efectoras importantes en la resistencia innata hacia patógenos microbianos intracelulares (Weatherby, Zwillling *et al.* 2003). Dentro de la etapa del primer encuentro con un patógeno intracelular o el macrófago resiste el crecimiento del microorganismo o el microorganismo se adapta y se replica dentro del macrófago (Weatherby, Zwillling *et al.* 2003).

Esta habilidad del macrófago para resistir el crecimiento de los microorganismos es dependiente del estado de activación del mismo macrófago (Weatherby, Zwillling *et al.* 2003). *Mycobacterium* sobrevive y en ocasiones se replica activamente dentro de los fagocitos mononucleares, de donde el conocimiento de los mecanismos que le permiten evadir su destrucción por el macrófago es importante en el estudio de la patogenia de la enfermedad.

Las vías principales que utilizan los macrófagos para inhibir el crecimiento micobacterial son: fusión fagosoma-lisosoma, generación de ROI y producción de RNI. Sin embargo, poco se conoce acerca del papel de esos intermediarios durante la infección latente (Firmani y Riley 2002).

Durante las primeras etapas de reconocimiento, los macrófagos pueden interactuar de dos maneras con las micobacterias: puede haber una interacción

directa con los receptores de superficie de los macrófagos con los componentes de la superficie micobacterial, o bien, el macrófago puede reconocer de manera específica diversos elementos séricos, que son depositados de manera específica como los anticuerpos o, de manera inespecífica como los componentes del complemento (C') o proteínas de fase aguda, los cuales funcionan como opsoninas (Hirsch, Ellner *et al.* 1994).

Estas opsoninas hacen más eficiente la fagocitosis de los macrófagos hacia las micobacterias, debido a que tienen receptores de alta afinidad para diversas opsoninas que recubren las micobacterias, esto les permite tener mecanismos microbicidas como la formación de complejos inmunes o lisis por C' (Aderem y Underhill 1999). Ya que durante las fases iniciales de la infección, la fagocitosis no opsónica realizada por los macrófagos es crítica para la defensa del huésped en el pulmón, debido a que en el fluido broncoalveolar no inflamatorio no hay cantidad suficiente de opsoninas para promover la fagocitosis opsónica (Linehan, Martínez-Pomares *et al.* 2000).

La LAM de cepas virulentas interfiere con la producción de IL-12 en las células dendríticas y en macrófagos cuando son estimulados vía receptor de manosa (MR), este es uno de los mecanismos que contribuyen a la persistencia de la infección al evitar que la IL-12 actúe directamente en los linfocitos Th para desarrollar células Th1, las cuáles son críticas para la erradicación del patógeno intracelular (Beckman, Porcelli *et al.* 1994).

La captación de micobacterias a través del MR puede favorecer la presentación del antígeno hacia linfocitos T. Los antígenos micobacterianos principalmente LAM son llevados a los endosomas para seguir la vía de presentación de

antígeno exógeno y ahí se asocian a moléculas CD1b, como la estructura de la LAM contiene grandes cantidades de lípidos, la vía de presentación de antígenos lipídicos es importante para la activación de los linfocitos T (Prigozy, Sieling *et al.* 1997).

Adicionalmente, otra forma estructural de LAM es que tiene unidades de manosa en la porción terminal (ManLAM) que se unen con gran afinidad al MR, la participación simultánea de ambos receptores CD14 y el MR generan señales dobles para activar al macrófago (Thomas, Kapoor *et al.* 2002).

Los receptores *Scavenger* (SRs) están presentes en macrófagos y reconocen principalmente moléculas polianiónicas, en las que se incluyen los LPS de bacterias Gram (-), ácidos lipoteicoicos de bacterias Gram (+) y moléculas con ácido siálico (Dunne, Resnick *et al.* 1994). Los SRs presentan diversas estructuras y pueden tener múltiples ligandos como los lípidos de baja densidad (LDL), fosfatidilserina y componentes polianiónicos (Krieger y Hertz 1994). El SR de clase A contribuye de manera importante en la interacción entre *M. tuberculosis* y los macrófagos (Zimmerli, Edwards *et al.* 1996) ya que se une a los sulfolípidos de la micobacteria. En cambio, el SR de clase B (CD36), ha sido implicado en la fagocitosis de células apoptóticas (Savill 1997).

Sin embargo, todavía no se sabe como los SRs pueden activar el citoesqueleto para absorber a la bacteria o, como actúan para unirse a la bacteria, siendo que la fagocitosis es ejecutada por otros receptores (Ernst 1998).

El MR de los macrófagos reconoce manosa y mucosa sobre la superficie de los patógenos y regula la fagocitosis de diversos microorganismos incluyendo a las micobacterias en presencia o ausencia de opsoninas, cuando las micobacterias

están opsonizadas con proteínas de C', la participación del MR en la fagocitosis de patógeno es menor que la de los receptores para C' (CRs) (Schlesinger 1996).

Por otra parte, el colesterol de la membrana del macrófago es importante para la entrada de las micobacterias debido a que se acumula en el sitio de entrada del microorganismo para asegurar su ingreso a la célula huésped (Gatfield y Pieters 2000).

La pared micobacteriana tiene moléculas ricas en manosa en posición terminal como la ManLAM, es uno de los ligandos para el MR en los macrófagos (Schlesinger, Kaufman *et al.* 1996). El MR se sobreexpresa por el estímulo del SP-A y el SP-D y se incrementa la capacidad fagocítica y la pinocitosis de moléculas con manosa, por lo que notablemente aumenta la capacidad de infección del macrófago por *M. tuberculosis*, en contraste, el IFN- γ disminuye la expresión del MR (Nigou, Zelle-Rieser *et al.* 2001).

Las micobacterias son fagocitadas por los macrófagos pulmonares y pueden sobrevivir dentro de los fagosomas, la clave de la infección con *M. tuberculosis* es la latencia prolongada, los organismos viables sobreviven en el hospedero durante décadas en donde los linfocitos T tienen diversas funciones durante la defensa contra la infección primaria y el control de la LTBI (Wong y Pamer 2003).

Los macrófagos alveolares infectados con cepas atenuadas o avirulentas de *M. tuberculosis* padecen apoptosis de una manera dependiente, en contraste a la infección con las cepas micobacteriales virulentas, las cuales inducen poca o

nula apoptosis, los macrófagos primarios son resistentes a la citotoxicidad TNF, pero llegan a ser los primeros en inducir la muerte que parte del TNF cuando son infectados con cepas atenuadas de *M. tuberculosis* y aliados micobacteriales, esto postula que esta respuesta de apoptosis representa un mecanismo de defensa innato contra la infección intracelular (Riendeau y Kornfeld 2003).

La producción de RNI y de ROI por las células inmunes innatas es considerada un mecanismo de defensa efectivo contra patógenos microbianos, el NO es importante en la defensa contra *M. tuberculosis* (Chan, Chan *et al.* 2001), incluso se ha sugerido que los medicamentos antituberculosos pueden ser efectivos *in vivo* solamente con la ayuda de NO derivado de iNOS.

Diversos estudios han demostrado que la forma inducible de la expresión del NOS (iNOS) es requerida para el control de la infección microbacterial (Chan, Tanaka *et al.* 1995; Shi y Ehrt 2006), la respuesta inmune frente a esta infección incluye la expresión de NOS2, cuyos productos pueden matar *in vitro* al *Mycobacterium*, con más potencia que muchos agentes antituberculosos convencionales (Rhee, Erdjument-Bromage *et al.* 2005).

En relación con la fusión fagosoma-lisosoma, se sabe que, durante la infección por el *Mycobacterium*, en el macrófago hay producción de amonio en abundancia, la cual alcaliniza el compartimiento lisosomal, inhibiendo su fusión con fagosomas y disminuyendo la toxicidad de las enzimas lisosomales.

Aunque es controversial el papel antimicobacteriano que desempeñan los ROI en la defensa del macrófago, se ha demostrado inhibición de este mecanismo a varios niveles por parte de algunos componentes de la pared de la

micobacteria, como el LAM (Ziegler-Heitbrock y Ulevitch 1993) del *Mycobacterium*.

Durante la infección, *M. tuberculosis* es fagocitada por macrófagos alveolares en los pulmones. La bacteria o crece para causar TB primaria o entrar a un estado de latencia en la cual puede persistir, algunas veces durante décadas, dentro del hospedero. Los mecanismos que permiten al *M. tuberculosis* sobrevivir y persistir no se han identificado (Shi y Ehrt 2006).

Interleucinas (IL)

Una de las primeras respuestas detectables de las células T al reconocimiento antigénico es la secreción de las proteínas denominadas citocinas que median muchas de las respuestas y funciones subsiguientes de las células T. La producción de citocinas implica la transcripción de nuevos genes y la síntesis de nuevas proteínas, estas citocinas se denominan IL.

Los determinantes más potentes del destino de las células Th parecen ser las citocinas presentes durante los procesos de diferenciación celular Th, IL-12 e IL-4, las cuáles fueron caracterizadas inicialmente como citocinas dominantes influenciando la diferenciación Th1 y Th2, respectivamente; mientras que, la IL-4 mantiene las citocinas prominentes para inducir la diferenciación Th2, las citocinas IFN- γ , IL-12, IL-18, IL23 e IL-27, influyen significativamente el desarrollo de Th1 (Szabo, Sullivan *et al.* 2003).

Las citocinas tipo 1 dependientes de la inmunidad celular son importantes en la defensa del hospedero contra patógenos intracelulares, el IFN- γ es el mayor activador de macrófagos infectados y es producido por células citocidas

naturales (NK) y Th1, al mismo tiempo monocinas como TNF- α e IFN- γ activan mecanismos microbicidas en macrófagos infectados necesarios para el control de la infección intracelular, las NK secretan IFN- γ en respuesta al reconocimiento de componentes desconocidos de microorganismos o en respuesta a la IL-12 (Lichtenauer-Kaligis, de Boer *et al.* 2003). El principal factor de crecimiento autocrino para la mayoría de las células T es la IL-12.

Después de la dimerización inducida por el ligando de IFN- γ en la cadena- β R2 son reclutados en el interior del complejo y el mayor factor que regula la producción de IFN- γ por las células Th1 y células NK es la IL-12, ésta es una citocina heterodimérica que consiste de una cadena p40 y está oculta en los macrófagos activados y en DCs, cuyas células se unen a la alta afinidad de los complejos de IL-12R que son compuestos por dos cadenas receptoras de citocinas, la IL-12R β y la IL-12R β 2, la señal intracelular por el complejo IL-12R depende de la fosforilación de IL-12 R β 2 asociada a una señal traductora STAT-4 la cual en humanos es únicamente activada por IL-12 o IFN- α ; además, el IFN- γ ejerce su efecto como un ligando homodimérico por el enlace a IFN- γ en la cadena- α R1 (Lichtenauer-Kaligis, de Boer *et al.* 2003).

Recientemente, IL-18 y la IL-23 han sido reconocidas como las principales citocinas heterodiméricas Tipo 1, la IL-18 amplifica la IL-12 dependiente de la producción de IFN- γ y promueve la inducción de una óptima inmunidad mediada por células tipo 1, además, la IL-23 tiene una subunidad p40 como la IL-12, la cual se une a una segunda cadena única, p19, el receptor para IL-23 consiste en una subunidad IL-12 R β 1, en un complejo con un miembro recientemente

identificado de la familia receptora homopoiatina, la IL-12 e IL-23 tienen funciones similares –aunque no idénticas- incluyendo la estimulación de la producción de IFN- γ (Lichtenauer-Kaligis, de Boer *et al.* 2003; Wozniak, Ryan *et al.* 2006).

El BCG puede reducir la formación de IgE específica, eosinofilia, e hipersensibilidad por vía aérea (AHR) inducida por el alérgeno con un incremento en la producción de IFN- γ (Hylkema, Timens *et al.* 2002).

Además, la inflamación crónica e AHR por vía aérea son indicadores de asma, un desorden alérgico asociado con un aumento de linfocitos CD4+ predominando Th2, emergiendo la hipótesis de la reducción a la exposición a infecciones bacterianas, por vacunación y el uso oportuno de antibióticos, favoreciendo una respuesta inmune Th2 (IL-4, IL-5, IL-13) en individuos susceptibles, mientras que, las infecciones bacterianas tempranas u otras modificaciones inmunológicas podrían promover al predominio de Th1 (IL-2, IFN- γ) (Hubeau, Singer *et al.* 2003), la principal citocina producida por las células T no estimuladas es la IL-2 que actúa como un factor de crecimiento y diferenciación de las células T.

Adicionalmente, el *Mycobacterium vaccae*, y el PPD de *M. tuberculosis* han mostrado que suprimen la alergia y la respuesta como el asma en ratones (Hattori, Okano *et al.* 2002; Ozdemir, Akkoc *et al.* 2003; Li, Yang *et al.* 2006) y últimamente, la AHR fue medida después de la exposición al BCG y fueron contadas las células en el fluido de lavado broncoalveolar, cuyas citocinas

fueron detectadas por análisis inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) (Li, Yang *et al.* 2006).

Los macrófagos alveolares representan la mayoría de la población celular inmune en la vía aérea del lumen constituyendo la primera línea de defensas del tracto respiratorio, por la producción de mediadores inflamatorios y reguladores en respuesta a un estímulo exógeno; la producción de varios factores solubles por los macrófagos y DCs, incluyen las citocinas inflamatorias IL-1 β , IL-6 y TNF- α , o citocinas moduladoras, tales como IL-10, IL-12 e IL-18 (Hubeau, Singer *et al.* 2003).

La IL-12 es un heterodímero enlazado a un disulfuro, ésta es liberada de las APC (macrófagos y DCs) por la micobacteria y es importante para el desarrollo de la inmunidad protectora contra la TB, los animales deficientes en IL-12 muestran un incremento de la susceptibilidad frente a la infección de *M. tuberculosis* y un decremento en la producción de IFN- γ ; la vacunación contra *M. tuberculosis* requiere la activación de las células Th1 para inducir la expresión de la IL-12 e IFN- γ (Cho, Lasco *et al.* 2005; Wozniak, Ryan *et al.* 2006).

La función predominante de las células Th1 co-activan las células T citotóxicas (CD8⁺), las cuales están caracterizadas por su producción del prototipo citocina proinflamatoria IL-12 e IFN- γ (Dovedi, Kirby *et al.* 2005). En adición, se reporta que las células Th1 producen IL-2 e IFN- γ (Okamoto, Hasegawa *et al.* 2005).

La producción de IL-10, IL-4 y TGF- β por las células Th2 que provocan la activación de las células B y esta principalmente asociada con la inmunidad

humoral (Dovedi, Kirby *et al.* 2005). Adicionalmente, se reporta que las células Th2 producen IL-4, IL-5 e IL-10 (Okamoto, Hasegawa *et al.* 2005).

La prostaglandina 2 (PGE₂), un producto de la cascada del ácido araquidónico y un potente modulador inmune, significativamente disminuye la regulación de la expresión de la IL-12, la cual puede ser debida a la capacidad de la PGE₂ de incrementar la síntesis de la IL-10 (Dovedi, Kirby *et al.* 2005).

Receptor Toll-like (TLR)

Los receptores de tipo *Toll*, se encuentran en la superficie celular de los fagocitos y de otras células que señalan la activación de los macrófagos en respuesta a productos microbianos tales como la endotoxina, en las respuestas de inmunidad innata. Los receptores de tipo *Toll* comparten homología estructural y vías de transducción de señales con el receptor de IL-1 de tipo I.

Recientemente, los receptores *Toll-like* (TLR) han emergido como puntos centrales de la inmunidad innata (Marodi 2006). Estos representan los receptores inmunológicos de una amplia variedad de patógenos, los cuales resultan en la activación de NF-κB y otros factores de transcripción incluyendo el factor regulador, IFN. Están expresados en la superficie de los monocitos, macrófagos, células epiteliales y DCs o en el citoplasma de células de tejidos diferentes (Marodi 2006).

El TLR2 es homólogo receptor de la IL-12 que, al igual que CD14 requiere de componentes séricos como el LPB para su señalamiento (Yang, Mark *et al.* 1998), esta molécula también está implicada en el reconocimiento e incorporación de células apoptóticas, durante la fagocitosis los TLR son

reclutados en los fagosomas, permitiendo favorecer la naturaleza de los patógenos, regulando de esta manera una respuesta inflamatoria adecuada (Devitt, Moffatt *et al.* 1998).

Los TLRs inducen coestimuladores del reconocimiento microbial que son requeridos para la activación efectiva de células T del patógeno específico y por lo tanto implica que la inmunidad innata dirige la respuesta de la inmunidad adaptativa a través del señalamiento TLR (Medzhitov y Janeway 2000).

Se ha demostrado que, la señal pro-inflamatoria estimulada por antígenos mico bacterianos como el LPS o por LAM está mediada por receptores de la familia del TLR, el TLR4 funciona como receptor para LPS de bacterias Gram (-), en tanto que TLR2 reconoce múltiples productos de bacterias Gram (+), el TLR2 del macrófago reconoce diversas moléculas de micobacterias como la lipoproteína de 19 kDa, LAM, fosfatidil-inositol y manana, el tipo de ligando de los TLR es capaz de polarizar la respuesta de los linfocitos Th, la lipoproteína de 19 kDa induce la producción de la IL-12 que es una citocina pro-Th1, la interacción de esta proteína con el macrófago incrementa la producción de NO, importante en los mecanismos de destrucción de las micobacterias intracelulares (Stenger y Aderem 2001).

Dentro del proceso de la cascada de activación de los TLRs se involucran diversas cinasas que activan el factor nuclear de transcripción (NF-kB) y otros factores de transcripción para controlar los efectores proinflamatorios, o son directamente citotóxicos para invadir al organismo o inducen una mayor defensa sostenida que puede involucrar numerosos tipos de células inmunes y citocinas (Beutler 2004).

Los patrones moleculares asociados al patógeno (PAMPs) gram-positivos tales como peptidoglicanos y lipopéptidos son reconocidos por TLR2, los cuales pueden interactuar con TLR6 o TLR1 para regular la respuesta a otros múltiples patógenos microbianos (Doherty y Arditi 2004; Kariko, Bhuyan *et al.* 2004).

El señalamiento del receptor TLR constituye el enlace esencial entre la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa y tiene una influencia mayor sobre la polarización de las células Th1/Th2 (Hoebe, Janssen *et al.* 2004; Iwasaki y Medzhitov 2004).

Adicionalmente, los TLRs y la respuesta inmune innata, la primera línea de defensas contra los microorganismos involucra no solo las células con función inmune primaria tales como, los macrófagos, células dendríticas y neutrófilos sino también tipos de células que parecen manifestar mayor vigilancia, tales como las células endoteliales de los vasos sanguíneos y células epiteliales en el intestino; en todos los casos, la familia de los receptores TLRs son el principal aparato sensorial que reconocen los PAMPs de una amplia variedad de patógenos; los TLRs no sólo son los receptores que reconocen los patrones, las proteínas intracelulares que juegan un papel importante, particularmente en la defensa contra los virus; sin embargo, la responsabilidad primaria para la detección del patógeno cae directamente sobre los TLRs (Doherty y Arditi 2005).

La expresión inducida por TLR de la traducción de coestimuladores del reconocimiento patrón no-clonal de la respuesta inmune antígeno específico (Doherty y Arditi 2005).

Los TLR en mamíferos guardan una gran homología estructural con el sistema *Toll* en *Drosophila*, donde estuvo implicado en la defensa del hospedero contra infecciones fúngicas; en adición, los receptores TLR2 y TLR4 tienen una función importante en la defensa del hospedero frente a *M. tuberculosis* y al LPS (Doherty y Arditi 2005).

Los TLR regulan las señales de la expresión genética de diversos patógenos y es acompañada por una fuerte descarga de actividades asociadas tales como la fagocitosis, opsonización, degradación y proceso de fragmentos moleculares durante la presentación y expresión de péptidos antimicrobianos, porque los patógenos expresan múltiples PAMPs que son reconocidos por distintos TLRs, hay redundancia significativa y probablemente cooperación entre los TLRs (Doherty y Arditi 2005).

Complemento (C') y sus receptores

El C' es un sistema de proteínas del suero y de la superficie celular que interaccionan entre sí y con otras moléculas del sistema inmunitario para generar importantes efectores de las respuestas inmunitarias innatas y adaptativas, es inespecífico, existe independientemente de toda inmunización y se encuentra en animales axénicos.

Está constituido por dos vías, la clásica y alterna, se activan mediante complejos antígeno-anticuerpo o por la superficie de los microorganismos, respectivamente y consisten en una cascada de enzimas proteolíticas que generan mediadores de la inflamación y opsoninas. Ambas vías conducen a la

formación de un complejo lítico celular final común que se inserta en las membranas de las células.

La capacidad adaptativa de las micobacterias es tan grande que la propia bacteria puede activar la vía alterna del C' para favorecer la producción de C3b y C3bi (Schlesinger, Bellinger-Kawahara *et al.* 1990) y puede inducir la formación de C3 convertasa reclutando fragmentos de C2a para generar C3b sin la activación temprana de los componentes de la vía clásica y alterna del C' (Schorey, Carroll *et al.* 1997).

Algunas moléculas del sistema de C' tienen una función dual en la fagocitosis de las micobacterias, la fracción C3b se une inespecíficamente a los carbohidratos de la superficie del patógeno y es reconocida a través de CRs: CR1 (CD35), CR3 (CD11b/CD18) y CR4 (CD11c/CD18) de los macrófagos durante la fagocitosis (Brown 1991; Carroll 1998).

Las micobacterias pueden ser opsonizadas con moléculas de con moléculas de la fracción de C', C3b, inmunoglobulinas G (IgG), proteína de unión a manosas (MBP), así como por el factor surfactante SP-A; esto ayuda a la bacteria a ingresar al macrófago de manera eficiente. Las micobacterias opsonizadas con IgG se unen a receptores para el Fc de las inmunoglobulinas (FcR γ) y esta vía de entrada desencadena una respuesta más agresiva en contra de ellas.

El hábitat intracelular confiere ventajas importantes a las micobacterias porque quedan protegidos de mecanismos efectores de la respuesta inmune del hospedero, como la lisis por C'.

Muchas de las acciones biológicas del sistema de C' están mediadas por la unión de fragmentos del C' a receptores de membrana expresados en diversos tipos celulares. El receptor para el C' tipo 1 (CR1 o CD35) actúa principalmente induciendo la fagocitosis de partículas recubiertas por C3b y C4b y la eliminación de inmunocomplejos de la circulación.

El CR3 o Mac-1 o CD11bCD18 es un receptor para el fragmento iC3b generado por proteólisis de C3b que desempeña un papel importante en la fagocitosis de partículas recubiertas de iC3b. El CR3 tiene una doble función en la fagocitosis: reconoce a iC3b directamente unido a la superficie de los microorganismos y puede reconocer los residuos glucosilados en la superficie micobacterial, por tener dominios tipo lectina en la región terminal de la cadena β -2 (CD11b) (Schlesinger, Bellinger-Kawahara *et al.* 1990; Cywes, Godeneir *et al.* 1996).

El receptor Mac-1 se expresa en neutrófilos, fagocitos mononucleares, mastocitos y células NK. Es miembro de la familia de las integrinas de los receptores de superficie y está formado por la cadena α (CD11b) unida de forma no covalente a una cadena β (CD18) que es idéntica a las cadenas β de dos moléculas de integrina estrechamente relacionadas.

La interacción de CR3 es específica hacia ciertos carbohidratos capsulares ya que puede ser inhibida por competencia con otros carbohidratos como la N-acetil-D-glucosamina, o por glucanos capsulares purificados de *M. tuberculosis* y por mananas, pero no por arabinomananas capsulares (Cywes, Hoppe *et al.* 1997).

Además, la eliminación de polisacáridos capsulares con aminoglucosidasa reduce marcadamente la unión no opsónica a este receptor, lo que significa que las micobacterias utilizan dichos receptores como mecanismos que pueden estar asociados a la virulencia de la cepa de *Mycobacterium*, esto explica que las diferencias en la composición sacarídica de la cápsula de las cepas patógenas y no patógenas sean importantes para su patogénesis (Ernst 1998).

Opsoninas y colectinas

Una opsonina es una macromolécula que se une a la superficie de un microorganismo que puede ser reconocida por los receptores de superficie de los neutrófilos y los macrófagos y que aumenta la eficacia de la fagocitosis del microorganismo. Las opsoninas son los anticuerpos IgG, que son reconocidos por los receptores Fc γ presentes en los fagocitos y fragmentos de las proteínas del C' y que son reconocidos por CR1 (CD35) y por la integrina leucocítica Mac-1 o CR3.

Las colectinas son una familia de proteínas, entre ellas la lectina de unión a manosa (MBL), que se caracterizan por la presencia de un dominio de tipo colágeno y de un dominio de lectina (es decir, de unión a carbohidratos). Las colectinas participan en las funciones del sistema de inmunidad innata actuando como receptores de reconocimiento de patrón de microorganismos y pueden activar el sistema del C' uniéndose a C1q.

Las vías aéreas distales y los alvéolos pulmonares, generalmente son los sitios de entrada del *Mycobacterium* por lo que los factores surfactantes pulmonares se pueden comportar como potentes opsoninas para las micobacterias

(Voorhout, Veenendaal *et al.* 1992), esta ruta de entrada hace que el fluido alveolar sea más abundante y esto se atribuye a la Proteína-A surfactante (SP-A), ésta es una proteína hidrofílica que forma parte de la respuesta inmune innata en el pulmón, es miembro de la familia colectina, la cual incluye la proteína-D surfactante (SP-D), la fracción de C', C1q y las proteínas transportadoras de manosa, cuyas funciones principales son facilitar la opsonización en varios patógenos por macrófagos alveolares y son activadores del C'; SP-A también incrementa la opsonización de *M. tuberculosis* y del BCG de *M. bovis* (Gold, Hoshino *et al.* 2004).

Se ha sugerido que la SP-A además de actuar como opsonina, también puede modular la actividad de uno o más receptores responsables de la unión directa de *M. tuberculosis*, sin embargo, aún no están completamente esclarecidos los mecanismos de estas interacciones (Ernst 1998).

La SP-A y SP-D son producidas y secretadas por células epiteliales alveolares Tipo II y por células no ciliadas bronqueolares, estas proteínas surfactantes también tienen proteínas enlazadas a un carbohidrato dependiente de Ca^{2+} que contiene un grupo amino terminal unido a cisteína que participa en la oligomerización covalente y una región que requiere colágeno.

Estas proteínas son altamente homólogos a la colectina proteína unida a manosa y a la conglutinina bovina; SP-A es una glicoproteína oligomérica compuesta de subunidades peptídicas de 28 a 35 kDa que forman un complejo de seis trímeros a través de interacciones covalentes y no covalentes, incrementa la fagocitosis a través de la opsonización de microorganismos y sobrerregula la función receptora del fagocito y puede también inducir la

formación de ROI y la quimiotaxis por macrófagos, así mismo favorece la interacción entre *M. tuberculosis* y los macrófagos (Ferguson, Voelker *et al.* 1999), las proteínas surfactantes también se pueden unir a los carbohidratos de la pared de la micobacteria y ser reconocida por los receptores para SP-A de los macrófagos (Nepomuceno, Henschen-Edman *et al.* 1997; Ernst 1998).

La interacción entre *M. tuberculosis* y SP-D se debe a LAM de la pared celular de *M. tuberculosis* que sirve como molécula de enlace para SP-D, esa interacción reduce la adherencia de la bacteria a los macrófagos de humanos (Ferguson, Voelker *et al.* 1999).

Al respecto, parece ser que SP-A regula directamente la inflamación de macrófagos y puede incrementar o disminuir la producción de citocinas proinflamatorias, dependiendo de la fuente de SP-A, del estímulo y del tipo de macrófagos; estudios recientes han demostrado que SP-A juega un papel importante en la regulación de la respuesta inmune del hospedero hacia la micobacteria y regula poco la producción de NO en macrófagos alveolares de murino infectado con *M. tuberculosis*, la SP-A incrementa la producción de NO y TNF- α en el marco de la infección micobacterial; se ha determinado que los niveles de la SP-A se alteran por diversas enfermedades [neumonía bacteriana, fibrosis quística, SIDA, silicosis, protenosis alveolar y fibrosis pulmonar] (Gold, Hoshino *et al.* 2004).

La micobacteria tiene varias estrategias para evitar ser destruida por los fagocitos; por ejemplo, puede tomar a los MR para activar diversos eventos, inhibe el Ca^{2+} que señala los receptores mediados por C', el cual puede

contribuir a que fallen los mecanismos de muerte también, la micobacteria puede inhibir la acidificación del fagosoma y modificar el trayecto intracelular de las vacuolas, así ellas se comportan como parte del compartimiento endosomal en lugar de los fagolisosomas tóxicos, esas vacuolas liberan grandes cantidades de LAM las cuales se insertan dentro del GPI que domina en la membrana celular; la LAM es un GPI que modifica la habilidad para responder a IFN y a la presentación del antígeno a las células T CD4+ (Rook, Seah *et al.* 2001).

Inmunoglobulinas (Ig's) y sus receptores

Las Ig's, también llamadas anticuerpos son un tipo de molécula glucoproteica, producida por los linfocitos B y que se une a antígenos, a menudo con un elevado grado de especificidad y afinidad. Las regiones variables N-terminales de las cadenas pesadas y ligeras forman los sitios de unión al antígeno, mientras que las regiones constantes C-terminales de las cadenas pesadas interaccionan funcionalmente con otras moléculas del sistema inmunitario.

Las Ig's secretadas realizan diversas funciones efectoras, como la neutralización de antígenos, la activación del C' y la promoción de la destrucción de microorganismos dependiente de los leucocitos.

Las micobacterias pueden ser opsonizadas por Ig's, principalmente por IgG para ser ingeridas por los macrófagos, es posible que éstos utilicen este mecanismo para adherir e ingerir a las micobacterias vivas, pero no es utilizado como primera elección por las micobacterias, porque se requiere de grandes cantidades de la opsonina para conseguir una adherencia óptima, el

internamiento de la micobacteria le confiere acceso a la ferritina, que es una enzima que se encuentra en abundancia en los lisosomas y le aporta a la micobacteria nutrientes para su metabolismo (Armstrong y Hart 1975).

Los receptores para fagocitosis opsónica como FcRS y los CRs, tienen asociadas a la formación del fagosoma varias moléculas del citoesqueleto como la vinculina y la paxilina, en cambio en receptores para fagocitosis no opsónicos como el MR, este tipo de moléculas no se movilizan para la formación del fagosoma (Allen y Aderem 1996).

La fracción cristalizable (Fc) de las Ig's (región C-terminal) que opsonizan a las micobacterias es reconocida con gran afinidad para diversos receptores Fc (FcRs), principalmente por la clase de Ig, IgG (Fc γ Rs) (Ravetch 1997; Ravetch y Clynes 1998).

Existen diversos tipos de receptores Fc γ (Fc γ R), como el Fc γ R1 de alta afinidad que median la fagocitosis por los macrófagos y los neutrófilos, el Fc γ RIIb que transduce señales inhibitoras en las células B y el Fc γ RIIIb que media la selección y la activación de las NK.

Los Fc γ Rs entran en dos clases de receptores: receptores que contienen motivos ITAM en sus dominios intracelulares, los cuales reclutan cinasas y activan las cascadas de fosforilación y receptores que contienen motivos ITIM en sus dominios intracelulares, los cuales reclutan fosfatasas que inhiben la señal (Ravetch y Bollard 2001).

Linfocitos T CD4+/CD8+

Los linfocitos T son un tipo de células que media la respuesta inmune celular en el sistema de inmunidad adaptativa. Los linfocitos T maduran en el timo, circulan en la sangre, en tejidos linfoides periféricos y son reclutados a sitios periféricos de exposición al antígeno. Expresan receptores para el antígeno TCR que reconocen fragmentos peptídicos de proteínas extrañas unidos a moléculas del MHC. Las subpoblaciones funcionales de los linfocitos T son las células T CD4⁺ colaboradoras y los linfocitos T citolíticos (CTL) CD8⁺.

Las células T CD4⁺ producen antígenos proteicos asociados a moléculas de clase II del MHC derivados de bacterias intravesiculares, estas células T producen IFN- γ y activan los macrófagos para destruir microorganismos residentes en el interior de los fagosomas, la infección primaria por el bacilo tuberculoso induce en el organismo la memoria inmunitaria mediada por las células T CD4⁺ (Muller, Cobbold *et al.* 1987).

Las CD4 son células T restringidas por el MHC de clase II, subpoblaciones de timocitos, monocitos y macrófagos, son un correceptor de señalización y adhesión en la activación de células T restringidas por el MHC de clase II inducida por el antígeno, desarrollo de timocitos, receptor primario para retrovirus VIH.

La reducción selectiva de subclases de células T demostró que las células T CD4 tienen una función predominante en el esclarecimiento micobacterial, pero las células T CD8⁺ también contribuyen (Muller, Cobbold *et al.* 1987).

Las células T CD8⁺ responden a péptidos asociados a moléculas de clase I derivados de antígenos citosólicos, subpoblaciones de timocitos y destruyen las células infectadas; de hecho, las células T CD8⁺ aisladas de animales infectados lisan los macrófagos infectados y producen IFN- γ (De Libero, Flesch *et al.* 1988). Las CD8 son un correceptor de señalización y adhesión en la activación de células T restringidas por el MHC de clase I inducida por el antígeno y desarrollo de timocitos.

El BCG también induce las células T CD8⁺ específicas (Stover, De la Cruz *et al.* 1991), la importancia de estas células en la defensa antimicobacteriana ha sido confirmada, se ha encontrado que los ratones *knockout* cepa $\beta 2m^{-/-}$ son más susceptibles a la infección con *M. tuberculosis* inducida por vía intravenosa (i.v.) (Flynn, Goldstein *et al.* 1992).

Se ha evaluado la capacidad de las células T CD4⁺ y CD8⁺ para producir IFN- γ por ELISA (Wood y Rothel 1994), en donde se ha observado que aún con terapias específicas para TB, hay una pérdida acelerada de células T CD4, por lo que posteriormente se da un gran riesgo de tener una infección oportunista, originando el deceso de los portadores (Wallis, Kyambadde *et al.* 2004), en esta situación se incrementa la apoptosis de células T por antígenos inducidos.

Se ha establecido que las células T CD4⁺ son las células T protectoras dominantes, pero hay evidencia de que las células T CD8⁺ también tienen una función en la respuesta contra la micobacteria, los animales deficientes en células T CD8⁺ son incapaces de controlar la infección de *M. tuberculosis*, y los experimentos de transferencia celular han mostrado que las células T CD4⁺ y

CD8⁺ pueden transferir inmunidad protectora; otros estudios sugieren que las células T CD8⁺ pueden contribuir a la resolución de la infección por la producción de IFN- γ y la citólisis de células infectadas; el análisis de la infiltración de las células T pulmonares seguida por la infección en aerosol revela que ambas células T CD4⁺ y CD8⁺ se elevan 8 semanas después de la infección, aunque, a las cuatro semanas se observaron CFU en pulmón (Feng, Bean *et al.* 1999).

El número total de células T CD4⁺ y CD8⁺ decrecieron a la doceava semana, el número de células T en pulmón y en nódulos linfáticos del mediastino incrementó de 5 a 10 por campo a las cuatro semanas de la infección, hubo un decremento significativo en la regulación de CD62L, más del 90% de CD4⁺ y 70% de CD8⁺ de las células T del pulmón disminuyeron en la regulación de CD62L (Feng, Bean *et al.* 1999).

La citotoxicidad y producción de IFN- γ son funciones para las células T CD8⁺ en la inmunidad antimicrobacteriana, pueden ser subdivididas en base a los patrones específicos de secreción de citocinas Tipo I, segregando primeramente IL-2 e IFN- γ y Tipo II, la IL-4, la IL-5 y la IL-10; al respecto, se ha propuesto que la respuesta de células T CD8⁺ es restringida por moléculas del MHC clase I, las cuales presentan antígenos endógenos que son sintetizados dentro de las APC y procesados en el citoplasma; por otro lado, los así llamados antígenos "exógenos" que son interiorizados al espacio extracelular por endocitosis o fagocitosis son procesados dentro de compartimientos

vacuolares durante la presentación por moléculas del MHC clase II (Liebana, Girvin *et al.* 1999).

Existe una serie de experimentos en modelos murino y humano en donde se realza la importancia de las células T CD8⁺ en infecciones micobacteriales, tales como la transferencia de precursores de células T citotóxicas CD8⁺ las cuales, inducen inmunidad protectora contra la infección, el agotamiento selectivo de las células T CD8⁺ en ratones más susceptibles a la infección con *M. tuberculosis*; la microglobulina β_2 en ratones tiene un realce de susceptibilidad a la infección de *M. tuberculosis*; los clones de células T CD8⁺ de ratones inmunizados muestran una actividad citolítica de antígeno específico micobacteriano; la inmunización de ratones con plásmidos expresando a la micobacteria hsp 65, antígeno 85-A, o el antígeno 38-kDa resulta en la generación del antígeno específico CD8⁺ asocia la toxicidad con protección de los desafíos subsecuentes con *M. tuberculosis*; las células T CD8⁺ humanas restringidas por moléculas CD1b son capaces de inhibir *in vitro* el crecimiento de *M. tuberculosis*; finalmente, se ha demostrado la presencia del MHC clase I restringido por la citólisis específica CD8⁺ para ESAT-6 en humanos infectados (Liebana, Girvin *et al.* 1999).

Las células T transferidas proveen protección solo si producen IFN- γ (Tascon, Stavropoulos *et al.* 1998), de hecho éste es esencial para esclarecer la infección micobacteriana con las células T CD4⁺ y CD8⁺ produciendo *in vivo* IFN- γ , seguida de la infección en pulmón con *M. tuberculosis*, las células T CD4⁺ efectoras de la inmunidad celular activan a los macrófagos y a los linfocitos T

CD8⁺ citotóxicos, éstos actúan en colaboración en la defensa contra las bacterias intracelulares (Caruso, Serbina *et al.* 1999; van Pinxteren, Cassidy *et al.* 2000).

La infección micobacterial también ha demostrado una función para el MHC clase I restringida por las células T CD8⁺ (Behar, Dascher *et al.* 1999; Sousa, Mazzaccaro *et al.* 2000).

La molécula de murino CD 1d no parece tener un papel significativo en la presentación de antígenos micobacteriales hacia las células T CD8⁺ (Behar, Dascher *et al.* 1999; Sousa, Mazzaccaro *et al.* 2000); sin embargo, el MHC H2-M3 de la clase de molécula 1d presenta varios péptidos de *M. tuberculosis* hacia las células T CD8⁺ (Chun, Serbina *et al.* 2001). Otros antígenos también han sido identificados incluyendo un epítipo identificado en la proteína micobacterial MPT64 (Feng, Demangel *et al.* 2001). Entonces, la presentación H2-M3 de péptidos N-formyl, puede también contribuir a la defensa contra la infección de *M. tuberculosis* (Wong y Pamer 2003).

El reclutamiento de CD4⁺ y CD8⁺ hacia el pulmón ocurre simultáneamente, con el predominio de las células T CD4⁺ y la producción de IFN- γ (Serbina y Flynn 1999). Las células T CD4⁺ tienen una función muy grande en la defensa temprana contra la infección de *M. tuberculosis* y ambas células T CD4⁺ y CD8⁺ controlan la micobacteria latente (Scanga, Mohan *et al.* 2000; van Pinxteren, Cassidy *et al.* 2000). Sin embargo, hay reportes de que el reclutamiento, expresión y producción de IFN- γ por células T CD8⁺ en pulmón con *M.*

tuberculosis no depende de la presencia de células T CD4⁺, ni de la adquisición de la actividad citolítica (Feng, Bean *et al.* 1999; Serbina y Flynn 2001).

Se ha estudiado que en ratones la carencia de todas las células T o sólo de células T CD4⁺ los hace más susceptibles a la infección con *M. tuberculosis* en aerosol, los ratones que carecen de células T CD8⁺ sobreviven, así como los ratones silvestres y la carga micobacteriana tiene un incremento de 10 veces (Mogues, Goodrich *et al.* 2001).

Y se ha determinado que, *Mycobacterium* resulta en una enfermedad lentamente progresiva que ocasionalmente es mortal después de 40 semanas de adquirida la infección, este proceso se ha asociado con una disminución de la función inmune atribuida a un incremento en la apoptosis de células T y una disminución en la producción de la citocina protectora IFN- γ , aunque en humanos se ha descrito una disminución en la función de las células T en infecciones crónicas micobacteriales, se conoce poco acerca del estado de activación y función de las células T en estados prolongados de esas infecciones, se han utilizado muchos marcadores para tener acceso a la activación de las células T y otros estados de memoria (Mannering y Cheers 2002).

En este tipo de infecciones, se han identificado marcadores de activación temprana como CD62L (L-selectina), CD25 (cadena de la IL-2, el receptor IL-12R) y CD44 (pgp-1), su expresión ha sido asociada por algunos con memoria inmunológica, la expresión CD62L es poco regulada en la activación de las células T, mientras que la expresión de CD44 es aumentada; ambas moléculas

son reguladas en la circulación celular y las CD44 permiten la unión de las células hacia el hialuronidato y entran de las células al interior de los tejidos, mientras que la baja regulación de CD62L libera células de la circulación continua entre los nódulos linfáticos (Mannering y Cheers 2002).

Las células T CD8⁺ tienen una función relevante en la defensa contra la micobacteria inoculada por vía i.v., mientras que, en aerosol su aportación para la defensa contra la infección primaria, es menos relevante (Wong y Pamer 2003). Las células T CD4⁺ predominantemente producen IFN- γ durante las primeras semanas de la infección, mientras que la producción de células T CD8⁺ de IFN- γ ocurre más tarde (Wong y Pamer 2003). Así mismo, se ha definido que para proteger contra la TB, es esencial el desarrollo de la respuesta inmune celular Th1, expresada por las células CD, CD4⁺ y Tc CD8⁺ ocultas en IFN- γ (Tollefsen, Pollock *et al.* 2003).

Actualmente, es un reto determinar la especificidad de las células T CD8⁺ seguida de la infección de *M. tuberculosis* (Wong y Pamer 2003). Estudios en modelos animal y humano han establecido que las células CD4⁺ y CD8⁺ contribuyen a la respuesta celular hacia *M. tuberculosis*; como resultado, el bacilo tubérculo incluido dentro de los granulomas desarrollados, y aunque la mayoría de las bacterias son destruidas, un pequeño número de bacilos persisten y pueden causar reactivación de la enfermedad (Dieli, Ivanyi *et al.* 2003).

El asma alérgico involucra la vía aérea y una inflamación inducida por el alérgeno, leucocitos inflamatorios, eosinófilos y algunas veces neutrófilos,

dándose la activación de los linfocitos T, los cuales actúan con alérgenos inhalados en el tracto respiratorio, los linfocitos T CD4⁺ tienen mayor función en el inicio de la inflamación alérgica vía aérea, vía producción de citocinas Th2, las cuales detonan el reclutamiento de los eosinófilos hacia la vía aérea y la subsecuente activación (Lagranderie, Nahori *et al.* 2003).

En pacientes coinfectados con el HIV tipo 1 y *M. tuberculosis*, la expresión de CD69 se correlacionó con los resultados de la prueba cutánea de la tuberculina (TST) y la producción de IFN- γ en los linfocitos T CD4⁺ estimulados con PPD, evaluado por citometría de flujo (Avgustin, Kotnik *et al.* 2005).

Interferón-*gamma* (IFN- γ)

El IFN- γ , también es conocido como IFN inmunitario o de tipo II, es una citocina producida por los linfocitos T y las células NK cuya función principal consiste en activar a los macrófagos en las respuestas inmunitarias tanto innatas como adaptativas. La citocina clave requerida para una inmunidad mediada por células es el IFN- γ , el cual funciona por estímulo de los macrófagos infectados para inducir la fusión fagolisosomal y destruir a la bacteria intracelular (Wozniak, Ryan *et al.* 2006).

La medición de la liberación de IFN- γ en sistemas de cultivo de sangre total se ha desarrollado como un método de diagnóstico para TBB (Wood, Corner *et al.* 1992). Numerosos estudios han identificado el IFN- γ oculto en tipos de células como macrófagos, células dendríticas, células T CD4⁺ nativas, e incluso en las células B, el IFN- γ ejerce sus efectos por enlazarse al receptor de IFN- γ , compuesto de cadenas IFN- γ R1 y R2, presentes en muchas células linfoides y

no linfoides, se han identificado individuos con mutaciones en los componentes de las rutas que señalan los receptores de IFN- γ , los cuales tienen inmunodeficiencias profundas, afectándoles principalmente las infecciones micobacterianas intracelulares (Feng, Bean *et al.* 1999).

Una función esencial del IFN- γ es activar a los macrófagos, resultando en un incremento de la fagocitosis, la expresión del MHC clase I y II, y la inducción de IL-12, NO y producción de superóxido, los cuales son importantes en la eliminación de patógenos intracelulares, la función exacta de IFN- γ en la diferenciación Th1 ha sido controversial, ya que un gran número de sistemas *in vitro* e *in vivo* han estado en conflicto con respecto a las acciones de IFN- γ en las células T CD4⁺ (Feng, Bean *et al.* 1999).

Para examinar la contribución de las subclases de células T hacia la producción de IFN- γ , las células del pulmón normal e infectado fueron estimuladas con anti-CD3 MAb durante 16 horas, durante todo el curso de la infección, la concentración de ambas poblaciones CD4⁺ y CD8⁺ células productoras de IFN- γ fue mayor en los pulmones infectados que en los pulmones no infectados (Feng, Bean *et al.* 1999).

La citotoxicidad y producción de IFN- γ son funciones para las células T CD8⁺ en la inmunidad antimicobacteriana, estas células pueden ser subdivididas en patrones específicos de secreción de citocinas, tales como células Tipo 1, segregando primeramente IL-2 e IFN- γ y secreción primaria de células Tipo 2, como la IL-4, la IL-5 y la IL-10 (Liebana, Girvin *et al.* 1999). Las citocinas IFN- γ

e IL-2 las cuales son consistentes con la respuesta con Th1, fueron observadas en orina después del tratamiento de BCG (Nadler, Luo *et al.* 2003).

Se ha propuesto que, la respuesta de células T CD 8⁺ es restringida por moléculas del MHC clase I, las cuales presentan antígenos endógenos que son sintetizados dentro de las APC y procesados en el citoplasma (Liebana, Girvin *et al.* 1999); además, se ha encontrado que la inmunidad mediada por IL-12 e IFN- γ es de crucial importancia para controlar la infección con la bacteria intracelular (Lichtenauer-Kaligis, de Boer *et al.* 2003). Por otro lado, el *M. tuberculosis* induce una respuesta inmune proinflamatoria, caracterizada por la expresión de IFN- γ , TNF e IL-12 (Fuller, Flynn *et al.* 2003).

Se ha determinado que esta expresión de la citocina TNF, indica la presencia de macrófagos infectados por *Mycobacterium*, por lo que TNF es un mediador clave durante la respuesta inflamatoria local y sistémica en TB, además de su habilidad por promover la apoptosis (Wallis, Kyambadde *et al.* 2004). Adicionalmente, la dependencia de CD40 sobre la inducción de la respuesta de IFN- γ parece estar en función de la dosis de antígeno en la infección i.v. y en aerosol de ratones CD 40 $-/-$, ya que una dosis elevada de *M. tuberculosis* llega a ser necesaria para la co-estimulación en la inducción en respuesta de IFN- γ (Lazarevic, Myers *et al.* 2003).

Las citocinas, tales como IFN- γ , factor estimulador de colonias GM y TNF- α , activan a los macrófagos para resistir el crecimiento de patógenos intracelulares para incrementar la producción de mejores moléculas efectoras

antimicrobianas, incluyendo las especies de ROI y de NO (Weatherby, Zwilling *et al.* 2003).

El sistema nervioso simpático actúa para mantener la homeostasis durante los períodos críticos de la infección liberando norepinefrina en el nervio simpático y epinefrina hacia la médula adrenal, las catecolaminas modulan la actividad celular, incluyendo las células del sistema inmune, éstas pueden activar o suprimir la función de los macrófagos.

Se ha mostrado que la adición de la epinefrina hacia el IFN- γ activado en macrófagos peritoneales inhibe su habilidad para resistir el crecimiento de *M. avium* (MAC), este efecto está mediado por el receptor 2-adrenérgico y se correlacionó con una disminución en la producción de NO, estos macrófagos fueron tratados en reposo con epinefrina y se inhibió el crecimiento micobacteriano, con esto se observa que las catecolaminas activan a los macrófagos (Weatherby, Zwilling *et al.* 2003).

El examen de células de lavados broncoalveolares ha indicado que *M. tuberculosis* induce una respuesta de citocinas polarizadas tipo 1 caracterizada por la expresión de IFN- γ . Los granulomas con nula evidencia de caseación expresaron IFN- γ mRNA o IFN- γ mRNA más IL-4 mRNA, mientras que los granulomas caseosos expresaron poco IFN- γ mRNA o IL-4 mRNA, esos descubrimientos sugieren que esas citocinas tienen la función de determinar la estructura del granuloma (Fuller, Flynn *et al.* 2003).

El desarrollo del granuloma comúnmente depende de los movimientos de las células a través del sitio de inflamación debido a la expresión de moléculas

quimiotácticas, las cuales tienen mayor función en el reclutamiento de las células en el sitio de la inflamación, las funciones de las CK incluyen la quimiotaxis, activación de la integrina y degranulación de distintas subclases de leucocitos expresando receptores de CK específicas, la expresión de quimiocinas proinflamatorias es inducida por señales locales medioambientales, tales como TNF- α o IFN- γ , los granulomas inducidos experimentalmente con agentes micobacteriales permiten el desarrollo de citocinas tipo 1 y la expresión de CK, IFN- γ induce a los macrófagos y DCs para producir IFN- γ inducible (Fuller, Flynn *et al.* 2003).

El IFN- γ es una citocina pleotrópica que tiene una función esencial en ambas fases de la respuesta inmune, innata y adaptativa, las células Th1, las NK, CD8⁺, y CD4⁺ son las más potentes en cuanto a la producción de IFN- γ , pero no son las únicas fuentes de IFN- γ (Szabo, Sullivan *et al.* 2003), esta citocina, así como el TNF- α activan mecanismos microbicidas en macrófagos infectados necesarios para el control de la infección intracelular (Lagranderie, Nahori *et al.* 2003).

Además, se ha determinado que el IFN- γ y el TNF- α actúan como efectores de la resistencia hacia la micobacteria, el TNF- α tiene una función importante en la formación y mantenimiento del granuloma y con el IFN- γ activa macrófagos para producir moléculas efectoras tales como intermediarios de nitrógeno y de oxígeno reactivo (Jeevan, McFarland *et al.* 2006).

Las concentraciones de IFN- γ e IL-4 fueron determinadas con kits de ELISA, el umbral detectado fue determinado en base a curvas estándar establecidas con

160 pg de IFN- γ e IL-4 y 80 pg de IL-10 (Westenbrink, Stienstra *et al.* 2005). Estas concentraciones son una medida de inmunidad tipo 1, que es ampliamente usada como representativa de la activación de células T, Th1 y Tc1 puede ser medida usando sangre total, la intensa respuesta de IFN- γ ha sido detectada frente a los antígenos usados en sujetos infectados o expuestos a la micobacteria (Black, Weir *et al.* 2003).

Recientemente, se ha visto que la producción de IFN- γ es estimulada por IL-12 y suprimida por IL-10 y por el factor transformante-*beta* (TGF- β), los cuales son liberados de los macrófagos activados, IFN- γ es una citosina producida por los linfocitos T y las NK cuya principal función es activar a los macrófagos en las respuestas inmunitarias tanto innatas como la adaptativa, el IFN- γ es un homodímero glucosilado de subunidades de 21 a 24 kDa, sus fuentes celulares principales son las células T (Th1, células T CD8+) y células NK (Cho, Lasco *et al.* 2005).

Actualmente, se han observado diferencias inmunológicas en infantes no infectados expuestos al HIV, los cuales generan una respuesta inmune celular neonatal inmadura, resultando de una disminución en la producción de IFN- γ resultando un incremento en la susceptibilidad a la infección de patógenos intracelulares, incluyendo *M. tuberculosis* (Van Rie, Madhi *et al.* 2006).

Transformación blastoide de linfocitos

La linfoproliferación de linfocitos T *in vitro* ante un estímulo mitogénico es un método utilizado para evaluar los eventos celulares que ocurren durante la

activación de los linfocitos de manera controlada. La activación policlonal como la realizada por medio de mitógenos permite estudiar la respuesta de gran cantidad de clones de células T y tener un panorama general del estado de la respuesta inmune celular del individuo (Buddle, Skinner *et al.* 2002; Waters, Palmer *et al.* 2003).

La proliferación de linfocitos T es una de las respuestas biológicas que ocurren cuando en condiciones fisiológicas los linfocitos reconocen un antígeno, son activados, se producen los factores de crecimiento y se expresan sus receptores necesarios para la proliferación, con la finalidad de generar gran cantidad de linfocitos efectores de la respuesta inmune celular.

El máximo de absorbancia del colorante azul de coomassie en solución ácida varía de 495 a 595nm tras añadir proteína debido a la estabilización de la forma iónica del mismo por interacciones hidrofóbicas e iónicas. El azul de coomassie reacciona principalmente con residuos de Arg y en menor grado con residuos de His, Lys, Tyr, Trp y Phe. Hay varios protocolos según la cantidad estimada de proteína a medir.

Es un ensayo rápido y sensible para cuantificar proteínas. El método se basa en el cambio de color que experimenta el colorante azul "coomassie" en medio ácido en presencia de proteínas. Las proteínas producen el cambio de la coloración anaranjada del reactivo a una tonalidad azulada, cuya intensidad es proporcional a la concentración de proteínas (Silva, Nunes *et al.* 2004; da Silva y Arruda 2006).

La respuesta inmune específica esta mediada por linfocitos. El primer paso en los estudios de los linfocitos consiste en su aislamiento a fin de estudiar su

comportamiento *in vitro*. Los linfocitos pueden aislarse de sangre periférica mediante centrifugación en distintos gradientes de densidad. Las células mononucleares (monocitos y linfocitos) tienen menor densidad que los eritrocitos y células polimorfonucleares.

La mayoría de las células mononucleares tienen densidades por debajo de 1.007 g/ml. Debido a estas características, las células pueden ser aisladas por centrifugación sobre un medio isoosmótico con una densidad de 1.077 g/ml, después de lo cual, los eritrocitos y los polimorfonucleares sedimentan a través del medio, mientras que las células mononucleares permanecen en la interfase del medio (Gasbarre, Romanowski *et al.* 1985).

Se ha desarrollado una técnica colorimétrica rápida que emplea el colorante 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) 2,5 bromuro de difeniltetrazolio (MTT), que es reducido por deshidrogenadas mitocondriales de células viables a formazan púrpura (Mosmann 1983; Green, Reade *et al.* 1984), se ha utilizado en una variedad de ensayos que incluyen la cuantificación de linfocinas (Green, Reade *et al.* 1984), citotoxicidad, proliferación (Mosmann 1983) y activación celular.

Mecanismo de acción de la inmunidad inducida por la vacuna BCG

El empleo de BCG induce alguna protección contra la TB. Por desgracia las distintas cepas de BCG con las cuales se preparan las vacunas tienen capacidad antigénica distinta. A esto puede deberse la ineficacia de algunas campañas de vacunación. La vacuna BCG por su efecto inespecífico de estímulo al sistema inmune, puede mejorar las defensas generales.

La protección contra *M. tuberculosis*, agente etiológico principal de la TB en humanos, puede ser inducida por inmunización con cualquiera de las vacunas BCG de *M. bovis* BCG, o con el bacilo del ratón campestre, *M. microti*, miembro del complejo *M. tuberculosis* (Pym, Brodin *et al.* 2002).

El control y erradicación de *M. bovis* en países en vías de desarrollo ha resultado en una reducción significativa en la incidencia de la enfermedad en humanos, desde la introducción de la pasteurización. Actualmente, en los casos de personas mayores a menudo el resultado es el resurgimiento de una infección adquirida en la infancia. así como también en individuos inmunocomprometidos que debido al HIV están predispuestos a la reactivación de una LTBI (Cooke, Gear *et al.* 2002).

Surge la necesidad de desarrollar nuevas vacunas, y un incremento en el estudio de la inmunología de TB animal y humana con una explicación más completa de la respuesta de células T, particularmente la TBB, detalla aspectos de inmunidad celular en relación con la infección de *M. bovis* que se mantiene por tiempo indefinido. Al respecto, la inmunidad contra las infecciones micobacterianas es considerada esencialmente mediada por la célula y depende de la interacción de macrófagos con linfocitos T (Liebana, Girvin *et al.* 1999).

La vacunación de poblaciones con animales salvajes infectados puede ser buena opción para el control, en donde los animales tienen valor invaluable de preservación, y puede formar parte de un programa de control integrado para otras especies (Corner, Buddle *et al.* 2002).

Por otro lado, en Nueva Zelanda, se ha elegido en gran escala, a la sarigüella Australiana (*Trichosurus vulpecula*) usando venenos para su control y así comprobar la evidencia de su función como vectores de la infección de *M. bovis*, para ganado bovino y venados de granja. A más de 5 años los hatos de ganado bovino han reducido en más de 50 % la prevalencia del ganado bovino infectado y esto se atribuye al programa de control con envenenamientos (Skinner, Keen *et al.* 2002).

La eficacia protectora del BCG atenuado de *M. bovis* varía de 0 a 80% de acuerdo con diversas pruebas clínicas y de campo, mientras que la epidemia actual de la TB indica que en general la vacuna BCG ha fallado para conferir inmunidad contra la TB (Brandt, Feino Cunha *et al.* 2002; Buddle, Skinner *et al.* 2002; Olleros, Guler *et al.* 2002). Por lo tanto, se ha enfatizado la importancia del antígeno diferencial por BCG en el contexto de la inmunidad protectora mediada por anticuerpos (Grode, Kursar *et al.* 2002).

Sin embargo, en neonatos la vacunación de BCG confiere protección contra TB en la infancia durante un periodo de 10 a 15 años. Para una eficacia elevada puede tener importancia el uso de revacunaciones a un tercio de los niños adolescentes en el mundo (Brandt, Feino Cunha *et al.* 2002).

A pesar del incremento del conocimiento de blancos antigénicos dentro de enfermedades micobacterianas, es necesaria información adicional sobre el reconocimiento antigénico de las subclases de células T para facilitar el desarrollo de pruebas de diagnóstico y vacunas; así, la atención se ha enfocado a la función de las células T $\alpha\beta$ (Welsh, Kennedy *et al.* 2002).

El BCG HK indujo fuertemente la liberación de TNF- α e IL-12 por los macrófagos alveolares y el BCG EFD dio lugar a una producción importante de IL-12 en macrófagos alveolares pero falló al generar TNF- α , esta disociación en la producción de TNF- α e IL-12 fue confirmada comparando la infiltración *in vivo* de BCG HK y de BCG EFD en vías aéreas (Hubeau, Singer *et al.* 2003).

Se investigó si cada uno de los tratamientos con las preparaciones de BCG en ratones recién nacidos modularían la respuesta pulmonar de las citocinas, cuando el ratón fue sensibilizado con ovoalbúmina y sometidos a la exposición alérgica, mientras que los ratones pretratados con BCG HK mostraron niveles elevados de la transcripción de citocinas Th1 y Th2 pre-tratados con BCG EFD mostrando niveles de transcripción similares a los controles normales, esto sugiere que la preinmunización con BCG EFD reconstituye fuertemente el balance Th1/Th2 (Hubeau, Singer *et al.* 2003).

Aunado a esto, se ha determinado que la vacunación con BCG en recién nacidos genera elevados niveles de inmunidad y que la sensibilización de animales muy jóvenes frente a los antígenos de micobacterias del medioambiente a las seis semanas de edad no afecta la efectividad de la vacuna BCG (Buddle, Wedlock *et al.* 2003).

Por lo que, se ha considerado el gran potencial que ofrece como transportador recombinante el BCG cepa atenuada de *M. bovis*, proporcionando antígenos proteicos externos para ser reconocidos por el sistema inmune, se ha determinado que la vacunación de alces con una vacuna atenuada viva de *M. bovis*, induce una respuesta sérica de anticuerpos hacia los antígenos de *M.*

bovis; además, *in vivo* provoca la inducción de células mononucleares hacia los sitios de la administración de antígenos micobacteriales, como ejemplo una respuesta DTH, una respuesta humoral *in vivo* predominante, sin embargo, no pudo ser favorable para el desarrollo de la inmunidad protectora frente a la vacunación de TB (Waters, Palmer *et al.* 2003).

La dependencia de CD40 sobre la inducción de la respuesta de IFN- γ parece estar en función de la dosis de antígeno en la infección i.v. y en aerosol de ratones CD 40 *-/-*, una dosis elevada de *M. tuberculosis* llega a ser necesaria para la co-estimulación en la inducción en respuesta de IFN- γ , este resultado, puede tener complicaciones importantes para desarrollar vacunas y producir respuesta inmune en humanos seguida de una infección de *M. tuberculosis* (Lazarevic, Myers *et al.* 2003).

Se ha demostrado que en el tratamiento vía intranasal (i.n.), el BCG de *M. bovis* suprime diversos aspectos patológicos del asma (Hubeau, Singer *et al.* 2003; Lagranderie, Nahori *et al.* 2003), la inflamación crónica e AHR, en donde se presenta un desorden alérgico asociado con un aumento de Linfocitos CD4+, predominando Th2, mostrando que el agrupamiento de las CD hacia los pulmones durante las primeras horas después de la administración de BCG permite a las células T iniciales ocultar al IFN- γ a citocinas tipo Th1 que tienen una función primordial en la protección contra el asma, el número de macrófagos activados produce principalmente mediadores inflamatorios que se incrementan en las lesiones asmáticas, y durante los ataques de asma ambas fases la temprana y la tardía de la inflamación aguda involucra los macrófagos

alveolares, han mostrado que estimulan un desbalance de citocinas Th2, mientras que los macrófagos activados expresan moléculas CD80 y CD86, las cuales se requieren para soportar la producción de citocinas Th2 por las células T; de este modo, los macrófagos alveolares pueden estar involucrados en la patogénesis del asma, por la estimulación de las citocinas Th2 y Th1 (Hubeau, Singer *et al.* 2003).

Las citocinas IFN- γ e IL-2 las cuales están presentes con la respuesta de Th1, fueron observadas en orina después del tratamiento de BCG (Nadler, Luo *et al.* 2003). Actualmente, se ha determinado que la vacunación del BCG puede proteger a los animales del asma, pero el efecto del BCG en la prevención del asma en la niñez es controversial en humanos (Li, Yang *et al.* 2006).

En un estudio realizado a 62 jóvenes adultos sanos que no habían recibido la vacuna BCG, se les vacunó y se observó gran variación en la protección que puede proveer la vacuna BCG de *M. bovis*, en donde cerca del 60% de los individuos vacunados presentaron buena producción de IFN- γ ; también, cuando los PPDs de varias micobacterias nontuberculosas medioambientales (atípica) fueron usados para estimular cultivos de sangre total de los mismos sujetos, los PPDs de los miembros del complejo *M. avium* - *M. intracelular* - *M. scrofulaceum* reforzaron la respuesta de IFN- γ (Black, Weir *et al.* 2003).

La inmunización vía aérea provee mejor protección inmune en los pulmones sobre una infección secundaria, bajo estas circunstancias las células de hospederos vacunados por vía i.n. pueden sufrir activación y expansión en pulmón más rápidamente durante la exposición a la micobacteria y circular

fuera del pulmón a través de los órganos linfoides distantes, como en bazo; adicionalmente, se observó que la vía i.n. confiere mayor inmunogeneicidad que por la vía subcutánea (s.c.) contra la TB pulmonar (Chen, Wang *et al.* 2004).

En la provincia de Alberta, Canadá hay una elevada prevalencia de TB en inmigrantes y en poblaciones aborígenes y se han identificado las prácticas para prevención y tratamiento de esos grupos culturales, entre las comunidades e individuos se observó el poco conocimiento acerca de la TB y éste es un problema permanente en las comunidades de alto riesgo porque solo los profesionales de la salud conocen y tratan a los pacientes únicamente en el estado activo de la TB, por lo que se considera una prioridad implementar programas de educación como estrategia importante para prevenir la TB (Gibson, Cave *et al.* 2005).

La PGE₂ reprime la regulación de la citotoxicidad del macrófago inducida por BCG (Yamada, Kuroda *et al.* 2002). Sin embargo, la terapia intravesical con el BCG es el tratamiento principal para el cáncer de vejiga, el 40% de los pacientes fallan en la respuesta a este tratamiento, el potencial durante la producción de la inhibición de PGE₂ por DCs tratadas con BCG, se estudió en el contexto de polarización preferencial de la respuesta inmune a través del esclarecimiento de la respuesta inmune tipo Th1 (Dovedi, Kirby *et al.* 2005).

La inhibición de la síntesis de la PGE₂ por la inhibición de la enzima ciclooxigenasa (COX) favoreció la producción de IL-12 por células dendríticas activadas con BCG. Este potencial resultaría de generación de la respuesta inmune Th1, polarizada por la respuesta de las células T que puede mejorar la eficacia de la terapia BCG (Dovedi, Kirby *et al.* 2005).

Choi y colaboradores, analizaron 4 cepas diferentes de vacuna BCG para suprimir el asma en ratones femeninos BALB/c (BCG 1×10^6 : Pasteur 173P2; Tokio 172; Tice y Connaught), cuyas cepas suprimieron el asma induciendo un cambio en el balance Th1/Th2, hacia Th1 sin incremento de la actividad de células T regulatorias relacionadas con la IL-10 (Choi, Lin *et al.* 2005).

Williams y colaboradores, evaluaron 24 vacunas para TB que han demostrado ser eficaces en modelos animales, el experimento se hizo con la exposición en aerosol de la vacuna, la sobrevivencia a las 17 o 26 semanas fue usada como parámetro de medición de la eficacia de la vacuna y el conteo de micobacterias en pulmones y bazo, así como los cambios histopatológicos observados en pulmones (Williams, Hatch *et al.* 2005).

Métodos de diagnóstico de tuberculosis

Dentro de las estrategias para combatir la TB, el diagnóstico subyace como uno de los pilares más importantes, debido a que permite la atención e inicio del tratamiento y en consecuencia minimiza los riesgos de contagio y dispersión de la enfermedad. La identificación de la micobacteria ha sido efectuada determinando su habilidad para utilizar sus componentes, sus características de crecimiento y su morfología colonial (McNabb, Adie *et al.* 2006).

Baciloscopia

La baciloscopia, es la técnica fundamental en toda investigación bacteriológica de la TB, en la detección de casos y control de tratamientos. Con un costo bajo y de rápida ejecución, la TB es una técnica que permite identificar al 78-80% de los casos pulmonares positivos.

En el diagnóstico de TB se detecta el bacilo ácido resistente por frotis microscópico (Ziehl-Neelsen) y cultivo de *M. tuberculosis* en medios apropiados. Aunque el frotis microscópico es rápido, el cultivo es la “prueba de oro” para el diagnóstico, pero toma de 6 a 8 semanas (Vera-Cabrera, Rendon *et al.* 1999).

En Brasil, se realizó un estudio para aislar el *Mycobacterium* spp. en muestras de leche de vacas sospechosas o positivas a la TB, en un total de 780 muestras de leche de 52 animales, las muestras se cultivaron en medio Löwenstein-Jensen con glicerol reducido (0.5%) y medio de Stonebrink, se mantuvieron a 37° durante 90 días, el género de cada colonia observada se determinó con los métodos de tinción Ziehl-Neelsen y auramina, el aislamiento fue confirmado en 78 muestras colectadas de 19 animales; de acuerdo a la cromatografía en capa fina, tiempo y características de la temperatura de crecimiento y aspecto de las colonias, en los 19 animales eliminados se encontró: MAC (5.26%), *M. fortuitum* (10.52%), *M. bovis* (5.26%) y *Mycobacterium* spp (78.95%) (Bonini, Langoni *et al.* 2001), cuyo resultado muestra una incidencia con casos subclínicos relativamente alta 78.95% de 19 vacas con aislamiento positivo de la micobacteria, presentada en más de un cuarto de la población afectada, los resultados refuerzan la participación de la leche en la transmisión de la

micobacteria a diversas especies animales; en Brasil, hay evidencias de que aproximadamente el 47% de la leche se vende cruda en las áreas rurales y urbanas (Bonini, Langoni *et al.* 2001).

Análisis inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA)

La técnica ELISA se fundamenta en el uso de anticuerpos marcados con una enzima (peroxidasa), de forma que los conjugados resultantes tengan actividad tanto inmunológica como enzimática. Al estar uno de los componentes (antígeno ó anticuerpo) insolubilizados sobre la placa, la reacción antígeno-anticuerpo quedará inmobilizada y por tanto, podrán fácilmente ser revelada mediante la adición del sustrato, que al actuar sobre la enzima, producirá un color observable a simple vista o cuantificable mediante un colorímetro, todo este proceso se lleva a cabo en una microplaca de polipropileno, la cual contiene adherido el antígeno o el anticuerpo, según lo que se vaya a determinar.

Es una reacción serológica que utiliza conjugados para poder visualizar la reacción del complejo Antígeno-Anticuerpo, el diagnóstico de IFN- γ en sangre total, se basa en la disminución de IFN- γ de linfocitos sensibilizados incubados con un antígeno específico, por lo que la detección de IFN- γ en plasma es por ELISA con anticuerpos monoclonales específicos (Carroll 1998; Walravens, Marche *et al.* 2002).

La cantidad de IFN- γ producido en respuesta a un antígeno micobacteriano es determinado por ELISA usando un anticuerpo monoclonal específico para IFN- γ bovino (Wood, Corner *et al.* 1992). Ha sido estandarizado el método ELISA con glicolípidos naturales y sintéticos para el serodiagnóstico de TB y lepra, esta prueba se simplificó para ser usada a nivel de campo y así se desarrolló la prueba “dot blot” simple y rápida que contiene el 2,3-di-O-acetiltrealosa (DAT), un glicolípido natural, cuya sensibilidad y especificidad fueron comparadas con ELISA convencional y con ampELISA, una técnica con elevada sensibilidad (Vera-Cabrera, Rendon *et al.* 1999).

La producción de citocinas como IL-2, IFN- γ , IL-10, IL-13, y TGF- β ha sido medida por ELISA (Saverino, Merlo *et al.* 2002), también se ha utilizado para estimar los niveles de anticuerpos de IgG, IgA e IgM contra el antígeno de 16 kDa de *M. tuberculosis* (Raja, Uma Devi *et al.* 2002). Una prueba serológica sería un método ideal para la implementación mundial de un diagnóstico simplificado en tiempo y costo, con una sensibilidad del 80% y especificidad de 95% acorde a la OMS (Julian, Matas *et al.* 2004), también se ha usado para estimar los niveles de anticuerpos de IgG, IgA e IgM contra el antígeno de 16 kDa de *M. tuberculosis* (Raja, Uma Devi *et al.* 2002).

La técnica de ELISA al cuantificar el IFN- γ , proporciona una oportunidad para evaluar la respuesta de las células T, la relación entre el reconocimiento de las células T y PPD, revela que la respuesta inmunológica inducida por la micobacteria es diferente a la respuesta frente al PPD, identifica antígenos específicos que revelan la presencia de TB (Black, Weir *et al.* 2003). ELISA

demuestra la presencia de IFN- γ en esputo (Huard, Chitale *et al.* 2003) y en fluido pleural (Sharma y Banga 2004) y es útil en la detección de más del 85% de casos positivos de TB, ELISA ofrece mejores perspectivas en la actualidad por ser una técnica rápida, automática y además proporciona resultados reproducibles (Mukherjee, Daifalla *et al.* 2004).

Black y colaboradores, realizaron con el método de ELISA la medición de IFN- γ , en muestras de individuos jóvenes adultos que no habían sido vacunados, al vacunarles y medir el IFN- γ observaron que el 60% de los jóvenes respondieron al IFN- γ y al PPD de *M. tuberculosis*, la citocina recombinante (2,000 a 31 pg/ml) fue usada para la curva normal; el límite más bajo detectado de ELISA fue de 31 pg/ml y sólo el 4% de los sujetos produjeron 62 pg/ml de IFN- γ ; en el análisis estadístico se observó la asociación entre los pares de antígenos, con tuberculina, la respuesta de la prueba superficial y la respuesta de IFN- γ se evaluaron a través de las tabulaciones cruzadas, chi-cuadrada y la prueba de McNemar, la cual fue usada para probar sensibilidad, los investigadores concluyeron que, ELISA proporciona una oportunidad para evaluar la respuesta de las células T permitiendo investigar las relaciones entre el reconocimiento de las células T de antígenos individuales y los PPDs, revelando que las respuestas inmunológicas inducidas por la micobacteria medioambiental son diferentes a las respuestas frente a los PPDs, identificando antígenos específicos que revelan la presencia de TB (Black, Weir *et al.* 2003).

Actualmente, la TST, es el método estándar para el diagnóstico de la LTBI en los EUA (McNabb, Adie *et al.* 2006). Los programas actuales del control de la TBB involucran la TST (Ewer, Cockle *et al.* 2006).

Una derivación de las técnicas de ELISA, es el Análisis inmunospot ligado a enzimas (ELISPOT), el cual permite desarrollar un sistema de diagnóstico para una LTBI, el sistema mide la cantidad de IFN- γ producido por las citocinas o por PBMC previamente estimuladas con PPD o antígenos más específicos (Arend, Van Meijgaarden *et al.* 2002; Ewer, Cockle *et al.* 2006).

Recientemente, bajo este mismo fundamento, se ha implementado el sistema QuantiFERON-TB test (QFT) (Cellestis Inc. Valencia, Calif.), aprobado por la Administración de drogas y alimentos (FDA) de los EUA, para detección de TB (Mazurek y Villarino 2003), este kit nuevo QTF es usado para la detección de la LTBI (Taggart, Hill *et al.* 2004; Porsa, Cheng *et al.* 2006), la inmunidad hacia la infección de *M. tuberculosis* es primariamente una respuesta inmune mediada por células frente a antígenos de *M. tuberculosis*, esta respuesta es detectada por QFT midiendo el IFN- γ en sangre total incubado con PPD de *M. tuberculosis*, un ensayo de ELISA detecta la cantidad de IFN- γ producido por las células T (Taggart, Hill *et al.* 2004).

Cuando las células T son estimuladas por el derivado proteico purificado de *M. tuberculosis*, ellos producen la citocina IFN- γ , la cual permite a los macrófagos eliminar al patógeno intracelular (Taggart, Hill *et al.* 2004).

Los glicolípidicos como antígenos pueden ser evaluados para el serodiagnóstico de TB (Grode, Kursar *et al.* 2002; Julian, Matas *et al.* 2004).

Últimamente, se ha realizado la técnica ELISA para diagnosticar la TB pulmonar ocasionada por el complejo MAC y se demuestra el nivel de los anticuerpos principales del lípidoglicopéptido que refleja la actividad de la infección por el MAC, el lípidoglicopéptido es una mezcla de antígenos de 11 cepas de referencia de MAC (Kitada, Maekura *et al.* 2005).

Prueba cutánea de la tuberculina (Mantoux)

En 1890, Robert Koch demostró que la aplicación intradérmica del bacilo tubérculo vivo o muerto o sus extractos podrían provocar una respuesta DTH, implementando así, el valor diagnóstico de la TST (Palmer, Waters *et al.* 2006); de hecho, la TST se ha mantenido como la prueba primaria de diagnóstico para TB tanto en ganado como en humanos (Waters, Palmer *et al.* 2006).

La TST, también conocida como el método Mantoux, es una manera sencilla de investigar si se tiene una infección inactiva de TB (latente), la exploración para LTBI por el PPD, es controversial porque involucra la exploración de individuos libres de síntomas y de tratamientos preventivos, además son frecuentes las reacciones cruzadas hacia antígenos presentes en la TST, así la interpretación de TST frecuentemente resulta complicada en individuos vacunados con BCG de *M. bovis*, por lo que se recomienda la exploración de TB por rayos X para prevenir la transmisión de TB en inmigrantes en poblaciones locales (Breuss, Helbling *et al.* 2002; Mukherjee, Daifalla *et al.* 2004).

La TST usada para detectar LTBI tiene elevada especificidad y sensibilidad (Barnes 2004; Lalvani 2004); en adición, se ha investigado que cuando las células T son estimuladas por el PPD de *M. tuberculosis*, ellas producen la

citocina IFN- γ , la cual permite a los macrófagos matar al patógeno intracelular, la medición de IFN- γ permite detectar *in vitro* la respuesta inmune mediada por células (Taggart, Hill *et al.* 2004).

Actualmente, la TST es el método estándar para identificar la LTBI en los EUA a pesar de sus limitaciones, incluyendo la necesidad de monitorear por lo menos dos contactos por paciente (Porsa, Cheng *et al.* 2006).

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La técnica de PCR desde su introducción, se ha convertido en una herramienta indispensable tanto en la investigación básica como en el diagnóstico, ha tenido un impacto muy grande, pues tiene una gran sensibilidad y especificidad; además, permite obtener resultados a partir de 100 bacilos por muestra en cuestión de horas (Pfyffer 1999).

El inventor de la técnica es Kary Mullis, premio *nobel* en 1993, las polimerasas, las enzimas o fermentos que se usan para la prueba, están presentes en todos los organismos vivos y su tarea es copiar el material genético y también leer y corregir las copias; primero, se desnaturaliza el material genético para separar los cromosomas que tienen forma de espirales o hélices, es decir se tienen que desenredar esos espirales y separar calentándolos a 90-96°C (94°C durante 1 minuto). Las hélices están formadas por dos cadenas iguales que se separan, una de las mitades no se separa en fragmentos, sino que se queda íntegra y sirve de “plantilla” y la otra parte se utiliza para el copiado, el segundo paso es la “hibridación”, que consiste en que las partes que han sido separadas forman una cadena y la polimerasa empieza a sacar copias de fragmentos de la mitad

que quedó como plantilla para formar una doble hélice nueva (45 segundos/54°C), la plantilla permanece intacta y se siguen formando copias indefinidamente, este es el tercer paso, el cual se llama extensión; en él la reacción continúa hasta que se interrumpa voluntariamente el proceso, es la replicación secuencial de la plantilla (2 minutos/72°C) (Sumnienski, Queiroz *et al.* 2002).

Dentro de los métodos que se han propuesto para expedir el diagnóstico de TB se incluye la determinación del ADN micobacteriano por PCR, la detección de antígenos de *M. tuberculosis* en muestras biológicas, y la medición de la respuesta inmune. De esos métodos, el más favorable para el diagnóstico clínico es el que emplea las técnicas serológicas, que son fáciles de realizar y requieren reactivos sencillos (Vera-Cabrera, Rendon *et al.* 1999).

La PCR está basada en que las enzimas que realizan la síntesis del ADN requieren la presencia de un indicador o *primer* para copiar la cadena que les sirve de molde y en que la capacidad del ADN de formar híbridos es dependiente de la temperatura, en el caso de *M. tuberculosis*, la muestra se trata con lisozima, proteinasa K y dodecil sulfato de sodio (SDS) para romper las células; el ADN se extrae con cloroformo-CTAB se agregan cada una de las mezclas de reacción, esta mezcla está compuesta por dos iniciadores específicos para la secuencia de inserción IS6110, característica del complejo *M. tuberculosis* y los cuatro desoxirribonucleótidos componentes del ADN y la ADN polimerasa (Taq polimerasa); los nucleótidos suministrados complementan las regiones que flanquean el fragmento por amplificar y en ciclos sucesivos de

síntesis, esta enzima amplifica millones de veces (Sumnienski, Queiroz *et al.* 2002).

Esta técnica PCR detecta y amplifica una secuencia genómica característica del complejo *M. tuberculosis*, por lo que es útil para distinguirlo de otras micobacterias y ha sido el método más sensible y rápido para identificar la infección por *Mycobacterium* (Miller, Jenny *et al.* 2002; Sumnienski, Queiroz *et al.* 2002), posteriormente, se puede identificar cualquier secuencia de nucleótidos (virus, bacteria, insectos, mamíferos; muestras de sangre, el bulbo de un pelo, saliva, tejidos, excremento, e incluso muestras con miles o millones años de antigüedad) (Sumnienski, Queiroz *et al.* 2002).

La PCR es una prueba que en muestras bacilosκόpico-negativas posee una sensibilidad del 95% y especificidad del 45 al 77% (Barnes 1997) y en muestras positivas a la TB se observa una especificidad y sensibilidad del 95% (Gamboa, Manterola *et al.* 1998; Scarparo, Piccoli *et al.* 2002).

Se han desarrollado métodos basados en PCR transcriptasa reversa (RT-PCR) para medir cambios en el modelo de transcripción de *M. tuberculosis* en respuesta a la inmunidad adaptativa, Th 1-mediada por la inmunidad del hospedero (Shi, Jung *et al.* 2003).

La espigotipificación es un método basado en PCR y es capaz de analizar los polimorfismos dependientes de las cepas en la región cromosomal de repetición corta directa (DR) la cual consiste de 36-bp idénticos (Jou, Chiang *et al.* 2005). En adición, los ensayos de PCR diseñados para amplificar el gen del antígeno de *M. tuberculosis* 38-kDa han dado resultados positivos en especies de *M.*

bovis y *M. africanum*, así como *M. tuberculosis*, pero no en otras micobacterias atípicas (Black, Weir *et al.* 2003).

La PCR, es el Standard de oro para el diagnóstico de TB en fluidos corporales (Lodha y Kabra 2004); también, se ha utilizado esta técnica para detectar las cepas de *M. tuberculosis* resistentes a la INH y para identificar el complejo *M. tuberculosis* (Herrera-Leon, Molina *et al.* 2005).

Recientemente, se llevó a cabo la estimación de la susceptibilidad a través de la infección experimental con *M. tuberculosis* utilizando al perro como modelo experimental, en donde se utilizó para el diagnóstico la técnica PCR en comparación con métodos clásicos de laboratorio (Bonovska, Tzvetkov *et al.* 2005); los cambios histopatológicos observados, estuvieron caracterizados con inflamación específica y formación de granulomas de células epiteloideas con caseificación central.

Los resultados obtenidos en el análisis comparativo, el estudio en PCR, bacteriológico y patomorfológico, manifiestan que el método de amplificación de DNA es una técnica útil, sensible, confiable y conveniente para la detección directa de *M. tuberculosis* en muestras de tejido infectadas con *Mycobacterium*, con o sin lesiones visibles, además los perros manifestaron un resultado negativo a la TST (Bonovska, Tzvetkov *et al.* 2005; Rao, Ahmed *et al.* 2006).

En este estudio, se observó que los perros no presentaron síntomas clínicos de enfermedad durante el tiempo del estudio, lo que es indicativo que al tener la presencia de la micobacteria y estar eliminando el bacilo en las expectoraciones hacen al perro un fuerte reservorio de la enfermedad, siendo un riesgo potencial de infección para humanos y otros animales, enfatizando su significado

epidemiológico y su importante función en la diseminación de la TB (Bonovska, Tzvetkov *et al.* 2005).

Además, PCR es un método mucho más rápido que los métodos tradicionales, solo es necesario de 1 a 2 días para la preparación de la muestra, mientras que para los métodos bacteriológicos tradicionales son necesarios de 2 a 3 meses y para un estudio histopatológico se necesitan de 10 a 20 días (Bonovska, Tzvetkov *et al.* 2005)

Citometría de flujo

La citometría de flujo es una tecnología que permite la medida simultánea de múltiples características físicas de una sola célula, estas medidas son realizadas mientras las células (partículas) pasan en fila, a una velocidad de 500 a 4000 células/segundo, a través del aparato de medida de una corriente de fluido. Permite el análisis de dos parámetros el FSC y SSC, éste último detecta la complejidad de la estructura interna de la célula, y tres parámetros de fluorescencia (FL1, FL2, FL3) y una cuarta fluorescencia en equipo de dos láser (Janeway 1996).

En el citómetro de flujo coinciden la mecánica de fluidos, láser, óptica, electrónica e informática. A las células que serán examinadas se les acopla un fluorocromo a través de un anticuerpo monoclonal que reconoce una estructura específica en la célula, posteriormente las células son suspendidas en el centro de un flujo de líquido isotónico que es impulsado a gran velocidad por un orificio estrecho y deben pasar a través de una fuente luminosa (láser) de forma secuencial. El láser al incidir con cada célula, se desvía y este cambio de

dirección es registrado por detectores especiales; por otra parte, el reactivo fluorescente al ser excitado, emite luz en una longitud de onda determinada (color) que es registrado por detectores colocados de forma perpendicular al rayo láser. Cada uno de éstos detectores ofrece una información que es convertida en impulsos eléctricos y posteriormente en códigos digitales que pueden ser visualizados en una computadora, los resultados serán presentados a manera de histogramas o “dot-plots” (Harboe, Wiker *et al.* 1998).

La citometría de flujo puede ser usada para detectar rápidamente la susceptibilidad de *M. tuberculosis* hacia varios agentes antimicrobianos y pueden estar disponibles dentro de las 24 hrs. de iniciación de la prueba y no requirieron del crecimiento de los organismos de *M. tuberculosis* para que determinaran la susceptibilidad (Norden, Kurzynski *et al.* 1995); en contraste, se ha reportado que los resultados con esta técnica están disponibles a las 72 hrs. después del inicio de la prueba (Moore, Kirk *et al.* 1999; Bonecini-Almeida 2000).

También, se utiliza para el aislamiento de microbios y su identificación, la detección del incremento de niveles de anticuerpos para un patógeno particular en el curso de una enfermedad y la detección directa de componentes microbianos (ácidos nucleicos y proteínas) en muestras clínicas obtenidas de diferentes tejidos o fluidos corporales son las herramientas principales para el diagnóstico de laboratorio de infecciones microbianas (Alvarez-Barrientos, Arroyo *et al.* 2000).

Su especificidad y la posibilidad de usar anticuerpos marcados usando fluorocromo para antígenos específicos lo convierte en una de las más poderosas herramientas en la identificación de patógenos, una ventaja en su uso es que no necesita del cultivo celular, es un método simple y rápido. En conjunción, con anticuerpos fluorescentes se usa para detectar antígenos de superficie de *Mycobacterium*, *Brucella*, *Mycoplasma*, *Pseudomona*, etc.; se usan anticuerpos que permiten la detección de tipos celulares particulares (100 células/ml en 30 minutos) en poblaciones heterogéneas (Alvarez-Barrientos, Arroyo *et al.* 2000).

La activación de las células T- γ - δ de bovino se pueden observar por tres rutas: i. Producción de IFN- γ demostrada por citometría de flujo por tinción celular; ii. Progresión dentro de la fase de replicación de ADN del ciclo celular por incorporación de nucleótidos marcados por radiación; iii. Progresión directa por fijación de mitosis por ester succinimidilcarboxifluoresceína (CFSE) cargados de células y cuantificación del número de divisiones celulares (Baldwin, Sathiyaseelan *et al.* 2002).

Otras estrategias de diagnóstico para tuberculosis

Se ha utilizado una serie de sistemas no-radiométricos para la detección de la presencia de micobacterias, como el sistema MB/BacT (Benjamin, Waities *et al.* 1998), BACTEC 9000® (Pfyffer, Cieslack *et al.* 1997), y el tubo indicador de crecimiento micobacteriano MGIT® (Pfyffer, Welscher *et al.* 1997), muestran diferentes niveles de eficiencia y funcionan midiendo cambios en la presión de

gas, producción de CO₂ y consumo de O₂ ya sea fluorométrica o colorimétricamente.

Estos métodos permiten detectar micobacterias en baciloscopias positivas, se ha utilizado un método BACTEC® para diagnosticar la presencia de TB, el cual requiere de 5 a 10 días en contraste con medios convencionales para probar la susceptibilidad a los medicamentos fenotípicos en medios sólidos que requieren de 10 a 30 días (Pfyffer, Cieslack *et al.* 1997; Herrera-Leon, Molina *et al.* 2005).

Dentro de otros métodos de diagnóstico, se ha empleado un “parche” que libera el antígeno TB *MPB64* por su capacidad de distinguir entre TB pasiva y controles sanos PPD-positivos; sin embargo, este tipo de técnicas se toman con ciertas reservas, por la gran variación de los antígenos entre especies y por el tipo de respuesta inmunológica dado por la población en diversas zonas geográficas, las proteínas inmunogénicas *MPB64* y *MPB80* de BCG de *M. bovis* fueron purificadas para homogeneizar y comparar con *MPB70*, en donde *MPB70* y *MPB80* mostraron distribución similar en las sub-cepas de BCG, ambas se encontraron en concentración elevada en cultivos de fluidos de sub-cepa de BCG de Tokio, Moreau, Rusia, Suecia y en pequeñas concentraciones en las subcepas Glaxo, Tice, Copenhagen y BCG Pasteur.

La secuencia de aminoácidos en amino-terminal fue idéntica en los primeros 30 residuos de *MPB70* y *MPB80*, así como en las reacciones con anticuerpos anti-*MPB70* y reacciones cutáneas de DTH, las dos proteínas tienen propiedades similares, pero son diferentes a la proteína *MPB64* que tiene mayor peso molecular, y la secuencia de aminoácidos N-terminal no mostró homología con *MPB70* (Harboe, Nagai *et al.* 1986).

Posteriormente, se encontró que el antígeno TB *MPB64* muestra una sensibilidad del 98% y una especificidad del 99%, en un estudio realizado para diagnosticar tuberculosis activa, este antígeno se utilizó impregnado en un “parche” transdérmico (Nakamura, Einck *et al.* 2000).

Se ha realizado la identificación de ácido tubérculo-esteárico en muestras de líquido cerebroespinal por cromatografía de gases (Muranishi, Nakashima *et al.* 1990; Alugupalli, Olson *et al.* 1993). Estudios basados en preparaciones de antígeno crudo revelan que los individuos sanos poseen anticuerpos, disminuidos por la exposición a la bacteria comensal, al medio ambiente de la bacteria, y por vacunaciones que ocasionan reactividad cruzada con varios antígenos de *M. tuberculosis*, casi todos los individuos sanos o enfermos tienen anticuerpos hacia epítomos en regiones de esos antígenos.

Se han aislado y caracterizado varios antígenos como el DnaK de 71-kDa, GroEL 65-kDa, factor de elongación Tu 47-kDa, el homólogo PstA 44-kDa, L-alanina dehidrogenasa 40-kDa, PhoS 38-kDa, superóxido dismutasa 23-kDa, una proteína extramembranal 23-kDa, tioredoxina 12-kDa, y GroES 14-kDa (Laal, Samanich *et al.* 1997).

Para superar el impedimento creado por la reactividad cruzada se han purificado antígenos tales como PhoS 38-kDa, antígeno 85 30/31-kDa, lipoproteína 19-kDa, GroES 14-kDa, y LAM.

La elección de esos antígenos fue determinada por su disponibilidad, su inmunodominancia en el sistema inmune animal, o la facilidad su purificación bioquímica más que por su reactividad en la respuesta inmune humana, el antígeno de 38-kDa tiene una elevada sensibilidad y especificidad, y la

presencia de anticuerpos anti-38-kDa esta asociada con el tratamiento, avance y TB recurrente, el uso de estos antígenos, seleccionados sobre las bases de su reactividad cruzada con el sistema inmune humano durante el progreso de la enfermedad activa, puede proveer utilidad para el desarrollo de pruebas serodiagnósticas para TB (Laal, Samanich *et al.* 1997).

Se ha detectado el ácido micólico, presente en el bacilo de la TB, en muestras sanguíneas o en orina por cromatografía de líquidos de alto rendimiento (HPLC) (Garza-Gonzalez, Guerrero-Olazarán *et al.* 1998).

También se han incorporado métodos de detección de TB mediante la amplificación de un producto génico por reacción en cadena de la ligasa (LCR) (Lumb, Davies *et al.* 1999) presente solo en los miembros del género *Mycobacterium*: el LCx® que amplifica un segmento del gen B, del cual solo hay una copia en el genoma con una sensibilidad del 97-99% y una especificidad del 90-100%. En adición, en un estudio realizado utilizando el sistema LCx® como método de diagnóstico de TB en muestras de especímenes respiratorios, se obtuvo una sensibilidad del 91.6% y una especificidad del 90.5% (Valente, Cuteri *et al.* 2002).

Se ha desarrollado la técnica de hibridación con sondas de ADN o ARN (Warnon, Zammateo *et al.* 2000), hibridación y PCR *in situ* (Zerbi, Schonau *et al.* 2001), o en cultivo celular (Rossi, Gori *et al.* 2000). La prueba intradérmica (IDT) puede ser facilitada por pruebas de IFN- γ las cuales se reportan más sensibles pero algunas veces menos específica que IDT (Amadori, Lyashchenko *et al.* 2002).

Las PBMC aisladas de venado con *M. bovis* producen NO en respuesta a la estimulación con *M. bovis*, pero no con antígenos de MAC (Waters, Palmer *et al.* 2002). La huella dactilar ADN o Fragmentos de Restricción de Longitud Polimórfica (RFLP) se basa en la secuencia de inserción IS6110 es usada para investigar casos en que se sospeche transmisión de la infección de TB (Yates, Drobniewski *et al.* 2002; Filliol, Motiwala *et al.* 2006; Warren, de Kock *et al.* 2006), los primeros reportes acerca del estudio de la secuencia de inserción IS6110 fueron en 1995 (Rao, Ahmed *et al.* 2006).

Otras pruebas basadas en la serología incluyen α -cristalina (*HspX*), *MTB48*, y *MTB81* (Lodes, Dillon *et al.* 2001). Así como también, *ESAT6* y *CFP10*, dos antígenos que han sido usados para pruebas basadas en la respuesta inmune mediada por células han sido evaluadas como pruebas de tarjeta para respuesta inmune humoral (Smit, Van Loveren *et al.* 2003). Para la detección de *M. tuberculosis* el antígeno *ESAT-6* ha resultado ser más específico que el *MPB64* (Black, Weir *et al.* 2003; Vitale, Reale *et al.* 2006).

Estos antígenos, ausentes en la vacuna BCG se están empleando con la finalidad de evitar falsos positivos causados por una reacción a los antígenos provenientes de una vacunación con BCG, al respecto, hacen falta más estudios para su aprobación final (Lalvani, Pathan *et al.* 2001).

Las proteínas recombinantes, son potentes en sensibilidad y especificidad para producir la reacción antígeno/anticuerpo en fase líquida más que en fase sólida (Amadori, Lyashchenko *et al.* 2002; Ameixa y Friedland 2002; Buddle, Skinner *et al.* 2002).

Las pruebas *in vitro* de la respuesta inmune mediada por células permiten la detección temprana de la latencia de los individuos infectados y son de gran valor para explorar los grupos de alto riesgo en un lugar de endemicidad baja (Brock, Munk *et al.* 2001; Ewer, Deeks *et al.* 2003).

La respuesta humoral en TB ha sido estudiada durante varias décadas, principalmente con el propósito de desarrollar pruebas de serodiagnóstico (Laal, Samanich *et al.* 1997), estas pruebas son seleccionadas por su rapidez, fácil realización y no requiere células vivas, mientras que el diagnóstico basado en la respuesta inmune mediada por células si las requiere (Ewer, Deeks *et al.* 2003). Se han realizado estudios con un antígeno de 38-kDa la sensibilidad en su ensayo se reporta en un rango de 16 a 80%; sin embargo, estudios realizados han reportado que el antígeno 38-kDa con la versión recombinante, por la técnica de ELISA tuvo un rango de sensibilidad del 16 al 36% para pacientes con frotis negativo y de 36 a 67% para pacientes con frotis positivo (Silva, Kanaujia *et al.* 2003).

Este antígeno de 38-kDa, es un componente de tres diferentes kits inmunocromatográficos como: ICT TB AMRAD-ICT® [Amrad, Sydney, Australia], RAPID test® TB, y PATHOZYMEMYCO®, el cual detecta TB del 25 a 64% de pacientes en frotis negativos y positivos a TB (Perkins, Conde *et al.* 2003).

Los ensayos *in vitro* con los antígenos, PPDa, PPDb, o mitógeno, detectan el IFN- γ producido por PBMC, implica el IFN- γ inducido por el antígeno, el NO, y la producción de TNF- α de bovinos con *M. bovis* (Waters, Palmer *et al.* 2003). Sin

embargo, la producción no específica de NO₂ en cultivos de PBMC puede ser problemático para el desarrollo de una prueba de diagnóstico para NO. El BCG, cepa atenuada de *M. bovis*, es transportador de proteínas recombinantes, proporciona antígenos para ser reconocidos por el sistema inmune (Buddle, Skinner *et al.* 2002; Waters, Palmer *et al.* 2003).

La respuesta de IFN- γ provee un diagnóstico útil de TB (Breuss, Helbling *et al.* 2002; Rhoades, Hsu *et al.* 2003). El IFN- γ producido por el antígeno específico y los Macrófagos que activan las células T CD4+ conducen hacia la producción de NO, esencial para la muerte intracelular del bacilo tubérculo (Waters, Nonnecke *et al.* 2003).

Los primeros eventos juegan un papel clave en la regulación del balance entre la respuesta inmune mediada por Th1 y Th2, la activación de Th1 mejora la respuesta de Th2 por macrófagos alveolares y DCs después de la liberación de BCG, informan sobre el alergen durante el efecto protector observado en la vía aérea. Así, a pesar del fondo dominante de Th2 de ratones BP2, las APC pueden contribuir al desarrollo de la respuesta inmediata después de la liberación de BCG: probablemente porque la BCG intracelular actúa como un estímulo fuerte sobre macrófagos alveolares y células dendríticas (Lagranderie, Nahori *et al.* 2003).

Existen dos sistemas comerciales de amplificación de ácidos nucleicos para el diagnóstico de TB aprobados por la FDA en los EUA; la prueba directa de *M. tuberculosis* (Chedore y Jamieson 2002) y la prueba Amplicor® de *M. tuberculosis*, el cual en especímenes positivos muestra una sensibilidad del

66.7% con especificidad del 99.6%, y en especímenes negativos tiene una sensibilidad del 91.7% y una especificidad del 97.7% (D'Amato, Wallman *et al.* 1995; Devallois, Legrand *et al.* 1996).

En principio, ambas pruebas fueron aprobadas para usarse solo en muestras clínicas positivas porque su sensibilidad y especificidad disminuye de 70-80% en baciloscopias negativas; posteriormente, hubo una reformulación dando origen a la prueba MTDII y se aprobó para usarse en baciloscopias negativas y positivas por su sensibilidad del 96.1% y especificidad de 97.1% (Visca, De Mori *et al.* 2004).

Actualmente, la mayoría de los casos de TB ocurren en ciudades con recursos limitados y su diagnóstico depende del examen clínico y de los descubrimientos radiográficos confirmados por la microscopia del frotis de esputo y el cultivo bacteriano (Weldingh, Rosenkrands *et al.* 2005). El cultivo no es útil por requerir periodos prolongados para *M. tuberculosis* (6 a 8 semanas); por lo tanto, la confirmación del diagnóstico recae en el examen del frotis de esputo (Weldingh, Rosenkrands *et al.* 2005).

Sin embargo, el frotis de esputo solo tiene una sensibilidad del 50 al 60%, y la proporción de detección en niños y en pacientes co-infectados con VIH es frecuentemente más baja, para tener un diagnóstico más rápido se han investigado nuevas técnicas en años recientes como PCR que detecta los componentes de *M. tuberculosis* en especímenes clínicos basado en la CMI o en la respuesta inmune humoral (Weldingh, Rosenkrands *et al.* 2005). La estructura hidrofóbica de la pared celular es responsable de las propiedades de la tinción ácido resistente (Chen, German *et al.* 2006).

En un estudio reciente, se realizó el diagnóstico de TB por rayos X, programas excretores, urianálisis y examen microscópico del sedimento urinario, TST con PPD-RT23 y urocultivos, realizados durante la evaluación (Hernandez-Hernandez, Alberu *et al.* 2006).

Consideraciones bioéticas

La bioética tiene como objetivo conectar la reflexión ética con la investigación científica con la finalidad de construir una ciencia con conciencia al servicio integral del hombre, la experimentación clínica, constituye un valor en sí misma que debe ser buscado lícitamente por los científicos y que no se contrapone con la instancia ética en cuanto al objetivo común de ambas que es la búsqueda de la verdad para el hombre y para su salud.

La Ley Federal de sanidad animal, en México, D. F., publicada el 18 de Junio de 1993, trata la prevención y control de las enfermedades de los animales, la cual fija las bases para el diagnóstico, prevención, control y erradicación de enfermedades y plagas de los animales terrestres, establece atribuciones de la Secretaría general de salud, en cuestiones de medidas zoonositarias. Normas oficiales para productos, subproductos animales, productos químicos, farmacéuticos, biológicos y alimenticios para uso en animales o consumo por éstos, así como envases y rótulos.

Normas que deben reunir los siguientes establecimientos: ferias, frigoríficos, fábricas de productos o subproductos animales para consumo humano, los que fabriquen o expendan alimentos procesados para consumo animal y productos

químicos y farmacológicos para uso en animales, hospitales y clínicas vegetarianas.

Desde el punto de vista bioético, la experimentación clínica es objetada en base al uso de los pacientes y el investigador y puede aplicarse en varias etapas de la investigación: la selección de pacientes y su reclutamiento. La Ley Federal de Sanidad Animal contempla los laboratorios de prueba o diagnóstico en cuanto al trato humanitario, cuidado zoonosanitario y técnicas de sacrificio.

Desde el punto de vista bioético, la experimentación clínica es objetada en base al uso de los pacientes y el investigador y puede aplicarse en varias etapas de la investigación: la selección de pacientes y su reclutamiento.

Tratamiento para tuberculosis

El primer agente quimioterapéutico específico para la TB fue la estreptomina, descubierta por el microbiólogo norteamericano Selman Abraham Waksman en 1944, con su uso disminuyó significativamente el índice de mortalidad. En 1948, se descubrió el ácido para-amino salicílico (PAS) y más tarde la INH. En la década de los 60's el descubrimiento del etambutol (EMB) y la RIF en los 70's, la batalla contra la TB parecía ganada.

La resistencia del *Mycobacterium* a los medicamentos, en especial las cepas MDR se ha convertido en uno de los factores que impide la curación de los afectados. Para la mayoría de las cepas MDR, las mutaciones se han encontrado en dos genes, en el gen *katG* codificado por peroxidasa-catalasa

(Zhang, Heym *et al.* 1992), y en el gen *mabA-inhA* (Banerjee, Dubnau *et al.* 1994).

La idea de la regulación inmune para tratar la TB no es nueva, en 1890, en el Congreso Mundial de Medicina Robert Koch anunció que las “sustancias” preparadas curaban completamente a los cerdos de Guinea en los estados avanzados de la TB (Moreira, Tsenova *et al.* 2002). En los inicios de los 1990s, la MDR de las cepas de *M. tuberculosis* fue identificada en Nueva York (Garcia de Viedma, del Sol Diaz Infantes *et al.* 2002; Glynn, Whiteley *et al.* 2002).

Los nuevos regimenes antituberculosos son necesarios para el tratamiento de las cepas MDR y para reducir las terapias prolongadas (Qian, Abe *et al.* 2002), por lo que se han empleado las Quinolonas para el tratamiento de pacientes con MDR (Alvarez-Freites, Carter *et al.* 2002). En adición, las cepas MDR son prioridades de la OMS y de la Unión Internacional en contra de la TB y enfermedades pulmonares (Bemer, Palicova *et al.* 2002).

Se ha determinado que las fluoroquinolonas son activas contra *M. tuberculosis*, son los primeros medicamentos antimicobacterianos disponibles desde el descubrimiento de la RIF (Ginsburg, Grosset *et al.* 2003), entre las fluoroquinolonas que tienen gran actividad contra TB son los nuevos derivados 8-metoxi, tales como la moxifloxacina (MOX) y gatifloxacina (GAT) (Aubry, Veziris *et al.* 2006), así como también, la ofloxacina (OFX) y levofloxacina (LVX) (Hu, Coates *et al.* 2003; Veziris, Truffot-Pernot *et al.* 2003).

En los últimos años, en los EUA el tratamiento de la enfermedad tuberculosa se ha visto afectado por la aparición de bacilos resistentes a la quimioterapia tradicional, esto ha llevado a que los investigadores tomen conciencia de la

necesidad de disponer de nuevos medicamentos (LaBombardi 2002), en este caso el tratamiento debe iniciarse con cuatro fármacos, preferiblemente nunca antes recibidos por el paciente, combinando fármacos de segunda línea, entre éstos se encuentran: capreomicina, clofazimina, cicloserina, PAS, etionamida, protionamida, claritromicina, ciprofloxacino y ofloxacino.

Con el surgimiento del HIV surge la necesidad de métodos de detección simples, rápidos, asequibles y eficaces tratamientos (Caviedes, Delgado *et al.* 2002). Recientemente, se ha analizado que el HIV es el factor de riesgo más importante en la pobre respuesta a los tratamientos anti-TB, especialmente con la enfermedad avanzada (Graham, Bell *et al.* 2006).

Durante su introducción en 1952, la pirazinamida (PZA) ha mantenido uno de los componentes mas importantes dentro del régimen efectivo en el periodo de semilatencia (Pfyffer, Palicova *et al.* 2002), es un fármaco de primera línea y tiene una función única en cuanto a la disminución del tiempo de tratamiento, de 9 a 12 meses hasta 6 meses, eliminando a la población semilatente del bacilo que no es eliminada por otros fármacos TB (Zhang, Permar *et al.* 2002).

La situación se ha agravado por el incremento de las cepas MDR a la RIF e INH, las cuales comprenden la resistencia a la quimioterapia antitubercular, mientras que la resistencia a la RIF es mediada esencialmente por las mutaciones de las regiones *rpoB*, la resistencia a INH esta aparentemente controlada por un sistema genético complejo que involucra diversos genes llamados, *katG*, *inhA*, *kasA*, y *ahpC* (Mokrousov, Otten *et al.* 2002; Makinen, Marttila *et al.* 2006).

Recientemente, se ha encontrado, que uno de los clones que da un número elevado de colonias resistentes a rifampin (Rif) es *mutT1* (Dos Vultos, Blazquez et al. 2006).

La función inmune en pacientes con infección HIV está restaurándose, por lo menos parcialmente, por terapia antiretroviral (ART), esto ha sido demostrado en diversos caminos: primero, los pacientes que reciben ART tienen elevada la cantidad de linfocitos T CD4⁺, indicador de la función inmune y probablemente un marcador de por lo menos la restauración parcial de la inmunidad celular (Schluger, Perez et al. 2002).

Aunado a esto, se reporta que en general, la dirección y el pronóstico de pacientes infectados con el HIV han cambiado dramáticamente sobre el curso del SIDA, en los primeros años, el diagnóstico y tratamiento de infecciones oportunistas y neoplasias también hay pocos resultados, aunque durante más de 20 años las medicaciones han sido desarrolladas desde la introducción de la ART, cuya terapia ha resultado en una declinación dramática en morbilidad y mortalidad de la infección del HIV (Morris, Masur et al. 2006).

Últimamente, se ha estudiado la coinfección SIDA-TB en niños en estado avanzado de la enfermedad, empleando el método llamado terapia antiretroviral altamente activa (HAART), en el cual se determinó que la mayor causa de muerte en esos pacientes fueron las infecciones oportunistas que se dieron en pacientes con defecto residual en la inmunidad mediada por células (Puthanakit, Oberdorfer et al. 2006).

Japón ha explorado el uso de la vitamina K3 (menadiona) catalizada por un ensayo de Quimioluminiscencia como una prueba rápida de susceptibilidad

antimicrobiana, la concentración inhibitoria mínima (CMI) del agente antimicrobiano es determinada por este ensayo después de 4 hrs. de incubación, el fundamento de la vitamina K3, catalizada por un ensayo de quimioluminiscencia se propone como sigue: la vitamina K3 es reducida por NAD(P)H: quinona reductasa en la bacteria intacta, la cual mantiene la concentración intracelular de NAD(P)H, la resultante quinol y/o semiquinona reduce el oxígeno disuelto para generar especies de oxígeno activo tales como O_2 y H_2O_2 (Yamashoji 2003).

El éxito de la quimioterapia esta asociado con el aumento en la producción de $IFN-\gamma$ clínicamente detectable después de empezar el tratamiento (Al Attiyah, Mustafa *et al.* 2003).

La deficiencia de vitamina D esta asociada con un riesgo en el incremento para la infección de la TB. Sin embargo, reportes de mediados del siglo XIX sugieren que la vitamina D de aceite de hígado de bacalao fue benéfico en el tratamiento de la TB (Rhodes, Terry *et al.* 2003), se han hecho esfuerzos para tratar la TB con vitamina D (Rook y Hernandez-Pando 1996) y la terapia con calcio con o sin vitamina D fue usado antes de la quimioterapia específica, la luz solar y el aceite de hígado de bacalao tienen gran asociación con el tratamiento de la TB y representan dos fuentes de vitamina D disponible, vía irradiación de UV en la piel y en la dieta (Rhodes, Terry *et al.* 2003).

La mayoría de reportes recientes han asociado bajos o nulos niveles de vitamina D en suero con incremento de la susceptibilidad a la TB, y esto es fundamentado por estudios genéticos de un gene polimórfico receptor de la

vitamina D (VDR) que indica la asociación entre el VDR y la susceptibilidad a la resistencia a la TB (Rhodes, Terry *et al.* 2003).

Se ha estudiado el efecto de la sustancia Etanercept®, frente a la TB, y se ha llegado a la conclusión de que después de cuatro semanas de tratamiento se incrementa la cantidad de células T CD4+, así como el total de linfocitos en sangre periférica (Wallis, Kyambadde *et al.* 2004).

Los medicamentos antituberculosos deben ser prescritos durante períodos prolongados y por gente especializada en el área de la salud y manifestar el riesgo de la toxicidad de los medicamentos (Gordin, Cohn *et al.* 2004). La INH y RIF juntos representan la columna vertebral de la quimioterapia para las infecciones de *M. tuberculosis*, el desarrollo de la resistencia a esas dos drogas reduce la eficiencia de los tratamientos antituberculosos en un 77% (Herrera-Leon, Molina *et al.* 2005).

En años recientes se ha testificado un surgimiento elevado de casos dramáticos de infectados con *M. tuberculosis*, la adquisición de resistencia por la bacteria es un evento al azar, y en una población micobacterial dada, 1 cepa de 106 muta para desarrollar resistencia a la INH, mientras que 1 cepa de 108 muta para desarrollar resistencia a la RIF (Siddiqi, Shamim *et al.* 2002).

Esta resistencia se ha asociado a la alteración originada en la RNA polimerasa subunidad β la cual es codificada por el gen *rpoB*, más del 95% de las cepas resistentes a la RIF están asociadas con mutaciones dentro de la región de 81-bp en el gen *rpoB* (Herrera-Leon, Molina *et al.* 2005).

Sin embargo, se realizó el seguimiento de estudio de un caso con LTBI que muere por una falla hepática fulminante en el curso del tratamiento durante dos meses con PZA y RIF (Medinger 2002).

El EMB [dextro-2,2'-(ethylenediimino)di-1-butanol] es un fármaco de primera línea usado durante la terapia antitubercular en combinación con otros fármacos recomendados por la OMS Tratamientos Directamente Supervisados de Corta Duración (DOTS), así como tratamientos estándar oficialmente adoptados por el Ministerio de Salud Ruso, la acción del EMB o bacilo tubérculo es bactericida y es debido a sus interacciones con un análogo de arabinosa con el blanco arabinosil transferasa (Mokrousov, Narvskaya *et al.* 2002). Durante muchos años los DOTS han sido promovidos por la OMS por el resurgimiento de la TB (Escott y Walley 2005).

La implementación de los DOTS ha sido una labor intensiva y muy difícil en cuanto a la distribución de infraestructura sustancial, la detección de la resistencia a los medicamentos es problemática, el tiempo del proceso se lleva más de 12 semanas y este retraso significa exponer a los pacientes a una terapia subóptima, y esto permite la resistencia a los antituberculosos (Ballell, Field *et al.* 2005).

Se esta estudiando el efecto de un medicamento candidato para la TB, es la diariquinolina R207910 y PA-824 representa el más avanzado agente específico para TB, el cual presenta buenas perspectivas químicas y biológicas (Ballell, Field *et al.* 2005).

Los fármacos utilizados en la terapia contra la TB se pueden dividir en agentes de primera línea y los de segunda; como terapia de primera línea se ha

establecido utilizar: EMB, INH, PZA, Rifabutina, RIF y Rifapentina; La terapia de segunda línea consiste en Amikacina y kanamicina, capreomicina, cicloserina, etionamida y protionamida, levofloxacin, moxifloxacin, ácido aminosalicílico y estreptomycin (Launay-Vacher, Izzedine *et al.* 2005).

La TB es una enfermedad reemergente en pacientes con estado inmune alterado, tales como los pacientes con falla renal crónica y especialmente pacientes con diálisis; en adición, el monitoreo de drogas terapéuticas puede ser una herramienta útil para ajustar la dosis del medicamento antituberculoso (Launay-Vacher, Izzedine *et al.* 2005).

En estudios realizados por Gago y colaboradores (2006) se ha determinado que la biosíntesis de ácidos grasos de cadena larga es un blanco emergente para el desarrollo de nuevos quimioterapéuticos antibacterianos, en todos los animales, plantas y bacterias esta biosíntesis es catalizada por la acetil coenzima carboxilasa. El mecanismo químico en mamíferos es virtualmente idéntico los de la bacteria, pero la secuencia de proteínas y los arreglos de sitios activos enzimáticos difieren marcadamente entre ellos, por lo que pueden ser asignados inhibidores específicos (Gago, Kurth *et al.* 2006).

El proveer diagnósticos eficaces y rápidos, así como sistemas de detección de cepas resistentes a los antibióticos, es necesario para prevenir la transmisión, se utilizó el método para diagnóstico de micobacterias BACTEC 460 y la determinación de la MIC para probar la resistencia de la INH y de la RIF, en donde el resultado de la resistencia pudo ser reportado en 48 h para RIF y 4 días para INH (Gali, Dominguez *et al.* 2006; Rusch-Gerdes, Pfyffer *et al.* 2006).

Además, de conocer la serie de tratamientos específicos para la TB, es importante considerar que al identificar en algunos casos, el *M. bovis* como agente etiológico de la TB humana, esa identificación es crítica para determinar el impacto de transmisión zoonótica, esto debe impulsar a adoptar medidas de salud pública, tales como la pasteurización de la leche y productos lácteos, cocinar la carne y controlar la TB en animales domésticos (Cadmus, Palmer *et al.* 2006).

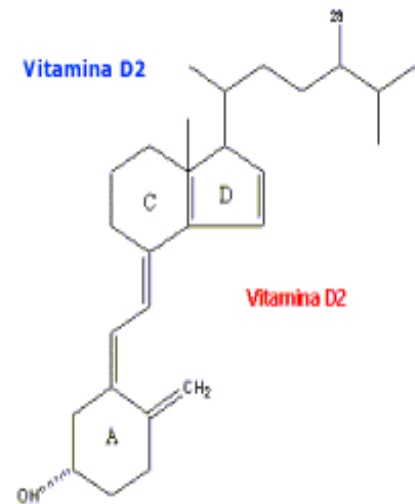
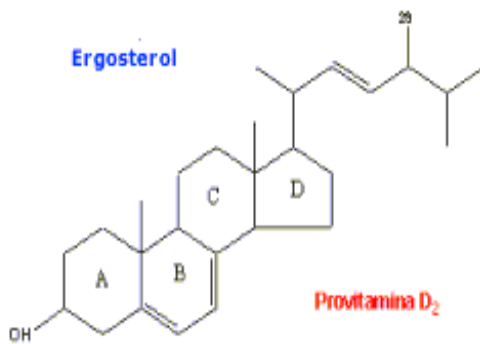
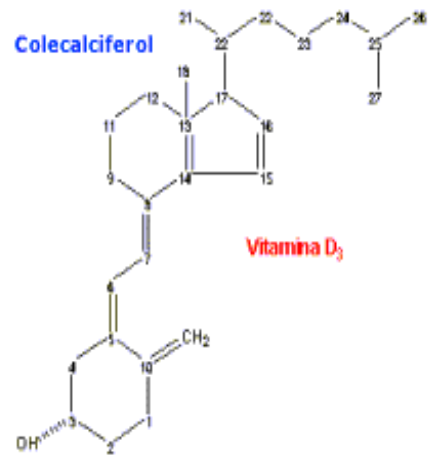
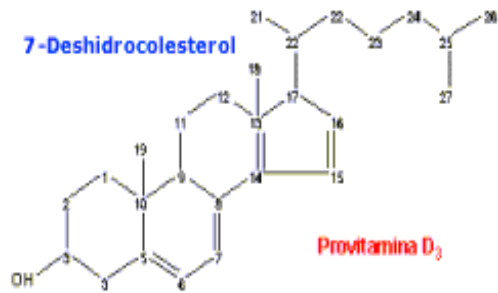
Más que buscar tratamientos eficaces, es necesario implementar estas medidas preventivas, debido a que los anti-TB tienen costos elevados y esto los hace inalcanzables para pacientes que viven en países en vías de desarrollo (D'Souza, Romano *et al.* 2006).

Síntesis de la 1,25-Dihidroxitamina D3 y sus receptores

La vitamina D es una de las hormonas más antiguas, presente en las formas de vida primitivas y que ha perdurado por más de 750 millones de años (Coronato, Laguens *et al.* 2005). Esta hormona no solo regula el metabolismo del calcio aumentando la absorción del calcio intestinal y la movilización del calcio óseo, sino que también tiene muchos otros efectos en todo el organismo.

Es una hormona esteroide que se encuentra en forma inactiva en el organismo y debe ser activada para ser funcional (**figura 7**), es hidroxilada en el hígado a 25-hidroxitamina D3 (25-OH-D3), que es la forma circulante y es convertida en la forma activa 1α , 25-dihidroxitamina D3 [$1,25-(OH)_2$ D3], calcitriol o vitamina D3 en el túbulo contorneado proximal del riñón, por acción de la enzima 1α -hidroxilasa (Penna y Adorini 2000; Crescioli, Ferruzzi *et al.* 2004; Coronato,

Laguens *et al.* 2005). El calcitriol afecta la maduración y la diferenciación de las células mononucleadas y también influye sobre la producción de linfocinas. Es regulador importante del crecimiento celular y la diferenciación de varios tipos de células.



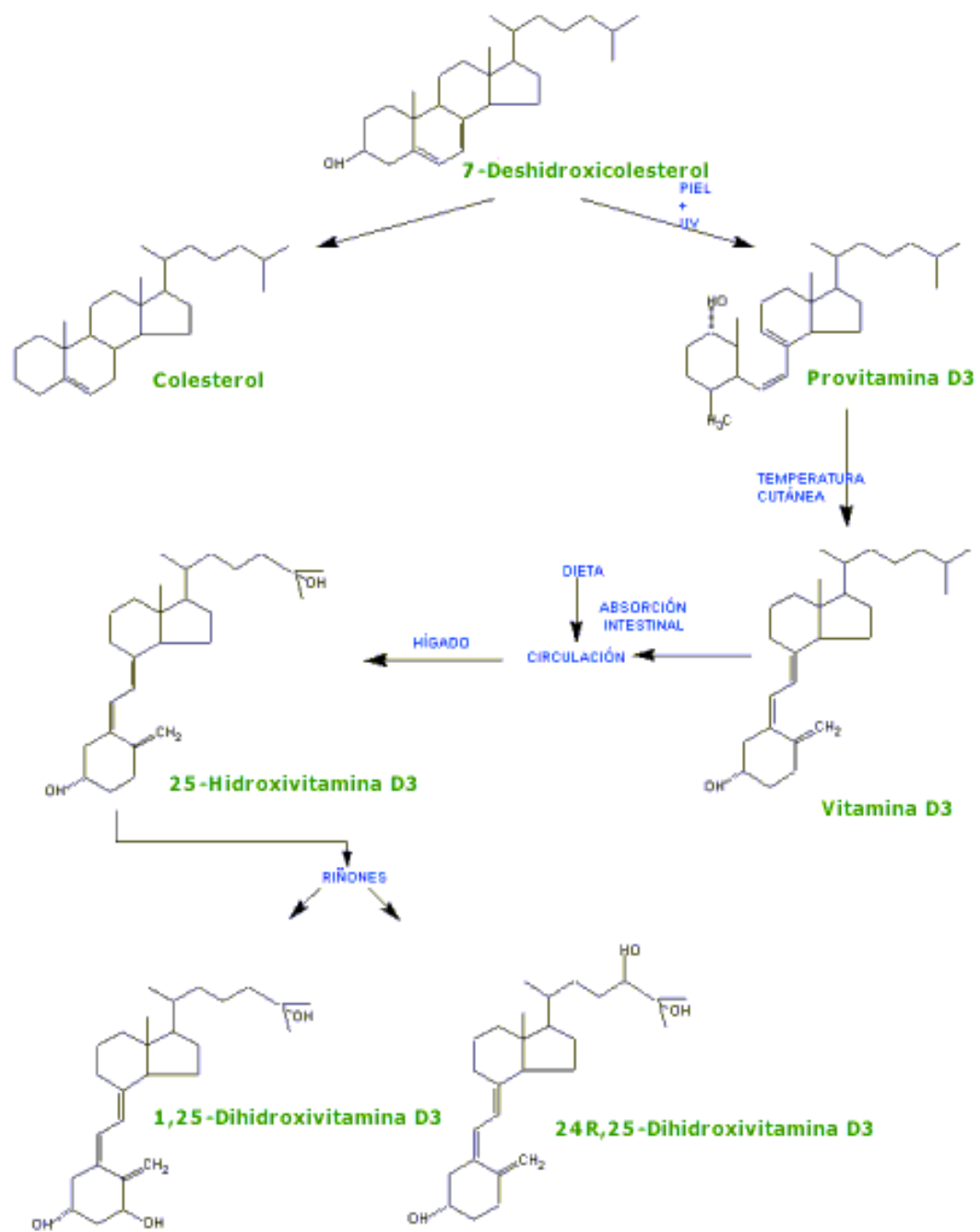


Figura 7. Fotobiogénesis y mecanismo de síntesis de la forma activa de la 1,25-Dihidroxivitamina D3.

(Coronato, Laguens *et al.* 2005)

Los análogos de calcitriol son notablemente eficaces y prolongan la supervivencia, así como también reducen la opción de la ciclosporina A para tratamiento (Veyron, Pamphile *et al.* 1993), la verdadera relevancia fisiológica de estos efectos *in vivo* no ha sido demostrada pero se ha estudiado que la síntesis de nuevos análogos de calcitriol han tenido menor tendencia para causar hipercalcemia y esto les ha permitido ser probados como supresores de la respuesta Th1 en modelos *in vivo* (Rook y Hernandez-Pando 1996).

El calcitriol, la forma activa hormonal de la 1,25(OH)₂ D3, regula la transcripción de una variedad de genes con efectos importantes en la homeostasis del calcio, en la regulación de la respuesta inmune y en la diferenciación celular, ese calcitriol tiene un efecto profundo antineoplásico sobre las células insulinas, *in vivo* e *in vitro*, calcitriol disminuye la expresión del gen, el contenido total y la liberación de insulina de los islotes pancreáticos (Galbiati, Polastri *et al.* 2002).

El calcitriol, no solo juega un papel piloto en la homeostasis del calcio sistémico sino también en la homeostasis intracelular de varios tejidos (Zittermann 2003).

La vitamina D existe en dos formas ergocalciferol (ergosterol activado, vitamina D2), que se encuentra en la levadura irradiada y colecalciferol (7-deshidrocolesterol activado, vitamina D3) que se forma en la piel humana por exposición a la luz solar (UV) y se encuentra principalmente en aceite de hígado de pescado y yema de huevo. La leche se enriquece con ambas formas. Un microgramo de vitamina D equivale a 40 UI (Waters, Nonnecke *et al.* 2001).

La vitamina D es una prohormona con varios metabolitos activos que se comportan como hormonas. La provitamina D3 se sintetiza fotoquímicamente

en la piel a partir de 7-deshidrocolesterol y se isomeriza lentamente a $1,25(\text{OH})_2$ D₃, la cual es transportada por la proteína fijadora de vitamina D.

En el hígado, la vitamina D₃ es convertida a $25(\text{OH})$ D₃, la principal forma circulante. Esta pasa a circulación enterohepática y es reabsorbible en el intestino. Después es hidroxilada de nuevo, sobre todo en los riñones, a la forma mucho más activa metabólicamente $1,25(\text{OH})_2$ D₃ (1,25-dihidroxicolecalciferol, calcitriol, vitamina D hormonal) su principal función es aumentar la absorción de calcio en el intestino y promover la formación y la mineralización del hueso, la $1,25(\text{OH})_2$ D₃ no solo regula el metabolismo óseo y del calcio/fósforo, sino que refuerza otras actividades biológicas, incluyendo la regulación de la respuesta inmune vía receptores específicos expresados en las APC y en las células T activadas (Penna y Adorini 2000; Deluca y Cantorna 2001). La hidroxilación está fuertemente estimulada por la hormona paratiroidea (PTH) (Waters, Nonnecke *et al.* 2001).

La $1,25(\text{OH})_2$ D₃ actúa a través de receptores para la vitamina D₃ (VDR), este receptor pertenece a la familia de receptores nucleares de la hormona tiroidea (Bettoun, Burris *et al.* 2003). Se expresa en células de diferentes tejidos como intestino, riñón, huesos, piel, islotes del páncreas, glándula paratiroides, promielocitos, queratinocitos y en células del sistema inmune (Boonstra, Barrat *et al.* 2001).

El calcitriol ejerce su acción a través de la unión de VDR y regula la expresión de genes blanco, también tiene efectos antiinflamatorios, principalmente debido a la inhibición de la IL 6 y de la IL 8 producidas por queratinocitos.

Se han identificado los VDR en células mononucleares de sangre periférica es el detonante del interés por la vitamina D como un regulador del sistema inmune (Bhalla, Amento *et al.* 1983; Provvedini, Tsoukas *et al.* 1983); también, en 1985 se determinó que los linfocitos poseen receptores para la $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ (Manolagas, Provvedini *et al.* 1985); adicionalmente, en el año 2000 se determinó que los linfocitos T CD8+, activados o no, son los que expresan mayor concentración de VDR (Veldman, Cantorna *et al.* 2000), los linfocitos CD4+ y los macrófagos lo poseen en menor cantidad, pero igualmente significativa, mientras que en los linfocitos B la expresión es escasa (Penna y Adorini 2000).

Utilizando ratones incapaces de sintetizar $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ por ausencia de la 1α -hidroxilasa, se demostró una disminución significativa de linfocitos T CD4 y CD8 en sangre periférica (Yang, Smith *et al.* 1993).

La identificación de los VDRs en las células T sugiere que la vitamina D tiene un papel o en la función o en el desarrollo de las células T (Cantorna 2000). Para las células que ocultan IL-2 o IL-12, la regulación puede incluir inhibición del factor nuclear de las células T activadas y la señal de transcripción del factor nuclear *kB* por la (Alroy, Towers *et al.* 1995; D'Ambrosio, Cippitelli *et al.* 1998).

La vitamina D por si misma es un factor de transcripción (Ross, Darwish *et al.* 1994). La vitamina D podría actuar como un regulador transcripcional de la síntesis de citocinas celulares Th (como lo hace para IL-2 e IL-12), como un regulador de Stat 1, 4, o 6, como un regulador de GATA-3, o quizá como el

último factor transcripcional para regular la diferenciación de células Th (Cantorna 2000).

La vitamina D es una de las nuevas terapias más potentes para enfermedades como la esclerosis múltiple, artritis y diabetes juvenil, la terapia de vitamina D para esas enfermedades reduce la autoinmunidad y construye huesos fuertes, bajo un suplemento apropiado para evitar la hipercalcemia, la cual por sí misma puede ser letal (Cantorna 2000).

Los queratinocitos de la piel, las células del islote del páncreas, linfocitos y promielocitos muestran localización nuclear específica de $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ y la presencia del VDR (Deluca y Cantorna 2001), quizá el mayor descubrimiento fue la existencia de la VDR en la glándula paratiroides (Korkor 1987; Deluca y Cantorna 2001).

Muchas células del sistema inmune contienen VDRs (Cantorna y Mahon 2004). La $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ regula la presentación del antígeno por las DCs y macrófagos; la producción de células dendríticas de IL-12 es suprimida y la producción de IL-10 es incrementada por el tratamiento con la $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$.

El principio activo de la vitamina D es $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ actúa exclusivamente vía receptor específico nuclear, y así la distribución del VDR dentro del sistema inmune provee información sobre los sitios activos de la hormona esteroidea (Rhodes, Terry *et al.* 2003), el VDR regula la acción biológica del $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ (Bettoun, Burris *et al.* 2003).

Con los estudios realizados acerca de encontrar que el calcitriol interviene en la homeostasis intracelular de varios tejidos, ahora es claro que los VDR existen en más de 30 tejidos diferentes: en células intestinales, musculares, del túbulo

distal renal, paratifoideas, en los islotes del páncreas, osteoblastos, epidérmicas, en monocitos circulantes, en células β transformadoras, en células T activadas, placenta, neuronas, fibroblastos de piel, condrocitos, eritrocitos de colon, células hepáticas, prostáticas, ováricas, queratinocitos de piel, células endócrinas estomacales, células aórticas endoteliales y células de la pituitaria (Zittermann 2003).

Recientemente, los VDR de los ratones *knockout* han mostrado ser más susceptibles a las enfermedades inflamatorias intestinales (Froicu, Weaver *et al.* 2003). Aún, no ha sido examinado el efecto de la deficiencia del VDR en una enfermedad conducida por Th2 (Wittke, Weaver *et al.* 2004).

El calcitriol puede inhibir la fosforilación dependiente del ligando del receptor del factor de crecimiento epidérmico y la señal celular regulada por la proteína cinasa en células epidérmicas, en la cual el receptor del factor de crecimiento epidérmico y el TGF- β constituyen la mayor señal autócrina (Crescioli, Ferruzzi *et al.* 2004).

La expresión de moléculas co-estimuladoras fue significativamente menor que en las DCs-IFN control; contrariamente, el tratamiento 1,25(OH)₂ D3 no modifica la expresión del MR, entonces se sugiere que el agente inmunoregulador no afecta la actividad fagocítica de DCs-IFN; similarmente, se observó que ambas subunidades del receptor IFN tipo I expresadas en las DCs-IFN no fueron reguladas por la presencia de la 1,25(OH)₂ D3 (Gauzzi, Purificato *et al.* 2005). Notablemente, DCs-IFN fueron incapaces de estimular la proliferación de las células T y producir IL-12 e IFNs tipo I en respuesta a la estimulación futura con LPS (Gauzzi, Purificato *et al.* 2005).

La vitamina D y el sistema inmune

La inmunosupresión por $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$, la forma activa de la vitamina D y sus análogos ha sido demostrada en modelos diferentes de enfermedades autoinmunes y en el trasplante experimental de órganos (Casteels, Bouillon *et al.* 1995), todavía no está claro si estos efectos inhibitorios son directamente ejercidos sobre las células T (Cippitelli y Santoni 1998; Takeuchi, Reddy *et al.* 1998) o vía inhibición de la actividad APC (Rigby, Waugh *et al.* 1990).

Desde 1980 se sabe que la $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$, además de su función reguladora en la homeostasis del calcio y fósforo, tiene un papel relevante en la regulación de la respuesta inmune (Deluca y Cantorna 2001; Coronato, Laguens *et al.* 2005) y en la formación del hueso (Cantorna 2000).

Sin embargo, se ha mostrado que la forma activa de la vitamina D [$1,25-(\text{OH})_2 \text{D}_3$] afecta profundamente la respuesta inmune (Cantorna 2000); en adición, interviene en la regulación de la respuesta inmune a través de la interacción con el receptor específico que se expresa constitutivamente en APC como células dendríticas, macrófagos y en linfocitos T (Cantorna, Hayes *et al.* 1996).

Tiene un efecto importante en el desarrollo y diferenciación de muchos tipos de células y produce propiedades inmunoregulatoras (Adorini, Amuchastegui *et al.* 2005). Los efectos biológicos de la $1,25-(\text{OH})_2 \text{D}_3$ son mediados por el VDR.

La vitamina D regula la diferenciación y actividad de las células TCD4+ directamente o indirectamente para suprimir la patología de la enfermedad autoinmune (Cantorna 2000).

La 1,25(OH)₂ D3 reduce la producción o expresión de IL-2 e IFN- γ en las células TCD4+ *in vitro*, estas citocinas son características de la respuesta Th1 y están asociadas con la progresión de las enfermedades autoinmunes (Cantorna 2000); también, inhibe la producción de IL-12, IL-2 e IFN- γ (Wittke, Weaver *et al.* 2004) inhibiendo el desarrollo de la respuesta inmune celular Th1 (Penna y Adorini 2000; Wittke, Weaver *et al.* 2004).

En contraste, las células TCD4+ de los ratones *knockout* expresaron un incremento en los niveles de IFN- γ , y tuvieron fuertes mezclas de reacciones linfocíticas (Froicu, Weaver *et al.* 2003).

Por otro lado, la 1,25(OH)₂ D3 promueve la producción de la citocina IL-10 en DCs maduras, promoviendo el desarrollo de la respuesta inmune humoral Th2 (Penna y Adorini 2000; Piemonti, Monti *et al.* 2000; Canning, Grotenhuis *et al.* 2001); en adición a la producción de la citocina IL-4 asociadas con la respuesta Th2, la IL-4 ha mostrado ser sobrerregulada por el tratamiento *in vivo* de la 1,25(OH)₂ D3 (Cantorna, Woodward *et al.* 1998). Indirectamente, la 1,25(OH)₂ D3 regula la respuesta celular autoinmune T CD4+ por la función reguladora de las DC (Penna y Adorini 2000).

Por citometría de flujo, se determinó el efecto de la 1,25(OH)₂ D3 sobre la producción de citocinas refleja un aumento en el desarrollo de la respuesta Th2 con reducción de IFN- γ e incremento en la producción de IL-4, ésta IL-4 es la mayor citocina que dirige el desarrollo de las células Th2, en este estudio se demostró que la 1,25(OH)₂ D3 afecta el balance Th1/Th2 en donde inhibe Th1 y

aumenta el desarrollo celular Th2, aumentando la producción de IL-4, IL-5 e IL-10 (Boonstra, Barrat *et al.* 2001).

La adición de la 1,25(OH)₂ D3 a células TCD4+ purificadas inhiben el desarrollo de las células Th1 (Barrat, Cua *et al.* 2002) Se ha mostrado que la combinación de la 1,25(OH)₂ D3 con desametazona induce la producción de IL-10 en humanos y células TCD4+ en ratón (Barrat, Cua *et al.* 2002).

La actividad selecta de 1,25(OH)₂ D3 sobre las células inmunes incluyen la potenciación de la producción de NO por estimulación de macrófagos monocitos y la inhibición de la producción de IFN- γ por estimulación de las células CD4+ (Waters, Nonnecke *et al.* 2003).

Evidencias experimentales sugieren que los metabolitos de la vitamina D regulan aspectos específicos de la función inmune, la 1,25(OH)₂ D3 induce la apoptosis (Waters, Nonnecke *et al.* 2001).

La función de los receptores y señales de muerte celular (Fas-Fas L) es importante para el mantenimiento de la homeostasis de linfocitos T y la regulación de la respuesta inmune, la unión Fas-Fas L induce apoptosis, a través de este proceso se eliminan los linfocitos T autoreactivos y se desarrolla tolerancia a los propios antígenos, las alteraciones de este sistema contribuyen a la aparición de enfermedades autoinmunes órgano-específicas (Cippitelli, Fionda *et al.* 2002).

La apoptosis de la población madura de las CD y de linfocitos T reactivos aumenta por la 1,25(OH)₂ D3, experimentos *in vitro* han demostrado aumento de apoptosis en cultivos de CD maduras con la 1,25(OH)₂ D3, después de 24

horas de incubación, la presencia de CD en estado inmaduro o su muerte producida por apoptosis, contribuye a la adquisición del estado de tolerancia periférica (Hewison, Freeman *et al.* 2003).

Muchas células del sistema inmune contienen VDRs. La 1,25(OH)₂ D3 regula la presentación de antígenos por las DCs y macrófagos (Cantorna y Mahon 2004). La vitamina D y de la 1,25(OH)₂ D3 regulan el desarrollo de las células Th1 por la inducción de las células T CD4⁺, incluyendo las células T de la respuesta celular Th2. En ausencia de adecuada concentración de vitamina D, el sistema inmune favorece el desarrollo de las células T auto-reactivas y de la autoinmunidad.

Las DCs, un sistema de APC altamente especializado, crítico para la iniciación de la respuesta celular T CD4⁺, están presentes, en diferentes estados de maduración, en la circulación tan bien como en órganos linfoides y no linfoides (Banchereau y Steinman 1998). Durante la migración hacia los órganos linfoides, las DCs maduran transformándose en potentes APCs por incremento de sus propiedades inmunoestimuladoras mientras disminuye la capacidad de captura del antígeno (Cella, Sallusto *et al.* 1997; Banchereau, Briere *et al.* 2000).

Y se ha sido esclarecido que las DCs pueden ser no solo inmunogénicas sino también tolerogénicas, ambos intratímicamente (Guery y Adorini 1995; Brocker, Riedinger *et al.* 1997) y en la periferia (Finkelman, Lees *et al.* 1996).

La inducción de la respuesta de la célula T requiere la activación del receptor de célula T y la interacción co-estimuladora entre las DCs y las células T

(Banchereau y Steinman 1998); en ausencia de la co-estimulación, las células T llegan a ser anérgicas (Schwartz 1990).

Los monocitos de sangre periférica CD14+ cultivados con GM-CSF e IL-4 desarrollan una población homogénea de DCs inmaduras, caracterizadas por la capacidad elevada para capturar el antígeno pero disminuye la actividad estimuladora de la célula T (Sallusto y Lanzavecchia 1994).

Las DCs inmaduras pueden ser inducidas a maduras por un estímulo inflamatorio tal como el LPS, un proceso asociado con la pérdida de la habilidad de capturar el antígeno pero incrementa la capacidad co-estimuladora para la activación de la célula T (Cella, Engering *et al.* 1997), estas DCs inmaduras, tales como las células Langerhans en la piel, son encontradas en los tejidos no linfoides, en donde tienen una función de centinela (Penna y Adorini 2000). Después el antígeno migra a través de los linfoides aferentes hacia las áreas T dependientes de los órganos linfoides secundarios (Banchereau y Steinman 1998; Cyster 1999).

Se ha reportado que *in vitro*, la 1,25(OH)₂ D3 inhibe la diferenciación y maduración, activación y sobrevivencia de las DCs, conduciendo a una regulación profunda del fenotipo y función de la célula T (Penna y Adorini 2000), mientras que aumenta fuertemente la producción de IL-10.

La 1,25(OH)₂ D3 también promueve la apoptosis de las DCs (Penna y Adorini 2000), éstas y los monocitos expresan constitutivamente los receptores de la 1,25(OH)₂ D3 (Penna y Adorini 2000).

Las DCs son APC profesionales que tienen una función importante en la iniciación y propagación de la respuesta inmune mediada por las células T; *in*

vitro, la 1,25(OH)₂ D3 inhibe la diferenciación de monocitos dentro de las DCs y la actividad estimuladora de las células T de las DCs (Berer, Stockl *et al.* 2000; Griffin, Lutz *et al.* 2000; Penna y Adorini 2000; Piemonti, Monti *et al.* 2000; Canning, Grotenhuis *et al.* 2001).

En la respuesta inmune de tipo humoral, la Th2, la 1,25(OH)₂ D3 incrementa la producción de IL-4 y sobrerregula la expresión del factor de transcripción GATA-3, gen relacionado con la respuesta inmune Th2 en pulmón (Mahon, Wittke *et al.* 2003).

La 1,25(OH)₂ D3 inhibe la ruta mediada por IFN tipo I de la diferenciación de monocitos en las DCs (Gauzzi, Purificato *et al.* 2005).

Las dos rutas mayores co-estimuladoras de la activación de la célula T depende de CD80 y CD154 sobre las células T por CD80/CD86 y CD40 sobre las DCs, respectivamente (Lenschow, Walunas *et al.* 1996; Grewal y Flavell 1998).

Una vez activadas, las células T también expresan CD152, un homólogo de CD28 que se enlaza a CD80/CD86 con más elevada afinidad que el mismo CD28 e inhibe la producción de IL-2, la expresión del receptor IL-2, y la progresión del ciclo celular en la activación de las células T (Walunas, Bakker *et al.* 1996).

La interrupción de esas rutas co-estimuladoras por agentes biológicos tales como Ig-CD152 y anti-CD154 mAb ha mostrado ser benéfico en enfermedades autoinmunes (Lenschow, Walunas *et al.* 1996; Grewal y Flavell 1998).

Los monocitos CD14+ obtenidos de sangre periférica y cultivados con GM-CSF e IL-4, dan origen a una población homogénea de CD inmaduras, caracterizadas por su elevada capacidad de capturar antígenos; sin embargo,

necesitan madurar para realizar la presentación antigénica a linfocitos T específicos, este proceso de maduración implica el aumento de la expresión de moléculas clase II del MHC (Lyakh, Sanford *et al.* 2005).

Los monocitos y las CD son muy sensibles a la $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ *in vitro*, estas células expresan VDR y 1α -hidroxilasa y esta co-expresión interviene en la regulación autocrina y paracrina de la función de las CD, la $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ cumple una función importante en la capacidad de los monocitos para diferenciarse en CD o en macrófagos, tanto a nivel fenotípico como funcional (Lyakh, Sanford *et al.* 2005).

La $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ inhibe la síntesis de la IL-12 en las CD y macrófagos, esta inhibición se acompaña de un aumento en la producción de IL-10, que causa disminución de la actividad de células T, la falta de diferenciación y maduración de las CD, así como la modulación de su activación y sobrevivencia por la $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$, lleva a la aparición de CD con un fenotipo telerógeno, éstos efectos se observan *in vivo* en modelos experimentales con transplantes alogénicos, en tratamientos cortos con $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$, la vitamina es responsable de inducir Linfocitos T reguladores $\text{CD}4^+ \text{CD}25^+$, células que serían responsables de mediar la tolerancia a los transplantes (Griffin, Lutz *et al.* 2000; Mathieu y Adorini 2002).

Las CD son capaces de sintetizar $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ *in vitro* como consecuencia del aumento de la expresión de la enzima α -hidroxilasa y esto influye en la regulación de los linfocitos T; por lo tanto, puede hablarse de una regulación autocrina y paracrina, esta síntesis de $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$, aumenta a medida que las

CD van madurando a partir de monocitos, la habilidad de una célula de producir la $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ depende de la presencia de la enzima, la accesibilidad al sustrato adecuado y los efectos de competición de enzimas inhibitorias (Hewison, Freeman *et al.* 2003).

Existen diferencias marcadas entre la producción de la vitamina en el riñón y la producción por parte de las CD y los macrófagos; en primer lugar, estas células responden a estímulos proinflamatorios con un aumento en la síntesis de $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$, los túmulos renales no responden a estos estímulos, que son sumamente sensibles a los efectos reguladores negativos de la vitamina (Hewison, Freeman *et al.* 2003).

Los macrófagos activados también son capaces de sintetizar y secretar $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ en su forma activa, ya que poseen la enzima 1α -hidroxilasa, aunque esta es similar a la enzima de los túmulos renales, su regulación parece estar mediada directamente por señales inmunes, como la secreción de $\text{IFN-}\gamma$ (Mathieu y Adorini 2002).

La regulación enzimática es baja, por la acumulación del producto final, no parece ser un método de regulación en macrófagos, por lo tanto, puede observarse hipercalcemia en situaciones donde hay una sobreactivación de los mismos, como sucede en enfermedades granulomatosas como sarcoidosis y TB (Mathieu y Adorini 2002).

Las células Th son el centro de toda la respuesta inmune antígeno-específico (Cantorna, Zhu *et al.* 2004). En el ambiente en el cual se desarrollan las células Th determina dos predominantes subtipos (Th1 o Th2).

Los linfocitos CD4+ se pueden dividir en Th1 y Th2, según el perfil de citocinas que elaboran después de la estimulación antigénica (Boonstra, Barrat *et al.* 2001). La subpoblación de células Th1 produce IFN- γ e IL-2 (Boonstra, Barrat *et al.* 2001) y el TNF- α y se relaciona con las respuestas de la respuesta inmune celular, incluyendo la respuesta del hospedero hacia los tumores y patógenos intracelulares (Cantorna, Zhu *et al.* 2004), la subpoblación Th2 produce IL-4, IL-5 e IL-13 y se relaciona con la respuesta inmune de tipo humoral (Boonstra, Barrat *et al.* 2001; Cantorna, Zhu *et al.* 2004).

Al inhibir la maduración de las CD se reduce la producción de IL-12, cuya acción es crítica para la maduración de linfocitos Th1, la 1,25(OH) $_2$ D3 reprime la transcripción de los genes que codifican la IL-2 e IFN- γ , citocinas que definen el perfil de linfocitos Th1, la 1,25(OH) $_2$ D3 se une con el receptor e inhibe la transcripción del factor NF-AT que es un activador del promotor de los genes que codifican IL-2 (Cantorna 2000). Por otro lado, activa los genes *GATA-3* y *c-maf* promotores de la transcripción de citocinas características de linfocitos Th2 (Boonstra, Barrat *et al.* 2001).

La 1,25(OH) $_2$ D3 estimula la secreción de TGF- β que suprime las acciones proinflamatorias de los linfocitos Th1, este balance a favor de los Th2 provee las bases moleculares para una terapia potencial con 1,25(OH) $_2$ D3 y sus análogos en enfermedades autoinmunes mediadas por linfocitos Th1 (Hewison, Freeman *et al.* 2003).

La respuesta de los hospederos hacia patógenos extracelulares (la mayoría de bacterias y parásitos) requiere de las células Th2, las alergias y el asma son

enfermedades conducidas por las células Th2, y ocurren cuando el sistema inmune responde hacia diferentes antígenos medioambientales (Cantorna, Zhu *et al.* 2004). Las células Th1 y Th2 son blanco directo de la $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ (Cantorna, Zhu *et al.* 2004).

La vitamina D como agente quimiopreventivo contra diversas enfermedades

Técnicas de genética molecular han ayudado a revelar que la $1\alpha,25 (\text{OH})_2 \text{D}_3$ puede controlar más que la homeostasis del calcio, esto ha ampliado los efectos en la diferenciación y proliferación celular y puede regular la respuesta inmune y la función del sistema nervioso central. Sin embargo, evidencias moleculares y epidemiológicas sugieren que la $1\alpha,25 (\text{OH})_2 \text{D}_3$ actúa como un agente quimiopreventivo contra diversas enfermedades malignas incluyendo cáncer de próstata y colon (Lin y White 2004).

Los productos celulares Th2 son la IL-4, IL-5 e IL-13 han sido asociados con varias enfermedades en asma alérgico experimental (Webb, McKenzie *et al.* 2000). Estas citocinas están involucradas en la estimulación de las células B para producir IgE y en promover la infiltración de los tejidos blanco por mastocitos y eosinófilos (Webb, McKenzie *et al.* 2000), el metabolito activo de la vitamina D es $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ es un regulador potente de la respuesta inmune (Wittke, Weaver *et al.* 2004).

El haber encontrado VDR en varios tipos de células como queratinocitos epidérmicos, fibroblastos dérmicos, melanocitos, tejido tumoral, así como el

hecho de comprender mejor el modo de acción de los análogos de la 1,25(OH)₂D₃ originaron interés por evaluar la aplicación clínica potencial de estas sustancias en las alteraciones de la piel. Tras su unión con los receptores específicos del núcleo celular se produce la modificación de la transcripción del material genético que inhibe la multiplicación de los queratinocitos no diferenciados y estimula los queratinocitos diferenciados a su queratinización. Además, la presencia de los VDR en las células de Langerhans, queratinocitos, melanocitos, fibroblastos, células endoteliales y sobre todo, en los linfocitos activados permite que la actividad de estos productos abarque también la inmunorregulación.

La existencia del VDR en la glándula paratiroides, la aplicación de la 1,25(OH)₂D₃ y sus análogos son un buen tratamiento de hiperparatiroidismo secundario encontrado en pacientes con diálisis (Deluca y Cantorna 2001).

Para investigar la función de la 1,25(OH)₂D₃ en enfermedades dirigidas por células Th₂, en asma alérgico experimental fue inducido en el VDR, induciendo la inflamación con un influjo de eosinófilos, elevando los niveles de la citocina Th₂, producción de moco y una reacción AHR (Wittke, Weaver *et al.* 2004).

En estudios previos, se mostró la evidencia de que el *Bcl-2* juega un papel esencial durante el proceso apoptótico estimulado por VDR, porque su sobreexpresión previene la muerte celular inducida por calcitriol en el insulino, cáncer de pecho y células cancerosas de próstata (Crescioli, Morelli *et al.* 2005). La vejiga humana, la cual expresa niveles de transcripción VDR virtualmente idénticos a los de la glándula prostática, representa nuevo blanco potencial para los ligandos VDR (Crescioli, Morelli *et al.* 2005).

Las enfermedades autoinmunes están caracterizadas por la destrucción del tejido propio por el sistema inmune (Cantorna y Mahon 2004). Se conocen más de 80 desordenes autoinmunes y representan la causa de muerte entre las mujeres jóvenes de mediana edad en los EUA (Walsh y Rau 2000).

A pesar de su elevada prevalencia, la etiología y patogénesis de la mayoría de estas enfermedades se mantiene desconocida, para curar un desorden autoinmune, se necesita erradicar o el mismo antígeno o las células inmunes responsables de la patología, la erradicación del mismo antígeno es imposible; por lo tanto, las opciones de tratamiento incluyen varias estrategias con el objetivo de regular la respuesta autoinmune (Cantorna y Mahon 2004).

Las propiedades inmunoregulatoras de la $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ y específicamente su función en la maduración de las CD, el aumento de linfocitos T reguladores y la inhibición que ejerce en el desarrollo de linfocitos Th1, posibilitan su uso terapéutico en enfermedades autoinmunes (Adorini, Giarratana *et al.* 2004).

En animales, el uso de la $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ puede atenuar las manifestaciones del lupus eritematoso sistémico (Koizumi, Nakao *et al.* 1985), la encefalomielitis autoinmune (Cantorna, Hayes *et al.* 1996) en una provisión de 50-200 ng/día de $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ (Deluca y Cantorna 2001), la enfermedad inflamatoria del intestino (Cantorna, Munsick *et al.* 2000), la artritis inducida por colágeno (Larsson, Mattsson *et al.* 1998), diabetes mellitus insulino dependiente, esclerosis múltiple, artritis reumatoide (Cantorna, Zhu *et al.* 2004; Holick 2004) y la tiroiditis autoinmune (Pani, Regulla *et al.* 2002).

En adición, la diabetes tipo 1 demostrada en ratones NOD puede ser detenida por un tratamiento de corta duración con $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$, el cual es capaz de

inducir una inhibición selectiva de Th1 y una frecuencia aumentada de de las células T reguladoras CD4+ CD25+ en nódulos linfáticos pancreáticos (Gregori, Giarratana *et al.* 2002).

In vivo, el efecto inhibitorio de la 1,25(OH)₂ D3 sobre la esclerosis múltiple experimental mostró que depende de la habilidad del hospedero para producir IL-4 (Cantorna, Humpal-Winter *et al.* 2000), este dato sugiere, que el efecto inhibitorio de la 1,25(OH)₂ D3 sobre las enfermedades conducidas por Th1 ocurren en parte debido a un cambio en el compartimiento de las células T, el cual inhibe las células Th1 y sobrerregula las células Th2 (Wittke, Weaver *et al.* 2004).

El efecto de la 1,25(OH)₂ D3 o el estado de la vitamina D sobre las enfermedades conducidas por Th2 no han sido investigadas totalmente.

La autoinmunidad es conducida por las células Th1, las cuales atacan varios tejidos propios en el cuerpo, es claro que ambos factores, genéticos y medioambientales afectan la prevalencia de la enfermedad (Cantorna y Mahon 2004). El hecho de que la vitamina D ha estado implicada como un factor en varias enfermedades autoinmunes diferentes, sugiere que la vitamina D debería ser un factor medioambiental que normalmente participa en el control de la propia tolerancia (Cantorna y Mahon 2004).

En adición, ahí puede ser un mayor requisito de vitamina D para pacientes en riesgo de desarrollar una enfermedad autoinmune, la cantidad óptima de vitamina D para apoyar la respuesta inmune puede ser diferente de la cantidad requerida para prevenir la deficiencia de vitamina D o para mantener la homeostasis de calcio; actualmente, los niveles que se recomiendan de

vitamina D son bajos para apoyar la mineralización del hueso, la cual es ya un problema en pacientes con autoinmunidad (Cantorna y Mahon 2004).

In vitro, se ha demostrado se ha demostrado que la $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ y sus análogos puede inhibir la formación de autoanticuerpos en lupus eritematoso sistémico, ya que reducen la apoptosis de linfocitos B activados (Koizumi, Nakao *et al.* 1985).

La psoriasis, es una enfermedad inflamatoria crónica de la piel, mediada por linfocitos Th1, que afecta al 2% de la población, dentro de su tratamiento se emplean combinaciones de $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ y antiinflamatorios para evitar complicaciones posteriores (Lebwohl, Menter *et al.* 2004).

In vivo, el suplemento de $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ previene la encefalomiелitis autoinmune (Cantorna, Hayes *et al.* 1996), e inyectada prolonga el tiempo del desarrollo de la diabetes mellitus insulina-dependiente en murino (Mathieu, Laureys *et al.* 1992). Aunado a esto, en pacientes con diabetes tipo I se ha comprobado una disminución importante en la resistencia a la insulina después de administrar el tratamiento con $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ por vía oral (Borissova, Tankova *et al.* 2003; Giarratana, Penna *et al.* 2004).

La diabetes tipo I es una destrucción mediada por células de las células β que secretan insulina en los islotes pancreáticos, los eventos que inician la enfermedad y los factores que favorecen la infiltración progresiva de leucocitos, en particular los linfocitos T y B, DCs y macrófagos, dentro de los islotes pancreáticos aún no se ha entendido en su totalidad; adicionalmente, la sobrerregulación mediada por el TLR de la producción de CK proinflamatorias por las células de los islotes podría representar un elemento importante en las

primeras fases del desarrollo de la diabetes tipo I permitiendo la infiltración de leucocitos en los islotes pancreáticos (Giarratana, Penna *et al.* 2004).

La deficiencia de vitamina D incrementa la susceptibilidad del ratón hacia la encefalomiелitis autoinmune (Cantorna, Hayes *et al.* 1996). *In vitro*, la 1,25(OH)₂D₃ inhibe la proliferación de células T disminuyendo la producción de citocinas Th1, como IL-2, IFN-γ, en el nivel del factor GM-CSF en el mRNA (Alroy, Towers *et al.* 1995) y el TNF-α (Lemire 1992).

In vivo, las inyecciones de han mostrado que inhiben la conducción de Th1 en la respuesta de hipersensibilidad tipo retardada (Lemire y Archer 1991; Lemire y Adams 1992). El blanco de la vitamina D en el sistema inmune ha comenzado a ser identificado, y un blanco de la vitamina D en las células Th1 que causa la encefalomiелitis autoinmune (Cantorna 2000). La vitamina D puede ser un regulador fisiológico del desarrollo de las células T (Cantorna 2000).

In vitro, la 1,25(OH)₂ D₃ ha mostrado ser un factor de diferenciación para monocitos y otros tipos de células incluyendo las células tumorales (DeLuca 1988). En las células T, la 1,25-(OH)₂ D₃ parece que preferentemente sobrerregula las células tipo Th1 ambas disminuyendo la proliferación y secreción de citocinas (Lemire, Archer *et al.* 1995). Además, la 1,25(OH)₂ D₃ disminuye la producción de IL-12 y la IL-12 es un importante factor de diferenciación de las células T (D'Ambrosio, Cippitelli *et al.* 1998).

In vivo, el tratamiento con la 1,25(OH)₂ D₃ incrementa la proporción de citocinas Th2, IL-4 y el TGF-β1 (Cantorna, Woodward *et al.* 1998). En ausencia de la

vitamina D la encefalomiелitis autoinmune se desarrolla más rápidamente, comparado con ratones con suficiente vitamina D (Cantorna, Hayes *et al.* 1996). El uso de la 1,25(OH)₂ D3 ha logrado prevenir el rechazo agudo y crónico de aloinjertos, en una variedad de modelos experimentales por su potente efecto inmunomodulador, aunque se debe de tener cuidado de la dosis terapéutica, porque puede ocasionar hipercalcemia, por tal razón se ha estudiado su efecto combinado con inmunosupresores como la ciclosporina A, rapamicina (van Etten, Branisteanu *et al.* 2000) y micofenolato mofenil, que es un potente agente inmunosupresor (Gregori, Casorati *et al.* 2001), logrando de esta manera prolongar la vida de los injertos.

En ratones tratados con la 1,25(OH)₂ D3, la respuesta de linfocitos T CD4⁺ se caracteriza por una baja producción de IFN- γ y un incremento de linfocitos T reguladores CD4⁺ CD25⁺CD25⁺, esto impide el 100% de rechazo celular (Gregori, Casorati *et al.* 2001).

Otros trabajos experimentales han mostrado que la 1,25(OH)₂ D3 y sus análogos prolongan la sobrevivencia de aloinjertos (injerto de tejidos u órganos entre individuos de la misma especie) incluyendo corazón, hígado, piel e intestino delgado (Mathieu y Adorini 2002).

El uso de la 1,25(OH)₂ D3 y sus análogos que controlan la diferenciación celular y ejercen una actividad inmunorreguladora, constituye una estrategia terapéutica potencial para favorecer la tolerancia inmune y prevenir el rechazo crónico de trasplantes (Adorini 2002).

La vitamina D y su efecto en la tuberculosis

Los macrófagos de los pacientes con TB y la siguiente activación por IFN- γ expresa una enzima activa la 1α -hidroxilasa y convierte rápidamente la 25(OH)-vitamina-D3 a calcitriol (Rook, Steele *et al.* 1986; Rook 1988). Sus células T también pueden expresar esta enzima (Cadranel, Garabedian *et al.* 1990).

Este fenómeno potente permite ocasionalmente verter el calcitriol a la periferia; aunque, su función en la hipercalcemia ha sido difícil de entender (Rook 1988).

La calcificación es un mecanismo de retroalimentación que tiende a disminuir la regulación Th1 e incrementa la respuesta Th2, una posibilidad sugerida recientemente porque el metabolito activo de la $1,25(\text{OH})_2$ D3 colecalciferol (calcitriol), $1,25(\text{OH})_2$ inhibe la producción de IFN- γ y de IL-2 e incrementa la producción de IL-4 e IL-5 (Rigby, Yirinec *et al.* 1987; Daynes, Meikle *et al.* 1991; Cantorna, Zhu *et al.* 2004). Este cambio de Th1 a Th2 puede relacionarse bien a la habilidad del calcitriol para inhibir la liberación de IL-12 (Lemire 1994).

Con respecto al efecto de la $1,25(\text{OH})_2$ D3, queda claro que la respuesta del timo ante el antígeno es expresión del iNOS esencial en la activación de las células T asociando claramente al IFN- γ , el TNF- α y la respuesta del NO por los macrófagos alveolares, por lo que la respuesta de IFN- γ provee un diagnóstico útil para la TBB (Waters, Nonnecke *et al.* 2001).

En ganado vacuno, $1,25(\text{OH})_2$ D3 también inhibe la proliferación celular CD4+, la proliferación celular que estimula CD8+ e inhibe la expresión de CD25 por estimulación policlonal de PBMC (Waters, Nonnecke *et al.* 2003).

La respuesta de las células de bovino CD4+ y receptor de células T (TCR) TCR+ γ/δ asociados con la proliferación inducida del antígeno y los efectos de 1,25(OH)₂-D3 demostraron un incremento en la expresión en los marcadores de superficie (o marcadores de activación temprana) CD25 y CD44, además de un decremento en la expresión de los CD62L, no así, siendo para las mismas CD25 en el caso de estimulación policlonal de las PBMC (Waters, Nonnecke *et al.* 2003).

La adición de 1,25(OH)₂ D3 al cultivo del antígeno estimulado resultó en la disminución de la proliferación de células CD4+ hacia el antígeno y la disminución de la expresión de CD44 sobre la respuesta celular (ejemplo, ambas células CD4+ y TCR+ γ/δ) (Waters, Nonnecke *et al.* 2003). Estas acciones son altamente relevantes frente a la infección de TB mientras que la 1,25(OH)₂ D3 actúa específicamente sobre las células inmunes importantes en la defensa del hospedero en las infecciones micobacteriales (Waters, Nonnecke *et al.* 2003).

Los macrófagos y las células T CD4+ son dos tipos de células particularmente relevantes durante la respuesta antitubercular. El IFN- γ producido por el antígeno específico y los macrófagos que activan las células T CD4+ (ejemplo, las células infectadas del hospedero) conduciendo hacia la producción de NO, esencial para la muerte intracelular del bacilo tubérculo (Waters, Nonnecke *et al.* 2003).

La $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ desempeña un papel importante en la reducción de la respuesta de Th1, para la cual la expresión de las células accesorias CD80 puede ser importante (Rhodes, Terry *et al.* 2003; Tazi, El Baghdadi *et al.* 2004). Los macrófagos alveolares activados por $\text{IFN-}\gamma$ tienen una tasa de incremento de conversión de 25-hidroxyvitamina D3 a $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$, la forma más activa, la $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$, en tino estimula la expresión del iNOS y la producción de NO por macrófagos alveolares, aún los efectos de la $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ sobre la activación de las células T específicas, no son claros (Waters, Nonnecke *et al.* 2003), respecto a la aceleración de la producción de NO por $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ es probable que desencadene un mecanismo dependiente del NO que incrementa la destrucción de la micobacteria (Waters, Nonnecke *et al.* 2004; Waters, Palmer *et al.* 2004).

La $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ es una hormona esteroidea esencial en la homeostasis de calcio y en la regulación de la diferenciación y proliferación de muchos tipos de células, incluyendo las del sistema inmune, también actúa específicamente sobre las células inmunes importantes en la defensa del hospedero a las infecciones micobacterianas (Waters, Nonnecke *et al.* 2001; Waters, Nonnecke *et al.* 2003). En cultivos de linfocitos se ha observado que la presencia de la $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ aumenta la producción de IL-4. IL-5 e IL-10 (Boonstra, Barrat *et al.* 2001).

La 1,25-Dihidroxitamina D3 regula la liberación de intermediarios reactivos de nitrógeno

La 1,25(OH)₂ D3 es un estímulo potente para la producción de NO por macrófagos, la cual es indicativo de la defensa del hospedero contra la TB (Rook 1988). Adicionalmente, se ha observado que la 1,25(OH)₂ D3 suprime el crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis* en los macrófagos a través de un mecanismo dependiente de NO, la concentración de 1,25-D3 en suero normal de humano es alrededor de 0.1 nM, pero de su inmediato precursor que es 25-hidroxitamina D3 es alrededor de 100 nM (Rockett, Brookes *et al.* 1998).

Un punto crítico es que la 25-OH-D3 es convertida a 1,25(OH)₂ D3 dentro del macrófago, y la proporción de conversión incrementa marcadamente dentro de los macrófagos alveolares y en monocitos humanos seguidos de la estimulación con IFN- γ (Koeffler, Reichel *et al.* 1985; Rook, Steele *et al.* 1986).

Con respecto al efecto de la 1,25(OH)₂ D3, queda claro que la respuesta del timo ante el antígeno es expresión del iNOS esencial en la activación de las células T asociando claramente al IFN- γ , el TNF- α y la respuesta del NO por los macrófagos alveolares, por lo que la respuesta de IFN- γ provee un diagnóstico útil para la TBB (Waters, Nonnecke *et al.* 2001).

Interesantemente, se ha observado que en infecciones de *M. bovis* la 1,25(OH)₂ D3 acelera la producción específica de NO e inhibe la producción específica de IFN- γ y la proliferación celular específica de CD4+, al respecto, se plantea el desarrollo de nuevas investigaciones para esclarecer estos descubrimientos (Waters, Nonnecke *et al.* 2001).

Hay evidencias, de otro estimulador conocido como LPS que por sí solo es suficiente para estimular niveles elevados en la producción de NO en la línea celular mielomonocítica (Rockett, Brookes *et al.* 1998).

Los macrófagos alveolares activados por IFN- γ tienen una tasa de incremento de conversión de 25-hidroxivitamina D₃ a 1,25(OH)₂ D₃, la cual, en tino estimula la expresión del iNOS y la producción de NO por macrófagos alveolares, aún los efectos de la 1,25(OH)₂ D₃ sobre la activación de las células T específicas, no quedan claros (Waters, Nonnecke *et al.* 2003), respecto a la aceleración de la producción de NO por 1,25(OH)₂ D₃ es probable que desencadene un mecanismo dependiente del NO que incrementa la destrucción de la micobacteria (Waters, Nonnecke *et al.* 2004; Waters, Palmer *et al.* 2004).

De las aseveraciones anteriores, se deduce que los macrófagos son capaces de sintetizar NO pero que esa respuesta puede depender de factores tales como el estado preciso de la diferenciación del macrófago, el estímulo complejo o la localización del tejido. Una pregunta importante emergida de estas observaciones es el papel del NO en la defensa del huésped contra TB. Las evidencias conducen a que los macrófagos pueden destruir varias especies micobacteriales a través de la ruta dependiente de NO.

Se ha observado que los macrófagos alveolares de pacientes con TB expresan NOS₂, pero hasta el momento no ha habido evidencia que los macrófagos utilicen el NO para eliminar al *Mycobacterium*. Un camino para dirigir este problema es la búsqueda de la producción de RNI a través de la línea celular

promielocítica por su habilidad de diferenciar una variedad de fenotipos mielomonocíticos.

También se ha determinado que la $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ es un estímulo potente para la producción de NO dentro de esta línea celular.

La latencia clínica sobrepasa la importancia para la epidemiología y el control de TB. Poco se conoce acerca de la naturaleza del estado de persistencia *in vivo* o de los factores del huésped que lo inducen y lo mantienen. El control de la replicación bacteriana en el estado de latencia requiere del $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IFN-}\gamma$ y del NO, éste junto con el $\text{TNF-}\alpha$ constituyen dos componentes esenciales de la defensa tuberculosa del huésped. La estimulación de iNOS y la generación subsecuente de RNI son mecanismos potentes para la destrucción micobacteriana.

La situación aún no es clara, porque a pesar de estos avances, todavía hay necesidad de realizar nuevas pruebas de diagnóstico para TB. Por lo que, se dedujo lo siguiente, favorecerá la $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ la producción de RNI en macrófagos y sobrenadantes de cultivo obtenidos de células mononucleares de sangre periférica de cabras vacunadas con BCG de *M. bovis*, *in vivo*. Los mamíferos producen óxido nítrico como una respuesta natural cuando se defienden de la TB.

Por lo que se planteó lo siguiente, la $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ favorece la producción de Intermediarios reactivos de nitrógeno en cultivos de células mononucleares de cabras expuestas a la vacuna BCG de *M. bovis*. El objetivo general establecido fue evaluar el efecto de la $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ sobre mediadores de la respuesta

inmune como diagnóstico oportuno de la infección de tuberculosis latente en células mononucleares de sangre periférica de cabras expuestas al BCG de *M. bovis*.

Como objetivos particulares se plantearon los siguientes: analizar el efecto *in vivo* de la 1,25(OH)₂ D3 en la producción de intermediarios reactivos de nitrógeno en macrófagos de células mononucleares de cabras infectadas con vacuna BCG de *Mycobacterium bovis*, comparar el efecto *in vivo* de la 1,25(OH)₂ D3 en la producción de intermediarios reactivos de nitrógeno en sobrenadantes de cultivo de células mononucleares de cabras infectadas con vacuna BCG de *Mycobacterium bovis* e investigar el efecto *in vitro* del lipopolisacárido sobre la producción de óxido nítrico en sobrenadantes de cultivo de células mononucleares en cabras infectadas con vacuna BCG de *Mycobacterium bovis* suplementadas con 1,25(OH)₂ D3.

La comarca lagunera es una cuenca lechera por excelencia, lo que incrementa que haya la existencia de grupos de personas consideradas de alto riesgo y que pueden convertirse en focos de infección debido al contacto continuo con los animales. Por lo que, surge la necesidad de realizar un diagnóstico rápido, oportuno y preciso de la primoinfección de *Mycobacterium* como un elemento primordial de salud pública para controlar la tuberculosis.

Más aún, como la mayoría de los estudios se han realizado *in vitro* es importante determinar si la 1,25(OH)₂ D3 tiene un efecto *in vivo* en la producción de intermediarios reactivos de nitrógeno en células mononucleares de animales suplementados con la vacuna BCG de *M. bovis*. Modulando la respuesta inmune del huésped a partir de la acción de algunas citocinas y de la

determinación de eficientes mecanismos microbicidas que actúan en forma conjunta, como la generación de radicales libres, la iNOS y la oxidasa fagocítica, se conseguirá un mejor control de la infección desde su estado de latencia, antes de que se desencadene la enfermedad de la tuberculosis.

CAPÍTULO III

Materiales y métodos

La presente investigación se llevó a cabo en los laboratorios de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Juárez del Estado de Durango, en los laboratorios de la Clínica Hospital ISSSTE, en el Laboratorio de Análisis Clínicos y Microbiológicos en Gómez Palacio y en el ejido Banco Nacional del Municipio de Tlahualilo, Durango.

Selección de animales

Se seleccionaron 12 animales (Nonnecke, Waters *et al.* 2003) de ganado caprino raza *Sannen*, con edad aproximada de 24 meses, libres de tuberculosis, brucelosis y clínicamente sanos. Los animales empleados en el estudio se mantuvieron en corrales aislados del resto del ganado. Se realizó el marcaje y se procedió a pesar cada animal.

Para diagnóstico de brucelosis se utilizó el antígeno Rosa de Bengala (Productora Nacional de Biológicos Veterinarios-PRONABIVE®); para diagnóstico de tuberculosis se utilizó el *kit Tuberculosis Serum Rapid Screen Test* (TASHIMA®. Inc. Country Wide Distributor. IDL Biotech Sweden) que es usado para realizar diferenciación cualitativa de anticuerpos IgG e IgM para *Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis* y *M. africanum*. Adicionalmente, se llevó a cabo un proceso de desparasitar para tratamiento y control de parásitos como: nemátodos gastrointestinales, pulmonares y oculares, miosis (gusaneras) piojos, ácaros de la sarna, garrapatas de un solo huésped con dosis única de 1

ml/50kg vía IM de solución inyectable al 1% 500 ml. DECTOMAX®
(doramectina) Laboratorios PFIZER LTDA. S.A.G.A.R. Q-0001-064.

Tratamientos

	Nitritos	Nitratos
Control (Solución salina)		
Vacuna BCG de <i>M. bovis</i>		
1,25(OH) ₂ D ₃		
Vacuna BCG de <i>M. bovis</i> + 1,25(OH) ₂ D ₃		

Muestreo

Las muestras de sangre se obtuvieron en el momento previo a la inoculación (cero días), y posteriormente a los 3, 7, 14 y 21 días después de inocular a los animales. La toma de muestra se realizó por venopunción en la yugular utilizando tubos Vacutainer® con EDTA de 4 ml. Una vez colectadas se depositaron en una hielera y fueron transportadas al laboratorio para ser procesadas. Se trabajaron dentro de un período no mayor de cuatro horas después de haberse obtenido.

Exposición a la vacuna BCG de *Mycobacterium bovis*

Tres cabras (control) fueron inoculadas con 0.1 ml de solución salina. Otras tres cabras fueron inmunizadas con la vacuna BCG de *M. bovis* utilizada por la Secretaría de Salud (Pasteur Merieux, Lyon France). Se aplicó 0.1 ml de solución, con una jeringa para insulina vía intradérmica. Se tomaron muestras en el momento previo a la inoculación (cero días), y posteriormente a los 3, 7, 14 y 21 días después de inocular a los animales, y se evaluaron los RNI (NO_3^- y NO_2^-) en los macrófagos ($\mu\text{moles/l}$) (Feng, Bean *et al.* 1999; Aldwell, Tucker *et al.* 2003).

Tratamiento con 1,25 dihidroxivitamina D3

Para evaluar el efecto de 1,25-(OH)₂ D3 en la secreción de RNI, se inocularon otros tres animales con BCG se administró una dosis de 0.25 μg de 1,25-(OH)₂ D3 (CALCITRIOL –alfa 25-hidroxicolecalcitol GELDEX-GELPHARMA®) y tres animales control administrando solo el Calcitriol®, de igual manera que en los otros tratamientos se tomaron muestras en el momento previo a la inoculación (cero días), y posteriormente a los 3, 7, 14 y 21 días de inoculados los animales y después se obtuvieron y cultivaron macrófagos para evaluar el efecto de la 1,25-(OH)₂ D3 administrada como adyuvante.

Procedimiento para la obtención de las células mononucleares a partir de sangre total por el método de Ficoll-Hypaque

La sangre periférica fue colectada en tubos Vacutainer® con EDTA y procesada en un lapso no mayor de cuatro horas a temperatura ambiente. Posteriormente,

la sangre total se centrifugó a 1500 rpm durante 15 minutos, se recolectó el plasma y se colectó en un tubo cónico de 15 ml la capa de células mononucleares o suspensión celular (SC) presente entre el plasma y el paquete globular, posteriormente la SC se resuspendió en RPMI suplementado con SFB al 10% y 27 mM de bicarbonato de sodio llevándolo a 6 ml, después se pasó a otro tubo cónico con 3 ml de Ficoll-histopaque de una manera lenta por las paredes del tubo, se volvió a centrifugar a 1,500 rpm durante 15 minutos (eliminar freno de la centrífuga), se obtuvieron 4 capas, Ficoll, mononucleares, Ficoll, y polimorfonucleares con eritrocitos, respectivamente (**figura 8**). Posteriormente, se recuperó el anillo rico en células mononucleares mediante aspiración con un pipetor y se lavó dos veces PBS estéril llevándolo hasta 10 ml para lavar del Ficoll que haya quedado, manteniendo en hielo y centrifugar a 1500 rpm durante 5 minutos.

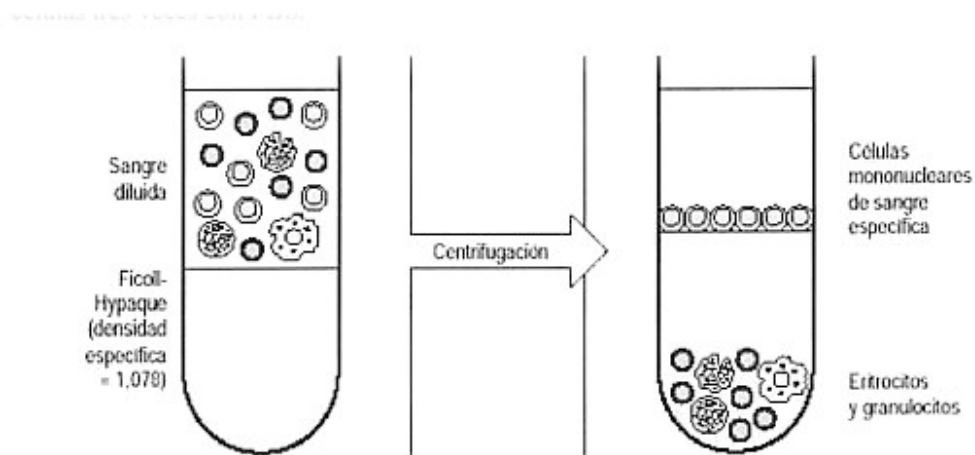


Figura 8. Obtención de células mononucleares de sangre periférica (Waters, Nonnecke *et al.* 2004).

Se eliminó el PBS por decantación y el botón celular se resuspendió con 1 ml (2 ml si es una SC grande) de medio de cultivo RPMI-1640 completo (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10%, inactivado por calor, se mezcló dentro del medio para no formar burbujas con la misma micropipeta (Gasbarre, Romanowski *et al.* 1985; Huttunen, Pelkonen *et al.* 2004; Waters, Nonnecke *et al.* 2004)

Viabilidad Celular

Las suspensiones celulares se resuspendieron en RPMI completo con SFB, 100 U/ml de penicilina/100 µg/ml de estreptomicina, 2 mM de L-glutamina, 15 mM de hepes (2.38 g/l), aminoácidos esenciales y 50 µM de 2-mercaptoetanol. La viabilidad de las células se determinó utilizando la prueba de exclusión del colorante azul de tripano. Se realizó en un hematocitómetro (cámara de Neubauer) de la siguiente manera: se prepararon 100 µl de suspensión (1:10): en un tubo eppendorf se agregaron 90 µl de PBS + 10 µl de suspensión celular, se mezcló y en otro tubo eppendorf se tomaron de esta suspensión 10 µl + 80 µl de PBS + 10 µl de azul de tripano, se mezcló e inmediatamente se tomaron 10 µl y se agregaron a un hematocitómetro para determinar la viabilidad celular.

La viabilidad de las células se determinó utilizando la prueba de exclusión del colorante azul de tripano (Huttunen, Pelkonen *et al.* 2004). Se realizó una dilución con 100 µl de SC: en un tubo eppendorf se adicionaron 90 µl de PBS más 10 µl de SC (1:10), de esta suspensión se tomaron 10 µl y se pasaron a

otro tubo eppendorf con 80 μ l de PBS más 10 μ l de azul de tripano (1:100) e inmediatamente después se mezcló y se tomaron 10 μ l para adicionarlos a un hematocitómetro para contar las células mononucleares en un microscopio con el objetivo seco débil (10X) (Gallily, Aalseth *et al.* 1970) (**ANEXO 1**).

Transformación Blastoide de Linfocitos

La linfoproliferación consistió en una modificación de Gasbarre *et al.* Una vez que fueron obtenidos los linfocitos, se ajustaron a 1.32×10^6 células por pozo en placas de poliestireno de 24 pozos (Corning) para cultivo celular y se les adicionó por triplicado RPMI-1640 suplementado con SFB al 10% a las células estimuladas solo con la primera señal inmunológica (aplicación de los tratamientos *in vivo*), y a otros tres pozos, además, de la primera señal inmunológica se les adicionó RPMI-1640 suplementado con SFB al 10% más 100 ng/ml de lipopolisacárido (LPS)-segunda señal inmunológica (células estimuladas *in vitro*).

Se incubaron a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂, por ser una transformación blastoide con antígenos específicos, la duración del cultivo fue de 48 horas. Luego fue removido el sobrenadante de las células adheridas y éstas fueron resuspendidas por raspado en 300 μ l de PBS frío/pozo, y la suspensión celular fue obtenida en tubos eppendorf Axygen® posteriormente, se podía efectuar la lectura de la placa en un lector de ELISA a una densidad óptica (DO) de 540 nm. Al no poder realizar la lectura a la brevedad posible, se prepararon para congelación.

Congelación y descongelación de células mononucleares

Las 15 muestras de sangre total fueron procesadas de acuerdo a los protocolos establecidos, al tiempo cero días y posteriormente a los 3, 7, 14, 21 y 28 días después de aplicar los tratamientos. Cuando fue necesario se llevó a cabo la congelación de linfocitos la cual consistió en que una vez obtenidos los linfocitos de sangre periférica se suspendieron en 0.1 ml de RPMI 1640 y se colocaron en un criotubo, inmediatamente se adicionó 90% (90 μ l) de suero fetal bovino (SFB) y 10% (10 μ l) de dimetilsulfóxido (DMSO) y luego se congelaron a -70°C. Para descongelar las células, se mantuvieron a temperatura ambiente durante 10 min y luego se centrifugaron a 800 rpm durante 10 min a 10°C; después se descartó el sobrenadante y el paquete celular fue suspendido en RPMI 1640. El DMSO fue esterilizado por filtración a través de una membrana de celulosa de 0.2 μ m y se hicieron alícuotas en pequeñas cantidades (2 ml) para su almacenamiento y uso posterior.

Detección y cuantificación de intermediarios reactivos de nitrógeno (RNI) ($\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$) por ELISA

Las soluciones stock de nitrito de sodio y de nitrato de sodio (SIGMA®) en 100 mM de agua fueron almacenados a 4°C, la solución de NO_3^- reductasa (Boehringer Mannheim®, Lewes, United Kingdom) a 2.5 U/ml y una mezcla de NADPH (SIGMA®) a 1.67 mg/ml más flavin adenin dinucleótido (FAD) (Boehringer Mannheim®, Lewes, United Kingdom) a 0.05 mg/ml en agua fueron

almacenados a -20°C . Antes de usarlo, un volumen de NO_3^- reductasa fue mezclado con tres volúmenes de NADPH-FAD (mezcla enzimática). El reactivo de Griess (Huttunen, Pelkonen *et al.* 2004) también fue preparado (**ANEXO 1**). El ensayo fue realizado en microplacas de fondo plano de 96 pozos. Las muestras ($100\ \mu\text{l}$ de cultivo de células mononucleares se transfirieron a placas de 96 pozos) fueron divididas entre dos placas, adicionando $50\ \mu\text{l}$ a cada una, uno para la medición de NO_2^- y otra para la medición de NO_3^- , cada uno conteniendo los estándares apropiados. Agua ($20\ \mu\text{l}$ por pozo) fue adicionado a la microplaca del NO_2^- y la mezcla enzimática ($20\ \mu\text{l}$ por pozo) fue adicionado a la microplaca del NO_3^- . Todas las microplacas fueron incubadas durante 30 minutos a temperatura ambiente. El reactivo de Griess ($100\ \mu\text{l}$ por pozo) fue adicionado y después de 5 minutos a temperatura ambiente se realizó en todas las microplacas la lectura de las densidades ópticas (OD) a $620\ \text{nm}$ (referencia) y $540\ \text{nm}$ (prueba) (Jeevan, McFarland *et al.* 2006), se midió la absorbancia en un lector de ELISA (Organon Tecknika, Microwell system). Las concentraciones de NO_2^- fueron calculadas directamente de la curva estándar del nitrito de sodio (Rhoades y Orme 1997). Para determinar la concentración de NO_3^- , la OD del NO_2^- fue restada a la OD del NO_3^- antes de la comparación con la curva estándar de NO_3^- . La media sola fue usada para calcular el nivel del ensayo, y esta fue la resta de todos los datos (Rockett, Brookes *et al.* 1998; Roy, Sharma *et al.* 2004).

La cantidad de $\text{NO}_3^-/\text{NO}_2^-$ se midió utilizando una curva patrón de NaNO_2 en solución PBS en un rango de concentraciones de 0 a 100 μM . Los ensayos se realizaron por duplicado obteniéndose la media de éstos.

Análisis estadístico

Se empleó un diseño completamente al azar con mediciones repetidas en los períodos. El procedimiento que se utilizó fue el PROC MIXED (SAS, 1992). El modelo estadístico empleado fue el siguiente:

$$Y_{ijkl} = \mu + \zeta_i + C\zeta_{j(i)} + P_k + \zeta P_{ik} + \beta (x_{i.} - x_{..}) + \varepsilon_{ijkl}$$

Donde:

Y_{ijkl} = medición sanguínea de cada cabra de nitritos y nitratos en μM

μ = media general

ζ_i = efecto del i-ésimo nivel de tratamiento

$C\zeta_{j(i)}$ = efecto aleatorio de la j-ésimo nivel de cada unidad experimental dentro de cada tratamiento

P_k = efecto del k-ésimo nivel de período

ζP_{ik} = efecto de la interacción entre el tratamiento y el período

β = factor de ponderación lineal

$\beta (x_{i.} - x_{..})$ = ajuste lineal por la covariable peso al inicio del estudio

ε_{ijkl} = error experimental $e_{ijkl} \sim \text{NID}(0, \sigma_e^2)$

CAPÍTULO IV

Resultados

Datos generales de la población en estudio

Los datos generales de la población en estudio son los siguientes: se incluyeron animales de ganado caprino, raza *sannen*, con un promedio en peso de 53.85 kgs. (ANEXO 2)

Niveles de intermediarios de nitrógeno reactivo (RNI): nitratos (NO_3^-) y nitritos (NO_2^-)

Se obtuvo la densidad óptica de los cultivos de células mononucleares, se preparó una curva patrón de NO_2^- de sodio para calcular las concentraciones existentes en cada muestra de NO_3^- y NO_2^- (ANEXO 3).

El comportamiento de los diferentes tratamientos durante el período de los muestreos, aunque fue variable, se observó un incremento de NO_3^- y NO_2^- . En el primer tratamiento (control) la concentración de NO_2^- fluctuó entre 7.9 y 18.64 $\mu\text{M/l}$, en el segundo tratamiento (vacuna BCG de *M. bovis*) fueron entre 10.84 y 17.06 $\mu\text{M/l}$, observándose mayor respuesta a los tres días de iniciar el tratamiento.

En el tercer tratamiento ($1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$) la concentración de NO_2^- estuvo entre 13.93 a 25.38 $\mu\text{M/l}$, incrementando al 21 día del reto. En el cuarto tratamiento (vacuna BCG+ $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$) hubo una variación de 12.64 a 28.29 $\mu\text{M/l}$, observándose la mayor concentración de NO_2^- al 21 día del tratamiento. En lo

que respecta a la determinación de NO_3^- , se obtuvieron mayores concentraciones que los niveles de NO_2^- , en el primer tratamiento (control) la concentración fluctuó entre 26.06 y 39.23 μM , en el segundo tratamiento (vacuna BCG de *M. bovis*) fue entre 17.77 y 64.27 μM , observándose mayor respuesta a los 21 días de iniciar el tratamiento.

En el tercer tratamiento ($1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$) la concentración de NO_3^- estuvo entre 20.94 a 57.35 μM , observándose un incremento constante a partir del quinto día de tratamiento. En el cuarto tratamiento (vacuna BCG+ $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$) hubo una variación de 16.41 a 80.94, obteniéndose la mayor concentración de NO_3^- al 21 día del tratamiento (**ANEXO 4**).

Estadísticamente, el efecto de variación de las densidades ópticas, así como, de los $\mu\text{mol/l}$ de NO_2^- y NO_3^- fue significativa ($P < 0.01$) por los factores periodos de muestreo durante 21 días y por el efecto de interacción de tratamiento aplicado en el periodo de muestreo. Sin embargo el efecto de tratamiento fue no significativo ($P > 0.9$). Se considero el ajuste lineal mediante la covariable peso de las cabras al inicio del estudio resultado con efecto no significativo ($P > 0.5$), cuyo resultado refleja que la variación existente en pesos de las cabras al inicio del estudio fue uniforme en la respuesta tanto de densidad óptica como de concentración ($\mu\text{mol/l}$) de NO_3^- y NO_2^- (**Cuadros 1 y 2**).

Por resultar significativa la interacción tipo de tratamiento a cabras en los periodos de muestreo, la presentación de resultados solo se sujetara a este factor de variación, debido a que describe de manera mas completa el comportamiento biológico del estudio.

Cuadro 1. Efecto de la variación de tratamientos en cuanto a la determinación de Nitritos (NO_2^-) en macrófagos.

Efecto	Num DF	Den DF	F-valor	Pr > F
Tratamiento	3	7	0.03	0.9917 NS
Período	4	32	2.85	0.0397*
Tratamiento* período	12	32	3.18	0.0044*
Peso inicial	1	32	0.03	0.8543 NS

Cuadro 2. Efecto de la variación de tratamientos en cuanto a la determinación de Nitratos (NO_3^-) en macrófagos.

Efecto	Num DF	Den DF	F-valor	Pr > F
Tratamiento	3	7	0.08	0.9707 NS
Período	4	32	31.11	0.0001*
Tratamiento* período	12	32	3.58	0.0019*
Peso inicial	1	32	0.44	0.5135 NS

El comportamiento en sus diferentes modalidades de medición de NO_2^- son mostrados en la **Figura 9**, donde en el tratamiento con la $1,25(\text{OH})_2$ D3 y con el combinado $1,25(\text{OH})_2$ D3 más la vacuna BCG de *M. bovis*, se observa un incremento constante durante el tiempo del estudio, observándose mayor respuesta en el período de 14 a 21 días.

La respuesta de la aplicación de la vacuna BCG se obtuvo hasta el periodo de 7 a 14 días posteriores a su aplicación donde se diferencian ($P < 0.01$) en forma conjunta con la $1,25(\text{OH})_2$ D3. La $1,25(\text{OH})_2$ D3 ofrece una respuesta a incrementos en la concentración de NO_3^- , como se observa en la **Figura 10 (ANEXO 5)**.

Se detectó un incremento relativo en los niveles de NO_3^- en macrófagos estimulados por la $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$, la vacuna BCG de *M. bovis* y aún más con el tratamiento combinado, $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ más la vacuna BCG de *M. bovis*. En el tratamiento de $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ más la vacuna BCG de *M. bovis*, incrementó como resultado de la exposición a la $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$.

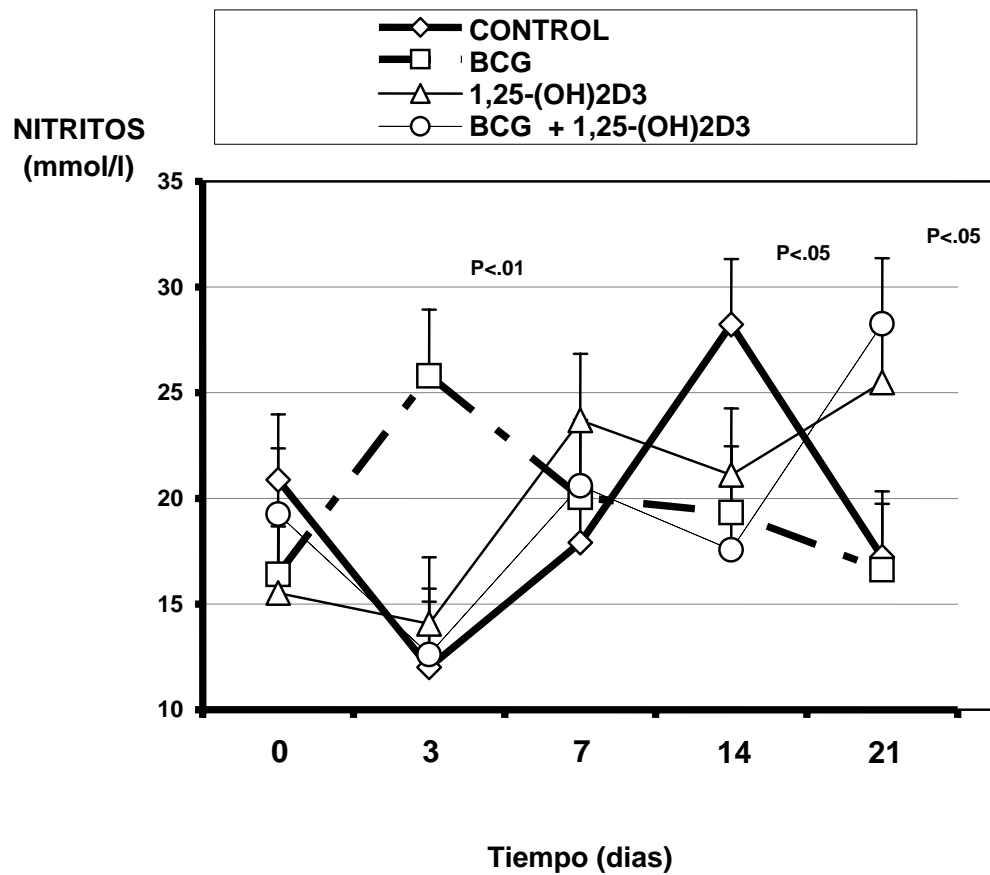


Figura 9. Medias de cuadrados mínimos y errores estándar de la concentración de nitritos en cultivo de células (macrófagos) al aplicar diferentes tratamientos para incrementar la respuesta del sistema inmune en cabras.

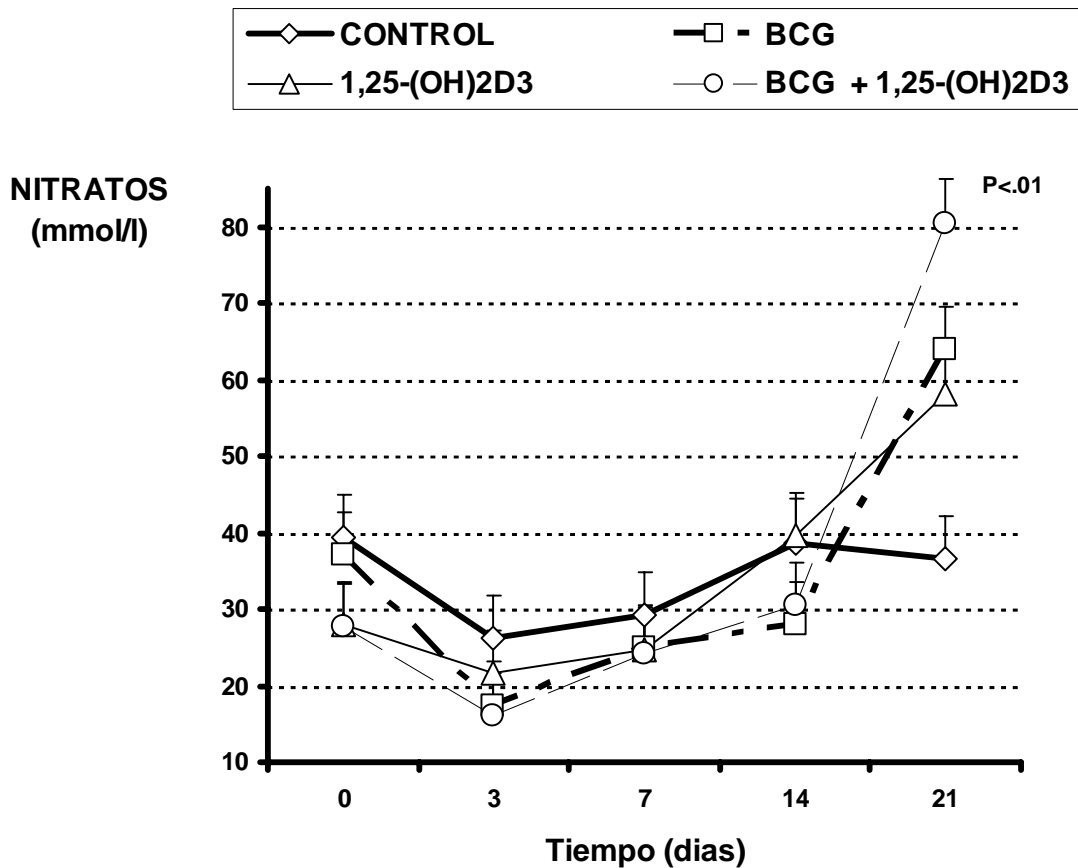


Figura 10. Medias de cuadrados mínimos y errores estándar de la concentración de nitratos en cultivo de células (macrófagos) al aplicar diferentes tratamientos para incrementar la respuesta del sistema inmune en cabras.

El comportamiento observado en la concentración de NO_3^- en los sobrenadantes de cultivo se muestran en el **Cuadro 3** y **Figura 11**, en donde estadísticamente entre los tratamientos se observó diferencia significativa, acentuándose más a los 21 días de tratamiento ya que en el período de 0 a 14 días se observó un comportamiento estable y muy similar entre los diferentes tratamientos, se obtuvo mayor respuesta a lo producción de NO_3^- con el

tratamiento con la sola 1,25(OH)₂ D3, seguida del tratamiento combinado 1,25(OH)₂ D3 con la vacuna BCG y del tratamiento con la vacuna BCG sola, el tratamiento “control” se mantuvo constante durante todo el período de 0 a 21 días (**ANEXO 6**).

Cuadro 3. Efecto de la variación de tratamientos en cuanto a la determinación de Nitratos (NO₃⁻) en sobrenadantes de cultivo.

Efecto	Num DF	Den DF	F-valor	Pr > F
Tratamiento	3	7	16.0	0.0001*
Período	4	32	38.06	0.0001*
Tratamiento* período	12	32	6.95	0.0001*

El comportamiento observado en la concentración de NO₃⁻ en los sobrenadantes de cultivo con el estimulante LPS se muestran en el Cuadro y **Figura 12**, en donde estadísticamente entre los tratamientos se observó diferencia significativa, habiendo una mayor respuesta a los 7 y 21 días de tratamiento, incluso no se observó diferencia en el comportamiento de los diferentes tratamientos, en el tratamiento “control” no se observó cambio durante el período de 0 a 21 días, la concentración de NO₃⁻ se mantuvo relativamente constante (**ANEXO 6**).

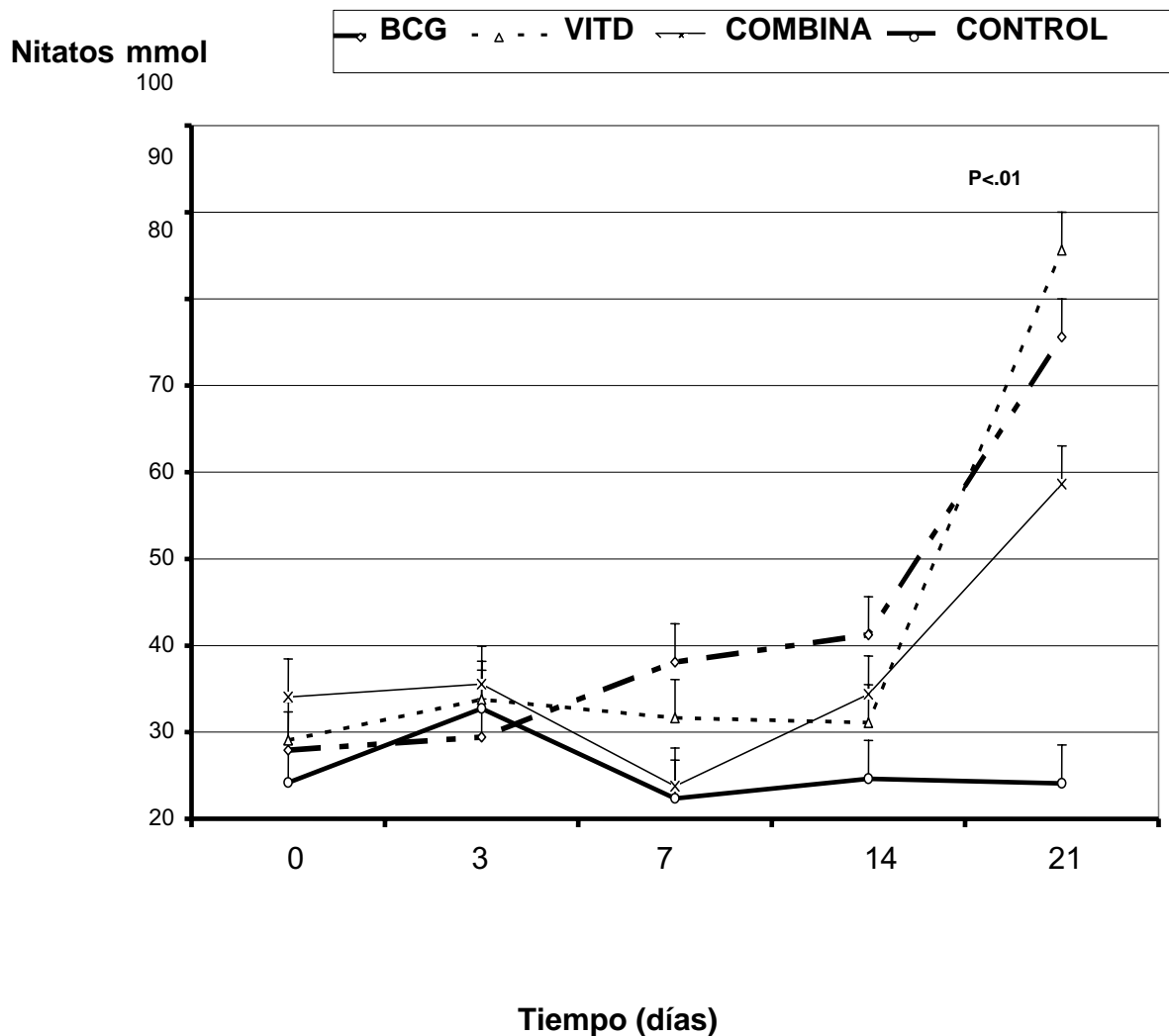


Figura 11. Medias de cuadrados mínimos y errores estándar de la concentración de nitratos en sobrenadantes de cultivo al aplicar diferentes tratamientos para incrementar la respuesta del sistema inmune en cabras.

Cuadro 4. Efecto de la variación de tratamientos en cuanto a la determinación de Nitratos (NO_3^-) en sobrenadantes de cultivo con el estimulante LPS.

Efecto	Num DF	Den DF	F-valor	Pr > F
Tratamiento	3	7	22.71	0.0003*
Período	4	32	46.33	0.0001*
Tratamiento* período	12	32	6.18	0.0001*

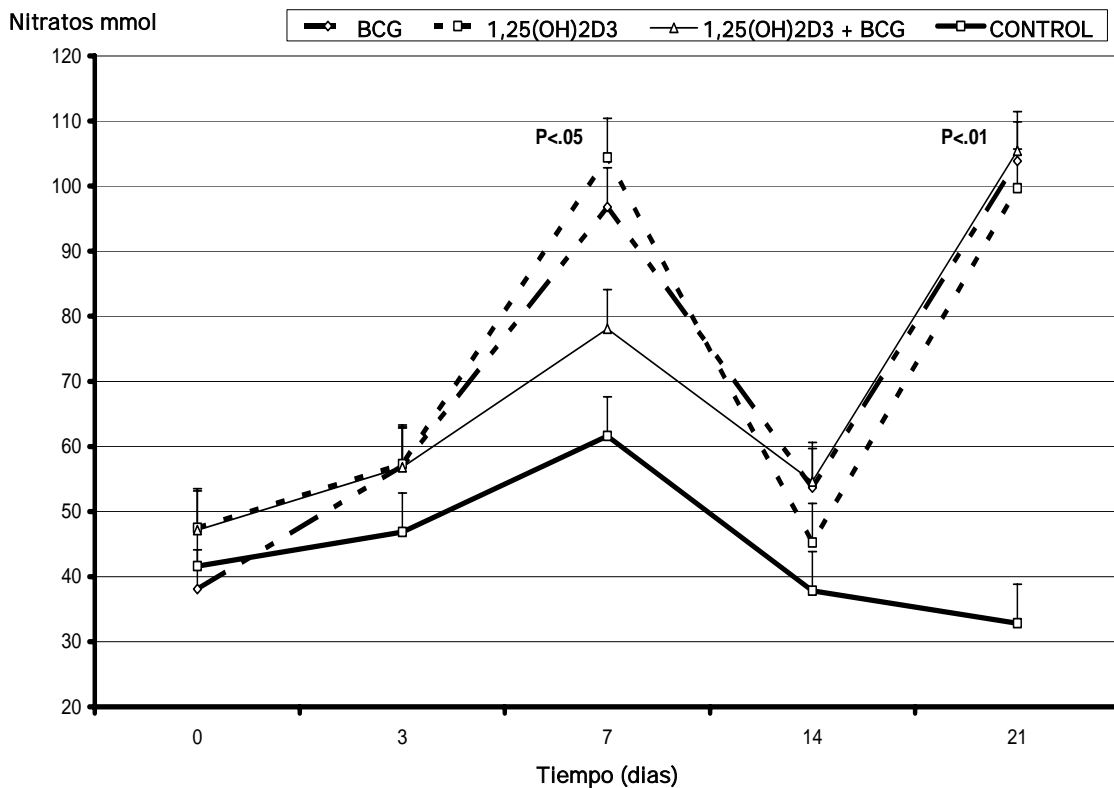


Figura 12. Medias de cuadrados mínimos y errores estándar de la concentración de nitratos en sobrenadantes de cultivo, con el estimulante LPS al aplicar diferentes tratamientos para incrementar la respuesta del sistema inmune en cabras.

El comportamiento observado en la concentración de NO_2^- en los sobrenadantes de cultivo con el estimulante LPS se muestran en el **Cuadro 5** y **Figura 13**, en donde estadísticamente entre los tratamientos no se observó diferencia significativa, el comportamiento de los tratamientos fue similar durante el período de 0 a 14 días, se observó elevada producción de NO_2^- hasta los 21 días de tratamiento, se obtuvo mayor respuesta a lo producción de NO_2^- con el tratamiento combinado con la $1,25(\text{OH})_2 \text{D3}$ y la vacuna BCG, seguida

de la sola 1,25(OH)₂ D3 y del tratamiento con la vacuna BCG sola, el tratamiento “control” se mantuvo constante durante todo el período de 0 a 21 días (ANEXO 7).

Cuadro 5. Efecto de la variación de tratamientos en cuanto a la determinación de Nitritos (NO₂⁻) en sobrenadantes de cultivo con el estimulante LPS.

Efecto	Num DF	Den DF	F-valor	Pr > F
Tratamiento	3	7	0.07	0.9734 NS
Período	4	32	12.45	0.0001*
Tratamiento* período	12	32	1.82	0.0877

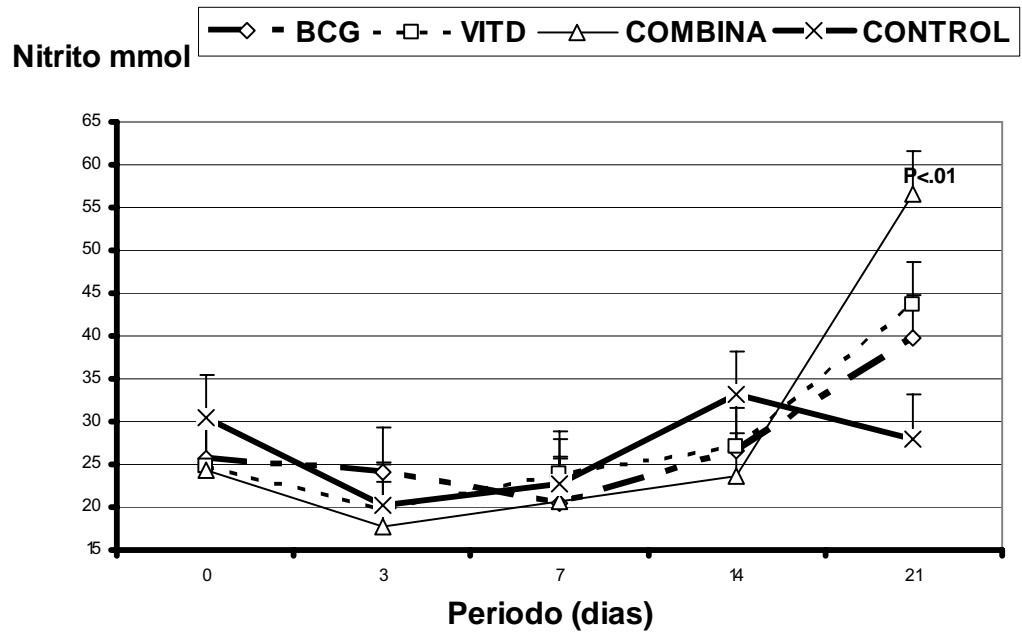


Figura 13. Medias de cuadrados mínimos y errores estándar de la concentración de nitritos en sobrenadantes de cultivo, con el estimulante LPS al aplicar diferentes tratamientos para incrementar la respuesta del sistema inmune en cabras.

CAPÍTULO V

Discusión

La vitamina D es conocida por sus efectos benéficos en procesos infecciosos con fuerte respuesta inmune Th1, quizá por alterar el balance *in vivo* Th1/Th2 (Cantorna, Hayes *et al.* 1996). En esta investigación se evaluó el efecto de la 1,25(OH)₂ D3 sobre mediadores de la respuesta inmune como diagnóstico oportuno de la tuberculosis latente en células mononucleares de sangre periférica de cabras expuestas al BCG de *M. bovis*.

Los monocitos (Provvedini, Tsoukas *et al.* 1983) y las DCs (Brennan, Katz *et al.* 1987) expresan constitutivamente los receptores de la 1,25(OH)₂ D3. En este estudio, encontramos que la 1,25(OH)₂ D3 estimuló la síntesis de NO₃⁻ indicando con esto que por sí sola es un buen activador de la producción de RNI. En adición a esta aseveración, se ha determinado que el metabolito activo de la vitamina D es la 1,25(OH)₂ D3, que es un potente regulador de la respuesta inmune (Wittke, Weaver *et al.* 2004).

Incluso, en un estudio previo se determinó que es posible que los RNI y ROI puedan inhibir la replicación micobacterial (bacteriostáticos) pero no erradicar la bacteria (bactericidas) (Firmani y Riley 2002). Esto concuerda con estudios (Flynn, Chan *et al.* 1993; Flynn y Chan 2001) que demostraron que la reactivación con *M. tuberculosis* ocurre si la producción de RNI es inhibida.

Sin embargo, recientemente se ha observado que el tratamiento con la 1,25(OH)₂ D3 inhibe la migración de células T inducidas por CK (Topilski, Flaishon *et al.* 2004).

El NO es una molécula inestable encontrada en los sistemas biológicos y es rápidamente convertida en NO₂⁻ y NO₃⁻. El NO en los macrófagos actúa como un potente microbicida para destruir a los microorganismos ingeridos. Se obtuvo una constante elevación en lo que respecta a la concentración de NO₃⁻ al transcurso del período del estudio llegando a los 21 días a una concentración de 80.94 μmol/l. Hay evidencias de producción de NO₃⁻ endógeno, especialmente en respuesta a estímulos inflamatorios donde la producción de nitrato *in vitro* podría estar inducida por los macrófagos en presencia de LPS (Stuehr, Wei *et al.* 2005).

Por lo tanto, se deduce que la producción de RNI en macrófagos es esencial para la defensa del hospedero, principalmente para ejercer acciones bactericidas. En adición, se demostró que la estimulación de iNOS en macrófagos y la generación subsecuente de RNI son mecanismos potentes para matar a la micobacteria (Waters, Palmer *et al.* 2003).

En una investigación previa, se realizó la medición de la concentración de NO₂⁻ en medio de cultivo de macrófagos llevado a cabo durante 7 días y fue de 5 a 15 mM, y bajo la estimulación con IFN-γ todas las cepas provocaron mayor acumulación de NO₂⁻, entre 20 y 40 mM; sin embargo, no hubo diferencia significativa entre las cepas individuales (Rhoades y Orme 1997); adicionalmente, en este estudio se sugirió que mientras más virulentas son las

cepas de *M. tuberculosis* son más susceptibles a RNI. En esta investigación, encontramos una concentración de NO_2^- de 11.03 a 28.29 $\mu\text{mol/l}$ durante el transcurso de los muestreos en los diferentes tratamientos, encontrando la mayor concentración en el tratamiento combinado con $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ más la vacuna BCG, en donde también entre tratamientos, no hubo diferencia significativa.

En adición, se ha determinado que las citocinas $\text{IFN-}\gamma$, GM-CSF y $\text{TNF-}\alpha$ activan macrófagos para resistir el crecimiento de patógenos intracelulares durante el mejoramiento en la producción de moléculas efectoras antimicrobiales, incluyendo los RNI y los ROI (Weatherby, Zwilling *et al.* 2003). Además, los macrófagos activados pueden convertir la L-arginina a NO_2^- en presencia de la enzima iNOS, con el desarrollo de una actividad citotóxica contra células tumorales (Hibbs 1991) y frente a infecciones bacteriales (Adams, Franzblau *et al.* 1991). Hay pocos trabajos donde reportan que macrófagos humanos sean capaces de expresar iNOS y presentar actividad enzimática. En este trabajo se determinó que la $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ ofrece una respuesta a incrementos en la concentración de NO_3^- en macrófagos. Aunado a esto, los RNI sirven como agentes protectores que limitan la invasión bacteriana y sobrerregulan las reacciones inflamatorias por inducir apoptosis en células inmunes como macrófagos, neutrófilos o células T; además, no solo se ha encontrado su actividad en procesos infecciosos como con el HIV, *Helicobacter pylori*, *M. tuberculosis*, malaria e infecciones del tracto respiratorio y urinario, también se ha observado en una gran diversidad de enfermedades

autoinmunes y enfermedades inflamatorias crónicas (Kroncke, Fehsel *et al.* 1998).

Adicionalmente, como un producto final en la reacción de iNOS se ha determinado la presencia de nitrotirosina en pulmón y en diversos tejidos, encontrando niveles muy similares (Brown, Jacobs *et al.* 2005).

En la literatura, existen muchos datos de desordenes inmunitarios con predominante reacción pro inflamatoria Th1 que involucra a macrófagos y neutrófilos activados, con una actividad destructiva por parte de NO contribuyendo a daño tisular local. Aunque la estimación de los niveles de NO_2^- / NO_3^- por el método de Griess está sujeta a variación de diversos factores inespecíficos como: dieta, presencia de proteínas séricas, tabaquismo, presencia de lípidos (Tsuchiya, Asada *et al.* 2002).

En una investigación previa, se observaron los rangos de las concentraciones de NO_2^- y NO_3^- en muestras de plasma en individuos sanos y fueron de 1.3-13 $\mu\text{M/l}$ (media de 4.2 $\mu\text{M l/l}$) y 4.0-45.3 $\mu\text{M l}$ (media de 19.7 $\mu\text{M l}$), respectivamente (Moshage, Kok *et al.* 1995), y a pesar de que nuestro experimento fue realizado en caprinos, como un comparativo manifestamos el valor promedio de los niveles de $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ de los animales control fue de 7.9-18.64 μM (media de 12.69 μM) y 17.77 y 64.27 μM (media de 34.62 μM). Este valor coincide con el rango promedio reportado por otros investigadores en la determinación de RNI que fue de $25.1 \pm 3.59 \mu\text{M}$ de $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ en cultivos realizados durante 1, 3 y 7 días de macrófagos derivados de monocitos de sangre periférica en pacientes con lepra (Khare, Bhutani *et al.* 1997).

Los resultados obtenidos en este estudio, entre el período 14 y 21 días en lo que respecta a la determinación de NO_3^- resultó con una diferencia significativa con respecto al control ($P < 0.05$), la concentración de NO_2^- se observó una elevación con el tratamiento con la $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ y más aún con el tratamiento de ésta con la vacuna BCG, estos datos son indicativos de que la $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ estimuló la producción de NO en nuestros cultivos.

En este sentido, Rockett, et al (1998) publicaron que la $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ estimula a las células HL-60 para expresar en el mRNA la NOS2 y por lo tanto generar NO, mientras que el colecalciferol y el ergocalciferol no lo hacen. En este sentido, Waters, Palmer *et al.* (2003) publicaron que los NO_2^- son un producto de oxidación del NO, y la cantidad de NO_2^- producido por las células en el cultivo es indicativo de la cantidad de NO producido.

Resultados similares fueron obtenidos de un estudio realizado para determinar la acumulación de NO_2^- después de cuatro o más días de infección (Rhoades y Orme 1997). En estudios previos realizados se reportó una disminución de los niveles de $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ con el tratamiento, la cual estuvo correlacionada con la reducción de la carga bacilar (Rada, Ulrich *et al.* 1997).

Recientemente, se reportó que la $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ suprime la eosinofilia y la inflamación pulmonar, los niveles elevados de RNI observados fueron asociados con el incremento de NO_3^- , el dato sugiere que la señal a través de VDR es requerida para controlar la respuesta de la Inmunoglobulina E (Topilski, Flaishon *et al.* 2004).

En estudios realizados en sobrenadantes de cultivo de células mononucleares de pacientes con eritema nodoso lepromatoso se observó un incremento

significativo de NO, después de 120 horas de cultivo, en ausencia de antígeno micobacterial, mientras que en los sobrenadantes de cultivo de pacientes multibacilares, paucibacilares y control no se encontraron variaciones, este resultado indica que las células mononucleares en pacientes con eritema nodoso lepromatoso producen NO en ausencia de proliferación celular y se permite inferir la prevalencia en la producción de NO en ausencia de estimulación antigénica (Rada, Marzal *et al.* 2003).

Estos hallazgos concuerdan con los resultados obtenidos en este estudio al observar que en los animales control también se observó producción de NO_2^- / NO_3^- durante el tiempo que duró el estudio.

Adicionalmente, a esta aseveración existen reportes sobre investigaciones realizadas en cultivos de macrófagos en pacientes con la enfermedad de Hansen demostraron que los macrófagos de pacientes lepromatosos y tuberculoides fueron capaces de producir NO en ausencia de estimulación, los primeros produjeron elevados niveles de NO después de 24 horas de cultivo y posteriormente se observó una disminución gradual al aumentar el tiempo de cultivo, en los control se observaron niveles muy bajos en la liberación de NO_2^- (Khare, Bhutani *et al.* 1997).

En otra investigación realizada al respecto, se deduce que el NO inhibe el desarrollo de muchas bacterias y parásitos *in vitro*, debido a la producción de RNI formados por la oxidación del NO (Burgner, Rockett *et al.* 1999).

Estudios previos, reportaron elevados niveles de $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ $1020 \pm 471 \mu\text{M}$ (n=22) en muestras de orina de pacientes etíopes sanos y en pacientes con

lepra se observaron las concentraciones de $1079 \pm 446 \mu\text{M}$, ($n=12$) respectivamente, y éstos presentaron reacciones de reversión tipo I (Schon, Gebre *et al.* 1999).

Se realizó un estudio para investigar las concentraciones fisiológicas de ROI y de RNI dentro de macrófagos humanos *in vitro* en donde fueron de $3.2 \text{ nmol de NO}_2^-/10^5$ células y $287 \text{ nmol de H}_2\text{O}_2/\text{mg de proteína/h}$ generados de macrófagos estimulados con IFN- γ , y en sobrenadantes de cultivo de monocitos de sangre periférica humana infectados con *M. tuberculosis* se encontraron de 34 a $241 \text{ nmol de NO}_2^-/10^6$ células, y de 10 a $80 \text{ nmol de H}_2\text{O}_2/\mu\text{g de DNA de células estimuladas con partículas de poliestireno}$ (Firmani y Riley 2002).

Se ha determinado que, el TGF- β inhibe la iNOS inducida por TNF- α /IFN- γ y en las reacciones tipo I se observaron muy bajos niveles de TGF- β (Khanolkar-Young, Snowdon *et al.* 1998). Su reducción podría ser un factor importante en la producción de una respuesta inflamatoria no regulada y así contribuir a la formación de fibrosis.

También se ha reportado que *Mycobacterium* induce el mRNA para el iNOS, la proteína de la enzima iNOS, NO y el peroxinitrito en cultivos de monocito/macrófago humano (Gretzer y Thomsen 2000).

En lo que respecta a las Gráficas 3 y 4 se obtuvo una producción de NO_3^- en sobrenadantes de cultivo sin y con LPS respectivamente, aunque se observó una diferencia notable en el tratamiento con LPS al día 7 que en comparación con el tratamiento sin LPS al día 7 no hubo incremento de NO_3^- y en los dos

casos al día 21 se observó un incremento significativo en los tratamientos con la vacuna BCG, la 1,25 (OH)₂ D3 solos y el combinado la vacuna BCG + la 1,25 (OH)₂ D3

En nuestros resultados se observó que, los cultivos estimulados con LPS incrementaron la producción de NO en los sobrenadantes de cultivo de células mononucleares en las cabras infectadas con vacuna BCG de *M. bovis*, esta producción se deriva de la elevada concentración de NO₂⁻ obtenida en los sobrenadantes de cultivo.

Lo anterior se deduce por análisis previos realizados por Waters y Palmer (2003), ellos encontraron que la cantidad de NO₂⁻ en los sobrenadantes de cultivo es indicativo de la cantidad de NO producido por las células en el cultivo (Waters, Palmer *et al.* 2003).

Este efecto es apoyado por la aseveración de que en los sobrenadantes de cultivo existe IFN- γ que incrementa la producción de NO₂⁻, con lo que se dedujo que el IFN- γ es un mediador crítico en la producción de NO (Roy, Sharma *et al.* 2004).

Los resultados de la presente investigación apoyan nuestra hipótesis de que la 1,25 (OH)₂ D3 favorece la producción de intermediarios reactivos de nitrógeno en cultivo de células mononucleares de cabras expuestas a la vacuna BCG de *M. bovis*.

Se observó también una buena respuesta en la producción de NO₃⁻ con el estimulante LPS en los sobrenadantes de cultivo, recientes descubrimientos apoyan esta correlación con un proyecto realizado en el que concluyeron que

hay evidencias en la producción de NO_3^- endógeno, especialmente en respuesta a un estímulo inflamatorio en donde la producción de los NO_3^- *in vitro* podía ser inducida por los macrófagos en presencia de LPS (Stuehr, Wei *et al.* 2005).

Sin embargo, en un estudio previo realizado por Stuehr y Marletta (1985) el pico máximo observado en la producción de NO_3^- fue entre 8 y 12 horas después de la inyección intraperitoneal de 15 μg de LPS de *Escherichia coli* en macrófagos obtenidos de ratones sanos de dos cepas diferentes: C3H/He y C3H/HeJ, a las 10 h el nivel de NO_3^- en sangre incrementó de 5 a 6 veces más que el promedio del nivel basal en los ratones de la primera cepa y en los de la segunda cepa el nivel de NO_3^- no incrementó.

Esta diferencia se debió a que las células linforeticulares estuvieron involucradas en la biosíntesis de NO_3^- , y los efectos biológicos del LPS son de origen linforeticular, por lo tanto, las células linforeticulares estuvieron involucradas en la biosíntesis de NO_3^- inducida por el LPS (Stuehr y Marletta 1985), también se llevó a cabo la medición de NO_3^- urinario, encontrando el pico máximo a los 10 días de la exposición al LPS. En esta parte del experimento, se concluyó que los macrófagos son productores de $\text{NO}_2^- / \text{NO}_3^-$ directamente en respuesta al LPS.

Posteriormente, en ese mismo experimento Stuehr y Marletta (1985) estas dos cepas fueron expuestas a la vacuna BCG y se midieron los niveles de NO_3^- urinario antes y después de la exposición al BCG obteniendo el pico máximo a los 15 días del reto, después el nivel de NO_3^- empezó a declinar, al día 19 se

administró el LPS por vía intraperitoneal y hubo una pequeña elevación de la concentración de NO_3^- , observando el mismo comportamiento en las dos cepas de ratones, la base celular de este comportamiento se atribuye a la respuesta inmune frente al primer reto que fue la administración de la BCG, lo cual apoya que los linfocitos T tienen una función importante en la biosíntesis de NO_3^- . La exposición al BCG causa una activación pronunciada de los macrófagos de los animales hospederos (Stuehr y Marletta 1985).

La generación de NO_3^- durante la primoinfección con BCG es producida por macrófagos que han sido activados por linfocinas de células T. En el tiempo transcurrido en la producción de NO_3^- durante la infección por BCG es paralelo a otros cambios inmunológicos, tales como el desarrollo de una resistencia bacteriana inespecífica (Stuehr y Marletta 1985).

Aún no se conoce el blanco de los RNI en las enfermedades por micobacterias y es esencial conocer su función en la destrucción micobacterial (Rhee, Erdjument-Bromage *et al.* 2005).

Con estos estudios, se deduce que la producción de NO está asociada a la naturaleza bioquímica del antígeno, por lo que se plantea realizar este mismo ensayo utilizando ciertos componentes micobacterianos como el glicolípido fenólico. Sería interesante, en otro trabajo incrementar el número de muestra, con estudios más específicos de expresión y actividad de la enzima iNOS, que no existe en los macrófagos en reposo, pero puede inducirse en respuesta al LPS en combinación con $\text{IFN-}\gamma$, ya que la enzima iNOS cataliza la conversión de arginina a citrulina liberando NO.

En la población de estudio, se observaron efectos muy claros del efecto de la 1,25-Dihidroxitamina D3 sobre el perfil de RNI, sobre todo en la determinación de Nitratos. La 1,25-Dihidroxitamina D3 sola y combinada con la vacuna BCG de *M. bovis* estimuló la generación de óxido nítrico. La 1,25-Dihidroxitamina D3 tiene un efecto *in vivo* en la producción de intermediarios reactivos de nitrógeno en cabras expuestas a la vacuna BCG de *M. bovis*.

La 1,25-Dihidroxitamina D3 tiene potentes propiedades inmunoregulatoras. La biosíntesis de $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ esta directamente relacionada con el estado de activación del sistema inmune. El LPS *in vitro* estimuló la producción de NO en los sobrenadantes de cultivo de células mononucleares en las cabras infectadas con vacuna BCG de *M. bovis*. La 1,25(OH)₂ D3 favorece la producción de intermediarios reactivos de nitrógeno en cultivo de células mononucleares de cabras expuestas a la vacuna BCG de *M. bovis*, ayudando a realizar un diagnóstico oportuno durante la infección latente de tuberculosis.

Referencias

- Adams, L. B., S. G. Franzblau, *et al.* (1991). "L-arginine-dependent macrophage effector functions inhibit metabolic activity of *Mycobacterium leprae*." J Immunol **147**(5): 1642-6.
- Aderem, A. y M. Underhill (1999). "Mechanisms of phagocytosis in macrophages." Ann Rev Immunol **17**: 593-623.
- Adorini, L. (2002). "1,25-Dihydroxyvitamin D3 analogs as potential therapies in transplantation." Curr Opin Investig Drugs **3**(10): 1458-63.
- Adorini, L., S. Amuchastegui, *et al.* (2005). "Prevention of chronic allograft rejection by Vitamin D receptor agonists." Immunol Lett **100**(1): 34-41.
- Adorini, L., N. Giarratana, *et al.* (2004). "Pharmacological induction of tolerogenic dendritic cells and regulatory T cells." Semin Immunol **16**(2): 127-34.
- Al Attiyah, R., A. S. Mustafa, *et al.* (2003). "Restoration of mycobacterial antigen-induced proliferation and interferongamma responses in peripheral blood mononuclear cells of tuberculosis patients upon effective chemotherapy." FEMS Immunol. Med. Microbiol **38**: 249-256.
- Aldwell, F. E., M. A. Baird, *et al.* (2005). "Oral vaccination of mice with lipid-encapsulated *Mycobacterium bovis* BCG: anatomical sites of bacterial replication and immune activity." Immunol Cell Biol **83**(5): 549-53.
- Aldwell, F. E., I. G. Tucker, *et al.* (2003). "Oral Delivery of *Mycobacterium bovis* BCG in a Lipid Formulation Induces Resistance to Pulmonary Tuberculosis in Mice." Infect Immun **71**(1): 101-8.
- Allen, L. A. H. y A. Aderem (1996). "Molecular definition of distinct cytoskeletal structures involved in complement and Fc receptor mediated phagocytosis in macrophages." J Exp Med **184**: 627-637.
- Alroy, I., T. L. Towers, *et al.* (1995). "Transcriptional repression of the interleukin-2 gene by vitamin D3: direct inhibition of NFATp/AP-1 complex formation by a nuclear hormone receptor." Mol Cell Biol **15**(10): 5789-99.
- Al-Tawfiq, J. A., A. A. Al-Muraikhy, *et al.* (2005). "Susceptibility Pattern and Epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* in a Saudi Arabian Hospital* A 15-Year Study From 1989 to 2003." CHEST **128**: 3229-3232.
- Alugupalli, S., B. Olson, *et al.* (1993). "Detection of 2-ecosanol by gas chromatography-mass spectrometry in sputa from patients with pulmonary mycobacterial infections." J Clin Microbiol **31**: 1575-8.
- Alvarez-Barrientos, A., J. Arroyo, *et al.* (2000). "Applications of flow cytometry to clinical microbiology." Clin Microbiol Rev **13**(2): 167-95.
- Alvarez-Freites, E. J., J. L. Carter, *et al.* (2002). "In vitro and in vivo activities of gatifloxacin against *Mycobacterium tuberculosis*." Antimicrob Agents Chemother **46**(4): 1022-5.
- Amadori, M., K. P. Lyashchenko, *et al.* (2002). "Use of recombinant proteins in antibody tests for bovine tuberculosis." Vet Microbiol **85**(4): 379-89.
- Ameixa, C. y J. S. Friedland (2002). "Interleukin-8 secretion from *Mycobacterium tuberculosis*-infected monocytes is regulated by protein tyrosine kinases but not

- by ERK1/2 or p38 mitogen-activated protein kinases." Infect Immun **70**(8): 4743-6.
- Aranaz, A., D. Cousins, *et al.* (2003). "Elevation of Mycobacterium tuberculosis subsp. caprae Aranaz et al. 1999 to species rank as Mycobacterium caprae comb. nov., sp. nov." Int J Syst Evol Microbiol **53**(Pt 6): 1785-9.
- Arend, S. M., K. E. Van Meijgaarden, *et al.* (2002). "Tuberculin Skin Testing and In Vitro T Cell Responses to ESAT-6 and Culture Filtrate Protein 10 after Infection with Mycobacterium marinum or M. kansasii." J Infect Dis **186**(12): 1797-807.
- Armstrong, J. A. y P. D. Hart (1975). "Phagosome-lysosome interactions in cultured macrophages infected with virulent tubercle bacilli reversal of the usual nonconfusion pattern and observations on bacterial survival." J Exp Med **142**: 1-16.
- Aubry, A., N. Veziris, *et al.* (2006). "Novel gyrase mutations in quinolone-resistant and -hypersusceptible clinical isolates of Mycobacterium tuberculosis: functional analysis of mutant enzymes." Antimicrob Agents Chemother **50**(1): 104-12.
- Avgustin, B., V. Kotnik, *et al.* (2005). "CD69 Expression on CD4+ T Lymphocytes after In Vitro Stimulation with Tuberculin Is an Indicator of Immune Sensitization against Mycobacterium tuberculosis Antigens." Clin Diagn Lab Immunol **12**(1): 101-6.
- Awomoyi, A. A., A. Marchant, *et al.* (2002). "Interleukin-10, polymorphism in SLC11A1 (formerly NRAMP1), and susceptibility to tuberculosis." J Infect Dis **186**(12): 1808-14.
- Bafica, A., C. A. Scanga, *et al.* (2005). "Host control of Mycobacterium tuberculosis is regulated by 5-lipoxygenase-dependent lipoxin production." J Clin Invest **115**(6): 1601-6.
- Baldwin, C. L., T. Sathiyaseelan, *et al.* (2002). "Activation of bovine peripheral blood gammadelta T cells for cell division and IFN-gamma production." Vet Immunol Immunopathol **87**(3-4): 251-9.
- Ballell, L., R. A. Field, *et al.* (2005). "New small-molecule synthetic antimycobacterials." Antimicrob Agents Chemother **49**(6): 2153-63.
- Banchereau, J., F. Briere, *et al.* (2000). "Immunobiology of dendritic cells." Annu Rev Immunol **18**: 767-811.
- Banchereau, J. y R. M. Steinman (1998). "Dendritic cells and the control of immunity." Nature **392**(6673): 245-52.
- Banerjee, A., E. Dubnau, *et al.* (1994). "inhA, a gene encoding a target for isoniazid and ethionamide in Mycobacterium tuberculosis." Science **263**(5144): 227-30.
- Bardarov, S., S. Bardarov Jr, Jr., *et al.* (2002). "Specialized transduction: an efficient method for generating marked and unmarked targeted gene disruptions in Mycobacterium tuberculosis, M. bovis BCG and M. smegmatis." Microbiology **148**(Pt 10): 3007-17.
- Barnes, P. F. (1997). "Rapid diagnostic tests for tuberculosis, progress but no gold standard." Am J Respir Crit Care Med **155**: 1497-8.
- Barnes, P. F. (2004). "Diagnosing latent tuberculosis infection: turning glitter to gold." Am J Respir Crit Care Med **170**(1): 5-6.
- Barrat, F. J., D. J. Cua, *et al.* (2002). "In vitro generation of interleukin 10-producing regulatory CD4(+) T cells is induced by immunosuppressive drugs and inhibited

- by T helper type 1 (Th1)- and Th2-inducing cytokines." *J Exp Med* **195**(5): 603-16.
- Bastos, R. G., O. A. Dellagostin, *et al.* (2002). "Construction and immunogenicity of recombinant Mycobacterium bovis BCG expressing GP5 and M protein of porcine reproductive respiratory syndrome virus." *Vaccine* **21**(1-2): 21-9.
- Beckman, E. M., S. A. Porcelli, *et al.* (1994). "Recognition of lipid antigen by CD1-restricted ab+T cells." *Nature* **372**: 691-694.
- Behar, S. M., C. C. Dascher, *et al.* (1999). "Susceptibility of mice deficient in CD1D or TAP1 to infection with Mycobacterium tuberculosis." *J Exp Med* **189**(12): 1973-80.
- Bemer, P., F. Palicova, *et al.* (2002). "Multicenter evaluation of fully automated BACTEC Mycobacteria Growth Indicator Tube 960 system for susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis." *J Clin Microbiol* **40**(1): 150-4.
- Benjamin, W. H., K. B. Waities, *et al.* (1998). "Comparison of the MB/BacT system with a revised antibiotic supplement kit to the BACTEC 460 system for detection of mycobacteria in clinical specimens." *J Clin Microbiol* **36**: 3234-8.
- Berer, A., J. Stockl, *et al.* (2000). "1,25-Dihydroxyvitamin D(3) inhibits dendritic cell differentiation and maturation in vitro." *Exp Hematol* **28**(5): 575-83.
- Bernardo, J., A. M. Billingslea, *et al.* (1998). "Differential response of human mononuclear phagocytes to mycobacterial lipoarabinomans: role of CD14 and mannose receptor." *Infect Immun* **66**: 28-35.
- Bettoun, D. J., T. P. Burris, *et al.* (2003). "Retinoid X receptor is a nonsilent major contributor to vitamin D receptor-mediated transcriptional activation." *Mol Endocrinol* **17**(11): 2320-8.
- Beutler, B. (2004). "Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling." *Nature* **430**(6996): 257-63.
- Bhalla, A. K., E. P. Amento, *et al.* (1983). "Specific high-affinity receptors for 1,25-dihydroxyvitamin D3 in human peripheral blood mononuclear cells: presence in monocytes and induction in T lymphocytes following activation." *J Clin Endocrinol Metab* **57**(6): 1308-10.
- Black, G. F., R. E. Weir, *et al.* (2003). "Gamma interferon responses induced by a panel of recombinant and purified mycobacterial antigens in healthy, non-mycobacterium bovis BCG-vaccinated Malawian young adults." *Clin Diagn Lab Immunol* **10**(4): 602-11.
- Bonecini-Almeida, M. G. (2000). "Flow cytometry as a tool to identify Mycobacterium tuberculosis interaction with the immune system and drug susceptibility." *Mem Inst Oswaldo Cruz* **95**(4): 491-4.
- Bonini, P. R., H. Langoni, *et al.* (2001). "Isolation of Mycobacterium spp. in milk from cows suspected or positive to tuberculosis." *Braz. J. vet. Res. anim. Sci.* **38**(6): 284-7.
- Bonovska, M., Y. Tzvetkov, *et al.* (2005). "PCR for detection of Mycobacterium tuberculosis in experimentally infected dogs." *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* **52**(4): 165-70.
- Boon, C. y T. Dick (2002). "Mycobacterium bovis BCG Response Regulator Essential for Hypoxic Dormancy." *J Bacteriol* **184**(24): 6760-7.
- Boon, C., R. Li, *et al.* (2001). "Proteins of Mycobacterium bovis BCG induced in the Wayne dormancy model." *J Bacteriol* **183**(8): 2672-6.

- Boonstra, A., F. J. Barrat, *et al.* (2001). "1alpha,25-Dihydroxyvitamin d3 has a direct effect on naive CD4(+) T cells to enhance the development of Th2 cells." J Immunol **167**(9): 4974-80.
- Borissova, A. M., T. Tankova, *et al.* (2003). "The effect of vitamin D3 on insulin secretion and peripheral insulin sensitivity in type 2 diabetic patients." Int J Clin Pract **57**(4): 258-61.
- Bouchonnet, F., N. Boechat, *et al.* (2002). "Alpha/beta interferon impairs the ability of human macrophages to control growth of Mycobacterium bovis BCG." Infect Immun **70**(6): 3020-5.
- Brandt, L., J. Feino Cunha, *et al.* (2002). "Failure of the Mycobacterium bovis BCG vaccine: some species of environmental mycobacteria block multiplication of BCG and induction of protective immunity to tuberculosis." Infect Immun **70**(2): 672-8.
- Brennan, A., D. R. Katz, *et al.* (1987). "Dendritic cells from human tissues express receptors for the immunoregulatory vitamin D3 metabolite, dihydroxycholecalciferol." Immunology **61**(4): 457-61.
- Brennan, P. J. y H. Nikaido (1995). "The envelope of mycobacteria." Annu Rev Biochem **64**: 29-63.
- Breuss, E., P. Helbling, *et al.* (2002). "Screening and treatment for latent tuberculosis infection among asylum seekers entering Switzerland." Swiss Med Wkly **132**(15-16): 197-200.
- Brill, K. J., Q. Li, *et al.* (2001). "Human natural killer cells mediate killing of intracellular Mycobacterium tuberculosis H37Rv via granule-independent mechanisms." Infect Immun **69**(3): 1755-65.
- Brock, I., M. E. Munk, *et al.* (2001). "Performance of whole blood IFN-gamma test for tuberculosis diagnosis based on PPD or the specific antigens ESAT-6 and CFP-10." Int J Tuberc Lung Dis **5**(5): 462-7.
- Brocker, T., M. Riedinger, *et al.* (1997). "Targeted expression of major histocompatibility complex (MHC) class II molecules demonstrates that dendritic cells can induce negative but not positive selection of thymocytes in vivo." J Exp Med **185**(3): 541-50.
- Brodin, P., L. Majlessi, *et al.* (2006). "Dissection of ESAT-6 system 1 of Mycobacterium tuberculosis and impact on immunogenicity and virulence." Infect Immun **74**(1): 88-98.
- Brown, E. J. (1991). "Complement receptors and phagocytosis." Curr Opin Immunol **3**: 76-82.
- Brown, N., M. Jacobs, *et al.* (2005). "Reduced local growth and spread but preserved pathogenicity of a DeltapurC Mycobacterium tuberculosis auxotrophic mutant in gamma interferon receptor-deficient mice after aerosol infection." Infect Immun **73**(1): 666-70.
- Brudey, K., I. Filliol, *et al.* (2006). "Long-term population-based genotyping study of Mycobacterium tuberculosis complex isolates in the French departments of the Americas." J Clin Microbiol **44**(1): 183-91.
- Buddle, B. M., M. A. Skinner, *et al.* (2002). "New generation vaccines and delivery systems for control of bovine tuberculosis in cattle and wildlife." Vet Immunol Immunopathol **87**(3-4): 177-85.

- Buddle, B. M., D. N. Wedlock, *et al.* (2003). "Revaccination of neonatal calves with *Mycobacterium bovis* BCG reduces the level of protection against bovine tuberculosis induced by a single vaccination." *Infect Immun* **71**(11): 6411-9.
- Burgner, D., K. Rockett, *et al.* (1999). "Nitric oxide and infectious diseases." *Arch Dis Child* **81**(2): 185-8.
- Caccamo, N., A. Barera, *et al.* (2003). "Cytokine profile, HLA restriction and TCR sequence analysis of human CD4+ T clones specific for an immunodominant epitope of *Mycobacterium tuberculosis* 16-kDa protein." *Clin Exp Immunol* **133**(2): 260-6.
- Cadmus, S., S. Palmer, *et al.* (2006). "Molecular analysis of human and bovine tubercle bacilli from a local setting in Nigeria." *J Clin Microbiol* **44**(1): 29-34.
- Cadranel, J., M. Garabedian, *et al.* (1990). "1,25(OH)2D3 production by T lymphocytes and alveolar macrophages recovered by lavage from normocalcaemic patients with tuberculosis." *J Clin Invest* **85**: 1588-93.
- Canning, M. O., K. Grotenhuis, *et al.* (2001). "1-alpha,25-Dihydroxyvitamin D3 (1,25(OH)2D(3)) hampers the maturation of fully active immature dendritic cells from monocytes." *Eur J Endocrinol* **145**(3): 351-7.
- Cantorna, M. T. (2000). "Vitamin D and autoimmunity: is vitamin D status an environmental factor affecting autoimmune disease prevalence?" *Proc Soc Exp Biol Med* **223**(3): 230-3.
- Cantorna, M. T., C. E. Hayes, *et al.* (1996). "1,25-Dihydroxyvitamin D3 reversibly blocks the progression of relapsing encephalomyelitis, a model of multiple sclerosis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(15): 7861-4.
- Cantorna, M. T., J. Humpal-Winter, *et al.* (2000). "In vivo upregulation of interleukin-4 is one mechanism underlying the immunoregulatory effects of 1,25-dihydroxyvitamin D(3)." *Arch Biochem Biophys* **377**(1): 135-8.
- Cantorna, M. T. y B. D. Mahon (2004). "Mounting evidence for vitamin D as an environmental factor affecting autoimmune disease prevalence." *Exp Biol Med (Maywood)* **229**(11): 1136-42.
- Cantorna, M. T., C. Munsick, *et al.* (2000). "1,25-Dihydroxycholecalciferol prevents and ameliorates symptoms of experimental murine inflammatory bowel disease." *J Nutr* **130**(11): 2648-52.
- Cantorna, M. T., W. D. Woodward, *et al.* (1998). "1,25-dihydroxyvitamin D3 is a positive regulator for the two anti-encephalitogenic cytokines TGF-beta 1 and IL-4." *J Immunol* **160**(11): 5314-9.
- Cantorna, M. T., Y. Zhu, *et al.* (2004). "Vitamin D status, 1,25-dihydroxyvitamin D3, and the immune system." *Am J Clin Nutr* **80**(6 Suppl): 1717S-20S.
- Capuano, S. V., 3rd, D. A. Croix, *et al.* (2003). "Experimental *Mycobacterium tuberculosis* infection of cynomolgus macaques closely resembles the various manifestations of human *M. tuberculosis* infection." *Infect Immun* **71**(10): 5831-44.
- Cardona, P. J., I. Amat, *et al.* (2005). "Immunotherapy with fragmented *Mycobacterium tuberculosis* cells increases the effectiveness of chemotherapy against a chronic infection in a murine model of tuberculosis." *Vaccine* **23**(11): 1393-8.
- Carroll, M. C. (1998). "The role of complement and complement receptors in induction and regulation of immunity." *Annu Rev Immunol* **16**: 545-568.

- Caruso, A. M., N. Serbina, *et al.* (1999). "Mice deficient in CD4 T cells have only transiently diminished levels of IFN-gamma, yet succumb to tuberculosis." J Immunol **162**(9): 5407-16.
- Casali, N., A. M. White, *et al.* (2006). "Regulation of the Mycobacterium tuberculosis mce1 Operon." J Bacteriol **188**(2): 441-9.
- Casteels, K., R. Bouillon, *et al.* (1995). "Immunomodulatory effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3." Curr Opin Nephrol Hypertens **4**(4): 313-8.
- Caviedes, L., J. Delgado, *et al.* (2002). "Tetrazolium microplate assay as a rapid and inexpensive colorimetric method for determination of antibiotic susceptibility of Mycobacterium tuberculosis." J Clin Microbiol **40**(5): 1873-4.
- Cella, M., A. Engering, *et al.* (1997). "Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells." Nature **388**(6644): 782-7.
- Cella, M., F. Sallusto, *et al.* (1997). "Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells." Curr Opin Immunol **9**(1): 10-6.
- Chan, E. D., J. Chan, *et al.* (2001). "What is the role of nitric oxide in murine and human host defense against tuberculosis? Current knowledge." Am J Respir Cell Mol Biol **25**(5): 606-12.
- Chan, J., T. Fujiwara, *et al.* (1989). "Microbial glycolipids: possible virulence factors that scavenge oxygen radicals." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(7): 2453-7.
- Chan, J., K. Tanaka, *et al.* (1995). "Effects of nitric oxide synthase inhibitors on murine infection with Mycobacterium tuberculosis." Infect Immun **63**(2): 736-40.
- Chedore, P. y F. B. Jamieson (2002). "Rapid molecular diagnosis of tuberculous meningitis using the Gen-probe Amplified Mycobacterium Tuberculosis direct test in a large Canadian public health laboratory." Int J Tuberc Lung Dis **6**(10): 913-9.
- Chen, J. M., G. J. German, *et al.* (2006). "Roles of Lsr2 in colony morphology and biofilm formation of Mycobacterium smegmatis." J Bacteriol **188**(2): 633-41.
- Chen, L., J. Wang, *et al.* (2004). "Single intranasal mucosal Mycobacterium bovis BCG vaccination confers improved protection compared to subcutaneous vaccination against pulmonary tuberculosis." Infect Immun **72**(1): 238-46.
- Chen, Y. M., W. K. Yang, *et al.* (2001). "An analysis of cytokine status in the serum and effusions of patients with tuberculous and lung cancer." Lung Cancer **31**(1): 25-30.
- Chen, Z. C. (2002). "Tuberculosis annual report 2002." Center for Disease Control, Department of Health, Taipei, Republic of China.
- Chicurel, M., E. Garcia, *et al.* (1988). "Modulation of macrophage lysosomal pH by Mycobacterium tuberculosis-derived proteins." Infect Immun **56**(2): 479-83.
- Cho, H., T. M. Lasco, *et al.* (2005). "Recombinant guinea pig tumor necrosis factor alpha stimulates the expression of interleukin-12 and the inhibition of Mycobacterium tuberculosis growth in macrophages." Infect Immun **73**(3): 1367-76.
- Choi, H. S., P. R. Rai, *et al.* (2002). "Analysis of nitric oxide synthase and nitrotyrosine expression in human pulmonary tuberculosis." Am J Respir Crit Care Med **166**(2): 178-86.
- Choi, I. S., X. H. Lin, *et al.* (2005). "Strain-dependent suppressive effects of BCG vaccination on asthmatic reactions in BALB/c mice." Ann Allergy Asthma Immunol **95**(6): 571-8.

- Chun, T., N. V. Serbina, *et al.* (2001). "Induction of M3-restricted cytotoxic T lymphocyte responses by N-formylated peptides derived from *Mycobacterium tuberculosis*." *J Exp Med* **193**(10): 1213-20.
- Cippitelli, M., C. Fionda, *et al.* (2002). "Negative regulation of CD95 ligand gene expression by vitamin D3 in T lymphocytes." *J Immunol* **168**(3): 1154-66.
- Cippitelli, M. y A. Santoni (1998). "Vitamin D3: a transcriptional modulator of the interferon-gamma gene." *Eur J Immunol* **28**(10): 3017-30.
- Coker, R., M. McKee, *et al.* (2006). "Risk factors for pulmonary tuberculosis in Russia: case-control study." *Bmj* **332**(7533): 85-7.
- Collins, D. M., T. Wilson, *et al.* (2002). "Production of avirulent mutants of *Mycobacterium bovis* with vaccine properties by the use of illegitimate recombination and screening of stationary-phase cultures." *Microbiology* **148**: 3019-3027.
- Colmegna, I., J. W. Koehler, *et al.* (2006). "Musculoskeletal and autoimmune manifestations of HIV, syphilis and tuberculosis." *Curr Opin Rheumatol* **18**(1): 88-95.
- Cooke, M. M., A. J. Gear, *et al.* (2002). "Accidental *Mycobacterium bovis* infection in a veterinarian." *New Zealand Veterinary Journal* **50**: 36-38.
- Cornejo, B. J., A. Sahagun-Ruiz, *et al.* (1998). "Comparison of C18-carboxypropylbetaine and glass bead DNA extraction methods for detection of *Mycobacterium bovis* in bovine milk samples and analysis of samples by PCR." *Appl Environ Microbiol* **64**(8): 3099-101.
- Corner, L. A., B. M. Buddle, *et al.* (2002). "Vaccination of the brushtail possum (*Trichosurus vulpecula*) against *Mycobacterium bovis* infection with bacille Calmette-Guerin: the response to multiple doses." *Vet Microbiol* **84**(4): 327-36.
- Coronato, S. S., C. G. Laguens, *et al.* (2005). "Action of vitamin D3 on the immune system." *Universidad Nacional de la Plata (Argentina)*.
- Cottrez, F., S. D. Hurst, *et al.* (2000). "T regulatory cells 1 inhibit a Th2-specific response in vivo." *J Immunol* **165**(9): 4848-53.
- Crescioli, C., P. Ferruzzi, *et al.* (2004). "Inhibition of prostate cell growth by BXL-628, a calcitriol analogue selected for a phase II clinical trial in patients with benign prostate hyperplasia." *Eur J Endocrinol* **150**(4): 591-603.
- Crescioli, C., A. Morelli, *et al.* (2005). "Human bladder as a novel target for vitamin D receptor ligands." *J Clin Endocrinol Metab* **90**(2): 962-72.
- Cyster, J. G. (1999). "Chemokines and the homing of dendritic cells to the T cell areas of lymphoid organs." *J Exp Med* **189**(3): 447-50.
- Cywes, C., H. C. Godeneir, *et al.* (1996). "Nonopsonic binding of *Mycobacterium tuberculosis* to human complement receptor type 3 expressed in Chinese hamster ovary cells." *Infect Immun* **64**: 5373-5383.
- Cywes, C., R. R. Hoppe, *et al.* (1997). "Nonopsonic binding of *Mycobacterium tuberculosis* to complement receptor type 3 is mediated by capsular polysaccharides and is strain dependent." *Infect Immun* **65**: 4258-4266.
- da Silva, M. A. y M. A. Arruda (2006). "Mechanization of the Bradford reaction for the spectrophotometric determination of total proteins." *Anal Biochem* **351**(1): 155-7.

- D'Amato, R. F., A. A. Wallman, *et al.* (1995). "Rapid diagnosis of pulmonary tuberculosis by using Roche AMPLICOR Mycobacterium tuberculosis PCR test." *J Clin Microbiol* **33**(7): 1832-4.
- D'Ambrosio, D., M. Cippitelli, *et al.* (1998). "Inhibition of IL-12 production by 1,25-dihydroxyvitamin D₃. Involvement of NF-kappaB downregulation in transcriptional repression of the p40 gene." *J Clin Invest* **101**(1): 252-62.
- Davies, P. D. y J. M. Grange (2001). "Factors affecting susceptibility and resistance to tuberculosis." *Thorax* **56 Suppl 2**: ii23-9.
- Daynes, R. A., A. W. Meikle, *et al.* (1991). "Locally active steroid hormones may facilitate compartmentalization of immunity by regulating the types of lymphokines produced by helper T cells." *Res Immunol* **142**: 40-45.
- De Libero, G., I. Flesch, *et al.* (1988). "Mycobacteria-reactive Lyt-2+ T cell lines." *Eur J Immunol* **18**(1): 59-66.
- DeLuca, H. F. (1988). "The vitamin D story: a collaborative effort of basic science and clinical medicine." *Faseb J* **2**(3): 224-36.
- Deluca, H. F. y M. T. Cantorna (2001). "Vitamin D: its role and uses in immunology." *Faseb J* **15**(14): 2579-85.
- Devallois, A., E. Legrand, *et al.* (1996). "Evaluation of Amplicor MTB test as adjunct to smears and culture for direct detection of Mycobacterium tuberculosis in the French Caribbean." *J Clin Microbiol* **34**(5): 1065-8.
- Devitt, A., O. D. Moffatt, *et al.* (1998). "Human CD14 mediates recognition and phagocytosis of apoptotic cells." *Nature* **392**: 505-509.
- Dieli, F., J. Ivanyi, *et al.* (2003). "Characterization of Lung gamma-delta T cells Following Intranasal Infection with Mycobacterium bovis Bacillus Calmette-Guérin." *J of Immunology*.
- Dietrich, G., H. J. Mollenkopf, *et al.* (2002). "Cultivation of Mycobacterium bovis BCG in bioreactors." *J Biotechnol* **96**(3): 259-70.
- Doherty, T. M. y M. Arditi (2004). "TB, or not TB: that is the question -- does TLR signaling hold the answer?" *J Clin Invest* **114**(12): 1699-703.
- Doherty, T. M. y M. Arditi (2005). "Innate immunity, Toll-like receptors and host response to infection." *Pediatr Infect Dis J* **24**(7): 643-4.
- Dos Vultos, T., J. Blazquez, *et al.* (2006). "Identification of Nudix hydrolase family members with an antimutator role in Mycobacterium tuberculosis and Mycobacterium smegmatis." *J Bacteriol* **188**(8): 3159-61.
- Dovedi, S. J., J. A. Kirby, *et al.* (2005). "Cyclooxygenase-2 inhibition: a potential mechanism for increasing the efficacy of bacillus Calmette-Guerin immunotherapy for bladder cancer." *THE JOURNAL OF UROLOGY* **Vol. 174**: 332-337.
- Draper, P. (1998). "The outer parts of the mycobacterial envelope as permeability barriers." *Front Biosci* **3**: D1253-61.
- D'Souza, S., M. Romano, *et al.* (2006). "Partial reconstitution of the CD4+-T-cell compartment in CD4 gene knockout mice restores responses to tuberculosis DNA vaccines." *Infect Immun* **74**(5): 2751-9.
- Dunne, D. W., D. Resnick, *et al.* (1994). "The type 1 macrophage scavenger receptor binds to gram-positive bacteria and recognizes lipoteichoic acid." *Proc Natl Acad Sci* **91**: 1863-1867.

- Ernst, J. D. (1998). "Macrophage receptors for *Mycobacterium tuberculosis*." Infect Immun **66**(4): 1277-81.
- Escott, S. y J. Walley (2005). "Listening to those on the frontline: lessons for community-based tuberculosis programmes from a qualitative study in Swaziland." Soc Sci Med **61**(8): 1701-10.
- Ewer, K., P. Cockle, *et al.* (2006). "Antigen mining with iterative genome screens identifies novel diagnostics for the *Mycobacterium tuberculosis* complex." Clin Vaccine Immunol **13**(1): 90-7.
- Ewer, K., J. Deeks, *et al.* (2003). "Comparison of T-cell-based assay with tuberculin skin test for diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection in a school tuberculosis outbreak." Lancet **361**(9364): 1168-73.
- Feng, C. G., A. G. Bean, *et al.* (1999). "Increase in gamma interferon-secreting CD8(+), as well as CD4(+), T cells in lungs following aerosol infection with *Mycobacterium tuberculosis*." Infect Immun **67**(7): 3242-7.
- Feng, C. G., C. Demangel, *et al.* (2001). "Dendritic cells infected with *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette Guerin activate CD8(+) T cells with specificity for a novel mycobacterial epitope." Int Immunol **13**(4): 451-8.
- Ferguson, J. S., D. R. Voelker, *et al.* (1999). "Surfactant protein D binds to *Mycobacterium tuberculosis* bacilli and lipoarabinomannan via carbohydrate-lectin interactions resulting in reduced phagocytosis of the bacteria by macrophages." J Immunol **163**(1): 312-21.
- Filliol, I., A. S. Motiwala, *et al.* (2006). "Global phylogeny of *Mycobacterium tuberculosis* based on single nucleotide polymorphism (SNP) analysis: insights into tuberculosis evolution, phylogenetic accuracy of other DNA fingerprinting systems, and recommendations for a minimal standard SNP set." J Bacteriol **188**(2): 759-72.
- Finkelman, F. D., A. Lees, *et al.* (1996). "Dendritic cells can present antigen in vivo in a tolerogenic or immunogenic fashion." J Immunol **157**(4): 1406-14.
- Firmani, M. A. y L. W. Riley (2002). "Reactive nitrogen intermediates have a bacteriostatic effect on *Mycobacterium tuberculosis* in vitro." J Clin Microbiol **40**(9): 3162-6.
- Flynn, J. L. y J. Chan (2001). "Immunology of tuberculosis." Annu Rev Immunol **19**: 93-129.
- Flynn, J. L. y J. Chan (2001). "Tuberculosis: latency and reactivation." Infect Immun **69**(7): 4195-201.
- Flynn, J. L., J. Chan, *et al.* (1993). "An essential role for interferon gamma in resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection." J Exp Med **178**(6): 2249-54.
- Flynn, J. L., M. M. Goldstein, *et al.* (1992). "Major Histocompatibility complex class I-restricted T cells are required for resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection." Proc Natl Acad Sci **89**: 12013-17.
- Flynn, J. L., C. A. Scanga, *et al.* (1998). "Effects of aminoguanidine on latent murine tuberculosis." J Immunol **160**(4): 1796-803.
- Fritz, C., S. Maass, *et al.* (2002). "Dependence of *Mycobacterium bovis* BCG on anaerobic nitrate reductase for persistence is tissue specific." Infect Immun **70**(1): 286-91.
- Froicu, M., V. Weaver, *et al.* (2003). "A crucial role for the vitamin D receptor in experimental inflammatory bowel diseases." Mol Endocrinol **17**(12): 2386-92.

- Fuller, C. L., J. L. Flynn, *et al.* (2003). "In situ study of abundant expression of proinflammatory chemokines and cytokines in pulmonary granulomas that develop in cynomolgus macaques experimentally infected with *Mycobacterium tuberculosis*." *Infect Immun* **71**(12): 7023-34.
- Fulton, S. A., S. M. Reba, *et al.* (2002). "Neutrophil-mediated mycobacteriocidal immunity in the lung during *Mycobacterium bovis* BCG infection in C57BL/6 mice." *Infect Immun* **70**(9): 5322-7.
- Gago, G., D. Kurth, *et al.* (2006). "Biochemical and Structural Characterization of an Essential Acyl Coenzyme A Carboxylase from *Mycobacterium tuberculosis*." *J Bacteriol* **188**(2): 477-486.
- Galbiati, F., L. Polastri, *et al.* (2002). "Antitumorigenic and antiinsulinogenic effects of calcitriol on insulinoma cells and solid beta-cell tumors." *Endocrinology* **143**(10): 4018-30.
- Gali, N., J. Dominguez, *et al.* (2006). "Use of a mycobacteriophage-based assay for rapid assessment of susceptibilities of *Mycobacterium tuberculosis* isolates to isoniazid and influence of resistance level on assay performance." *J Clin Microbiol* **44**(1): 201-5.
- Gallily, R., B. Aalseth, *et al.* (1970). "A method for increasing the number of pleural macrophages in mice." *Isr J Med Sci* **6**(1): 166-7.
- Gamboa, F., J. M. Manterola, *et al.* (1998). "Comparative evaluation of two Commercial assays for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory specimens." *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **17**: 151-7.
- Garcia de Viedma, D., M. del Sol Diaz Infantes, *et al.* (2002). "New real-time PCR able to detect in a single tube multiple rifampin resistance mutations and high-level isoniazid resistance mutations in *Mycobacterium tuberculosis*." *J Clin Microbiol* **40**(3): 988-95.
- Garza-Gonzalez, E., M. Guerrero-Olazarán, *et al.* (1998). "Identification of mycobacteria and mycolic acid pattern." *Arch Med Res* **29**: 303-6.
- Gasbarre, L. C., R. D. Romanowski, *et al.* (1985). "Suppression of antigen- and mitogen-induced proliferation of bovine lymphocytes by excretory-secretory products of *Oesophagostomum radiatum*." *Infect Immun* **48**(2): 540-5.
- Gatfield, J. y J. Pieters (2000). "Essential role for cholesterol in entry of mycobacteria into macrophages." *Science* **288**: 1647-1650.
- Gauzzi, M. C., C. Purificato, *et al.* (2005). "Suppressive effect of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 on type I IFN-mediated monocyte differentiation into dendritic cells: impairment of functional activities and chemotaxis." *J Immunol* **174**(1): 270-6.
- Giarratana, N., G. Penna, *et al.* (2004). "A vitamin D analog down-regulates proinflammatory chemokine production by pancreatic islets inhibiting T cell recruitment and type 1 diabetes development." *J Immunol* **173**(4): 2280-7.
- Gibson, N., A. Cave, *et al.* (2005). "Socio-cultural factors influencing prevention and treatment of tuberculosis in immigrant and Aboriginal communities in Canada." *Soc Sci Med* **61**(5): 931-42.
- Ginsburg, A. S., J. H. Grosset, *et al.* (2003). "Fluoroquinolones, tuberculosis, and resistance." *Lancet Infect Dis* **3**(7): 432-42.

- Glatman-Freedman, A., A. J. Mednick, *et al.* (2000). "Clearance and organ distribution of Mycobacterium tuberculosis lipoarabinomannan (LAM) in the presence and absence of LAM-binding immunoglobulin M." *Infect Immun* **68**(1): 335-41.
- Glynn, J. R., J. Whiteley, *et al.* (2002). "Worldwide occurrence of Beijing/W strains of Mycobacterium tuberculosis: a systematic review." *Emerg Infect Dis* **8**(8): 843-9.
- Gold, J. A., Y. Hoshino, *et al.* (2004). "Surfactant protein A modulates the inflammatory response in macrophages during tuberculosis." *Infect Immun* **72**(2): 645-50.
- Gooding, T. M., P. D. R. Johnson, *et al.* (2002). "Cytokine profiles of patients infected with Mycobacterium ulcerans and unaffected household contacts." *Infect Immun* **70**: 5562-5567.
- Gordin, F. M., D. L. Cohn, *et al.* (2004). "Hepatotoxicity of rifampin and pyrazinamide in the treatment of latent tuberculosis infection in HIV-infected persons: is it different than in HIV-uninfected persons?" *Clin Infect Dis* **39**(4): 561-5.
- Graham, S. M., D. J. Bell, *et al.* (2006). "Low levels of pyrazinamide and ethambutol in children with tuberculosis and impact of age, nutritional status, and human immunodeficiency virus infection." *Antimicrob Agents Chemother* **50**(2): 407-13.
- Green, L. M., J. L. Reade, *et al.* (1984). "Rapid colorimetric assay for cell viability: application to the quantitation of cytotoxic and growth inhibitory lymphokines." *J Immunol Methods* **70**(2): 257-68.
- Green, S. J., L. F. Scheller, *et al.* (1994). "Nitric oxide: cytokine-regulation of nitric oxide in host resistance to intracellular pathogens." *Immunol Lett* **43**(1-2): 87-94.
- Gregori, S., M. Casorati, *et al.* (2001). "Regulatory T cells induced by 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 and mycophenolate mofetil treatment mediate transplantation tolerance." *J Immunol* **167**(4): 1945-53.
- Gregori, S., N. Giarratana, *et al.* (2002). "A 1alpha,25-dihydroxyvitamin D(3) analog enhances regulatory T-cells and arrests autoimmune diabetes in NOD mice." *Diabetes* **51**(5): 1367-74.
- Gretzer, C. y P. Thomsen (2000). "Secretion of IL-1 and H2O2 by human mononuclear cells in vitro." *Biomaterials* **21**(10): 1047-55.
- Grewal, I. S. y R. A. Flavell (1998). "CD40 and CD154 in cell-mediated immunity." *Annu Rev Immunol* **16**: 111-35.
- Griffin, M. D., W. H. Lutz, *et al.* (2000). "Potent inhibition of dendritic cell differentiation and maturation by vitamin D analogs." *Biochem Biophys Res Commun* **270**(3): 701-8.
- Grode, L., M. Kursar, *et al.* (2002). "Cell-mediated immunity induced by recombinant Mycobacterium bovis Bacille Calmette-Guerin strains against an intracellular bacterial pathogen: importance of antigen secretion or membrane-targeted antigen display as lipoprotein for vaccine efficacy." *J Immunol* **168**(4): 1869-76.
- Guery, J. C. y L. Adorini (1995). "Dendritic cells are the most efficient in presenting endogenous naturally processed self-epitopes to class II-restricted T cells." *J Immunol* **154**(2): 536-44.
- Harboe, M., S. Nagai, *et al.* (1986). "Properties of proteins MPB64, MPB70, and MPB80 of Mycobacterium bovis BCG." *Infect Immun* **52**(1): 293-302.
- Harboe, M., H. G. Wiker, *et al.* (1998). "MPB70 and MPB83 as indicators of protein localization in mycobacterial cells." *Infect Immun* **66**(1): 289-96.

- Harth, G., D. L. Clemens, *et al.* (1994). "Glutamine synthetase of *Mycobacterium tuberculosis*: extracellular release and characterization of its enzymatic activity." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(20): 9342-6.
- Harth, G. y M. A. Horwitz (1999). "An inhibitor of exported *Mycobacterium tuberculosis* glutamine synthetase selectively blocks the growth of pathogenic mycobacteria in axenic culture and in human monocytes: extracellular proteins as potential novel drug targets." J Exp Med **189**(9): 1425-36.
- Harty, J. T., A. R. Tvinnereim, *et al.* (2000). "CD8+T cell effector mechanisms in resistance to infection." Annu Rev Immunol **18**: 275-308.
- Hasegawa, N., T. Miura, *et al.* (2002). "New simple and rapid test for culture confirmation of *Mycobacterium tuberculosis* complex: a multicenter study." J Clin Microbiol **40**(3): 908-12.
- Hattori, H., M. Okano, *et al.* (2002). "Intranasal application of purified protein derivative suppresses the initiation but not the exacerbation of allergic rhinitis in mice." Clin Exp Allergy **32**(6): 951-9.
- Haydel, S. E. y J. E. Clark-Curtiss (2006). "The *Mycobacterium tuberculosis* TrcR Response Regulator Represses Transcription of the Intracellularly Expressed Rv1057 Gene, Encoding a Seven-Bladed {beta}-Propeller." J Bacteriol **188**(1): 150-9.
- Hernandez-Hernandez, E., J. Alberu, *et al.* (2006). "Screening for Tuberculosis in the Study of the Living Renal Donor in a Developing Country." Transplantation **81**(2): 290-292.
- Herrera-Leon, L., T. Molina, *et al.* (2005). "New multiplex PCR for rapid detection of isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates." Antimicrob Agents Chemother **49**(1): 144-7.
- Hewison, M., L. Freeman, *et al.* (2003). "Differential regulation of vitamin D receptor and its ligand in human monocyte-derived dendritic cells." J Immunol **170**(11): 5382-90.
- Hibbs, J. B., Jr. (1991). "Synthesis of nitric oxide from L-arginine: a recently discovered pathway induced by cytokines with antitumour and antimicrobial activity." Res Immunol **142**(7): 565-9; discussion 596-8.
- Hirsch, C. S., J. Ellner, *et al.* (1994). "Complement receptor-mediated uptake and tumor necrosis factor alpha mediated growth inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* by human alveolar macrophages." J Immunol **52**: 743-753.
- Hoebe, K., E. Janssen, *et al.* (2004). "The interface between innate and adaptive immunity." Nat Immunol **5**(10): 971-4.
- Holick, M. F. (2004). "Vitamin D: importance in the prevention of cancers, type 1 diabetes, heart disease, and osteoporosis." Am J Clin Nutr **79**(3): 362-71.
- Hovav, A. H., J. Mullerad, *et al.* (2003). "The *Mycobacterium tuberculosis* recombinant 27-kilodalton lipoprotein induces a strong Th1-type immune response deleterious to protection." Infect Immun **71**(6): 3146-54.
- Hu, Y., A. R. Coates, *et al.* (2003). "Sterilizing activities of fluoroquinolones against rifampin-tolerant populations of *Mycobacterium tuberculosis*." Antimicrob Agents Chemother **47**(2): 653-7.
- Huard, R. C., S. Chitale, *et al.* (2003). "The *Mycobacterium tuberculosis* complex-restricted gene *cfp32* encodes an expressed protein that is detectable in

- tuberculosis patients and is positively correlated with pulmonary interleukin-10." Infect Immun **71**(12): 6871-83.
- Hubeau, C., M. Singer, *et al.* (2003). "Extended freeze-dried Mycobacterium bovis Bacillus Calmette-Guerin induces the release of interleukin-12 but not tumour necrosis factor-alpha by alveolar macrophages, both in vitro and in vivo." Clin Exp Allergy **33**(3): 386-93.
- Huttunen, K., J. Pelkonen, *et al.* (2004). "Synergistic interaction in simultaneous exposure to Streptomyces californicus and Stachybotrys chartarum." Environ Health Perspect **112**(6): 659-65.
- Hylkema, M. N., W. Timens, *et al.* (2002). "The effect of bacillus Calmette-Guerin immunization depends on the genetic predisposition to Th2-type responsiveness." Am J Respir Cell Mol Biol **27**(2): 244-9.
- Ismaili, J., J. Rennesson, *et al.* (2002). "Monophosphoryl lipid A activates both human dendritic cells and T cells." J Immunol **168**(2): 926-32.
- Iwasaki, A. y R. Medzhitov (2004). "Toll-like receptor control of the adaptive immune responses." Nat Immunol **5**(10): 987-95.
- Janeway, C. A. (1996). The immune system in health and disease. Immunobiology. **2**: 8-9.
- Jeevan, A., C. T. McFarland, *et al.* (2006). "Production and characterization of guinea pig recombinant gamma interferon and its effect on macrophage activation." Infect Immun **74**(1): 213-24.
- Jou, R., C. Y. Chiang, *et al.* (2005). "Distribution of the Beijing Family Genotypes of Mycobacterium tuberculosis in Taiwan." J Clin Microbiol **43**(1): 95-100.
- Julian, E., L. Matas, *et al.* (2004). "Comparison of antibody responses to a potential combination of specific glycolipids and proteins for test sensitivity improvement in tuberculosis serodiagnosis." Clin Diagn Lab Immunol **11**(1): 70-6.
- Jung, Y. J., L. Ryan, *et al.* (2003). "Increased interleukin-10 expression is not responsible for failure of T helper 1 immunity to resolve airborne Mycobacterium tuberculosis infection in mice." Immunology **109**(2): 295-9.
- Junqueira-Kipnis, A. P., J. Turner, *et al.* (2004). "Stable T-cell population expressing an effector cell surface phenotype in the lungs of mice chronically infected with Mycobacterium tuberculosis." Infect Immun **72**(1): 570-5.
- Kanaujia, G. V., S. Motzel, *et al.* (2004). "Recognition of ESAT-6 sequences by antibodies in sera of tuberculous nonhuman primates." Clin Diagn Lab Immunol **11**(1): 222-6.
- Kariko, K., P. Bhuyan, *et al.* (2004). "Exogenous siRNA mediates sequence-independent gene suppression by signaling through toll-like receptor 3." Cells Tissues Organs **177**(3): 132-8.
- Kennedy, H. E., M. D. Welsh, *et al.* (2002). "Modulation of immune responses to Mycobacterium bovis in cattle depleted of WC1(+) gamma delta T cells." Infect Immun **70**(3): 1488-500.
- Khanolkar-Young, S., D. Snowdon, *et al.* (1998). "Immunocytochemical localization of inducible nitric oxide synthase and transforming growth factor-beta (TGF-beta) in leprosy lesions." Clin Exp Immunol **113**(3): 438-42.
- Khare, S., L. K. Bhutani, *et al.* (1997). "Release of reactive nitrogen intermediates from the peripheral blood-derived monocytes/macrophages of leprosy patients stimulated in vitro by tuftsin." Lepr Rev **68**(1): 16-24.

- Kitada, S., R. Maekura, *et al.* (2005). "Use of Glycopeptidolipid Core Antigen for Serodiagnosis of Mycobacterium avium Complex Pulmonary Disease in Immunocompetent Patients." Clin Diagn Lab Immunol **12**(1): 44-51.
- Kitajima, K., Y. Kaji, *et al.* (2006). "Magnetic resonance imaging findings of tuberculous endometritis: a report of 2 cases." J Comput Assist Tomogr **30**(1): 62-4.
- Koeffler, H. P., H. Reichel, *et al.* (1985). "gamma-Interferon stimulates production of 1,25-dihydroxyvitamin D3 by normal human macrophages." Biochem Biophys Res Commun **127**(2): 596-603.
- Koizumi, T., Y. Nakao, *et al.* (1985). "Effects of corticosteroid and 1,24R-dihydroxyvitamin D3 administration on lymphoproliferation and autoimmune disease in MRL/MP-lpr/lpr mice." Int Arch Allergy Appl Immunol **77**(4): 396-404.
- Korkor, A. B. (1987). "Reduced binding of [3H]1,25-dihydroxyvitamin D3 in the parathyroid glands of patients with renal failure." N Engl J Med **316**(25): 1573-7.
- Krieger, M. y J. Hertz (1994). "Structures and functions of multiligand lipoprotein receptors: macrophage scavenger receptor and LDL receptor-related protein (LRP)." Annu Rev Biochem **63**: 601-637.
- Kroncke, K. D., K. Fehsel, *et al.* (1998). "Inducible nitric oxide synthase in human diseases." Clin Exp Immunol **113**(2): 147-56.
- Laal, S., K. M. Samanich, *et al.* (1997). "Human humoral responses to antigens of Mycobacterium tuberculosis: immunodominance of high-molecular-mass antigens." Clin Diagn Lab Immunol **4**(1): 49-56.
- LaBombardi, V. J. (2002). "Comparison of the ESP and BACTEC systems for testing susceptibilities of Mycobacterium tuberculosis complex isolates to pyrazinamide." J Clin Microbiol **40**(6): 2238-9.
- Lagranderie, M., M. A. Nahori, *et al.* (2003). "Dendritic cells recruited to the lung shortly after intranasal delivery of Mycobacterium bovis BCG drive the primary immune response towards a type 1 cytokine production." Immunology **108**(3): 352-64.
- Lalvani, A. (2004). "Counting antigen-specific T cells: a new approach for monitoring response to tuberculosis treatment?" Clin Infect Dis **38**(5): 757-9.
- Lalvani, A., A. A. Pathan, *et al.* (2001). "Enhanced contact tracing and spatial tracking of Mycobacterium tuberculosis infection by enumeration of antigen specific T-cells." Lancet **357**: 2017-21.
- Larsson, P., L. Mattsson, *et al.* (1998). "A vitamin D analogue (MC 1288) has immunomodulatory properties and suppresses collagen-induced arthritis (CIA) without causing hypercalcaemia." Clin Exp Immunol **114**(2): 277-83.
- Launay-Vacher, V., H. Izzedine, *et al.* (2005). "Pharmacokinetic considerations in the treatment of tuberculosis in patients with renal failure." Clin Pharmacokinet **44**(3): 221-35.
- Lazarevic, V., A. J. Myers, *et al.* (2003). "CD40, but not CD40L, is required for the optimal priming of T cells and control of aerosol M. tuberculosis infection." Immunity **19**(6): 823-35.
- Lebwohl, M., A. Menter, *et al.* (2004). "Combination therapy to treat moderate to severe psoriasis." J Am Acad Dermatol **50**(3): 416-30.
- Lemire, J. M. (1992). "Immunomodulatory role of 1,25-dihydroxyvitamin D3." J Cell Biochem **49**(1): 26-31.

- Lemire, J. M. (1994). "Immunomodulatory actions of 1,25-dihydroxyvitamin D3." J Steroid Biochem Mol Biol **53**: 599-602.
- Lemire, J. M. y J. S. Adams (1992). "1,25-Dihydroxyvitamin D3 inhibits the passive transfer of cellular immunity by a myelin basic protein-specific T cell clone." J Bone Miner Res **7**(2): 171-7.
- Lemire, J. M. y D. C. Archer (1991). "1,25-dihydroxyvitamin D3 prevents the in vivo induction of murine experimental autoimmune encephalomyelitis." J Clin Invest **87**(3): 1103-7.
- Lemire, J. M., D. C. Archer, *et al.* (1995). "Immunosuppressive actions of 1,25-dihydroxyvitamin D3: preferential inhibition of Th1 functions." J Nutr **125**(6 Suppl): 1704S-1708S.
- Lenschow, D. J., T. L. Walunas, *et al.* (1996). "CD28/B7 system of T cell costimulation." Annu Rev Immunol **14**: 233-58.
- Lewinsohn, D. A., M. L. Gennaro, *et al.* (2004). "Tuberculosis immunology in children: diagnostic and therapeutic challenges and opportunities." Int J Tuberc Lung Dis **8**(5): 658-74.
- Li, R., X. Yang, *et al.* (2006). "Respiratory syncytial virus infection reversed anti-asthma effect of neonatal Bacillus Calmette-Guerin vaccination in BALB/c mice." Pediatr Res **59**(2): 210-5.
- Lichtenauer-Kaligis, E. G., T. de Boer, *et al.* (2003). "Severe Mycobacterium bovis BCG infections in a large series of novel IL-12 receptor beta1 deficient patients and evidence for the existence of partial IL-12 receptor beta1 deficiency." Eur J Immunol **33**(1): 59-69.
- Liebana, E., R. M. Girvin, *et al.* (1999). "Generation of CD8(+) T-cell responses to Mycobacterium bovis and mycobacterial antigen in experimental bovine tuberculosis." Infect Immun **67**(3): 1034-44.
- Lin, R. y J. H. White (2004). "The pleiotropic actions of vitamin D." Bioessays **26**(1): 21-8.
- Linehan, S. H., L. Martínez-Pomares, *et al.* (2000). "Macrophage lectins in host defense." Microb Infect **2**: 279-288.
- Lodes, M. J., D. C. Dillon, *et al.* (2001). "Serological expression cloning and immunological evaluation of MTB48, a novel Mycobacterium tuberculosis antigen." J Clin Microbiol **39**(7): 2485-93.
- Lodha, R. y S. K. Kabra (2004). "Newer diagnostic modalities for tuberculosis." Indian J Pediatr **71**(3): 221-7.
- Long, R., R. Jones, *et al.* (2005). "Inhaled nitric oxide treatment of patients with pulmonary tuberculosis evidenced by positive sputum smears." Antimicrob Agents Chemother **49**(3): 1209-12.
- Lucas, J. N., D. V. Cousins, *et al.* (2003). "Identification of Mycobacterium avium subsp avium in an alpaca with lesions resembling paratuberculosis." Aust Vet J **81**(9): 567-9.
- Lumb, R., K. Davies, *et al.* (1999). "Multicenter evaluation of the Abbott LCx Mycobacterium tuberculosis ligase chain reaction assay." J Clin Microbiol **37**(10): 3102-7.
- Lyakh, L. A., M. Sanford, *et al.* (2005). "TGF-beta and vitamin D3 utilize distinct pathways to suppress IL-12 production and modulate rapid differentiation of human monocytes into CD83+ dendritic cells." J Immunol **174**(4): 2061-70.

- MacMicking, J., Q. W. Xie, *et al.* (1997). "Nitric oxide and macrophage function." Annu Rev Immunol **15**: 323-50.
- MacMicking, J. D., R. J. North, *et al.* (1997). "Identification of nitric oxide synthase as a protective locus against tuberculosis." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(10): 5243-8.
- Mahon, B. D., A. Wittke, *et al.* (2003). "The targets of vitamin D depend on the differentiation and activation status of CD4 positive T cells." J Cell Biochem **89**(5): 922-32.
- Makinen, J., H. J. Marttila, *et al.* (2006). "Comparison of two commercially available DNA line probe assays for detection of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*." J Clin Microbiol **44**(2): 350-2.
- Mannering, S. I. y C. Cheers (2002). "Interleukin-2 and loss of immunity in experimental *Mycobacterium avium* infection." Infect Immun **70**(1): 27-35.
- Manolagas, S. C., D. M. Provvedini, *et al.* (1985). "Interactions of 1,25-dihydroxyvitamin D3 and the immune system." Mol Cell Endocrinol **43**(2-3): 113-22.
- Marodi, L. (2006). "Neonatal innate immunity to infectious agents." Infect Immun **74**(4): 1999-2006.
- Mathieu, C. y L. Adorini (2002). "The coming of age of 1,25-dihydroxyvitamin D(3) analogs as immunomodulatory agents." Trends Mol Med **8**(4): 174-9.
- Mathieu, C., J. Laureys, *et al.* (1992). "1,25-Dihydroxyvitamin D3 prevents insulinitis in NOD mice." Diabetes **41**(11): 1491-5.
- Mazurek, G. H. y M. E. Villarino (2003). "Guidelines for using the QuantiFERON-TB test for diagnosing latent *Mycobacterium tuberculosis* infection. Centers for Disease Control and Prevention." MMWR Recomm Rep **52**(RR-2): 15-8.
- McKinney, J. D., K. Honer zu Bentrup, *et al.* (2000). "Persistence of *Mycobacterium tuberculosis* in macrophages and mice requires the glyoxylate shunt enzyme isocitrate lyase." Nature **406**(6797): 735-8.
- McNabb, A., K. Adie, *et al.* (2006). "Direct identification of mycobacteria in primary liquid detection media by partial sequencing of the 65-kilodalton heat shock protein gene." J Clin Microbiol **44**(1): 60-6.
- Medinger, A. (2002). "Death associated with rifampin and pyrazinamide 2-month treatment of latent mycobacterium tuberculosis." Chest **121**(5): 1710-2.
- Medzhitov, R. y C. Janeway, Jr. (2000). "Innate immunity." N Engl J Med **343**(5): 338-44.
- Mellman, I., R. Fuchs, *et al.* (1986). "Acidification of the endocytic and exocytic pathways." Annu Rev Biochem **55**: 663-700.
- Miller, J. M., A. L. Jenny, *et al.* (2002). "Polymerase chain reaction detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex and *Mycobacterium avium* organisms in formalin-fixed tissues from culture-negative ruminants." Vet Microbiol **87**(1): 15-23.
- Mistry, N. F., A. M. Iyer, *et al.* (2002). "Spoligotyping of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from multiple-drug-resistant tuberculosis patients from Bombay, India." J Clin Microbiol **40**(7): 2677-80.
- Miyazaki, E., R. E. Chaisson, *et al.* (1999). "Analysis of rifapentine for preventive therapy in the Cornell mouse model of latent tuberculosis." Antimicrob Agents Chemother **43**(9): 2126-30.

- Mogues, T., M. E. Goodrich, *et al.* (2001). "The relative importance of T cell subsets in immunity and immunopathology of airborne Mycobacterium tuberculosis infection in mice." *J Exp Med* **193**(3): 271-80.
- Mohan, V. P., C. A. Scanga, *et al.* (2001). "Effects of tumor necrosis factor alpha on host immune response in chronic persistent tuberculosis: possible role for limiting pathology." *Infect Immun* **69**(3): 1847-55.
- Mokrousov, I., O. Narvskaya, *et al.* (2002). "Detection of ethambutol-resistant Mycobacterium tuberculosis strains by multiplex allele-specific PCR assay targeting embB306 mutations." *J Clin Microbiol* **40**(5): 1617-20.
- Mokrousov, I., T. Otten, *et al.* (2002). "Detection of isoniazid-resistant Mycobacterium tuberculosis strains by a multiplex allele-specific PCR assay targeting katG codon 315 variation." *J Clin Microbiol* **40**(7): 2509-12.
- Monahan, I., J. Betts, *et al.* (2001). "Differential expression of mycobacterial proteins following phagocytosis by macrophages." *Microbiol* **147**: 459-471.
- Moncada, S., R. M. Palmer, *et al.* (1991). "Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology." *Pharmacol Rev* **43**(2): 109-42.
- Moore, A. V., S. M. Kirk, *et al.* (1999). "Safe determination of susceptibility of Mycobacterium tuberculosis to antimycobacterial agents by flow cytometry." *J Clin Microbiol* **37**(3): 479-83.
- Moreira, A. L., L. Tsenova, *et al.* (2002). "Mycobacterial antigens exacerbate disease manifestations in Mycobacterium tuberculosis-infected mice." *Infect Immun* **70**(4): 2100-7.
- Morris, A., H. Masur, *et al.* (2006). "Current issues in critical care of the human immunodeficiency virus-infected patient." *Crit Care Med* **34**(1): 42-9.
- Moshage, H., B. Kok, *et al.* (1995). "Nitrite and nitrate determinations in plasma: a critical evaluation." *Clin Chem* **41**(6 Pt 1): 892-6.
- Mosmann, T. (1983). "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays." *J Immunol Methods* **65**(1-2): 55-63.
- Mukherjee, S., N. Daifalla, *et al.* (2004). "Potential serological use of a recombinant protein that is a replica of a Mycobacterium tuberculosis protein found in the urine of infected mice." *Clin Diagn Lab Immunol* **11**(2): 280-6.
- Muller, I., S. P. Cobbold, *et al.* (1987). "Impaired resistance to Mycobacterium tuberculosis infection after selective in vivo depletion of L3T4+ and Lyt-2+ T cells." *Infect Immun* **55**(9): 2037-41.
- Muranishi, H., M. Nakashima, *et al.* (1990). "Measurement of tuberculostearic acid in sputa, pleural effusions and bronchial washing. A clinical evaluation for diagnosis of pulmonary tuberculosis." *Diagn Microbiol Infect Dis* **13**: 235-40.
- Naarding, M. A., I. S. Ludwig, *et al.* (2005). "Lewis X component in human milk binds DC-SIGN and inhibits HIV-1 transfer to CD4+ T lymphocytes." *J Clin Invest* **115**(11): 3256-64.
- Nadler, R., Y. Luo, *et al.* (2003). "Interleukin 10 induced augmentation of delayed-type hypersensitivity (DTH) enhances Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin (BCG) mediated antitumour activity." *Clin Exp Immunol* **131**(2): 206-16.
- Nakamura, R. M., L. Einck, *et al.* (2000). "Detection of active tuberculosis by an MPB64 transdermal patch: a field study." *Scan J Infect Dis* **33**: 405-7.

- Navoa, J. A., S. Laal, *et al.* (2003). "Specificity and diversity of antibodies to Mycobacterium tuberculosis arabinomannan." Clin Diagn Lab Immunol **10**(1): 88-94.
- Nepomuceno, R. R., H. A. Henschen-Edman, *et al.* (1997). "cDNA cloning and primary structure analysis of C1qR(P), the human C1q/MBL/SPA receptor that mediates enhanced phagocytosis in vitro." Immunity **6**: 119-129.
- Nicholson, S., G. Bonecini-Almeida Mda, *et al.* (1996). "Inducible nitric oxide synthase in pulmonary alveolar macrophages from patients with tuberculosis." J Exp Med **183**(5): 2293-302.
- Nigou, J., C. Zelle-Rieser, *et al.* (2001). "Mannosylated lipoarabinomannans inhibit IL-12 production by human dendritic cells: evidence for a negative signal delivered through the mannose receptor." J Immunol **166**: 7477-7485.
- Nonnecke, B. J., W. R. Waters, *et al.* (2003). "In vitro effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha secretion by blood leukocytes from young and adult cattle vaccinated with Mycobacterium bovis BCG." Int J Vitam Nutr Res **73**(4): 235-44.
- Norden, M. A., T. A. Kurzynski, *et al.* (1995). "Rapid susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis (H37Ra) by flow cytometry." J Clin Microbiol **33**(5): 1231-7.
- Nozaki, Y., Y. Hasegawa, *et al.* (1997). "Nitric oxide as an inflammatory mediator of radiation pneumonitis in rats." Am J Physiol **272**(4 Pt 1): L651-8.
- Okamoto, M., Y. Hasegawa, *et al.* (2005). "T-helper type 1/T-helper type 2 balance in malignant pleural effusions compared to tuberculous pleural effusions." Chest **128**(6): 4030-5.
- Okamoto, M., T. Kawabe, *et al.* (2005). "Evaluation of interferon-gamma, interferon-gamma-inducing cytokines, and interferon-gamma-inducible chemokines in tuberculous pleural effusions." J Lab Clin Med **145**(2): 88-93.
- Olleros, M. L., R. Guler, *et al.* (2002). "Transmembrane TNF induces an efficient cell-mediated immunity and resistance to Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin infection in the absence of secreted TNF and lymphotoxin-alpha." J Immunol **168**(7): 3394-401.
- O'Riordan, M., C. H. Yi, *et al.* (2002). "Innate recognition of bacteria by a macrophage cytosolic surveillance pathway." Proc Natl Acad Sci U S A **99**: 13861-13866.
- Ozdemir, C., T. Akkoc, *et al.* (2003). "Impact of Mycobacterium vaccae immunization on lung histopathology in a murine model of chronic asthma." Clin Exp Allergy **33**(2): 266-70.
- Palmer, M. V., W. R. Waters, *et al.* (2006). "Effects of different tuberculin skin-testing regimens on gamma interferon and antibody responses in cattle experimentally infected with Mycobacterium bovis." Clin Vaccine Immunol **13**(3): 387-94.
- Pani, M. A., K. Regulla, *et al.* (2002). "Vitamin D 1alpha-hydroxylase (CYP1alpha) polymorphism in Graves' disease, Hashimoto's thyroiditis and type 1 diabetes mellitus." Eur J Endocrinol **146**(6): 777-81.
- Parsons, L. M., R. Brosch, *et al.* (2002). "Rapid and simple approach for identification of Mycobacterium tuberculosis complex isolates by PCR-based genomic deletion analysis." J Clin Microbiol **40**(7): 2339-45.

- Penna, G. y L. Adorini (2000). "1 Alpha,25-dihydroxyvitamin D3 inhibits differentiation, maturation, activation, and survival of dendritic cells leading to impaired alloreactive T cell activation." *J Immunol* **164**(5): 2405-11.
- Perkins, M. D., M. B. Conde, *et al.* (2003). "Serologic diagnosis of tuberculosis using a simple commercial multiantigen assay." *Chest* **123**: 107-112.
- Peteroy-Kelly, M. A., V. Venketaraman, *et al.* (2003). "Modulation of J774.1 Macrophage L-Arginine Metabolism by Intracellular Mycobacterium bovis BCG." *Infect Immun* **71**(2): 1011-5.
- Pfyffer, G. E. (1999). "Nucleico acid amplification for mycobacterial diagnosis." *J Infect* **39**: 21-6.
- Pfyffer, G. E., C. Cieslack, *et al.* (1997). "Rapid detection of mycobacteria in clinical specimens by using the automated BACTEC 9000 MB System and comparison with radiometric and solid culture systems." *J Clin Microbiol* **35**: 2229-34.
- Pfyffer, G. E., F. Palicova, *et al.* (2002). "Testing of susceptibility of Mycobacterium tuberculosis to pyrazinamide with the nonradiometric BACTEC MGIT 960 system." *J Clin Microbiol* **40**(5): 1670-4.
- Pfyffer, G. E., H. M. Welscher, *et al.* (1997). "Comparison of the Mycobacteria growth indicator tube (MGIT) with radiometric and solid culture for recovery of acid-fast bacilli." *J Clin Microbiol* **35**: 364-8.
- Piemonti, L., P. Monti, *et al.* (2000). "Vitamin D3 affects differentiation, maturation, and function of human monocyte-derived dendritic cells." *J Immunol* **164**(9): 4443-51.
- Porsa, E., L. Cheng, *et al.* (2006). "Comparison of a new ESAT-6/CFP-10 peptide-based gamma interferon assay and a tuberculin skin test for tuberculosis screening in a moderate-risk population." *Clin Vaccine Immunol* **13**(1): 53-8.
- Prigozy, T. I., P. A. Sieling, *et al.* (1997). "The mannose receptor delivers lipoglycan antigens to endocites for presentation to T cells by CD1b molecules." *Immunity* **6**: 187-197.
- Provvedini, D. M., C. D. Tsoukas, *et al.* (1983). "1,25-dihydroxyvitamin D3 receptors in human leukocytes." *Science* **221**(4616): 1181-3.
- Puthanakit, T., P. Oberdorfer, *et al.* (2006). "Immune reconstitution syndrome after highly active antiretroviral therapy in human immunodeficiency virus-infected thai children." *Pediatr Infect Dis J* **25**(1): 53-8.
- Pym, A. S., P. Brodin, *et al.* (2002). "Loss of RD1 contributed to the attenuation of the live tuberculosis vaccines Mycobacterium bovis BCG and Mycobacterium microti." *Mol Microbiol* **46**(3): 709-17.
- Qian, L., C. Abe, *et al.* (2002). "rpoB genotypes of Mycobacterium tuberculosis Beijing family isolates from East Asian countries." *J Clin Microbiol* **40**(3): 1091-4.
- Rada, E., M. Marzal, *et al.* (2003). "[Increase in nitric oxide concentrations in serum and mononuclear cell cultures from patients with Type II reaction state of Hansen's disease]." *Invest Clin* **44**(2): 129-36.
- Rada, E., M. Ulrich, *et al.* (1997). "A follow-up study of multibacillary Hansen's disease patients treated with multidrug therapy (MDT) or MDT + immunotherapy (IMT)." *Int J Lepr Other Mycobact Dis* **65**(3): 320-7.
- Raja, A., K. R. Uma Devi, *et al.* (2002). "Immunoglobulin G, A, and M responses in serum and circulating immune complexes elicited by the 16-kilodalton antigen of Mycobacterium tuberculosis." *Clin Diagn Lab Immunol* **9**(2): 308-12.

- Rao, K. R., N. Ahmed, *et al.* (2006). "Rapid Identification of Mycobacterium tuberculosis Beijing Genotypes on the Basis of the Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit Locus 26 Signature." *J Clin Microbiol* **44**(1): 274-7.
- Ravetch, J. V. (1997). "Fc receptors." *Curr Opin Immunol* **9**: 121-125.
- Ravetch, J. V. y S. Bollard (2001). "IgG Fc receptors." *Annu Rev Immunol* **19**: 275-290.
- Ravetch, J. V. y R. A. Clynes (1998). "Divergent roles for Fc receptors and complement in vivo." *Annu Rev Immunol* **16**: 421-432.
- Rhee, K. Y., H. Erdjument-Bromage, *et al.* (2005). "S-nitroso proteome of Mycobacterium tuberculosis: Enzymes of intermediary metabolism and antioxidant defense." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(2): 467-72.
- Rhoades, E., F. Hsu, *et al.* (2003). "Identification and macrophage-activating activity of glycolipids released from intracellular Mycobacterium bovis BCG." *Mol Microbiol* **48**(4): 875-88.
- Rhoades, E. R. y I. M. Orme (1997). "Susceptibility of a panel of virulent strains of Mycobacterium tuberculosis to reactive nitrogen intermediates." *Infect Immun* **65**(4): 1189-95.
- Rhodes, S. G., L. A. Terry, *et al.* (2003). "1,25-dihydroxyvitamin D3 and development of tuberculosis in cattle." *Clin Diagn Lab Immunol* **10**(6): 1129-35.
- Riendeau, C. J. y H. Kornfeld (2003). "THP-1 cell apoptosis in response to Mycobacterial infection." *Infect Immun* **71**(1): 254-9.
- Rigby, W. F., M. Waugh, *et al.* (1990). "Regulation of human monocyte HLA-DR and CD4 antigen expression, and antigen presentation by 1,25-dihydroxyvitamin D3." *Blood* **76**(1): 189-97.
- Rigby, W. F., B. Yirinec, *et al.* (1987). "Comparison of the effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on T lymphocyte subpopulations." *Eur J Immunol* **17**: 563-66.
- Roach, T. I., D. Chatterjee, *et al.* (1994). "Induction of early-response genes KC and JE by mycobacterial lipoarabinomannans: regulation of KC expression in murine macrophages by Lsh/Ity/Bcg (candidate Nramp)." *Infect Immun* **62**(4): 1176-84.
- Rockett, K. A., R. Brookes, *et al.* (1998). "1,25-Dihydroxyvitamin D3 induces nitric oxide synthase and suppresses growth of Mycobacterium tuberculosis in a human macrophage-like cell line." *Infect Immun* **66**(11): 5314-21.
- Rook, G. A. (1988). "The role of vitamin D in tuberculosis." *Am Rev Respir Dis* **138**(4): 768-70.
- Rook, G. A., K. Dheda, *et al.* (2005). "Immune responses to tuberculosis in developing countries: implications for new vaccines." *Nat Rev Immunol* **5**(8): 661-7.
- Rook, G. A., G. Seah, *et al.* (2001). "M. tuberculosis: immunology and vaccination." *Eur Respir J* **17**(3): 537-57.
- Rook, G. A., J. Steele, *et al.* (1986). "Vitamin D3, gamma interferon, and control of proliferation of Mycobacterium tuberculosis by human monocytes." *Immunology* **57**(1): 159-63.
- Rook, G. A. W. (1988). "The role of vitamin D in tuberculosis." *Am Rev Respir Dis* **138**: 768-70.
- Rook, G. A. W. y R. Hernandez-Pando (1996). "The pathogenesis of tuberculosis." *Annu Rev Microbiol* **50**: 259-84.
- Rook, G. A. W., G. Seah, *et al.* (2001). "M. tuberculosis: immunology and vaccination." *Eur Respir J* **17**: 537-557.

- Rook, G. A. W., J. Steele, *et al.* (1986). "Vitamin D3, gamma interferon, and control of proliferation of Mycobacterium tuberculosis by human monocytes." Immunology **57**: 159-63.
- Ross, T. K., H. M. Darwish, *et al.* (1994). "Molecular biology of vitamin D action." Vitam Horm **49**: 281-326.
- Rossi, M. C., A. Gori, *et al.* (2000). "A PCR-colorimetric microwell plate hybridization assay for detection of Mycobacterium tuberculosis and M. avium from culture samples and Ziehl-Neelsen-positive smears." J Clin Microbiol **38**: 1772-6.
- Roy, S., S. Sharma, *et al.* (2004). "Induction of nitric oxide release from the human alveolar epithelial cell line A549: an in vitro correlate of innate immune response to Mycobacterium tuberculosis." Immunology **112**(3): 471-80.
- Rusch-Gerdes, S., G. E. Pfyffer, *et al.* (2006). "Multicenter laboratory validation of the BACTEC MGIT 960 technique for testing susceptibilities of Mycobacterium tuberculosis to classical second-line drugs and newer antimicrobials." J Clin Microbiol **44**(3): 688-92.
- Sakai, J., S. Matsuzawa, *et al.* (2001). "New diagnostic approach for ocular tuberculosis by ELISA using the cord factor as antigen." Br J Ophthalmol **85**(2): 130-3.
- Sallusto, F. y A. Lanzavecchia (1994). "Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha." J Exp Med **179**(4): 1109-18.
- Saukkonen, J. J., B. Bazydlo, *et al.* (2002). "Beta-chemokines are induced by Mycobacterium tuberculosis and inhibit its growth." Infect Immun **70**(4): 1684-93.
- Saverino, D., A. Merlo, *et al.* (2002). "Dual effect of CD85/leukocyte Ig-like receptor-1/Ig-like transcript 2 and CD152 (CTLA-4) on cytokine production by antigen-stimulated human T cells." J Immunol **168**(1): 207-15.
- Savill, J. (1997). "Recognition and phagocytosis of cells undergoing apoptosis." Br Med Bull **53**: 491-508.
- Scanga, C. A., V. P. Mohan, *et al.* (2000). "Depletion of CD4(+) T cells causes reactivation of murine persistent tuberculosis despite continued expression of interferon gamma and nitric oxide synthase 2." J Exp Med **192**(3): 347-58.
- Scarpato, C., P. Piccoli, *et al.* (2002). "Comparison of enhanced Mycobacterium tuberculosis amplified direct test with COBAS AMPLICOR Mycobacterium tuberculosis assay for direct detection of Mycobacterium tuberculosis complex in respiratory and extrapulmonary specimens." J Clin Microbiol **38**: 1559-62.
- Schlesinger, L. S. (1996). "Entry of Mycobacterium tuberculosis into mononuclear phagocytes." Curr Topics Microbiol Immunol **215**: 71-96.
- Schlesinger, L. S., C. G. Bellinger-Kawahara, *et al.* (1990). "Phagocytosis of Mycobacterium tuberculosis is mediated by human monocyte complement receptors and complement component C3." J Immunol **144**: 2771-2780.
- Schlesinger, L. S., T. Kaufman, *et al.* (1996). "Differences in mannose receptor-mediated uptake of lipoarabinomannan from virulent and attenuated strains of Mycobacterium tuberculosis by human macrophages." J Immunol **157**: 4568-4575.
- Schluger, N. W. (2002). "Challenges of treating latent tuberculosis infection." Chest **121**(6): 1733-5.

- Schluger, N. W., D. Perez, *et al.* (2002). "Reconstitution of immune responses to tuberculosis in patients with HIV infection who receive antiretroviral therapy." *Chest* **122**(2): 597-602.
- Schon, T., N. Gebre, *et al.* (1999). "Increased levels of nitric oxide metabolites in urine from leprosy patients in reversal reaction." *Lepr Rev* **70**(1): 52-5.
- Schon, T., R. Hernandez-Pando, *et al.* (2004). "Nitrotyrosine localization to dermal nerves in borderline leprosy." *Br J Dermatol* **150**(3): 570-4.
- Schorey, J. S., M. C. Carroll, *et al.* (1997). "A macrophage invasion mechanism of pathogenic mycobacteria." *Science* **277**: 1091-1093.
- Schwartz, R. H. (1990). "A cell culture model for T lymphocyte clonal anergy." *Science* **248**(4961): 1349-56.
- Serbina, N. V. y J. L. Flynn (1999). "Early emergence of CD8(+) T cells primed for production of type 1 cytokines in the lungs of Mycobacterium tuberculosis-infected mice." *Infect Immun* **67**(8): 3980-8.
- Serbina, N. V. y J. L. Flynn (2001). "CD8(+) T cells participate in the memory immune response to Mycobacterium tuberculosis." *Infect Immun* **69**(7): 4320-8.
- Sharma, K., M. Gupta, *et al.* (2006). "Transcriptional control of the mycobacterial embCAB operon by PknH through a regulatory protein, EmbR, in vivo." *J Bacteriol* **188**(8): 2936-44.
- Sharma, S. K. y A. Banga (2004). "Diagnostic utility of pleural fluid IFN-gamma in tuberculosis pleural effusion." *J Interferon Cytokine Res* **24**(4): 213-7.
- Shi, L., Y. J. Jung, *et al.* (2003). "Expression of Th1-mediated immunity in mouse lungs induces a Mycobacterium tuberculosis transcription pattern characteristic of nonreplicating persistence." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(1): 241-6.
- Shi, S. y S. Ehrt (2006). "Dihydrolipoamide acyltransferase is critical for Mycobacterium tuberculosis pathogenesis." *Infect Immun* **74**(1): 56-63.
- Siddiqi, N., M. Shamim, *et al.* (2002). "Molecular characterization of multidrug-resistant isolates of Mycobacterium tuberculosis from patients in North India." *Antimicrob Agents Chemother* **46**(2): 443-50.
- Sifuentes-Osornio, J., M. Bobadilla-del-Valle, *et al.* (2003). "Epidemiology of drug-resistance of Mycobacterium tuberculosis in Mexico: Symposium. [Epidemiologia de la resistencia antimicrobiana en Mycobacterium tuberculosis en Mexico. Simposio]." *Gac Med Mex*: 139-477.
- Silva, A. L., A. S. Nunes, *et al.* (2004). "Protein loss quantification of abraded virgin and abraded bleached hair according to Bradford assay." *J Cosmet Sci* **55 Suppl**: S175-9.
- Silva, V. M., G. Kanaujia, *et al.* (2003). "Factors associated with humoral response to ESAT-6, 38 kDa and 14 kDa in patients with a spectrum of tuberculosis." *Int J Tuberc Lung Dis* **7**(5): 478-84.
- Skinner, M. A., D. L. Keen, *et al.* (2002). "Increased protection against bovine tuberculosis in the brushtail possum (Trichosurus vulpecula) when BCG is administered with killed Mycobacterium vaccae." *Tuberculosis (Edinb)* **82**(1): 15-22.
- Smit, J. J., H. Van Loveren, *et al.* (2003). "Mycobacterium vaccae administration during allergen sensitization or challenge suppresses asthmatic features." *Clin Exp Allergy* **33**(8): 1083-9.

- Sousa, A. O., R. J. Mazzaccaro, *et al.* (2000). "Relative contributions of distinct MHC class I-dependent cell populations in protection to tuberculosis infection in mice." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(8): 4204-8.
- Stenger, S. (2001). "Cytolytic T cells in the immune response to mycobacterium tuberculosis." Scand J Infect Dis **33**(7): 483-7.
- Stenger, S. y A. Aderem (2001). "Role of Toll-like receptors in inflammatory response in macrophage." Crit Care Med **29** suppl: 116-158.
- Stienstra, Y., W. T. van der Graaf, *et al.* (2001). "Mycobacterium ulcerans disease: review of possible risk factors." Trop. Med. Int. Health **6**: 554-562.
- Stokes, R. W., R. Norris-Jones, *et al.* (2004). "The glycan-rich outer layer of the cell wall of Mycobacterium tuberculosis acts as an antiphagocytic capsule limiting the association of the bacterium with macrophages." Infect Immun **72**(10): 5676-86.
- Stover, C. K., V. F. De la Cruz, *et al.* (1991). "New use of BCG for recombinant vaccines." Nature **351**: 456-60.
- Stuehr, D. J. y M. A. Marletta (1985). "Mammalian nitrate biosynthesis: mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to Escherichia coli lipopolysaccharide." Proc Natl Acad Sci U S A **82**(22): 7738-42.
- Stuehr, D. J., C. C. Wei, *et al.* (2005). "Exploring the redox reactions between heme and tetrahydrobiopterin in the nitric oxide synthases." Dalton Trans(21): 3427-35.
- Sumnienski, R. V. d. F., M. F. C. Queiroz, *et al.* (2002). "Detection of Mycobacterium avium in Blood Samples of Patients with AIDS by Using PCR." J Clin Microbiol **40**(6): 2297-2299.
- Szabo, S. J., B. M. Sullivan, *et al.* (2003). "Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses." Annu Rev Immunol **21**: 713-58.
- Tadesse, A. y E. J. Shannon (2005). "Effects of Thalidomide on Intracellular Mycobacterium leprae in Normal and Activated Macrophages." Clin Diagn Lab Immunol **12**(1): 130-4.
- Taggart, E. W., H. R. Hill, *et al.* (2004). "Evaluation of an in vitro assay for gamma interferon production in response to Mycobacterium tuberculosis infections." Clin Diagn Lab Immunol **11**(6): 1089-93.
- Takamatsu, H. H., M. S. Denyer, *et al.* (2002). "A sub-population of circulating porcine gammadelta T cells can act as professional antigen presenting cells." Vet Immunol Immunopathol **87**(3-4): 223-4.
- Takayama, K., C. Wang, *et al.* (2005). "Pathway to synthesis and processing of mycolic acids in Mycobacterium tuberculosis." Clin Microbiol Rev **18**(1): 81-101.
- Takeuchi, A., G. S. Reddy, *et al.* (1998). "Nuclear factor of activated T cells (NFAT) as a molecular target for 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3-mediated effects." J Immunol **160**(1): 209-18.
- Tan, S. L. y P. J. Parker (2003). "Emerging and diverse roles of protein kinase C in immune cell signalling." Biochem J **376**(Pt 3): 545-52.
- Tascon, R. E., E. Stavropoulos, *et al.* (1998). "Protection against Mycobacterium tuberculosis infection by CD8+ T cells requires the production of gamma interferon." Infect Immun **66**(2): 830-4.
- Tazi, L., J. El Baghdadi, *et al.* (2004). "Genetic diversity and population structure of Mycobacterium tuberculosis in Casablanca, a Moroccan city with high incidence of tuberculosis." J Clin Microbiol **42**(1): 461-6.

- Tenner, A. J., S. L. Robinson, *et al.* (1995). "Mannose binding protein (MBP) enhances mononuclear phagocyte function via a receptor that contains the 126,000 M (r) component of the C1q receptor." Immunity **3**: 485-493.
- Thomas, C. J., M. Kapoor, *et al.* (2002). "Evidence of a trimolecular complex involving LPS, LPS binding protein and soluble CD14 as an effector of LPS response." FEBS Lett **531**: 184-188.
- Tollefsen, S., J. M. Pollock, *et al.* (2003). "T- and B-cell epitopes in the secreted Mycobacterium bovis antigen MPB70 in mice." Scand J Immunol **57**(2): 151-61.
- Tomioka, H., K. Sato, *et al.* (2002). "Intramacrophage passage of Mycobacterium tuberculosis and M. avium complex alters the drug susceptibilities of the organisms as determined by intracellular susceptibility testing using macrophages and type II alveolar epithelial cells." Antimicrob Agents Chemother **46**(2): 519-21.
- Topilski, I., L. Flaishon, *et al.* (2004). "The anti-inflammatory effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on Th2 cells in vivo are due in part to the control of integrin-mediated T lymphocyte homing." Eur J Immunol **34**(4): 1068-76.
- Tsuchiya, M., A. Asada, *et al.* (2002). "Smoking a single cigarette rapidly reduces combined concentrations of nitrate and nitrite and concentrations of antioxidants in plasma." Circulation **105**(10): 1155-7.
- Tufariello, J. M., K. Mi, *et al.* (2006). "Deletion of the Mycobacterium tuberculosis resuscitation-promoting factor Rv1009 gene results in delayed reactivation from chronic tuberculosis." Infect Immun **74**(5): 2985-95.
- Valente, C., V. Cuteri, *et al.* (2002). "Evaluation of the Abbott LCx Mycobacterium tuberculosis assay for direct detection of Mycobacterium bovis in bovine tissue samples." Vet Res Commun **26**(1): 21-7.
- van Beilen, J. B., T. H. M. Smits, *et al.* (2005). "Substrate Range of Integral Membrane Alkane Hydroxylases." Journal of Bacteriology **187**(1): 85-91.
- van Etten, E., D. D. Branisteanu, *et al.* (2000). "Analogues of 1,25-dihydroxyvitamin D3 as dose-reducing agents for classical immunosuppressants." Transplantation **69**(9): 1932-42.
- van Pinxteren, L. A., J. P. Cassidy, *et al.* (2000). "Control of latent Mycobacterium tuberculosis infection is dependent on CD8 T cells." Eur J Immunol **30**(12): 3689-98.
- Van Rie, A., S. A. Madhi, *et al.* (2006). "Gamma interferon production in response to Mycobacterium bovis BCG and Mycobacterium tuberculosis antigens in infants born to human immunodeficiency virus-infected mothers." Clin Vaccine Immunol **13**(2): 246-52.
- Veldman, C. M., M. T. Cantorna, *et al.* (2000). "Expression of 1,25-dihydroxyvitamin D(3) receptor in the immune system." Arch Biochem Biophys **374**(2): 334-8.
- Vera-Cabrera, L., A. Rendon, *et al.* (1999). "Dot blot assay for detection of antiacyltrehalose antibodies in tuberculous patients." Clin Diagn Lab Immunol **6**(5): 686-9.
- Veyron, P., R. Pamphile, *et al.* (1993). "Two novel vitamin D analogues, KH 1060 and CB 966 prolong skin allograft survival in mice." Transpl Immunol **1**: 72-76.
- Vezeris, N., C. Truffot-Pernot, *et al.* (2003). "Fluoroquinolone-containing third-line regimen against Mycobacterium tuberculosis in vivo." Antimicrob Agents Chemother **47**(10): 3117-22.

- Visca, P., P. De Mori, *et al.* (2004). "Evaluation of the BDProbeTec strand displacement amplification assay in comparison with the AMTD II direct test for rapid diagnosis of tuberculosis." Clin Microbiol Infect **10**(4): 332-4.
- Vitale, F., S. Reale, *et al.* (2006). "ESAT-6 peptide recognition by bovine CD8+ lymphocytes of naturally infected cows in herds from southern Italy." Clin Vaccine Immunol **13**(4): 530-3.
- Voorhout, W. F., T. Veenendaal, *et al.* (1992). "Immunocytochemical localization of surfactant protein D (SP-D) in type II cells, clara cells, and alveolar macrophages of rat lung." J Histochem Cytochem **5**: 59-66.
- Wallis, R. S., P. Kyambadde, *et al.* (2004). "A study of the safety, immunology, virology, and microbiology of adjunctive etanercept in HIV-1-associated tuberculosis." Aids **18**(2): 257-64.
- Walravens, K., S. Marche, *et al.* (2002). "IFN-gamma diagnostic tests in the context of bovine mycobacterial infections in Belgium." Vet Immunol Immunopathol **87**(3-4): 401-6.
- Walsh, S. J. y L. M. Rau (2000). "Autoimmune diseases: a leading cause of death among young and middle-aged women in the United States." Am J Public Health **90**(9): 1463-6.
- Walunas, T. L., C. Y. Bakker, *et al.* (1996). "CTLA-4 ligation blocks CD28-dependent T cell activation." J Exp Med **183**(6): 2541-50.
- Wang, C. H., C. Y. Liu, *et al.* (1998). "Increased exhaled nitric oxide in active pulmonary tuberculosis due to inducible NO synthase upregulation in alveolar macrophages." Eur Respir J **11**(4): 809-15.
- Wang, J., D. L. Rousseau, *et al.* (1994). "Heme coordination of NO in NO synthase." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(22): 10512-6.
- Warnon, S., N. Zammattéo, *et al.* (2000). "Colorimetric detection of the tuberculosis complex using cycling probe technology and hybridization in microplates." Biotechniques **28**: 1152-60.
- Warren, R., M. de Kock, *et al.* (2006). "Safe Mycobacterium tuberculosis DNA Extraction Method That Does Not Compromise Integrity." J Clin Microbiol **44**(1): 254-256.
- Waters, W. R., B. J. Nonnecke, *et al.* (2003). "Mycobacterium bovis bacille Calmette-Guerin vaccination of cattle: activation of bovine CD4+ and gamma delta TCR+ cells and modulation by 1,25-dihydroxyvitamin D3." Tuberculosis (Edinb) **83**(5): 287-97.
- Waters, W. R., B. J. Nonnecke, *et al.* (2004). "Use of recombinant ESAT-6:CFP-10 fusion protein for differentiation of infections of cattle by Mycobacterium bovis and by M. avium subsp. avium and M. avium subsp. paratuberculosis." Clin Diagn Lab Immunol **11**(4): 729-35.
- Waters, W. R., B. J. Nonnecke, *et al.* (2001). "Modulation of Mycobacterium bovis-Specific Responses of Bovine Peripheral Blood Mononuclear Cells by 1,25-Dihydroxyvitamin D3." Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology **8**: 1204-1212.
- Waters, W. R., M. V. Palmer, *et al.* (2004). "Mycobacterium bovis infection of vitamin D-deficient NOS2-/- mice." Microb Pathog **36**(1): 11-7.
- Waters, W. R., M. V. Palmer, *et al.* (2003). "Immune responses of elk to Mycobacterium bovis bacillus Calmette Guerin vaccination." Vaccine **21**(13-14): 1518-26.

- Waters, W. R., M. V. Palmer, *et al.* (2002). "Nitric oxide production as an indication of *Mycobacterium bovis* infection in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*)." J Wildl Dis **38**(2): 338-43.
- Waters, W. R., M. V. Palmer, *et al.* (2006). "Diagnostic implications of antigen-induced gamma interferon production by blood leukocytes from *Mycobacterium bovis*-infected reindeer (*Rangifer tarandus*)." Clin Vaccine Immunol **13**(1): 37-44.
- Waters, W. R., M. V. Palmer, *et al.* (2003). "Diagnostic implications of antigen-induced gamma interferon, nitric oxide, and tumor necrosis factor alpha production by peripheral blood mononuclear cells from *Mycobacterium bovis*-infected cattle." Clin Diagn Lab Immunol **10**(5): 960-6.
- Weatherby, K. E., B. S. Zwillig, *et al.* (2003). "Resistance of macrophages to *Mycobacterium avium* is induced by alpha2-adrenergic stimulation." Infect Immun **71**(1): 22-9.
- Webb, D. C., A. N. McKenzie, *et al.* (2000). "Integrated signals between IL-13, IL-4, and IL-5 regulate airways hyperreactivity." J Immunol **165**(1): 108-13.
- Weldingh, K., I. Rosenkrands, *et al.* (2005). "Assessing the serodiagnostic potential of 35 *Mycobacterium tuberculosis* proteins and identification of four novel serological antigens." J Clin Microbiol **43**(1): 57-65.
- Welsh, M. D., H. E. Kennedy, *et al.* (2002). "Responses of bovine WC1(+) gammadelta T cells to protein and nonprotein antigens of *Mycobacterium bovis*." Infect Immun **70**(11): 6114-20.
- Westenbrink, B. D., Y. Stienstra, *et al.* (2005). "Cytokine Responses to Stimulation of Whole Blood from Patients with Buruli Ulcer Disease in Ghana." Clin Diagn Lab Immunol **12**(1): 125-129.
- Westenbrink, B. D., Y. Stienstra, *et al.* (2005). "Cytokine responses to stimulation of whole blood from patients with Buruli ulcer disease in Ghana." Clin Diagn Lab Immunol **12**(1): 125-9.
- Wilkinson, K. A., O. M. Kon, *et al.* (2006). "Effect of treatment of latent tuberculosis infection on the T cell response to *Mycobacterium tuberculosis* antigens." J Infect Dis **193**(3): 354-9.
- Williams, A., G. J. Hatch, *et al.* (2005). "Evaluation of vaccines in the EU TB Vaccine Cluster using a guinea pig aerosol infection model of tuberculosis." Tuberculosis (Edinb) **85**(1-2): 29-38.
- Wittke, A., V. Weaver, *et al.* (2004). "Vitamin D receptor-deficient mice fail to develop experimental allergic asthma." J Immunol **173**(5): 3432-6.
- Wong, P. y E. G. Pamer (2003). "CD8 T cell responses to infectious pathogens." Annu Rev Immunol **21**: 29-70.
- Wood, P. R., L. A. Corner, *et al.* (1992). "A field evaluation of serological and cellular diagnostic tests for bovine tuberculosis." Vet Microbiol **31**(1): 71-9.
- Wood, P. R. y J. S. Rothel (1994). "In vitro immunodiagnostic assays for bovine tuberculosis." Vet Microbiol **40**(1-2): 125-35.
- Wozniak, T. M., A. A. Ryan, *et al.* (2006). "Plasmid interleukin-23 (IL-23), but not plasmid IL-27, enhances the protective efficacy of a DNA vaccine against *Mycobacterium tuberculosis* infection." Infect Immun **74**(1): 557-65.
- Yamada, H., E. Kuroda, *et al.* (2002). "Prostaglandin E2 down-regulates viable Bacille Calmette-Guerin-induced macrophage cytotoxicity against murine bladder cancer cell MBT-2 in vitro." Clin Exp Immunol **128**(1): 52-8.

- Yamashoji, S. (2003). "Coenzyme Q1-catalyzed luminol chemiluminescent assay for rapid antimicrobial susceptibility testing of *Mycobacterium bovis*." Microbiol Immunol **47**(3): 191-8.
- Yang, R. B., M. R. Mark, *et al.* (1998). "Toll-like receptor-2 mediates lipopolysaccharide-induced cellular signaling." Nature **395**: 284-288.
- Yang, S., C. Smith, *et al.* (1993). "Vitamin D deficiency suppresses cell-mediated immunity in vivo." Arch Biochem Biophys **303**(1): 98-106.
- Yao, H. W., J. Li, *et al.* (2003). "Effect of leflunomide on immunological liver injury in mice." World J Gastroenterol **9**(2): 320-3.
- Yates, M. D., F. A. Drobniewski, *et al.* (2002). "Evaluation of a rapid PCR-based epidemiological typing method for routine studies of *Mycobacterium tuberculosis*." J Clin Microbiol **40**(2): 712-4.
- Zerbi, P., A. Schonau, *et al.* (2001). "Amplified in situ hybridization with peptide nucleic acid probes for differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* complex and nontuberculosis *Mycobacterium* species on formalin-fixed, paraffin embedded archival biopsy and autopsy samples." Am J Clin Pathol **116**: 770-5.
- Zhang, Y., B. Heym, *et al.* (1992). "The catalase peroxidase gene and isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*." Nature **358**: 501-593.
- Zhang, Y., S. Permar, *et al.* (2002). "Conditions that may affect the results of susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* to pyrazinamide." J Med Microbiol **51**(1): 42-9.
- Ziegler-Heitbrock, H. W. L. y R. J. Ulevitch (1993). "Cell surface receptor and differentiation marker." Immunol Today **14**: 121-125.
- Zimmerli, S., S. Edwards, *et al.* (1996). "Selective receptor blockade during phagocytosis does not alter the survival and growth of *Mycobacterium tuberculosis* in human macrophages." J Respir Cell Mol Biol **15**: 760-770.
- Zittermann, A. (2003). "Vitamin D in preventive medicine: are we ignoring the evidence?" Br J Nutr **89**(5): 552-72.

Glosario de términos

Adyuvante

Cualquier sustancia que intensifica de manera inespecífica la respuesta inmunitaria frente a un antígeno o aumenta los efectos farmacológicos de un medicamento.

Anergia

Tolerancia inmunológica específica potencialmente reversible en la cual el linfocito pierde la capacidad de respuesta funcional.

Anticuerpo (Ab)

Proteína que posee las propiedades moleculares de una inmunoglobulina, sintetizada principalmente por las células plasmáticas como resultado del estímulo de un antígeno (agente infeccioso o una sustancia extraña). Un anticuerpo es producido por células plasmáticas derivadas de linfocitos B. Esta proteína tiene afinidad específica para el antígeno que estimuló la formación fijándose a él por su fragmento Fab en forma no covalente. Todos los anticuerpos IgG, IgM, IgA secretoria, IgA sérica, IgE e IgD pertenecen a las inmunoglobulinas, sin embargo no todas las inmunoglobulinas funcionan como anticuerpos. Moléculas proteicas producidas por el organismo como respuesta a un estímulo por un inmunógeno. Ante los inmunógenos que los originan, los anticuerpos tienen la propiedad esencial de reaccionar específicamente.

Anticuerpo fluorescente

Un anticuerpo conjugado con un colorante fluorescente como el FITC.

Anticuerpo monoclonal

Anticuerpo homogéneo derivado de una única clona celular B. Todos estos anticuerpos tienen idénticos sitios de fijación antigénica e isotipo.

Antígeno (Ag)

Término que se acuñó en el s. XIX para designar cualquier sustancia que introducida en el organismo era capaz de inducir una respuesta inmunológica.

1) en la actualidad el término se utiliza más ampliamente para referirse a cualquier sustancia o célula (e.g. bacterias, virus, glóbulos rojos, células de trasplantes o algunos componentes de estos como: proteínas, lipopolisacáridos) que es reconocida como extraña por el sistema inmune. 2) también se utiliza para designar a uno de los reactivos de las pruebas serológicas, e.g. antígeno Rosa de Bengala, antígeno Tífico. Según la definición clásica, es una sustancia capaz de provocar en el organismo la formación de anticuerpos que puedan unirse específicamente con ella, o de células que tengan una afinidad específica ante ella. De hecho, esta definición corresponde más bien al término de inmunógeno.

Antígeno CD - Conjunto de diferenciación celular

Designación de la aglomeración de diferenciación para moléculas de la superficie celular leucocítica que son identificadas por un grupo dado de anticuerpos monoclonales. Los linfocitos T se localizan predominantemente en los folículos y entre ellos, en la paracorteza. La mayoría (70% aproximadamente) de estas células T son linfocitos T colaboradores CD4+, entremezclados con escasas células CD8+. Las células CD4+ y CD8+ son proteínas de superficie moléculas de adhesión; integrinas. CD44 Isoforma CD45 principal (solo en seres humanos). La Isoforma de la molécula CD45 es

identificada por anticuerpos específicos del segmento codificado por el exón A, por lo que recibe el nombre de CD45RA (restringida por A).

Antígeno de Histocompatibilidad.

Isoantígenos codificados por los genes del sistema mayor de Histocompatibilidad (HLA y H-2) que se localizan en la membrana celular de la mayoría de las células nucleadas. Son las responsables de la interacción y cooperación celular (Ag de la clase II), así como del rechazo de injertos (Ag de la clase I).

Apoptosis

Muerte celular programada que se caracteriza por la digestión endonucleásica del ADN. Proceso de muerte celular caracterizado por la escisión del ADN, condensación y fragmentación del núcleo y la vesiculación de la membrana plasmática que provoca la fagocitosis de la célula sin inducir una respuesta inflamatoria. Este tipo de muerte celular es importante en el desarrollo de los linfocitos, en la regulación de las respuestas linfocíticas a los antígenos extraños y en el mantenimiento de la tolerancia a los autoantígenos.

Bacilo Calmette-Guérin (BCG)

Mycobacterium tuberculosis o *bovis* atenuado que se emplea como vacuna específica contra la TB y también como un adyuvante.

CD 4+

Glucoproteína de la superficie celular, usualmente en las células T cooperadoras, que reconoce las moléculas de la clase II del MHC en las APC.

CD 8+

Glucoproteína de la superficie celular, usualmente en las células T citotóxicas, que reconoce las moléculas de la clase I del MHC en las dianas celulares.

Células citocidas naturales (NK)

Subpoblación de linfocitos derivados de la médula ósea, diferentes de las células T o B, que actúan en las respuestas inmunitarias innatas para destruir a las células infectadas por microorganismos mediante mecanismos líticos directos y secretando IFN- γ . Las células NK no expresan receptores para el antígeno de distribución clonal como los receptores Ig o los TCR, y su activación esta regulada por una combinación de receptores estimuladores e inhibidores; estos últimos reconocen moléculas del MHC propio. Secretan citoquinas e IFN- γ

Células Dendríticas

Células accesorias inmunitarias derivadas de la médula ósea presentes en los tejidos epiteliales y linfoides que se caracterizan desde el punto de vista morfológico por delgadas proyecciones membranosas. Actúan como APC para los linfocitos T no estimulados, y son importantes para el inicio de las respuestas inmunitarias adaptativas a los antígenos proteicos.

Célula Dendrítica Folicular

Células dendríticas negativas para la clase II del MHC y positivas para receptores de Fc que poseen inmunocomplejos en su superficie y probablemente participen en la generación de células secretoras de anticuerpos y en el mantenimiento de la memoria celular B en los centros germinativos.

Célula Dendrítica Interdigitante

Células dendríticas APC positivas para la clase II del MHC y negativas para receptores de Fc que se encuentran en las áreas celulares T de los ganglios linfáticos y el bazo.

Células de Langerhans

Son de las principales poblaciones celulares presentes en la epidermis, éstas son las células dendríticas inmaduras. Su función principal es atrapar y transportar antígenos proteicos a los ganglios linfáticos de drenaje. Durante su migración a los ganglios linfáticos, las células de Langerhans maduran a células dendríticas a los ganglios linfáticos, capaces de presentar eficazmente los antígenos a las células no estimuladas (“vírgenes”), positivas para la clase II del MHC y para receptores de Fc que se encuentran en la piel.

Células M

Son células de membrana especializadas. Células epiteliales especializadas utilizadas sobre las placas de Peyer del intestino que desempeñan un papel en la llegada de los antígenos a las placas de Peyer.

Célula NK (destructora o citocida natural)

Linfocito granular grande que no reordena ni expresa genes de inmunoglobulinas ni de receptores celulares T pero que es capaz de reconocer o destruir ciertas células tumorales o infectadas por virus de una manera independiente de los anticuerpos y el MHC.

Célula presentadora de antígenos (APC)

Célula que expone en su superficie fragmentos peptídicos de antígenos proteicos, asociados a moléculas del MHC, y activa las células T específicas de

los antígenos. Además de presentar complejos péptido-molécula del MHC, las APC también deben expresar moléculas coestimuladoras para activar óptimamente a los linfocitos T.

Célula presentadora de antígeno profesional (APC profesional)

APC para los linfocitos T colaboradores, como las células dendríticas, los fagocitos mononucleares y los linfocitos B, que es capaz de expresar moléculas de clase II del MHC y coestimuladores. Las APC profesionales más importantes para el inicio de las respuestas de células T primarias son las células dendríticas.

Células plasmáticas

Linfocitos B; células que sintetizan y secretan anticuerpos específicos de una especificidad e isotipo. Los anticuerpos son sintetizados y secretados por las células plasmáticas. Las células plasmáticas maduras son de corta vida y liberan muchos miles de anticuerpos idénticos por segundo. Cada anticuerpo es capaz de reaccionar específicamente con el antígeno que inició la respuesta inmune. El origen de los anticuerpos son las células plasmáticas diferenciadas. Estas células se encuentran más frecuentemente en la pulpa blanca del bazo, médula de ganglios periféricos y otros tejidos linfáticos secundarios. Las células plasmáticas están caracterizadas por su retículo endoplásmico rugoso iniciador de la síntesis proteica activa, su cromatina nuclear marginada y por la presencia de un citoplasma fuertemente basófilo. Los gránulos plasmáticos son ricos en anticuerpos proteicos. Durante el curso de la respuesta inmune, las células plasmáticas producen anticuerpos.

Células presentadoras de antígenos (APC)

Denominación habitual para células que presentan péptido antigénico procesado y molécula de la clase II del MHC al receptor T en los linfocitos T CD4+. Son ejemplos macrófagos, células dendríticas y células B. La mayor parte de los tipos celulares es capaz de presentar péptidos antigénicos con la clase I del MHC a las células T CD8+, como ocurre con las células infectadas por virus.

Células presentadoras de antígenos profesionales (APC profesionales)

Son APC profesionales los linfocitos T colaboradores, como las células dendríticas, los fagocitos mononucleares y los linfocitos B, que es capaz de expresar moléculas de clase II del MHC y coestimuladores. Las APC profesionales más importantes para el inicio de las respuestas de células T primarias son las células dendríticas.

Células T colaboradoras

Subpoblación funcional de los linfocitos T cuyas funciones efectoras principales consisten en activar a los macrófagos en las respuestas inmunitarias celulares y promover la producción de anticuerpos por las células B en las respuestas inmunitarias humorales. Estas funciones efectoras están mediadas por citoquinas secretadas y por la unión del ligando de CD40 expresado en las células T al CD40 de los macrófagos o las células B. La mayoría de las células T colaboradoras expresa CD4.

Células Th1 (Células T colaboradoras)

Subpoblación funcional de células T colaboradoras que secreta un conjunto específico de citoquinas, como IFN- γ , y cuya función principal consiste en

estimular la defensa mediada por los fagocitos contra las infecciones, especialmente las debidas a los microorganismos intracelulares.

Células Th2 (Células T colaboradoras)

Subpoblación funcional de células T colaboradoras que secreta un conjunto específico de citoquinas, como IL-4 e IL-5, y cuyas funciones principales consisten en estimular las reacciones inmunitarias medidas por IgE y por eosinófilos/mastocitos y regular negativamente las respuestas de Th1.

Cininas

Una familia de polipéptidos liberados durante las respuestas inflamatorias y que aumentan la permeabilidad vascular y la contracción del músculo liso.

Citometría de Flujo

Método para el análisis del fenotipo de las poblaciones celulares que requiere un instrumento especializado (citómetro de flujo) que detecta la fluorescencia en células individuales en una suspensión y, por lo tanto, determina el número de células que expresan la molécula a la que se une la sonda fluorescente. Las suspensiones de células se incuban con anticuerpos marcados fluorescentemente o con otras sondas, y la cantidad de sonda unida por cada célula de la población se mide haciendo pasar las células a través de un fluorímetro con un haz incidente generado por láser.

Citoquinas (citocinas)

Proteínas de bajo peso molecular que estimulan o inhiben la diferenciación, proliferación o función de las células inmunitarias. Proteínas producidas por muchos tipos de células distintos que median las reacciones inflamatorias e

inmunitarias. Las citoquinas son uno de los principales mediadores de la comunicación entre las células del sistema inmunitario.

Citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos

Proceso por el cual las células citocidas naturales (NK) son dirigidas a las células recubiertas de anticuerpos. En la membrana de las células NK se expresa un receptor específico de la región constante de las IgG, denominado Fc γ RIII (CD16), que media la unión a la Ig.

Coestimulador

Molécula de la superficie de una célula presentadora de antígenos (APC) o secretada por esta que proporciona un estímulo (una "segunda señal") necesaria para la activación de las células T no estimuladas ("vírgenes"), además del antígeno. Los coestimuladores mejor definidos son las moléculas B7 presentes en las APC profesionales que se unen a la molécula CD28 presente en las células T.

Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC)

Es un locus genético de gran tamaño localizado en el cromosoma 6 del ser humano y en el 17 del ratón, consta de genes muy polimórficos que codifican las moléculas de unión al péptido que son reconocidas por los linfocitos T. El locus CMH también contiene genes que codifican citoquinas, moléculas que participan en el procesamiento antigénico y proteínas del complemento.

Complemento (C)

Complejo proteico, presente en todo suero normal. Es inespecífico, es decir, existe en ausencia de toda inmunización. Se fija a la mayoría de complejos

antígeno-anticuerpo. Completa, en cierta manera, la acción de los anticuerpos y es necesario en la hemólisis inmunológica y en la bacteriólisis. C' es una serie de proteínas plasmáticas que, al activarse, operan como una "cascada" para efectuar la lisis de membranas celulares; pueden activarse por reacción entre antígeno en una membrana celular (vía clásica) o por polisacáridos bacterianos, como endotoxinas (vía alternativa).

Determinante antigénico

Una aglomeración de epítomos.

ELISA Análisis de inmunoabsorción ligado a enzimas

Método para cuantificar un antígeno inmovilizado en una superficie sólida utilizando un anticuerpo específico con una enzima unida covalentemente. La cantidad de anticuerpo que se une al antígeno es proporcional a la cantidad de antígeno presente, y se establece mediante la determinación espectrofotométrica de la conversión de un sustrato transparente en un producto coloreado por la enzima unida.

Epítomo

La parte de un antígeno que es reconocida por un receptor antigénico (determinante antigénico)

Factor de Necrosis Tumoral (TNF)

Citocina producida fundamentalmente por fagocitos mononucleares activados que actúa estimulando el reclutamiento de los neutrófilos y los monocitos a los sitios de infección y activando estas células para erradicar a los microorganismos. El TNF estimula a las células del endotelio vascular para que expresen nuevas moléculas de adhesión, induce la secreción de quimioquinas

por los macrófagos y las células endoteliales y promueve la apoptosis de las células Diana.

Factor de Necrosis Tumoral-alfa y beta (TNF- α y TNF- β)

Dos citocinas emparentadas que originalmente fueron designadas así por sus efectos citotóxicos sobre ciertas células tumorales pero que también poseen funciones inmunorreguladoras.

Fagocitosis

Fenómeno que consiste en el englobamiento y destrucción por los fagocitos de partículas sólidas organizadas o inertes. Proceso por el que ciertas células del sistema inmunitario, incluidos los macrófagos y los neutrófilos, engloban partículas de gran tamaño ($> 0.5 \mu\text{m}$ de diámetro), como microorganismos intactos. La célula rodea la partícula con extensiones de una membrana plasmática mediante un proceso dependiente de energía y del citoesqueleto; este proceso tiene como resultado la formación de una vesícula intracelular denominada fagosoma, que contiene la partícula ingerida.

Fagocitosis inducida

Fagocitosis auxiliada por la acción de las opsoninas del suero sanguíneo.

Fitoheماغlutinina (PHA)

Lectina vegetal que actúa como mitógeno para las células T.

Fragmento Fab

Obtenido por acción de la papaína. Está formado por las dos mitades C terminales de las dos cadenas ligeras.

Fragmento Fc

Fragmento, llamado cristalizante, de la molécula de Ig. Fragmento que no fija antígenos, obtenido de una molécula de Ig tras la digestión con papaína. Consiste en la fracción C-terminal de ambas cadenas pesadas que se une a los receptores de Fc y al C1q.

Hipersensibilidad

Respuesta inmunológica inadecuada o exagerada que causa daño en un individuo inmunizado.

Hipersensibilidad inmediata

Sensibilidad anormal a un antígeno que se traduce por una reacción patológica (liberación de aminas vasoactivas) en los minutos que siguen a la unión de este antígeno con el anticuerpo específico correspondiente.

Hipersensibilidad retardada

Reacción inmunitaria, mediante células nucleadas de un mismo individuo, responsables de la reacción inmunitaria de rechazo de injertos. Corresponden a una especificidad del individuo.

IgG

(immunoglobulin G) inmunoglobulina G (γ -gamma). PM de 150,000, 80% del total de inmunoglobulina en plasma; protege los líquidos corporales internos contra bacterias y sus toxinas; puede cruzar la placenta y conferir defensas en las primeras semanas de vida.

Inflamación

La respuesta de los tejidos ante los traumatismos que se caracteriza por un aumento del flujo sanguíneo y el influjo de leucocitos en el sitio afectado y cuyas consecuencias son la tumefacción (tumor), el enrojecimiento (rubor), el aumento de la temperatura (calor) y el dolor.

Inmune

Protegido natural o artificialmente contra una enfermedad determinada.

Inmunidad

Conjunto de manifestaciones que un organismo vivo es capaz de desarrollar en su esfuerzo para adquirir un estado refractario frente a las infecciones.

Inmunidad Activa (Inmunidad Actual)

La debida a una reacción del organismo contra el agente nocivo, después de curado de una enfermedad infecciosa o de inoculado con la bacteria causante o sus productos.

Inmunidad Adquirida (Inmunidad Artificial)

Inmunidad mediada por linfocitos y caracterizada por especificidad antigénica y memoria. Es la que se obtiene naturalmente después de una enfermedad infecciosa o artificialmente por inoculación o vacunación.

Inmunidad Antibacteriana o antitóxica

Inmunidad contra la acción de las bacterias o las toxinas respectivamente.

Inmunidad Celular

Es la inmunidad mediada por células, alude a las respuestas inmunitarias mediadas por células T. Inmunidad en la que los factores activos son las células fagocitarias.

Inmunidad de Comunidad

La que por medidas higiénicas u otras se confiere a un grupo de individuos contra una enfermedad a la que particularmente cada individuo sigue siendo susceptible.

Inmunidad Congénita (Inmunidad Natural, inherente o innata)

Inmunidad que poseen ciertos individuos o especies de animales contra una enfermedad determinada, como la que tienen muchas especies respecto a la sífilis.

Inmunidad Específica

Inmunidad contra una enfermedad o antígeno particular.

Inmunidad Familiar

Inmunidad que existe como característica de algunas familias.

Inmunidad Humoral

Aquella cuyos factores activos son los anticuerpos en los humores orgánicos. Derivada de linfocitos B y síntesis de anticuerpos específicos solubles por las células plasmáticas; esto estimula la fagocitosis de células extrañas o la combinación con moléculas extrañas y su precipitación.

Inmunidad innata

Inmunidad que no es intrínsecamente afectada por el contacto previo con el antígeno, o sea todos los aspectos de la inmunidad no mediada de manera directa por los linfocitos.

Inmunidad Opsónica

La debida a la presencia de opsoninas que estimulan la fagocitosis.

Inmunización

Protección contra una enfermedad por medio de una vacuna, generalmente con una forma débil del agente que causa la enfermedad.

Inmunoglobulina (Ig)

Fracción de las proteínas plasmáticas ligada a la función anticuerpo; sinónimo de globulinas γ . Son globulinas séricas con propiedades de anticuerpo. Sin embargo, no todas las moléculas de inmunoglobulinas tienen una actividad de anticuerpo. Actualmente se conocen cinco variedades denominadas IgG, IgA, IgM, IgD e IgE.

Inmunomoduladores

Medicamentos que se espera fortalezcan el sistema inmunológico y ayuden al cuerpo a combatir las infecciones oportunistas u otras enfermedades. No son necesariamente usados para estimular el sistema inmunológico ya que puede ser perjudicial. Incluyen dos sub-grupos: las citocinas y los inmunomoduladores de amplia actividad. Los inmunomoduladores de amplia actividad son hormonas mensajeras químicas del cuerpo que regulan el sistema inmunológico, como las endorfinas que controlan el calor.

Interferones (IFN)

El IFN- α deriva de diversos leucocitos, el IFN- β lo hace de fibroblastos y el IFN- γ proviene de los linfocitos T. Los tres tipos inducen un estado antivirósico en las células y el IFN- γ actúa como una citocina en la regulación de las respuestas inmunitarias.

Interferón-gamma (IFN- γ)

Citosina producida por los linfocitos T y las células citocidas naturales (NK) cuya principal función consiste en activar a los macrófagos en las respuestas inmunitarias, tanto innatas como adaptativas. El IFN- γ también se denomina interferón inmunitario o de tipo II.

Interleucina (IL)

Designación de algunas citocinas secretadas por los leucocitos.

Interleucina 1

Linfocina secretada por los macrófagos o células accesorias que tiene como acción biológica el activar los linfocitos T y linfocitos B contra los antígenos.

Interleucina 2

Linfocina sintetizada por los linfocitos T cooperadores activados cuya función es la de causar la proliferación y activación de otros linfocitos T en forma no específica. Este factor es esencial para mantener en cultivo por tiempo prolongado a los linfocitos T.

ITAM (Motivos de activación de inmunorreceptores basados en tirosina)

Son secuencias consenso para la familia src de las tirosina cinasas. Estos motivos se encuentran en los dominios citoplasmáticos de varias moléculas de señalización, incluidas las unidades de transducción de señales de los receptores antigénicos linfocíticos y de los receptores de Fc.

Knockout

El uso de recombinación genética homóloga en células precursoras embrionarias para reemplazar un gen funcional por una copia defectuosa de

ese gen. Los animales generados mediante esta técnica pueden criarse hacia la homocigosis, lo que permite la aparición de un fenotipo nulo para ese producto génico.

Lectina

Una familia de proteínas, en su mayoría de origen vegetal, que se unen a los carbohidratos específicos en glucoproteínas y glucolípidos. Algunas lectinas también son mitógenos (PHA, conA).

Linfocitos B

Linfocitos timoindependientes o burso -o *bone marrow*- dependientes, precursores de los plasmocitos que producen los anticuerpos.

Linfocitos T

Linfocitos timoderivados o timodependientes, implicados en las reacciones inmunitarias de tipo celular.

Linfocito T citotóxico

Células T (por lo general CD8+) que destruyen dianas celulares tras el reconocimiento de moléculas del MHC-péptidos extraños en la membrana celular de la diana.

Linfocitos T cooperador (auxiliar) T_H

Linfocitos T que colaboran en la síntesis de anticuerpos frente a antígenos timodependientes.

Linfocitos T supresores

Linfocitos T que ejercen una acción supresiva ante respuestas inmunitarias humorales.

Linfokinas

Mediadores solubles producidos tanto por linfocitos T sensibilizados a un antígeno, durante la reacción inmunitaria celular, como por los linfocitos T no sensibilizados, bajo influencia de mitógenos no específicos.

Lipopolisacárido (LPS)

Endotoxina derivada de las paredes celulares de las bacterias Gramnegativas que tienen acciones inflamatorias y mitógenas.

Macrófago (M ϕ)

Célula fagocítica grande, derivada del monocito de la sangre, que también funciona como célula presentadora de antígenos y puede mediar la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC).

Mycobacterium

Género de bacterias aerobias, muchas especies de las cuales pueden sobrevivir en el interior de los fagocitos y provocar enfermedad. La principal defensa del huésped frente a las micobacterias como *Mycobacterium tuberculosis* es la inmunidad celular.

NADPH

Forma reducida del fosfato de dinucleótido de nicotinamida adenina.

Opsoninas

Sustancia termolábil del suero sanguíneo normal, que hace a los microbios o células sanguíneas más aptos para ser fagocitados por los leucocitos. Sustancias capaces de aumentar la fagocitosis. Son básicamente anticuerpos y fracciones del complemento.

Opsonina específica o inmune

Opcionina que se desarrolla en el suero sanguíneo como resultado de una infección, activa únicamente contra el organismo infectante.

Opcionización

Proceso en que un antígeno se combina con el anticuerpo opsonina para hacerlo más susceptible a la acción de englobamiento de los fagocitos.

Organo linfoide central

Organo bajo cuya influencia las células se hacen inmunológicamente competentes, es decir, capaces de reaccionar con el antígeno. Lo son la médula ósea, el timo y la bolsa de Fabricio (está únicamente en las aves).

Órgano linfoide periférico

Órgano en el que se realiza el contacto entre el antígeno y las células inmunológicamente competentes. Comprende los ganglios linfáticos, el bazo y las formaciones linfoides de las mucosas digestivas y respiratorias.

Oxido Nítrico (NO)

Molécula efectora biológica con una amplia gama de actividades que en los macrófagos actúa como un potente agente microbicida para destruir a los microorganismos ingeridos.

Proteína fijadora de manosa

Un miembro de la familia de las colectinas (lectinas calciodependientes) que es una proteína de fase aguda. Funciona como un estimulante de la activación de la vía clásica del C' y como una opsonina para la fagocitosis a través de su unión a la manosa, un residuo de carbohidrato que suele hallarse en una forma expuesta solo en la superficie de los microorganismos.

Quimioquinas

Una familia de citocinas de bajo peso molecular, relacionadas estructuralmente que inducen con selectividad quimiotaxis y activación de las células fagocíticas y linfocitos. También son capaces de desencadenar rápidamente la adhesión leucocítica mediada por integrinas.

Reacción inmunitaria

Reactividad nueva y específica del organismo adquirida como consecuencia de la introducción de un inmunógeno. Se distingue la reacción inmunitaria humoral caracterizada por la producción de anticuerpos y la reacción inmunitaria celular, con producción de células mononucleadas que reaccionan específicamente con el antígeno.

Receptor de célula T (TCR)

El receptor antigénico heterodimérico del linfocito T existe en dos formas alternativas consistentes en cadenas α y β y en cadenas γ y δ . El TCR $\alpha\beta$ reconoce fragmentos peptídicos presentados por moléculas del MHC en la superficie de las células. La función de los TCR $\gamma\delta$ no está tan bien definida pero se sabe que puede reconocer proteínas nativas en la superficie celular.

Receptores de Fc (FcRs)

Receptores de la superficie celular que fijan la porción Fc de clases particulares de Ig's.

Reclutamiento

Movimiento regulado por los linfocitos.

Respuesta inmune primaria

Es la respuesta inmunitaria relativamente débil que se produce en el primer encuentro de los linfocitos vírgenes con un antígeno dado.

Respuesta inmune secundaria

Es la respuesta inmunitaria con mejoras cualitativas y cuantitativas que ocurre en el segundo encuentro de los linfocitos programados con un antígeno dado.

Separador celular activado por fluorescencia (FACS)

Adaptación del citómetro de flujo que se utiliza para purificar las células de una población mixta en función de que sonda y que cantidad de la misma se une a las células. Las células se tiñen con una sonda marcada fluorescentemente, como un anticuerpo específico del antígeno de superficie de una población celular. Las células se hacen pasar entonces de una en una a través de un fluorímetro con un haz incidente generado por láser y son deflectadas diferencialmente por campos electromagnéticos cuya potencia y dirección varían de acuerdo con la intensidad medida de la señal de fluorescencia.

Sintetasa de óxido nítrico inducible (iNOS)

Es una enzima citosólica que no existe en los macrófagos en reposo, pero puede inducirse en respuesta al LPS en combinación con IFN- γ . La iNOS cataliza la conversión de arginina en citrulina, y se libera óxido nítrico que se difunde libremente.

Tolerógeno

Antígeno utilizado para inducir tolerancia, a menudo depende de las circunstancias de la administración que de cualquier propiedad inherente a la molécula.

Timo

Sitio de maduración de los linfocitos T. Órgano linfoide llamado central en el que tiene lugar la diferenciación en los linfocitos T, responsables de la respuesta inmunitaria de tipo celular. Es un órgano glandular endócrino transitorio, propio de la infancia, del que solo quedan vestigios adiposos a los 10 o 12 años de edad, situado en la parte inferior del cuello y superior del mediastino anterior, formado por dos lóbulos alargados, compuestos cada uno de ellos por una serie de lobulillos dispuestos alrededor de un eje o cordón central conjuntivo. Cada lobulillo se halla dividido por un tabique de tejido conjuntivo en folículos formados de una sustancia cortical y otra medular con linfocitos, leucocitos y corpúsculos de Hassall (cuerpos pequeños en el Timo, estriados concéntricamente; restos del tejido epitelial que se encuentran en los primeros períodos de desarrollo de la glándula).

Timocito

Célula T en desarrollo en el timo.

Vacuna

Preparación microbiana que, introducida en el organismo, provoca en éste la inmunización activa contra una enfermedad determinada. Provoca una reacción en el organismo y es principalmente preventiva.

Vías de Activación del Complemento

La activación de los factores proteicos del complemento se hace secuencialmente según dos vías: en la vía clásica, el activador está constituido por complejos antígeno-anticuerpo; en la vía alterna, los activadores

corresponden a las endotoxinas bacterianas, el zymosan, el veneno de cobra y agregados de determinadas inmunoglobulinas (IgA, IgE).

ANEXOS

ANEXO No. 1

- **Buffer de fosfatos y cloruro de sodio (PBS).** Contiene Buffer de fosfatos de potasio (J. T. Baker, Xalostoc, Edo. De México) 0.015 M pH 7.4 y NaCl (J. T. Baker, Xalostoc, Edo. De México) 0.15 M.
- **PBS suplementado.** PBS con suero fetal bovino al 10% (Gibco, Grand Island NY).
- **RPMI.** Se utilizó medio RPMI 1640 (Gibco, Grand Island NY) con L-glutamina, con 25 mM HEPES buffer y sin bicarbonato de sodio. [Un sobre de RPMI se disolvió en un litro de agua estéril, en un matraz estéril de 2 litros, se mezcló con un agitador magnético estéril y se agregó 1 g de bicarbonato de sodio. Se burbugeó con CO₂ para conservar un pH adecuado para mantener las células viables].
- **RPMI Completo.** Se utilizó medio RPMI 1640 (Gibco, Grand Island NY) suplementado con: penicilina 10 U/ml, estreptomycin 10 µg/ml, L-glutamina 0.2 mM, 2-mercaptoetanol 0.1%, aminoácidos esenciales (Flor Laboratorios, Irving) 1%, suero fetal bovino 10% [En un frasco estéril se agregan con una pipeta de 10 ml 90 ml de medio RPMI 1640 con 10 ml de suero fetal bovino, más 100 µl de aminoácidos esenciales, 100 µl de 2-Me y 100 µl de penicilina/estreptomycin (para evitar contaminación) y se mezcló, etiquetando como RPMI completo].

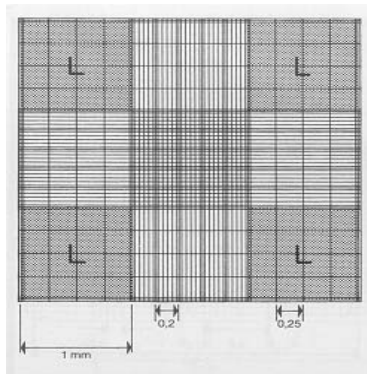
- **KNO₂** (Sigma Chemical, St Louis MO). Solución Stock 100 mM, a partir de esta se preparó la curva estándar.
- **Albúmina sérica bovina** (Sigma Chemical, St Louis MO) Se preparó una solución stock de 1 mg/ml en agua milli Q, a partir de la cual se preparó la curva estándar.
- **Cámara de Neubauer (Brand) o Hematocitómetro.** Consta de un portaobjetos de vidrio grueso con la superficie esculpida de prismas paralelos; existen dos prismas idénticos separados por un surco transversal, lo cual permite colocar dos muestras al mismo tiempo sin posibilidad de mezcla. Los laterales están elevados con respecto al centro, de forma que al colocar un cubre aparece un espacio entre el centro y el cubre que supone la altura de la cámara (0.1 mm). Existen 9 cuadros grandes de 1 mm² de superficie. Los eritrocitos se cuentan en el cuadro central, que a su vez está dividido en 16 cuadrillos con otros 25 cuadrillos cada uno. Por tanto, cada cuadrillo pequeño presenta una superficie de 1/400 mm²



Tiene dos cámaras de conteo: Detalle de la cámara de conteo, con cuatro áreas de 1 mm² (marcadas con L). La cámara de Neubauer es una cámara de conteo adaptada al microscopio de campo claro o al de contraste de fases. Se trata de un portaobjetos con una depresión en el centro, en el fondo de la cual se ha marcado con la ayuda de un

diamante una cuadrícula como la que se ve en la imagen. Es un cuadrado de 3 x 3 mm, con una separación entre dos líneas consecutivas de 0.25 mm. Así pues el área sombreada y marcada L corresponde a 1 mm². La depresión central del cubreobjetos está hundida 0.1 mm respecto a la superficie, de forma que cuando se cubre con un cubreobjetos éste dista de la superficie marcada 0.1 mm, y el volumen comprendido entre la superficie L y el cubreobjetos es de 0.1 mm³, es decir 0.1 µl. El número de células contadas se encuentra en 0.1 mm³, ya que los cuadros tienen 1 mm² de superficie y la altura hasta el cubreobjetos es de 0.1 mm.

Detalle de una de las áreas de conteo, tal como se ve con el microscopio de contraste de fases. El área recuadrada en rojo es un cuadrado de 1 mm de lado.



Si contamos las cuatro áreas sombreadas (L) observando un total de x células entre las cuatro áreas (deben contarse las células que están sobre las líneas superior e izquierda de la cámara) la concentración en la

suspensión celular por mililitro se realiza mediante los cálculos siguientes:

$$\text{Número de células contadas} \times 10 = \text{número de células/mm}^3$$

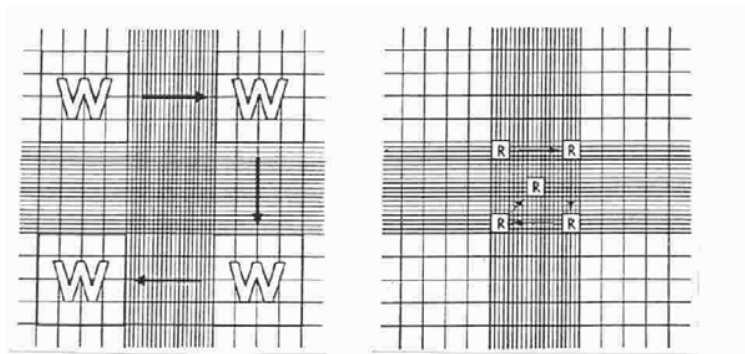
$$\text{Número de células/mm}^3 \times 1000 = \text{número de células/ml en la dilución correspondiente}$$

$$\text{Número de células/ml} \times \text{dilución correspondiente} = \text{número de células/ml}$$

$$\text{Concentración en la suspensión celular (células / mL)} = \text{Número de células contadas} \times 10,000 \times \text{dilución}$$

En la siguiente imagen se observa el aspecto de una de las regiones marcadas como L y que en el microscopio se ven como una cuadrícula de 16 pequeños cuadrados de 0.25 mm de lado. Esta imagen ha sido tomada empleando un microscopio invertido de contraste de fases.

En la siguiente figura se muestra el procedimiento de conteo:



Se cuentan los cuatro cuadrantes (4 mm^2) señalados con la letra W.

En la imagen se representan células vivas como puntos blancos y células muertas (teñidas con azul de tripano, es un coloide que se introduce en

el interior de las células que presentan roturas en la membrana) como puntos azules. Corresponde a una de las áreas de conteo de la cámara de Neubauer (1 mm²). El número de puntos blancos en la zona de conteo es de 35 y el de azules de 16. El criterio de inclusión ha sido: están dentro del área y por eso se cuentan los que evidentemente estén dentro además de aquellas que toquen la línea superior o la derecha pero no la inferior o la izquierda.

- **Solución de Hank's**

Glucosa	1.0 g
Cloruro de sodio	8.0 g
Cloruro de potasio	0.4 g
Cloruro de calcio	0.14 g
Sulfato de magnesio	0.1 g
Cloruro de magnesio	0.1 g
Fosfato monopotásico	0.06 g
Fosfato disódico	0.06 g
Bicarbonato de sodio	0.35 g
Rojo de fenol	0.02 g
Agua destilada	Aforar a 1 L

- **Solución de ácido fenol disulfónico**

Calentar 6 g de fenol con 37 ml de ácido sulfúrico concentrado, en un baño de vapor hasta disolución total, enfriar y agregar 3 ml de agua.

- **Solución patrón de nitrato de sodio**

Disolver 1 g de nitrato de sodio puro y seco en agua, diluir a 1 litro. Evaporar 10 ml de esta solución a sequedad en baño de vapor, agregar 2 ml de ácido fenol disulfónico y mezclar rápida y perfectamente con la ayuda de un agitador de vidrio. Calentar cerca de 1 minuto en baño de vapor y diluir con agua a 100 ml (1 ml = 0.1 g de NaNO₃).

- **Reactivo de Griess**

- a) Disolver 0.1 g de ácido sulfanílico en 30 ml de ácido acético glacial y 120 ml de agua destilada. Filtrar si es necesario (refrigerar).
- b) Disolver 0.5 g de alfa-naftilamina (Naftilamina 1) en 120 ml de agua destilada, enfriar, agregar 30 ml de ácido acético glacial y filtrar (guardar en refrigeración). Si cualquiera de las soluciones se torna colorida, agitar con 0.5 g de zinc en polvo y filtrar. Mezclar ambas soluciones y guardar en frasco ámbar.

- **Solución patrón de nitrito de sodio**

Pesar 0.5 g de NaNO_2 puro, disolver en un litro de agua, libre de nitritos.

Diluir 10 ml de esta solución a un litro con agua destilada (1 ml = 0.005 mg de NaNO_2).

ANEXO No. 2

PROMEDIO EN PESO DE CABRAS

No. Animal	Peso (kg)
8	47.62
5	58.96
13	56.69
14	52.16
2	54.43
26	49.89
39	61.23
36	52.16
21	56.69
34	49.89
20	58.96
3	47.62
total	646.3
promedio	53.8583333

ANEXO No. 3

DETERMINACION DE INTERMEDIARIOS DE NITROGENO REACTIVO (RNI)

CONTROL
DIA CERO

PRIMER MUESTREO (MACRÓFAGOS)
DO $\mu\text{mol/l}$

	8	NITRITO (NO2)	0.162	13.8461538
		NITRATO (NO3)	0.315	26.9230769
	5	NITRITO (NO2)	0.338	28.8888889
		NITRATO (NO3)	0.469	40.0854701
	13	NITRITO (NO2)	0.232	19.8290598
		NITRATO (NO3)	0.593	50.6837607
VACUNA BCG				
	14	NITRITO (NO2)	0.175	14.957265
		NITRATO (NO3)	0.329	28.1196581
	2	NITRITO (NO2)	0.186	15.8974359
		NITRATO (NO3)	0.443	37.8632479
	26	NITRITO (NO2)	0.217	18.5470085
		NITRATO (NO3)	0.543	46.4102564
1,25(OH)2D3				
	39	NITRITO (NO2)	0.167	14.2735043
		NITRATO (NO3)	0.299	25.5555556
	36	NITRITO (NO2)	0.164	14.017094
		NITRATO (NO3)	0.332	28.3760684
	21	NITRITO (NO2)	0.21	17.9487179
		NITRATO (NO3)	0.328	28.034188
VACUNA BCG + 1,25(OH)2D3				
	34	NITRITO (NO2)	0.161	13.7606838
		NITRATO (NO3)	0.234	20
	20	NITRITO (NO2)	0.312	26.6666667
		NITRATO (NO3)	0.358	30.5982906
	3	NITRITO (NO2)	0.205	17.5213675
		NITRATO (NO3)	0.396	33.8461538

DETERMINACION DE INTERMEDIARIOS DE NITROGENO REACTIVO
(RNI)

CONTROL DIA TRES	SEGUNDO MUESTREO (MACRÓFAGOS)				
	DO	μmol/l			
CONTROL DIA TRES	8	NITRITO (NO ₂) 0.15 NITRATO (NO ₃) 0.388	12.8205128 33.1623932		
	5	NITRITO (NO ₂) 0.179 NITRATO (NO ₃) 0.256	15.2991453 21.8803419		
	13	NITRITO (NO ₂) 0.092 NITRATO (NO ₃) 0.273	7.86324786 23.3333333		
	VACUNA BCG	14	NITRITO (NO ₂) 0.258 NITRATO (NO ₃) 0.13	22.0512821 11.1111111	
		2	NITRITO (NO ₂) 0.289 NITRATO (NO ₃) 0.327	24.7008547 27.9487179	
		26	NITRITO (NO ₂) 0.361 NITRATO (NO ₃) 0.168	30.8547009 14.3589744	
		1,25(OH)2D3	39	NITRITO (NO ₂) 0.171 NITRATO (NO ₃) 0.232	14.6153846 19.8290598
			36	NITRITO (NO ₂) 0.201 NITRATO (NO ₃) 0.297	17.1794872 25.3846154
			21	NITRITO (NO ₂) 0.118 NITRATO (NO ₃) 0.207	10.0854701 17.6923077
	VACUNA BCG + 1,25(OH)2D3		34	NITRITO (NO ₂) 0.11 NITRATO (NO ₃) 0.203	9.4017094 17.3504274
		20			

NITRITO (NO2)	0.132	11.2820513
NITRATO (NO3)	0.183	15.6410256

3

NITRITO (NO2)	0.203	17.3504274
NITRATO (NO3)	0.19	16.2393162

DETERMINACION DE INTERMEDIARIOS DE NITROGENO REACTIVO (RNI)

CONTROL DIA SIETE	TERCER MUESTREO (MACRÓFAGOS)		
	DO	μmol/l	
8	NITRITO (NO2)	0.186 15.8974359	
	NITRATO (NO3)	0.333 28.4615385	
5	NITRITO (NO2)	0.2 17.0940171	
	NITRATO (NO3)	0.298 25.4700855	
13	NITRITO (NO2)	0.242 20.6837607	
	NITRATO (NO3)	0.391 33.4188034	
VACUNA BCG	14	NITRITO (NO2)	0.216 18.4615385
		NITRATO (NO3)	0.386 32.991453
2	26	NITRITO (NO2)	0.232 19.8290598
		NITRATO (NO3)	0.294 25.1282051
1,25(OH)2D3	39	NITRITO (NO2)	0.258 22.0512821
		NITRATO (NO3)	0.211 18.034188
39	36	NITRITO (NO2)	0.148 12.6495726
		NITRATO (NO3)	0.212 18.1196581
36	21	NITRITO (NO2)	0.413 35.2991453
		NITRATO (NO3)	0.302 25.8119658
21		NITRITO (NO2)	0.267 22.8205128
		NITRATO (NO3)	0.326 27.8632479

VACUNA BCG + 1,25(OH)2D3

34	NITRITO (NO2)	0.204	17.4358974
	NITRATO (NO3)	0.276	23.5897436
20	NITRITO (NO2)	0.236	20.1709402
	NITRATO (NO3)	0.268	22.9059829
3	NITRITO (NO2)	0.285	24.3589744
	NITRATO (NO3)	0.318	27.1794872

DETERMINACION DE INTERMEDIARIOS DE NITROGENO REACTIVO (RNI)

CONTROL DIA CATORCE		CUARTO MUESTREO (MACRÓFAGOS)	
		DO	μmol/l
8	NITRITO (NO2)	0.33	28.2051282
	NITRATO (NO3)	0.469	40.0854701
5	NITRITO (NO2)	0.391	33.4188034
	NITRATO (NO3)	0.443	37.8632479
13	NITRITO (NO2)	0.269	22.991453
	NITRATO (NO3)	0.443	37.8632479

VACUNA BCG

14	NITRITO (NO2)	0.214	18.2905983
	NITRATO (NO3)	0.346	29.5726496
2	NITRITO (NO2)	0.239	20.4273504
	NITRATO (NO3)	0.347	29.6581197
26	NITRITO (NO2)	0.228	19.4871795
	NITRATO (NO3)	0.301	25.7264957

1,25(OH)2D3

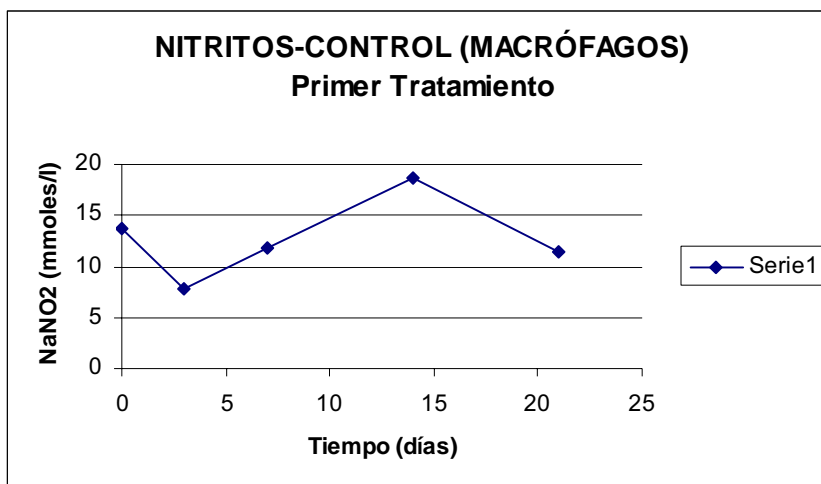
39	NITRITO (NO2)	0.198	16.9230769
	NITRATO (NO3)	0.271	23.1623932
36	NITRITO (NO2)	0.259	22.1367521
	NITRATO (NO3)	0.406	34.7008547

	21	NITRITO (NO ₂)	0.28	23.9316239
		NITRATO (NO ₃)	0.689	58.8888889
VACUNA BCG + 1,25(OH)2D3				
	34	NITRITO (NO ₂)	0.227	19.4017094
		NITRATO (NO ₃)	0.377	32.2222222
	20	NITRITO (NO ₂)	0.206	17.6068376
		NITRATO (NO ₃)	0.348	29.7435897
	3	NITRITO (NO ₂)	0.186	15.8974359
		NITRATO (NO ₃)	0.357	30.5128205
DETERMINACION DE INTERMEDIARIOS DE NITROGENO REACTIVO (RNI)				
CONTROL DIA VEINTIUNO				
QUINTO MUESTREO (MACRÓFAGOS)				
			DO	μmol/l
	8	NITRITO (NO ₂)	0.14	11.965812
		NITRATO (NO ₃)	0.447	38.2051282
	5	NITRITO (NO ₂)	0.146	12.4786325
		NITRATO (NO ₃)	0.298	25.4700855
	13	NITRITO (NO ₂)	0.318	27.1794872
		NITRATO (NO ₃)	0.538	45.982906
VACUNA BCG				
	14	NITRITO (NO ₂)	0.213	18.2051282
		NITRATO (NO ₃)	0.75	64.1025641
	2	NITRITO (NO ₂)	0.264	22.5641026
		NITRATO (NO ₃)	0.865	73.9316239
	26	NITRITO (NO ₂)	0.109	9.31623932
		NITRATO (NO ₃)	0.642	54.8717949
1,25(OH)2D3				
	39			

	NITRITO (NO ₂)	0.269	22.991453
	NITRATO (NO ₃)	0.478	40.8547009
36			
	NITRITO (NO ₂)	0.392	33.5042735
	NITRATO (NO ₃)	0.99	84.6153846
21			
	NITRITO (NO ₂)	0.23	19.6581197
	NITRATO (NO ₃)	0.546	46.6666667
VACUNA BCG + 1,25(OH)2D3			
34			
	NITRITO (NO ₂)	0.333	28.4615385
	NITRATO (NO ₃)	1.106	94.5299145
20			
	NITRITO (NO ₂)	0.285	24.3589744
	NITRATO (NO ₃)	0.982	83.9316239
3			
	NITRITO (NO ₂)	0.376	32.1367521
	NITRATO (NO ₃)	0.753	64.3589744

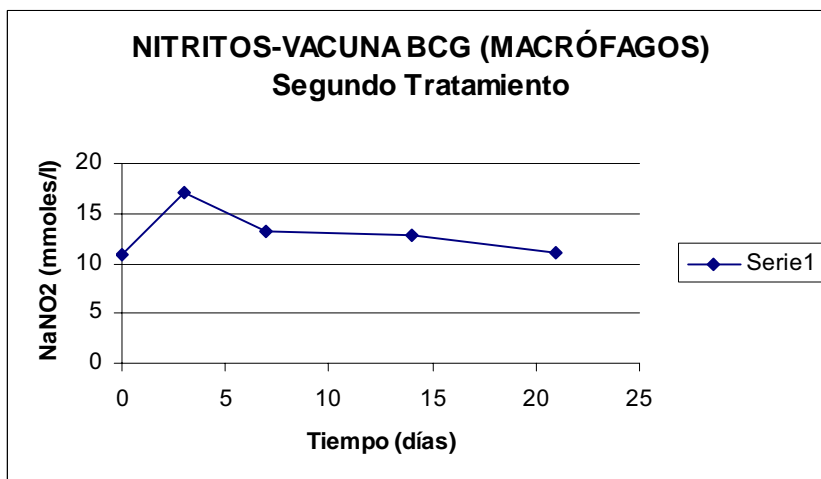
ANEXO No. 4

Primer Tratamiento/TIEMPO	MACRÓFAGOS		Densidad Óptica 540 nm	
	DO (Promedio)	μmol/l	TIEMPO (días)	μmol/l
NITRITOS	0.244	13.7853107	0	13.78
CONTROL	0.140333333	7.90960452	3	7.9
No. Animales	0.209333333	11.8079096	7	11.8
8, 5, 13	0.33	18.6440678	14	18.64
	0.201333333	11.3559322	21	11.35



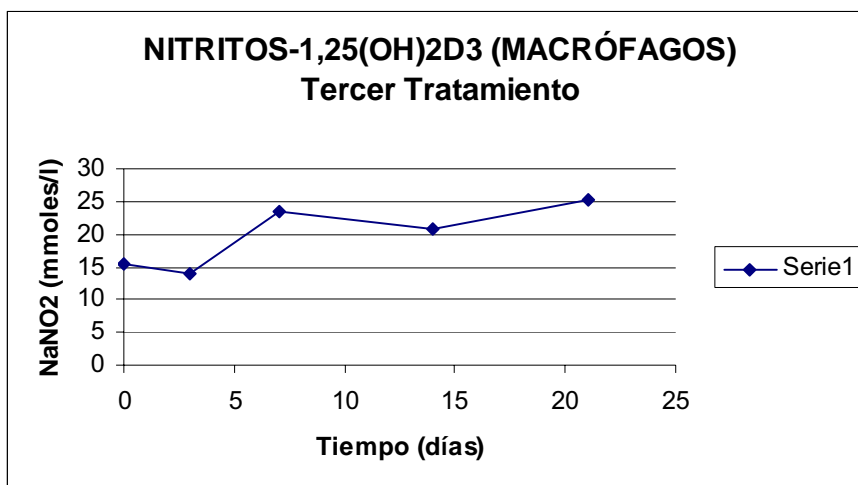
Segundo Tratamiento

NITRITOS	DO (Promedio)	$\mu\text{mol/l}$	TIEMPO (días)	$\mu\text{mol/l}$
VACUNA BCG	0.192666667	10.8474576	0	10.84
No. Animales	0.302666667	17.0621469	3	17.06
14, 2, 26	0.235333333	13.2768362	7	13.27
	0.227	12.8248588	14	12.82
	0.195333333	11.0169492	21	11.01



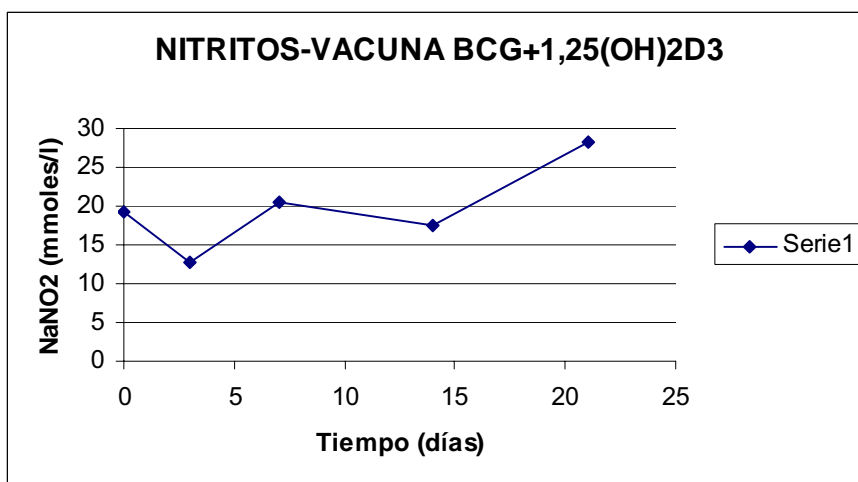
Tercer Tratamiento

NITRITOS	DO (Promedio)	$\mu\text{mol/l}$	TIEMPO (días)	$\mu\text{mol/l}$
1,25(OH)2D3	0.180333333	15.3846154	0	15.38
No. Animales	0.163333333	13.9316239	3	13.93
39, 36, 21	0.276	23.5897436	7	23.58
	0.245666667	20.9401709	14	20.94
	0.297	25.3846154	21	25.38



Cuarto Tratamiento

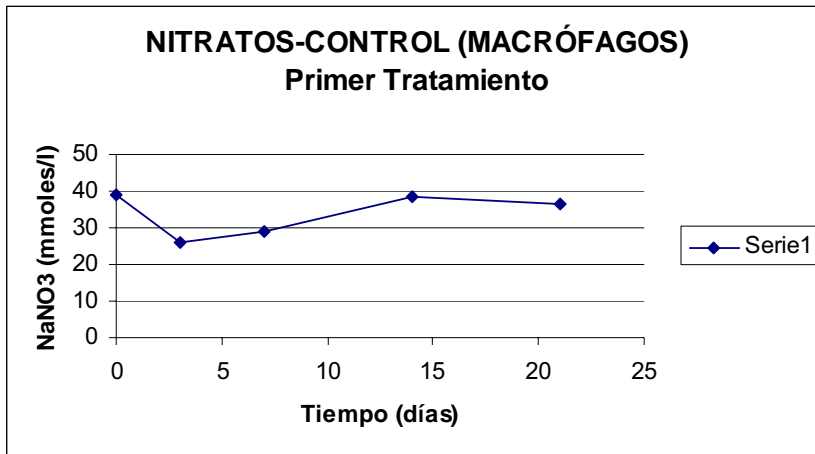
NITRITOS VACUNA BCG+1,25(OH)2D3 No. Animales 34, 20, 3	DO (Promedio)	$\mu\text{mol/l}$	TIEMPO (días)	$\mu\text{mol/l}$
	0.226	19.3162393	0	19.31
	0.148333333	12.6495726	3	12.64
	0.241666667	20.5982906	7	20.59
	0.206333333	17.6068376	14	17.6
	0.331333333	28.2905983	21	28.29



MACRÓFAGOS Densidad Óptica 540 nm

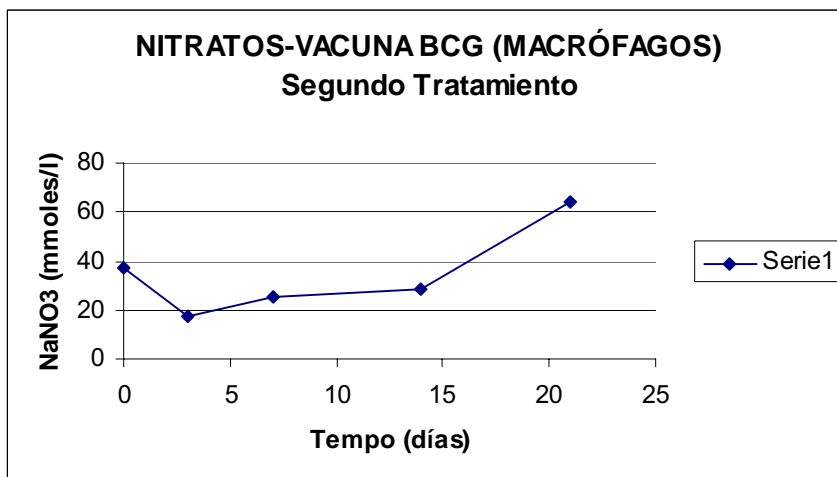
Primer Tratamiento/TIEMPO

NITRATOS	DO (Promedio)	$\mu\text{mol/l}$	TIEMPO (días)	$\mu\text{mol/l}$
CONTROL	0.459	39.2307692	0	39.23
No. Animales	0.305666667	26.0683761	3	26.06
8, 5, 13	0.340666667	29.0598291	7	29.05
	0.451666667	38.5470085	14	38.54
	0.427666667	36.4957265	21	36.49



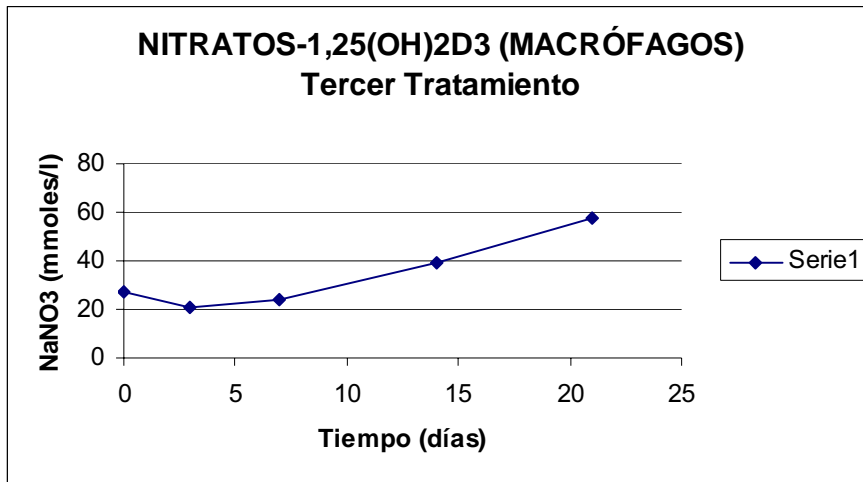
Segundo Tratamiento

NITRATOS	DO (Promedio)	$\mu\text{mol/l}$	TIEMPO (días)	$\mu\text{mol/l}$
VACUNA BCG	0.438333333	37.4358974	0	37.43
No. Animales	0.208333333	17.7777778	3	17.77
14, 2, 26	0.297	25.3846154	7	25.38
	0.331333333	28.2905983	14	28.29
	0.752333333	64.2735043	21	64.27



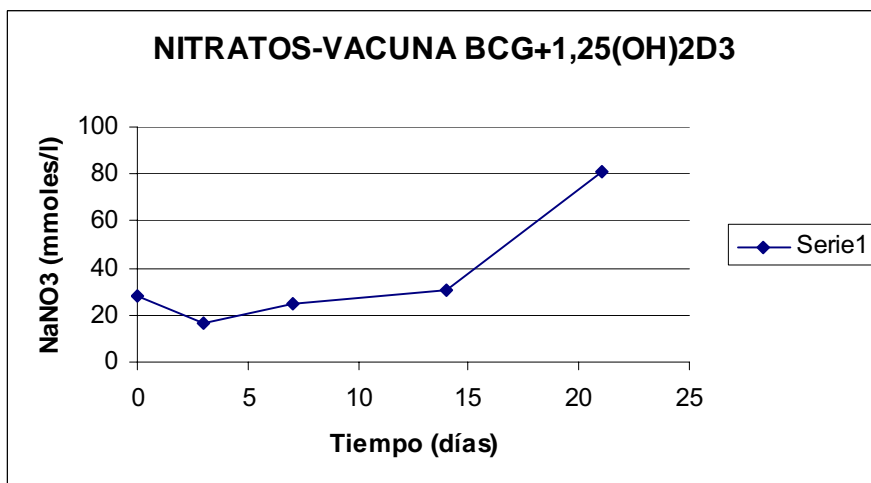
Tercer Tratamiento

NITRATOS	DO (Promedio) $\mu\text{mol/l}$	TIEMPO (días) $\mu\text{mol/l}$
1,25(OH)2D3	0.319666667	27.2649573
No. Animales	0.245333333	20.9401709
39, 36, 21	0.28	23.9316239
	0.455333333	38.8888889
	0.671333333	57.3504274



Cuarto Tratamiento

NITRATOS	DO (Promedio) $\mu\text{mol/l}$	TIEMPO (días) $\mu\text{mol/l}$
VACUNA		
BCG+1,25(OH)2D3	0.329333333	28.1196581
No. Animales	0.192	16.4102564
34, 20, 3	0.287333333	24.5299145
	0.360666667	30.7692308
	0.947	80.9401709



ANEXO No. 5

Obs ni tramm	trata	cabra	pi ni ci al	peri odo	ni tri do	ni tri mm	ni trado
1	control	8	47.62	0	0.162	13.8462	0.315
26.9231	control	5	58.96	0	0.338	28.8889	0.469
2	control	13	56.69	0	0.232	19.8291	0.593
40.0855	BCG	14	52.16	0	0.175	14.9573	0.329
3	BCG	2	54.43	0	0.186	15.8974	0.443
50.6838	BCG	26	49.89	0	0.217	18.5470	0.543
28.1197	vi tad	39	61.23	0	0.167	14.2735	0.299
5	vi tad	36	52.16	0	0.164	14.0171	0.332
37.8632	vi tad	21	56.69	0	0.210	17.9487	0.328
6	combi na	34	49.89	0	0.161	13.7607	0.234
46.4103	combi na	20	58.96	0	0.312	26.6667	0.358
7	combi na	3	47.62	0	0.205	17.5214	0.396
25.5556	control	8	47.62	3	0.150	12.8205	0.388
28.3761	control	5	58.96	3	0.179	15.2991	0.256
8	control	13	56.69	3	0.092	7.8632	0.273
28.0342	BCG	14	52.16	3	0.258	22.0513	0.130
9	BCG	2	54.43	3	0.289	24.7009	0.327
28.0342	BCG	26	49.89	3	0.361	30.8547	0.168
10	vi tad	39	61.23	3	0.171	14.6154	0.232
20.0000	vi tad	36	52.16	3	0.201	17.1795	0.297
11	vi tad	21	56.69	3	0.118	10.0855	0.207
30.5983	combi na	34	49.89	3	0.110	9.4017	0.203
12	combi na	20	58.96	3	0.132	11.2821	0.183
33.8462	combi na	3	47.62	3	0.203	17.3504	0.190
13	control	8	47.62	7	0.186	15.8974	0.333
33.1624	control	5	58.96	7	0.200	17.0940	0.298
14	control	13	56.69	7	0.242	20.6838	0.391
21.8803	BCG	14	52.16	7	0.216	18.4615	0.386
15	BCG	2	54.43	7	0.232	19.8291	0.294
23.3333	BCG	26	49.89	7	0.258	22.0513	0.211
16	vi tad	39	61.23	7	0.148	12.6496	0.212
11.1111	vi tad	36	52.16	7	0.413	35.2991	0.302
27.9487	vi tad	21	56.69	7	0.267	22.8205	0.326
14.3590	combi na	34	49.89	7	0.204	17.4359	0.276
19.8291	combi na	20	58.96	7	0.236	20.1709	0.268
25.3846	combi na	3	47.62	7	0.285	24.3590	0.318
17	control	8	47.62	14	0.330	28.2051	0.469
17.6923	control	5	58.96	14	0.391	33.4188	0.443
22							
17.3504							
15.6410							
16.2393							
28.4615							
25.4701							
33.4188							
32.9915							
25.1282							
18.0342							
18.1197							
25.8120							
27.8632							
23.5897							
22.9060							
27.1795							
40.0855							
38							

37. 8632							
39	control	13	56. 69	14	0. 269	22. 9915	0. 443
37. 8632							
40	BCG	14	52. 16	14	0. 214	18. 2906	0. 346
29. 5726							
41	BCG	2	54. 43	14	0. 239	20. 4274	0. 347
29. 6581							
42	BCG	26	49. 89	14	0. 228	19. 4872	0. 301
25. 7265							
43	vi tad	39	61. 23	14	0. 198	16. 9231	0. 271
23. 1624							
44	vi tad	36	52. 16	14	0. 259	22. 1368	0. 406
34. 7009							
45	vi tad	21	56. 69	14	0. 280	23. 9316	0. 689
58. 8889							
46	combi na	34	49. 89	14	0. 227	19. 4017	0. 377
32. 2222							
47	combi na	20	58. 96	14	0. 206	17. 6068	0. 348
29. 7436							
48	combi na	3	47. 62	14	0. 186	15. 8974	0. 357
30. 5128							
49	control	8	47. 62	21	0. 140	11. 9658	0. 447
38. 2051							
50	control	5	58. 96	21	0. 146	12. 4786	0. 298
25. 4701							
51	control	13	56. 69	21	0. 318	27. 1795	0. 538
45. 9829							
52	BCG	14	52. 16	21	0. 213	18. 2051	0. 750
64. 1026							
53	BCG	2	54. 43	21	0. 264	22. 5641	0. 865
73. 9316							
54	BCG	26	49. 89	21	0. 109	9. 3162	0. 642
54. 8718							
55	vi tad	39	61. 23	21	0. 269	22. 9915	0. 478
40. 8547							
56	vi tad	36	52. 16	21	0. 392	33. 5043	0. 990
84. 6154							
57	vi tad	21	56. 69	21	0. 230	19. 6581	0. 546
46. 6667							
58	combi na	34	49. 89	21	0. 333	28. 4615	1. 106
94. 5299							
59	combi na	20	58. 96	21	0. 285	24. 3590	0. 982
83. 9316							
60	combi na	3	47. 62	21	0. 376	32. 1368	0. 753
64. 3590							

2004 3

Sistema SAS

11: 43 Tuesday, March 16,

Procedi mi ento Mi xed

Model I nformati on

Conj. datos	WORK. CABRA
Vari able dependi ente	ni tri do
Estructura de covari anza	Variance Components
Método de estimaci ón	REML
Método de varianza del residual	Perfil
Método SE de efectos fijos	Basado en el modelo
Método de grados de libertad	Contenci ón

I nformaci ón de nivel de cl ase

Cl ass	Level s	Val ues
trata	4	BCG combi na control vi tad
cabra	12	13 14 2 20 21 26 3 34 36 39 5
peri odo	5	8 0 3 7 14 21

Di mensi ons

Parámetros de covari anza	2
Columnas en X	31
Columnas en Z	12
Asuntos	1

Obs máx por asunto 60
 Observaciones utilizadas 60
 Observaciones no utilizadas 0
 Observaciones totales 60

Iteration History

Iteration	Evaluations	-2 Res Log Like	Criterion
0	1	-76.72363359	
1	1	-77.34109109	0.00000000

Se ha cumplido el criterio de convergencia.

2004 4

Sistema SAS

11:43 Tuesday, March 16,

Procedimiento Mixed

Estimadores de parámetro de covarianza

Cov Parm	Estimador
cabra(trata)	0.000396
Residual	0.003551

Fit Statistics

Verosimilitud -2 Res Log	-77.3
AIC (mejor más pequeño)	-73.3
AICC (mejor más pequeño)	-73.0
BIC (mejor más pequeño)	-72.4

Type 3 Tests of Fixed Effects

Effect	Num DF	Den DF	F-Valor	Pr > F
trata	3	7	0.03	0.9917
periodo	4	32	2.85	0.0397
trata*periodo	12	32	3.18	0.0044
pi nicial	1	32	0.03	0.8543

Least Squares Means

Effect	trata	periodo	Estimador	Error estándar	DF	Valor t	Pr
> t							
trata	BCG		0.2299	0.01962	7	11.71	
<.0001							
trata	combi na		0.2300	0.01962	7	11.72	
<.0001							
trata	control		0.2252	0.01925	7	11.70	
<.0001							
trata	vi tad		0.2337	0.02035	7	11.48	
<.0001							
periodo		0	0.2108	0.01814	32	11.62	
<.0001							
periodo		3	0.1887	0.01814	32	10.40	
<.0001							
periodo		7	0.2406	0.01814	32	13.27	
<.0001							
periodo		14	0.2523	0.01814	32	13.91	
<.0001							
periodo		21	0.2563	0.01814	32	14.13	
<.0001							
trata*periodo	BCG	0	0.1919	0.03650	32	5.26	
<.0001							
trata*periodo	BCG	3	0.3019	0.03650	32	8.27	
<.0001							
trata*periodo	BCG	7	0.2346	0.03650	32	6.43	
<.0001							

trata*perio	BCG	14	0.2263	0.03650	32	6.20
<.0001						
trata*perio	BCG	21	0.1946	0.03650	32	5.33
<.0001						
trata*perio	combi	0	0.2253	0.03650	32	6.17
<.0001						
trata*perio	combi	3	0.1476	0.03650	32	4.04
0.0003						
trata*perio	combi	7	0.2409	0.03650	32	6.60
<.0001						

2004 5 Sistema SAS 11:43 Tuesday, March 16,

Procedimiento Mixed

Least Squares Means

Effect	trata	perio	Estimador	Error estándar	DF	Valor t	Pr
> t							
trata*perio	combi	14	0.2056	0.03650	32	5.63	
<.0001							
trata*perio	combi	21	0.3306	0.03650	32	9.06	
<.0001							
trata*perio	control	0	0.2442	0.03630	32	6.73	
<.0001							
trata*perio	control	3	0.1406	0.03630	32	3.87	
0.0005							
trata*perio	control	7	0.2096	0.03630	32	5.77	
<.0001							
trata*perio	control	14	0.3302	0.03630	32	9.10	
<.0001							
trata*perio	control	21	0.2016	0.03630	32	5.55	
<.0001							
trata*perio	vi	0	0.1816	0.03689	32	4.92	
<.0001							
trata*perio	vi	3	0.1646	0.03689	32	4.46	
<.0001							
trata*perio	vi	7	0.2772	0.03689	32	7.51	
<.0001							
trata*perio	vi	14	0.2469	0.03689	32	6.69	
<.0001							
trata*perio	vi	21	0.2982	0.03689	32	8.08	
<.0001							

2004 6 Sistema SAS 11:43 Tuesday, March 16,

Procedimiento Mixed

Model Information

Conj. datos	WORK.CABRA
Variable dependiente	nitrim
Estructura de covarianza	Variance Components
Método de estimación	REML
Método de varianza del residual	Perfil
Método SE de efectos fijos	Basado en el modelo
Método de grados de libertad	Contención

Información de nivel de clase

Class	Level s	Val ues
trata	4	BCG combi control vi
cabra	12	13 14 2 20 21 26 3 34 36 39 5
		8
perio	5	0 3 7 14 21

Dimensi ons

Parámetros de covari anza	2
Columnas en X	31
Columnas en Z	12

Asuntos	1
Obs máx por asunto	60
Observaciones utilizadas	60
Observaciones no utilizadas	0
Observaciones totales	60

Iteration History

Iteration	Evaluations	-2 Res Log Like	Criterion
0	1	270.23334850	
1	1	269.61589100	0.00000000

Se ha cumplido el criterio de convergencia.

2004 7

Sistema SAS

11:43 Tuesday, March 16,

Procedimiento Mixed

Estimadores de parámetro
de covarianza

Cov Parm	Estimador
cabra(trata)	2.8918
Residual	25.9435

Fit Statistics

Verosimilitud -2 Res Log	269.6
AIC (mejor más pequeño)	273.6
AICC (mejor más pequeño)	273.9
BIC (mejor más pequeño)	274.6

Type 3 Tests of Fixed Effects

Effect	Num DF	Den DF	F-Valor	Pr > F
trata	3	7	0.03	0.9917
periodo	4	32	2.85	0.0397
trata*periodo	12	32	3.18	0.0044
pi nicial	1	32	0.03	0.8543

Least Squares Means

Effect	trata	periodo	Estimador	Error estándar	DF	Valor t	Pr
> t							
<.0001	BCG		19.6455	1.6771	7	11.71	
<.0001	combi na		19.6567	1.6773	7	11.72	
<.0001	control		19.2520	1.6452	7	11.70	
<.0001	vi tad		19.9757	1.7395	7	11.48	
<.0001		0	18.0128	1.5501	32	11.62	
<.0001		3	16.1254	1.5501	32	10.40	
<.0001		7	20.5627	1.5501	32	13.27	
<.0001		14	21.5598	1.5501	32	13.91	
<.0001		21	21.9017	1.5501	32	14.13	
<.0001	BCG	0	16.4033	3.1195	32	5.26	
<.0001	BCG	3	25.8050	3.1195	32	8.27	
<.0001	BCG	7	20.0500	3.1195	32	6.43	

<.0001	trata*perio	BCG	14	19.3378	3.1195	32	6.20
<.0001	trata*perio	BCG	21	16.6312	3.1195	32	5.33
<.0001	trata*perio	combi na	0	19.2522	3.1195	32	6.17
<.0001	trata*perio	combi na	3	12.6140	3.1195	32	4.04
0.0003	trata*perio	combi na	7	20.5912	3.1195	32	6.60
<.0001							

2004 8 Sistema SAS 11:43 Tuesday, March 16,

Procedi mi ento Mi xed

Least Squares Means

Effect	trata	perio do	Esti mador	Error estándar	DF	Val or t	Pr
> t							
trata*perio	combi na	14	17.5713	3.1195	32	5.63	
<.0001							
trata*perio	combi na	21	28.2550	3.1195	32	9.06	
<.0001							
trata*perio	control	0	20.8760	3.1024	32	6.73	
<.0001							
trata*perio	control	3	12.0156	3.1024	32	3.87	
0.0005							
trata*perio	control	7	17.9130	3.1024	32	5.77	
<.0001							
trata*perio	control	14	28.2264	3.1024	32	9.10	
<.0001							
trata*perio	control	21	17.2292	3.1024	32	5.55	
<.0001							
trata*perio	vi tad	0	15.5198	3.1534	32	4.92	
<.0001							
trata*perio	vi tad	3	14.0668	3.1534	32	4.46	
<.0001							
trata*perio	vi tad	7	23.6965	3.1534	32	7.51	
<.0001							
trata*perio	vi tad	14	21.1039	3.1534	32	6.69	
<.0001							
trata*perio	vi tad	21	25.4913	3.1534	32	8.08	
<.0001							

2004 9 Sistema SAS 11:43 Tuesday, March 16,

Procedi mi ento Mi xed

Model I nformati on

Conj. datos	WORK.CABRA
Vari able dependi ente	ni trado
Estructura de covari anza	Variance Components
Método de estimaci ón	REML
Método de varianza del residual	Perfi l
Método SE de efectos fijos	Basado en el model o
Método de grados de libertad	Contenci ón

I nformaci ón de nivel de cl ase

Cl ass	Level s	Val ues
trata	4	BCG combi na control vi tad
cabra	12	13 14 2 20 21 26 3 34 36 39 5
perio do	5	8 0 3 7 14 21

Di mensi ons

Parámetros de covari anza	2
Columnas en X	31

Columnas en Z	12
Asuntos	1
Obs máx por asunto	60
Observaciones utilizadas	60
Observaciones no utilizadas	0
Observaciones totales	60

Iteration History

Iteration	Evaluations	-2 Res Log Like	Criterion
0	1	-30.29365085	
1	1	-30.53719756	0.00000000

Se ha cumplido el criterio de convergencia.

2004 10

Sistema SAS

11:43 Tuesday, March 16,

Procedimiento Mixed

Estimadores de parámetro de covarianza

Cov Parm	Estimador
cabra(trata)	0.000793
Residual	0.01214

Fit Statistics

Verosimilitud	-2 Res Log	-30.5
AIC (mejor más pequeño)		-26.5
AICC (mejor más pequeño)		-26.2
BIC (mejor más pequeño)		-25.6

Type 3 Tests of Fixed Effects

Effect	Num DF	Den DF	F-Valor	Pr > F
trata	3	7	0.08	0.9707
periodo	4	32	31.11	<.0001
trata*periodo	12	32	3.58	0.0019
inicial	1	32	0.44	0.5135

Least Squares Means

Effect	trata	periodo	Estimador	Error estándar	DF	Valor t	Pr
> t							
trata	BCG		0.4009	0.03348	7	11.97	
<.0001							
trata	combi na		0.4187	0.03348	7	12.50	
<.0001							
trata	control		0.3984	0.03284	7	12.13	
<.0001							
trata	vi tad		0.4019	0.03473	7	11.57	
<.0001							
periodo		0	0.3866	0.03282	32	11.78	
<.0001							
periodo		3	0.2378	0.03282	32	7.25	
<.0001							
periodo		7	0.3012	0.03282	32	9.18	
<.0001							
periodo		14	0.3997	0.03282	32	12.18	
<.0001							
periodo		21	0.6996	0.03282	32	21.31	
<.0001							
trata*periodo	BCG	0	0.4338	0.06601	32	6.57	
<.0001							
trata*periodo	BCG	3	0.2038	0.06601	32	3.09	
0.0042							

trata*perio	BCG	7	0.2924	0.06601	32	4.43
0.0001						
trata*perio	BCG	14	0.3268	0.06601	32	4.95
<.0001						
trata*perio	BCG	21	0.7478	0.06601	32	11.33
<.0001						
trata*perio	combi na	0	0.3248	0.06601	32	4.92
<.0001						
trata*perio	combi na	3	0.1874	0.06601	32	2.84
0.0078						
trata*perio	combi na	7	0.2828	0.06601	32	4.28
0.0002						

2004 11

Sistema SAS

11:43 Tuesday, March 16,

Procedi mi ento Mi xed

Least Squares Means

Effect	trata	perio do	Estimador	Error estándar	DF	Val or t	Pr
> t							
trata*perio	combi na	14	0.3561	0.06601	32	5.39	
<.0001							
trata*perio	combi na	21	0.9424	0.06601	32	14.28	
<.0001							
trata*perio	control	0	0.4605	0.06569	32	7.01	
<.0001							
trata*perio	control	3	0.3072	0.06569	32	4.68	
<.0001							
trata*perio	control	7	0.3422	0.06569	32	5.21	
<.0001							
trata*perio	control	14	0.4532	0.06569	32	6.90	
<.0001							
trata*perio	control	21	0.4292	0.06569	32	6.53	
<.0001							
trata*perio	vi tad	0	0.3273	0.06665	32	4.91	
<.0001							
trata*perio	vi tad	3	0.2529	0.06665	32	3.80	
0.0006							
trata*perio	vi tad	7	0.2876	0.06665	32	4.32	
0.0001							
trata*perio	vi tad	14	0.4629	0.06665	32	6.95	
<.0001							
trata*perio	vi tad	21	0.6789	0.06665	32	10.19	
<.0001							

2004 12

Sistema SAS

11:43 Tuesday, March 16,

Procedi mi ento Mi xed

Model I nformati on

Conj. datos	WORK.CABRA
Vari able dependi ente	ni tramm
Estructura de covari anza	Variance Components
Método de estimaci ón	REML
Método de vari anza del residual	Perfil
Método SE de efectos fijos	Basado en el modelo
Método de grados de libertad	Contenci ón

I nformaci ón de nivel de cl ase

Cl ass	Level s	Val ues
trata	4	BCG combi na control vi tad
cabra	12	13 14 2 20 21 26 3 34 36 39 5
perio do	5	8 0 3 7 14 21

Di mensi ons

Parámetros de covari anza 2

Columnas en X	31
Columnas en Z	12
Asuntos	1
Obs máx por asunto	60
Observaciones utilizadas	60
Observaciones no utilizadas	0
Observaciones totales	60

Iteration History

Iteration	Evaluations	-2 Res Log Like	Criterion
0	1	316.66333126	
1	1	316.41978455	0.00000000

Se ha cumplido el criterio de convergencia.

2004 13

Sistema SAS

11:43 Tuesday, March 16,

Procedimiento Mixed

Estimadores de parámetro de covarianza

Cov Parm	Estimador
cabra(trata)	5.7935
Residual	88.6577

Fit Statistics

Verosimilitud -2 Res Log	316.4
AIC (mejor más pequeño)	320.4
AICC (mejor más pequeño)	320.8
BIC (mejor más pequeño)	321.4

Type 3 Tests of Fixed Effects

Effect	Num DF	Den DF	F-Valor	Pr > F
trata	3	7	0.08	0.9707
periodo	4	32	31.11	<.0001
trata*periodo	12	32	3.58	0.0019
pi nicial	1	32	0.44	0.5135

Least Squares Means

Effect	trata	periodo	Estimador	Error estándar	DF	Valor t	Pr
> t							
<.0001	BCG		34.2659	2.8616	7	11.97	
<.0001	combi na		35.7865	2.8619	7	12.50	
<.0001	control		34.0554	2.8072	7	12.13	
<.0001	vi tad		34.3536	2.9680	7	11.57	
<.0001		0	33.0413	2.8055	32	11.78	
<.0001		3	20.3276	2.8055	32	7.25	
<.0001		7	25.7479	2.8055	32	9.18	
<.0001		14	34.1667	2.8055	32	12.18	
<.0001		21	59.7934	2.8055	32	21.31	
<.0001	BCG	0	37.0751	5.6419	32	6.57	
<.0001	BCG	3	17.4169	5.6419	32	3.09	

0.0042	trata*período	BCG	7	24.9953	5.6419	32	4.43
0.0001	trata*período	BCG	14	27.9298	5.6419	32	4.95
<.0001	trata*período	BCG	21	63.9127	5.6419	32	11.33
<.0001	trata*período	combi na	0	27.7580	5.6420	32	4.92
<.0001	trata*período	combi na	3	16.0202	5.6420	32	2.84
0.0078	trata*período	combi na	7	24.1683	5.6420	32	4.28
0.0002							

2004 14 Sistema SAS 11:43 Tuesday, March 16,

Procedi mi ento Mi xed

Least Squares Means

Effect	trata	período	Estimador	Error estándar	DF	Valor t	Pr
> t							
trata*período	combi na	14	30.4361	5.6420	32	5.39	
<.0001	trata*período	combi na	21	80.5501	5.6420	32	14.28
<.0001	trata*período	control	0	39.3603	5.6145	32	7.01
<.0001	trata*período	control	3	26.2549	5.6145	32	4.68
<.0001	trata*período	control	7	29.2463	5.6145	32	5.21
<.0001	trata*período	control	14	38.7335	5.6145	32	6.90
<.0001	trata*período	control	21	36.6822	5.6145	32	6.53
<.0001	trata*período	vi tad	0	27.9718	5.6966	32	4.91
<.0001	trata*período	vi tad	3	21.6186	5.6966	32	3.80
0.0006	trata*período	vi tad	7	24.5815	5.6966	32	4.32
0.0001	trata*período	vi tad	14	39.5673	5.6966	32	6.95
<.0001	trata*período	vi tad	21	58.0288	5.6966	32	10.19
<.0001							

ANEXO No. 6

NITRIMM

Effect	trat	período	Estimador	est'e1ndar	DF	Valor t	t
	trat	BCG	42.4501	1.9734	8	21.51	<.0001
	trat	COMBINA	37.2707	1.9734	8	18.89	<.0001
	trat	VITD	42.2393	1.9734	8	21.4	<.0001
	trat	control	25.6068	1.9734	8	12.98	<.0001
	período	0	28.8105	2.2064	32	13.06	<.0001
	período	3	32.8632	2.2064	32	14.89	<.0001
	período	7	28.9672	2.2064	32	13.13	<.0001
	período	14	32.8348	2.2064	32	14.88	<.0001
	período	21	60.9829	2.2064	32	27.64	<.0001
trat*período	BCG	0	27.9202	4.4128	32	6.33	<.0001
trat*período	BCG	3	29.4302	4.4128	32	6.67	<.0001
trat*período	BCG	7	38.0912	4.4128	32	8.63	<.0001
trat*período	BCG	14	41.2251	4.4128	32	9.34	<.0001
trat*período	BCG	21	75.584	4.4128	32	17.13	<.0001

trat*periodo	COMBINA	0	34.0456	4.4128	32	7.72	<.0001
trat*periodo	COMBINA	3	35.5271	4.4128	32	8.05	<.0001
trat*periodo	COMBINA	7	23.7607	4.4128	32	5.38	<.0001
trat*periodo	COMBINA	14	34.3875	4.4128	32	7.79	<.0001
trat*periodo	COMBINA	21	58.6325	4.4128	32	13.29	<.0001
trat*periodo	VITD	0	29.0883	4.4128	32	6.59	<.0001
trat*periodo	VITD	3	33.7607	4.4128	32	7.65	<.0001
trat*periodo	VITD	7	31.6524	4.4128	32	7.17	<.0001
trat*periodo	VITD	14	31.0826	4.4128	32	7.04	<.0001
trat*periodo	VITD	21	85.6125	4.4128	32	19.4	<.0001
trat*periodo	control	0	24.188	4.4128	32	5.48	<.0001
trat*periodo	control	3	32.735	4.4128	32	7.42	<.0001
trat*periodo	control	7	22.3647	4.4128	32	5.07	<.0001
trat*periodo	control	14	24.6439	4.4128	32	5.58	<.0001
trat*periodo	control	21	24.1026	4.4128	32	5.46	<.0001

nitrammLPS

Effect	trat	periodo	Estimador	est\`e1ndar	DF	Valor	t
	trat	BCG	69.8803	2.69	8	25.98	<.0001
	trat	COMBINA	68.4217	2.69	8	25.44	<.0001
	trat	VITD	70.8091	2.69	8	26.32	<.0001
	trat	control	44.1425	2.69	8	16.41	<.0001
	periodo	0	43.5897	3.0075	32	14.49	<.0001
	periodo	3	54.4801	3.0075	32	18.11	<.0001
	periodo	7	85.2208	3.0075	32	28.34	<.0001
	periodo	14	47.8348	3.0075	32	15.9	<.0001
	periodo	21	85.4416	3.0075	32	28.41	<.0001
trat*periodo	BCG	0	38.0912	6.0151	32	6.33	<.0001
trat*periodo	BCG	3	56.9801	6.0151	32	9.47	<.0001
trat*periodo	BCG	7	96.8091	6.0151	32	16.09	<.0001
trat*periodo	BCG	14	53.6752	6.0151	32	8.92	<.0001
trat*periodo	BCG	21	103.85	6.0151	32	17.26	<.0001
trat*periodo	COMBINA	0	47.151	6.0151	32	7.84	<.0001
trat*periodo	COMBINA	3	56.8091	6.0151	32	9.44	<.0001
trat*periodo	COMBINA	7	78.0912	6.0151	32	12.98	<.0001
trat*periodo	COMBINA	14	54.6154	6.0151	32	9.08	<.0001
trat*periodo	COMBINA	21	105.44	6.0151	32	17.53	<.0001
trat*periodo	VITD	0	47.4929	6.0151	32	7.9	<.0001
trat*periodo	VITD	3	57.2934	6.0151	32	9.52	<.0001
trat*periodo	VITD	7	104.39	6.0151	32	17.35	<.0001
trat*periodo	VITD	14	45.2137	6.0151	32	7.52	<.0001
trat*periodo	VITD	21	99.6581	6.0151	32	16.57	<.0001
trat*periodo	control	0	41.6239	6.0151	32	6.92	<.0001
trat*periodo	control	3	46.8376	6.0151	32	7.79	<.0001
trat*periodo	control	7	61.5954	6.0151	32	10.24	<.0001
trat*periodo	control	14	37.8348	6.0151	32	6.29	<.0001
trat*periodo	control	21	32.8205	6.0151	32	5.46	<.0001

ANEXO No. 7

Effect	TRAT	PERIODO	Estimador	EE	DF	Valor	t
	TRAT	BCG	0.32	0.03145	8	10.18	<.0001
	TRAT	COMBINA	0.3349	0.03145	8	10.65	<.0001
	TRAT	VITD	0.3253	0.03145	8	10.34	<.0001
	TRAT	control	0.3152	0.03145	8	10.02	<.0001
	PERIODO	0	0.308	0.02975	32	10.35	<.0001
	PERIODO	3	0.24	0.02975	32	8.07	<.0001
	PERIODO	7	0.2572	0.02975	32	8.64	<.0001
	PERIODO	14	0.3228	0.02975	32	10.85	<.0001
	PERIODO	21	0.4912	0.02975	32	16.51	<.0001
TRAT*PERIODO	BCG	0	0.3007	0.05951	32	5.05	<.0001
TRAT*PERIODO	BCG	3	0.2827	0.05951	32	4.75	<.0001
TRAT*PERIODO	BCG	7	0.2403	0.05951	32	4.04	
TRAT*PERIODO	BCG	14	0.311	0.05951	32	5.23	<.0001
TRAT*PERIODO	BCG	21	0.4653	0.05951	32	7.82	<.0001
TRAT*PERIODO	COMBINA	0	0.2853	0.05951	32	4.8	<.0001
TRAT*PERIODO	COMBINA	3	0.2087	0.05951	32	3.51	
TRAT*PERIODO	COMBINA	7	0.2427	0.05951	32	4.08	
TRAT*PERIODO	COMBINA	14	0.2757	0.05951	32	4.63	<.0001
TRAT*PERIODO	COMBINA	21	0.662	0.05951	32	11.12	<.0001
TRAT*PERIODO	VITD	0	0.29	0.05951	32	4.87	<.0001
TRAT*PERIODO	VITD	3	0.232	0.05951	32	3.9	
TRAT*PERIODO	VITD	7	0.2787	0.05951	32	4.68	<.0001
TRAT*PERIODO	VITD	14	0.3163	0.05951	32	5.32	<.0001
TRAT*PERIODO	VITD	21	0.5093	0.05951	32	8.56	<.0001
TRAT*PERIODO	control	0	0.356	0.05951	32	5.98	<.0001
TRAT*PERIODO	control	3	0.2367	0.05951	32	3.98	
TRAT*PERIODO	control	7	0.267	0.05951	32	4.49	<.0001
TRAT*PERIODO	control	14	0.3883	0.05951	32	6.53	<.0001
TRAT*PERIODO	control	21	0.328	0.05951	32	5.51	<.0001

NITRIMOL

Effect	TRAT	PERIODO	Estimador	EE	DF	Valor	t
TRAT	BCG		27.3504	2.6879	8	10.18	<.0001
TRAT	COMBINA		28.6211	2.6879	8	10.65	<.0001
TRAT	VITD		27.8006	2.6879	8	10.34	<.0001
TRAT	control		26.9402	2.6879	8	10.02	<.0001
PERIODO		0	26.3248	2.543	32	10.35	<.0001
PERIODO		3	20.5128	2.543	32	8.07	<.0001
PERIODO		7	21.9801	2.543	32	8.64	<.0001
PERIODO		14	27.5926	2.543	32	10.85	<.0001
PERIODO		21	41.9801	2.543	32	16.51	<.0001

TRAT*PERIODO	BCG	0	25.698	5.086	32	5.05	<.0001
TRAT*PERIODO	BCG	3	24.1595	5.086	32	4.75	<.0001
TRAT*PERIODO	BCG	7	20.5413	5.086	32	4.04	
TRAT*PERIODO	BCG	14	26.5812	5.086	32	5.23	<.0001
TRAT*PERIODO	BCG	21	39.7721	5.086	32	7.82	<.0001
TRAT*PERIODO	COMBINA	0	24.3875	5.086	32	4.8	<.0001
TRAT*PERIODO	COMBINA	3	17.8348	5.086	32	3.51	
TRAT*PERIODO	COMBINA	7	20.7407	5.086	32	4.08	
TRAT*PERIODO	COMBINA	14	23.5613	5.086	32	4.63	<.0001
TRAT*PERIODO	COMBINA	21	56.5812	5.086	32	11.12	<.0001
TRAT*PERIODO	VITD	0	24.7863	5.086	32	4.87	<.0001
TRAT*PERIODO	VITD	3	19.8291	5.086	32	3.9	
TRAT*PERIODO	VITD	7	23.8177	5.086	32	4.68	<.0001
TRAT*PERIODO	VITD	14	27.037	5.086	32	5.32	<.0001
TRAT*PERIODO	VITD	21	43.5328	5.086	32	8.56	<.0001
TRAT*PERIODO	control	0	30.4274	5.086	32	5.98	<.0001
TRAT*PERIODO	control	3	20.2279	5.086	32	3.98	
TRAT*PERIODO	control	7	22.8205	5.086	32	4.49	<.0001
TRAT*PERIODO	control	14	33.1909	5.086	32	6.53	<.0001
TRAT*PERIODO	control	21	28.0342	5.086	32	5.51	<.0001

NITRADO

Effect	TRAT	PERIODO	Error				
			Estimador	est\ e1ndar	DF	Valor t	
	TRAT	BCG	0.6727	0.0677	8	9.94	<.0001
	TRAT	COMBINA	0.7209	0.0677	8	10.65	<.0001
	TRAT	VITD	0.6524	0.0677	8	9.64	<.0001
	TRAT	control	0.3843	0.0677	8	5.68	
	PERIODO	0	0.2613	0.07569	32	3.45	
	PERIODO	3	0.4708	0.07569	32	6.22	<.0001
	PERIODO	7	0.6956	0.07569	32	9.19	<.0001
	PERIODO	14	0.805	0.07569	32	10.64	<.0001
	PERIODO	21	0.8053	0.07569	32	10.64	<.0001
TRAT*PERIODO	BCG	0	0.267	0.1514	32	1.76	
TRAT*PERIODO	BCG	3	0.3907	0.1514	32	2.58	
TRAT*PERIODO	BCG	7	0.9973	0.1514	32	6.59	<.0001
TRAT*PERIODO	BCG	14	0.703	0.1514	32	4.64	<.0001
TRAT*PERIODO	BCG	21	1.0057	0.1514	32	6.64	<.0001
TRAT*PERIODO	COMBINA	0	0.2553	0.1514	32	1.69	
TRAT*PERIODO	COMBINA	3	0.578	0.1514	32	3.82	
TRAT*PERIODO	COMBINA	7	0.917	0.1514	32	6.06	<.0001
TRAT*PERIODO	COMBINA	14	0.9767	0.1514	32	6.45	<.0001
TRAT*PERIODO	COMBINA	21	0.8777	0.1514	32	5.8	<.0001
TRAT*PERIODO	VITD	0	0.2377	0.1514	32	1.57	
TRAT*PERIODO	VITD	3	0.6063	0.1514	32	4.01	
TRAT*PERIODO	VITD	7	0.5537	0.1514	32	3.66	
TRAT*PERIODO	VITD	14	0.969	0.1514	32	6.4	<.0001
TRAT*PERIODO	VITD	21	0.8953	0.1514	32	5.91	<.0001