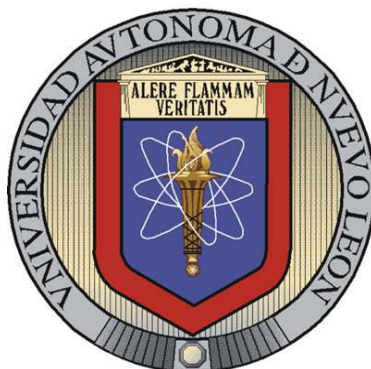


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**INDUCCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE CITOCINAS POR
Mycobacterium tuberculosis EN UN MODELO DE REBANADAS
DE TEJIDO PULMONAR**

Por

IRMA EDITH CARRANZA TORRES

**Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRO EN CIENCIAS con Acentuación en Microbiología**

Marzo, 2010

INDUCCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE CITOCINAS POR
Mycobacterium tuberculosis EN UN MODELO DE REBANADAS
DE TEJIDO PULMONAR

Comité de Tesis



Dra. Licet Villarreal Treviño
Presidente



Dra. Pilar Carranza Rosales
Secretario



Dr. José Santos García Alvarado
Vocal



Dr. Jorge E. Castro Garza
Suplente

INDUCCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE CITOCINAS POR
Mycobacterium tuberculosis EN UN MODELO DE REBANADAS
DE TEJIDO PULMONAR

Por


IRMA EDITH CARRANZA TORRES

El presente trabajo se realizó bajo la dirección de la **Dra. Licet Villarreal Treviño** del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL, la **Dra. Pilar Carranza Rosales** como director externo, de la División de Biología Celular y Molecular del CIBIN-IMSS, y como co-director el **Dr. Jorge E. Castro Garza**.



Dra. Licet Villarreal Treviño

Director Interno



Dra. Pilar Carranza Rosales

Director Externo



Dr. Jorge E. Castro Garza

Co-Director Externo

Gracias doy a mi Dios, por la gracia de Dios que me fue dada en Cristo Jesús; porque en todas las cosas fui enriquecida en Él, en toda palabra y en toda ciencia; así como el testimonio acerca de Cristo ha sido confirmado en mí, de tal manera que nada me falta en ningún don, esperando la manifestación de mi Señor Jesucristo; el cual también me confirmará hasta el fin, para que sea irreprochable en el día del Señor Jesucristo. Fiel es Dios, por el cual fui llamada a la comunión con su Hijo Jesucristo mi Señor.

1 Corintios 1:4-9

TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
AGRADECIMIENTOS	i
DEDICATORIA	iii
LISTA DE TABLAS	iv
LISTA DE FIGURAS	v
NOMENCLATURA	vii
1. RESUMEN Y ABSTRACT	1
2. INTRODUCCIÓN	3
3. HIPÓTESIS	6
4. OBJETIVOS	7
4.1 Objetivo General.....	7
4.2 Objetivos Específicos.....	7
5. ANTECEDENTES	8
5.1 Epidemiología. Marco Teórico	10
5.2 Establecimiento de la Infección	11
5.3 Respuesta Inmune ante <i>M. tuberculosis</i>	12
5.4 Modelo de Rebanadas de Tejido Pulmonar	20
6. MATERIAL Y MÉTODOS	22
6.1 Diseño Experimental	22
6.2 Animales de Laboratorio	22
6.3 Cultivo de Micobacterias	23

6.4	Obtención y Cultivo de Rebanadas de Pulmón	24
6.4.1	Obtención de Rebanadas de Tejido Pulmonar	24
6.4.2	Cultivo de Rebanadas de Pulmón	25
6.5	Infección de las Rebanadas de Tejido	26
6.6	Extracción de RNA Total a Partir de Rebanadas de Tejido Pulmonar	29
6.6.1	Proceso de Extracción de RNA de Rebanadas de Pulmón	29
6.6.2	Determinación de la Concentración y Pureza de RNA.....	30
6.7	Síntesis de DNA Complementario (cDNA)	31
6.8	Cuantificación de la Expresión de Citocinas Mediante qPCR	32
6.8.1	Cuantificación Relativa por el Método Comparativo ($\Delta\Delta C_T$)	34
6.9	Cuantificación de la Expresión de Citocinas (TNF- α , IFN- γ e IL-1 α) Mediante la Técnica de ELISA.....	34
6.10	Análisis Histopatológico	36
7.	RESULTADOS	37
7.1	Cultivo de Micobacterias	37
7.2	Obtención y Cultivo de Rebanadas de Pulmón.....	37
7.3	Infección de las Rebanadas de Tejido Pulmonar	38
7.4	Extracción de RNA Total a Partir de Rebanadas de Tejido Pulmonar	44
7.5	Síntesis de DNA Complementario (cDNA)	45
7.6	Cuantificación de la Expresión de Citocinas Mediante la Técnica de ELISA	45
7.7	Cuantificación de la Expresión de Citocinas Mediante qPCR en Tiempo Real	48
8.	DISCUSION	55
9.	CONCLUSIONES	62
10.	LITERATURA CITADA	63

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a la Dra. Licet Villarreal por aceptarme como alumna de posgrado, por su amistad, confianza y su paciencia durante el desarrollo de este trabajo.

Agradezco a la Dra. Pilar Carranza Rosales por su sincera amistad, consejos y por proporcionarme todo su apoyo, el equipo y material de laboratorio durante la realización de la tesis de maestría.

Agradezco al Dr. Jorge Castro por proporcionarme su confianza, apoyo y dirección durante la realización de esta investigación.

Agradezco a la Dra. Nancy Elena Guzmán Delgado por su valiosa ayuda que fue una gran contribución para este proyecto.

Agradezco al Dr. Lucio Vera por permitirme trabajar en su laboratorio y por el apoyo con el material biológico para la realización de este trabajo.

Al MC. Gerardo Lozano Garza, por su ayuda que fue de gran utilidad en la primera parte experimental de la tesis.

A la química Consuelo Coronado por su amistad, apoyo, compañía y su plática amena.

A mis amigos del laboratorio: Anely, Sam, Brenda, Lupita, Ezequiel por su amistad, complicidad y compañía durante mi estancia en el laboratorio, por amenizar mis mañanas y tardes de trabajo.

A mis compañeros de maestría, por todo el tiempo que compartimos en clase y fuera de clase.

A mi familia (mamá, papá y mi “bro”) por su apoyo en mis decisiones, su amor, paciencia.

Agradecimientos institucionales:

Agradezco al CONACYT (201768) e IMSS (99208018) por las becas que me fueron otorgadas para la realización de mis estudios de posgrado.

Al proyecto PAICYT-UANL (CN1534-07) por el apoyo económico para la realización del trabajo experimental.

A las instituciones, departamentos y laboratorios que apoyaron este proyecto:

Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, (Depto. Microbiología).

Centro de Investigación Biomédica del Noreste del Instituto Mexicano del Seguro Social, (División de Biología Celular).

UMA 34 del Instituto Mexicano del Seguro Social, (Departamento de Patología).

Hospital Universitario “José E. González” de la Universidad Autónoma de Nuevo León, (Servicio de Dermatología).

Gracias.

DEDICATORIA

Al que me ha enseñado la verdad, a YHWH, a su hijo Jesucristo y al Espíritu Santo.

A mi familia que es parte importante de todos mis logros.

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
I Expresión de IL-1 α Mediante qPCR.....	54
II Expresión de IL-1 β Mediante qPCR.....	54

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1 Diagrama de cultivo de micobacterias.....	23
2 Diagrama de obtención de rebanadas de tejido pulmonar.....	25
3 Diagrama de cultivo de rebanadas de pulmón.....	26
4 Diagrama de infección de rebanadas de pulmón.....	28
5 Rebanadas de tejido pulmonar murino.....	38
6 Rebanadas de tejido pulmonar murino (24h).....	40
7 Rebanadas de pulmón infectadas con <i>M. tuberculosis</i> a 24 h.....	41
8 Rebanadas de pulmón infectadas con <i>M. tuberculosis</i> H37Rv (A, C, E) y con <i>M. bovis</i> BCG (B, D, F).....	42
9 Rebanadas de pulmón infectadas con <i>M. tuberculosis</i> H37Rv (A, C, E) y con <i>M. bovis</i> BCG (B, D, F).....	43
10 Extracción del RNA total de tejido pulmonar de ratón.....	44
11 Curva estándar del ELISA para TNF- α	46
12 Curva estándar del ELISA para IFN- γ	46
13 Curva estándar del ELISA para IL-1 α	47
14 Cuantificación de la expresión de IFN- γ mediante ELISA.....	48
15 Eficiencia de los oligonucleótidos marcados con sondas TaqMan [®] para cuantificar la expresión para <i>GADP</i> mediante qPCR tiempo real de los DNAc's de las rebanadas de pulmón.....	49

16	Eficiencia de los oligonucleótidos marcados con sondas TaqMan [®] para cuantificar la expresión para <i>TNF-α</i> mediante qPCR tiempo real de los cDNA's de las rebanadas de pulmón.....	49
17	Eficiencia de los oligonucleótidos marcados con sondas TaqMan [®] para cuantificar la expresión para <i>IL-1α</i> mediante qPCR tiempo real de los cDNA's de las rebanadas de pulmón.....	50
18	Eficiencia de los oligonucleótidos marcados con sondas TaqMan [®] para cuantificar la expresión para <i>IL-1β</i> mediante qPCR tiempo real de los cDNA's de las rebanadas de pulmón.....	50
19	Hoja de cálculo Excel para obtener valores ΔC_T y $\Delta\Delta C_T$	51
20	Expresión de <i>TNF-α</i> mediante qPCR en rebanas de tejido pulmonar.....	53

NOMENCLATURA

Abs	Absorbancia
ABTS	2,2'azinobis-(3-etilbenzotiazolin 6-ácido sulfónico)
BALB/c	Cepa de ratón albino
BCG	Bacilo Calmette-Guerin
BSA	Albúmina de suero bovino
CaCl ₂ .2H ₂ O	Cloruro de calcio dihidratado
cDNA	DNA complementario
CO ₂	Dióxido de carbono
col.	Colaboradores
C _T	Ciclo umbral o thershold cycle
dATP	Desoxiadenosina-5'-trifosfato
dCTP	Desoxicitidina-5'-trifosfato
DEPC	Dietilpirocarbonato
dGTP	Desoxiguanosina-5'-trifosfato
DMEM/F12	Medio Dulbecco modificado por Eagle / Mezcla de Nutrientes F-12 de Ham
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxinucleótidos Trifosfato
DO	Densidad óptica
DTT	Ditiotreitol

dTTP	Desoxitimidina-5'-trifosfato
ELISA	Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas
<i>et al.</i>	en latín, “et alia”, y otros
FAM	6-carboxi-fluoresceina
g	Gramos
GADP	Gliceraldehído 3-fosfato
h	Horas
H ₂ O milliQ	Agua procesada en filtros MilliQ
H37Rv	Variante virulenta de la cepa bacteriana H37 de <i>M. tuberculosis</i>
H&E	Tinción con hematoxilina y eosina
IFN	Interferón
IgA	Inmunoglobulina A
IL	Interleucina
KCl	Cloruro de potasio
KH ₂ PO ₄	Fosfato de potasio monobásico
L	Litro
M	Concentración Molar (1 Molar)
MGB Probe	Sonda con sitio de unión a surco menor
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
MgSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato de magnesio
min	Minutos
mM	Milimolar

mm	Milímetro
ml	Mililitro
MTT	(3-(4,5 dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil bromuro de tetrazolio)
m/seg	Metros por segundo
NaCl	Cloruro de sodio
NaHCO ₃	Bicarbonato de sodio
ng	Nanogramos
ng/ml	Nanogramos por mililitro
nm	Nanómetros
NO	Óxido nítrico
O ₂	Oxígeno
PBS	Buffer de fosfatos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pg/ml	Picogramos por mililitro
PPD	Prueba cutánea del derivado proteico purificado
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
r ²	Correlación
RNA	Ácido ribonucleico
RNA _m	Ácido ribonucleico mensajero
RNAasas	Enzimas que degradan el RNA
rpm	Revoluciones por minuto
RT	Transcripción reversa

RT-PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa asociada a Transcripción Reversa
SFB	Suero fetal bovino
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
Tris-HCl	Buffer ácido clorhídrico
UFC	Unidades formadoras de colonia
UFC/ml	Unidades formadoras de colonia por mililitro
USA	Estados Unidos de América
UV	Rayos Ultravioleta
VIC	2'-cloro-7'-fenil-1,4-dicloro-6-carboxifluoresceina
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
Z-N	Tinción de Zielh Neelsen
μ l	Microlitros
μ g/ml	Microgramos por mililitro
ΔC_T	Cambios en el Ciclo umbral o thershold cycle
$\Delta\Delta C_T$	Cambios en el Ciclo umbral o thershold cycle con respecto a un Control
%	Por ciento
$^{\circ}$ C	Grados Celsius
®	Marca registrada

1. RESUMEN

La tuberculosis es una de las tres principales enfermedades infecciosas que afectan al humano a nivel mundial. Este padecimiento, producido por *Mycobacterium tuberculosis*, causa anualmente 2 millones de muertes. Para el estudio de la patogénesis de la tuberculosis, la interacción del bacilo con diferentes células y la inducción de la respuesta inmune durante la infección se han utilizado diversos modelos *in vitro* e *in vivo*. Un modelo alternativo lo representan las rebanadas de tejido pulmonar. En ellas se mantiene la arquitectura del tejido, la interacción entre las células y se encuentran los diferentes tipos celulares correspondientes al tejido. Las rebanadas de tejido se han utilizado principalmente para estudios farmacológicos y toxicológicos, pero a la fecha no existe ningún reporte del uso del sistema de cultivo de rebanadas de pulmón como modelo de infección con *M. tuberculosis*. En el presente trabajo se estandarizaron la obtención y el cultivo de rebanadas de tejido pulmonar murino y las condiciones de infección con *M. tuberculosis ex vivo*. En el tejido pulmonar infectado experimentalmente se localizaron los bacilos en los septos alveolares, cercanos a neumocitos tipo II, en los espacios alveolares y dentro de macrófagos. Se analizó la expresión de citocinas en el tejido infectado mediante la técnica de ELISA y qRT-PCR. Se observó una sobreexpresión del IFN- γ en las rebanadas infectadas con *M. tuberculosis* con respecto a las no infectadas, mientras que las demás citocinas no pudieron detectarse por ELISA. La determinación de la expresión de citocinas mediante qPCR mostró un pico de inducción de expresión de IL-1 β y TNF- α a las 6h de incubación en rebanadas infectadas con *M. bovis* BCG y *M. tuberculosis* H37Rv; y un pico de expresión a las 6h y 24h de incubación en rebanadas infectadas con *M. bovis* BCG y *M. tuberculosis* H37Rv, respectivamente. El gene GAPD fue usado como gene endógeno. En todos los casos la inducción de la expresión de citocinas fue mayor con *M. bovis* BCG (no virulenta) que con *M. tuberculosis* H37Rv (virulenta) sugiriendo una inhibición de la respuesta inmune innata por parte de la cepa virulenta como un posible mecanismo para facilitar su sobrevivencia en el tejido. Los resultados obtenidos en este trabajo nos muestran que el modelo de infección con *M. tuberculosis* en rebanadas de tejido pulmonar puede servir para evaluar la respuesta inmune innata ante este patógeno y puede ser utilizado en futuros estudios para analizar otros aspectos iniciales de la infección con esta bacteria.

1. ABSTRACT

Tuberculosis is the third infectious disease affecting humans worldwide. This condition, caused by *Mycobacterium tuberculosis*, accounts for 2 million deaths per year. Several *in vitro* and *in vivo* experimental models have been used to study the pathogenesis of tuberculosis, the interaction of bacteria with different cells and induction of immune response during infection. Lung tissue slices represent an experimental alternative model, in which all the usual cell types of the organ are found, the tissue architecture is maintained as well as the interactions between the different cells. Tissue slices have been mainly used for pharmacological and toxicological studies. At present, there is not any report of using lung tissue slices as a system to study *M. tuberculosis* infection. The methods to obtain and culture murine lung tissue slices were standardized in this work. Also, the best conditions to infect them *ex vivo* with micobacterias were established. Bacilli infecting lung tissue slices were observed in the alveolar septa, alveolar light spaces and near to type II pneumocytes, a few were intracellular in macrophages. Cytokine expression in *Mycobacterium* infected lung tissue slices was analyzed by ELISA and qRT-PCR. Over-expression of IFN- γ was detected in *M. tuberculosis* infected lung slices, but no other was detected by ELISA. Cytokine expression, quantified by Real-Time PCR, showed a peak at 6 h for IL-1 β and TNF- α in lung slices infected with *M. bovis* BCG and *M. tuberculosis* H37Rv. IL-1 α expression had a peak at 6 and 24 h in infected lung slices infected with *M. bovis* BCG and *M. tuberculosis* H37Rv, respectively. GAPD gene was used as endogen control. The result displayed by this work show that the model of infection with *M. tuberculosis* in lung tissue slices can serve to evaluate the immune response to this pathogen and can be used to further studies to analyze other aspects of the disease. All the results showed that *M. bovis* BCG (non-virulent) induced a higher cytokine expression than *M. tuberculosis* H37Rv (virulent) suggesting an inhibition of innate immune response by the virulent strain, as a possible mechanism to facilitate its survival in the tissue. The results of this work show that lung tissue slices model infected with *M. tuberculosis* may be a very useful tool to evaluate the innate immune response and other aspects during the early stages of mycobacterial infection.

2. INTRODUCCIÓN

La tuberculosis, enfermedad causada principalmente por *M. tuberculosis*, es responsable de más del 6% de todas las muertes en el mundo. Los datos del 2007 muestran que durante ese año, 9.3 millones de personas a nivel mundial se enfermaron de tuberculosis y alrededor de 1.32 millones de personas VIH negativos más 0.46 millones de VIH positivos murieron a causa de este padecimiento (WHO, 2009), lo que hace de esta enfermedad la primer causa de muerte debida a un solo agente infeccioso. Además, se estima que un tercio de la población mundial está infectado con este bacilo.

La transmisión de *M. tuberculosis* es de persona a persona, usualmente mediante la inhalación de gotitas de aerosol diseminadas en el ambiente cuando una persona enferma tose, estornuda o habla. La enfermedad se presenta en un curso crónico que ataca de manera primaria a los pulmones, pero puede afectar cualquier órgano o tejido (van Crevel *et al.*, 2002).

La respuesta inmune ante la infección micobacteriana pulmonar depende primariamente de la inmunidad celular la cual frecuentemente falla en eliminar al patógeno, a pesar de la fuerte respuesta inflamatoria con destrucción y necrosis pulmonar en los casos más avanzados. Esta respuesta inmune está generalmente balanceada por mecanismos anti-inflamatorios, posiblemente para limitar el daño a los tejidos por la inflamación excesiva, y facilitar la solución al proceso, y restaurar la función normal del órgano. La inmunosupresión ocasiona una actividad micobactericida insuficiente (Mason *et al.*, 2007). Además *M. tuberculosis* puede persistir por la supresión de actividades microbicidas de los macrófagos del hospedero y en última instancia disminuir la respuesta inmune celular (Pulendran *et al.*, 2001; Deretic *et al.*, 2006).

Las citocinas juegan un papel importante en la interacción, modulación y regulación del sistema inmune (Mohan *et al.*, 2001; van Deventer, 2001). Entre las citocinas que han sido involucradas en el proceso de la infección de la tuberculosis están el TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-1 α , IL-2, IL-6, IL-4, IL-10 e IL-12. Dependiendo del balance de la expresión y la actividad entre ellas puede derivarse el progreso o control de la enfermedad (Arriaga *et al.*, 2002; Chacón-Salinas *et al.*, 2005; Cho *et al.*, 2005; Hernández-Pando *et al.*, 1997, 2004; Saunders *et al.*, 2005).

Debido a la peculiar naturaleza de la patogenicidad de *M. tuberculosis* y su proceso infeccioso, el entendimiento de la interacción entre este patógeno y el sistema inmune es de importancia básica y puede ayudar a revelar algunos aspectos de la tuberculosis y el diseño de nuevos fármacos y estrategias de vacunación (Giacomini *et al.*, 2006).

Para el estudio del proceso infeccioso de la tuberculosis y de las interacciones con las células del tejido hospedero, así como la respuesta inmune a la infección se han utilizado tanto modelos animales (ratones, conejos, primates), así como modelos *in vitro* (cultivos primarios y líneas celulares de diversas especies de mamíferos). Un modelo alternativo es el de rebanadas de tejido, el cual se ha utilizado principalmente en estudios de farmacología y toxicología. De manera particular, las rebanadas de pulmón han sido utilizadas en estudios de toxicidad (Fisher *et al.*, 1994), biotransformación (Wohlsen *et al.*, 2003), respuesta frente a alérgenos, metabolismo de xenobióticos (de Kanter *et al.*, 2002b) entre otros, sin embargo, su utilidad como modelo de infección ha sido muy poco estudiada; existen solamente dos reportes donde Ebsen y col., (2002), y Goris y col., (2009), infectaron rebanadas de tejido pulmonar con *Chlamydophila pneumoniae* y virus respiratorio sincitial, y rebanadas de pulmón con el virus 3 de la parainfluenza bovina, respectivamente, mostrando que este modelo ofrece la posibilidad de estudiar mecanismos y efectos de infección por bacterias y virus en tejidos viables.

A la fecha no existen antecedentes de trabajos utilizando este modelo en infecciones con *M. tuberculosis*. Por lo que el empleo de rebanadas de pulmón infectadas con *M. tuberculosis* puede representar un método adicional para estudiar distintos mecanismos implicados en las primeras etapas de la patogénesis de la tuberculosis, que lleven a tomar medidas para el control de la enfermedad. Es un modelo

donde se pueden estudiar las interacciones del patógeno con el hospedero en una manera más cercana a lo que pasa *in vivo*, pero con las ventajas de un cultivo *in vitro*, ya que se conserva la estructura y complejidad del tejido, incluyendo el movimiento ciliar, por lo que es posible realizar estudios funcionales, morfológicos y de patogénesis. También es importante determinar si la inducción de citocinas en este modelo se asemeja a la reportada en modelos animales durante las primeras horas de infección y en estudios *in vitro* con macrófagos. Como una primer etapa en la caracterización del modelo propuesto, en este trabajo se analizó la inducción de citocinas en respuesta a la infección con *M. tuberculosis* en cultivo de rebanadas de pulmón. Los resultados obtenidos hasta ahora sugieren que este será muy útil para el estudio de patogénesis de *M. tuberculosis*.

3. HIPÓTESIS

La expresión de citocinas inducidas por la infección con *M. tuberculosis* puede ser detectada en un sistema de cultivo de rebanadas de pulmón.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Determinar la expresión de citocinas en rebanadas de pulmón infectadas con *Mycobacterium tuberculosis*.

4.2 Objetivos específicos.

Estandarizar y optimizar el proceso de la obtención, el cultivo y la infección con micobacterias de rebanadas de pulmón murino.

Realizar análisis histopatológico de las rebanadas infectadas y sin infectar (testigo negativo).

Cuantificar la expresión de TNF- α , IFN- γ , IL-10, IL-4, IL-1 α e IL-1 β mediante RT-PCR en tiempo real en rebanadas de pulmón infectadas *in vitro* con respecto a rebanadas sin infectar.

Cuantificar la expresión de TNF- α , IFN- γ , IL1 α mediante ELISA en rebanadas de pulmón infectadas *in vitro* y sin infectar.

5. ANTECEDENTES

Mycobacterium tuberculosis es un patógeno intracelular que puede invadir células no fagocíticas *in vitro* incluyendo células epiteliales de pulmón, sin embargo, no se ha demostrado que estas células tengan un papel relevante en el control de la enfermedad o su diseminación. El mecanismo de diseminación no está totalmente entendido, pero los macrófagos y las células dendríticas han sido involucrados en el transporte y diseminación tisular de *M. tuberculosis*. Considerando que el alveolo está recubierto por las células epiteliales, estas deben entrar en interacción con los bacilos tan pronto llegan al alvéolo. Si las micobacterias invaden a las células epiteliales, estas les pueden facilitar un espacio alejado de los mecanismos bactericidas de los macrófagos y pueden representar una puerta para la diseminación de *M. tuberculosis* hacia el sistema linfático y sanguíneo y de ahí diseminarse a otras zonas del pulmón o cualquier órgano del cuerpo sin necesidad de macrófagos acarreadores (Castro-Garza, *et al.*, 2002).

Se ha propuesto que el principal factor de daño tisular en la infección por *M. tuberculosis* se debe a la respuesta inflamatoria generada por la infección y es mediada principalmente por la activación de TNF- α citotóxico, pero en la cual están también involucradas una serie de citocinas que dependiendo del balance entre ellas puede derivarse el progreso o control de la enfermedad. Entre ellas están El TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-1 α , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 e IL-12 (van Crevel *et al.*, 2002; Schluger, 2005).

Los modelos animales han sido muy útiles para el estudio de diferentes estados de la infección de *M. tuberculosis* en cuanto a la respuesta del hospedero a la infección, pero poco se ha hecho en estudiar la interacción inicial de la bacteria en el epitelio pulmonar.

Existen modelos alternativos al uso de animales de laboratorio y de estudios *in vitro*. El uso de rebanadas de tejido con diámetro y grosor similares entre sí es uno de estos modelos alternativos y representa un sistema *in vitro* muy valioso en el que se observan características fisiológicas muy similares a las presentes *in vivo*. En una rebanada pueden encontrarse representadas todos los tipos celulares presentes en las diferentes zonas del órgano del cual proviene dicho tejido. Así mismo se conserva la arquitectura normal del tejido u órgano de donde proviene, se mantienen las interacciones célula-célula dentro de la matriz original del tejido y por consiguiente, se refleja mejor el complejo nivel de organización biológica dentro del órgano (Gandolfi *et al.*, 1996).

Las rebanadas de pulmón se han utilizado para diversos estudios fisiológicos y de toxicología, pero su uso es muy reducido para estudiar mecanismos y efectos de infección por bacterias o virus. Recientemente se inició la preparación de rebanadas de pulmón en nuestro laboratorio y se logró mantenerlas en cultivo, viables y en buenas condiciones fisiológicas. Mediante análisis histológicos, es posible evidenciar que estas rebanadas presentan el aspecto normal y saludable del tejido pulmonar. En este proyecto se propuso analizar, mediante el modelo de rebanadas de pulmón murino, las interacciones que ocurren durante las primeras etapas de infección por *M. tuberculosis* al nivel del epitelio pulmonar. Así mismo, cuantificar mediante ELISA y RT-PCR las citocinas expresadas durante la infección a etapas tempranas aportará información de la respuesta inicial en el pulmón a la infección con *M. tuberculosis*. La comparación de este modelo con los modelos previos indicará la relevancia de tal modelo y lo validará para posteriores estudios de infección con *M. tuberculosis* y otros patógenos.

5.1 Epidemiología. Marco teórico

La tuberculosis causada por el patógeno *Mycobacterium tuberculosis*, produce la mayor morbilidad y mortalidad infecciosa debida a agentes bacterianos en todo el mundo. Se estima que anualmente surgen 9.3 millones de nuevos casos y se registran cerca de 2 millones de muertes relacionadas con la tuberculosis. Además, el 4.9% de los casos anuales de tuberculosis son multidrogosresistentes (Corbett *et al.*, 2003; Koul *et al.*, 2004; WHO, 2009).

En América Latina, cada año se presentan aproximadamente 650 mil casos nuevos y 50 mil defunciones. En México, de acuerdo con la información disponible en el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE), se ha presentado una disminución en la incidencia de la enfermedad, aunque la tuberculosis continúa presentándose con más de 17 mil casos nuevos y cerca de dos mil defunciones cada año lo que representa una importante pérdida de años potenciales de vida saludable y, por consiguiente, un obstáculo para el desarrollo socioeconómico de México, ya que el promedio de edad de muerte por este padecimiento es de 54 años (CENAVECE, 2007). También, es la tercera causa de muerte después de las neumonías no tuberculosas y las infecciones intestinales y ocupa el primer lugar en mortalidad causado por un solo agente infeccioso (WHO, 2009; Guevara-Guzmán *et al.*, 2003). En el estado de Nuevo León, según cifras proporcionadas por la Secretaría de Salud, se registraron un total de 835 casos nuevos en el 2007; de los cuales 86.5% corresponde a tuberculosis pulmonar (CENAVECE, 2007).

Se estima que una tercera parte de la población mundial está actualmente infectada con *M. tuberculosis* (Flynn and Chan, 2001a; Krutzik and Modlin, 2004), de ellos solo un 5-10% de la población desarrolla la enfermedad activa dentro del primero o segundo año después de la infección (tuberculosis primaria) o mucho tiempo después (tuberculosis posprimaria) (Kaufmann, 2005; Flynn and Chan, 2001b; van Crevel *et al.*,

2002). La tuberculosis pulmonar es la manifestación más común de la enfermedad (Guevara-Guzmán *et al.*, 2003; Collins and Kaufmann, 2001).

5.2. Establecimiento de la Infección.

La tuberculosis primaria, tiene lugar después de la primera exposición a *M. tuberculosis*, cuando pequeñas gotas conteniendo *M. tuberculosis* son inhaladas hacia los alveolos pulmonares. Una vez ahí las bacterias son ingeridas por los macrófagos alveolares residentes donde sobreviven y empiezan a multiplicarse (Wigginton and Kirschner, 2001; Flynn and Chan, 2001b).

La diseminación de organismos viables a partir de este estado de la infección hacia el sistema linfático o sanguíneo es crítica para el establecimiento de la enfermedad. El mecanismo preciso de diseminación es todavía desconocido, pero se asume que los macrófagos están involucrados en este transporte. Se ha propuesto también que las células dendríticas por ser células migratorias desempeñen un papel importante en la diseminación tisular de *M. tuberculosis* (Smith, 2003).

M. tuberculosis es capaz de infectar y replicarse dentro de una amplia variedad de células de mamífero en cultivo, incluyendo neumocitos transformados (McDonough and Kress, 1995; Mehta *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 1997; Castro-Garza *et al.*, 2002). García-Pérez y col., (2003), han sugerido que la internalización de *M. tuberculosis* en estas células no fagocíticas puede ser a través de macropinocitosis o un proceso de fagocitosis inducido, y posiblemente algún producto bacteriano secretado es responsable de inducir este fenómeno. Las células epiteliales pueden representar un medioambiente ideal y seguro para la replicación de *M. tuberculosis*, lejos de los mecanismos bactericidas de los macrófagos. También esta localización puede facilitar el acceso directo a los sistemas linfático y sanguíneo del hospedero por la alteración del endotelio

vascular pulmonar sin necesidad de macrófagos acarreadores como lo hacen otros patógenos respiratorios (Cundell and Tuomanen, 1994; McDonough and Kress, 1995).

Utilizando un sistema de cultivo de órganos de mucosa respiratoria humana con una interfase de aire Middleton y col., (2002), reportaron que *M. tuberculosis* se adhiere preferentemente en áreas previamente dañadas del epitelio y luego invade el tejido. Relevante es el hecho de que en este modelo no encontraron células inmunes involucradas en el proceso de invasión, aunque probablemente porque se eliminaron durante el proceso de preparación del órgano. Sin embargo la falta de sensibilidad para detectar la presencia de las bacterias y su localización en el epitelio evitó que determinaran cual fue la ruta de invasión al tejido.

Debido a la naturaleza de la patogénesis de *M. tuberculosis*, el entendimiento de la interacción entre este patógeno y el sistema inmune es de importancia básica para revelar algunos aspectos del proceso infeccioso y contribuir al diseño de nuevos fármacos y estrategias de vacunación (Giacomini *et al.*, 2006).

5.3 Respuesta inmune ante *M. tuberculosis*.

El establecimiento de la infección por *M. tuberculosis* y el progreso hacia la enfermedad depende del balance que se dé entre los factores bacterianos para producir enfermedad y los mecanismos inmunes para el control de la infección y eliminación de la bacteria. Se han realizado extensos trabajos para analizar la respuesta de las células inmunes ante la infección por micobacterias (Korbel *et al.*, 2008). Tales estudios se han realizado en modelos *in vitro* utilizando líneas celulares y cultivos primarios de células provenientes de pacientes o animales. Así mismo, los modelos animales de experimentación han aportado una gran cantidad de información en este aspecto.

M. tuberculosis es transmitida por la aspiración de aerosoles seguida del establecimiento de la infección en los pulmones. *M. tuberculosis* sobrevive, reside y prolifera principalmente dentro de macrófagos alveolares; sin embargo, estudios recientes han mostrado que células dendríticas también fagocitan a la bacteria. Estos dos tipos de células presentadoras de antígenos están presentes en el pulmón y son activadas enseguida de la infección (Sinha *et al.*, 2006; Wolf, *et al.*, 2007; Korbel *et al.*, 2008)

Durante el curso de la enfermedad, la respuesta inmune contribuye al daño tisular severo. Esta respuesta puede ser mediada por células T y macrófagos activados. Si la regulación es inapropiada, la enfermedad se establece y progresa o puede dar lugar a una infección latente (Smith, 2003). La respuesta inmune celular contra la tuberculosis involucra macrófagos, células T CD4⁺, células T CD8⁺, y células T γ δ (Feng *et al.*, 2001; McShane *et al.*, 2001; Lazarevic and Flynn, 2002).

La eliminación de las bacterias por los macrófagos alveolares depende de la presencia de linfocitos, así como de la activación por IFN- γ , liberado por células Th1 y otras células de la respuesta inmune (como células NK y T CD8⁺) que migran al sitio de la infección en respuesta a las señales quimiotácticas generadas por los macrófagos infectados (Carranza *et al.*, 2006; Korbel *et al.*, 2008).

M. tuberculosis evade la respuesta inmune del hospedero mediante la manipulación de las vías de señalización celular (Koul *et al.*, 2004). Los mecanismos más importantes son la supresión de la producción de IL-12 (Nigou *et al.*, 2002), la prevención de la fusión fagosoma-lisosoma (Deretic *et al.*, 2006) y la regulación negativa de la apoptosis de los macrófagos hospederos (Loeuillet *et al.*, 2006).

La respuesta inmune producida por el hospedero depende de la virulencia de *M. tuberculosis*. Macrófagos derivados de médula ósea infectados con diferentes genotipos de *M. tuberculosis* muestra que cada genotipo tiene la habilidad de inducir diferentes niveles de expresión de citocinas que pueden ser relacionadas con su patogénesis durante la infección (Chacon-Salinas *et al.*, 2005).

Las citocinas juegan un papel importante en la interacción, modulación y regulación del sistema inmune (Mohan *et al.*, 2001; van Deventer, 2001). Las células inmunitarias liberan dos patrones conocidos de citocinas: las tipo 1 (pro-inflamatorias) como IFN- γ , IL-12, IL-2, TNF- α , IL1 β e IL-1 α ; las citocinas tipo 2 (anti-inflamatorias) como IL-4 e IL-10 (Schluger, 2005; van Crevel *et al.*, 2002).

El control inmunológico de la infección por *M. tuberculosis* está basado en una respuesta Th1 (Collins and Kaufmann, 2001; Flynn and Chan, 2001b). Citocinas como IL-12, IFN- γ y TNF- α son esenciales para la protección contra este patógeno (Jung *et al.*, 2003).

La producción de IL-12 es inducida (después de la fagocitosis de *M. tuberculosis*), por los macrófagos y células dendríticas, las cuales inducen el desarrollo de una respuesta Th1 con producción de IFN- α (Collins and Kaufmann, 2001; Nolt and Flynn, 2004; Trinchieri, 2003; Pathak *et al.*, 2005). La importancia de IL-12 en el control de la infección por *M. tuberculosis* se puede observar en el ratón deficiente del gen-IL-12p40. Cuando estos ratones se infectan, muestran una carga bacteriana importante y una disminución del tiempo de supervivencia en relación con los ratones del grupo control. Esto probablemente se debe a una reducción sustancial en la producción de IFN- γ . Los humanos con mutaciones en los genes IL-12p40 o en el receptor de IL-12 presentan una disminución en la producción de IFN- γ a partir de células T y son más susceptibles a la diseminación de BCG y a las infecciones por *M. avium*. Existe evidencia de que la vacuna DNA-IL-12 podría reducir sustancialmente el número de bacterias en el ratón con una infección tuberculosa crónica, sugiriendo que la inducción de esta citocina pudiera ser un factor importante en el diseño de una vacuna antituberculosa (Pulendran, 2004; Araujo *et al.*, 2008).

El IFN- γ es clave en el control de la infección por *M. tuberculosis*. (Condos *et al.*, 2003). Esta citocina es producida por las células T CD4+ y T CD8+ durante la infección tuberculosa y por las células natural killer (NK) (Jeevan *et al.*, 2006; Korbel *et al.*, 2008). IFN- γ , es una citocina activadora de macrófagos requerida para la

inmunidad mediada por células, induce la fusión fagolisosomal y la eliminación de las bacterias intracelulares (Jeevan *et al.*, 2006). Su producción es estimulada por IL-12 y suprimida por IL-10 (Pulendran, 2004). Niveles elevados de RNAm correspondiente a INF- γ , así como de la citocina están frecuentemente relacionados con una mejor respuesta inmune anti-*M. tuberculosis* (Condos *et al.*, 2003).

Recientemente, se ha reportado la producción de IFN- γ dependiente de IL-12 en los macrófagos alveolares infectados con micobacterias. El ratón deficiente en IFN- γ (*knock-out*, GKO) es más susceptible a cepas virulentas de *M. tuberculosis* (Cooper *et al.*, 1993; Pearl *et al.*, 2001). La diseminación es consecuencia de una falla en la formación de granuloma, debido que no hay producción de las citocinas (principalmente del TNF- α) y quimiocinas involucradas en este proceso. En este caso, el IFN- γ exógeno no tiene la capacidad de activar a los macrófagos. El efecto de la falta de IFN- γ es el crecimiento sin control del bacilo en los órganos del ratón GKO, y aunque se forman granulomas, éstos se vuelven rápidamente necróticos. En estos ratones la activación de los macrófagos es defectuosa lo que contribuye en gran medida a la susceptibilidad. La IL-12 también ha sido detectada en granulomas tuberculosos (Nicholson *et al.*, 1996; North and Jung, 2004; Araujo *et al.*, 2008).

M. tuberculosis, es un potente inductor de IL-12 y debido a que la producción de IFN- γ es dependiente de IL-12, la respuesta de IFN- γ es detectada siempre en huéspedes infectados (Jung *et al.*, 2003; Cooper *et al.*, 2002). Aunque la producción de IFN- γ , por sí sola es insuficiente para el control de la infección por *M. tuberculosis*, se requiere de esta citocina para tener una respuesta protectora a este patógeno (Cooper *et al.*, 2002, 2007). EL IFN- γ , es producido tanto por sujetos PPD positivos sanos como por enfermos. Si bien, la producción de IFN- γ puede variar mucho entre sujetos y algunos estudios sugieren que los niveles de IFN- γ están disminuidos en pacientes con TB activa (Pai *et al.*, 2004), la medición de solo esta citocina puede no ser un marcador confiable de respuesta inmunitaria protectora.

El TNF- α es una citocina pleiotrópica producida principalmente por los monocitos y macrófagos (Dempsey *et al.*, 2003), se requiere para generar la respuesta granulomatosa y para una inmunidad mediada por células efectiva (Smith *et al.*, 2002; Saunders *et al.*, 2005). Los datos encontrados por Cho y col., (2005), sugieren que la dosis de TNF- α es crucial para la estimulación de la expresión óptima de citocinas protectoras y contribuye al control de la replicación de la micobacteria. Sin embargo, en grandes cantidades, puede producir necrosis en los pulmones. En modelos animales, la ausencia de TNF- α impide cualquier control del crecimiento de *M. tuberculosis*. La eliminación intracelular de *M. tuberculosis* está mediada por la producción de NO (óxido nítrico, por sus siglas en inglés) inducida por el TNF- α , sin esta inducción *M. tuberculosis* crece sin control. Sin embargo el exceso del TNF- α puede ser, como ya se mencionó, en extremo dañino. Si en el modelo experimental, el animal recibe una dosis elevada de este factor, el animal muere. El análisis histopatológico muestra inflamación pulmonar tan grave que, aun cuando las micobacterias hayan sido eliminadas, el daño al huésped debido a inflamación no regulada ocasiona la muerte (Arriaga *et al.*, 2002).

Otra citocina involucrada es la IL-1 (IL-1 α e IL-1 β), es una citocina multipotencial prototípica, importante en la inmunidad protectora antimicobacteriana en etapas tempranas (Fremond *et al.*, 2007; Yamada *et al.*, 2000). Los cambios en las respuestas inmunes producidas por IL-1 incrementan la producción de anticuerpos y la síntesis de linfocinas, regula positivamente los receptores para IL-2, y aumenta las respuestas mitogénicas de las células del bazo hacia el lipopolisácarido bacteriano (Yamada *et al.*, 2000). La IL-1 β es producida principalmente por monocitos, macrófagos y células dendríticas (Perregaux *et al.*, 2002). En pacientes con tuberculosis y en el sitio de la enfermedad es producida en exceso (Tsao *et al.*, 2000). Participa en la regulación de la maduración de células dendríticas (Wesa and Galy, 2001; Mellman and Steinman, 2001).

En contraste con el TNF- α , la interleucina 10 (IL-10) es considerada una citocina antiinflamatoria, la cual es producida por macrófagos y células T durante la infección

por *M. tuberculosis*. Posee propiedades desactivantes de macrófagos, incluyendo la alteración de la producción de IL-12, la cual a su vez disminuye la producción de IFN- γ por las células T (Rivas-Santiago *et al.*, 2005).

Al parecer *M. tuberculosis* activa las señales opuestas y dependientes de TNF- α e IL-10 en la inducción de la apoptosis de macrófagos; y el balance entre ambas citocinas influye sobre la apoptosis y/o sobrevivencia del macrófago (Rojas *et al.*, 1999; Patel *et al.*, 2009). La IL-10 ha sido implicada en la modulación de la producción excesiva de IL-12, TNF- α e IFN- γ durante infecciones intracelulares (Hickman *et al.*, 2002).

Los macrófagos de pacientes tuberculosos son supresores de la proliferación de las células T *in vitro*, y la inhibición de IL-10 revierte parcialmente esta supresión. La IL-10 inhibe directamente las respuestas de los linfocitos T CD4⁺, así como también la presentación de antígenos por las células presentadoras infectadas con micobacterias. La IL-10 puede actuar en contra de las propiedades de activación del macrófago por parte del IFN- γ (Rojas *et al.*, 1999; Gong *et al.*, 1996).

La presencia de respuesta Th2 y de IL-4 en TB está sujeta a controversia. (Lienhardt *et al.*, 2002); Sin embargo, la detección de IL-4 es variable y aunque algunos reportes indican que existen varias respuestas Th2 en la enfermedad tuberculosa, esto no ha sido fehacientemente demostrado (Jung *et al.*, 2002, 2003). Es la deficiencia de IFN- γ la que evita el control de la infección y no la presencia de IL-4 u otras citocinas Th2. En un estudio de expresión de genes de citocinas en los granulomas de pacientes con tuberculosis avanzada mediante hibridización *in situ*, IL-4 fue detectada en 3/5 partes de los pacientes, pero nunca en ausencia de expresión de IFN- γ (Fenhalls *et al.*, 2000). Sin embargo múltiples estudios refieren a la interleucina-4 (IL-4) como una importante citocina regulatoria producida por linfocitos Th2, mastocitos, basófilos y células NK que inhibe la producción de IFN- γ , la activación de macrófagos por IFN- γ y potencia la diferenciación de células T CD4⁺ en células Th2 (Yao *et al.*, 2005). Se ha sugerido que tiene efectos perjudiciales en la eficacia antibacteriana de la respuesta Th1 y efectos marcados en la toxicidad de TNF- α , y en la fibrosis (Hernández-Pando *et al.*, 2004). La

acción de IL-4 en tuberculosis es dirigida a los macrófagos en ratones BALB/c y puede incluir un efecto antagonista en la activación de IgA/IFN- γ inducida y en la producción de óxido nítrico (Buccheri *et al.*, 2007). En humanos, un aumento en la producción de IL-4 se ha asociado con el desarrollo de tuberculosis activa (Ordway *et al.*, 2004; Demissie *et al.*, 2006). En pacientes con tuberculosis es altamente bioactiva y generalmente producida en baja cantidad (Lienhardt *et al.*, 2002).

Los modelos animales han sido muy útiles para el estudio de diferentes estados de la infección de *M. tuberculosis* y a la respuesta inmune del hospedero. Las tres especies más utilizadas son ratón, cuyo y conejo. Los ratones son los más usados debido a su bien estudiada genética, la disponibilidad de medir citocinas, su bajo costo de mantenimiento comparado con los otros animales (Orme and McMurray, 1996), así como a la existencia de cepas singénicas resistentes o sensibles a la infección por *M. tuberculosis* (Kramnik *et al.*, 2000).

Las micobacterias se inoculan en los animales por vía intravenosa, intratraqueal o mediante aerosoles. Se considera que la inoculación de una dosis baja por inhalación de aerosoles es el método fisiológicamente natural para infectar los animales con *M. tuberculosis*. El modelo con ratones BALB/c está bien caracterizado (Schwebach *et al.*, 2002; Gupta and Katoch, 2009).

Estudios realizados por Barrios-Payan y col., (2006), con ratones BALB/c infectados con cepas virulentas de *M. tuberculosis* muestran que los neutrófilos son las células inflamatorias más abundantes en la primer semana después de la infección y son una fuente importante de citocinas proinflamatorias (IL-1, IL-8 y TNF- α), contribuyendo al reclutamiento temprano de macrófagos y linfocitos y a su activación.

Cuando ratones BALB/c son infectados con *M. tuberculosis* (H37Rv) vía intratraqueal existe una fase inicial de resistencia parcial dominada por citocinas del tipo Th-1 más TNF- α y la isoforma inducible de sintasa del óxido nítrico (iNOS), seguida por una fase de enfermedad progresiva caracterizada por un incremento en la expresión

de IL-4, disminución en la expresión de TNF- α e iNOS, y bajos niveles de hipersensibilidad tardía (Fabre *et al.*, 2004).

Los resultados obtenidos con un modelo murino usando ratones híbridos C57Bl/6 x DBA/2 F1, sugirieron que la tuberculosis latente es inducida y mantenida por un patrón de citocinas tipo 1 más TNF- α y que las micobacterias se localizan principalmente en macrófagos alveolares e intersticiales, así como en el epitelio bronquial, células endoteliales y fibroblastos de áreas histológicamente normales o con evidencia de una respuesta inmune local (Arriaga *et al.*, 2002).

Recientemente se han realizado estudios para intentar determinar la participación de los neumocitos en la respuesta inmune ante una infección. El gran número de células epiteliales en los alvéolos hace que la probabilidad de interacción con una bacteria infectando el tejido pulmonar sea alta. En un estudio que realizamos previamente encontramos que la línea celular A549 (neumocitos humanos tipo II) produce y libera al medio de cultivo TNF- α , cuando son infectados con *M. tuberculosis* o *M. bovis* BCG. Esto mismo ocurre cuando los neumocitos se cultivan con sobrenadantes provenientes de cultivos de células A549 o monocitos humanos de sangre periférica previamente infectados con estas mismas especies de micobacterias (Castro-Garza *et al.*, 1997).

Investigadores han encontrado que las células epiteliales de pulmón, tanto *in vivo* como *in vitro* y provenientes de diferentes especies son capaces de producir diversas quimiocinas (Debbabi *et al.*, 2005), moléculas protectoras como lipocalina (Saiga *et al.*, 2008), defensinas (Rivas-Santiago *et al.*, 2008), NO (Yuhas *et al.*, 2009), así como citocinas. Entre las citocinas producidas por células epiteliales que han sido reportadas están TNF- α (McRitchie *et al.*, 2000; Bansal *et al.*, 2009), IL-10 (Haase *et al.*, 2007), IL-8 (Lee *et al.*, 2005; Kohwiwattanagun *et al.*, 2007) e IL-18 (Pechkovsky *et al.*, 2006), sin descartarse que tengan la capacidad de producir otras citocinas, hasta que no haya sido estudiada esta posibilidad. Por lo cual se plantea que las células epiteliales del pulmón tienen un papel en la respuesta inmune innata y en el inicio de la respuesta inmune específica en contra de la infección.

5.4 Modelo de rebanadas de tejido pulmonar.

Tanto los modelos *in vitro* como los modelos animales han sido muy útiles en el estudio de diferentes aspectos de la tuberculosis. Sin embargo, el modelo de rebanadas de tejido es un conveniente modelo intermedio que puede ser clasificado como *in vitro* o *ex vivo*. Este modelo reduce el número de animales usados en experimentación. En las rebanadas de tejido se mantiene la arquitectura tisular, de tal manera que todos los tipos celulares del tejido están presentes en una sola rebanada (Parrish *et al.*, 1995; de Kanter *et al.*, 1999; Lerche-Langrand and Toutain, 2000). Además se conservan las relaciones intercelulares, así como de las células con la matriz extracelular y por consiguiente, se refleja mejor el complejo nivel de organización biológica dentro del órgano (Gandolfi *et al.*, 1996). En contraste con otros modelos *in vitro*, la preparación de rebanadas de tejidos no requiere del uso de enzimas proteolíticas que rompen las interacciones intercelulares y que pueden dañar a las células. Además, las condiciones de preparación y aislamiento de rebanadas de tejidos a partir de diferentes órganos y especies, incluyendo humanos, son similares, por lo que resulta un modelo útil para llevar a cabo estudios entre especies y entre órganos de una misma especie (Brendel *et al.*, 1987). La utilización de rebanadas de tejidos permite evaluar el daño celular específico mediante técnicas microscópicas, tanto de luz como electrónicas (Phelps *et al.*, 1987).

Rebanadas de tejido de diferentes órganos se han utilizado para muy diversos estudios; entre estos órganos se incluyen hígado, riñón, corazón, intestino, próstata y bazo (Parrish *et al.*, 1995; Bach *et al.*, 1996; de Kanter *et al.*, 1999, 2002a). Para pulmón, se ha desarrollado un procedimiento que le proporciona consistencia sólida, lo que permite preparar y cultivar rebanadas de este tejido (Stefaniak *et al.*, 1992; Jaramillo, 2006).

El modelo de rebanadas de pulmón se ha utilizado para estudiar el metabolismo de algunos fármacos (Vickers *et al.*, 1997), la inducción de factores transcripcionales y de unión a DNA inducidos por arsénico (Wijeweera *et al.*, 2001), el metabolismo de

xenobióticos (de Kanter *et al.*, 2002b), los blancos celulares de combustibles (Hays *et al.*, 2003), la respuesta frente a alérgenos (Wohlsen *et al.*, 2003), el metabolismo de la nicotina (Price *et al.*, 2004), o como modelo para estudiar fibrosis pulmonar (Kasper *et al.*, 2004).

A pesar de las múltiples aplicaciones que presenta este sistema su empleo para el estudio de mecanismos y efectos de la infección por bacterias y virus ha sido muy reducido (Ebsen *et al.*, 2002; Goris *et al.*, 2009). Recientemente, nuestro grupo inició el trabajo con el modelo de rebanadas de tejido. A la fecha se ha logrado el cultivo de rebanadas de pulmón con buenas condiciones morfológicas y de viabilidad determinadas por histología (tinción de hematoxilina y eosina) y por la capacidad de los cultivos para reducir la sal de tetrazolio MTT (Jaramillo, 2006). Basado en ese trabajo, ahora realizamos la infección de rebanadas de pulmón murino con micobacterias y analizamos la localización preferente del bacilo en el tejido. También, en el presente trabajo se ha logrado realizar los primeros ensayos con este modelo para la cuantificación de citocinas luego de la infección con micobacterias. Contar con un modelo más para el estudio de la patogénesis de *M. tuberculosis* con las ventajas que presenta las rebanadas de tejido pulmonar puede ser de gran utilidad para en un futuro determinar mecanismos de acción, respuesta inmune inicial e interacciones celulares en la patogénesis de la enfermedad y posiblemente en el estudio de otros patógenos de vías aéreas.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Diseño experimental

Para la realización de este trabajo dividimos el protocolo de investigación en 3 etapas: a) obtención de rebanadas de tejido pulmonar y análisis de su viabilidad utilizando criterios histológicos b) cultivo e infección de rebanadas de pulmón; y c) cuantificación de la inducción de citocinas mediante PCR cuantitativa en tiempo real y ELISA. El análisis estadístico para los diferentes ensayos se describe en cada apartado correspondiente en la sección de métodos o de resultados.

6.2 Animales de laboratorio

Se utilizaron ratones machos de la cepa BALB/c con edad de entre 18-20 semanas, los cuales fueron obtenidos de Harlan México, S.A. de C.V. con un periodo de aclimatización mínimo de 2 semanas antes de usar. Se les proporcionó alimento para roedores PURINA® y agua a libre demanda, haciendo cambios de cama, agua y alimento cada tercer día.

6.3 Cultivo de micobacterias

Mycobacterium tuberculosis cepa H37Rv ha sido utilizada ampliamente en estudios de patogénesis de la tuberculosis (Brennan *et al.*, 1996). Las bacterias se cultivaron en medio Middlebrook 7H9 (Becton Dickinson, Maryland, USA) y suplementado con ácido oleico, albúmina, dextrosa y catalasa (OADC) (Becton Dickinson, Maryland, USA) y 0.2 % de glicerol a 37°C con una atmósfera de 5% de CO₂. Para la producción de lotes grandes de bacterias y su criopreservación, la cepa se cultivó en volúmenes de 100 ml en frascos de cultivo de 490 ml con tapón de rosca (Costar-Corning, New York, USA) por 7 días. Al final del tiempo de incubación, la suspensión bacteriana se homogenizó por agitación vigorosa para eliminar los agregados bacilares y se distribuyeron en alícuotas de 1.2 ml en tubos de plástico estériles con tapón de rosca de 2.0 ml y se almacenaron a -70 °C para mantener la cepa sin cambios a través de todo el proyecto. En el transcurso de la semana posterior a la congelación se tomaron tres tubos al azar, se prepararon diluciones 1:10 y se sembraron en medio de cultivo 7H10 para determinar el número de unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/ml) del cultivo almacenado. *Mycobacterium bovis* BCG, cepa no patogénica (Oettinger *et al.*, 1999), fue cultivada bajo las mismas condiciones que *M. tuberculosis* hasta obtener alícuotas de 1.2 ml de cultivo almacenadas a -70°C (figura 1).



Figura 1. Diagrama de cultivo de micobacterias. *M. tuberculosis* H37Rv y *M. bovis* BCG fueron inoculadas en medio de cultivo Middlebrook 7H9 suplementado e incubadas a 37°C con una atmósfera de CO₂ al 5% para obtener alícuotas y criopreservarlas -70°C.

6.4 Obtención y cultivo de rebanadas de pulmón.

6.4.1 Obtención de rebanadas de tejido pulmonar

Todo el proceso de obtención de rebanadas de pulmón fue realizado en condiciones asépticas y con material y soluciones estériles. Los ratones BALB/c fueron sacrificados mediante dislocación cervical y se disectó la piel del abdomen y tórax para abrir la cavidad pleural a lo largo de la línea media del cuerpo. Se canuló la tráquea con una sonda y se instiló agarosa al 0.7% disuelta en medio de cultivo RPMI 1640 (Gibco/Invitrogen, New York, USA) a 40°C, hasta llenar los pulmones, luego éstos se cubrieron con hielo para enfriar rápidamente la agarosa y permitirle solidificar para que los pulmones adquirieran una consistencia adecuada para obtener las rebanadas. Posteriormente, los dos pulmones de cada animal fueron extraídos y separados; se colocaron en solución Krebs-Henseleit (pH 7.4) (6.9 g NaCl, 0.36 g KCl, 0.13 g KH₂PO₄, 2.11 g NaHCO₃, 4.50 g D-glucosa anhidra, 0.25 g MgSO₄ · 7H₂O, 0.425 g CaCl₂ · 2H₂O en 1 L de agua MilliQ) y después de limpiar la superficie del órgano con la misma solución se colocaron en un vaso de precipitado de 250 ml con solución Krebs-Henseleit. Se obtuvieron cortes cilíndricos de tejido pulmonar utilizando un sacabocados de acero inoxidable de 5 mm de diámetro. A partir de los cilindros de tejido se prepararon rebanadas de pulmón de 5 mm de diámetro y entre 350-450 µm de grosor, utilizando un rebanador Brendel-Vitron (Vitron, Inc, Tucson Arizona, USA) con flujo constante de solución Krebs-Henseleit a 4°C y una mezcla de O₂/CO₂ (95:5 %). Las rebanadas se colectaron y colocaron en un vaso de precipitados de 500 ml con solución Krebs-Henseleit a 4°C. Una de las variantes que se realizaron en los ensayos preliminares fue la concentración de agarosa para instilar y rellenar los pulmones antes de extraerlos del animal, se utilizaron concentraciones de 0.5 a 0.8 % (figura 2).

6.4.2 Cultivo de rebanadas de pulmón

Las rebanadas recuperadas en solución Krebs-Henseleit se transfirieron a microplacas de 24 pozos (Corning Incorporated, New York, USA), colocando una rebanada por pozo conteniendo 1 ml de medio de cultivo DMEM/F12 (Sigma Chemical Company, Missouri, USA) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (Gibco BRL Laboratorios, New York, USA) y 25 mM de glucosa (Sigma Chemical Company, Missouri, USA). Las microplacas se incubaron a 37°C y 5% CO₂ en agitación lenta (~40 rpm). Después de 1 hora se realizó el primer cambio de medio DMEM/F12 suplementado (10% de SFB y 25 mM de glucosa), seguido de 3 cambios de medio cada 30 min para eliminar la agarosa. Para determinar el número adecuado de cambios de medio, en los estudios preliminares, se realizaron cada hora durante las primeras 6 horas de incubación (figura 3).



Figura 2. Diagrama de obtención de rebanadas de tejido pulmonar.

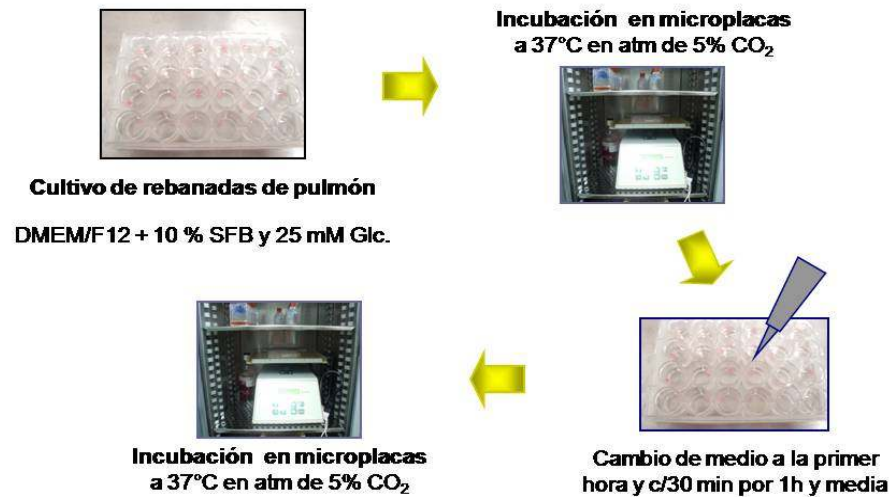


Figura 3. Diagrama de cultivo de rebanadas de pulmón.

6.5 Infección de las rebanadas de tejido

La densidad celular del tejido pulmonar es de un 10% en comparación con otros órganos del cuerpo, debido a que la mayor parte del pulmón se compone de espacios aéreos. Una rebanada de tejido hepático de 250 μ grosor y 5 mm diámetro contiene aproximadamente 2×10^6 células (AJ Gandolfi, comunicación personal) por lo que estimamos que las rebanadas obtenidas en este trabajo, con un promedio de 400 μ m de grosor, contienen aproximadamente 3.6×10^5 células. En los ensayos de estandarización para la técnica de infección de rebanadas, se inocularon bacterias en una relación de 10:1 y de 5:1 (bacterias:célula). Por los resultados obtenidos determinamos que el mejor inóculo fue en una relación de 5:1.

Las rebanadas se infectaron en las microplacas, luego del último lavado para retirar la agarosa. A cada pozo con rebanada se le adicionaron 250 μ l de medio DMEM completo, enseguida se le adicionó el inóculo directamente sobre la rebanada. Las

rebanadas infectadas se incubaron a 37°C y 5% CO₂ por 1 h sin agitación para facilitar la adherencia y posterior invasión de las micobacterias al tejido. Después se adicionó a cada pozo medio de cultivo suficiente para alcanzar un volumen final de 1 ml por pozo y se incubaron por 2, 6, 12, 24 y 48 horas (ver figura 4). El inóculo bacteriano se obtuvo a partir de los cultivos almacenados a -70 °C y a los cuales se les había determinado previamente el número de UFC/ml, con base en el cual se calculó el número de bacterias inoculadas.

El procedimiento anterior se utilizó para las rebanadas inoculadas con *M. tuberculosis* y con *M. bovis* BCG. Para la muestra testigo negativo (sin infectar), después de retirar el medio de cultivo de los pozos conteniendo las rebanadas, a cada pozo se le agregó 250 µl de medio, se incubó a 37°C y 5% de CO₂ por 1 h sin agitación y después se adicionó a cada pozo mas medio de cultivo para alcanzar un volumen final de 1 ml por pozo y se incubaron por 2, 6, 12, 24 y 48 horas.

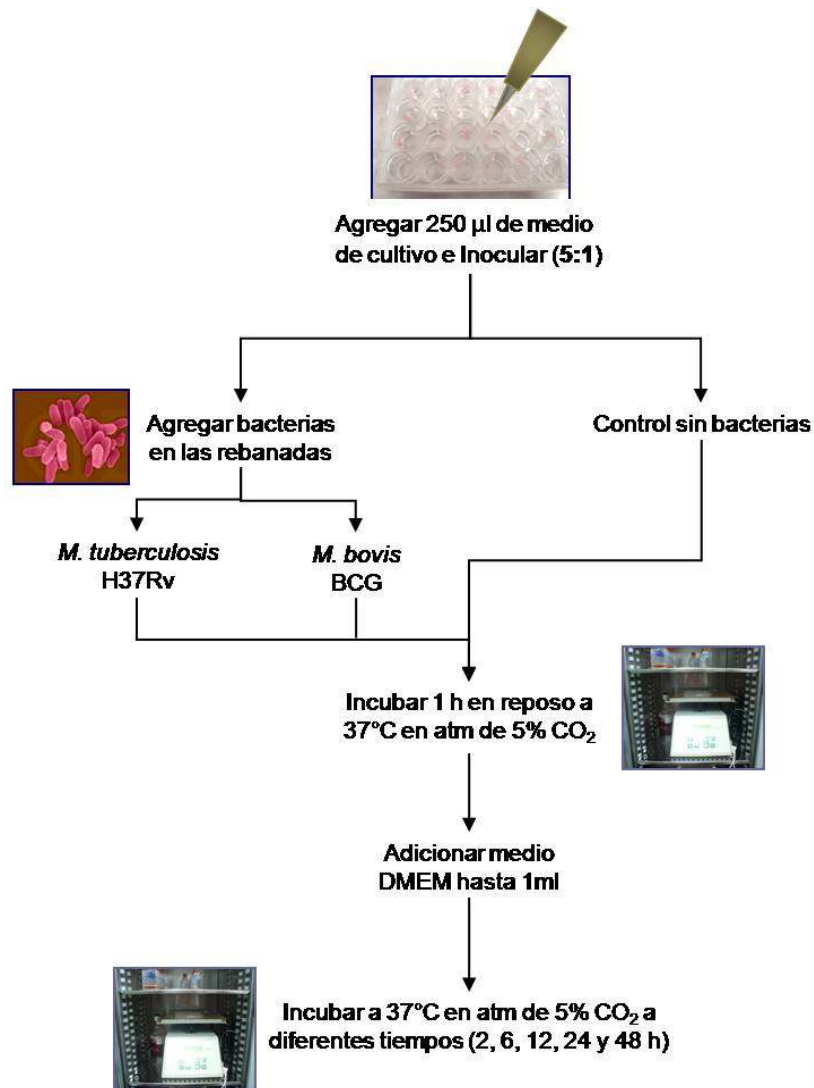


Figura. 4. Diagrama de infección de rebanadas de pulmón. A cada pozo se le agregaron 250 ml de medio para cubrir la rebanada e inmediatamente después se inoculó con las cepas bacterianas en una relación de 5:1 (bacterias:célula). Se incubaron a 37°C y 5% de CO₂ por 1 h sin agitación y después se adicionó a cada pozo el medio de cultivo suficiente para alcanzar un volumen final de 1 ml por pozo y se incubaron por 2, 6, 12, 24 y 48 horas.

6.6 Extracción de RNA total a partir de rebanadas de tejido pulmonar

6.6.1 Proceso de extracción de RNA de rebanadas de pulmón

Al final de cada tiempo de incubación, las rebanadas infectadas con *M. tuberculosis* cepa H37Rv o *M. bovis* cepa BCG y las rebanadas no infectadas se transfirieron a su correspondiente tubo eppendorf de 1.5 ml conteniendo 300 µl de solución de estabilización RNAlater (Qiagen, USA) para evitar el deterioro del RNA; se mantuvieron por 12 h a 4°C y posteriormente se almacenaron a -20°C. Todo el proceso desde la infección hasta el aislamiento del RNA se realizó en un laboratorio de bioseguridad nivel 3.

La extracción del RNA total se realizó con material libre de RNAsas, como tubos para microcentrífuga certificados, agua DEPC, soluciones disueltas en agua DEPC, recipientes de vidrio y material quirúrgico horneados a 300 °C por 3h, micropipetas reservadas para ese uso y cámaras de electroforesis tratadas con RNase AWAY (Molecular Bio-Products, CA, USA). Se usaron guantes para evitar la contaminación con las RNAsas. El agua DEPC se preparó añadiendo 1mL de DEPC 6.9M (dietilpirocarbonato, Calbiochem-Novabiochem Corporation, CA, USA) en 1 L de agua procesada en filtros MilliQ, se homogenizó por agitación, se incubó a 37 °C por un mínimo de 12 h, y se esterilizó por autoclave durante 15 min para hidrolizar el DEPC.

El RNA de rebanadas infectadas de pulmón infectadas con *M. tuberculosis* cepa H37Rv, *M. bovis* cepa BCG y rebanadas sin infectar se extrajo utilizando el kit de extracción RNeasy[®] Protect Mini (Qiagen, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante, como se describe a continuación. Para el proceso de extracción de RNA, cada rebanada se descongeló a temperatura ambiente por 30 min y se transfirió a un tubo con tapón de rosca de 2 ml conteniendo una matriz de sílica (MP Biomedicals, USA) para la lisis de las bacterias y se le agregaron 600 µl de solución RLT adicionado con DTT 2M.

Los tubos conteniendo cada muestra individual se colocaron en el equipo FAST PREP (FP 120, BIO 101 Inc. Carlsbad, CA, USA) y se procesaron por 40 segundos a una velocidad de 6.0 m/seg una sola vez. Al término del ciclo de lisis, se procedió a centrifugar a 12,000 Xg por 3 min y el sobrenadante se transfirió a un tubo eppendorff nuevo de 1.5 ml. Se adicionó 1 volumen de Etanol al 70% y se agitó con pipeta por 5 seg. Inmediatamente, se pasaron 700 µl de la muestra a la columna RNeasy en un tubo de recolección de 2 ml y se centrifugó a 8,000 Xg por 15 seg, se descartó la solución de lavado (en el caso en que el volumen de muestra fue superior a 700 µl se repitió el paso anterior). Se adicionaron 700 µl de solución RW1 a la columna RNeasy y se centrifugó a 8,000 Xg por 15 segundos para lavar la columna. Se descartó la solución de lavado y se adicionaron 500 µl de solución RPE a la columna RNeasy y se centrifugó a 8,000 x g por 15 seg y después de descartar la solución de lavado se agregaron 500 µl de solución RPE a la columna RNeasy y se centrifugó a 8,000 x g por 2 min. Para eliminar residuos de solución RPE o residuos del lavado, se colocó la columna RNeasy spin en un nuevo tubo de recolección de 2 ml y se centrifugó a 12,000 Xg por un minuto, posteriormente, se colocó la columna RNeasy en un nuevo tubo de recolección de 1.5 ml y se adicionaron 30 µl de agua libre de RNAsas directamente a la columna y se centrifugó a 8,000 x g por 1 min para eluir el RNA, el cual se almacenó a -70°C hasta su uso. Una vez aislado el RNA de las rebanadas, las muestras estaban libres de micobacterias vivas y se procesaron en el laboratorio convencional acondicionado para biología molecular.

6.6.2 Determinación de la concentración y pureza de RNA

Una vez extraído el RNA de las rebanadas infectadas con *M. tuberculosis* cepa H37Rv o *M. bovis* cepa BCG y las rebanadas no infectadas; se valoró su concentración y pureza mediante la lectura de las absorbancias a las longitudes de onda 260 y 280 nm en el espectrofotómetro NanoDrop Spectrophotometer ND-1000 (Thermo Scientific, Massachusetts, USA). Se midió 1.5 µl de la muestra directamente sin diluciones.

La concentración de RNA se calculó en base a la siguiente ecuación:

$$\text{Concentración ácido nucleico (ng/ml)} = A_{260 \text{ nm}} \times C \quad \text{\textit{Fórmula 1}}$$

Donde:

A_{260} = Valor de la absorbancia a la longitud de onda de 260 nm.

C = Coeficiente de extinción molar: en el caso del RNA en solución acuosa equivale a 40.

El cociente de las absorbancias a las longitudes de onda de 260/280 nm nos indica la calidad y pureza del RNA, considerándose de óptima calidad si la relación se encuentra entre 1.8 - 2. Cuando esta relación se encuentra por debajo de estos valores nos indica la presencia de proteínas, fenoles, otros contaminantes o degradación del ácido nucleico.

La integridad y calidad electroforética del RNA se obtuvo por visualización en geles de agarosa al 1.5% en condiciones desnaturalizantes. La agarosa se disolvió en solución MOPS 1X preparada con agua DEPC adicionado con 0.66 M de formaldehído en un volumen final de 30 ml. Diez microlitros de cada muestra fueron mezclados con 0.2 μ l de bromuro de etidio (10 mg/ml) (Research Organic Inc., Ohio, USA) y 2 μ l de solución de carga 5X. Las muestras se cargaron en el gel y se corrieron en una cámara de electroforesis horizontal (E-C minicel, New York, USA) por 45 minutos con una fuente de poder (Fotodyne, Wisconsin, USA) a 80 V; la visualización se hizo en un emisor de luz UV (Fotodyne, Wisconsin, USA).

6.7 Síntesis de DNA complementario (cDNA)

Posterior a la extracción del RNA de cada muestra, se procedió a realizar las reacciones de retrotranscripción para la obtención del DNA complementario (cDNA)

utilizando el kit ImProm-IITM Reverse Transcription System de Promega (Madison, Wisconsin, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se preparó una mezcla que incluyó 1 µl de hexámeros al azar (0.5 µg/µl), un volumen de la muestra conteniendo 100 ng de RNA, y agua libre de nucleasas para completar un volumen de 5 µl. Se colocó en el termociclador (PCR Sprint, Thermo-Hyaid; Waltham, MA) a 70° C por 5 min y se pasó inmediatamente a 4°C por 5 min. Mientras tanto, se prepararon las mezclas de reacción de transcripción reversa: 4 µl de buffer de reacción ImProm-IITM 5x (250mM Tris-HCl pH 8.3, 375mM KCl y 50mM DTT.); 3 µl de MgCl₂ 25 mM; 1µl de mezcla de dNTPs (10 mM de cada uno dGTP, dCTP, dATP y dTTP); 0.5 µl de inhibidor de ribonucleasas recombinante RNasin[®] (20 U/µl); 1 µl de Transcriptasa Reversa ImProm-IITM (20 U/µl) y agua libre de nucleasas para llevar a un volumen de 15 µl. Esta preparación se adicionó a la mezcla de RNA y se colocó en el termociclador a 25°C por 5 min, 42°C por 1 hora y 70°C por 15 min.

6.8 Cuantificación de la expresión de citocinas mediante qPCR.

Para los ensayos de PCR cuantitativa de la expresión del RNA de las citocinas TNF- α , IL1 α e IL1 β se utilizaron los ensayos de TaqMan[®] Gene Expression Assays marcados con FAMTM (Dye/MGB Probe) de Applied Biosystems. Como control endógeno se utilizó el gene de ratón GAPD marcado con VICTM (Dye/MGB Probe). Los ensayos TaqMan[®] emplean sondas fluorescentes que hibridan específicamente en la secuencia blanco (Livak *et al.*, 1995).

El estudio se realizó empleando el termociclador de tiempo real “*Applied Biosystems 7500 Real Time PCR System*” (CA, USA). En la mezcla de reacción se agregaron 12.5 µl de *Master Mix (TaqMan[®] Universal PCR Master Mix (2X))*, 1.25 µl (*20X Assay Mix*), 3 µl de cDNA (100 ng/mL) y 11.7 µl de agua para un volumen total de 25 µl.

Las condiciones de amplificación fueron: activación de 2 min a 50 °C, seguido de 10 min a 95 °C y 40 ciclos de amplificación (15 seg a 95 °C; 1 min a 60 °C). El calentamiento inicial durante 10 minutos a 95 °C se debe a la utilización del sistema de inicio en caliente (*hot start*) con el fin de reducir la formación de productos no específicos. La detección de fluorescencia se programó en la fase de extensión.

Como primer paso para llevar a cabo el análisis de expresión relativa, se realizó una curva estándar de amplificación para cada uno de los genes a probar y del gene endógeno, variando la concentración de cDNA y graficando el logaritmo de la concentración de cDNA contra el ciclo umbral (C_T ; ciclo de amplificación, donde la cantidad del amplicón llega a una cantidad predeterminada por el programa del termociclador). Si los valores de correlación (r^2) para cada curva estaban cercanos a 1 se consideró que la amplificación fue correcta y se procedió al siguiente paso.

Para la validación del uso del gene *GADP* como control endógeno se analizó la eficiencia de amplificación del gene *GADP* y de cada uno de los genes en estudio basados en los datos obtenidos de las curvas estándar y calculando por análisis de regresión lineal los valores de la recta de la relación entre el \log_{10} de la concentración del cDNA y el valor de la diferencia (ΔC_T) entre la C_T del gene menos la C_T del gene endógeno para cada concentración. Cuando el valor de la pendiente es cercana a 0, la eficiencia de amplificación para el control endógeno y los genes a estudiar son similares y por lo tanto la expresión del gene endógeno es adecuada para el análisis de expresión del resto de los genes. Se obtuvieron los ΔC_T para cada muestra siguiendo la fórmula 2. La pendiente de la línea de tendencia que se obtiene graficando el \log_{10} de la concentración de cDNA contra el ΔC_T , debe de ser menor a 0.1 para validar que el ΔC_T no varía con respecto a la concentración de cDNA.

$$\Delta C_T = C_T \text{ gen blanco} - C_T \text{ GADP} \qquad \text{Fórmula 2}$$

Si la eficiencia de amplificación era adecuada según lo descrito en el párrafo anterior, los datos de cuantificación de la expresión de los genes en estudio podían ser analizados por el método del $\Delta\Delta C_T$.

6.8.1 Cuantificación relativa por el método comparativo ($\Delta\Delta C_T$)

Se realizó la amplificación de los genes de las citocinas (*TNF- α* , *IL-1 α* e *IL-1 β*) y del gene *GADP* mediante PCR en tiempo real de los cDNAs obtenidos de las rebanadas infectadas con *M. tuberculosis* H37Rv, *M. bovis* BCG y las rebanadas no infectadas con la metodología ya mencionada en la sección 6.7. Los C_T 's obtenidos para *TNF- α* , *IL-1 α* e *IL-1 β* fueron normalizados con el gen referencia *GADP* (Fórmula 2) y se obtuvieron los ΔC_T para cada muestra. Posteriormente, se realizaron los cálculos matemáticos para la obtención de la cuantificación relativa de *TNF- α* , *IL-1 α* e *IL-1 β* por el método $\Delta\Delta C_T$ (Livak and Schmittgen, 2001) utilizando como calibrador el control sin infección (Fórmula 3 y 4).

Fórmula 3

$$\Delta\Delta C_T = (\Delta C_T)_{gen\ blanco\ tiempo X} - (C_{Tmedia\ genblanco} - C_{Tmedia\ GADP})_{Control\ tiempo X}$$

$$2^{-\Delta\Delta C_T} = \begin{array}{l} \text{Expresión de } gen\ blanco \text{ en rebanadas infectadas} \\ \text{relativa a la muestra control sin infección} \end{array} \quad \text{Fórmula 4}$$

6.9 Cuantificación de la expresión de citocinas (TNF- α , IFN- γ e IL-1 α) mediante la técnica de ELISA.

Los sobrenadantes de los cultivos de rebanadas infectadas con *M. tuberculosis* se colectaron a los tiempos de incubación determinados y se filtraron a través de membranas con tamaño de poro de 0.2 μm para eliminar todas las bacterias. Estos sobrenadantes filtrados se utilizaron para la cuantificación de las citocinas por el método ELISA.

Para la cuantificación de las citocinas se utilizaron los ensayos Murine TNF- α ELISA Development kit 900-K54, Murine IFN- γ ELISA Development kit 900-K98, Murine IL-1 α ELISA Development kit 900-K82 siguiendo las instrucciones del fabricante (Peprotech, New Jersey, USA).

El anticuerpo de captura de conejo específico para cada una de las citocinas se diluyó con PBS a una concentración de 0.5 $\mu\text{g/ml}$ y se agregaron inmediatamente 100 μl de esta solución a cada pozo de la microplaca (Costar, New York, USA), la cual se selló con una película adhesiva transparente (MicroAmp, California, USA) y se incubó por 24 h a temperatura ambiente. Posteriormente, se lavó la microplaca 4 veces con 300 μl de solución de lavado por pozo y al final de los lavados se agregaron 300 μl de solución de bloqueo a cada pozo y se incubó por 1 h a temperatura ambiente. Después de la incubación, la microplaca se lavó de la misma manera que la vez anterior y se dejó secar. Después de este proceso la placa se usó inmediatamente. Para cada análisis se preparó una curva estándar de cada citocina con concentraciones entre 0 y 4000 pg/ml . A cada pozo se le agregaron 100 μl de cada dilución de las muestras a analizar y se incubó por dos horas para luego lavar 4 veces con 300 μl solución de lavado por pozo por vez. A cada pozo se agregaron 100 μl del anticuerpo de detección, el cual previamente se diluyó a una concentración de 0.5 $\mu\text{g/ml}$ (0.25 $\mu\text{g/ml}$ por cada pozo); las microplacas se incubaron por 2 h a temperatura ambiente. Luego de la incubación, se lavó como se describió previamente y se le agregaron 100 μl del conjugado Avidina-HRP diluido previamente 1:2000 en diluyente (0.05% Tween-20, 0.1% BSA en PBS). Se incubó por 30 min a temperatura ambiente y se lavó nuevamente para luego agregar 100 μl del substrato ABTS a cada pozo, incubándose a temperatura ambiente para el desarrollo del color. La absorbancia a 450 nm con corrección a 650 nm se leyó cada 5 minutos después de agregado el substrato hasta por 35 min, cuidando que la densidad óptica (DO) del blanco no excediera las 0.2 unidades de DO y que la lectura de la concentración más alta del estándar no excediera las 1.2 unidades de DO. Las lecturas de absorbancia se realizaron en un equipo *SynergyTM HT Multinode Microplate Reader* de BioTek (VT, USA) con el software *Gen5TM Data Analysis* para finalmente proceder al análisis de los resultados.

Los datos se sometieron a pruebas de estadística descriptiva y exploratoria. Se comprobaron los requisitos de normalidad mediante el estadístico D con la prueba de Kolmogorov-Smirnov para distribución normal. Para probar la igualdad de las medias se utilizó un análisis de varianza, y en aquellos casos en donde la hipótesis nula fue rechazada se aplicó la prueba de contrastes HSD (diferencia honesta significativa) de Tukey para probar cuáles medias fueron diferentes. Se mantuvo el nivel global de α de todas las comparaciones en 0.05. El análisis estadístico se llevó a cabo en el paquete SPSS Statistics 15 (IBM Company, Chicago, Illinois, USA).

6.10 Análisis histopatológico

Para el análisis histopatológico, rebanadas de cada tiempo de incubación y de cada grupo experimental fueron fijadas en formalina neutra (10% en PBS) y se dejaron por 24 horas a 4 °C para la inactivación de las micobacterias (Castro-Garza, *et. al.*, 2007). Se utilizó una microplaca diferente para cada tiempo de incubación, para evitar que los vapores del formaldehído afectaran al resto de los cultivos celulares. Además las rebanadas de cada grupo experimental se fijaron directamente en viales con 4 ml de formol neutro. Luego, fueron incluidas en parafina en el histoquinette Citadel 1000 (Shandon, Pennsylvania, USA), se procesaron mediante la técnica histológica convencional y se obtuvieron cortes de 5 μ m, los cuales fueron teñidos con hematoxilina y eosina (H&E) y con la tinción de Zielh Neelsen (Z-N) para ser analizados utilizando un microscopio de luz con campo claro.

7. RESULTADOS

7.1 Cultivo de micobacterias

Se cultivaron y criopreservaron a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ las cepas micobacterianas. La cepa H37Rv de *M. tuberculosis* con una densidad bacteriana de 8.93×10^6 unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/ml) y la cepa BCG de *M. bovis* con una densidad de 4.76×10^6 UFC/ml.

7.2 Obtención y cultivo de rebanadas de pulmón

Estudios previos en el laboratorio demostraron que las rebanadas de tejido pulmonar murino se mantienen en buenas condiciones fisiológicas comprobado por el ensayo de MTT y análisis histológico (Jaramillo, 2006). Para este trabajo se optimizó el método de obtención y cultivo de las rebanadas. Las mejores condiciones para la obtención de las rebanadas de pulmón fueron utilizar una concentración de 0.7% de agarosa para instilar los pulmones antes de ser extraídos del ratón; y realizar cambios de medio después de la primer hora de incubación y seguido de 3 cambios de medio cada 30 min; después de esto las rebanadas se mantuvieron en cultivo en el medio DMEM completo. Los análisis histopatológicos mostraron que las rebanadas de tejido pulmonar mantienen la estructura normal del tejido sin presentar evidencias de daño tisular o necrosis a los diferentes tiempos analizados (figura 5).

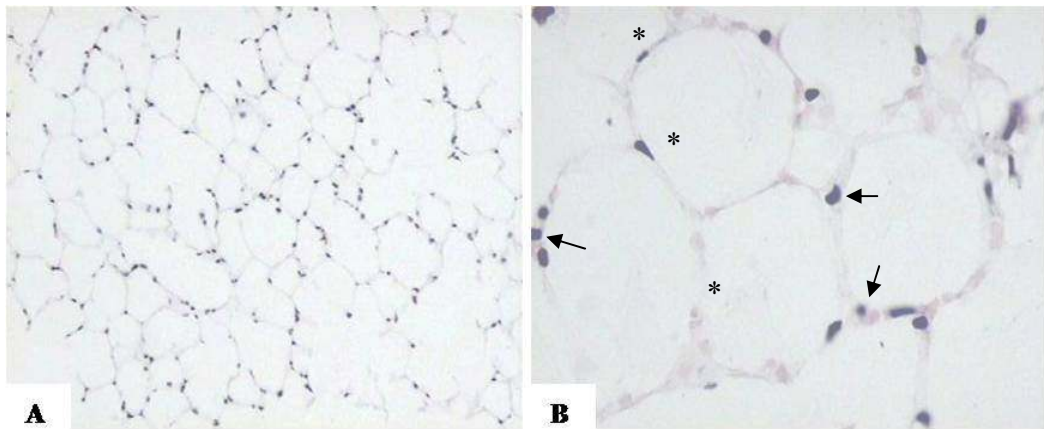


Figura 5. Rebanadas de tejido pulmonar murino. Las figuras muestran rebanadas de pulmón teñidas con la técnica de H&E. En **A** se observa la arquitectura pulmonar normal con los espacios alveolares delimitados por tabiques finos o septos alveolares correspondientes a tejido pulmonar sin alteraciones (Amplificación 100X). En **B**, acercamiento de los espacios alveolares, identificándose neumocitos tipo I (asteriscos), los cuales son células planas, y en los ángulos de intersección alveolar se identifican neumocitos tipo II (flechas) que presentan una morfología cúbica (Amplificación 400X).

7.3 Infección de las rebanadas de tejido pulmonar

La infección de las rebanadas de tejido pulmonar resultó exitosa como lo demuestran los análisis histológicos mediante las tinciones de H&E y la de Z-N. Tanto las rebanadas sin infectar (testigo) como las infectadas mantuvieron su estructura histológica normal durante todo el tiempo de incubación (ver figura 6).

Las modificaciones para mejorar la técnica de infección consistieron en dejar las rebanadas en la cantidad mínima requerida de medio de cultivo para mantener la rebanada sumergida (250 μ l), inocular las micobacterias directamente sobre la rebanada e iniciar la incubación sin agitación por 1 h antes de agregar el medio de cultivo para llevarlo a su volumen final. Esto facilitó la interacción de las micobacterias con el tejido y por lo tanto la infección de las rebanadas.

En las rebanadas infectadas se observaron bacilos de *M. tuberculosis* cerca de los septos alveolares, neumocitos tipo II y en los espacios alveolares como se puede apreciar en la figura 7.

En las figuras 8 y 9 se pueden apreciar distintos campos con micobacterias a diferentes tiempos de incubación (0 - 48 h) después de la infección con *M. tuberculosis* H37Rv o *M. bovis* BCG. Se observa discreto engrosamiento de los septos alveolares con infiltrado inflamatorio crónico leve. La visualización de micobacterias para ambos grupos experimentales fue muy similar sin embargo la localización de *M. tuberculosis* H37Rv se observó generalmente próxima a los septos alveolares y a los neumocitos tipo II. Mientras que la localización de *M. bovis* BCG fue principalmente como bacilos libres en los espacios alveolares y en menor grado cercana a los neumocitos tipo II.

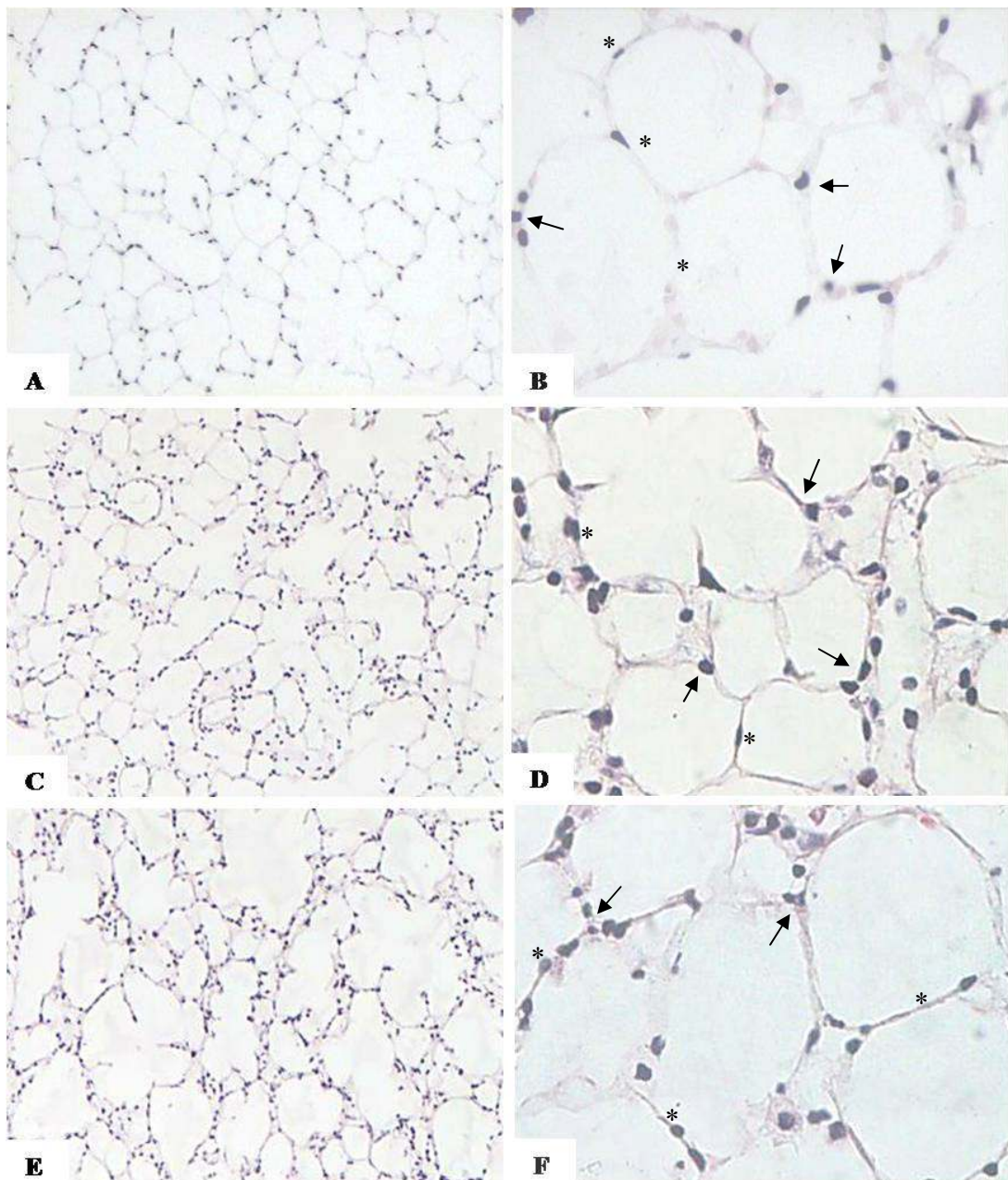


Figura 6. Rebanadas de tejido pulmonar murino (24h). Las figuras muestran rebanadas de pulmón teñidas con la técnica de H&E. En **A** (rebanada no infectada), **C** (rebanada infectada con *M. tuberculosis* H37Rv) y **E** (rebanada infectada con *M. bovis* BCG) se observa la arquitectura pulmonar característica con los espacios alveolares delimitados por septos alveolares (Amplificación 100X). En **B** (rebanada no infectada), **D** (rebanada infectada con *M. tuberculosis* H37Rv) y **F** (rebanada infectada con *M. bovis* BCG) se observan los alveolos y neumocitos tipo I (asteriscos) y tipo II (flechas) (Amplificación 400X).

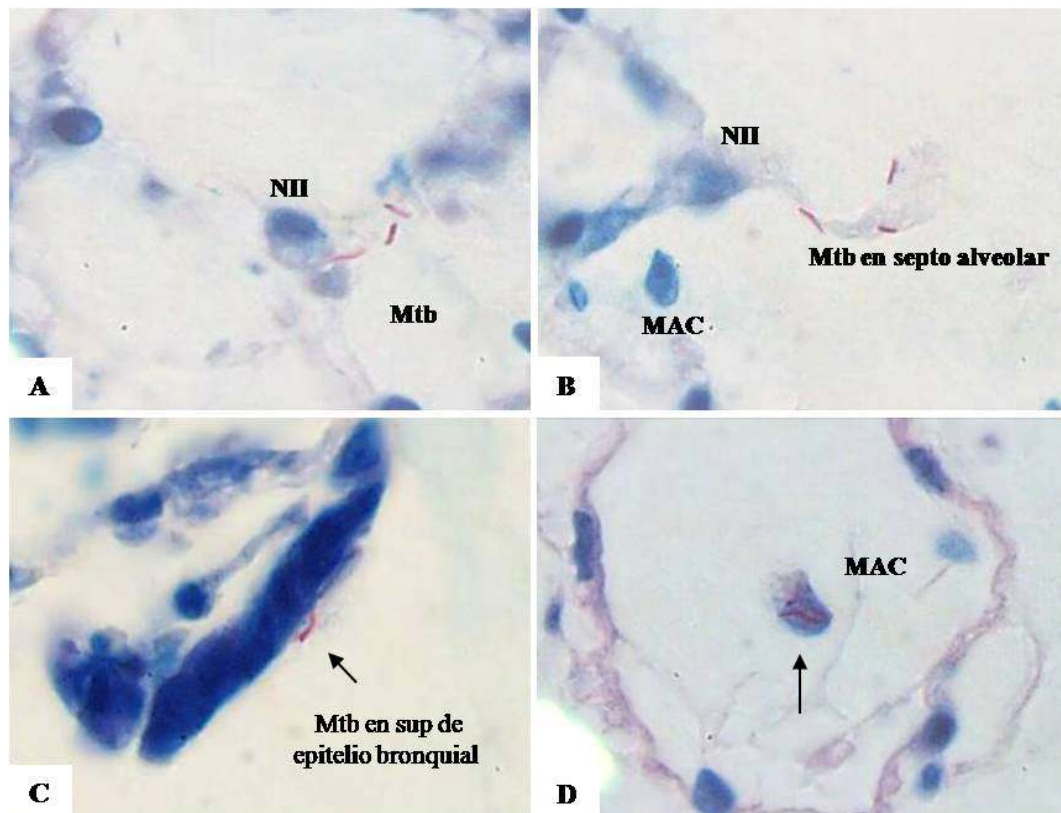


Figura 7. Rebanadas de pulmón infectadas con *M. tuberculosis* a 24h. (A) Se observan micobacterias en contacto con neumocitos tipo II (NII); en (B) la interacción es con los septos alveolares, y en los espacios alveolares. También se observan macrófagos (MAC). (C) Además se localizaron bacilos acidorresistentes en la superficie de epitelio bronquial y (D) dentro de macrófagos (MAC). Tinción Ziehl Neelsen (Amplificación 1000X).

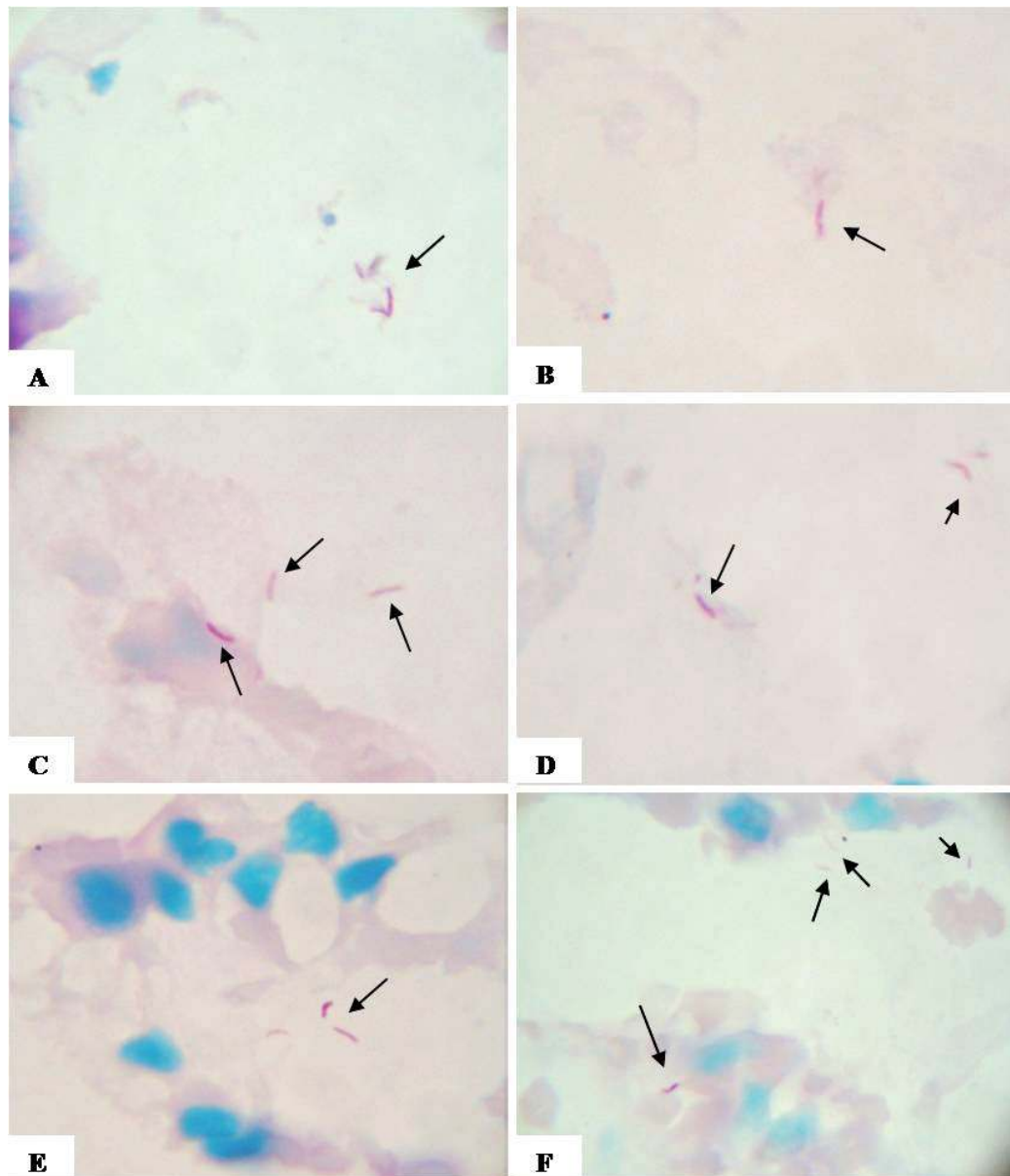


Figura 8. Rebanadas de pulmón infectadas con *M. tuberculosis* H37Rv (A, C, E) y con *M. bovis* BCG (B, D, F). A 1 h de incubación las micobacterias se localizan en los espacios alveolares (A y B). A las 2 horas de incubación los bacilos ácido alcohol resistentes localizados cerca de las paredes celulares (C) y en los espacios alveolares (D). A las 6 horas después de la infección se observan micobacterias localizados en acúmulos en los espacios alveolares (E y F). Tinción Ziehl Neelsen (Amplificación 1000X).

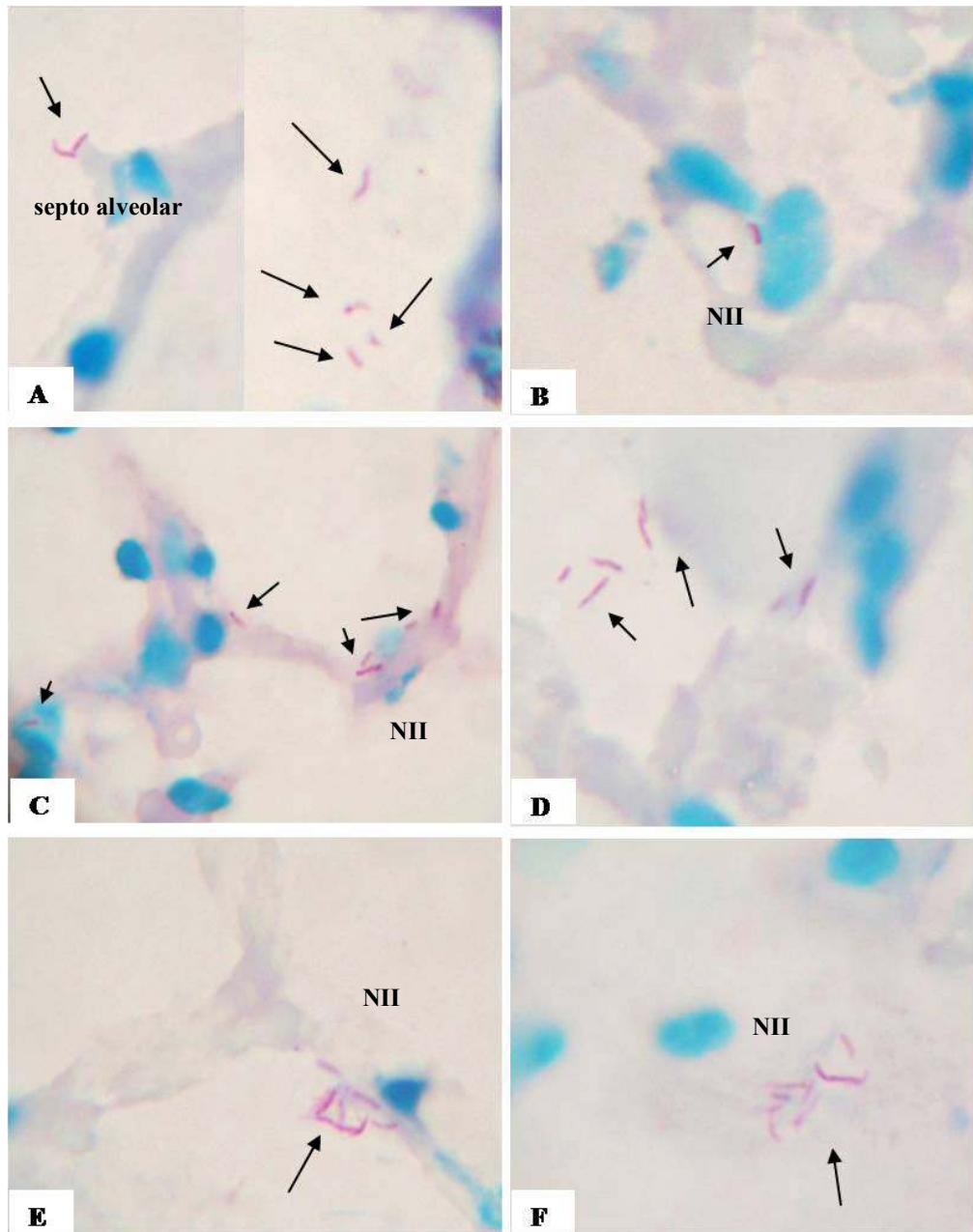


Figura 9. Rebanadas de pulmón infectadas con *M. tuberculosis* H37Rv (A, C, E) y con *M. bovis* BCG (B, D, F). A las 12 horas (A y B), 24 horas (C y D) y 48 horas (E y F) se observan micobacterias localizadas preferentemente cerca de neumocitos tipo II (NII), los septos alveolares, y en los espacios alveolares. Tinción Ziehl Neelsen (Amplificación 1000X).

7.4 Extracción de RNA total a partir de rebanadas de tejido pulmonar

A partir del tejido pulmonar se estandarizó la extracción de RNA con el Kit RNeasy de Qiagen con concentración y pureza satisfactorias, determinadas por su cuantificación por espectrofotometría y su relación de absorbancia 260/280 y 260/230 nm, los valores de las muestras estuvieron entre 1.71 y 2.45. Para obtener suficiente RNA de las muestras se procesaron de 2 a 3 rebanadas por cada muestra experimental que resultó ser la mejor cantidad de tejido para tal efecto.

Utilizando el procedimiento estandarizado y descrito en la sección 6.6.2 la calidad electroforética del RNA obtenido fue buena ya que se pueden observar claramente las bandas de los RNA ribosomales 28s y 18s que indican la integridad del RNA de las rebanadas de tejido pulmonar como se demostró al visualizarlo en un gel de agarosa al 1.5% (figura 10).

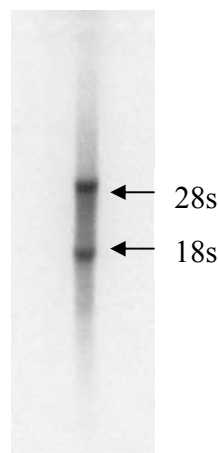


Figura 10. Extracción del RNA total de tejido pulmonar de ratón. El RNA total obtenido por el método estandarizado se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. Se puede observar de manera definida las bandas correspondientes a las unidades 28s y 18s de los RNA ribosomales que indica la integridad del RNA. El carril contiene aproximadamente 1 μ g de RNA total.

7.5 Síntesis de DNA complementario (cDNA)

A partir del RNA aislado se realizaron las reacciones de retrotranscripción para la obtención del cDNA. Se cuantificó la concentración del cDNA colocando 2.0 μl de cada muestra sin diluir en el Nanodrop, obteniéndose rangos desde 102.74 ng/ μl hasta 841.67 ng/ μl . Estos resultados mostraron una producción de cDNA con una pureza adecuada, basada en la relación de las absorbancias a 260/280 nm, de entre 1.55 y 1.99. La concentración de los cDNA se ajustó a 100 ng/ μl diluyéndolo en H₂O milliQ estéril para su uso posterior.

7.6 Cuantificación de la expresión de citocinas mediante la técnica de ELISA

Los resultados de las curvas estándar para la cuantificación de la concentración de las citocinas TNF- α , IFN- γ e IL-1 α (figuras 11-13) concordaron con las especificaciones requeridas para realizar el análisis. Los valores de r^2 obtenidos por análisis de regresión fueron de 0.9720 para TNF- α , 0.9939 para IFN- γ y de 0.9393 para IL-1 α .

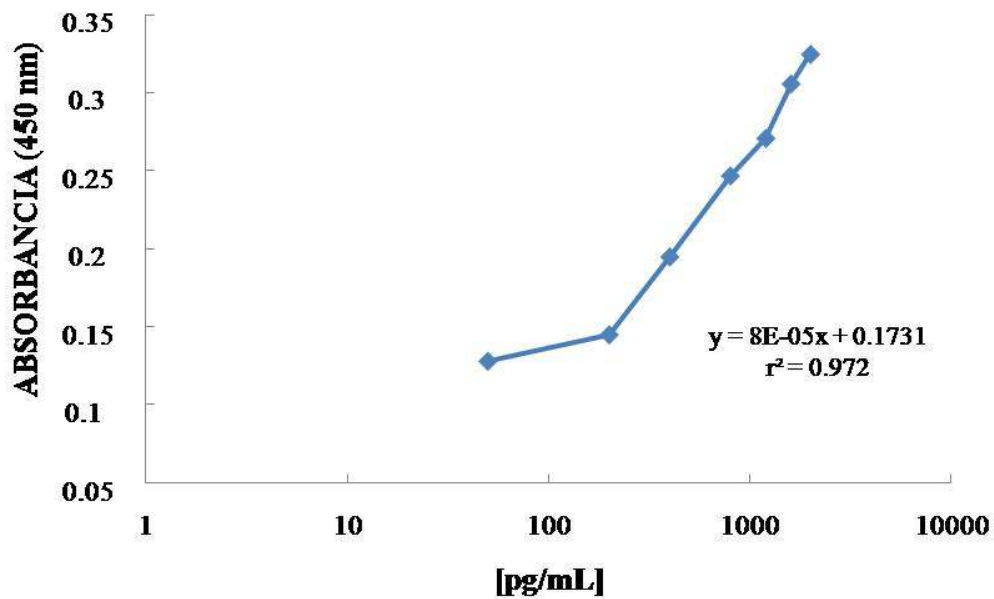


Figura 11. Curva estándar del ELISA para TNF- α . La gráfica muestra la Abs contra el \log_{10} de la concentración de TNF- α . En la gráfica se muestran la ecuación de la línea de regresión y el valor de r^2 .

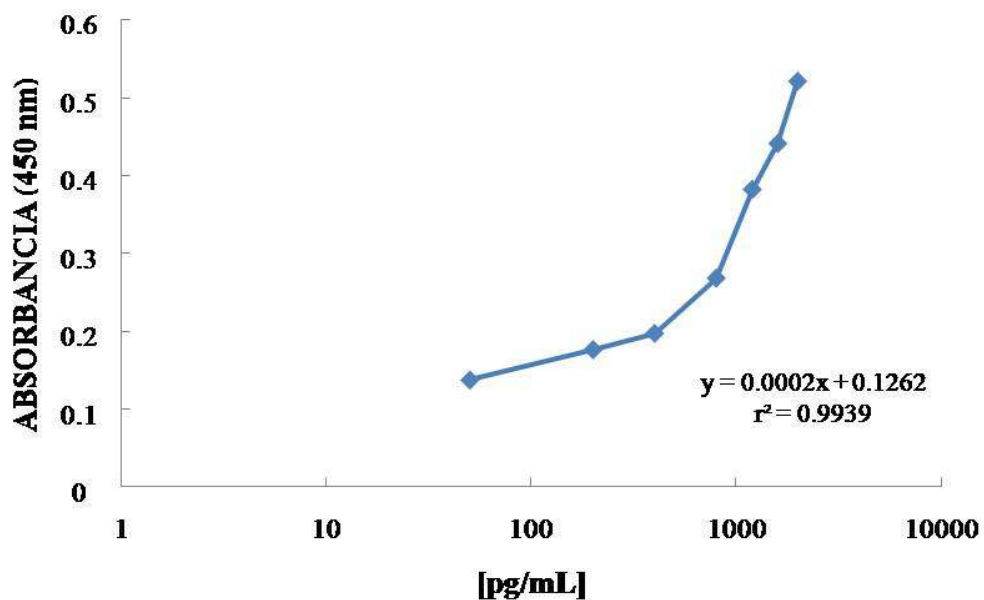


Figura 12. Curva estándar del ELISA para IFN- γ . La gráfica muestra la Abs contra el \log_{10} de la concentración de IFN- γ . En la gráfica se muestran la ecuación de la línea de regresión y el valor de r^2 .

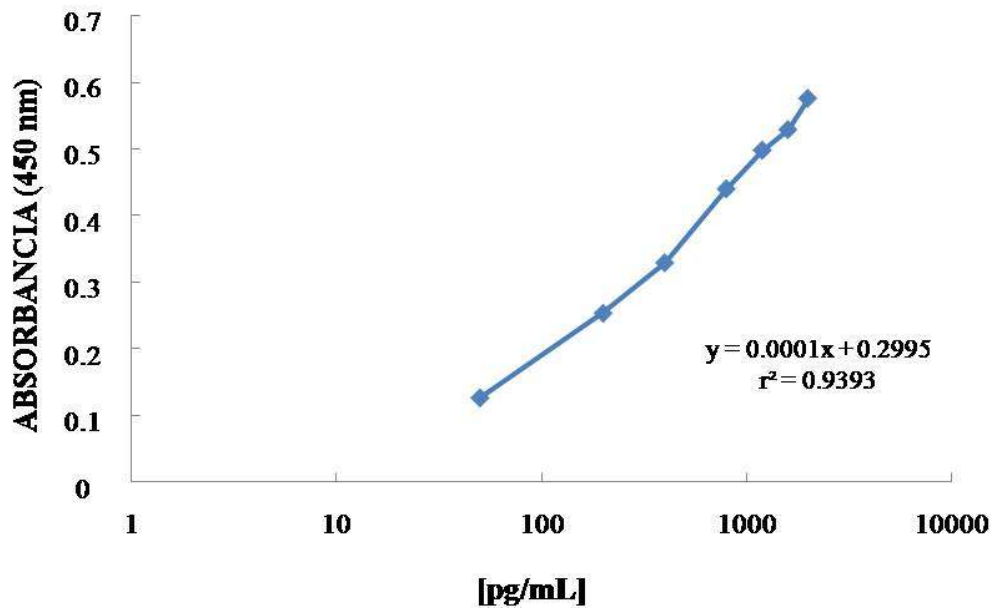


Figura 13. Curva estándar del ELISA para IL-1 α . La gráfica muestra la Abs contra el \log_{10} de la concentración de IL-1 α . En la gráfica se muestran la ecuación de la línea de regresión y el valor de r^2 .

Mediante este método no se logró detectar la presencia de IL-1 α y TNF- α en el sobrenadante de las rebanadas infectadas tanto con *M. tuberculosis* como con *M. bovis*. En cuanto al IFN- γ , los resultados muestran una tendencia de aumento en la expresión con respecto al tiempo de infección, sin embargo, solo en los sobrenadantes de las rebanadas infectadas con *M. tuberculosis* se determinaron valores por arriba de las rebanadas sin infectar. En los sobrenadantes de las rebanadas infectadas con *M. bovis* BCG, los valores obtenidos fueron menor que en las rebanadas testigo (figura 14).

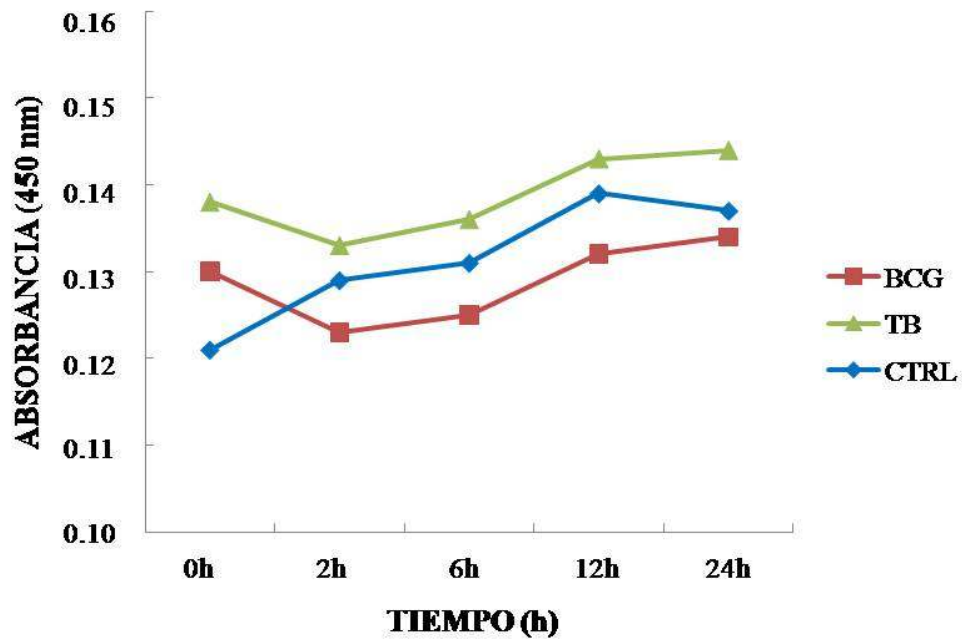


Figura 14. Cuantificación de la expresión de IFN- γ mediante ELISA. La gráfica muestra la Abs contra el tiempo de incubación de las rebanadas de pulmón. Se puede apreciar una expresión mayor para las rebanadas infectadas con *M. tuberculosis*.

7.7 Cuantificación de la expresión de citocinas mediante qPCR en Tiempo Real

Como se mencionó previamente en la sección de metodología, para la cuantificación de la expresión génica por este método, es necesario obtener primero el valor C_T . Al momento de llevarse a cabo la amplificación en el equipo, el programa calcula automáticamente el C_T . Teniendo los valores de cada ensayo, se graficó el \log_{10} de la concentración del cDNA contra los valores de C_T para obtener las curvas estándar para cada gene a estudiar (figuras 15-18).

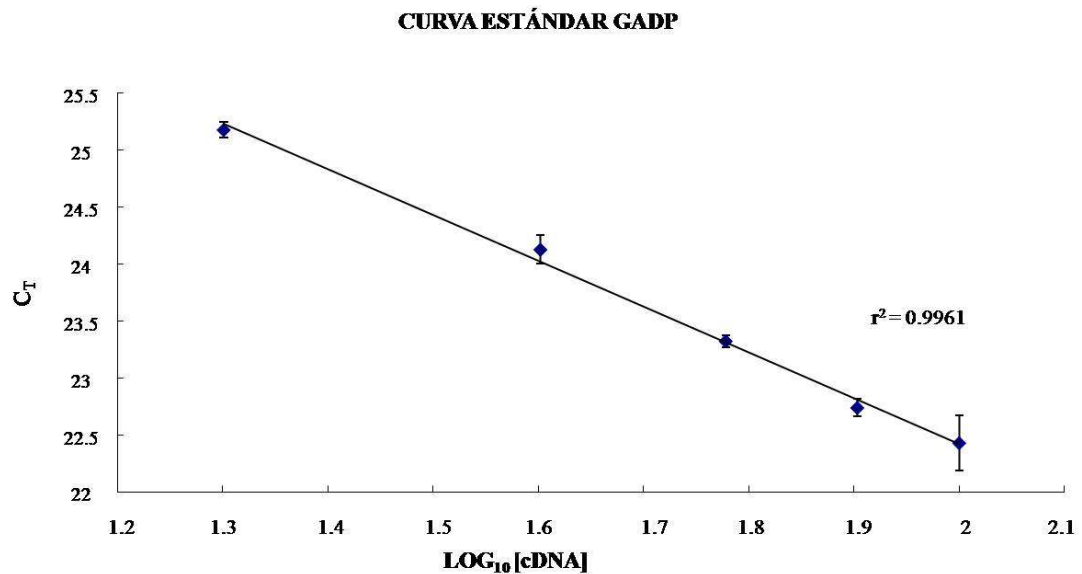


Figura 15. Eficiencia de los oligonucleótidos marcados con sondas TaqMan[®] para cuantificar la expresión para *GADP* mediante qPCR tiempo real de los cDNA's de las rebanadas de pulmón. La gráfica muestra el C_T contra el logaritmo de la concentración de los cDNA's en cada dilución (promedio y desviación estándar de cada triplicado). El valor de r² se muestra en la parte derecha de la gráfica.

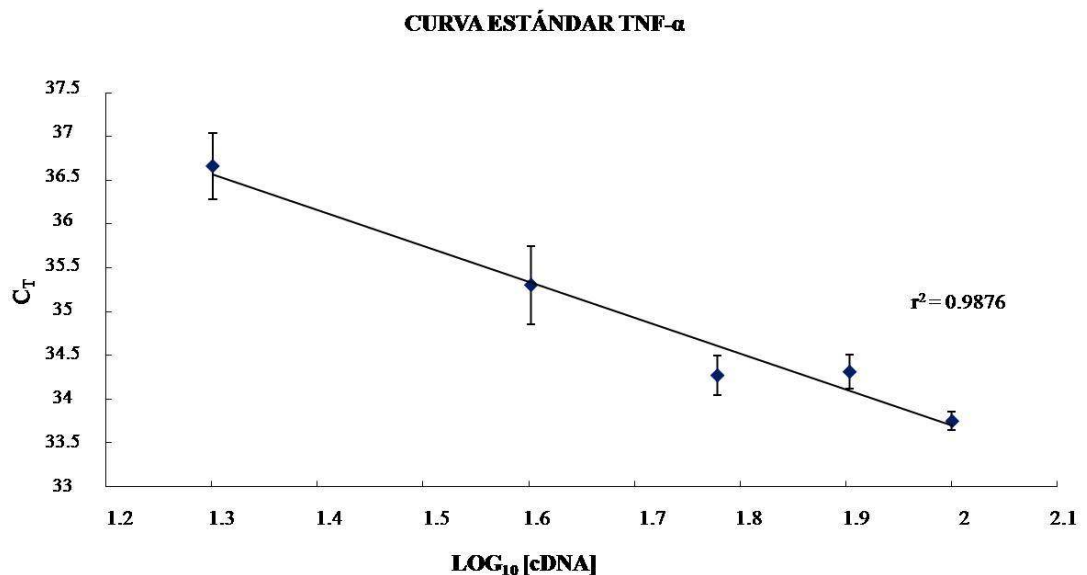


Figura 16. Eficiencia de los oligonucleótidos marcados con sondas TaqMan[®] para cuantificar la expresión para *TNF-α* mediante qPCR tiempo real de los cDNA's de las rebanadas de pulmón. La gráfica muestra el C_T contra el logaritmo de la concentración de los cDNA's en cada dilución (promedio y desviación estándar de cada triplicado). El valor de r² se muestra en la parte derecha de la gráfica.

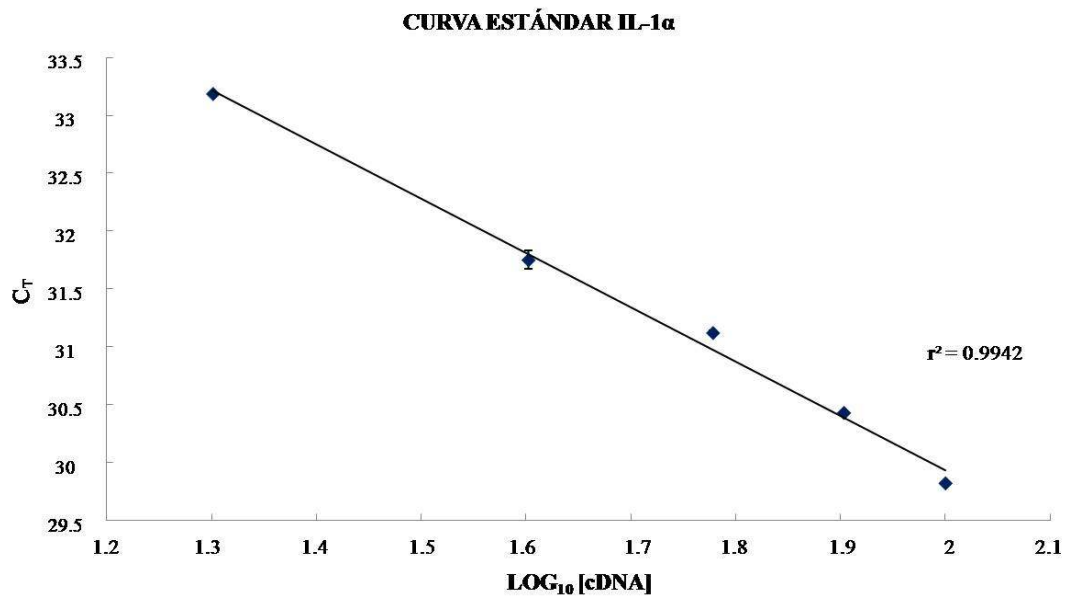


Figura 17. Eficiencia de los oligonucleótidos marcados con sondas TaqMan[®] para cuantificar la expresión para *IL-1 α* mediante qPCR tiempo real de los cDNA's de las rebanadas de pulmón. La gráfica muestra el C_T contra el logaritmo de la concentración de los cDNA's en cada dilución (promedio y desviación estándar de cada triplicado). El valor de r² se muestra en la parte derecha de la gráfica.

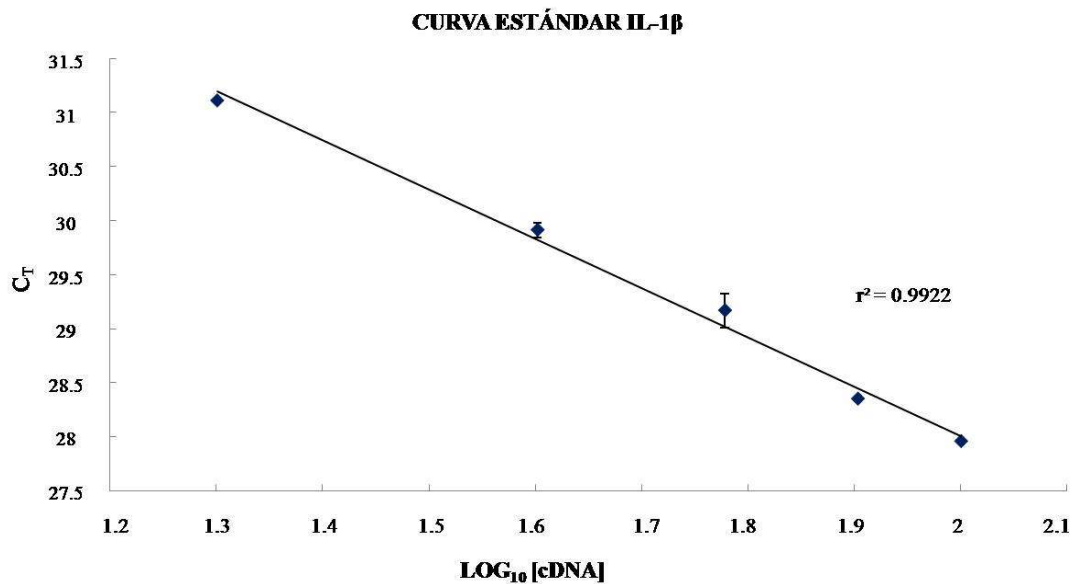


Figura 18. Eficiencia de los oligonucleótidos marcados con sondas TaqMan[®] para cuantificar la expresión para *IL-1 β* mediante qPCR tiempo real de los cDNA's de las rebanadas de pulmón. La gráfica muestra el C_T contra el logaritmo de la concentración de los cDNA's en cada dilución (promedio y desviación estándar de cada triplicado). El valor de r² se muestra en la parte derecha de la gráfica.

Posteriormente se diseñó una hoja de cálculo (figura 19) con algoritmos para obtener la ΔC_T de cada amplificación y realizar el análisis para saber si era válido usar el gene *GADP* como gene endógeno y testigo de nuestros ensayos. Cuando el gene *GADP* fue validado para cada gene en estudio, se utilizó el análisis $\Delta\Delta C_T$ para determinar el perfil de expresión.

	B	C	D	E	F	G	H	I	J
1		Tiempo	Ct <i>GADP</i>	Ct <i>IL-1b</i>	ΔC_t	$\Delta\Delta C_t$	$2^{-\Delta\Delta C_t}$	Mean Fold Change	S.D.
2					$(Ct_{IL-1b} - Ct_{GADP})_{i,t} - (Ct_{IL-1b} - Ct_{GADP})_{i,ctrl}$	$(Media Ct_{IL-1b} - Media Ct_{GADP})_{i,t} - (Media Ct_{IL-1b} - Media Ct_{GADP})_{i,ctrl}$		in gene expression	
3	BCG		21,3935	27,8078	6,4143		0,4082	0,7536	
4		0	20,8159	27,7401	6,9242		0,9181	0,5292	0,159
5			21,2956	26,2100	4,9144		-1,4507	2,7333	
6		2	21,3684	26,3207	4,9523		-1,4128	2,6624	2,6979
7			21,4782	27,2369	5,7587		-2,4176	5,3426	
8		6	21,6513	27,2700	5,6187		-2,5576	5,8871	5,6149
9			21,8919	28,0387	6,1468		-1,4457	2,7239	
10		12	21,7681	28,0133	6,2452		-1,3473	2,5443	2,6341
11			22,3318	29,7337	7,4019		-0,8816	1,8424	
12		24	22,1514	29,6053	7,4539		-0,8296	1,7772	1,8098
13									
14	TB		20,7793	27,9707	7,1914		1,1853	0,4397	
15		0	21,8935	27,9777	6,0842		0,0781	0,9473	0,6935
16			21,3741	28,0090	6,6349		0,2698	0,8294	
17		2	22,0427	28,0170	5,9743		-0,3908	1,3111	1,0702
18			21,1607	28,5124	7,3517		-0,8245	1,7710	
19		6	20,9396	28,1811	7,2415		-0,9347	1,9116	1,8413
20			21,8928	28,7635	6,8707		-0,7218	1,6492	
21		12	21,6034	28,6822	7,0788		-0,5137	1,4277	1,5384
22			21,4823	28,9772	7,4949		-0,7886	1,7274	
23		24	21,8005	29,1620	7,3615		-0,9220	1,8947	1,8111
24									
25	CTRL		26,3234	32,6418	6,3184		0,3123	0,8054	
26		0	26,1272	31,8210	5,6938		-0,3123	1,2417	1,0235
27			21,4117	27,8353	6,4236		0,0585	0,9602	
28		2	21,3095	27,6160	6,3065		-0,0586	1,0414	1,0008
29			21,4777	30,0693	8,5916		0,4154	0,7498	
30		6	21,4416	29,2025	7,7609		-0,4154	1,3336	1,0417
31			21,6388	29,2844	7,6456		0,0531	0,9638	
32		12	21,8748	29,4141	7,5393		-0,0532	1,0375	1,0007
33			21,4299	29,8595	8,4296		0,1461	0,9037	
34		24	21,2798	29,4172	8,1374		-0,1461	1,1066	1,0051

Figura 19. Hoja de cálculo Excel para obtener valores ΔC_T y $\Delta\Delta C_T$. Los datos se calcularon en base a las formulas 2 y 3 de la sección de materiales y métodos.

Los valores de los C_T obtenidos fueron normalizados para obtener los valores ΔC_T , al restar los C_T 's de la amplificación del gen *GADP* a los valores de C_T obtenidos de la amplificación del gen *TNF- α* . Después se realiza un análisis de regresión lineal y se obtiene el valor de la pendiente; cuando este valor es igual o menor a 0.1, se considera

que el gene endógeno es adecuado para usarlo como testigo en el análisis de expresión mediante el método de $\Delta\Delta C_T$.

Obtenidos los valores de ΔC_T se procedió al cálculo del $\Delta\Delta C_T$ aplicando la fórmula 3 (sección 6.8.1 de Materiales y Métodos) para el gene de *TNF- α* . Una vez determinado el $\Delta\Delta C_T$ se procedió a evaluar la expresión relativa del gen de interés (en rebanadas de pulmón infectadas) en comparación a las muestras testigo (muestras sin infección) utilizando la fórmula 4 (sección 6.8.1 de Materiales y Métodos). Los datos se analizaron utilizando una hoja de cálculo de Excel (figura 18) que contenía los algoritmos para tal fin. En la figura 19, se encuentran graficados los cambios en la expresión de *TNF- α* en las rebanadas de tejido pulmonar infectado con respecto a su expresión en las rebanadas control sin infectar. Las rebanadas inoculadas con *M. bovis* BCG presentaron un aumento progresivo en la expresión de *TNF- α* hasta las 6 horas donde alcanzó su máxima expresión (7.31 aumentos) en relación a la expresión cuantificada en las muestras control; después la expresión relativa disminuye a los tiempos de 12 y 24 horas. Las rebanadas infectadas con *M. tuberculosis* H37Rv también presentaron el mismo patrón de aumento que las inoculadas con la cepa no virulenta con un aumento progresivo en la expresión de *TNF- α* hasta las 6 horas donde alcanzó su máxima expresión (2.62 aumentos) en relación a la expresión cuantificada en las muestras control; después la expresión relativa disminuye a los tiempos de 12 y 24 horas. Sin embargo como se puede apreciar el aumento relativo en expresión fue menor para las muestras infectadas con tuberculosis.

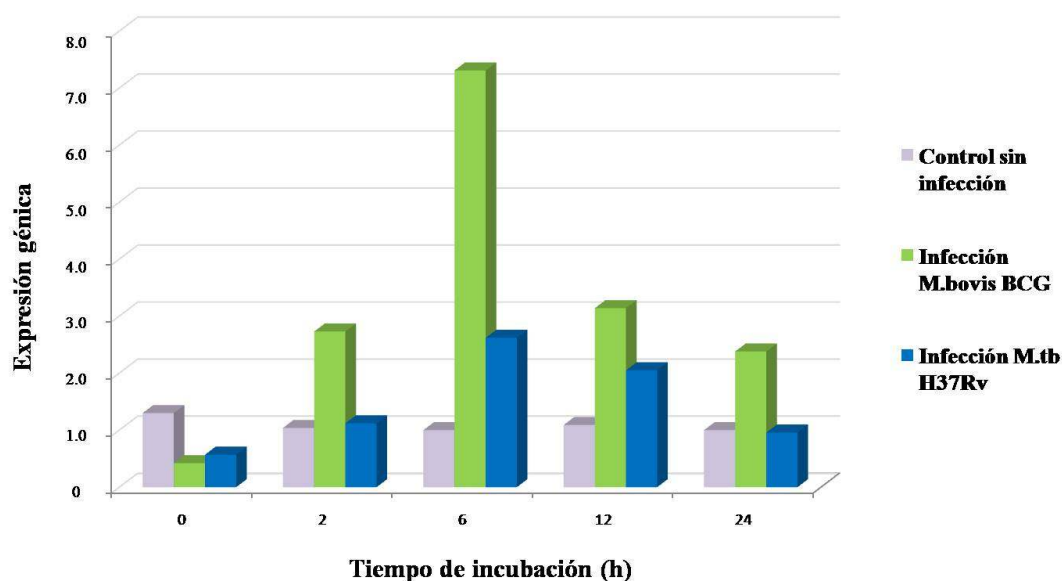


Figura 20. Expresión de *TNF-α* mediante qPCR en rebanas de tejido pulmonar. La gráfica de barras muestra los cambios de la expresión génica de *TNF-α* relativo al Control a diferentes tiempos de incubación en las rebanadas control no infectadas (lila), inoculadas con *M. bovis* BCG (verde) e infectadas con *M. tuberculosis* H37Rv (azul).

Los valores de los C_T 's de la amplificación del gen *IL-1α* y del gen *IL-1β* fueron analizados de la misma manera que *TNF-α* para la validación del método $\Delta\Delta C_T$ sin embargo la pendiente obtenida no fue menor o igual a 0.1, indicando que la diferencia en la expresión entre el gen de referencia (*GADP*) y ambos genes problema (*IL-1α* e *IL-1β*) presenta variaciones significativas en diferentes concentraciones de los cDNA's. Lo anterior no nos permitió utilizar el método $\Delta\Delta C_T$ para analizar la expresión de estos genes, sin embargo se analizaron las tendencias de expresión (en valores ΔC_T) de los diferentes grupos experimentales (infección con *M. tuberculosis* o *M. bovis*) y se observó que la expresión de *IL-1α* en las muestras infectadas con *M. tuberculosis* H37Rv tuvo un aumento a partir de las 12 horas con un pico de expresión a las 48 horas mientras que en las rebanadas infectadas con *M. bovis* BCG, se presentó un aumento a partir de las 2 horas de incubación con un pico de expresión a las 6 y 48 horas (Tabla I). La expresión de *IL-1β* en las rebanadas infectadas con *M. tuberculosis* H37Rv presentó un aumento a las 2 horas de incubación el cual se mantuvo hasta las 48 horas donde se registró el pico de expresión; en las muestras de infectadas con *M. bovis* BCG se

observó una expresión similar a la de la IL-1 α , con aumento a partir de las 2 horas de incubación con un pico de expresión a las 6 y 48 horas (Tabla II).

Muestra	ΔC_T (muestra – control) para IL-1 β				
	0h	2h	6h	12h	24h
TB	0	0.060	0.879	0.617	0.855
BCG	0	1.431	2.487	1.396	0.855

Tabla I. Expresión de IL-1 α mediante qPCR. El ΔC_T de las muestras infectadas con *M. tuberculosis* H37Rv y *M. bovis* BCG fue corregido restando el ΔC_T del control.

Muestra	ΔC_T (muestra – control) para IL-1 α				
	0h	2h	6h	12h	24h
TB	0	0	0	0.295	2.132
BCG	0	1.390	2.686	1.364	1.611

Tabla II. Expresión de IL-1 β mediante qPCR. El ΔC_T de las muestras infectadas con *M. tuberculosis* H37Rv y *M. bovis* BCG fue corregido restando el ΔC_T del control.

Aunque se realizaron análisis de expresión con PCR tiempo real para IL-10, IL-4, IL-2 e IFN- γ , no se detectó su presencia utilizando las sondas y primers específicos para cada citocina de los ensayos TaqMan[®] Gene Expression Assays de Applied Biosystems.

8. DISCUSIÓN

A pesar de los avances en el conocimiento de *M. tuberculosis*, aún no se esclarecen por completo los mecanismos que están involucrados en la virulencia de la bacteria; esto debido a que múltiples factores bacterianos interactúan en forma muy compleja con las células del hospedero. Generalmente, cuando el hospedero se enfrenta a la bacteria es capaz de controlar la infección, sin embargo si el balance entre los factores bacterianos y la respuesta inmune se rompe, el bacilo puede replicarse y causar daño tisular ya sea por productos propios de la bacteria o por una inducción de la respuesta inmune que en su intento de controlar la infección lesiona los tejidos.

Para el estudio de los mecanismos involucrados en la patogénesis de la tuberculosis se han utilizado modelos experimentales *in vivo* e *in vitro* que han aportado valiosos datos para entender algunos aspectos de la enfermedad. Entre los modelos *in vivo* más empleados se encuentran el cerdo de guinea, el conejo y el ratón infectados artificialmente. Los ratones son naturalmente resistentes a la infección lo que permite hacer estudios sobre la respuesta inmune y régimen de tratamiento, en los conejos es más fácil de estudiar el desarrollo de tuberculosis cavitaria, mientras que por su alta susceptibilidad a la infección los cerdos de guinea son utilizados para el análisis de la transmisión aérea y la eficiencia de vacunas. Entre sus desventajas se tiene los costos de un mantenimiento adecuado, requerimientos de espacio en el laboratorio y los problemas éticos del uso excesivo de animales (Dharmadhikari and Nardell, 2008). En tanto, los modelos *in vitro*, como los cultivos celulares, han aportado mucha información sobre la relación parásito y células hospedero sin embargo excluyen muchos factores que se presentan en el organismo completo.

En el presente trabajo se proponen las rebanadas de tejido pulmonar murino infectadas con *M. tuberculosis* como un modelo alternativo de estudio, el cual puede ser clasificado tanto como *in vitro* o *ex vivo*. Presenta varias ventajas con respecto a los cultivos celulares: la conservación estructural de la complejidad del tejido, todos los tipos celulares del tejido se encuentran representados, en los epitelios se conserva el movimiento ciliar; de esta manera permite realizar estudios funcionales, morfológicos y de patogénesis. Además, el uso de rebanadas reduce el número de animales usados en experimentación y reduce los costos de mantenimiento de los mismos. Otra ventaja que se le puede añadir es que se pueden realizar estudios con tejido humano (en dado caso de estar disponible) y realizar estudios de interacción entre diferentes órganos al cultivar de manera simultánea rebanadas de diferente origen tisular. Existen investigaciones que muestran que las rebanadas de pulmón pueden ser infectadas *in vitro* con el virus sincitial respiratorio y *Chlamydomphila pneumoniae*, destacando las cualidades del modelo y su reproducibilidad en buenas condiciones fisiológicas (Ebsen *et al.*, 2002). Recientemente se publicó un reporte donde rebanadas de tejido pulmonar bovino fueron infectadas con virus de la parainfluenza bovina, localizándose la infección en las células de capas inferiores de las rebanadas de pulmón (Goris *et al.*, 2009).

Con la experiencia previa obtenida en el laboratorio (Jaramillo, 2006), nos planteamos el uso de las rebanadas de pulmón murino como un modelo de infección eficiente para el estudio de las interacciones de *M. tuberculosis* con el tejido pulmonar y la respuesta de este ante la infección. Se logró optimizar y hacer reproducible la infección con *M. tuberculosis* de las rebanadas; esto permitió observar bacilos en contacto con células epiteliales, así como bacilos intracelulares en macrófagos. Las bacterias son fácilmente localizables en los espacios alveolares, tendiendo a acumularse en los septos alveolares y cercanos o en contacto con neumocitos tipo II. Los macrófagos presentes en el tejido también entran en interacción con los bacilos y en algunas ocasiones estos se encuentran intracelularmente. Hasta ahora no se ha reportado una localización preferente de los bacilos en el tejido pulmonar. Esta cercanía de las micobacterias a los neumocitos tipo II puede ser relevante en el proceso de infección celular y posterior diseminación tisular de *M. tuberculosis*, ya que se reconoce que las

micobacterias (patógenas y no patógenas) pueden invadir este tipo de células (Castro-Garza *et al.*, 2002; García-Pérez *et al.*, 2003; 2008, Rivas-Santiago *et al.*, 2008); en el presente trabajo no se puede determinar con certeza que se haya producido la infección de los neumocitos tipo II en las rebanadas de pulmón murino, para poder asegurar que en nuestro modelo se encuentran infectados los neumocitos es necesario realizar análisis más detallados de ultraestructura, o el uso micobacterias transformadas que expresen el gen reportero *GFP* para el estudio con microscopia de fluorescencia combinado con inmunohistoquímica.

En el análisis histológico se observó claramente que en rebanadas infectadas por 24 h, ocurrió un infiltrado o reclutamiento moderado de las células inmunes presentes en el tejido hacia las áreas de mayor concentración de *M. tuberculosis*; este fenómeno es semejante al incremento de linfocitos y células plasmáticas en las zonas de infección con virus respiratorio sincitial (RSV) y *Chlamydomphila pneumoniae* observado por Ebsen y col., (2002) en rebanadas de pulmón de ratón infectadas. Henjakovic y col., (2008) observaron que sustancias inmunoactivas inducen una fuerte respuesta inmune proinflamatoria en las rebanadas de pulmón de ratón. En el estudio se detectó la inducción de citocinas/quimiocinas (IL-5, IL-1 α , TNF- α e IL-12), RANRES y moléculas de HLA clase II. Nuestro trabajo y estudios anteriores demuestran que las rebanadas de pulmón permanecen activas inmunológicamente y que las células del tejido pueden interactuar con organismos o moléculas extrañas. Este hecho abre la posibilidad para nuevos trabajos donde se investiguen diferentes aspectos de la respuesta celular ante la infección de microorganismos. Así mismo, se podrían realizar estudios añadiendo un número controlado de células exógenas de cada diferente población de células inmunes y analizar su papel en la patogénesis de la tuberculosis y otros patógenos.

Los estudios previos en nuestro laboratorio nos condujeron a iniciar un análisis más profundo de las interacciones celulares con las bacterias infectantes en el modelo de rebanadas, por lo que en este proyecto se inició el análisis de la expresión de citocinas inducidas por micobacterias en el sistema de cultivo de rebanadas de pulmón para

caracterizarlo como un modelo efectivo para el estudio de los mecanismos que ocurren durante los primeros tiempos de infección.

Un factor muy relevante en este modelo es el tiempo límite en el cual las rebanadas de pulmón pueden mantenerse en buenas condiciones fisiológicas. Esto también repercute en los tiempos en los cuales debe estudiarse la expresión de los genes y sus productos en el sistema. Los estudios previos en nuestro laboratorio demostraron que las rebanadas se mantienen viables hasta 96 h (Jaramillo, 2006); para nuestro experimentos nos enfocamos en las primeras 24 después de la infección. Los análisis efectuados por Umachandran y col., (2004), mostraron que las rebanadas de tejido pulmonar de rata se mantienen metabólicamente viables hasta por 8 horas, un tiempo muy corto comparado con nuestros resultados. La corta viabilidad de las rebanadas de rata puede deberse a diferencias en el proceso de obtención y sistema de incubación. Además el grosor promedio de las rebanadas usadas por ese grupo de investigación fue de 600 μm a diferencia de las 450 μm usadas en nuestro trabajo. El mayor grosor dificulta el intercambio de gases en el tejido, así como un adecuado flujo de nutrientes hacia el centro del corte y esto provocaría una pérdida de viabilidad más rápida.

Los antecedentes relativos al mejor tiempo para el estudio de expresión en modelos *in vitro* han mostrado que la expresión inducida por *M. tuberculosis* en macrófagos muestran picos de expresión a las 6 h con un aumento de 336 veces, mientras que a las 24, 48 y 72 h, la cantidad de mRNA era 100 veces más que la basal (Dubnau *et al.*, 2002). En tanto, el único estudio de expresión de citocinas realizado en rebanadas de pulmón solo reportan la cuantificación a las 24 h, pero mencionan (sin mostrar los datos) que el pico de expresión fue a las 6 h (Henjakovic *et al.*, 2008). Por los antecedentes, los tiempos elegidos para realizar este estudio son adecuados para realizar estudios de inducción de respuesta celular en rebanadas de tejido pulmonar murino (Ebsen *et al.*, 2002; Henjakovic *et al.*, 2008).

Un factor adicional para tomar en cuenta es la integridad del RNAm durante su aislamiento y almacenamiento. La adecuada preparación y manejo de todas las

soluciones y material que se utilizaron en el trabajo evitaron este problema. Desde que la muestra fue tomada a cada tiempo de incubación, el tejido fue mantenido en solución de RNAlater[®]. Todo el material usado se trató para eliminar cualquier posible contaminación con DNAsas y todas las soluciones fueron preparadas con agua MilliQ tratada con DEPC.

Los diferentes aislados clínicos y las cepas de laboratorio de micobacterias difieren ampliamente en virulencia, infectividad e inmunogenicidad. Se ha reportado que macrófagos humanos infectados con cepas virulentas indujeron menor producción de TNF- α que las cepas no virulentas, mientras que las interleucinas IL-10 e IL-12 no se detectaron, esto a pesar de que las cepas virulentas se multiplicaron intracelularmente (Wong *et al.*, 2007). En modelo de infección con células epiteliales de pulmón A549, se observó que es necesario el crecimiento celular es necesario para la producción de quimosinas, pero ésta no correlacionó con la virulencia de las cepas ni con la capacidad o velocidad del crecimiento intracelular (Lin, *et al.*, 1998). En nuestro trabajo no se detectó la presencia de IL-10, IL-4 e IL-2, mientras que la expresión de TNF- α fue mayor en rebanadas infectadas con *M. bovis* BCG (no virulenta), que en las rebanadas infectadas con *M. tuberculosis* H37Rv (virulenta). Los picos de expresión, determinados por qPCR, para TNF- α se obtuvieron a las 6 horas tanto para rebanadas infectadas con *M. tuberculosis* como con *M. bovis*, con 2.62 y 7.31 aumentos, respectivamente. Posiblemente, las micobacterias han desarrollado mecanismos de inhibición de moléculas de la respuesta inmune; tales como la supresión de la producción de IL-12 y regulación negativa de la apoptosis de macrófagos hospederos (Nigou *et al.*, 2002; Deretic *et al.*, 2006; Loeuillet *et al.*, 2006), lo cual le permitiría sobrevivir intracelularmente lejos de los efectores inmunes y facilitando su permanencia y diseminación en los tejidos.

De manera paralela, se detectó un ligero aumento en la expresión de IFN- γ respecto al tiempo de incubación en rebanadas infectadas con *M. tuberculosis* H37Rv y con *M. bovis* BCG, por el método de ELISA. Sólo las rebanadas infectadas con *M. tuberculosis* mostraron una expresión mayor a la registrada por las muestras sin

infección. Existen reportes que muestran que neumocitos tipo II infectadas con *M. tuberculosis* producen IFN- γ (Sharma *et al.*, 2007). IFN- γ es una citocina importante en la respuesta inmune montada para controlar la enfermedad, y siempre es detectado en ratones con tuberculosis activa (Jung *et al.*, 2003; Cooper *et al.*, 2002). Sin embargo, en estudios *in vitro* y *ex vivo*, se observa una disminución de la inducción de IFN- γ por cepas de *M. tuberculosis* virulentas, sugiriendo una modulación negativa de citocinas pro-inflamatorias, lo que contribuiría a la sobrevivencia del bacilo en el hospedero (Tanveer *et al.*, 2009).

Para la detección y cuantificación de citocinas, el método más sensible fue el qPCR en tiempo real, por el cual se pudieron detectar tres citocinas TNF- α , IL-1 α e IL-1 β , sin embargo no se logró la detección de la expresión de las citocinas IFN- γ , IL-2, IL-4 e IL-10 en las diferentes muestras analizadas. Por el método de ELISA se detectó una ligera inducción de IFN- γ pero no de TNF- α e IL-1 α . Una posible causa de lo anterior es que la cepa empleada en este trabajo tiene una alta virulencia y puede inhibir la expresión de citocinas del tipo pro-inflamatorio. Aunado a esto, no se pudo utilizar el método $\Delta\Delta C_T$ para la cuantificación relativa de IL-1 α e IL-1 β , ya que la expresión de estas citocinas fue muy reducida ocasionando eficiencias de amplificación muy diferentes a las del gen endógeno utilizado, impidiendo el empleo del método.

Debido a que no se logró realizar el análisis estadístico de los resultados de expresión, no podemos llegar a una observación concluyente, sin embargo los resultados nos dan un panorama preliminar de lo mucho que se puede lograr con este modelo de infección y nos dan la pauta para el seguimiento de este trabajo.

Los cambios morfológicos observados en las rebanadas de pulmón infectadas experimentalmente con *M. tuberculosis* y *M. bovis* sugieren que este sistema pudiera representar un modelo alternativo en el estudio de diversos aspectos de la patogénesis de *M. tuberculosis* bajo condiciones controladas, al mismo tiempo que permitiría reducir de manera considerable el número de animales de experimentación, una premisa vigente a nivel mundial. Su posible utilidad en estudios de respuesta inmune a tiempos cortos de

infección, así como la evaluación de factores de virulencia, o nuevos agentes quimioterapéuticos, son algunos de los aspectos a considerar en futuros trabajos de investigación.

9. CONCLUSIONES

1. La infección de rebanadas de tejido pulmonar con *M. tuberculosis* es una metodología con resultados reproducibles.
2. El análisis por microscopía de luz de los tejidos infectados reveló que los bacilos de *M. tuberculosis* fueron localizados preferentemente cerca de los septos alveolares, neumocitos tipo II (NII) y en los espacios alveolares.
3. Se observó un aumento de TNF- α inducida por la infección con *M. tuberculosis* mediante qPCR, encontrando un pico máximo de expresión a las 6 h posterior a la infección.
4. Se registró un aumento moderado pero gradual en la expresión de IFN- γ mediante ELISA, inducida por la infección con *M. tuberculosis*, durante todo el tiempo de incubación (0-24 h).
5. La expresión de IL-1 α e IL-1 β inducida *M. bovis* mostró una tendencia de aumento a partir de las 2 h de incubación posterior a la infección, alcanzando un pico a las 6 h y disminuyendo a las 12 y 24 h.
6. Las rebanadas de pulmón infectadas experimentalmente con *M. tuberculosis* y *M. bovis* puede representar un modelo alternativo en el estudio de diversos aspectos de la patogénesis de *M. tuberculosis* bajo condiciones controladas.

10. LITERATURA CITADA

Araujo Z, Acosta M, Escobar H, Baños R, Fernández LC, Rivas-Santiago B. 2008. Respuesta inmunitaria en tuberculosis y el papel de los antígenos de secreción de *Mycobacterium tuberculosis* en la protección, patología y diagnóstico. *Investigación Clínica*. 49(3):411-441.

Arriaga AK, Orozco EH, Aguilar LD, Rook GA, Hernandez Pando R. 2002. Immunological and pathological comparative analysis between experimental latent tuberculous infection and progressive tuberculosis. *Clinical and Experimental Immunology*. 128:229-237.

Bach PH, Vickers AEM, Fisher R, Baumann A, Brittebo E, Carlile DJ, Koster HJ, Lake BG, Salmon F, Sawyer TW, Skibinski G. 1996. The use of tissue slices for pharmacotoxicology studies. The report and recommendations of ECVAM Workshop 20. *Alternatives to Laboratory Animals*. 24:893-923.

Bansal K, Narayana Y, Balaji KN. 2009. Inhibition of TNF-alpha-induced cyclooxygenase-2 expression by *Mycobacterium bovis* BCG in human alveolar epithelial A549 cells. *Scandinavian Journal of Immunology*. 69:11-19.

Barrios-Payan J, Aguilar-Leon D, Lascurain-Ledezma R, Hernandez-Pando R. 2006. Neutrophil participation in early control and immune activation during experimental pulmonary tuberculosis. *Gaceta Médica de México*. 142:273-81.

Brendel K, Gandolfi AJ, Krumdieck CL, Smith PF. 1987. Organ slices revisited. *Trends in Pharmacological Sciences*. 8:11-25.

Brennan WR, Curlin G, Ginsberg A, Adams M, Fleischmann R, Fraser C, Venter JC, Shinnick T, Bishai W, Smith H, Stover K, and Hatfull G. 1996. Comparative sequencing. *Science*. 274:17-18

Buccheri S, Reljic R, Caccamo N, Ivanyi J, Singh M, Salerno A, Dieli F. 2007. IL-4 depletion enhances host resistance and passive IgA protection against tuberculosis infection in BALB/c mice. *European Journal of Immunology*. 37:729-737.

Carranza C, Juárez E, Torres M, Ellner JJ, Sada E, Schwander SK. 2006. *Mycobacterium tuberculosis* growth control by lung macrophages and CD8 cells from patient contacts. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 173:238-245.

Castro-Garza J, Barrios-García HB, Cruz-Vega DE, Said-Fernández S, Carranza-Rosales P, Molina-Torres CA, Vera-Cabrera L. 2007. Use of a colorimetric assay to measure differences in cytotoxicity of *Mycobacterium tuberculosis* strains. *Journal of Medical Microbiology*. 56(6):733-737.

Castro-Garza J, King CH, Swords WE, Quinn FD. 2002. Demonstration of spread by *Mycobacterium tuberculosis* bacilli in A549 epithelial cell monolayers. *FEMS Microbiology Letters* 212:145-149.

Castro-Garza J, Quinn FD, King CH. 1997. Assay to assess the cytotoxic effect of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* BCG on human alveolar pneumocytes. In: ASM Conference on Tuberculosis: Past, Present and Future, Copper Mountain, Colorado, USA, July 8-12.

CENAVECE, 2007. Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica. DGAE dependiente de la SSA. Disponible en el sitio de red:
<http://www.dgepi.salud.gob.mx/boletin/2007/sem52/pdf/cua5.pdf>
<http://www.dgepi.salud.gob.mx/boletin/2008/sem13/pdf/edit1308.pdf>
[Revisado el 25 de noviembre de 2009]

Chacón-Salinas R, Serafín-López J, Ramos-Payán R, Méndez-Aragón P, Hernández-Pando R, Van Soolingen D, Flores-Romo S, Estrada-Parra S, Estrada-García I. 2005. Differential pattern of cytokine expression by macrophages infected *in vitro* with different *Mycobacterium tuberculosis* genotypes. *Clinical and Experimental Immunology*. 140:443-449.

Cho H, Lasco TD, Allen SS, Yoshimura T, McMurray DN. 2005. Recombinant guinea pig tumor necrosis factor alpha stimulates the expression of Interleukin-12 and the inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* growth in macrophages. *Infection and Immunity*. 73:1367-1376.

Collins HL, Kaufmann SH. 2001. Prospects for better tuberculosis vaccines. *The Lancet Infectious Diseases*. 1(1):21-28.

Condos R, Raju B, Canova A, Zhao BY, Weiden M, Rom WN, Pine R. 2003. Recombinant gamma interferon stimulates signal transduction and gene expression in alveolar macrophages in vitro and in tuberculosis patients. *Infection and Immunity*. 71:2058-2064.

Cooper AM, Dalton DK, Stewart TA, Griffen JP, Russell DG, Orme IM. 1993. Disseminated tuberculosis in interferon-gamma gene disrupted mice. *The Journal of Experimental Medicine*. 178:2243-2248.

Cooper AM, Kipnis A, Turner J, Magram J, Ferrante J, Orme IM. 2002. Mice lacking bioactive IL-12 can generate protective, antigenspecific cellular responses to mycobacterial infection only if the IL-12 p40 subunit is present. *Journal of Immunology*. 168:1322-1327.

Cooper AM, Solache A, Khader S. 2007. Interleukin-12 and tuberculosis: an old story revisited. *Current Opinion in Immunology*. 19:441-447.

Corbett EL, Watt CJ, Walker N, Maher D, Williams BG, Raviglione MC, Dye C. 2003. The growing burden of tuberculosis: global trends and interactions with the HIV epidemic. *Archives of Internal Medicine*. 163:1009-1021.

Cundell DR, Tuomanen, EI. 1994. Receptor specificity of adherence of *Streptococcus pneumoniae* to human type-II pneumocytes and vascular endothelial cells *in vitro*. *Microbial Pathogenesis*. 17:361-374.

Debbabi H, Ghosh S, Kamath AB, Alt J, deMello DE, Dunsmore S, Behar SM. 2005. Primary type II alveolar epithelial cells present microbial antigens to antigen-specific CD4-T cells. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*. 289:L274-L279

de Kanter R, de Jager MH, Draaisma AL, Jurva JU, Olinga P, Meijer, DKF, Groothuis GMM. 2002a. Drug-metabolizing activity of human and rat liver, lung, kidney and intestine slices. *Xenobiotica*. 32:349-362.

de Kanter R, Monshouwer M, Meijer DK, Groothuis GM. 2002b. Precision-cut organ slices as a tool to study toxicity and metabolism of xenobiotics with special reference to non-hepatic tissues. *Current Drug Metabolism*. 3:39-59.

de Kanter R, Olinga P, de Jager MH, Merema MT, Meijer DKF, Groothuis GMM. 1999. Organ slices as an *in vitro* test system for drug metabolism in human liver, lung and kidney. *Toxicology In Vitro* 13:737-744.

Demissie A, Wassie L, Abebe M, Aseffa A, Rook G, Zumla A, Andersen P, Doherty TM, the VACSEL Study Group. 2006. The 6-kilodalton early secreted antigenic target-responsive, asymptomatic contacts of tuberculosis patients express elevated levels of Interleukin-4 and reduced levels of gamma interferon. *Infection and Immunity*. 74:2817-2822.

Dempsey PW, Doyle SE, He JQ, Cheng G. 2003. The signaling adaptors and pathways activated by TNF superfamily. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 14:193-209.

Deretic V, Singh S, Master S, Harris J, Roberts E, Kyei G, Davis A, de Haro S, Naylor J, Lee H, Vergne I. 2006. *Mycobacterium tuberculosis* inhibition of phagolysosome biogenesis and autophagy as a host defense mechanism. *Cellular Microbiology*. 8:719-727.

Dharmadhikari AS, Nardell EA. 2008. What animal models teach humans about tuberculosis. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. 39(5):503-508.

Dubnau E, Fontan P, Manganeli R, Soares-Appel S, Smith I. 2002. *Mycobacterium tuberculosis* genes induced during infection of human macrophages. *Infection and Immunity*. 70:2787-2795.

Ebsen M, Mogilevski G, Anhenn O, Maiworm V, Theegarten D, Scharze J, Morgenroth K. 2002. Infection of murine precision cut slices (PCLS) with respiratory syncytial virus (RSV) and *Chlamydia pneumoniae* using the Krumdieck technique. *Pathology, Research and Practice*. 198:747-753.

Fabre RA, Perez TM, Aguilar LD, Rancel MJ, Estrada-Garcia I, Hernandez-Pando R, Parra SE. 2004. Transfer factors as immunotherapy and supplement of chemotherapy in experimental pulmonary tuberculosis. *Clinical and Experimental Immunology*. 136:215-223.

Feng CG, Blanchard TJ, Smith GL, Hill AV, Britton WJ. 2001. Induction of CD8⁺ T-lymphocyte responses to a secreted antigen of *Mycobacterium tuberculosis* by an attenuated vaccinia virus. *Immunology and Cell Biology*. 79:569-575.

Fenhalls G, Wong A, Bezuidenhout J, van Helden P, Bardin P, Lukey PT. 2000. *In situ* production of gamma interferon, interleukin-4, and tumor necrosis factor alpha mRNA in human lung tuberculous granuloma. *Infection and Immunity*. 68:2827-2836.

Fisher RL, Smith MS, Hasal SJ, Hasal KS, Gandolfi AJ, Brendel K. 1994. The use of human lung slices in toxicology. *Human & Experimental Toxicology*. 13:466-471.

Flynn JL, Chan J. 2001a. Immunology of tuberculosis. *Annual Review of Immunology*. 19:93-129.

Flynn JL, Chan J. 2001b. Tuberculosis: latency and reactivation. *Infection and Immunity*. 69:4195-4201.

Fremont CM, Togbe D, Doz E, Rose S, Vasseur V, Maillet I, Jacobs M, Ryffel B, Quesniaux VF. 2007. IL-1 receptor-mediated signal is an essential component of MyD88-dependent innate response to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Journal of Immunology*. 179(2):1178-89.

Gandolfi AJ, Brendel K, Fernando Q. 1996. Preparation and use of precision-cut renal cortical slices in renal toxicology, *In* RK Zalups and LH Lash (ed.), *Methods in Renal Toxicology*. CCR Press: FL, USA, pp. 110-122.

García-Pérez BE, Hernández-González JC, García-Nieto S, Luna-Herrera J. 2008. Internalization of a non-pathogenic mycobacteria by macropinocytosis in human alveolar epithelial A549 cells. *Microbial Pathogenesis*. 45(1):1-6.

García-Pérez BE, Mondragón-Flores R, Luna-Herrera J. 2003. Internalization of *Mycobacterium tuberculosis* by macropinocytosis in non-phagocytic cells. *Microbial Pathogenesis*. 35(2):49-55.

Giacomini E, Sotolongo A, Iona E, Severa M, Remoli ME, Gafa V, Lande R, Fattorini L, Smith I, Manganelli R, Coccia EM. 2006. Infection of human dendritic cells with a *Mycobacterium tuberculosis sigE* mutant stimulates production of high levels of Interleukin-10 but low levels of CXCL10: impact on the T-cell response. *Infection and Immunity*. 74:3296-3304.

Gong JH, Zhang M, Modlin RL, Linsley PS, Iyer D, Lin Y, Barnes PF. 1996. Interleukin-10 downregulates Mycobacterium tuberculosis-induced Th1 responses and CTLA-4 expression. *Infection and Immunity*. 64(3):913-918.

Goris K, Uhlenbruck S, Schwegmann-Wessels C, Köhl W, Niedorf F, Stern M, Hewicker-Trautwein M, Bals R, Taylor G, Braun A, Bicker G, Kietzmann M, Herrler G. 2009. Differential sensitivity of differentiated epithelial cells to respiratory viruses reveals different viral strategies of host infection. *Journal of Virology*. 83(4):1962-1968.

Guevara-Guzmán A, Juárez-Hernández A, Zenteno-Cuevas R. 2003. Tuberculosis y la importancia de incorporar nuevas metodologías diagnósticas. *MedUNAB*. 6(16):46-51.

Gupta UD, Katoch VM. 2009. Animal models of tuberculosis for vaccine development. *The Indian Journal of Medical Research*. 129(1):11-8.

Haase MG, Klawitter A, Geyer P, Baretton GB. 2007. Expression of the immunomodulator IL-10 in type I pneumocytes of the rat: Alterations of IL-10 expression in radiation-induced lung damage. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 55: 1167-1172.

Hays AM, Lantz CL, Witten ML. 2003. Correlation between *in vivo* and *in vitro* pulmonary responses and a dynamic organ culture system. *Toxicologic Pathology*. 31:200-207.

Henjakovic M, Sewald K, Switalla S, Kaiser D, Müller M, Veres TZ, Martin C, Uhlig S, Krug N, Braun A. 2008. *Ex vivo* testing of immune responses in precision-cut lung slices. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 231(1):68-76.

Hernandez-Pando R, Aguilar D, Hernandez ML, Orozco H, Rook G. 2004. Pulmonary tuberculosis in BALB/c mice with non-functional IL-4 genes: changes in the inflammatory effects of TNF-alpha and in the regulation of fibrosis. *European Journal of Immunology*. 34:174-183.

Hernandez-Pando R, Orozco H, Arriaga K, Sampieri A, Larriva-Sahd J, Madrid-Marina V. 1997. Analysis of the local kinetics and localization of interleukin-1 alpha, tumour necrosis factor-alpha and transforming growth factor-beta, during the course of experimental pulmonary tuberculosis. *Immunology* 90:607-17.

Hickman SP, Chan J, Salgame P. 2002. *Mycobacterium tuberculosis* Induces differential cytokine production from dendritic cells and macrophages with divergent effects on naive T cell polarization. *Journal of Immunology*. 168:4636-4642.

Jaramillo, E, 2006. *Rebanadas de tejidos: un modelo alternativo en investigación biomédica*. Tesis (de Licenciatura). Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León.

Jeevan A, McFarland CT, Yoshimura T, Skwor T, Cho H, Lasco T, McMurray DN. 2006. Production and characterization of guinea pig recombinant gamma interferon and its effect on macrophage activation. *Infection and Immunity*. 74:213-224.

Jung YJ, LaCourse R, Ryan L, North RJ. 2002. Evidence inconsistent with a negative influence of T helper 2 cells on protection afforded by a dominant T helper 1 response against *Mycobacterium tuberculosis* lung infection in mice. *Infection and Immunity*. 70:6436-6443.

Jung YJ, Ryan L, LaCourse R, North RJ. 2003. Increased Interleukin-10 expression is not responsible for failure of T helper 1 immunity to resolve airborne *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. *Immunology*. 109:295-299.

Kasper M, Seidel D, Knels L, Morishima N, Neisser A, Bramke S, Koslowski R. 2004. Early signs of lung fibrosis after *in vitro* treatment of rat lung slices with CdCl₂ and TGF- β 1. *Histochemistry and Cell Biology*. 121:131-140.

Kaufmann SHE, Cole ST, Mizrahi V, Rubin E, Nathan C. 2005. *Mycobacterium tuberculosis* and the host response. *The Journal of Experimental Medicine*. 201:1693-1697.

Kohwiwattanagun J, Kawamura I, Fujimura T, Mitsuyama M. 2007. Mycobacterial mammalian cell entry protein 1A (Mce1A)-mediated adherence enhances the chemokine production by A549 alveolar epithelial cells. *Microbiology and Immunology*. 51:253-261.

Korbel DS, Schneider BE, Schaible UE. 2008. Innate immunity in tuberculosis: myths and truth. *Microbes and Infection*. 10:995-1004

- Koul A, Herget T, Klebl B, Ullrich A. 2004. Interplay between mycobacteria and host signalling pathways. *Nature Reviews. Microbiology*. 2:189-202.
- Kramnik I, Dietrich WF, Demant P, Bloom BR. 2000. Genetic control of resistance to experimental infection with virulent *Mycobacterium tuberculosis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 97:8560-8568.
- Krutzik SR, Modlin RL. 2004. The role of Toll-like receptors in combating mycobacteria. *Seminars in immunology*. 16: 35-41.
- Lazarevic V, Flynn J. 2002. CD8⁺ T cells in tuberculosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 166:1116-1121.
- Lee SC, Hsu JY, Fu LS, Chu JJ, Fan SJ, Chi CS. 2005. Comparison of the activities of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-8 secretion between two lung epithelial cell lines. *The Journal of Microbiology, Immunology and Infection*. 38:327-331.
- Lerche-Langrand C, Toutain HJ. 2000. Precision-cut liver slices: characteristics and use for *in vitro* pharmaco-toxicology. *Toxicology*. 153:221-253.
- Lienhardt C, Azzurri A, Amedei A, Fielding K, Sillah J, Sow OY, Bah B, Benagiano M, Diallo A, Manetti R, Manneh K, Gustafson P, Bennett S, D'Elios MM, McAdam K, del Prete G. 2002. Active tuberculosis in Africa is associated with reduced Th1 and increased Th2 activity in vivo. *European Journal of Immunology*. 32:1605-13.
- Lin Y, Zhang M, Barnes PF. 1998. Chemokine production by a human alveolar epithelial cell line in response to *Mycobacterium tuberculosis*. *Infection and Immunity*. 66(3):1121-6.
- Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*. 25:402-408.
- Loeuillet C, Martinon F, Perez C, Munoz M, Thome M, Meylan PR. 2006. *Mycobacterium tuberculosis* subverts innate immunity to evade specific effectors. *Journal of Immunology*. 177:6245-6255.

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

McDonough KA, Kress Y. 1995. Cytotoxicity for lung epithelial cells is a virulence-associated phenotype of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infection and Immunity*. 63:4802-4811.

McRitchie DI, Isowa N, Edelson JD, Xavier AM, Cai L, Man HY, Wang YT, Keshavjee SH, Slutsky AS, Liu M. 2000. Production of tumour necrosis factor alpha by primary cultured rat alveolar epithelial cells. *Cytokine*. 12:644-654.

McShane H, Brookes R, Gilbert SC, Hill AVS. 2001. Enhanced immunogenicity of CD4⁺ T-cell responses and protective efficacy of a DNA-modified vaccinia virus Ankara prime-boost vaccination regimen for murine tuberculosis. *Infection and Immunity*. 69:681-686.

Mehta PK, King CH, White EH, Murtagh Jr JJ, Quinn FD. 1996. Comparison of *in vitro* model for the study of *Mycobacterium tuberculosis* invasion and intracellular replication. *Infection and Immunity*. 64:2673-2679.

Mellman I, Steinman RM. 2001. Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell*. 106:255-258.

Middleton AM, Chadwick MV, Nicholson AG, Dewar A, Groger RK, Brown EJ, Ratliff TF, Wilson R. 2002. Interaction of *Mycobacterium tuberculosis* with human respiratory mucosa. *Tuberculosis*. 82:69-78.

Mohan VP, Scanga CA, Yu K, Scott HM, Tanaka KE, Tsang E, Tsai MC, Flynn JL, Chan J. 2001. Effects of tumor necrosis factor alpha on host immune response in chronic persistent tuberculosis: possible role for limiting pathology. *Infection and Immunity*. 69:1847-1855.

Nicholson S, Bonecini-Almeida Mda G, Lapa e Silva JR, Nathan C, Xie QW, Mumford R, Weidner JR, Calaycay J, Geng J, Boechat N, Linhares C, Rom W, Ho JL. 1996. Inducible nitric oxide synthase in pulmonary alveolar macrophages from patients with tuberculosis. *The Journal of Experimental Medicine*. 183(5):2293-2302.

Nigou J, Gilleron M, Rojas M, Garcia LF, Thurnher M, Puzo G. 2002. Mycobacterial lipoarabinomannans: modulators of dendritic cell function and the apoptotic response. *Microbes and Infection*. 4:945-953.

Nolt D, Flynn JL. 2004. Interleukin-12 therapy reduces the number of immune cells and pathology in lungs of mice infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infection and Immunity*. 72: 2976-2988.

North RJ, Jung YJ. 2004. Immunity to tuberculosis. *Annual Review of Immunology*. 22:599-623.

Oettinger T, Jorgensen M, Ladefoged A, Haslov K, Andersen P. 1999. Development of the *Mycobacterium bovis* BCG vaccine: review of the historical and biochemical evidence for a genealogical tree. *Tubercle and Lung Disease*. 79(4):243-250.

Ordway DJ, Costa L, Martins M, Silveira H, Amaral L, Arroz MJ, Ventura FA, Dockrell HM. 2004. Increased interleukin-4 production by CD8 and $\gamma\delta$ T cells in health-care workers is associated with the subsequent development of active tuberculosis. *The Journal of Infectious Diseases*. 190:756-766.

Orme IM, McMurray DN. 1996. The immune response to tuberculosis in animal models, *In* W. N. Rom and S. Garay (ed.), *Tuberculosis*. Little, Brown and Co.: Boston, Mass. pp. 269-280.

Pai RK, Pennini ME, Tobian AA, Canaday DH, Boom WH, Harding CV. 2004. Prolonged toll-like receptor signaling by *Mycobacterium tuberculosis* and its 19-kilodalton lipoprotein inhibits gamma interferon-induced regulation of selected genes in macrophages. *Infection and Immunity*. 72(11):6603-6614.

Parrish AR, Gandolfi AJ, Brendel K. 1995. Precision-cut tissue slices: applications in pharmacology and toxicology. *Life Sciences*. 57:1887-1901.

Patel NR, Swan K, Li X, Tachado SD, Koziel H. 2009. Impaired *M. tuberculosis*-mediated apoptosis in alveolar macrophages from HIV⁺ persons: potential role of IL-10 and BCL-3. *Journal of Leukocyte Biology*. 86(1):53-60.

Pathak SK, Basu S, Bhattacharyya A, Pathak S, Kundu M, Basu J. 2005. *Mycobacterium tuberculosis* lipoarabinomannan-mediated IRAK-M induction negatively regulates Toll-like receptor-dependent Interleukin-12 p40 production in macrophages. *The Journal of Biological Chemistry*. 280:42794-42800.

Pearl JE, Saunders BM, Ehlers S, Orme IM, Cooper AM. 2001. Inflammation and lymphocyte activation during mycobacterial infection in the interferon-g-deficient mouse. *Cellular Immunology*. 211:43-50.

Pechkovsky DV, Goldmann T, Vollmer E, Müller-Quernheim J, Zissel G. 2006. Interleukin-18 expression by alveolar epithelial cells type II in tuberculosis and sarcoidosis. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 46:30-38.

Perregaux DG, Bhavsar K, Contillo L, Shi J y Gabel CA. 2002. Antimicrobial peptides initiate IL-1 β posttranslational processing: a novel role beyond innate immunity. *Journal of Immunology*. 168:3024-3032.

Phelps JS, Gandolfi AJ, Dorr RT, Brendel K. 1987. Cisplatin nephrotoxicology: *in vitro* studies with precision cut renal cortical slices. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 90:501-512.

Price RJ, Renwick AB, Walters DG, Young PJ, Lake BG. 2004. Metabolism of nicotine and induction of CYP1A forms in precision-cut rat liver and lung slices. *Toxicology In Vitro*. 18:179-185.

Pulendran B. 2004. Modulating TH1/TH2 responses with microbes, dendritic cells, and pathogen recognition receptors. *Immunologic Research*. 29:187-96.

Pulendran B, Palucka K, Banchereau J. 2001. Sensing Pathogens and Tuning Immune Responses. *Science*. 293:253.

Rivas-Santiago B, Contreras JC, Sada E, Hernández-Pando R. 2008. The potential role of lung epithelial cells and beta-defensins in experimental latent tuberculosis. *Scandinavian Journal of Immunology*. 67:448-452.

Rivas-Santiago B, Vieyra-Reyes P, Araujo Z. 2005. The Cellular Immune Response in Pulmonary Tuberculosis. *Investigación Clínica*. 46(4):391-412.

Rojas M, Olivier M, Gros P, Barrera LF, García LF. 1999. TNF-alpha and IL-10 modulate the induction of apoptosis by virulent *Mycobacterium tuberculosis* in murine macrophages. *Journal of Immunology*. 162(10):6122-6131.

Saiga H, Nishimura J, Kuwata H, Okuyama M, Matsumoto S, Sato S, Matsumoto M, Akira S, Yoshikai Y, Honda K, Yamamoto M, Takeda K. 2008. Lipocalin 2-dependent inhibition of mycobacterial growth in alveolar epithelium. *Journal of Immunology*. 181:8521-8527.

Saunders BM, Tran S, Ruuls S, Sedgwick JD, Briscoe H, Britton WJ. 2005. Transmembrane TNF is sufficient to initiate cell migration and granuloma formation and provide acute, but not long-term, control of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Journal of Immunology*. 174:4852-4859.

Schluger NW. 2005. The pathogenesis of tuberculosis: the first one hundred (and twenty-three) years. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. 32:251-256.

Schwebach JR, Chen B, Glatman-Freedman A, Casadevall A, McKinney JD, Harb JL, McGuire PJ, Barkley WE, Bloom BR, Jacobs Jr. WR. 2002. Infection of Mice with Aerosolized *Mycobacterium tuberculosis*: Use of a Nose-Only Apparatus for Delivery of Low Doses of Inocula and Design of an Ultrasafe Facility. *Applied and Environmental Microbiology*. 68:4646-4649.

Sharma M, Sharma S, Roy S, Varma S, Bose M. 2007. Pulmonary epithelial cells are a source of interferon-gamma in response to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Immunology and Cell Biology*. 85(3):229-37.

Sinha A, Singh A, Satchidanandam V, Natarajan K. 2006. Impaired generation of reactive oxygen species during differentiation of dendritic cells (DCs) by *Mycobacterium tuberculosis* secretory antigen (MTSA) and subsequent activation of MTSA-DCs by mycobacteria results in increased intracellular survival. *Journal of Immunology*. 177:468-478.

Smith I. 2003. *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis and molecular determinants of virulence. *Clinical Microbiology Reviews*. 16:463-496.

Smith S, Liggitt D, Jeromsky E, Tan X, Skerrett SJ, Wilson CB. 2002. Local role for tumor necrosis factor alpha in the pulmonary inflammatory response to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Infection and Immunity*. 70:2082-2089.

Stefaniak MS, Krumdieck CL, Spall RD, Gandolfi AJ, Brendel K. 1992. Biochemical and histological characterization of agar-lled precision-cut rat lung slices in dynamic organ culture as an in vitro tool. *In Vitro Toxicology*. 5(1):7-19.

Tanveer M, Hasan Z, Kanji A, Hussain R, Hasan R. 2009. Reduced TNF-alpha and IFN-gamma responses to Central Asian strain 1 and Beijing isolates of *Mycobacterium tuberculosis* in comparison with H37Rv strain. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 103(6):581-587.

Trinchieri G. 2003. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nature Reviews Immunology*. 3:133-146.

Tsao TC, Hong J, Li LF, Hsieh MJ, Liao SK y Chang KS. 2000. Imbalances between tumor necrosis factor- α and its soluble receptor forms, and Interleukin-1 β and Interleukin-1 receptor antagonist in BAL fluid of cavitary pulmonary tuberculosis. *Chest* 117:103-109.

Umachandran M, Howarth J, Ioannides C. 2004. Metabolic and structural viability of precision-cut rat lung slices in culture. *Xenobiotica*. 34(8):771-780.

van Crevel R, Ottenhoff THM, van der Meer JW. 2002. Innate immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *Clinical Microbiology Reviews*. 15:294-309.

van Deventer SJ. 2001. Transmembrane TNF-alpha, induction of apoptosis, and the efficacy of TNF-targeting therapies in Crohn's disease. *Gastroenterology*. 121:1242-1246.

Vickers AEM, Jimenez RM, Spaans MC, Flimin VP, Fisher R, Brendel K. 1997. Human and rat lung biotransformation of cyclosporine A and its derivatives using slices and bronchial epithelial cells. *Drug Metabolism and Disposition*. 25:873-880.

Wesa AK, Galy A. 2001. IL-1 β induces dendritic cells to produce IL-12. *International Immunology*. 13:1053-1061.

- WHO. 2009. *Global tuberculosis control 2009, epidemiology, strategy and financing: WHO report 2009*. Switzerland: WHO, (WHO/HTM/TB/2009.411).
- Wigginton JE, Kirschner D. 2001. A model to predict cell-mediated immune regulatory mechanisms during human infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Immunology*. 166:1951-1967.
- Wijeweera JB, Gandolfi AJ, Parrish A, Lantz RC. 2001. Sodium arsenite enhances AP-1 and NFkappaB DNA binding and induces stress protein expression in precision-cut rat lung slices. *Toxicological Sciences*. 61:283-294.
- Wohlsen A, Marti C, Vollmer E, Branscheid D, Magnussen H, Becker WM, Lepp U, Uhlig S. 2003. The early allergic response in small airways of human precision-cut lung slices. *The European Respiratory Journal*. 21:1024-1032.
- Wolf AJ, Linas B, Trevejo-Nuñez GJ, Kincaid E, Tamura T, Takatsu K, Ernst JD. 2007. *Mycobacterium tuberculosis* infects dendritic cells with high frequency and impairs their function in vivo. *Journal of Immunology*. 179:2509-2519.
- Wong KC, Leong WM, Law HK, Ip KF, Lam JT, Yuen KY, Ho PL, Tse WS, Weng XH, Zhang WH, Chen S, Yam WC. 2007. Molecular characterization of clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* and their association with phenotypic virulence in human macrophages. *Clinical and Vaccine Immunology*. 14(10):1279-1284.
- Yamada H, Mizumo S, Horai R, Iwakura Y, Sugawara I. 2000. Protective role of interleukin-1 in mycobacterial infection in IL-1 alpha/beta double-knockout mice. *Laboratory Investigation*. 80(5):759-767.
- Yao Y, Li W, Kaplan MH, Chang CH. 2005. Interleukin (IL)-4 inhibits IL-10 to promote IL-12 production by dendritic cells. *The Journal of Experimental Medicine*. 201:1899-1903.
- Yuhas Y, Berent E, Cohen R, Ashkenazi S. 2009. Roles of NF-kappaB activation and peroxisome proliferator-activated receptor gamma inhibition in the effect of rifampin on inducible nitric oxide synthase transcription in human lung epithelial cells. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 53:1539-1545.

Zhang M, Kim KJ, Lyer D, Lin Y, Belisle J, McEnery K, Crandall ED, Barnes PF. 1997. Effects of *Mycobacterium tuberculosis* on the bioelectric properties of the alveolar epithelium. *Infection and Immunity*. 65:692-698.