

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA**



**ESTUDIO COMPARATIVO DE RECEPTORES
Y CO-RECEPTORES QUE RECONOCEN PATRONES
MOLECULARES DE MICOBACTERIAS Y VIH
EN PACIENTES INFECTADOS Y CITOCINAS**

POR:

Q.B.P. ADRIAN GEOVANNI ROSAS TARACO

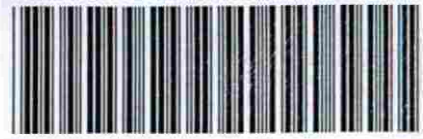
**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER
EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN INMUNOLOGIA**

MONTERREY, N. L., A DICIEMBRE DEL 2002

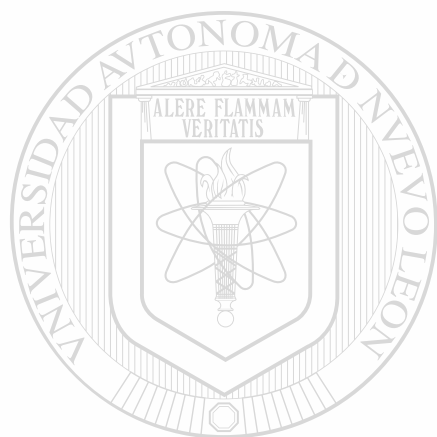
TM
RC607
A26
R6
2002
c.1

Q.B.P. ADRIAN GEOVANNI ROSAS TARACCO

2002



1080116950



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

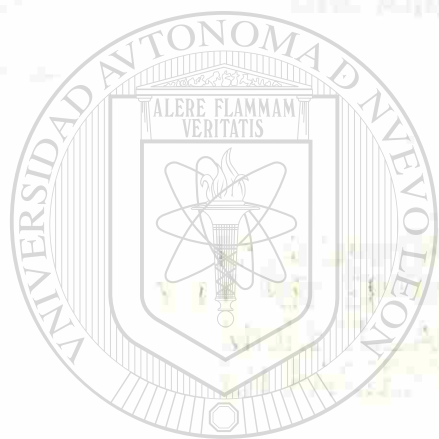


DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA

EN EL CREDITO COLABORATIVO DE INVESTIGACIONES Y CO-INVESTIGACIONES
CON LAS INSTITUCIONES PATRIAS Y NO PATRIAS DE
BIOQUÍMICA II Y VII EN EL CREDITO DE INVESTIGACIONES

Dr. Alma Rosa López Rodríguez



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

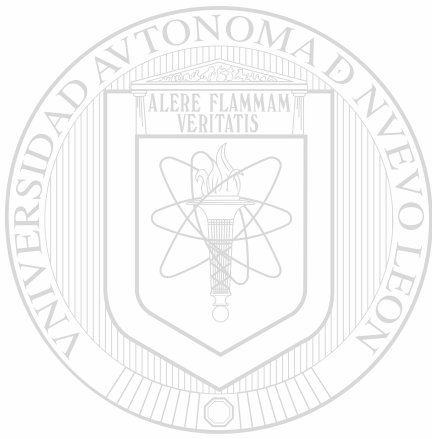
®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

VOLUMEN REQUISITO PARCIAL
Y CREDITO DE MAESTRÍA
EN EL CREDITO DE INVESTIGACIONES
DE BIOQUÍMICA II Y VII
DE INVESTIGACIONES Y
ZAFERÍA DE PASADORA



TM
RC607
.A26
R6
2002



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

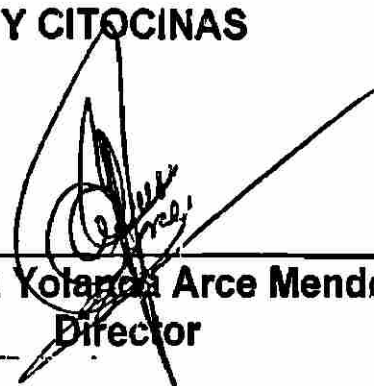
®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

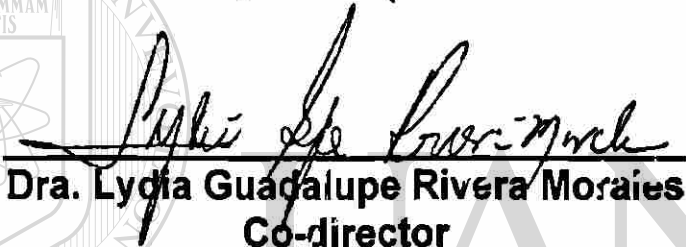
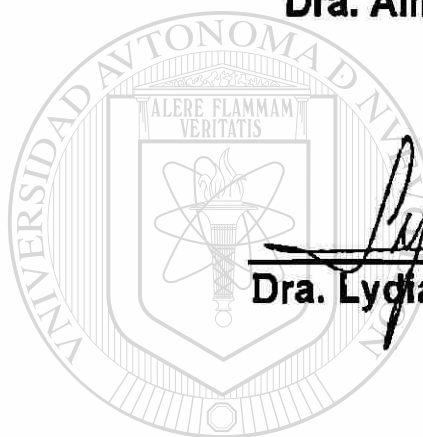
Rangel Flores
UANL
FONDO
DE INVESTIGACIÓN

**ESTUDIO COMPARATIVO DE RECEPTORES Y CO-RECEPTORES
QUE RECONOCEN PATRONES MOLECULARES DE
MICOBACTERIAS Y VIH EN PACIENTES INFECTADOS**

Aprobación de Tesis: **Y CITOCINAS**



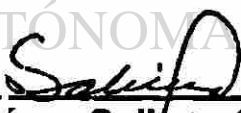
Dra. Alma Yolanda Arce Mendoza
Director



Dra. Lydia Guadalupe Rivera Moraes
Co-director

UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



Dr. Mario César Salinas Carmona
Miembro de la Comisión



Dr. Dionicio A. Galarza Delgado
Subdirector de Investigación y
Estudios de Posgrado

LUGAR DE TRABAJO

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Inmunoinfectología del Departamento de Inmunología y el Laboratorio de Hematología en la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León bajo la dirección de la Dra. Alma Yolanda Arce Mendoza y co-dirección de la Dra. Lydia Gpe. Rivera Morales, así como también, contamos con la colaboración del Dr. Jacobo Ayala (consulta de infectología de la Clínica No. 25 del IMSS) y del Dr. Guillermo Caballero Olín (consulta de epidemiología de la Clínica No. 28 del IMSS).

Se agradece el financiamiento otorgado para la realización de este proyecto a las siguientes instituciones:

PAICYT. Proyecto: SA599-01

PAICYT. Proyecto: SA815-02.

Finalmente, se agradece a **CONACYT** por la beca crédito otorgada.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

DEDICATORIA

A DIOS.....

Por protegirme, estar siempre conmigo y por encontrar en él la paz espiritual.

A mi madre María Elena Taraco Reyes.....

Por su gran apoyo en estos pasos de superación y respetar cada una de mis decisiones, pero especialmente por creer en mí (mil gracias).

A Viviana Leticia Mata Tijerina.....

Por tú paciencia y comprensión, por tú gran apoyo incondicional y de pareja en éste camino tan largo y duro por recorrer gracias (N.H.D.T.A.D.).

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

A mis hermanos Sergio y Alex.....®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS
Por su amistad y apoyo moral y comprensión en los momentos difíciles.

A todos lo que creyeron en mí y especialmente aquellos que no creyeron.....

AGRADECIMIENTOS

Dra. Alma Yolanda Arce Mendoza....

Por darme la oportunidad de formar parte de su laboratorio, por su asesoría y sobretodo la confianza brindada para realizar esta investigación. Una vez un investigador Suizo dijo "el secreto de la investigación, es dejar hacer a los estudiantes investigación apoyando sus decisiones". Gracias por ese apoyo.

Dra. Lydia Guadalupe Rivera Morales....

Por brindarme su confianza, apoyo, por su valiosa asesoría y revisión de éste trabajo. Por sus palabras de aliento y sobretodo por su amistad.

Dr. Mario César Salinas Carmona....

Por aceptarme ser parte del Departamento, por ser un buen maestro y por compartir sus conocimientos y sugerencias en éste proyecto.

Dr. Javier Márfil y Dr. David Gómez Almaguer....

Por permitirme trabajar en su Departamento, facilitándome el citómetro de flujo, haciendo posible la elaboración de esta tesis.

Q.C.B. Nereida Méndez Ramírez....

Por su ayuda brindada, sus palabras de aliento y por compartir sus conocimientos en citometría de flujo, incondicionalmente, para llevar a cabo la elaboración de esta tesis.

Q.C.B. Rosario Salazar....

Por compartir sus conocimiento, sus palabras de apoyo y su muestra de superación haciendo agradable mi estancia en el Laboratorio de Hematología.

Dr. Guillermo Caballero Olín....

Por su participación tan valiosa y el apoyo con los pacientes en este proyecto, donde con el mismo interés, concordamos con la problemática actual del país, haciendo así una colaboración entre clínicos e investigadores.

Dr. Jacobo Ayala....

Por su participación en esta área de investigación, facilitándonos los pacientes de su consulta.

Dra. Herminia Martínez....

Por tan amable trato y recibimiento en el posgrado, por su preocupación por cada uno de los alumnos, haciendo segura y agradable nuestra estancia en esta Institución.

Dr. Jesús Ancer Rodríguez....

Por su preocupación en esta nueva era de la Facultad, de la Universidad y del país, impulsando y apoyando la investigación científica en las instalaciones de esta facultad.

A todos los Maestros de Tronco Común....

Por su enseñanzas, sus experiencias y por la transmisión de conocimientos, los cuales fueron y serán de utilidad siempre.

A todos los Maestros de la Especialidad....

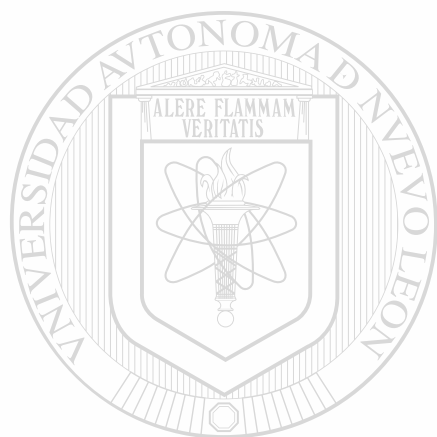
Dra. Alma Yolanda Arce Mendoza, Dr. Carlos E. Medina de la Garza, Dra. Ángeles Castro Corona y al Dr. Mario César Salinas Carmona.

A todo el Departamento de Inmunología....

M.C. Isabel Pérez, Q.F.B. Alejandra Gallegos, Dr. Solís, Dr. Ernesto Torres, Q.C.B. Edith Pequeño, Alejandro, Lissy, Araceli, Brenda, Camelita, Frank, Carlitos, Reynaldo, Santana, Paty, Dra. Velia, Dra. Jaquie.

A todos los compañeros y amigos del Posgrado....

Angélica, Ariana, Blanca, Luis Miguel, Marcela, Teresa, especialmente, a Graciela y Lorena. A mis compañeros y amigos del Posgrado con especialidad en Inmunología a Marisol, Isabel, Ángeles, especialmente a Lupita de la Cruz y Juan Manuel Zúñiga.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

INDICE DE CONTENIDO

PORTADA	I
COMISIÓN DE TESIS	II
LUGAR DE TRABAJO	III
DEDICATORIA	IV
AGRADECIMIENTOS	V
ÍNDICE DE CONTENIDO	VIII
INDICE DE FIGURAS	X
INDICE DE TABLAS	XII
ABREVIATURAS Y SIMBOLOGÍA	XIII
I. RESUMEN	1
II. INTRODUCCIÓN	3
III. ANTECEDENTES	6
IV. JUSTIFICACIÓN	30
V. HIPÓTESIS	31
VI. OBJETIVO GENERAL	32
VII. ESTRATEGIA GENERAL	33
VIII. MATERIAL Y MÉTODOS	34
8.1 CRITERIOS DE INCLUSIÓN DE INDIVIDUOS	34
8.2 EXTRACCIÓN DE SANGRE VENOSA Y CONTEO DE LEUCOCITOS	34
8.2 ANÁLISIS POR CITOMETRÍA DE FLUJO	35
8.3.1. INCUBACIÓN CON ANTICUERPOS MONOCLONALES	35

8.3.2. ADQUISICIÓN Y ANÁLISIS DE LA MUESTRA	36
8.4 ANÁLISIS INMUNOABSORBENTE LIGADO A ENZIMAS (ELISA)	36
8.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.	37
IX. RESULTADOS	38
9.1 CARATERÍSTICAS GENERALES DE LOS GRUPOS	38
9.2 EXPRESIÓN DE RECEPTORES/CO-RECEPTORES EMPLEADOS POR MICOBACTERIAS Y VIH EN LA REGIÓN DE LINFOCITOS.	40
9.3 EXPRESIÓN DE RECEPTORES/CO-RECEPTORES EMPLEADOS POR MICOBACTERIAS Y VIH EN LA REGIÓN DE MONOCITOS/GRANULOCITOS.	47
9.4 ANÁLISIS INMUNOABSORBENTE LIGADO A ENZIMAS (ELISA).	54
X. DISCUSIÓN	62
<hr/>	
XI. CONCLUSIONES	69
XII. PERSPECTIVAS A FUTURO	71
XIII. BIBLIOGRAFÍA	72

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA	DESCRIPCIÓN	PAG
1.	Papel de las citocinas en la infección por micobacterias.	10
2.	Supresión de la respuesta inmune a la infección por micobacterias.	11
3.	Epidemiología global de TB y número de casos recientes hasta el año 2000.	17
4.	Papel de las citocinas y quimiocinas en la replicación viral.	23
5.	Tropismo del virus de la inmunodeficiencia humana A) virus T-tropical y B) virus M-tropical.	25
6.	Epidemiología global del VIH/SIDA hasta el año 2000.	29
7.	Dot plot donde se señala las regiones para el análisis de receptores/co-receptores.	41
8.	Porcentaje de células e IMF con que se expresan CD11c y CD40 en pacientes con TB en la región de linfocitos.	42
9.	Porcentaje de células e IMF con que se expresan CCR5 y CXCR4 en pacientes con TB en la región de linfocitos.	43
10.	Porcentaje de células e IMF con que se expresan CD11c y CD40 en pacientes infectados con VIH en la región de linfocitos.	44
11.	Porcentaje de células e IMF con que se expresan CCR5 y CXCR4 en pacientes infectados con VIH en la región de linfocitos.	45
12.	Porcentaje de células e IMF con que se expresan CD11c y CD14 en pacientes con TB en la región de monocitos/granulocitos.	48
13.	Porcentaje de células e IMF con que se expresan CD40 y CCR5 en pacientes con TB en la región de monocitos/granulocitos.	49

14.	Porcentaje de células e IMF con que se expresan CXCR4 en pacientes con TB en la región de monocitos/granulocitos.	50
15.	Porcentaje de células e IMF con que se expresan CD11c en pacientes infectados con VIH en la región de monocitos/granulocitos.	50
16.	Porcentaje de células e IMF con que se expresan CD14 y CD40 en pacientes infectados con VIH en la región de monocitos/granulocitos.	51
17.	Porcentaje de células e IMF con que se expresan CCR5 y CXCR4 en pacientes infectados con VIH en la región de monocitos/granulocitos.	52
18.	Producción de IL-1 β en sueros de controles y pacientes.	55
19.	Producción de IL-6 en sueros de controles y pacientes infectados.	56
20.	Producción de TNF- α en suero de controles y pacientes infectados.	57
21.	Producción de RANTES en suero de controles y pacientes infectados.	59
<hr/>		
22.	Producción de IL-8 en suero de controles y pacientes infectados.	60

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA	DESCRIPCIÓN	PÁG
1.	Estimación global de la incidencia y mortalidad de TB en 1990.	16
2.	Influencia de la infección por VIH y la infección con <i>M. tuberculosis</i> .	20
3.	Incidencia de TB y números de casos en personas VIH-positivos por región hasta 1997.	28
4.	Características generales de los grupos.	39
5.	Comparación del porcentaje de células positivas e IMF para cada uno de los receptores / co-receptores en la región de linfocitos.	46
6.	Comparación del porcentaje de células positivas e IMF para cada uno de los receptores / co-receptores en la región de monocitos/granulocitos.	53
7.	Producción de citocinas y quimiocinas en suero de controles y pacientes infectados con VIH y TB.	61

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN[®]
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

ABREVIATURAS Y SIMBOLOGÍA

CD.....	Grupo de diferenciación.
VIH.....	Virus de la Inmunodeficiencia Humana.
TB.....	Tuberculosis.
IMF.....	Intensidad Media de Fluorescencia.
TBMDR.....	Tuberculosis multidrogoresistente.
TBP.....	Tuberculosis pulmonar.
TBEP.....	Tuberculosis extrapulmonar.
ELISA.....	Análisis Inmuno-Absorbente Ligado a Enzimas.
IL.....	Interleucina.
α	Alfa.
β	Beta.
γ	Gamma.
<hr/>	
TNF- α	Factor de Necrosis Tumoral-alfa.
CXCR.....	Receptor de la familia de las α -quimiocinas. [®]
CCR.....	Receptor de la familia de las β -quimiocinas.
RANTES.....	T normal expresada y secretada regulada por activación.
%.....	Porcentaje.
SIDA.....	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida.
INF.....	Interferón.
Th.....	Células T cooperadoras.
gp.....	Glicoproteína.

TGF- β	Factor de crecimiento tumoral-beta.
MCP-1.....	Proteína quimiotáctica del monocito-1.
GRO.....	Péptido relacionado con el crecimiento.
MIP-1 y 2.....	Proteína inflamatoria del macrófago-1 y 2.
IP.....	Proteína inducida por interferón gamma.
MIG.....	Monocina inducida por interferón gamma.
SDF.....	Factor derivado de células estromales.
Fc.....	Fracción cristalizable.
IgG.....	Inmunoglobulina G.
μm	Micrómetro.
<i>et al.</i>	Colaboradores.
MDM.....	Macrófagos derivados de monocitos.
LAM.....	Lipoarabinomanana.
BCG.....	Bacilo de Calmete-Guerin.
Células NK.....	Células asesinas naturales.
CMSP.....	Células mononucleares de sangre periférica.
CR.....	Receptor de complemento.
CHO.....	Células de ovario de hámster chino.
DNAc.....	Ácido desoxiribonucleico complementario.
kDa.....	Kilodaltones.
PMN.....	Polimorfonucleares.
Acm.....	Anticuerpos monoclonales.
TNF-R.....	Receptor de factor de necrosis tumoral.

CD40L.....	Ligando de CD40.
OMS.....	Organización Mundial de la Salud.
ml.....	Mililitro.
μl.....	Microlitro.
CMA.....	Complejo <i>Micobacterium avium</i> .
CDC.....	Centro de control de enfermedades.
M-CSF.....	Factor estimulador de colonias de macrófago.
GM-CSF.....	Factor estimulador de colonias de granulocitos-monocitos.
h.....	Horas.
PGSIDA.....	Programa global de SIDA.
°C.....	Grados Celsius.
PPD.....	Proteína Purificada de <i>M. tuberculosis</i> .
min.....	Minuto.
rpm.....	Revoluciones por minuto.
cat.....	Catalogo.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



I. RESUMEN

Las micobacterias pueden ingresar a la célula huésped a través de moléculas expresadas en la membrana celular (CD11c, CD14 y CD40, entre otras). El VIH se internaliza a su célula hospedera a través de la molécula CD4, pero además, utiliza moléculas co-factoras nombradas comúnmente co-receptores, CXCR4 y CCR5, que son receptores de quimiocinas. Ambas patologías desencadenan una red compleja de citocinas pro-inflamatorias. Con el propósito de determinar si existía una alteración en los receptores/co-receptores de los microorganismos anteriormente mencionados en pacientes infectados con el virus y pacientes con TB, a partir de muestras de sangre periférica estudiamos la expresión e intensidad media de fluorescencia (IMF) de CD11c, CD14, CD40, CCR5 y CXCR4, por citometría de flujo. Además, se determinaron los patrones de citocinas y quimiocinas pro-inflamatorias de sueros de pacientes por la técnica de ELISA.

Nosotros encontramos una disminución en la IMF en el receptor CD11c ($p < 0.05$) en células de pacientes con TB multidrogoresistente (TBMDR), así como también disminuyeron la expresión e IMF de CD40 en linfocitos y monocitos. En las células de pacientes con TB pulmonar (TBP) y extrapulmonar (TBEP) se observó un incremento en la IMF del receptor CD14, también disminuyeron la expresión y la IMF de CD40 en monocitos ($p < 0.05$). El co-receptor CCR5 en linfocitos y monocitos se encontró elevado en el grupo de TBP, lo cual podría contribuir a una infección por virus macrofagotrópicos (M-trópicos) o dual-trópico. Por otra parte, en el grupo infectado con el VIH se incrementó la expresión de CD40 en linfocitos y monocitos (esto explicaría en parte, porque un individuo infectado con VIH es más susceptible a una infección con *M. tuberculosis*). Tanto el incremento del receptor CD40 en pacientes con VIH y el co-receptor CCR5 en TBP pudieran explicar parcialmente la susceptibilidad presentada en individuos infectados con VIH con una posterior co-infección con *M. tuberculosis* y viceversa.

Las citocinas y quimiocinas pro-inflamatorias en sueros de los grupos estudiados, IL-6, IL-8, TNF- α , RANTES e IL-1 β , siendo las dos últimas, las que

en mayor concentración se presentaron. Los valores de IL-1 β fueron notablemente significativos en todos los grupos, mientras IL-6 estuvo elevado en todos los grupos con excepción al grupo de VIH. TNF- α se incrementó solo en el grupo de pacientes con VIH y TBEP. IL-8 solo se encontró diferencia significativa en TBMDR. En cuanto a las citocinas pro-inflamatorias algunos de nuestros resultados concuerdan con los ya reportados por otros autores. Sin embargo, nos llamó la atención las altas concentraciones detectadas de RANTES en muestras estudiadas, probablemente esto se deba a un intento más del sistema inmune para bloquear o modular la expresión del co-receptor CCR5, para así controlar la infección por el VIH.

En conclusión, nosotros describimos los patrones de expresión de receptores y co-receptores que reconocen patrones moleculares de micobacterias y el VIH, así como también el patrón de algunas citocinas y quimiocinas pro-inflamatorias en pacientes infectados con VIH y TB. Se determinó que las células de pacientes con VIH incrementan la expresión e IMF de CD40, lo cual hace a un individuo infectado con VIH más susceptible a una infección por micobacterias. Por otro lado, el incremento de CCR5 en pacientes con TBP, los hace más susceptibles a contraer una infección por virus M-trópicos o dual-trópico.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

II. INTRODUCCIÓN

La tuberculosis (TB) es una enfermedad altamente infectocontagiosa producida por *Mycobacterium tuberculosis* principalmente, en la actualidad se piensa que aproximadamente una tercera parte de la población mundial se encuentre infectada con TB, la cual se creía controlada hace unos años, pero debido a la adquisición de multiresistencia y la aparición del virus de inmunodeficiencia humana (VIH) la enfermedad nuevamente ha estado presentándose en la actualidad en índices elevados (1).

En países en vía de desarrollo donde la prevalencia de TB en individuos jóvenes, quienes corren con un gran riesgo de contraer la infección por VIH, es mayor del 50 %. Lo anterior es posible debido a los siguientes eventos: 1) la progresión a TB activa es posible cuando los individuos se encuentran infectados de forma latente con TB; 2) cuando existen nuevas infecciones con TB, es común el desarrollo a TB activa. La pandemia de la infección por VIH/SIDA han causado un incremento en las notificaciones de TB en algunos países. Con la habilidad del VIH de destruir el Sistema Inmune, ha permitido desarrollar un factor de riesgo importante para la progresión de infecciones latentes por TB a enfermedad clínica, donde para 1994 el 4.6 % de todas las muertes por TB fueron atribuidas a co-infecciones por VIH. Hasta 1997, los casos reportados de individuos VIH-positivos con TB en el mundo ascienden a 640 000, siendo el continente Africano el más perjudicado (2).

La respuesta aguda del hospedero a una infección primaria por el VIH es caracterizado por la producción de citocinas del tipo Th0 y pro-inflamatorias, tales como interleucina-1 (IL-1), IL-2, IL-6, factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), interferón alfa, beta y gamma (INF- α/β e INF- γ) así como también citocinas anti-inflamatorias como IL-4, IL-10 e IL-13 (3), mientras en etapas tardías de la infección, el patrón de producción de citocinas se ve modificado hacia el tipo Th2 (4, 5). La glicoproteína 120 (gp 120), Tat, Nef y proteína viral R (Vpr) del VIH son inmunomoduladores de la secreción de citocinas en diversas

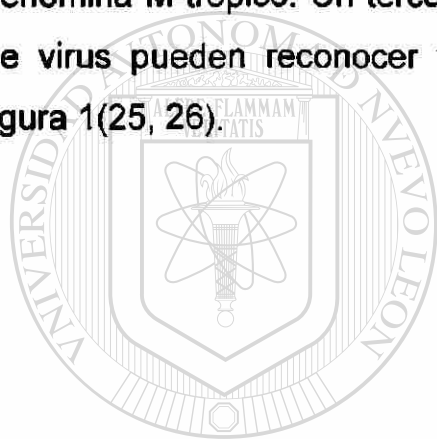
células del sistema inmune. La gp120 induce la secreción de citocinas pro-inflamatorias: IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , INF- α/β e INF- γ (6, 7, 8, 9), también participa en la inducción de IL-4 e IL-13 en basófilos e IL-10 en células mononucleares (10). Por otro lado, la proteína Tat implicada en la replicación viral, induce la producción de las citocinas y quimiocinas IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, factor de crecimiento transformador beta1 (TGF- β 1), citocina quimioatrayente de monocito 1 (MCP-1) y TNF- α (11, 12, 13, 14, 15). La proteína Nef extracelular es una potente inductora de IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-15, TNF- α e INF- γ en varias poblaciones de leucocitos humanos (16, 17, 18). Finalmente, la proteína Vpr, induce la expresión de IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α e INF- γ en diversos tipos de células (19).

Las micobacterias son capaces de inducir la producción de ciertas quimiocinas del grupo de las α y β -quimiocinas. Se han observado en pacientes con tuberculosis pulmonar activa, elevados niveles de péptido relacionado con el crecimiento (GRO), proteína inflamatoria del macrófago 2 (MIP-2), proteína inducible por INF- γ (IP-10), quimiocina inducida por INF- γ (MIG), MIP-1 α , MIP-1 β , T normalmente expresada y secretada regulada por activación (RANTES), MCP-1 e IL-8 en lavado broncoalveolar (LBA) (20, 21).

La interacción de las micobacterias con el macrófago, se lleva a cabo a través de la unión de estos microorganismos a la superficie celular del macrófagos. Las micobacterias utilizan las moléculas expresadas en la superficie celular del macrófago, para internalizarse en él, estas moléculas son receptores de otros factores como: componentes del complemento, manosa, proteína surfactante A, lipopolisacáridos, fracción Fc de anticuerpos del isotipo IgG, macromoléculas polianiónicas y moléculas de interacción celular como CD40 (23).

De la misma manera el VIH entra en contacto con el macrófago a través de moléculas de interacción celular de manera directa y de manera indirecta con

receptores de quimiocinas (22, 24). Los receptores de quimiocinas asociados como cofactores necesarios para la entrada del VIH a diferentes células blancas, además de la molécula de superficie celular $CD4^+$, determinan el tropismo celular de las diferentes cepas aisladas del VIH. Tal es el caso del receptor de α -quimiocinas (LESTR/fusina o CXCR4), cuyo ligando es el factor derivado de células estromales (SDF-1), esta molécula funciona como co-receptor para el VIH en las líneas celulares T. Por presentar este tropismo hacia las células T, las cepas de VIH son nombradas T-trópicas. Otro de los co-receptores son los empleados por las β -quimiocinas (RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β) CC-CR5, el cual es empleado por el VIH en líneas de células de macrófago, por lo que se le denomina M-trópico. Un tercer prototipo del VIH es el dual-trópico, estas cepas de virus pueden reconocer tanto el co-receptor CXCR4 como CC-CR5, ver figura 1(25, 26).



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

III. ANTECEDENTES

3.1 Micobacterias

3.1.1 Patogénesis de las Micobacterias

La ruta de entrada del bacilo de la TB en el cuerpo es a través del tracto respiratorio al inhalar gotitas de micobacterias, las cuales alcanzan un tamaño entre 1 – 2 μm o menos de diámetro, estas pasan hacia el tracto respiratorio bajo. La enfermedad es producida por el establecimiento y la proliferación de bacilos virulentos y las interacciones con el huésped. Una vez en el pulmón puede desencadenar cuatro rutas: 1) Una respuesta inicial del hospedero que podría matar a todos los bacilos efectivamente de tal manera que los pacientes no desarrollen la TB. 2) El microorganismo puede comenzar a multiplicarse y crecer inmediatamente después de la infección, causando una TB primaria. 3) El bacilo puede llegar inactivo y nunca causar enfermedad, tales pacientes tienen una enfermedad latente y presentar reacción positiva para la prueba de la tuberculina. 4) Los microorganismos latentes pueden eventualmente crecer y causar la enfermedad de TB reactiva (22).

3.1.2 Respuesta Inmune

Las células de macrófago son capaces de inhibir el crecimiento de la micobacterias a través del proceso de fagocitosis y de participar en la respuesta inmune celular a través del proceso de presentación de antígeno y reclutamiento de células T. En el proceso de la fagocitosis se encuentran involucrados diversos eventos como la unión de la bacteria a la célula hospedero, la internalización e inhibición del crecimiento o muerte intracelular. La fagocitosis generalmente comienza con el englobamiento de la bacteria invasora en una vacuola de membrana delgada, la cual se forma cuando los pseudópodos de la membrana del macrófago rodean la bacteria y se fusionan. La interacción de la célula fagocítica con la micobacteria, es llevada a cabo por la unión del microorganismo a través de receptores de complemento o manosa u otros receptores de superficie celular.

Mohaghehpour, N. *et al.*, 2000, en sus experimentos no encontraron diferencia significativa en los índices de porcentajes de células apoptóticas encontrados en células dendríticas y macrófagos derivados de monocitos (MDM) al ser expuestas a *M. avium*, pero la producción de IL-12 se vio incrementada casi 20 veces más en las células dendríticas que en los MDM, mientras IL-1 β se mantuvo en concentraciones similares en ambas células (27).

3.1.3 Papel de citocinas y quimiocinas en infecciones por micobacterias

La interacción de los macrófagos con otras células efectoras ocurre a menudo gracias a las citocinas y quimiocinas. Estas moléculas juegan un papel importante en la atracción de otras células efectoras participantes en la inflamación. Una quimiocina importante en la interacción micobacteria-hospedero es la interleucina 8 (IL-8) miembro de la familia de quimiocinas CXC, en la cual se incluyen un número de proteínas estimuladas por INF γ como IP-10 y MIG. Entre sus funciones IL-8 tiene la capacidad de reclutar neutrófilos, linfocitos T y basófilos en respuesta a una variedad de estímulos. La expresión del gen y la secreción de IL-8 es incrementada en macrófago por su interacción con *M. tuberculosis* o por uno de sus componentes de la pared celular, lipoarabinomanana (LAM) (28).

Se ha observado la liberación de TNF α *in vitro*, tras la interacción del macrófago-monocito con las micobacterias, las proteínas micobacterianas y el LAM (29). Además, se ha descrito el papel de TNF α en la estimulación de la formación del granuloma tuberculoide. La producción de INF γ , IL-4 e IL-6 es necesaria para que se lleve a cabo la inducción de macrófagos tuberculostáticos (inhiben el crecimiento de las micobacterias). Los resultados de las investigaciones realizadas por Bloom, B. *et al.* en 1994, sugieren la participación de INF γ y los mecanismos de la respuesta inmune celular en la hipersensibilidad de tipo retardada. Estos son necesarios para la resistencia a infecciones con *M. tuberculosis*. Los individuos que carecen de la cadena α (de unión al ligando) o

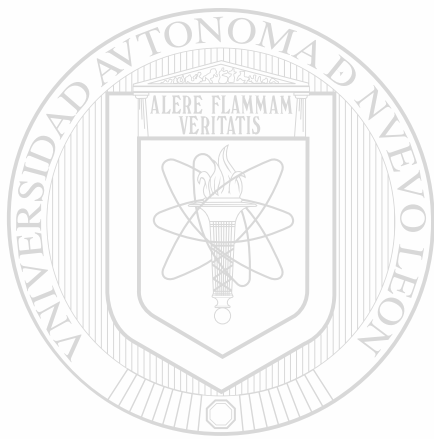
β (de señalización) del receptor de $\text{INF}\gamma$, mueren al suministrarse la vacuna de BCG o por infecciones con *M. avium* o *M. fortuitum* (30).

La interleucina 12 (IL-12) es una citocina producida por macrófagos y células B principalmente, esta ejerce efectos pleiotrópicos sobre el sistema inmune induciendo la producción de $\text{INF}\gamma$, de células T y NK e incrementa la proliferación y citotoxicidad de estas células, así como también, juega un papel esencial en la respuesta inmune contra micobacterias, ver figura 1 y 2.

Estudios de Flynn, J. *et al.* en 1994, al emplear ratones BALB/c infectados con *M. tuberculosis* y al ser tratados con IL-12 disminuyeron la carga bacteriana, pero al tratar los ratones con $\text{INF}\gamma$, este tratamiento no afectó la sobrevivencia o carga bacteriana (31). Además, se ha reportado que en ratones y humanos carentes de la cadena p40 del heterodímero de IL-12 o de la subunidad receptora de IL-12, tienden a ser más susceptibles a infecciones micobacterianas con una menor secreción de $\text{INF}\gamma$ (32).

Un inactivador importante de macrófagos en humanos podría ser el $\text{TGF-}\beta$, el cual es una citocina ampliamente distribuida y producida principalmente por monocitos y macrófagos. Aunque tiene efectos pro-inflamatorios como el aumento en la quimiotaxis de monocitos e incremento en la expresión de receptores Fc, $\text{TGF-}\beta$ también tiene importantes efectos anti-inflamatorios como la desactivación de la producción de intermediarios de oxígeno y nitrógeno en el macrófago, inhibe la proliferación de las células T, interfiere con la función de células NK y linfocitos T citotóxicos y regula la liberación de $\text{INF}\gamma$, $\text{TNF}\alpha$ e IL-1. Otra citocina considerada como inactivadora de macrófago en tuberculosis es la interleucina 10 (IL-10), donde se ha mostrado que la adición de anticuerpos monoclonales anti-IL10 incrementan la respuesta proliferativa de linfocitos T *in vitro*, mientras que la expresión de $\text{INF}\gamma$, IL-2 e IL-4 por células mononucleares de sangre periférica (CMSP) es suprimida por IL-10, ver figura 1 y 2 (22).

Rhoades, E. y Orme, I. en 1997, infectaron macrófagos derivados de médula ósea murina con diferentes cepas de *M. tuberculosis* y observaron por un lado el crecimiento de todas las cepas de *M. tuberculosis*, pero por otro lado, el crecimiento se vio limitado cuando los macrófagos eran cultivados en medio con INF- γ (33).



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

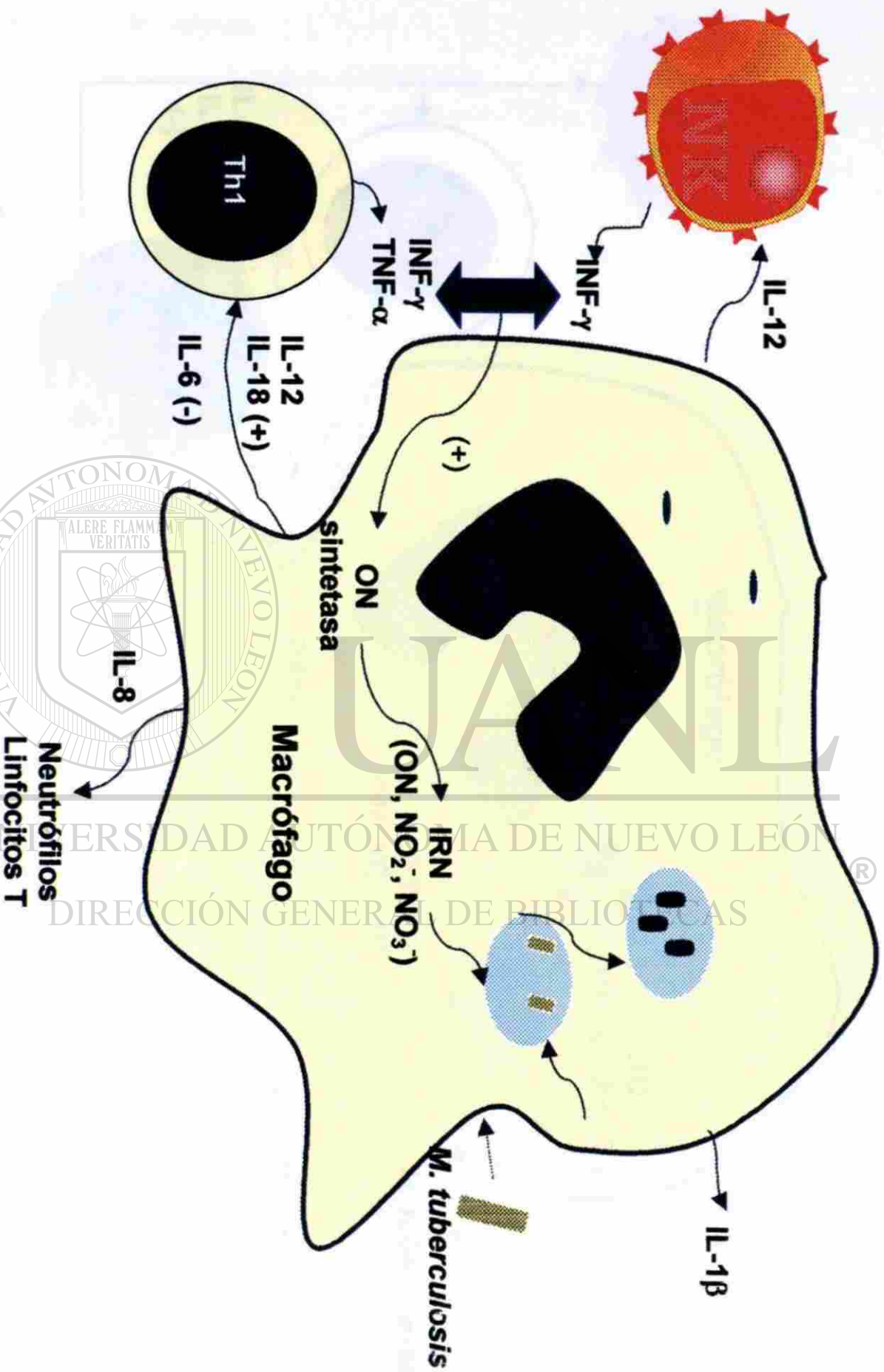


Figura 1. Papel de las citocinas en la infección por micobacterias.

3.1.4 Receptores en macrófago involucrados en la entrada de micobacterias patógenas

Receptores para complemento CD11c(CR4)

Existe evidencia que la unión de *Mycobacterium tuberculosis* es de manera no opsónica. Además, existen otros estudios donde se emplearon anticuerpos monoclonales anti-CD11c y se observó un bloqueo de la unión de *M. tuberculosis* a macrófagos derivados de monocitos, lo anterior fue reforzado al transfectar células de ovario de hámster chino (CHO), de la clona RI 3.7, con DNAc de CR4. Las células transfectadas adquirieron la capacidad de expresar en la superficie celular la molécula de CR4 y al ser expuestas a *M. tuberculosis*, estas últimas lograron unirse a las células. También se ha reportado que la unión de *M. tuberculosis* a CR4 desencadena una señal de traducción potente, de la cual resulta la fosforilación de tirosinas de las proteínas del macrófago, esta fosforilación es catalizada por una tirosin protein cinasa. Esta tirosin-cinasa, fosforila proteínas mayores de 60 kDa y se cree que juega un papel importante en el proceso fagocítico (34).

Receptor CD14

El receptor CD14 es una proteína de membrana unida a un fosfatidilinositol glicano de 55 kDa, la cual se expresa sobre la superficie de monocitos, macrófagos, células de microglia y leucocitos PMN. La molécula es reconocida y caracterizada como un receptor de alta afinidad para lipopolisacáridos de bacterias gram-negativas (35). CD14 puede unirse al LAM de *M. tuberculosis* (H37Ra), dicha unión estimula al macrófago a producir IL-8. Datos aportados por diversos investigadores, describen que tanto el residuo de arabinosa del LAM (AraLAM) como el de manosa (ManLAM) inducen una respuesta distinta en los receptores de manosa y CD14 en células monocíticas humanas y dicha respuesta es dependiente del estado de diferenciación celular (36,37,38). Se ha demostrado la participación de CD14 en la unión de las micobacterias a células de microglia, en donde al adicionar CD14 soluble o

anticuerpos monoclonales (Acm) anti-CD14 a un medio celular de macrófagos, estos inhibieron la unión de la micobacteria al macrófago (39).

Receptor CD40

CD40 es un miembro de la familia de los receptores del factor de necrosis tumoral (TNF-R) en donde se encuentran incluidos el receptor de factor de crecimiento tumoral 1 y 2 (TNF-R1 y TNF-R2, respectivamente), entre otros. CD40 es una proteína integral de membrana de un peso molecular de 50 kDa y se encuentra expresada en células dendríticas, células epiteliales basales, macrófagos, células de Langerhans, células endoteliales y células del epitelio tímico (40). La estimulación de CD40 y su ligando (CD40L) juega un papel crucial en la regulación de la respuesta inmune humoral y la respuesta inmune celular (41). La interacción de CD40 con CD40L en las células presentadoras de antígeno (CPA) es importante para una respuesta de células T, esta respuesta es mediada por al menos dos mecanismos: a) CD40/CD40L incrementan la expresión de moléculas accesorias de las CPA, como CD54, CD80, CD86 y CMH clase II; y b) inducen y/o incrementan la producción de citocinas inflamatorias, como IL-12, TNF α , IL-1 α , IL-1 β , IL-6 e IL-8 en macrófagos y células dendríticas.

Hagashi, T. *et al.* (1999) demostraron la colaboración de la interacción de CD40 con su ligando CD40L en el crecimiento intracelular de *M. avium* "in vitro" ya que al tratar ratas con anticuerpos monoclonales (Acm) anti-CD40L observaron un incremento en el crecimiento de *M. avium* en pulmones, hígado y bazo de ratas acompañado con un incremento de IL-12. Además describieron que la interacción de las células T con los macrófagos infectados con *M. avium* es imperativa para montar una resistencia contra infecciones asociadas con *M. avium* en individuos infectados con VIH-1 (42).

Por su parte, Méndez y García en 2001, al estimular células T con *Mycobacterium bovis* BCG, éste fue capaz de inducir la expresión del CD40L, la

Receptor de manosa

Existen estudios que apoyan la selectividad del receptor de manosa para cepas virulentas de *M. tuberculosis*, donde al emplear *M. tuberculosis* (H37Ra) se observó que estas bacterias no tienen la capacidad de unirse al receptor de manosa. Por el contrario, al emplear *M. tuberculosis* H37Rv esta es capaz de unirse a dicho receptor, esto se ve mediada a través del LAM, el cual está presente en la pared celular de la cepa H37Rv (considerado como factor de virulencia, Roach, T. *et al.*, 1993) y se caracteriza por contener oligosacáridos de manosa. Estos oligosacáridos le permiten incrementar la adherencia a macrófago y este incremento se reduce por la modulación negativa de receptores de manosa en el macrófago (Schlesinger, L. *et al.*, 1993).

3.1.5 Epidemiología de la TB

La prueba de la tuberculina nos permite detectar la presencia de infección o exposición con el bacilo de la tuberculosis y es empleada para medir la prevalencia de la infección. Se ha estimado que en los 90's aproximadamente 1.7 billones de personas (una tercera parte de la población mundial) fueron infectados con *M. tuberculosis* y el número de casos fue de más de 7.5 millones alrededor del mundo. De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 1989 se reportaron 1.3 millones de casos y 450 000 muertos por TB en países desarrollados presentándose con mayor ocurrencia en jóvenes, ver tabla1 y figura 3 (1).

Tabla 1. Estimación global de la incidencia y mortalidad de TB en 1990 (1).

	Incidencia de TB		Mortalidad de TB	
	Casos	Proporción*	Casos	Proporción*
Sudeste de Asia	3 106 000	237	1 087 000	84
Oeste del Pacífico ^(**)	1 839 000	136	644 000	48
África	992 000	191	393 000	76
Este del Mediterráneo	641 000	165	249 000	64
América ^(***)	569 000	127	114 000	25
Este de Europa	194 000	47	29 000	7
Países Industrializados (Ψ)	196 000	23	14 000	2
Total	7 537 000	143	2 530 000	48

*Proporción de Incidencia y Mortalidad por cada 100 000 individuos de población.

**Todos los países de la región excepto Australia, Japón y Nueva Zelanda.

***Todos los países de la región excepto Canadá y Estados Unidos.

ΨEuropa del Este más Australia, Canadá, Japón, Nueva Zelanda y Estados Unidos.

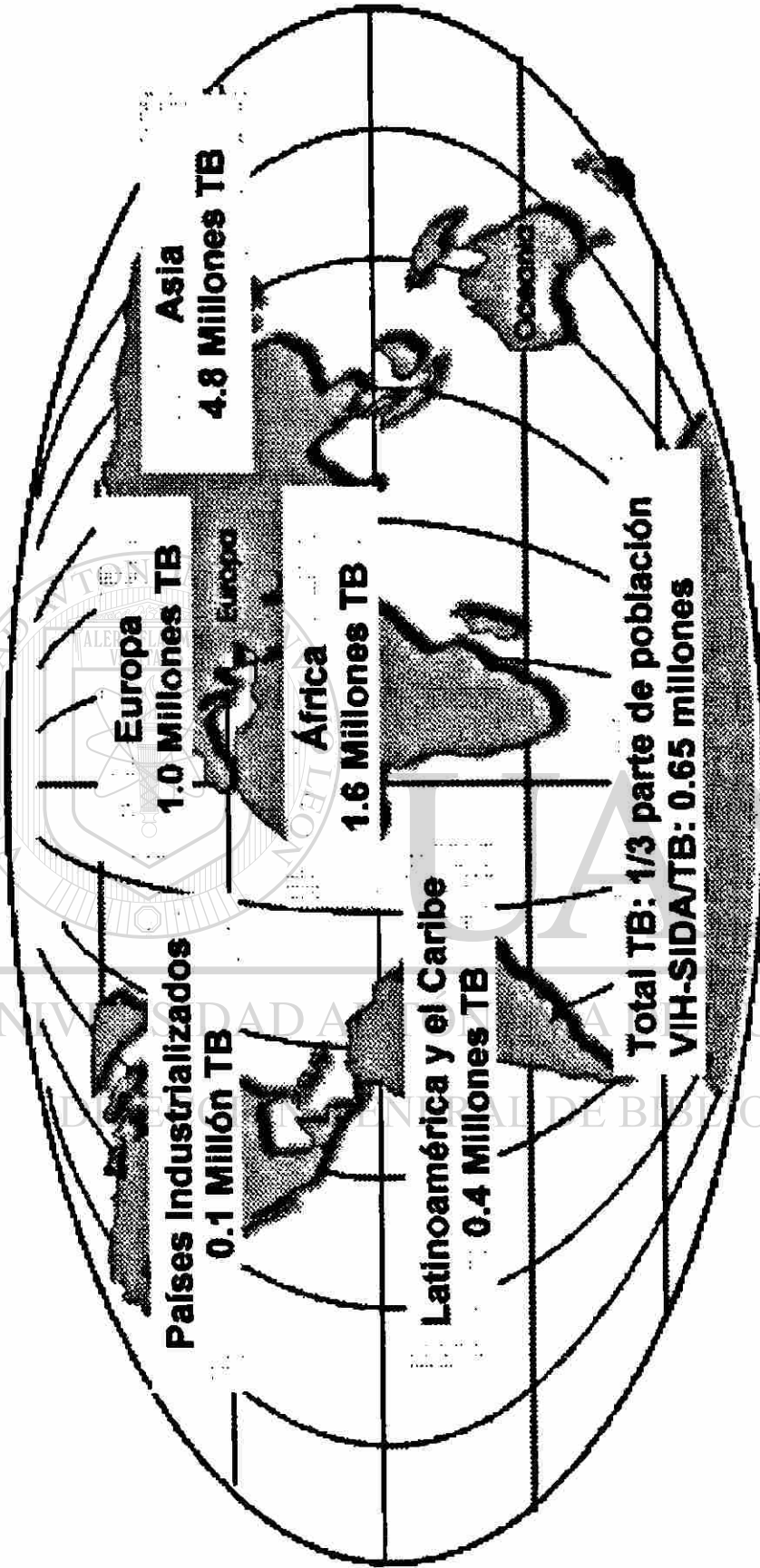


Figura 3. Epidemiología global de TB y número de casos recientes hasta el año 2000.

micobacterianas, candidiasis oral y esofágica, toxoplasmosis y retinitis por Citomegalovirus entre las más importantes, así como también, diversos cánceres como el cáncer cervical, Sarcoma de Kaposi, linfoma de células B asociadas al virus Epstein-Barr (45).

Nightingale, S. *et al.* en 1992, encontraron que los pacientes VIH-positivos/SIDA eran susceptibles a contraer bacteremia por el Complejo *M. avium*, donde observaron una incidencia del 21% y 43 % en el primer y segundo año de seguimiento, respectivamente, en todos los casos el número de células CD4 fue menor de 200 células/ μ l (46). Góngora, R. *et al* en 1997, determinaron que el 4% de los pacientes examinados presentaba infección por el complejo *M. avium-intracellulare* teniendo como característica particular cuentas de linfocitos T CD4 menores de 100 células/ μ l (47).

Los bacilos pertenecientes al Complejo *M. avium* (CMA) y sus constituyentes micobacterianos estimulan a los fagocitos mononucleares para secretar citocinas como IL-1 α , IL-6, IL-10, TNF α , TGF- β y receptor soluble tipo II de TNF (sTNF-RII). Algunas de estas moléculas se encuentran en niveles elevados en individuos infectados con VIH-1.

Havir, D. *et al.* en el 2001, analizaron los cambios de los niveles de las citocinas, anteriormente mencionadas, en el suero de individuos infectados con VIH-1 con bacteremia asociada a CMA antes y después de la profilaxis para CMA. Antes del tratamiento encontraron un incremento en la producción de IL-6, IL-10, TNF α , TGF- β y sTNF-RII, en todos los sujetos antes de la profilaxis, pero no lograron detectar IL-1 α . Mientras después del tratamiento se observó una disminución de IL-6 y TNF α , pero no en IL-10, TGF- β y sTNF-RII (48).

En los últimos años la TB ha vuelto a ser una enfermedad de moda y en la actualidad lo está más por diversos factores, entre los que destaca la infección por el VIH. Debido a que en las personas infectadas por el VIH existe una alta

incidencia de TB, ya sea por la reactivación de una infección TB previa o por una infección TB primaria, o porque las personas infectadas por el VIH presentan una TB con características clínicas atípicas con predominio de sus formas extrapulmonares el CDC incluyó a la TB como enfermedad indicativa de SIDA en 1987. Posteriormente, en 1992 el CDC volvió a revisar la definición incluyendo la TB pulmonar (TBP)..

Tabla 2. Influencia de la infección con VIH y la infección con *M. tuberculosis* (49).

Influencia de la infección del VIH sobre pacientes infectados con <i>M. tuberculosis</i>	Influencia de la infección <i>M. tuberculosis</i> sobre pacientes infectados por el VIH.
a) Hay una alta proporción para que se reactive la enfermedad .	a) Activación de macrófagos en respuesta a la infección con <i>M. tuberculosis</i> , lo cual puede
b) Alta proporción para desarrollar enfermedad aguda.	incrementar la replicación viral del VIH en macrófago.
c) Alta proporción para desarrollar anergia en la piel.	b) Existe una progresión más rápida a SIDA si la infección latente por <i>M. tuberculosis</i> no es tratada.
d) Alta proporción para desarrollar TB extrapulmonar (TBEP).	
e) Mala absorción de drogas Anti-TB.	

3.2.3 Papel de los factores exógenos en la regulación de la replicación viral

El VIH se replica más eficientemente en células activadas y los niveles de títulos virales se ven incrementados consistentemente cuando el sistema inmune de individuos infectados con el VIH es activado por estímulos exógenos tales como patógenos oportunistas. La infección activa por *M. tuberculosis* incrementa

sustancialmente la viremia en plasma, la cual regresa a niveles basales cuando la infección es tratada. Este incremento en la replicación viral esta asociada con la activación celular y la expresión de citocinas inductoras de la replicación del VIH. Sin duda alguna, uno de los continentes mayormente afectados por las infecciones por el VIH es África, donde se cree fue el origen de estos retrovirus, especialmente en el Sub-Sahara, debido probablemente a la asociación de la activación del sistema inmune con infecciones frecuentes y crónicas por parásitos u otros patógenos. La activación inmune esta asociada con altos niveles de citocinas estimuladoras de la replicación del VIH, entre estas se encuentran $TNF\alpha$, $IL-1\beta$ e $IL-6$. Los individuos infectados con VIH manifiestan viremia, cuando estos son inmunizados con antígenos como influenza y toxoide tetánico (50, 51,52, 53, 54, 55).

3.2.4 Papel de las citocinas en la replicación viral

La activación de las células del sistema inmune infectadas con el VIH, se encuentra ligada con la secreción y la expresión de varias citocinas involucradas con la replicación del VIH. Se ha encontrado que la adición de los sobrenadantes de cultivos de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) induce la expresión viral en líneas celulares infectadas crónicamente, tal hallazgo permitió identificar diversas citocinas inductoras de la replicación viral, donde se incluyen a $IL-1\beta$, $IL-2$, $IL-3$, $IL-6$, $IL-12$, $TNF\alpha$ y $TNF\beta$, el factor estimulador de colonia de macrófagos (M-CSF) y factor estimulador de colonia de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), mientras $INF\alpha$ e $INF\beta$, suprimen la replicación viral. Estudios donde bloquean citocinas como a $IL-1\beta$, $TNF\alpha$ e $INF\gamma$ con Acn o receptores antagonistas, revelan la supresión de la replicación viral, observar figura 4 (56,57).

Cocchi, F. *et al* en 1995, observaron la actividad de algunas β -quimiocinas, tales como RANTES, $MIP-1\alpha$ y $MIP-1\beta$, las cuales al ser adicionadas a cultivos de linfocitos T CD8 infectados con VIH-1, VIH-2 y VIS (virus inmunodeficiencia del simio), estas funcionaban como factores inhibitorios

de la replicación viral en todos los casos de manera dosis dependiente, ver figura 4 (58).

Breen, E. *et al.* en el 2000, examinaron la expresión de citocinas en el sobrenadante de CMSP de pacientes infectados con VIH y de individuos sanos. Encontraron que los niveles de IL-2, IL-6, IL-10, INF γ y TNF α de pacientes infectados con VIH se aumentaron entre las 4 y 8 h después de ser estimuladas con mitógenos o anti-CD3, mientras los sobrenadantes de CMSP de los individuos sanos mostraron solo un ligero incremento a las 8 h. Estos resultados hacen suponer que las CMSP de los individuos infectados con VIH, se encuentran en estado activado "*in vivo*" permitiéndoles la expresión de los genes de citocinas más rápido a los de las CMSP normales (59).



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

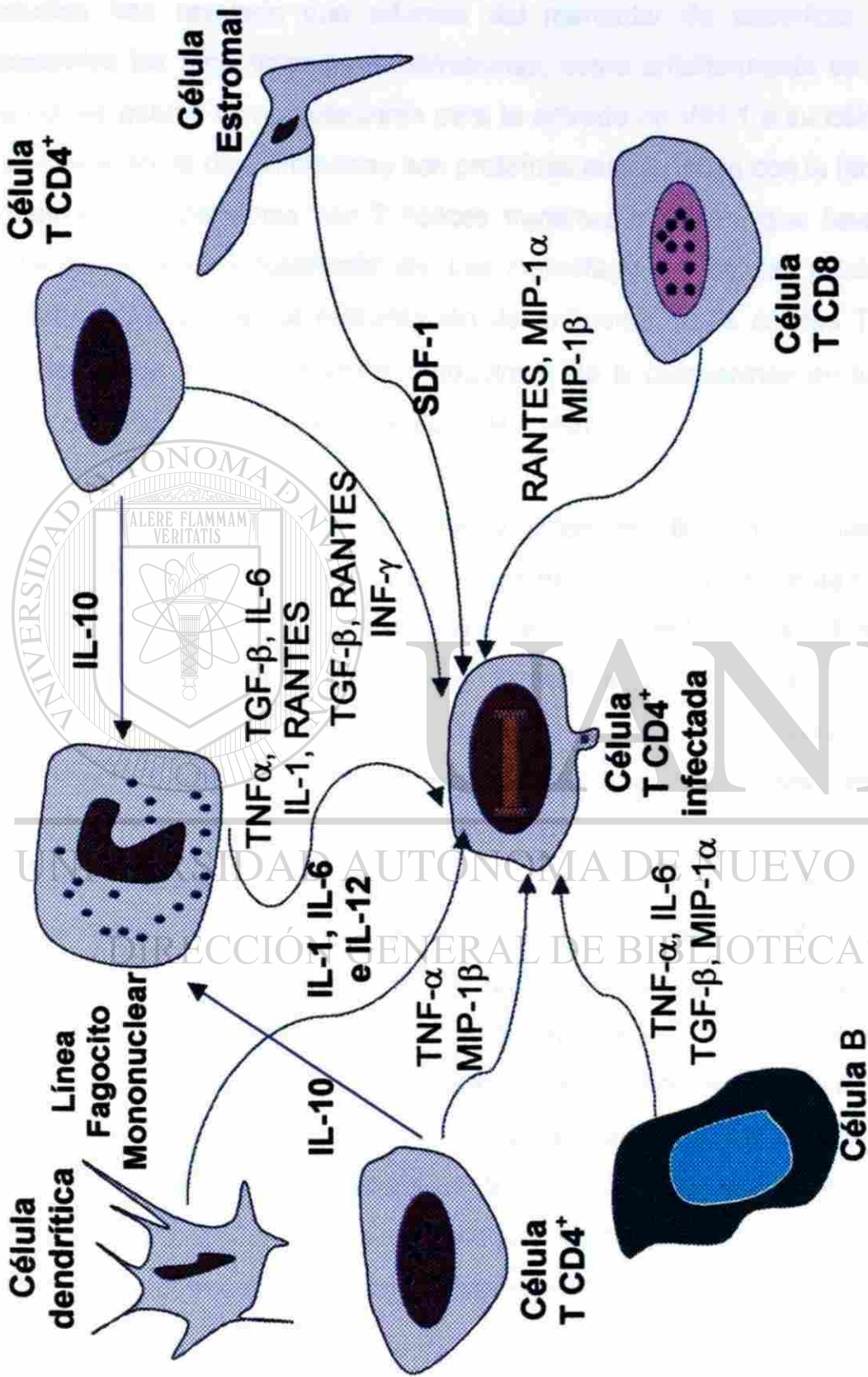


Figura 4. Papel de las citocinas y quimiocinas en la replicación viral.

3.2.5 Receptores y co-receptores en macrófago empleados por VIH-1

Tropismo celular del VIH

Estudios han revelado que además del marcador de superficie CD4, son necesarios los receptores para quimiocinas, como anteriormente se mencionó, los cuales actúan como cofactores para la entrada de VIH-1 a su célula blanco. Estos receptores de quimiocinas son proteínas relacionadas con la familia de las proteínas G o proteínas con 7 hélices transmembranales, que llevan a cabo señalizaciones intracitoplasmáticas. Los macrófago son células productoras de β -quimiocinas durante la presentación de antígenos a las células T y se han reportado que son los mayores productores de β -quimiocinas en los nódulos linfáticos en individuos infectados por VIH-1 (60).

La habilidad del VIH para infectar diferentes tipos de células varía de aislado a aislado y es conocido como tropismo celular. Actualmente los aislados del VIH han sido divididos en subgrupos de acuerdo a las diferencias del tropismo celular a la proporción en la replicación y a efectos citopáticos exhibidos durante ensayos de infectividad *in vitro*. Las cepas trópicas de macrófago (M-trópica) pueden infectar monocitos, macrófagos derivados de monocitos (MDM), cultivos primarios de macrófagos humanos y linfocitos T CD4⁺ primarios. Mientras, las cepas trópicas de líneas celulares-T (T-trópica) pueden infectar líneas celulares T y células T primarias, pero no MDM. Un tercer subgrupo son las cepas dual trópicas, las cuales pueden infectar tanto MDM y líneas celulares de T, así como también linfocitos T CD4⁺. Las cepas del VIH más involucradas en la transmisión sexual como infecciones a través de sangre son la trópicas-M, pero también están presentes en todas las etapas de la infección las trópicas-T y dual-trópicas (61). La diferencia entre la susceptibilidad a infecciones por VIH-1 entre monocitos y MDM, puede ser explicada por la expresión de co-receptores sobre la superficie celular de estas células, observar figura 5.

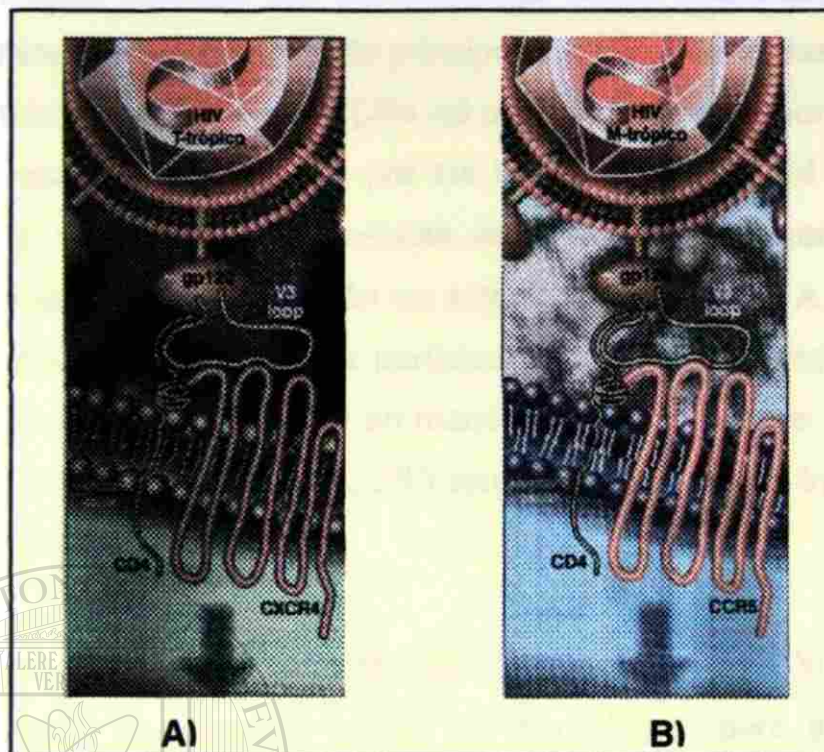


Figura 5. Tropicismo del virus de la inmunodeficiencia humana, A) virus T-tropico y B) virus M-tropico.

Recientemente, un nuevo sistema de clasificación se ha descrito para aislados de VIH-1, basado en el tipo de co-receptor usado conjunto con CD4⁺ para la entrada a la célula blanco. Los aislados virales que usan el receptor de las β -quimiocinas (CCR5) son denominados virus R5, mientras el receptor de las α -quimiocinas (CXCR4) es empleado por los virus denominados virus X4 y ambos receptores son usados por los virus R5X4 (62, 63). El tropismo del VIH-1 por algún tipo de célula, esta determinado por el dominio variable V3 de la glicoproteína de la envoltura externa (gp120) del VIH (64, 65).

Simmons, G. *et al* en 1996, reportaron que algunas cepas de VIH-1 productoras de sincitios en células T CD4⁺ son capaces de reconocer líneas celulares T, así como también células de macrófago. En la infección primaria estas cepas fueron más infectivas en macrófago (donde reconocieron el co-receptor CCR5) que en las células T CD4 (reconocieron el co-receptor CXCR4 o

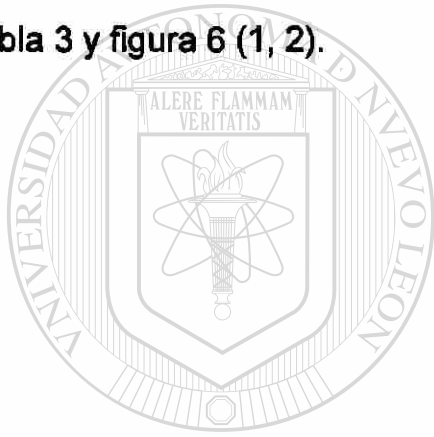
Lestr), sin embargo aunque se presentó un tropismo dual solo las células T CD4 formaron sincitios, mientras que los macrófago fueron incapaces de producirlos (66). El co-receptor CCR5 es usado principalmente por las cepas trópicas-M del VIH-1, mientras el co-receptor CXCR4 (el cual también es denominado fusina o LESTR) es usado principalmente por las cepas trópicas-T del VIH-1 (67). La expresión de co-receptores en células de la línea de monocitos-macrófago depende del estado de maduración de estas (68). Ghorpade, A. *et al* en 1998, realizó estudios que describen la participación de CCR5 como una molécula esencial para la infección del VIH en monocitos. Por otra parte, reveló el papel de la la expresión de los CCR5 y CCR3 son necesarios para la infección del VIH a células de microglia (69).

Lapham, *et al.* 1999, encontró que la expresión de CXCR4 puede ser expresado sobre la superficie celular de macrófagos, pero a diferencia del expresado por células T, éste es de mayor peso molecular. Debido al gran peso molecular del co-receptor CXCR4 expresado en macrófagos y a sus propiedades bioquímicas, éste es incapaz de asociarse con CD4, lo cual contribuye a la entrada ineficiente de cepas que usan este receptor en macrófagos maduros (70). Sozzani, S. *et al.* en 1997, reportaron la expresión de los co-receptores CXCR4 y CCR5 en células dendríticas derivadas de sangre o células Langerhans activadas de piel. Además, no observaron la expresión de CXCR4 en células de Langerhas no activadas, pero sí de CCR5 (71).

3.2.6 Epidemiología VIH/SIDA-TB

El Programa Global de SIDA (PGSIDA) estimó a mediados de 1994 una prevalencia de infecciones por VIH de 13 a 14 millones de individuos adultos infectados alrededor del mundo. El impacto de las infecciones por VIH sobre la TB es grande en poblaciones en la cual la prevalencia de infecciones por TB en adultos jóvenes (quienes corren el riesgo de contraer infecciones por VIH) es relativamente alta. Se estimó que a mediados de 1994 hubo 5.6 millones de personas infectadas con VIH y TB en todo el mundo, de los cuales 3.8 millones

pertenecían a Sub-Sahara en África. Mientras, otros como Norte América se estimaron más de 80 000 individuos con estas infecciones, más de 450 000 en América Latina y el Caribe, 23 000 en el Norte de África y Medio Este, 49 000 en el Oeste de Europa y más de 9 000 en el Este de Europa y la formada Unión Soviética, 20 000 en el Este de Asia y Pacífico, más de 1.15 millones en el Sudeste de Asia y más de 4 000 en Australia. En muchos países desarrollados, la TB ha surgido como la enfermedad oportunista más común asociada con infección por el VIH. Arriba del 54 % de los individuos infectados con VIH presentan TB en África, mientras que un 24 a 28 % de los pacientes en Latino América, un 23 % en Haití y más de la mitad de los pacientes en la India y Tailandia presentan TB clínica durante el curso de la infección con VIH, observar tabla 3 y figura 6 (1, 2).



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Tabla 3. Incidencia de TB y números de casos en personas VIH-positivos por región hasta 1997 (2).

Región	Total de Casos de TB	Proporción*	Casos de TB en personas VIH-positivos (%)
Sudeste de Asia	2 948 000	202	64 000 (2)
Oeste del Pacífico (θ)	1 924 000	129	9 000 (0.5)
África	1 586 000	259	515 000 (32)
Este del Mediterráneo	615 000	129	16 000 (3)
América (Υ)	390 000	79	22 000 (6)
Este de Europa	360 000	74	2 000 (0.5)
Países Industrializados (Δ)	140 000	16	12 000 (8)
Total	7 962 000	136	640 000 (8)

*Por cada 100 000 habitantes

θ Excepto Japón, Australia y Nueva Zelanda.

Υ Todos los países de América, excepto E.U.A. y Canadá.

Δ Japón, Australia, Nueva Zelanda, E.U.A. y Canadá.

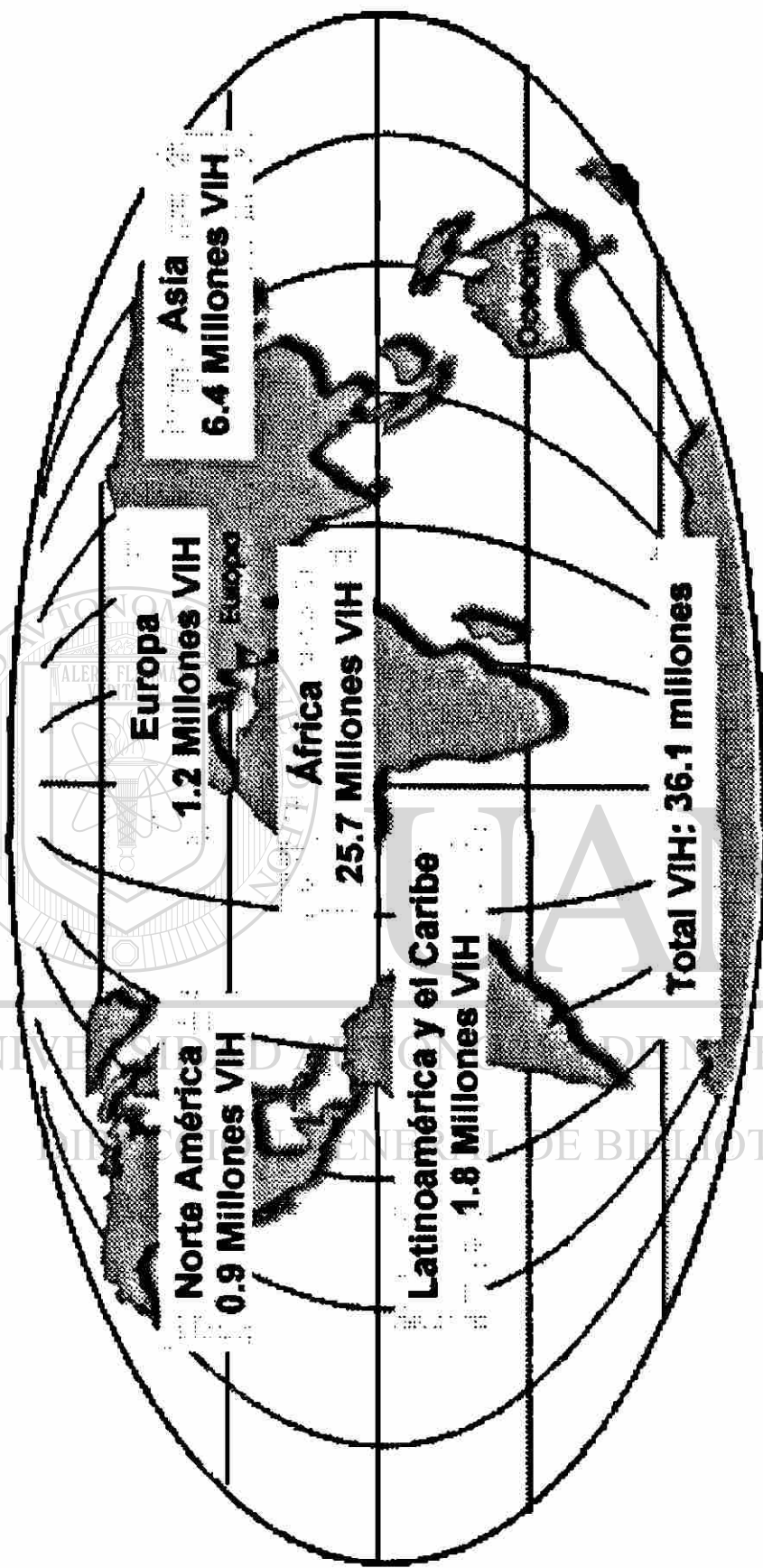


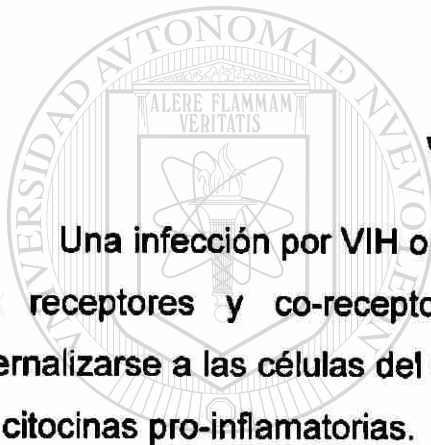
Figura 6. Epidemiología global del VIH/SIDA hasta el año 2000.

IV. JUSTIFICACIÓN

En el macrófago se expresan una variedad importante de moléculas de superficie celular, muchas ellas sirven como receptores de otras moléculas como complemento, manosa, lipopolisacáridos, fracción Fc de las inmunoglobulinas del isotipo de las IgG y moléculas de interacción celular (CD40) y CD4, y los receptores de quimiocinas. Recientemente se ha descrito la participación de muchas de esas moléculas en la entrada de microparásitos como el bacilo de la tuberculosis y el VIH.

Muchos son ya los estudios realizados con el único objetivo de comprender los mecanismos de interacción huésped-parásito de los microorganismos anteriormente mencionados, con el propósito de encontrar nuevas estrategias terapéuticas para el control de las infecciones asociadas a estos patógenos. Debido al tipo de infección y de enfermedad producida por ambos son considerados como un problema de Salud Mundial, debido al alto índice de morbilidad y mortalidad provocados por ambos microorganismos la epidemia de TB/VIH parece estar en aumento en todos los países del mundo, por lo que es importante desarrollar nuevos métodos de control y soluciones para estas infecciones pandémicas.

Por lo tanto, con todos los antecedentes mencionados nuestra investigación estuvo enfocada en la determinación de los niveles de expresión de algunos receptores conocidos para micobacterias en pacientes infectados con VIH/SIDA y además co-infectados con TB, pacientes infectados con VIH y pacientes con TB, así como también se incluyó un grupo control. Se estudió la participación de las citocinas IL-1 β , IL-6 y TNF α , así como también las quimiocinas IL-8 y RANTES. Lo anterior, fue llevado a cabo con el fin de elucidar la participación de uno o varios de los receptores como un o unos mediadores potenciales en la entrada de las micobacterias o VIH en células de sangre de pacientes infectados con el VIH y TB.



V. HIPÓTESIS

Una infección por VIH o TB incrementa la presencia de uno o algunos de los receptores y co-receptores empleados por los microparásitos para internalizarse a las células del sistema inmune y además favorece la producción de citocinas pro-inflamatorias.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

VI. OBJETIVO GENERAL

Identificar la frecuencia de los receptores celulares CD11c (CR4), CD14 y CD40, empleados por Micobacterias y los co-receptores CCR5 y CXCR4, empleados por el VIH, así como cuantificar los niveles de citocinas y quimiocinas pro-inflamatorias.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1.- Determinar el porcentaje de células y la intensidad media de fluorescencia (IMF) que expresan las moléculas CD11c (CR4), CD14 y CD40 empleadas por micobacterias en células de sangre periférica para cada grupo en estudio por el método de citometría de flujo.

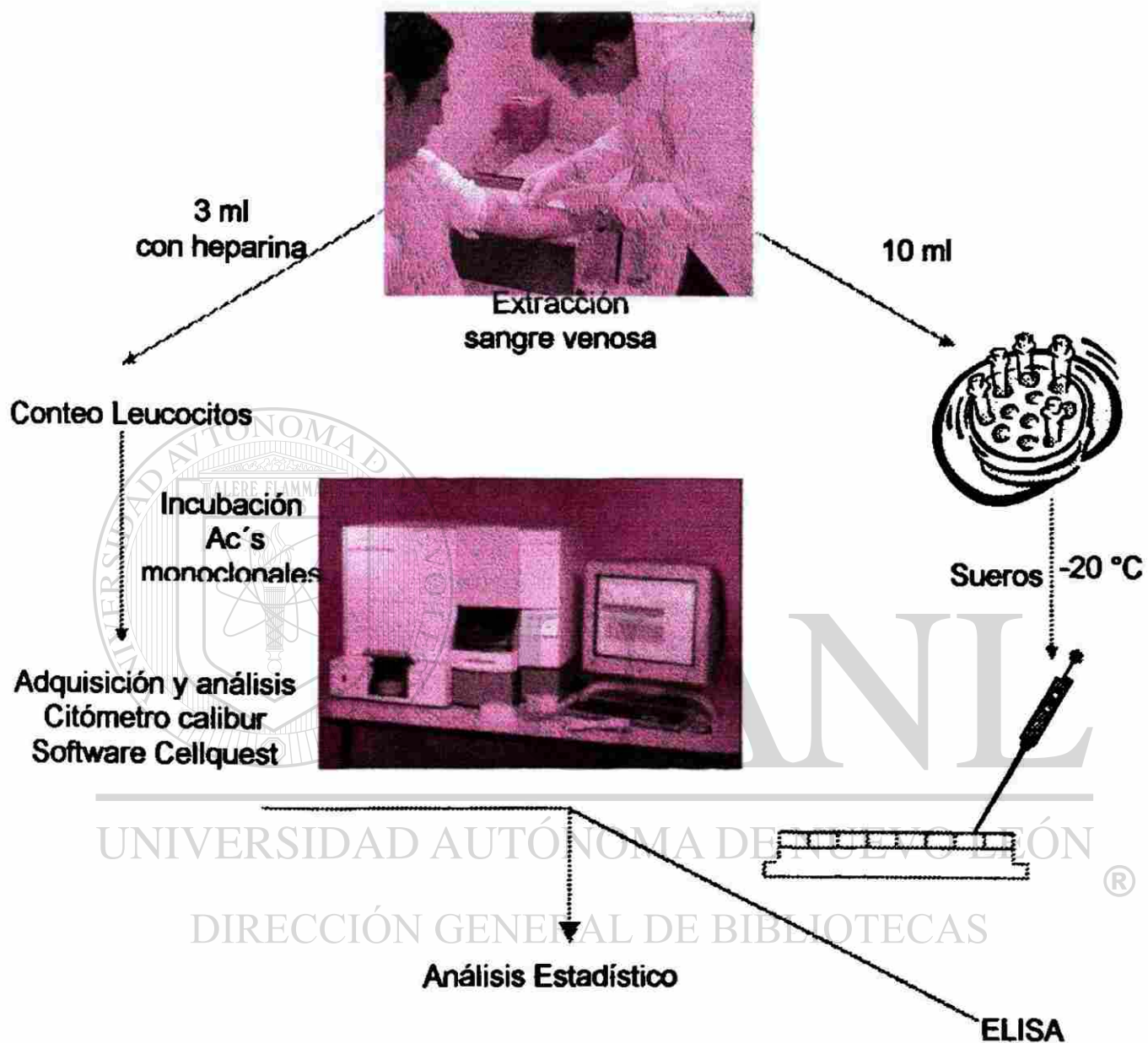
2.- Determinar el porcentaje de células y la intensidad media de fluorescencia (IMF) que expresan las moléculas CCR5 y CXCR4 usados por el VIH en células de sangre periférica para cada grupo en estudio por el método de citometría de flujo.

3.- Cuantificar los niveles de citocinas pro-inflamatorias IL-1 β , IL-6 y TNF- α en cada grupo en estudio por la técnica de ELISA a partir de los sueros de pacientes.

4.- Cuantificar los niveles de quimiocinas pro-inflamatorias IL-8 y RANTES en cada grupo en estudio por la técnica de ELISA a partir de los sueros de pacientes.

5.- Valoración de resultados empleando una prueba de "U" de Mann Whitney y un análisis de correlación de Pearson, utilizando los paquetes estadísticos Sigma Stat, Sigma Plot y Excel.

VII. ESTRATEGIA GENERAL



VIII. MATERIAL Y MÉTODOS

8.1 Criterios de Selección de Individuos.

Se realizaron seis grupos (A, B, C, D, E y F), donde el grupo A se formó por individuos clínicamente sanos, en el grupo B estuvo conformado por pacientes con VIH, el grupo C formado por pacientes con TB pulmonar (TBP), el grupo D representado por pacientes con TB extrapulmonar (TBEP), el grupo E fue integrado de pacientes con TB multidrogoresistentes (MDR). Finalmente, el grupo F fue conformado por pacientes infectados con VIH y co-infectados con TB (VIH-TB).

A Control	B VIH	C TBP	D TBEP	E TB MDR	F VIH-TB
Clinicamente Sanos	Diagnosticado por ELISA, confirmado por Western Blot	Diagnosticado por baciloscopia, cultivo y/o radiografía	Diagnosticado por baciloscopia, cultivo y/o radiografía	Diagnosticado por baciloscopia, cultivo.	Diagnosticado por ELISA, confirmado por Western Blot para VIH
Edad 20-70 años	Edad 20-70 años	Edad 20-70 años	Edad 20-70 años	Con resultados de antibiogramas con resistencia a más de 3 antifímicos.	Co-infección con TB pulmonar o extrapulmonar
Sexo Masculino/ Femenino	Sexo Masculino/ Femenino	Sexo Masculino/ Femenino	Sexo Masculino/ Femenino	Edad 20-70 años	Edad 20-70 años
PPD (+ o -)	Etapa A3/B3 (cuentas CD4* < 200 céls/ml)	Sin otra patología asociada	Sin otra patología asociada	Edad 20-70 años	Sexo Masculino/ Femenino
	En Tratamiento	En Tratamiento	En Tratamiento	Sexo Masculino/ Femenino	Etapa C
	PPD (+ o -).	No MDR	No MDR	Sin otra patología asociada	En Tratamiento
				En Tratamiento	PPD (+ o -).

8.2 Extracción de sangre venosa y conteo de leucocitos.

Se obtuvo 3 ml de sangre periférica heparinizada por punción venosa de cada uno de los grupos. La sangre fue trasladada a un tubo de ensayo de la cual se tomaron 20 µl para realizar una dilución 1:10 con 180 µl de solución de ácido

acético al 2% y se realizó un conteo de leucocitos empleando un hematocitómetro.

8.3 Análisis por Citometría de Flujo

8.3.1. Incubación con Anticuerpos monoclonales

Los leucocitos fueron ajustados entre 3,000 - 11,000 leucocitos/ml. Una vez ajustada las células blancas se prosiguió con el siguiente esquema:

Tubo	Anticuerpo 1	Anticuerpo 2	Muestra
	Control de Isotipo		
1	IgG ₁ -FITC e IgG _{2a} 10 µl	—————	50 µl
2	CD11c-FITC 10 µl Biosource-cat.AHS1158	CD45-PE 10 µl Chemicon-cat.CBL148P	50 µl
3	CD14-FITC 10 µl Biosource-cat.AHS1418	CD45-PE 10 µl Chemicon-cat.CBL148P	50 µl
4	CD40-FITC 10 µl Biosource-cat.AHS4008	CD45-PE 10 µl Chemicon-cat.CBL148P	50 µl
5	CCR5-FITC 10 µl Pharmigen-cat.36464X	CD45-PE 10 µl Chemicon-cat.CBL148P	50 µl
6	CXCR4-PE 10 µl Pharmigen-cat.36195X	CD45-FITC 10 µl Chemicon-cat.CBL148F	50 µl

Las mezclas se colocaron en tubos Falcon de 5 ml, se agitaron e incubaron por 10 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Al finalizar la incubación, se

adicionó 1 ml de solución de lisis, se agitó e incubó nuevamente en oscuridad a temperatura ambiente por 5 minutos. Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas a 1,300 rpm/5 minutos y el sobrenadante resultante fue descartado, al tubo se le agregó 1 ml de solución FACS flow (con el fin de llevar a cabo los lavados) los tubos se agitaron y se centrifugaron a 1,300 rpm/5 minutos. Nuevamente, el sobrenadante se descartó y el precipitado fue resuspendido en 1 ml de solución FACS flow y 200 μ l de formol al 2 % para fijar las células. La muestra fue almacenada a 4°C en oscuridad hasta su análisis en el citómetro de flujo (72).

8.3.2 Adquisición y análisis de la muestra.

La medición de la expresión de las moléculas en cada uno de los grupos se hizo por separado utilizando un citómetro de flujo marca Beckton Dickinson modelo Calibur, utilizando el software Cellquest. Primero, se colocó el tubo 1 conteniendo los controles de isotipo que nos permitieron eliminar la fluorescencia inespecífica. Eliminada la fluorescencia inespecífica (background), se prosiguió a adquirir los datos con un número de 10,000 células, colocando los tubos en el orden anteriormente mencionado en la tabla del punto pasado para cada uno de los individuos. Enseguida se realizó el análisis empleando el mismo software y se analizaron dos regiones: una región correspondiente a los linfocitos y otra región CD14 positiva (monocitos). Los resultados se obtuvieron mediante la impresión de gráficas (histogramas) e intensidad media de fluorescencia (IMF) conteniendo los valores y análisis estadístico del porcentaje de células que expresan dichas moléculas.

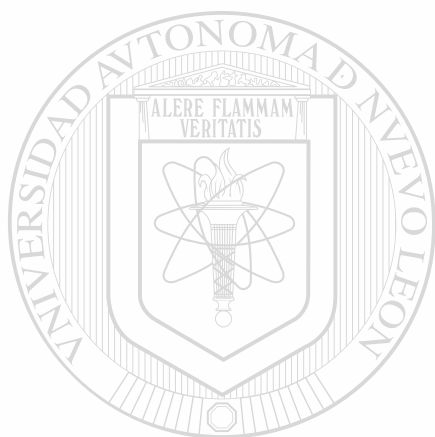
8.4 Análisis inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA).

A partir de los sueros de cada grupo en estudio, se realizó la determinación cuantitativa de las citocinas IL-1 β (Roche, cat.1 600 729), IL-6 (Roche, cat. 1 534 475) y TNF α (Roche, cat. 1 425 943), así como también, se llevó a cabo la determinación de las quimiocinas IL-8 (Biosource, cat.KAC1302) y RANTES

(Biosource, cat. KAC1511), con las especificaciones sugeridas por los fabricantes.

8.5 Análisis Estadístico

Se estableció una prueba de U de Mann Whitney (prueba de rangos) para la comparación de grupos apareados, para determinar si existen diferencia significativa entre el grupo control y los grupos de pacientes. Para esto se emplearon los paquetes estadísticos Sigma Stat, Sigma Plot y Excel.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

IX. RESULTADOS

9.1 Características generales de los grupos.

El grupo de individuos clínicamente sanos estuvo conformado en un 30 % por hombres y un 70 % por mujeres, en el grupo de VIH se reunió un 72.7 % de hombres, el grupo de TB estuvo compuesto en su mayoría por hombres (57.6 %) y por último el grupo de pacientes infectados con VIH y co-infectados con TB estuvo compuesto en 2 terceras partes por hombres. Los promedio de edades radicaron entre los 26-43 años en todos los grupos. El grupo de TB fue subdividido en tres subgrupos, TB pulmonar (TBP) n = 11 pacientes, TB extrapulmonar (TBEP) n = 11 pacientes y TB multidrogoresistentes (TBMDR) n = 7 pacientes. La totalidad de participantes en el grupo control y el grupo de pacientes con TB son heterosexuales, por su parte, el grupo de pacientes infectados con VIH el 54.5 % son heterosexuales, el 27.3 % son homosexuales y el 18.2 % son bisexuales, el 66.7 % de los pacientes infectados con VIH y co-infectados con TB (VIH-TB) son homosexuales. Las cuentas de leucocitos oscilaron entre 7,000 -8000 leucocitos/ml en todos los grupos analizados. Las medias de las cuentas de células CD4⁺ en los pacientes infectados con VIH < 200 células/ml, mientras la carga viral se encontró >138614.3. Datos mostrados en la tabla 4.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Tabla 4. Características generales de los grupos.

Características	A	B	C	D
Control		VIH	TB	VIH-TB
<i>n</i>	10	11	29	3
% Hombres/Mujeres	30/70	72.7/27.3	57.6/42.4	66.7/33.3
Promedio Edad	30.1 ± 7.8 *	36.4 ± 4.9 *	43.3 ± 8.7 *	26.3 ± 6.5 *
%TB pulmonar, TB	_____	_____	37.93 %	66.7 %
Extrapulmonar	_____	_____	37.93 %	33.3 %
TB MDR	_____	_____	24.14 %	_____
% PPD (+)	60 %	41.7 %	89.7 %	_____
% Heterosexual,	100 %	54.5 %	100%	33.3 %
Homosexual o	_____	27.3 %	_____	66.7 %
Bisexual	_____	18.2 %	_____	_____
Leucocitos/ml	8365 ±1335 *	7300 ± 2882.2 *	7544 ± 2409.1*	7000 ± 2100*
Cuenta CD4*	_____	129.1 ± 107.9 *	_____	_____
Carga Viral	_____	136502 ± 155721*	_____	_____

* Desviación Estándar

9.2 Expresión de receptores empleados por micobacterias y VIH en la región de linfocitos.

Para estudiar el porcentaje de células y la intensidad media de fluorescencia (IMF) dividimos nuestro dot plot en 2 regiones conforme a la complejidad de las células y de la expresión de la molécula CD14: a) linfocitos o CD14 negativa y b) monocitos y granulocitos que expresan CD14 (fig. 7). En la región de linfocitos se encontró una gran diferencia significativa en el porcentaje de células que expresan la molécula CD40 tanto en los pacientes con VIH ($p < 0.0001$) fig. 10B, como en los pacientes con TB ($p < 0.0001$) fig. 8B. Al subdividir el grupo de TB observamos que solo el grupo de pacientes con TBMDR, presentaron este aumento ($p = 0.0168$) fig. 8B. Con los co-receptores empleados por el VIH, se observó una disminución significativa en el porcentaje de células que expresaron el co-receptor CXCR4 en el grupo de VIH ($p = 0.0167$) fig. 11B. Por otro parte, en el grupo de TBP se incrementó significativamente el porcentaje de células que expresaron CCR5 ($p = 0.0221$), mientras el grupo de TBMDR lo disminuye ($p = 0.0359$) fig. 9A. La IMF de CCR5 y CXCR4 se vio disminuida en la región de linfocitos en el grupo de pacientes con VIH ($p = 0.0102$ y $p < 0.0001$, respectivamente) fig. 11A-B. La IMF de las moléculas CD11c y CD40 también se encuentran disminuidos en el grupo de pacientes con TBMDR ($p = 0.0021$ y $p = 0.0029$, respectivamente) fig. 8A y fig. 8B. También se observó una disminución en la IMF para la molécula CXCR4 en el grupo de pacientes con TB pulmonar ($p = 0.0265$) fig. 9B. Todos los datos se encuentran agrupados en la tabla 5.

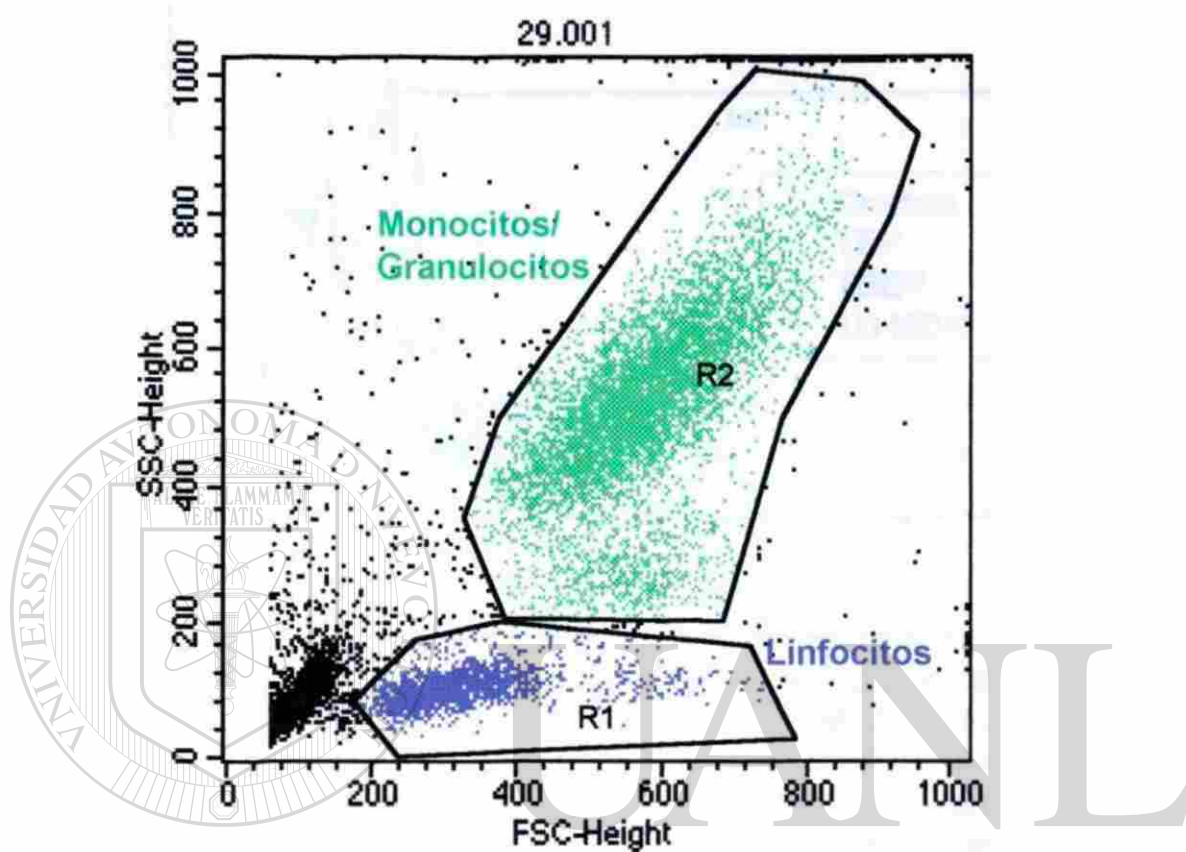


Figura 7 . Dot plot donde se señala las regiones empleadas para el análisis de receptore/co-receptores. ®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

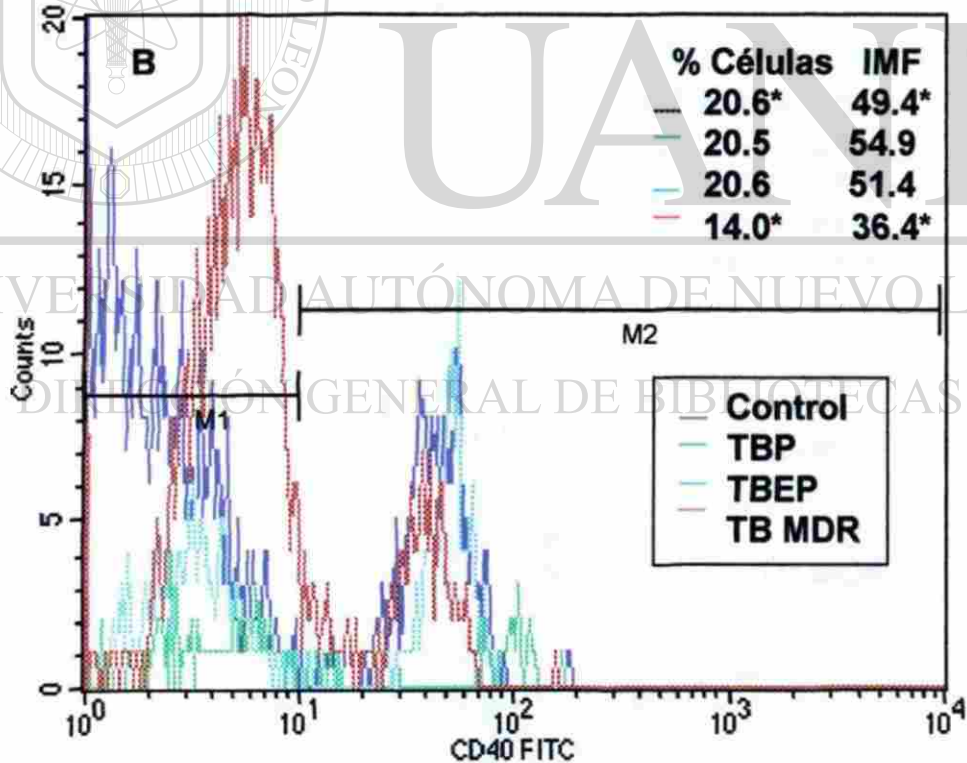
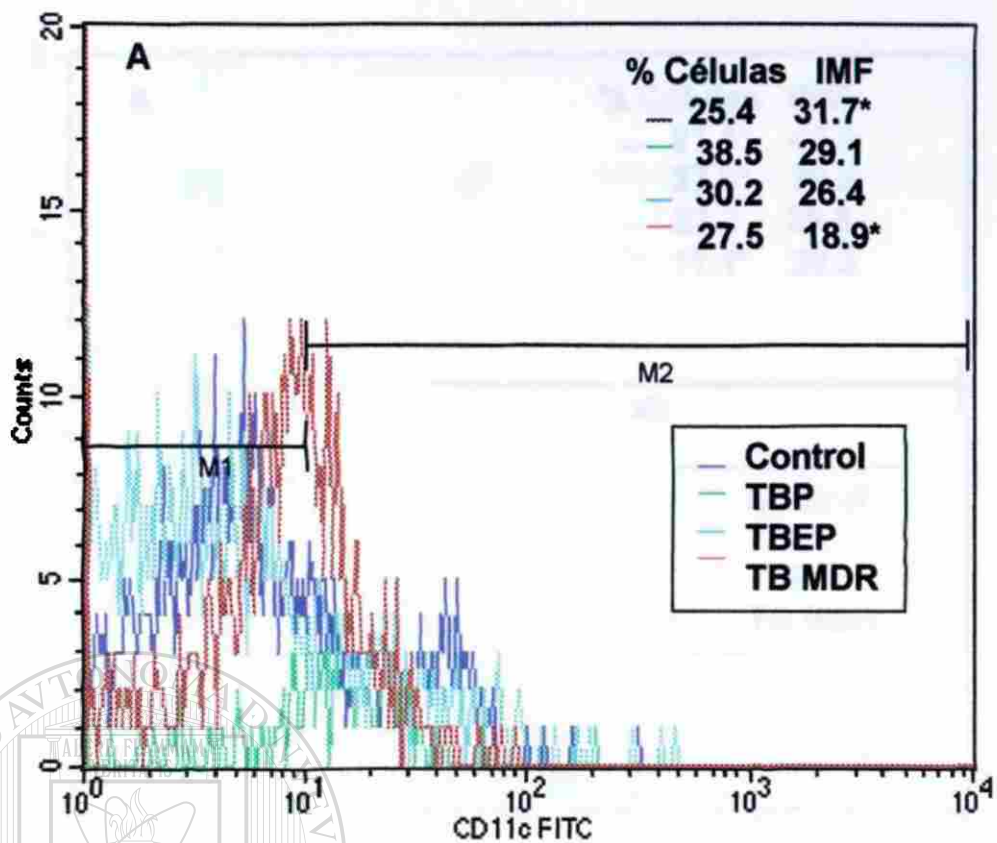


Figura 8 . Porcentaje de células e IMF con que se expresan CD11c y CD40 en pacientes con TB en la región de linfocitos.

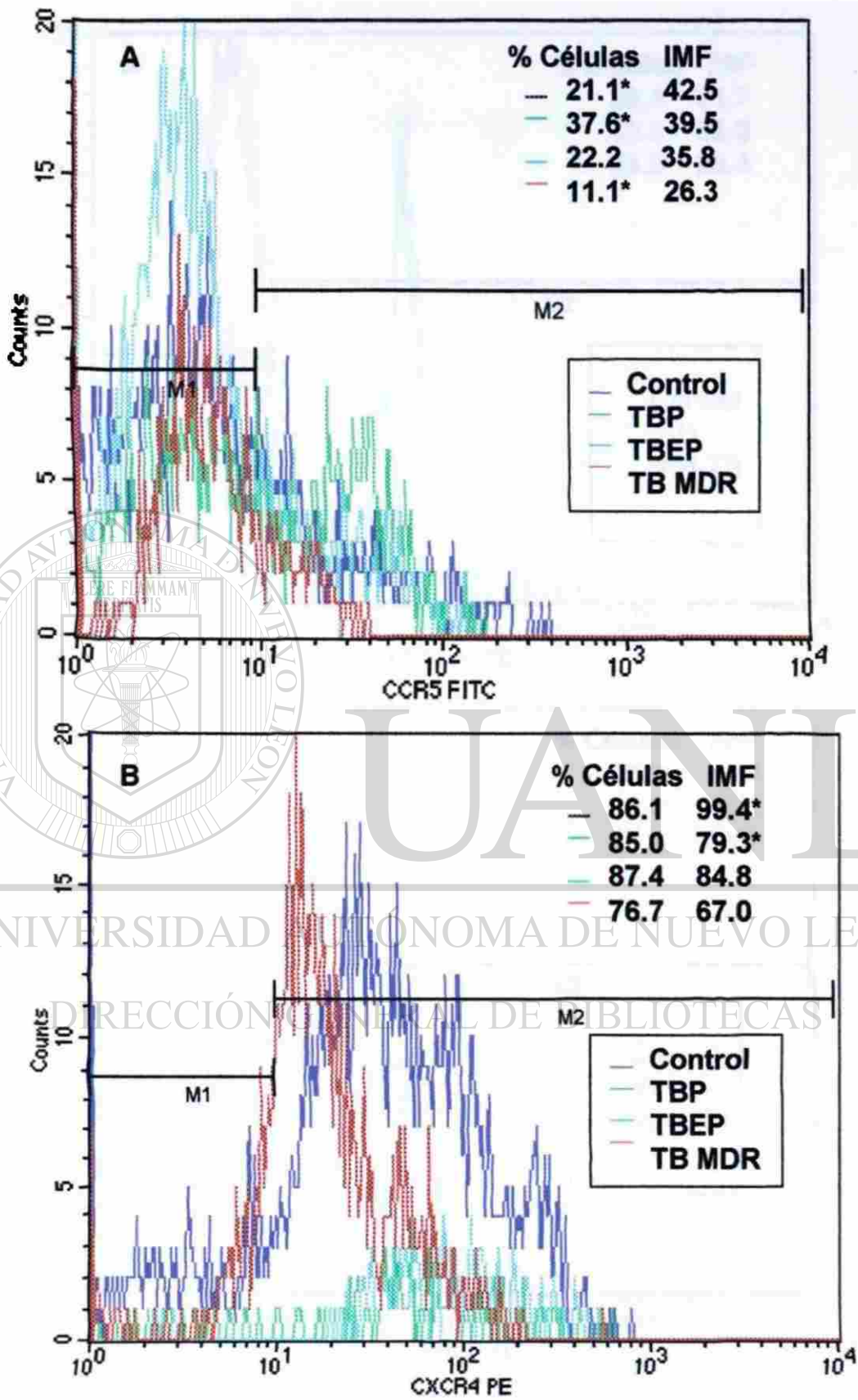


Figura 9. Porcentaje de células e IMF con que se expresan CCR5 y CXCR4 en pacientes con TB en la región de linfocitos.

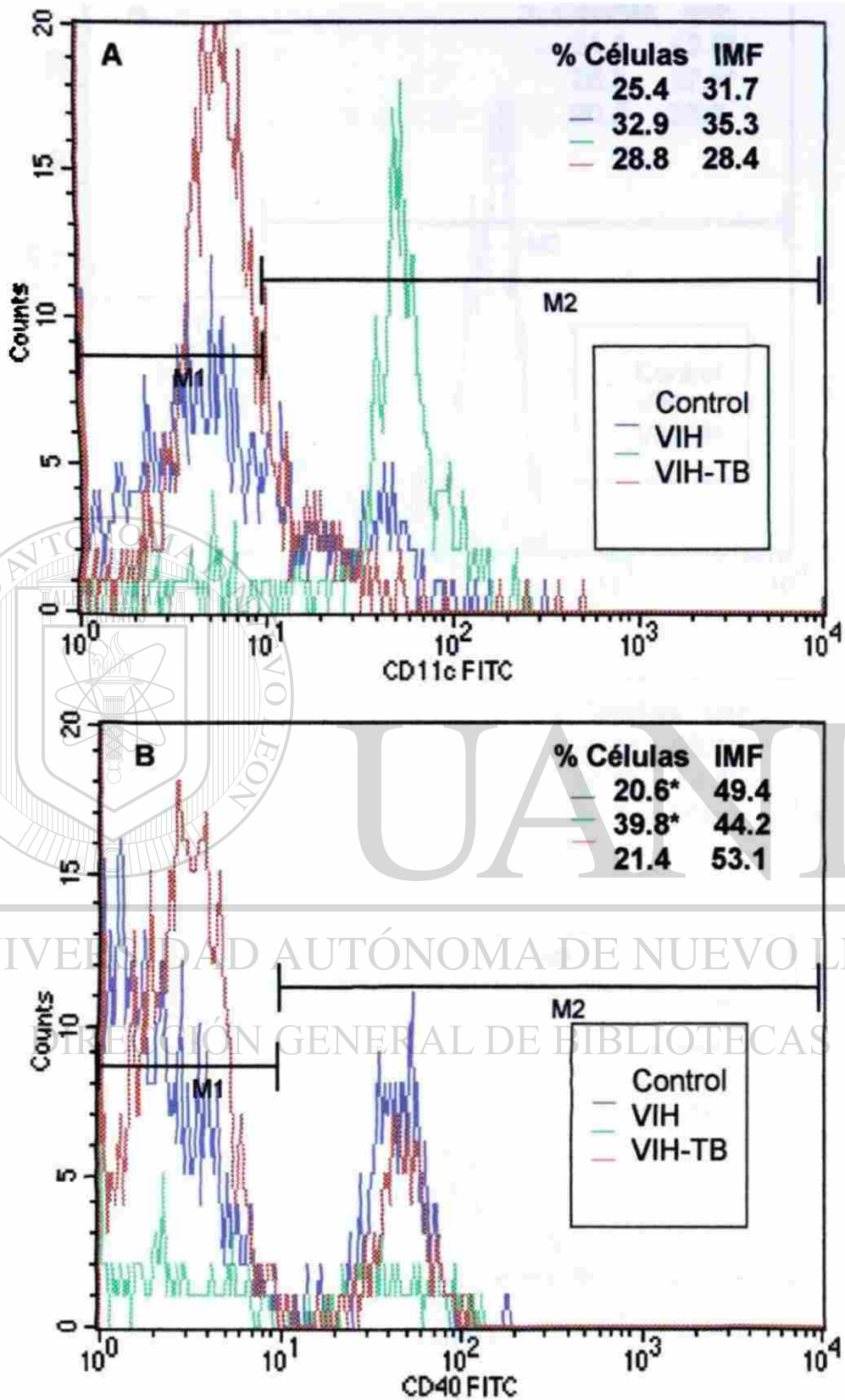


Figura 10. Porcentaje de células e IMF con que se expresan CD11c y CD40 en pacientes infectados con VIH en la región de linfocitos.

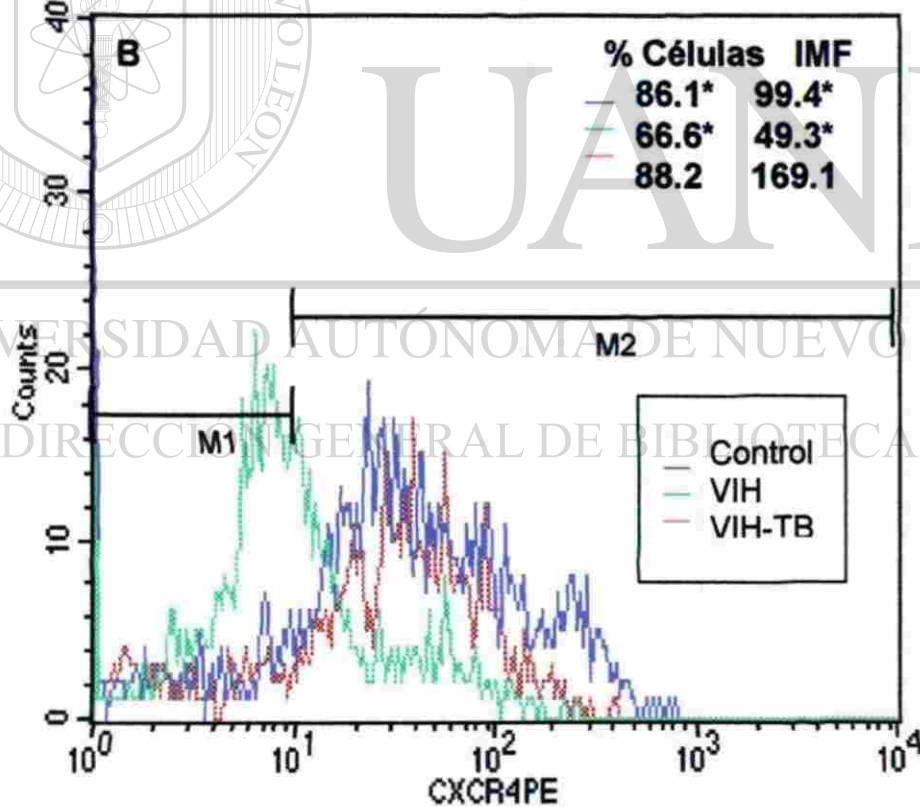
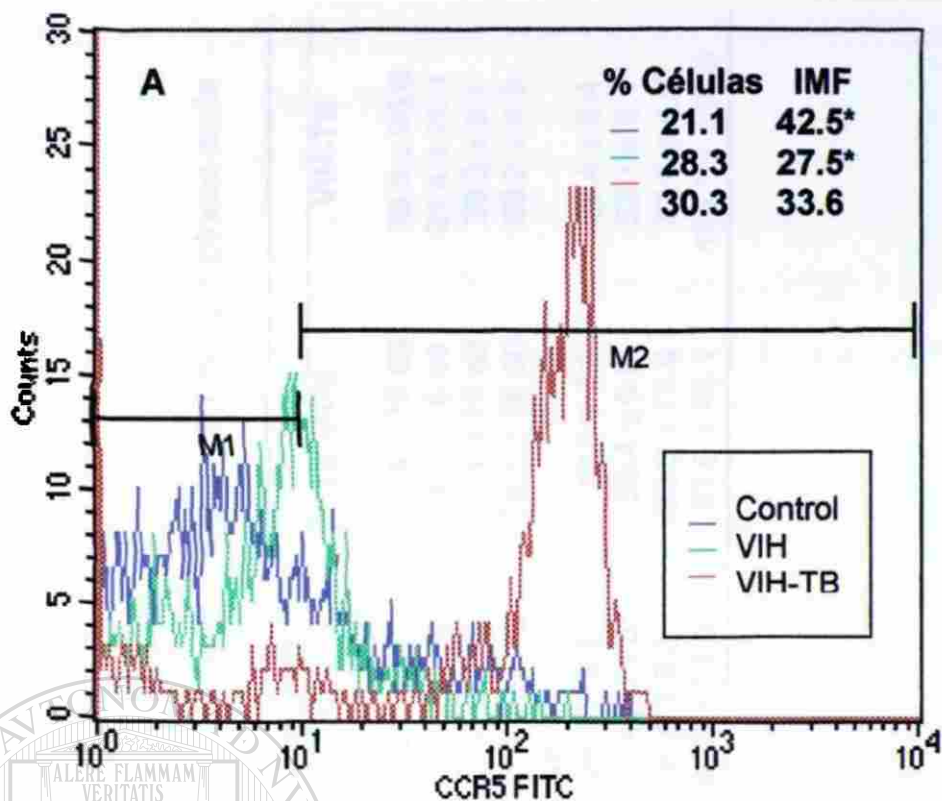


Figura 11. Porcentaje de células e IMF con que se expresan CCR5 y CXCR4 en pacientes infectados con VIH en la región de linfocitos.

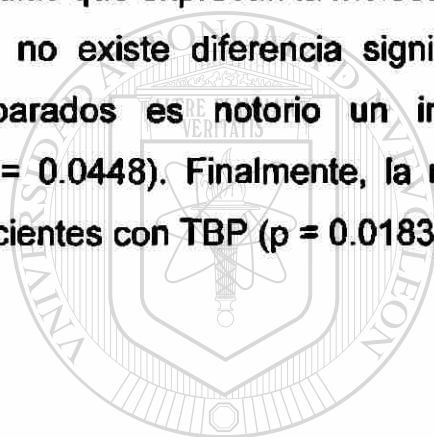
Tabla 5. Comparación del porcentaje de células positivas e IMF para cada uno de los receptores / co-receptores en la región de linfocitos.

Receptor/ Co-receptor	% Células en la Región de Linfocitos (CD14 negativa)					
	Control	VIH	TBP	TBEP	TB MDR	VIH-TB
CD11c	25.4 ± 7.22	32.9 ± 19.89	38.5 ± 23.02	30.2 ± 16.10	27.5 ± 15.69	28.8 ± 25.0
CD40	20.6 ± 7.29	39.8 ± 12.36	20.5 ± 7.80	20.6 ± 5.59	14.0 ± 5.88	21.4 ± 20.1
CCR5	21.1 ± 8.11	28.3 ± 11.02	37.6 ± 12.18	22.2 ± 9.76	11.1 ± 10.43	30.3 ± 9.1
CXCR4	86.1 ± 14.7	66.6 ± 18.10	85.0 ± 14.80	87.4 ± 13.10	76.7 ± 18.50	88.2 ± 4.8
		IMF en la Región de Linfocitos				
CD11c	31.7 ± 7.9	35.3 ± 15.6	29.1 ± 9.3	26.4 ± 8.8	18.9 ± 3.8	28.4 ± 5.4
CD40	49.4 ± 7.6	44.2 ± 14.9	54.9 ± 14.3	51.4 ± 11.5	36.4 ± 6.9	53.1 ± 5.1
CCR5	42.5 ± 12.3	27.6 ± 10.1	39.5 ± 9.1	35.8 ± 8.3	26.3 ± 15.9	33.6 ± 4.5
CXCR4	99.4 ± 21.7	49.3 ± 11.3	79.3 ± 13.9	84.8 ± 19.0	67.0 ± 43.1	169.1 ± 118.6

* Desviación Estándar

9.3 Expresión de receptores empleados por micobacterias y VIH en la región de monocitos/granulocitos.

La IMF de la molécula CD11c, disminuye en los pacientes con TBMDR ($p = 0.0021$). Al analizar los grupos de TB se encontró disminuida en los grupos de TBEP y TBMDR ($p = 0.015$ y $p = 0.0128$, respectivamente). mientras la IMF de CD14 aumenta en los pacientes con TBP ($p = 0.0183$), TBEP ($p = 0.0221$) y TBMDR ($p = 0.0128$). El grupo de VIH incrementó el porcentaje de células y la IMF de CD40 ($p = 0.0183$), contrario a los tres subgrupos de TB, los cuales mostraron una disminución, TBP ($p = 0.0448$), TBEP ($p = 0.0083$) y TBMDR ($p = 0.0029$), respectivamente. Los pacientes con VIH incrementan el porcentaje de células que expresan la molécula CCR5 ($p = 0.0317$), mientras los pacientes con TB no existe diferencia significativa, pero al realizar el análisis por grupos separados es notorio un incremento significativo en el grupo de TBP ($p = 0.0448$). Finalmente, la molécula CXCR4 obtuvo una IMF mayor en los pacientes con TBP ($p = 0.0183$). Datos mostrados en la tabla 6.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

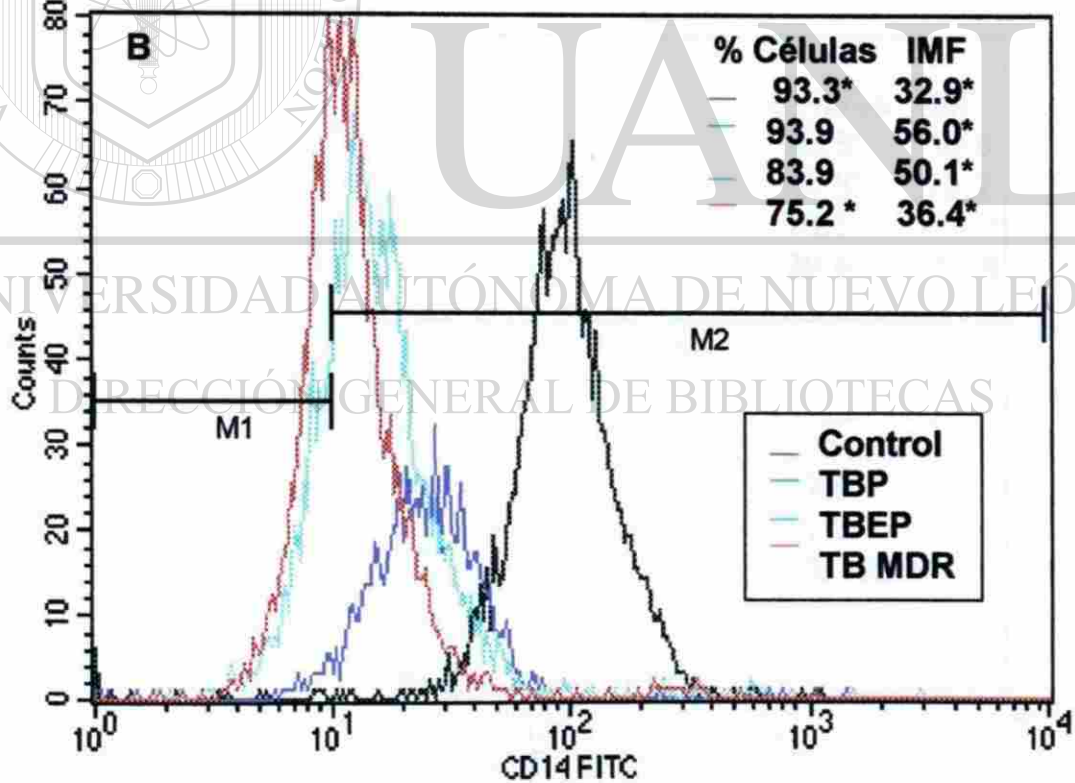
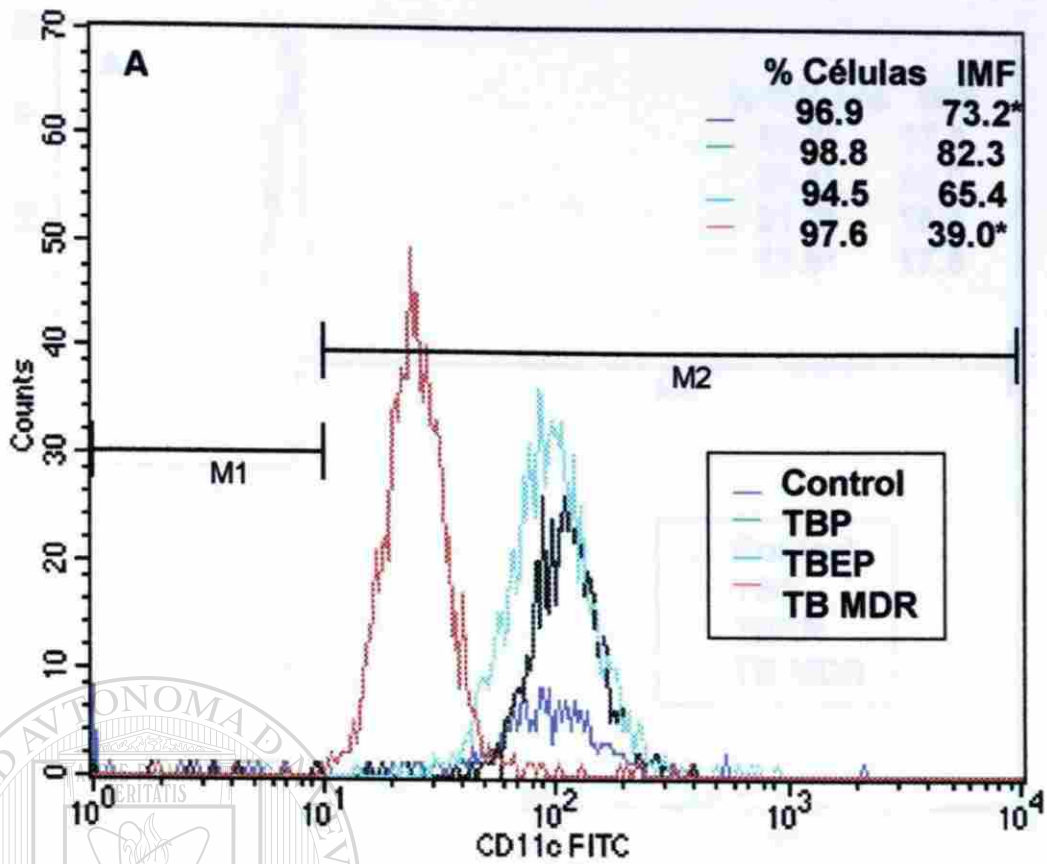


Figura 12. Porcentaje de células e IMF con que se expresan CD11c y CD14 en pacientes con TB en la región de monocitos/granulocitos.

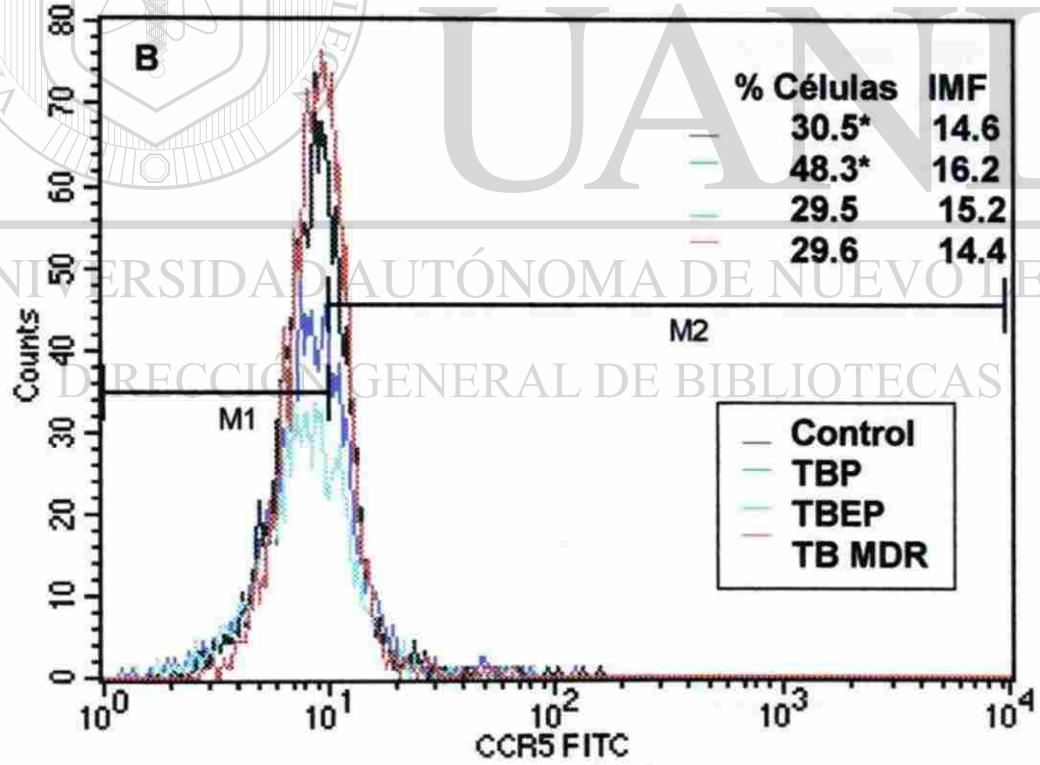
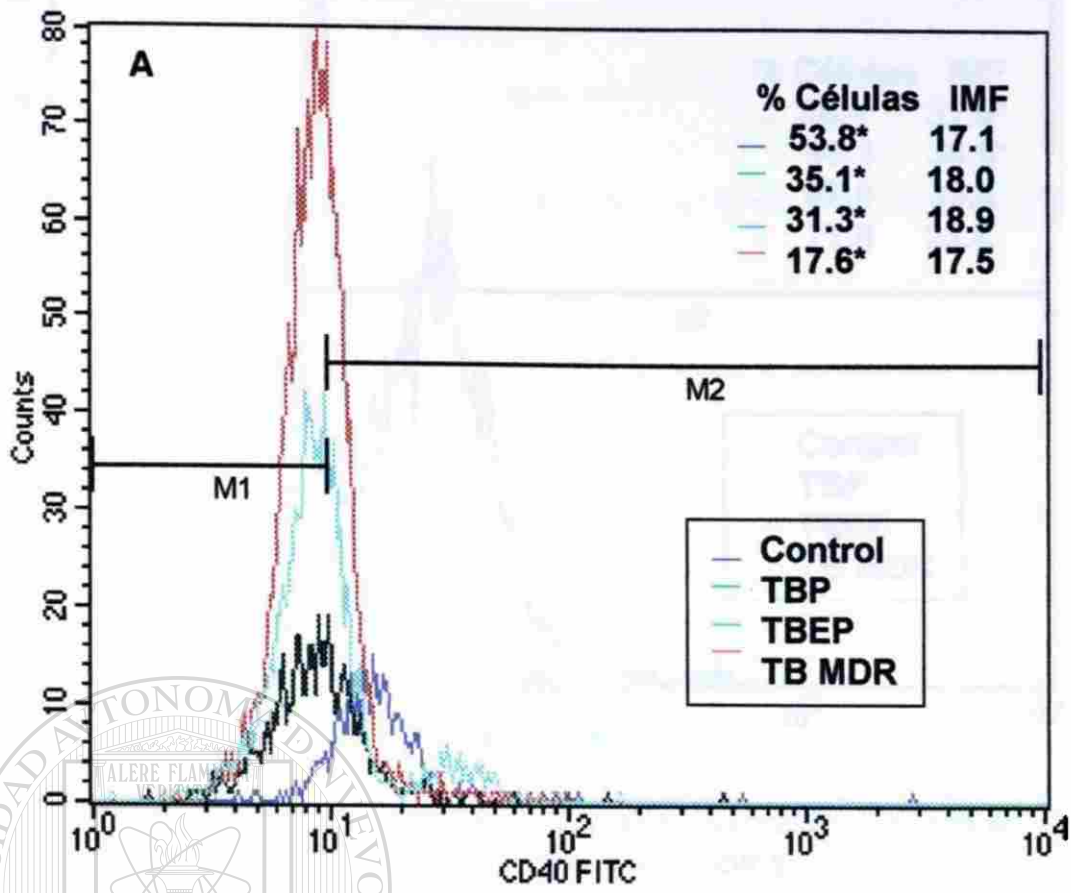


Figura 13. Porcentaje de células e IMF con que se expresan CD40 y CCR5 en pacientes con TB en la región de monocitos/granulocitos.

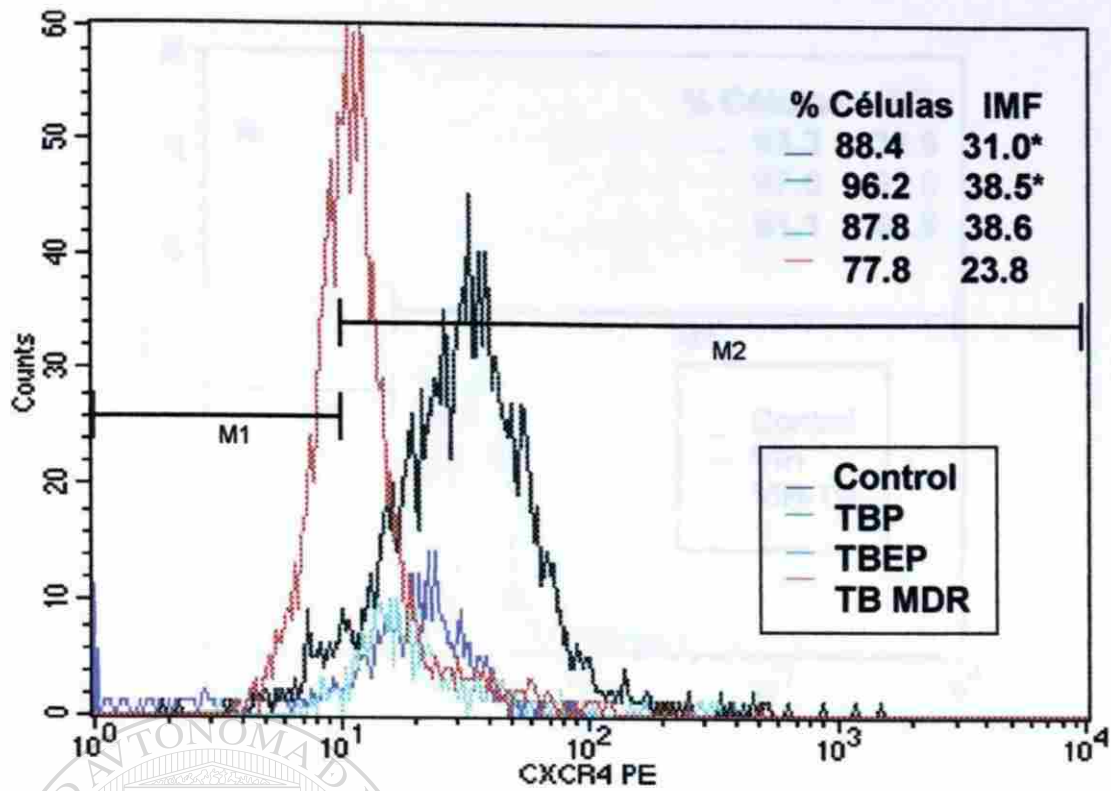


Figura 14. Porcentaje de células e IMF con que se expresan CXCR4 en pacientes con TB en la región de monocitos/granulocitos.

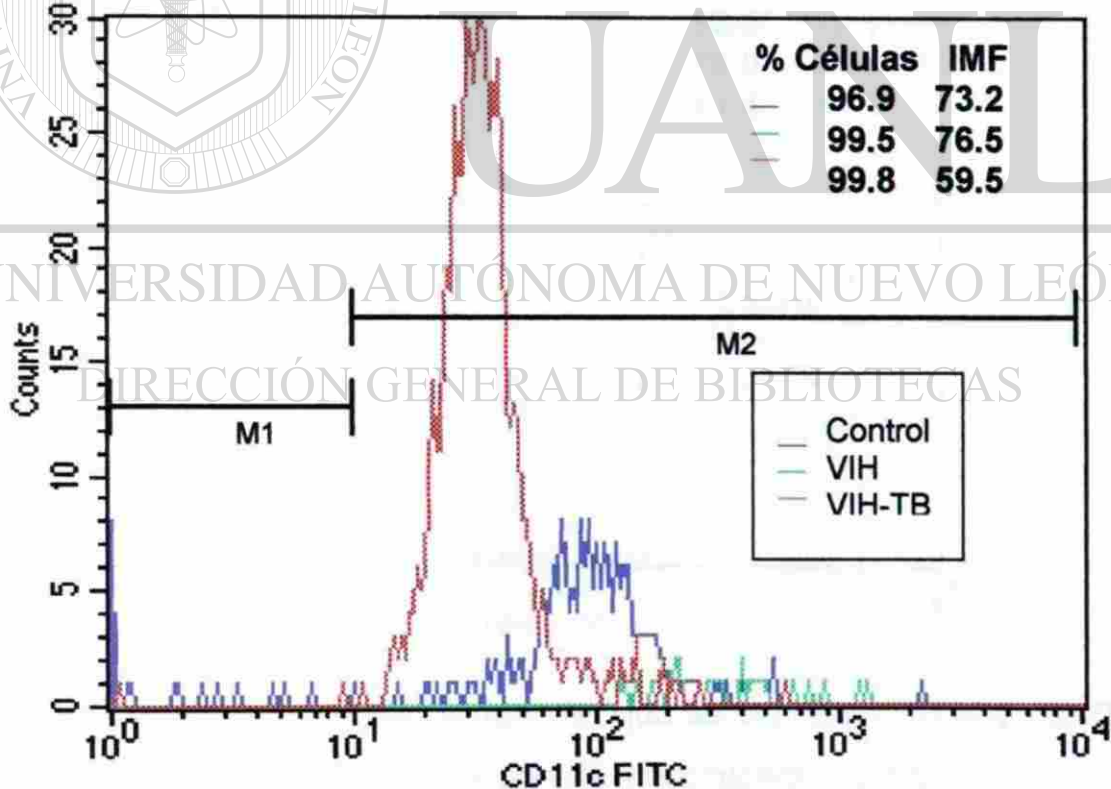


Figura 15. Porcentaje de células e IMF con que se expresan CD11c en pacientes infectados con VIH en la región de monocitos/granulocitos.

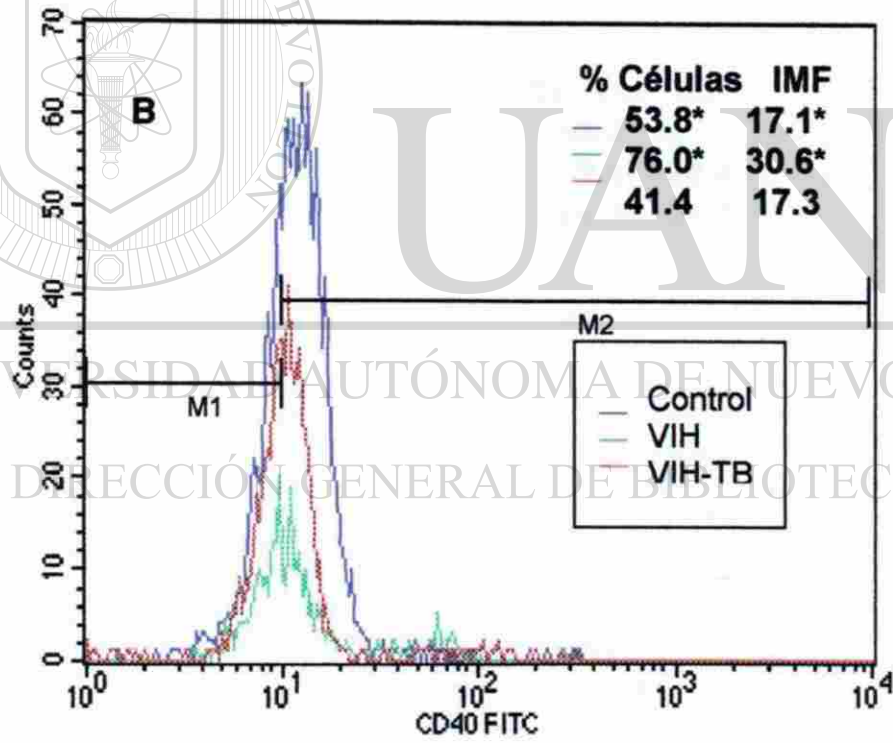
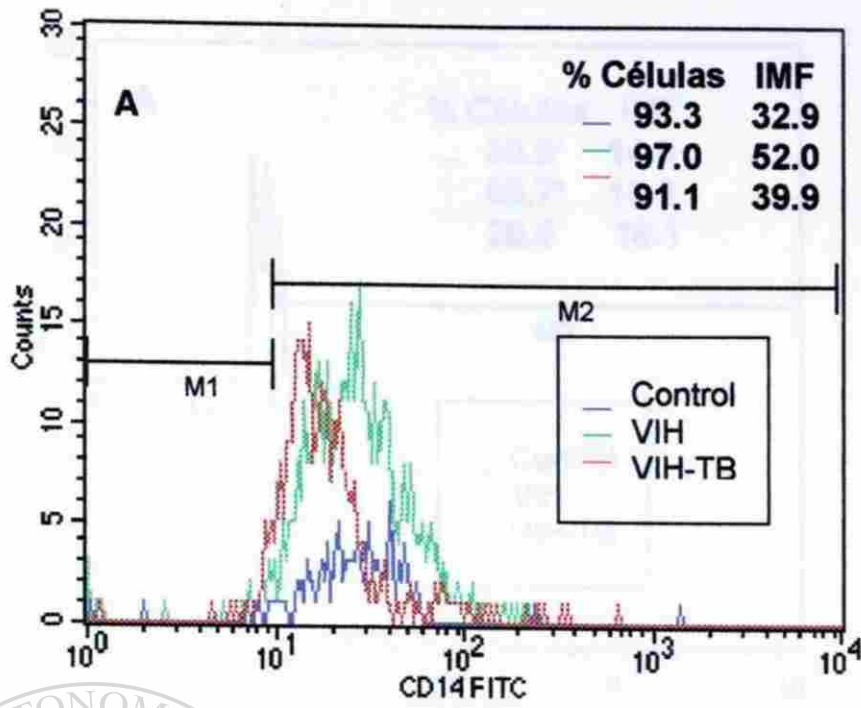


Figura 16. Porcentaje de células e IMF con que se expresan CD14 y CD40 en pacientes infectados con VIH en la región de monocitos/granulocitos.

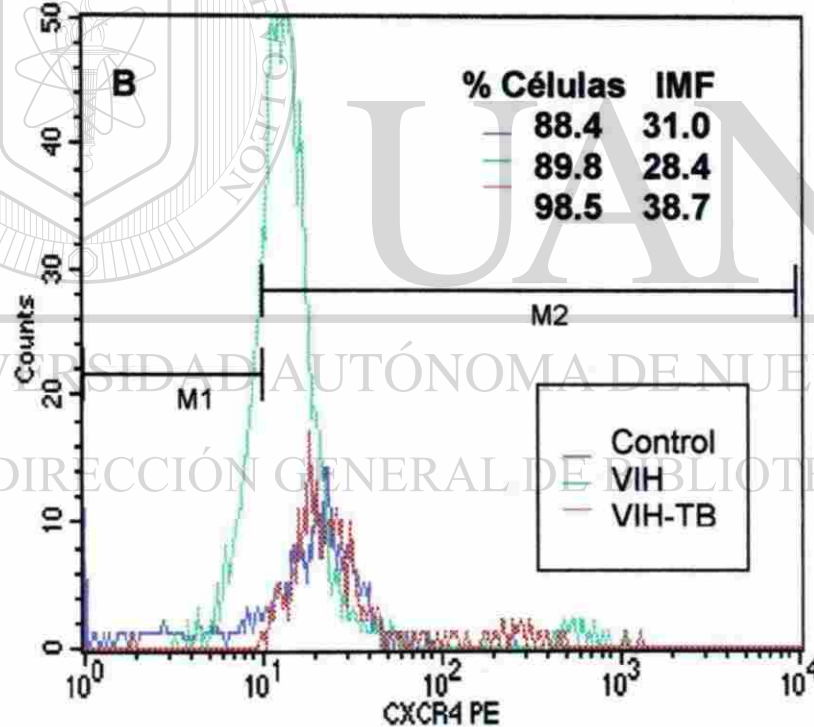
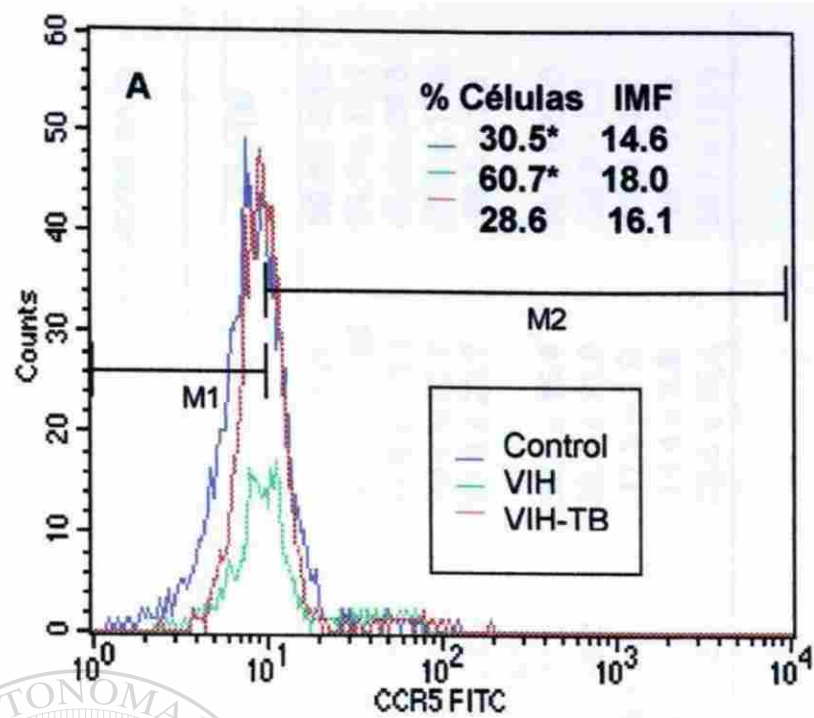


Figura 17. Porcentaje de células e IMF con que se expresan CCR5 y CXCR4 en pacientes infectados con VIH en la región de monocitos/granulocitos.

Tabla 6. Comparación del porcentaje de células positivas e IMF para cada uno de los receptores / co-receptores en la región de monocitos/granulocitos.

Receptor/ Co-receptor	% Células en la Región de Monocitos/Granulocitos (CD14 positiva)					
	Control	VIH	TBP	TBEP	TB MDR	VIH-TB
CD11c	96.9 ± 7.97	99.5 ± 0.86	98.8 ± 2.50	94.5 ± 11.37	97.6 ± 5.28	99.8 ± 0.12
CD14	93.3 ± 14.5	97.0 ± 4.37	93.9 ± 6.08	83.9 ± 12.85	75.2 ± 17.06	91.1 ± 17.1
CD40	53.8 ± 17.8	76.0 ± 18.2	35.1 ± 18.5	31.3 ± 15.4	17.6 ± 13.1	41.4 ± 26.0
CCR5	30.5 ± 20.6	60.7 ± 32.3	48.3 ± 20.8	29.5 ± 16.8	29.6 ± 20.7	28.6 ± 17.6
CXCR4	88.4 ± 24.8	89.8 ± 20.1	96.2 ± 6.1	87.8 ± 23.6	77.8 ± 23.7	98.5 ± 1.8
		IMF en la Región de Monocitos/Granulocitos				
CD11c	73.2 ± 10.8	76.5 ± 44.4	82.3 ± 29.3	65.4 ± 21.5	39.0 ± 15.4	59.5 ± 29.0
CD14	32.9 ± 7.2	52.0 ± 26.9	56.0 ± 20.5	50.1 ± 18.7	36.4 ± 10.8	39.9 ± 2.3
CD40	17.1 ± 4.4	30.6 ± 17.9	18.0 ± 3.8	18.9 ± 5.3	17.5 ± 2.9	17.3 ± 5.2
CCR5	14.6 ± 2.7	18.0 ± 6.5	16.2 ± 2.2	15.2 ± 2.7	14.4 ± 3.5	16.1 ± 5.5
CXCR4	31.0 ± 7.3	28.4 ± 8.0	38.5 ± 7.5	38.6 ± 12.8	23.8 ± 15.4	38.7 ± 12.5

* Desviación Estándar

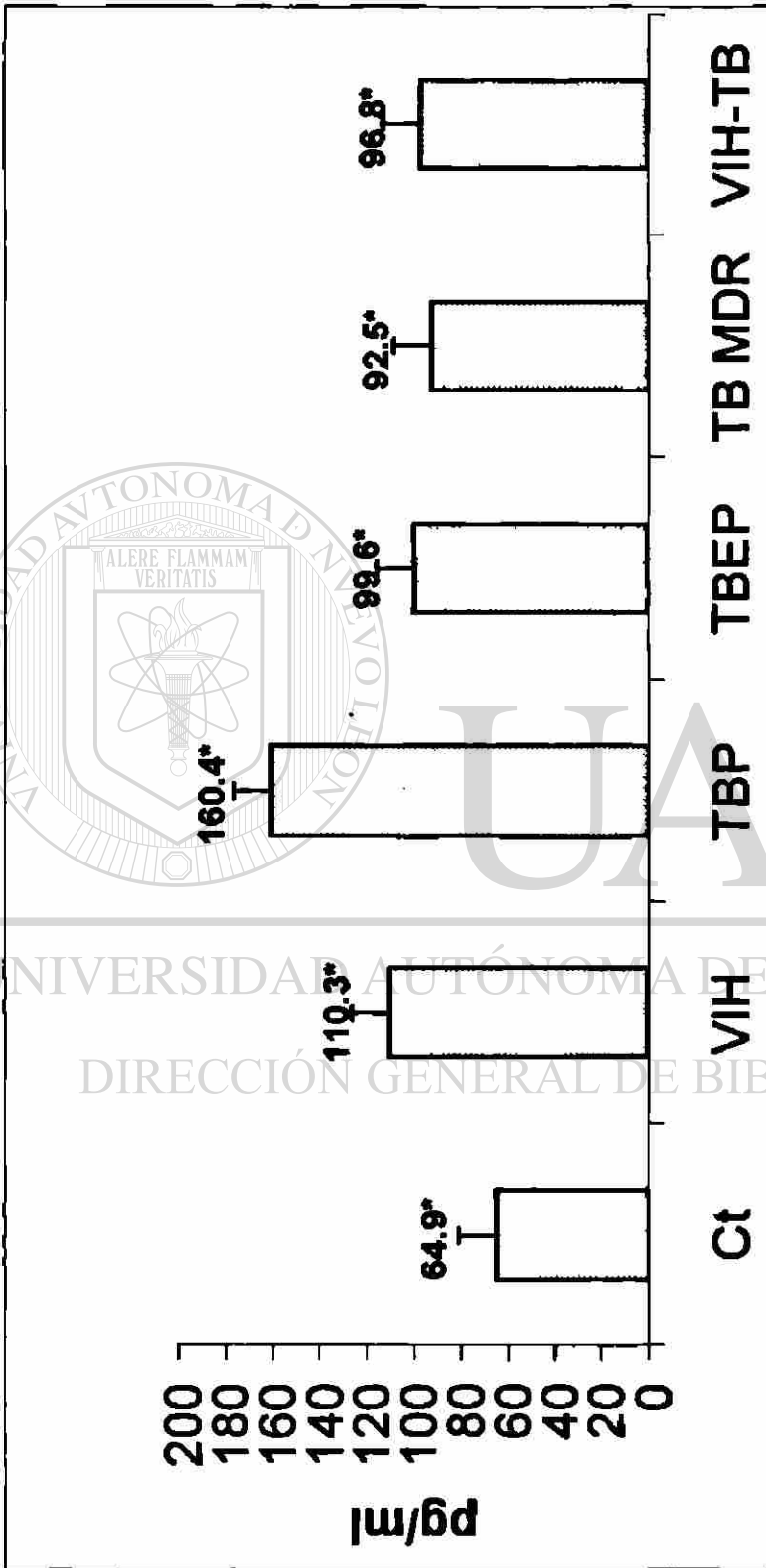


Figura 18. Producción de IL-1 β en sueros de controles y pacientes.

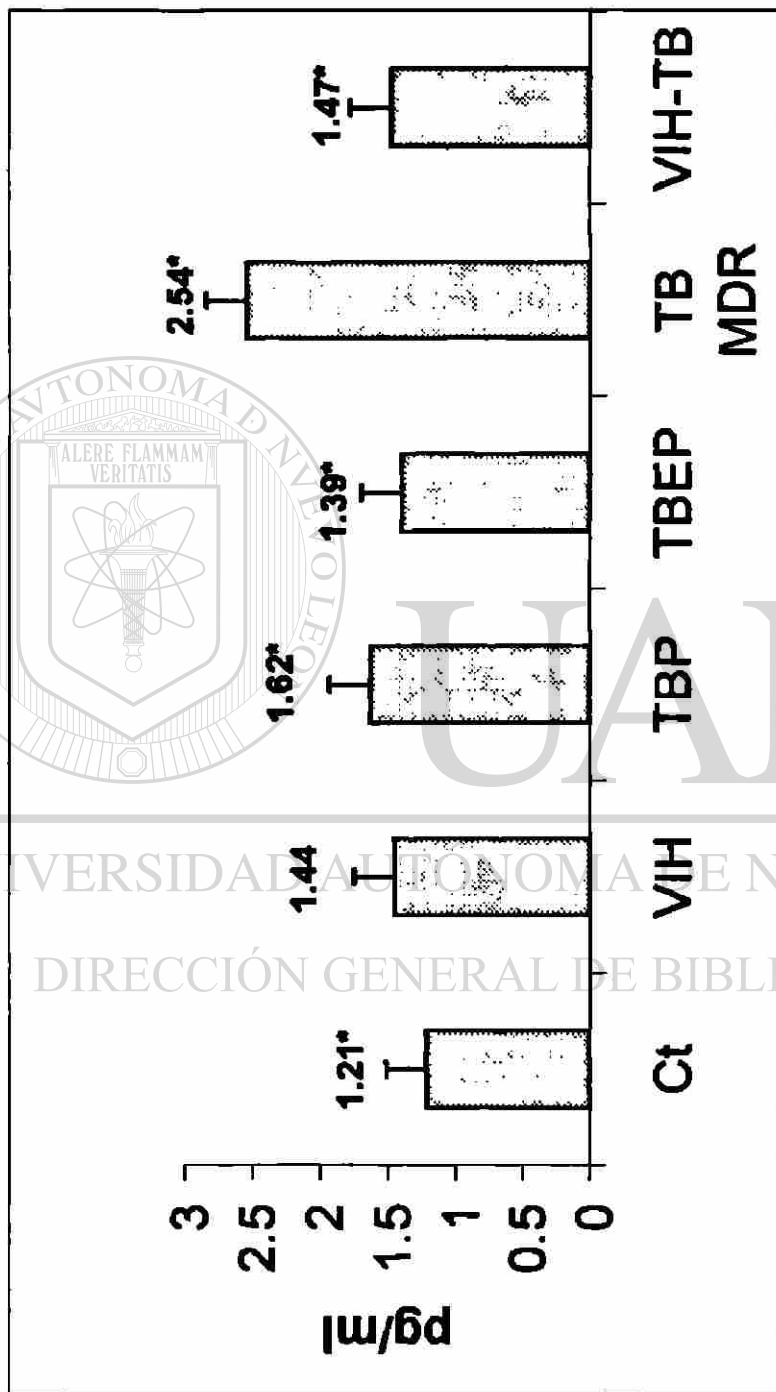


Figura 19. Producción de IL-6 en sueros de controles y pacientes infectados.

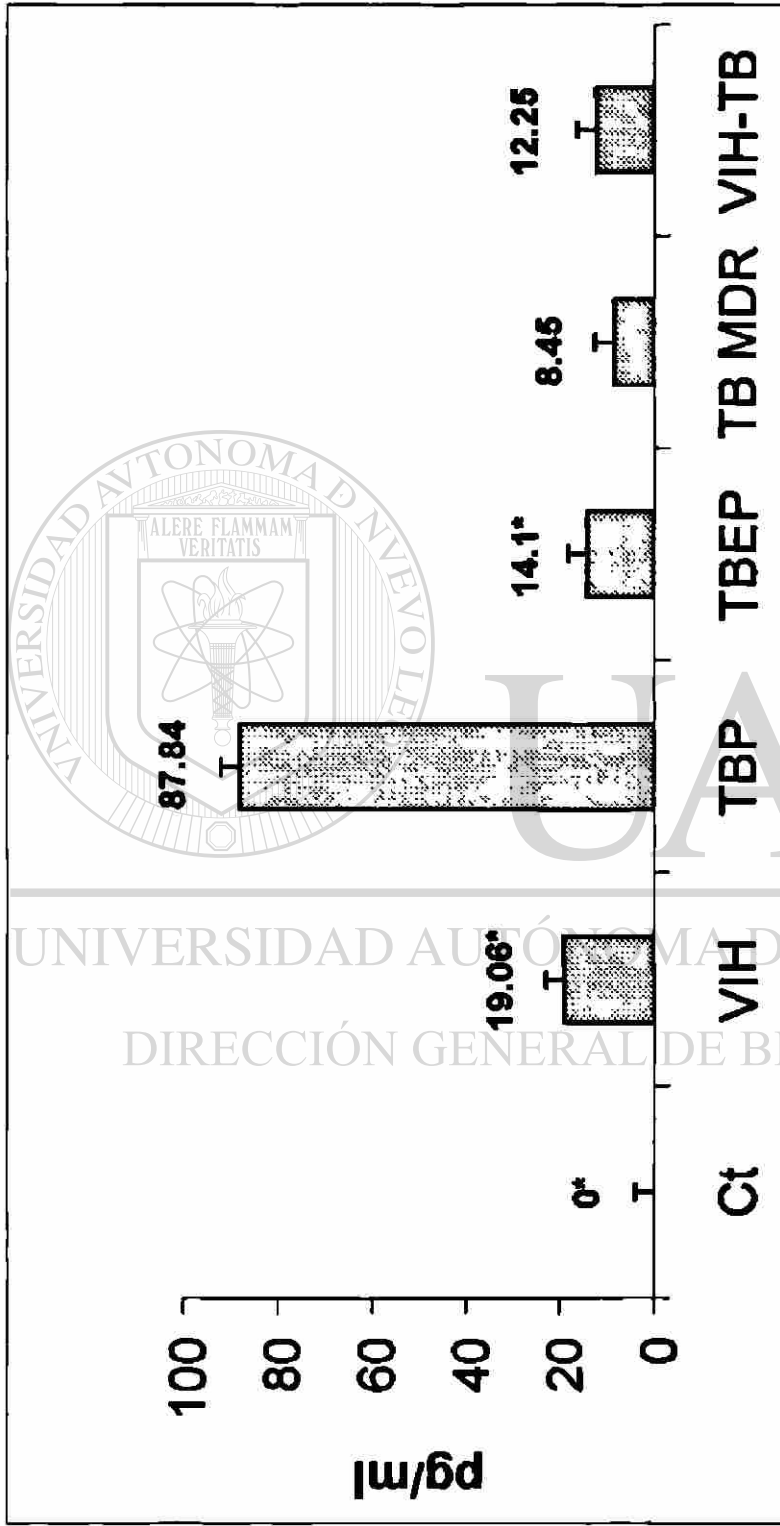
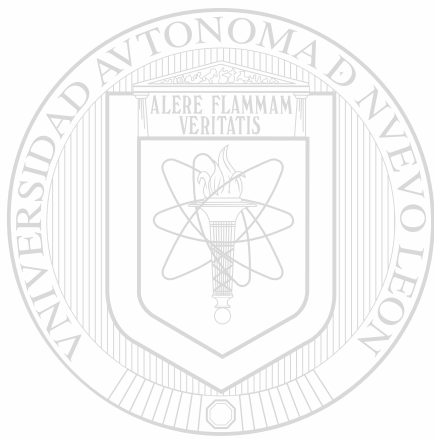


Figura 20. Producción de TNF- α en suero de controles y pacientes infectados.

Dentro la determinación de quimiocinas, RANTES e IL-8, se observo para la primera, concentraciones altas en sueros de todos los grupos estudiados, pero se encontró una ligera disminución significativa de la proteína en el grupo de pacientes con TBP ($p = 0.0221$) fig. 8. Mientras, los valores determinados para IL-8, solo se encontró una diferencia significativa en su producción en el grupo de pacientes con TBMDR ($p = 0.00728$) fig. 9. Los datos de todas las citocinas y quimiocinas se encuentran resumidos en la tabla 8.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

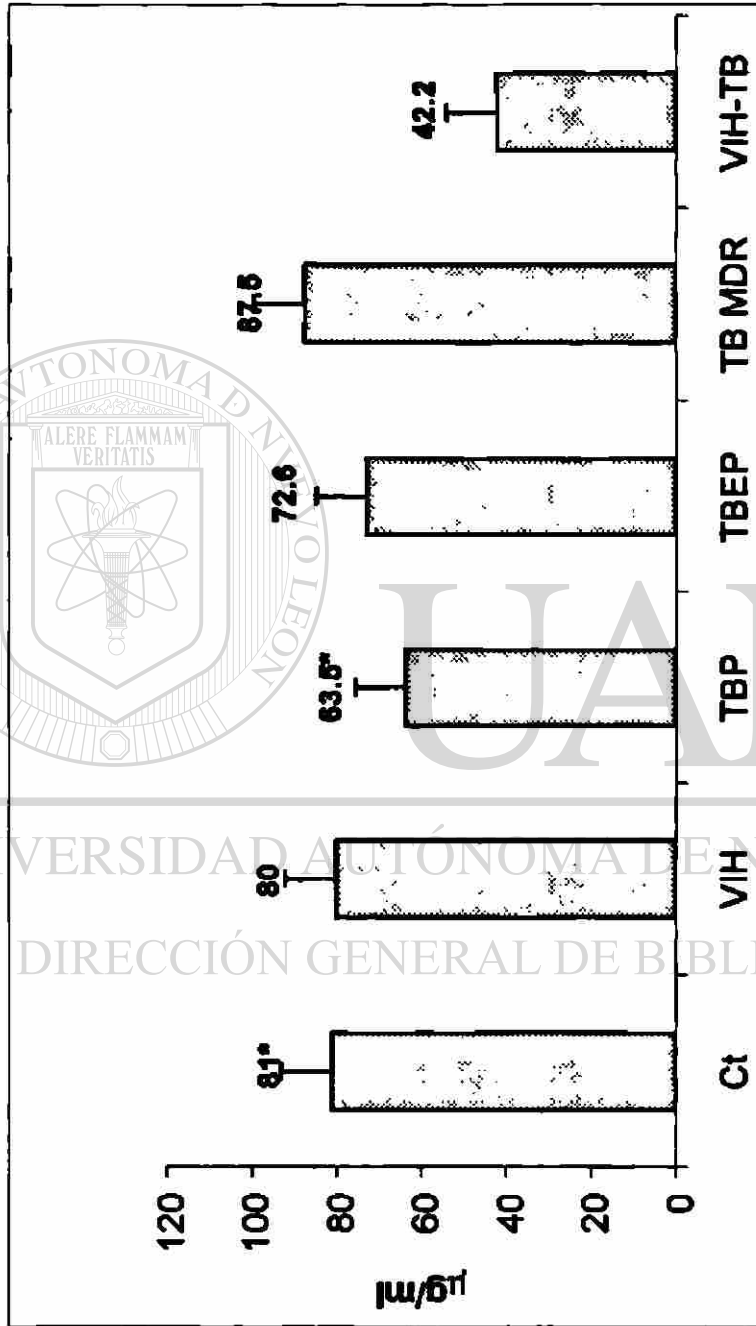


Figura 21. Concentración de RANTES en sueros de controles y pacientes infectados.

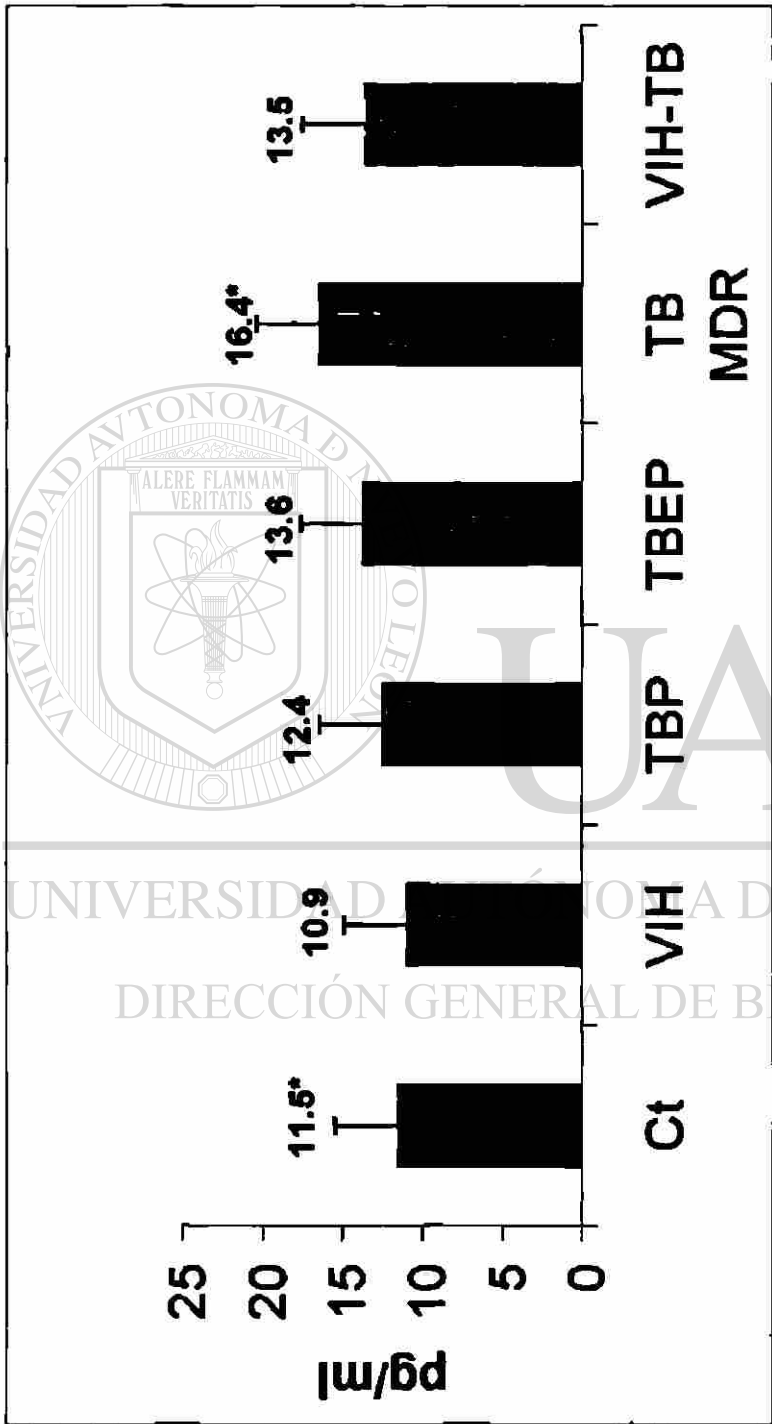


Figura 22. Concentración de IL-8 en controles y pacientes infectados.

Tabla 7. Producción de citocinas y quimiocinas en suero de controles y pacientes infectados con VIH y TB.

Citocina	Grupo	IL-1β	IL-6	TNF-α	IL-8	RANTES
Control		64.9 \pm 16.5*	1.21 \pm 0.4*	0.0 \pm 0.0*	11.5 \pm 3.2*	81.0 \pm 21.8*
VIH		110.3 \pm 34.2*	1.44 \pm 0.5*	19.1 \pm 18.6*	10.9 \pm 3.1*	80.0 \pm 12.7*
TB Pulmonar		160.4 \pm 221.3*	1.62 \pm 0.6*	87.8 \pm 276*	12.4 \pm 2.7*	63.5 \pm 25.6*
TB Extrapulmonar		99.6 \pm 28.9*	1.39 \pm 0.5*	14.1 \pm 15.0*	13.6 \pm 6.9*	72.6 \pm 21.2*
TB Multidrogoresistente		92.5 \pm 17.0*	2.54 \pm 1.1*	8.5 \pm 14.9*	16.4 \pm 7.6*	87.5 \pm 5.4 *
VIH-TB		96.8 \pm 15.6*	1.47 \pm 0.1*	12.24 \pm 25.9*	13.5 \pm 4.7*	42.2 \pm 23.1*

* Desviación Estándar

X. DISCUSIÓN

Actualmente muchas investigaciones se encuentran dirigidas al estudio de moléculas expresadas comúnmente en la membrana celular, las cuales muchas de ellas reconocen patrones moleculares de un gran número de ligandos (carbohidratos, proteínas, hormonas, lípidos, citocinas, quimiocinas, etc.). Recientemente, estas moléculas se han asociado al reconocimiento de patógenos o para algunas de sus fracciones con el fin de internalizarse a su célula huésped o modular hacia un tipo de respuesta inmune (humoral o celular) de una célula del sistema inmune que favorezca o limite su propagación.

El problema a resolver en este trabajo fue determinar si una infección por *M. tuberculosis* en pacientes con TB pulmonar, TB extrapulmonar o TB multidrogoresistente regula la expresión de los receptores (CD11c, CD14 y CD40) empleados por esta bacteria y/o sus fracciones y además de los co-receptores (CCR5 y CXCR4) utilizados por el VIH, así mismo, determinar si la infección con VIH en pacientes incrementa los receptores empleados por *M. tuberculosis* y regula la expresión de sus co-receptores. Por último, determinar los valores de citocinas y quimiocinas pro-inflamatorias (IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α y RANTES) en sueros de estos pacientes.

Pocos estudios existen sobre la expresión de las moléculas y concentraciones de citocinas y quimiocinas pro-inflamatorias anteriormente mencionadas, en pacientes infectados con *M. tuberculosis* y VIH. La mayoría de estos estudios se han desarrollado bajo un modelo "in vitro" utilizando cultivos celulares de una línea específica o de donadores. Además, en el caso de citocinas y quimiocinas los estudios se han llevado a cabo en su mayor parte en el foco de la infección, en el caso de TB en lavado broncoalveolar y en el plasma en pacientes infectados con VIH.

Entre nuestros datos reportamos una disminución significativa ($p = 0.0021$) en la IMF de la molécula CD11c en la región de linfocitos-

monocitos/granulocitos en el grupo de pacientes con TBMDR. La molécula CD11c es utilizada por la fracción C3b de complemento que tiene gran importancia en la opsonización de microorganismos para su posterior fagocitosis, en este caso para *M. tuberculosis*, datos aún no reportados (fig. 7A y 11A). El porcentaje de células y la IMF de CD11c está incrementado de manera no significativa ($p > 0.05$) en el grupo de VIH, lo cual concuerda con lo publicado por Stent en 1994, el cual menciona un incremento significativo en la IMF de CD11c sobre monocitos en pacientes infectados con VIH (73).

El receptor CD14 es conocido que reconoce al LAM de *M. tuberculosis* H37Rv (74). Los pacientes del grupo de TBEP y TBMDR disminuyeron significativamente el porcentaje de células que expresan CD14 ($p < 0.05$), pero se observó en estos dos grupos y en el grupo de pacientes con TBP un incremento significativo en la IMF. Es decir, que aunque hay un menor número de células expresando el receptor, *M. tuberculosis* puede regular positivamente el número de receptores por célula (IMF), asegurando así un sitio de entrada a la célula huésped.

— La molécula CD40 juega un papel importante en la regulación hacia un tipo de respuesta inmune (humoral o celular), así como también participa en el cambio de switch de inmunoglobulinas y en la regulación de secreción de ciertas citocinas (41). Estudios “*in vitro*” realizados por Larkin en el 2002 (75), demostraron un incremento de la expresión de CD40 en monocitos infectados con *M. tuberculosis*. Contrario a esos resultados, nosotros reportamos que las células de pacientes con TBP, TBEP y TBMDR disminuyeron la expresión de CD40 en linfocitos y monocitos. En base a los antecedentes de que CD40 inhibe el crecimiento de *M. tuberculosis* induciendo citocinas pro-inflamatorias (76) a través de la interacción de CD40 con la proteína de choque térmico de 70 kDa de *M. tuberculosis*, esta reduce la multiplicación de la micobacteria. Por otro lado, los pacientes infectados con el VIH incrementaron significativamente tanto la expresión como la IMF, esta interacción favorece la producción de

quimiocinas en células infectadas por el VIH, contribuyendo así, al reclutamiento de células del sistema inmune entre las cuales se encuentran los monocitos/macrófagos que son las células blanco de *M. tuberculosis*. Con estos datos posiblemente podríamos explicar por que un individuo infectado con VIH es más susceptible a contraer una TB, donde la micobacteria se disemina rápidamente.

Los dato obtenidos de la expresión de los co-receptores CCR5 y CXCR4 fueron comparados en nuestros individuos control con los controles empleados por Ostrowski en 1998 (77) y Lee en 1999 (78), así como también los datos mostrados en las células de pacientes infectados con VIH fueron comparados con las células infectadas "*in vitro*" con VIH y observamos que la expresión de CXCR4 en linfocitos y monocitos es menor "*in vitro*". Además, los estudios "*in vitro*", generalmente, involucran la separación de células por gradientes con algunos agentes (Ficoll-Hypaque) que pudieran afectar negativamente la expresión de las moléculas empleadas como co-receptores por el VIH, este fenómeno es mencionado en las especificaciones de un anticuerpo monoclonal según la casa comercial.

Los estudios "*in vitro*" realizados por Verani (79) y Ostrowski (77) en 1998 reportaron una disminución en los co-receptores utilizados por el VIH en células infectadas por éste virus, estos resultados concuerdan con los aquí mostrados, donde CCR5 y CXCR4 están disminuidos en la región de linfocitos. La disminución de los co-receptores nos hace suponer dos hipótesis, a) que exista una regulación negativa en la expresión de los co-receptores por el virus, o b) un bloqueo físico por el VIH de estas moléculas impide que sea reconocida por el anticuerpo monoclonal.

Además, el co-receptor CCR5 en pacientes con VIH se encuentra elevado en la región de monocitos/granulocitos difiriendo de lo reportado por Verani en 1998 (79). Nosotros justificamos de cierta forma estos resultados "*in vivo*" versus

los encontrados "in vitro" por dos factores: 1) el tamaño de la muestra (n=11 en éste estudio versus n= 3 por Verani) y 2) el estudio se realizó en pacientes, lo cual nos permite tener más información de lo que ocurre con el paciente, sin la manipulación de las células en los estudio "in vitro". El incremento de CCR5 nos hace sospechar de una regulación positiva en el número de células como el número de moléculas expresadas/célula (IMF) del co-receptor. Otra explicación pudiera ser la presencia de una deleción en el gen de CCR5 ($\Delta 32$) que impida al virus emplear dicha molécula, pero si es reconocida por el anticuerpo utilizado en el estudio (80). En el primer caso, la regulación positiva, podría dar lugar a una mayor susceptibilidad a contraer nuevas infecciones por virus M-trópicos o dual-trópicos.

El incremento en la expresión de CCR5 por el complejo *M. avium-intracellulare* y componentes de *M. tuberculosis* (LAM) ya ha sido reportado por Wahl (81, 82) y Juffermans (83) en linfocitos y monocitos. Este mismo fenómeno, el incremento de CCR5, fue encontrado en el grupo de pacientes con TBP. Mientras los grupos de pacientes con TBMDR se comportaron de manera diferente, ya que éstos mostraron una disminución de CCR5 en los linfocitos. Posiblemente sea debido al bloqueo por parte de las quimiocinas (RANTES, MIP-1 α y MIP-1 β) de dicho receptor. En este estudio también se demostró altos niveles de RANTES, los cuales esten interviniendo en primer lugar bloqueando el co-receptor y segundo en el reclutamiento de células T y NK, como un intento de contener la infección por *M. tuberculosis*. El incremento de la expresión de CCR5 en linfocitos y monocitos en los pacientes con TBP, en el caso que el paciente con TBP se infecte con el VIH, permite la progresión rápida a SIDA por virus M-trópicos o duales-trópicos.

Se dice que la producción elevada de citocinas y quimiocinas pro-inflamatorias se da principalmente en el foco de la infección en los pacientes con TB. En el caso de una infección por VIH se han encontrado niveles elevados de estas moléculas en plasma de pacientes. Sin embargo, en otros estudios se ha

logrado detectar algunas citocinas en sueros de pacientes infectados por VIH y co-infectados con el complejo *M. avium-intracellulare* (54,84,85).

En esta investigación se detectaron citocinas y quimiocinas en los sueros de la mayoría de los grupos en estudio. La producción de IL-1 β se incrementó de manera significativa en todos los grupos analizados con respecto al control ($p < 0.05$). Estos datos concuerdan con los estudios de Law en 1996 (85) y Bergeron en 1997 (86). Por otro lado, TNF- α se incrementó en el grupo de VIH y TBEP ($p < 0.05$). Este incremento se puede deber a las funciones pleiotrópicas ya conocidas de la IL-1 β en este caso activando y reclutando leucocitos circulantes. Por otro lado, TNF- α participa en la formación de granuloma en una infección con *M. tuberculosis* y sinergiza con el INF- γ para regular la multiplicación de la micobacteria, así como también, se cree que regula la expresión de ciertas quimiocinas y los receptores de quimiocinas (87). TNF- α se encuentra elevado en pacientes con VIH (54) y ha sido correlacionado como un indicador de TBP, en pacientes con VIH co-infectados con *M. tuberculosis* (88). Lo anterior nos hace creer que las funciones antes mencionadas se están llevando a cabo en los grupos de pacientes en estudio, además del fuerte proceso inflamatorio en cada uno de los grupos de pacientes mediado por estas citocinas, con lo cual relacionamos algunas de las sintomatología clínica encontrada en los pacientes con TB (fiebres nocturnas, pérdida de peso, cefáleas, etc) y pacientes con VIH (fiebre y síndromes neurológicos).

Los niveles de IL-6 también se encontraron elevados ($p < 0.05$) en la mayoría de los grupos, excepto en el grupo de pacientes infectados con VIH. Se dice que IL-6 tiene propiedades pro-inflamatorias y anti-inflamatorias (89). Otros estudios apoyan la participación de IL-6 como un mediador inicial de la respuesta contra *M. tuberculosis* (87). Havlir reportó un incremento en la producción de IL-6 en pacientes infectados con VIH-TB asociada al complejo *M. avium*, estos datos se relacionan con los encontrados en nuestros pacientes con VIH-TB (48). Esto nos indica una activación crónica de la producción de IL-6 en

los grupos de pacientes que padecen de TB. Con estos datos obtenidos, nosotros podemos hipotetizar una regulación por IL-6 sinergizando con IL-1 β y TNF- α , en cada una de las etapas en las que se encuentren nuestros grupos en estudio. Los resultados obtenidos en el grupo de VIH se encuentran aumentados de manera no significativa ($p < 0.05$), pero creemos que el mismo efecto observado en los pacientes con TB se da también en este grupo.

Por su parte, IL-8 solo se incrementó en el grupo de TBMDR, investigadores han encontrado en sus estudios bajos niveles de IL-8 en grupos de pacientes con TB comparados contra un grupo control (90) y los han relacionado con el avance clínico de la enfermedad. Otro estudio revela que IL-8 se encuentra en niveles elevados en lavado broncoalveolar de pacientes con TB y esto se correlacionó con el alto porcentaje de neutrófilos y linfocitos en el lavado bronquioalveolar (91). Si IL-8 se correlaciona con la gravedad de la infección, podemos explicar entonces porqué solo se encontró elevada en los pacientes con TBMDR, los cuales presentan una fase crónica de la infección, donde el organismo no encuentra una resolución del problema.

Finalmente, la concentración de RANTES en sueros de pacientes con TBP y pacientes VIH-TB se encontró disminuida. Datos sobre la disminución de las concentraciones de RANTES han sido reportados con anterioridad por Kurashima en lavado bronquioalveolar de pacientes con TBP en fase crónica. Lo anterior nos permite presumir que nuestros pacientes podrían encontrarse en dicha fase según lo ya reportado (92). Los niveles elevados encontrados de RANTES en las muestras control, nos permite suponer que existe una probable regulación innata del organismo hacia un tipo de infección por ejemplo una infección por VIH.

Las concentraciones de las citocinas estudiadas difieren de lo reportado por Casarini y Law, donde las citocinas se encuentran con valores mayores a los reportados por nosotros. La gran diferencia encontrada en las citocinas

XI. CONCLUSIONES

1.- Los pacientes infectados con VIH sobrerregulan la expresión e IMF de la molécula CD40 en linfocitos y monocitos. Esta sobrerregulación, principalmente en monocitos pudiera explicar porqué un individuo con VIH es más susceptible a contraer TB.

2.- Las células de los pacientes infectados con el VIH mostraron un incremento en la expresión de CCR5 en monocitos, lo que asegura por una parte la diseminación de virus M-trópicos o dual-trópicos. Por otro lado, es posible a la gran cantidad de células y número de receptores que expresan CCR5 encontrados, la presencia de deleciones en el gen de CCR5 ($\Delta 32$) y eso se visualiza en los resultados encontrados.

3.- Las células de los pacientes con TB pulmonar y extrapulmonar regulan negativamente la expresión de CD40 e incrementa la IMF de CD14, lo cual significa que *M. tuberculosis* regula el número de receptores/célula, asegurando así un sitio de entrada a la célula blanco.

4.- Existe una regulación positiva del co-receptor CCR5 en linfocitos y monocitos en pacientes con TB pulmonar. El incremento de este co-receptor permite en caso de una co-infección con VIH la replicación viral acelerada por virus M-trópicos y una progresión más rápida a SIDA .

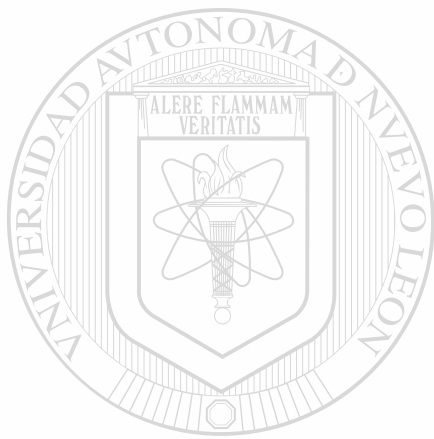
5.- Los pacientes con TB multidrogoresistentes regulan la expresión e IMF de los receptores CD11c, CD14 y CD40, así como también, el co-receptor CCR5.

6.- Las citocinas pro-inflamatorias, como era de esperarse se encontraron valores elevados en los grupos de pacientes, esto se ha correlacionado por el tipo de sintomatología presentada en ambas patologías entre las cuales se encuentra la inflamación, fiebre, síndrome neurológicos, la activación de

proteínas de la fase aguda y la participación de estas citocinas en el reclutamiento de células.

7.- La producción de IL-8, en los pacientes de TBMDR , se puede relacionar con el período de fase crónica que han llevado estos pacientes desde su infección.

8.- Los valores de RANTES en nuestros pacientes podrían relacionarse con la fase en que se encuentren los pacientes, debido a su relación con la evolución de la infección a fase crónica. La producción de RANTES, se encuentra notablemente elevado a los encontrados por otros investigadores.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

XII. PERSPECTIVAS FUTURAS

1.- Definir el papel de CD40 en una infección por *M. tuberculosis* y VIH y determinar cual de las proteínas micobacterianas o del virus se encuentran involucradas en la regulación de esta molécula.

2.- Especificar el papel del factor nuclear NF- κ B, en la expresión de CD40 y otros receptores.

3.- Estudiar el efecto de las fracciones de la micobacteria y proteínas del VIH sobre la expresión de los receptores CD11c, CD14, CD40 y co-receptores CXCR4 y CCR5 en células mononucleares de sujetos sanos.

4.- Cuantificar la producción de Citocinas IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IL-18, TNF α , INF- γ y RANTES por el método de ELISA en sueros de los grupos en estudio y sobrenadantes de los cultivos de las CMSP estimuladas con las proteínas virales, la micobacteria y cada una de sus fracciones.

5.- Medir los niveles de citocinas intracelulares IL-1 α , IL-4, IL-8, IL-10, IL-12, TNF α , INF- γ y RANTES por el método de citometría de flujo en pacientes o CMN estimuladas con proteínas virales, *M. tuberculosis* o sus fracciones.

6.- Cuantificar los transcritos de las citocinas y quimiocinas anteriormente mencionadas por la técnica de PCR en tiempo real (RTQ-PCR) en células mononucleares de sujetos sanos estimuladas con fracciones virales, la micobacteria y cada una de sus fracciones.

XIII. BIBLIOGRAFÍA

1. **Raviglione, M. C., D. E. Snider, and A. Kochi.** 1995. Global Epidemiology of Tuberculosis. *JAMA*. **273**(3): 220-226.
2. **Girardi, E., M. C. Raviglione, G. Antonucci, P. Godfrey-Faussett, and G. Ippolito.** 2000. Impact of the HIV Epidemic on the Spread of other Diseases: The Care of Tuberculosis. *AIDS*. **14**: S47-S56.
3. **Graziosi, C., K. R. Gantt, M. Vaccarezza, J. F. Demarest, M. Daucher, M. S. Saag, G. M. Shaw, T. C. Quinn, O. J. Cohen, C. C. Welbon, G. Pantaleo and A. S. Fauci.** 1996. Kinetics of cytokine expression during primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **93**:4386-4391.
4. **Clerici, M., F. Hakim, D. J. Venzon, S. Blatt, C. Hendrix, T. Wynn and G. M. Shearer.**1993. Changes interleukin-2 and interleukin-4 production in asymptomatic, human immunodeficiency virus-seropositive individuals. *J. Clin. Investig.* **91**:759-765.
5. **Clerici, M. and G. M. Shearer.**1993. A TH1→TH2 switch is a critical step in the etiology of HIV infection. *Immunol. Today*. **14**: 107-111.
6. **Ameglio, F., M. Capobianchi, C. Castilletti, P. Cordiali, S. Fais, E. Trento and F. Dianzani.** 1994. Recombinant gp120 induces IL10 in resting peripheral blood mononuclear cells; correlation with the induction of other cytokines. *Clin. Exp. Immunol.* **95**:455-458.
7. **Ankel, H., M. Capobianchi, C. Castilletti, and F. Dianzani.** 1994. Interferon induction by HIV glycoprotein 120: role of the V3 loop. *Virology*. **205**:34-43.
8. **Capobianchi, M., C. Barresi, O. Borghi, S. Gessani, G. Fantuzzi, F. Ameglio, F. Belardelli, S. Papadia and F. Dianzani.** 1997. Human immunodeficiency virus type 1 gp120 stimulates cytomegalovirus replication in monocytes: possible role of endogenous interleukin 8. *J. Virol.* **71**: 1591-1597.
9. **Francis, M. and M. S. Meltzer.** 1993. Induction INF- α by HIV-1 in monocyte-enriched PBMC requires gp120-CD4 interaction but not virus replication. *J. Immunol.* **151**:2208-2216.

10. Patella, V., G. Florio, A. Petraroli and G. Marone. 2000. HIV-1 gp120 induces IL-4 and IL-13 release from human FcεRI+ cells through interaction with the VH3 region of IgE. *J. Immunol.* **164**:589-595.
11. Hofman, F. M., P. Chen, F. Incardona, R. Zidovetzki and D. Hinton. 1999. HIV-1 tat protein induces the production of interleukin-8 by human brain-derived endothelial cells. *J. Neuroimmunol.* **94**:28-39.
12. Lim, S., and A. Garzino-Demo. 2000. The human immunodeficiency virus type 1 Tat protein up-regulates the promoter activity of the β-chemokine monocyte chemoattractant protein 1 in the human astrocytoma cell line U-87 MG: role of SP-1, AP-1 and NF-κB consensus sites. *J. Virol.* **74**:1632-1640.
13. Nath, A., K. Conant, P. Chen, C. Scott and E. Major. 1999. Transient exposure to HIV-1 Tat protein results in cytokine production in macrophages and astrocytes. A hit and run phenomenon. *J. Biol. Chem.* **274**: 17098-17102.
14. Sawaya, B., P. Thatikunta, L. Denisova and S. Amini. 1998. Regulation of TNF-α and TGF-β1 gene transcription by HIV-1 Tat in CNS cells. *J. Neuroimmunol.* **87**: 33-42.
15. Westendorp, M., Li Weber, R. Frank and P. Krammer. 1994. Human immunodeficiency virus type 1 Tat upregulates interleukin-2 secretion in activated T cells. *J. Virol.* **68**: 4177-4185.
16. Bribino, E., S. Haraguchi, A. Koutsonikolis, J. Cianciolo, U. Owens, R. Good and N. K. Day. 1997. Interleukin-10 is induced by recombinant HIV-1 Nef protein involving the calcium/calmodulin-dependent phosphodiesterase signal transduction pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **94**:3178-3182.
17. De, S., C. Venkateshan, P. Seth, D. Gajdusek and C. J. Gibbs. 1998. Adenovirus-mediated human immunodeficiency virus type 1 Nef expression in human monocytes/macrophages and effect of Nef on downregulation of Fcγ receptors and expression of monokines. *Blood.* **91**:2108-2117.

18. Quaranta, M. G., B. Camponeschi, E. Straface, W. Malomi and M. Viora. 1999. Induction of interleukin 15 production by HIV-1 Nef protein: a role in the proliferation of uninfected cells. *Exp. Cell Res.* 250:112-121.
19. Roux, P., C. Alfieri, M. Himech, E. Cohen, and J. E. Tanner. 2000. Activation of transcription factors NF- κ B and NF-IL-6 by human immunodeficiency virus type 1 protein R (Vpr) induces interleukin-8 expression. *J. Virol.* 74:4658-4665.
20. Sadek, M., E. Sada, Z. Toosi, S. Schwander and A. Rich. 1998. Chemokines induces by infection of mononuclear phagocytes with mycobacteria and present in lung alveoli during active pulmonary tuberculosis. *Am. J. Res.in Cell Mol. Biol.* 19: 513-521.
21. Chensue, S. W. 2001. Molecular Machinations: Chemokine Signals in Host-Pathogen Interactions. *Clin. Microbiol. Rev.* 14 (4):821-835.
22. Schluger, N. W. and W. N. Rom. 1998. The Host Immune Response to Tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 157:679-691.
23. Ernst, J. D. 1998. MINIREVIEW: Macrophage Receptors for *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immunit.* 66 (4): 1277 – 1281.
24. Fauci, A., G. Pantaleo, S. Stanley, and D. Weissman. 1996. Immunopathogenic Mechanisms of HIV Infection. *Ann. Intern. Med.* 124: 654-663.
25. Fauci, A. 1996. Host factors and the Pathogenesis of HIV-induced Disease. *Nature.* 384: 529-534.
26. Cheng-Mayer, C., R. Liu, N. Landau, and L. Stamatatos. 1997. Macrophage tropism of Human Immunodeficiency Virus Type 1 and Utilization of the CC-CKR5 Coreceptor. *Journal of Virology.* 71 (2): 1657 – 1661.
27. Mohagheghpour, N., A. Vollenhoven, J. Goodman, and L. Bermudez. 2000. Interaction of *Mycobacterium avium* with Human Monocyte-Derived Dendritic Cells. *Infect. Immunit.* 68(10): 5824-5829.
28. Zhang, Y., M. Broser, H. Cohen, M. Bodkin, K. Law, J. Reibman, and W. Rom. 1995. Enhanced interleukin-8 release and gene expression in

- macrophages after exposure to *Mycobacterium tuberculosis* and its components. *J. Clin. Invest.* **95**:586-592.
29. Flesch, I. E., and S. H. Kaufmann. 1993. Role of Cytokines in Tuberculosis. *Immunobiol.* **189**:316-339.
30. Bloom, B., J. Flynn, K. McDonough, Y. Kress, and J. Chan. 1994. Experimental Approaches to Mechanisms of Protection and Pathogenesis in *M. tuberculosis* Infection. *Immunobiol.* **191**:526-536.
31. Flynn, J. L., M. M. Goldstein, K. Triebold, J. Sypek, S. Wolf, and B. Bloom. 1995. IL-12 Increases Resistance of BALB/c Mice to *Mycobacterium tuberculosis* Infection. *J. of Immunol.* **155**:2515-2524.
32. Murray, P. J. 1999. Defining the requirements for immunological control of mycobacterial infections (Reviews). *Trends in Microbiol.* **7**(9):366-372.
33. Rhoads, E. and I. Orme. 1997. Susceptibility of a Panel of Virulent Strains of *Mycobacterium tuberculosis* to Reactive Nitrogen Intermediates. *Infect. Immun.* **65**(4): 1189-1195.
34. Zaffran, Y., L. Zhang, and J. J. Ellner. 1998. ROLE of CR4 in *Mycobacterium tuberculosis* - Human Macrophages Binding and Signal Transduction in Absence of Serum. *Infect. Immunit.* **66** (9): 4541 – 4544.
35. Viriyakosol, S., J. Mathison, P. Tobias, and T. Kirkland. 2000. Structure-Function Analysis of CD14 as a Soluble Receptor for Lipopolysaccharide. *J. Bio Chem.* **275**: 3144-3149.
36. Roach, T. I., C. Howard Barton, D. Chatterjee, and J. M. Blackwell. Macrophage Activation: Lipoarabinomannan from Avirulent and Virulent Strains of *Mycobacterium tuberculosis* Differentially Induces the Early Genes c-fos, KC, JE, and Tumor Necrosis Factor- α . *J. of Immunol.* **150**(5): 1886-1896.
37. Schlesinger, L. S., S. Hull, and T. Kaufman. Binding of Terminal Mannosyl Units of Lipoarabinomannan from a Virulent Strain of *Mycobacterium tuberculosis* to Human Macrophages. *J. of Immunol.* **152**: 4070-4079.
38. Bernardo, J., A. Billingslea, R. Blumenthal, K. Seetoo, E. Simons, and M. Fenton. 1998. Differential Responses of Human Mononuclear Phagocytes

- to Mycobacterial Lipoarabinomannans: Role of CD14 and the Mannose Receptor. *Infect. Immun.* **66**(1): 28-35.
39. Peterson, P., G. Gekker, S. Hu, W. Sheng, W. Anderson, R. Ulevitch, P. Tobias, K. Gustafson, T. Molitor, and C. Chao. 1995. CD14 Receptor-Mediated Uptake of Nonopsonized *Mycobacterium tuberculosis* by Human Microglia. *Infect. Immun.* **63**(4): 1598-1602.
40. Foy, T. M., A. Aruffo, J. Bajorath, J. Buhlmann, and R. Noelle. 1996. Immune Regulation By CD40 and its Ligand GP39. *Annu. Rev. Immunol.* **14** (1): 591 – 617.
41. Barr, T. A. and A. W. Heath. 1999. Enhanced In Vivo Immune Responses to Bacterial Lipopolysaccharide by Exogenous CD40 Stimulation. *Infect. Immun.* **67**(7): 3637-3640.
42. Hagashi, T., S. Rao, P. Meylan, R. Kornbluth, and A. Catanzaro. 1999. Role of CD40 Ligand in *Mycobacterium avium* Infection. *Infect. Immunit.* **67** (7): 3558 – 3565.
43. Méndez, P., and E. García-Martínez. 2001. CD40 Ligand Expression in *Mycobacterium bovis* BCG Infection and its Regulation by Cytokines: A Direct Role of Interleukin 12. *ELSEVIER.* **32**: 108-112.
44. Spear, G., C. Ou, H. Kessler, J. Moore, G. Schochetman, and A. Landay. 1990. Analysis of Lymphocytes, Monocytes, and Neutrophils from Human Immunodeficiency Virus (HIV)-Infected Persons for HIV DNA. *J. Infect. Diseases.* **162**: 1239-1244.
45. Cheng-Mayer, C., D. Seto, M. Tateno, and J. A. Levy. 1988. Biologic Features of HIV-1 that Correlate with Virulence in the Host. *Science.* **240**: 80-82.
46. Nightingale, S., L. Byrd, P. Southern, J. Jockusch, S. Cal, and B. Wynne. 1992. Incidence of *Mycobacterium avium-intracellulare* Complex Bacteremia in Human Immunodeficiency Virus-Positive Patients. *J. Infect. Diseases.* **165**: 1082-1085.
47. Góngora-Biachi, R., C. Castro, P. González, N. Pavía-Ruiz, R. Rodríguez-Sánchez, J. Flores, M. Puc-Franco. 1997. Infección por *M. avium* en

pacientes con SIDA en la Península de Yucatán. *Enf. Infecciosas y Microbiol.* **17**: 63.

48. Havlir, D., F. Torriani, R. Schrier, J. Huang, M. Lederman, K. Chervenak, and W. Boom. 2001. Serum Interleukin-6 (IL-6), IL-10, Tumor Necrosis Factor (TNF) Alpha, Soluble Type II TNF Receptor, and Transforming Growth Factor Beta Levels in Human Immunodeficiency Virus Type-1 Infected Individuals with *Mycobacterium avium* Complex Disease. *J. Clin. Microbiol.* **39**(1): 298-303.
49. Sepkowitz, K., J. Raffalli, L. Riley, T. Kiehn, and D. Armstrong. 1995. Tuberculosis in the AIDS Era. *Clin. Microbiol. Reviews.* **8**(2): 180-199.
50. Goletti, D., D. Weissman, R. Jackson, N. Graham, D. Vlahov, R. Klein, S. Munsiff, L. Ortona, R. Cauda, A. Fauci. 1996. Effect of *Mycobacterium tuberculosis* on HIV replication. Role of Immune Activation. *J. Immunol.* **157**: 1271-1278.
51. Essex, M. 1985. Africa and the Origin of AIDS. *Science.* **230**: 1141-1142.
52. Bentwich, Z., Kalinkovich, A., and Weisman, Z. 1995. Immune Activation is a Dominant Factor in the Pathogenesis of African AIDS. *Immunol. Today.* **16**: 187-191.
53. Brown, C., G. Poli, N. Lubaki, M. Louis, F. Davachi, L. Musey, T. Manzila, A. Kovacs, T. Quinn, and A. Fauci. 1994. Elevated Level of Tumor Necrosis Factor- α in Zairian Neonate Plasmas : Implications for Perinatal Infection with the Human Immunodeficiency Virus. *J. Infect. Dis.* **169** : 975-980.
54. Thea, D., R. Porat, K. Nagimbi, M. Baangi, M. St Louis, G. Kaplan, C. Dinarello, and G. Keusch. 1996. Plasma Cytokines, Cytokines Antagonists, and Disease Progression in Africa Women Infected with HIV-1. *Ann. Intern. Med.* **124**: 757-762.
55. Ostrowski, M., S. Stanley, J. Justemen, K. Gantt, D. Goletti, and A. Fauci. 1997. Increased in vitro tetanus-induced production of HIV type 1-infected individuals with tetanus toxoid. *AIDS Res. Hum. Retrovirus.* **13**(6): 473-480.

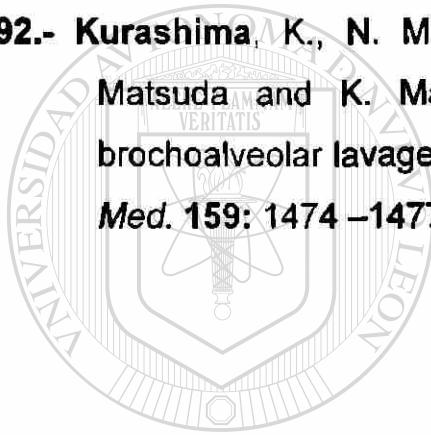
56. Kinter, A., G. Poli, L. Fox, E. Hardy, and A. Fauci. 1995. HIV Replication in IL-12-Stimulated Peripheral Blood Mononuclear Cells Is Driven in an Autocrine/Paracrine Manner by Endogenous Cytokines. *J. Immunol.* **154**: 2448-2459.
57. Kinter, A., M. Ostrowski, D. Goletti, A. Oliva, D. Weissman, K. Gantt, E. Hardy, R. Jackson, L. Ehler, and A. Fauci. 1996. HIV Replication in CD4⁺ T Cells of HIV-Infected Individuals is Regulated by a Balance between the Viral Suppressive Effects of Endogenous β -Chemokines and the Viral Inductive Effects of other Endogenous Cytokines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**: 14076-14081.
58. Cocchi, F., A. DeVico, A. Garzino-Demo, S. Arya, R. Gallo, and P. Lusso. 1995. Identification of RANTES, MIP-1 α , and MIP-1 β as the Major HIV-Suppressive Factors Produced by CD8⁺ T Cells. *Science.* **270**: 1811-1815.
59. Breen, E., M. McDonald, J. Fan, J. Boscardin, and J. Fahey. 2000. Cytokine Gene Expression Occurs More Rapidly in Stimulated Peripheral Blood Mononuclear Cells from Human Immunodeficiency Virus-Infected Persons. *Clin. and Diagnost. Laborat. Immunol.* **7**(5): 769-773.
60. MEDICAL MAG. 1999. Importancia de las quimiocinas en la infección por HIV. **8**(89): 21-25.
61. Yi, Y., S. Isaacs, D. Williams, I. Frank, D. Scols, E. Clercq, D. Kolson, and R. Collman. 1999. Role of CXCR4 in Cell-Cell Fusion and Infection of Monocytes-Derived Macrophages by Primary Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) Strain: Two Distinct Mechanisms of HIV-1 Dual Tropism. *J. of Virology.* **73**(9): 7117-7125.
62. Berger, E., R. Doms, E. Fenyö, B. Korber, D. Littman, J. Moore, Q. Sattentau, H. Schuitemaker, J. Sodroski, and R. Weiss. 1998. A New Classification for HIV-1. *Nature.* **391**:240.
63. Zhang, L. Y. Huang, T. He, Y. Cao, and D. Ho. 1996. HIV-1 Subtype and Second-Receptor Use. *Nature.* **383**(6603): 76.

64. Dittmar, M., M. Aine, S. Graham, P. Clapham, R. Weiss, and P. Simmonds. 1997. HIV-1 tropism and co-receptor use. *Nature*. **385** (6616): 495 - 496.
65. Cho, M., M. Lee, M. Carney, J. Berson, R. Doms, and M. Martin. 1998. Identification of Determinants on a Dualtropic Human Immunodeficiency Virus Type 1 Envelope Glycoprotein that Confer Usage of CXCR4. *J. of Virology*. **72**(3): 2509-2515.
66. Simmons, G., D. Wilkinson, J. Reeves, M. Dittmar, S. Beddows, J. Weber, G. Carnegie, U. Desselberger, P. Gray, R. Weiss, and P. Clapham. 1996. Primary, Syncytium-Inducing Human Immunodeficiency Virus Type 1 Isolates are Dual-Tropic and Most Can Use Either Lestr or CCR5 as Coreceptors for Virus Entry. *J. of Virology*. **70**(12): 8355-8360.
67. Feng, Y., C. Broder, P. Kennedy, and E. Berger. 1996. HIV-1 Entry Cofactor: Functional cDNA Cloning of a Seven-Transmembrane, G Protein-Coupled Receptor. *Science*. **272**: 872-877.
68. Tuttle, D., J. Harrison, C. Anders, J. Sleasman, and M. Goodenow. Expression of CCR5 Increases during Monocyte Differentiation and Directly Mediates Macrophage Susceptibility to Infection by Human Immunodeficiency Virus Type 1. *J. of Virology*. **72** (6): 4962 – 4969.
69. Ghorpade, A., M. Xia, B. Hyman, Y. Persidsky, A. Nukuna, P. Bock, M. Che, J. Limoges, H. Gendelman, and C. Mackay. 1998. Role of the β -Chemokine Receptors CCR3 and CCR5 in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection of Monocytes and Microglia. *J. of Virology*. **72**(4): 3351-3361.
70. Lapham, C., M. Zaitseva, S. Lee, T. Romanstseva, and H. Golding. 1999. Fusion of monocytes and macrophages with HIV-1 correlates with biochemical properties of CXCR4 and CCR5. *Nat. Med.* **5**:303-308.
71. Sozzani, S., W. Luini, A. Borsatti. 1997. Receptor expression and responsiveness of human dendritic cells to a defines set of CC and CXC chemokines. *J. Immunol.* **159**: 1993-2000.

- 72. Manual de Métodos:** Laboratorio de Hematología, Facultad de Medicina, U.A.N.L.
- 73. Stent, G., P. U. Cameron and S.M. Crowe.** 1994. Expression of CD11/CD18 and ICAM-1 on monocytes and lymphocytes of HIV-1-infected individuals. *J. Leukoc. Biol.* **56** (3): 304 – 309.
- 74. Savedra, R., R. Delude, R. Ingalls, M. Fenton and D. Golenbock.** 1996. Mycobacterial lipoarabinomannan recognition requires a receptor that shares components of the endotoxin signaling system. *J. Immunol.* **157**: 2549 – 2554.
- 75. Larkin R., C. Benjamin, Y. Hsu, Q. Li, L. Zukoski and R. Silver.** 2002. CD40 Ligand (CD154) does not contribute to lymphocyte-mediated inhibition of virulent *Mycobacterium tuberculosis* within human monocytes. *Infect. Immun.* **70** (8): 4716 – 4720.
- 76. Wang, Y., C. Kelly, J. Karttunen, T. Whittall, P. Lehner, L. Duncan, P. MacAry, J. Younson, M. Singh, W. Oehlmann, G. Cheng, L. Bergmeier and T. Lehner.** 2001. CD40 is a cellular receptor mediating mycobacterial heat shock protein 70 stimulation of CC-Chemokines. *Immunity.* **15**: 971-983.
- 77.- Ostrowski, M., S. Justement, A. Catanzaro, C. Hallahan, L. Ehler, S. Mizell, P. Kumar, J. Mican, T. Chun, and A. Fauci.** 1998. Expression of Chemokine Receptors CXCR4 and CCR5 in HIV-1-Infected and Uninfected Individuals. *J. Immunol.* **161**: 3195 - 3201.
- 78. Lee, B., M. Sharron, L. Montaner, D. Weissman and R. Doms.** 1999. Quantification of CD4, CCR5, and CXCR4 levels on lymphocyte subsets, dendritic cells, and differentially conditioned monocyte-derived macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **96** : 5215 – 5220.
- 79. Verani, A., E. Pesenti, S. Polo, E. Tresoldi, G. Scarlatti, P. Lusso, A. Siccardi and D. Vercelli.** 1998. CXCR4 is a functional coreceptor for infection of human macrophages by CXCR4-dependent primary HIV-1 isolates. *J. Immunol.* **161**: 2084 – 2088.

- 80.- Cohen, O., S. Paolucci, S. M. Bende, M. Daucher, H. Moriuchi, M. Moriuchi, C. Cicala, R. Davey Jr., B. Baird, and A. Fauci. 1998. CXCR4 and CCR5 Genetic Polymorphisms in Long-Term Nonprogressive Human Immunodeficiency Virus Infection: Lack of Association with Mutations other than CCR5-Δ32. *J. Virol.* 72(7): 6215-6217.**
- 81.- Wahl, S., T. Wild, G. Peng, H. Donze, T. Doherty, D. Mizel and J. Orenstein. 1998. Mycobacterium avium complex augments macrophage HIV-1 production and increases CCR5 expression. . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95 : 12574 – 12579.**
- 82.- Wahl, S., T. Wild, G. Peng, H. Donze, and J. Orenstein. 1999. Co-infection with opportunistic pathogens promotes Human Immunodeficiency Virus type 1 infection in macrophages. *J. Infect Dis.* 179 (3): S457 – S460.**
- 83.- Juffermans, N., W. Paxton, P. Dekkers, A. Verbon, E. Jonge, P. Speelman, S. van Deventer and T. van der Poll. 2000. Up-regulation of HIV coreceptors CXCR4 and CCR5 on CD4⁺ T cells during human endotoxemia and after stimulation with (myco)bacterial antigens: the role of cytokines. *Blood.* 96 (8): 2649 – 2654.**
- 84.- Casarini, M., F. Ameglio, L. Alemanno, P. Zangrilli, P. Mattia, G. Paone, A. Bisetti and S. Giosue. 1999. Cytokine levels correlate with a Radiologic Score in Active pulmonary tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 159: 143 – 148.**
- 85.- Law, K., M. Weiden, T. Harkin, K. Tchou-Wong, C. Chi, and W. Rom. 1996. Increase release of interleukin-1 beta, interleukin-6, and tumor necrosis factor-alpha by bronchoalveolar cells lavaged from involved sites in pulmonary tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 153 (2): 799 – 804.**
- 86.- Bergeron, A., M. Bonay, M. Kambouchner, D. Lecossier, M. Riquet, P. Soler, A. Hance and A. Tazi. 1997. Cytokine patterns in tuberculous and sarcoid granulomas :correlations with histopathologic features of the granulomatous response. *J. Immunol.* 159: 3034-3043.**
- 87.- Flynn, J., and J. Chan. 2001. Immunology of Tuberculosis. *Annu. Rev. Immunol.* 19: 93-129.**

- 88.- Nakata, K., W. Rom, Y. Honda, R. Condos, S. Kanegasaki, Y. Cao and M. Weiden. 1997. *Mycobacterium tuberculosis* enhances human immunodeficiency virus-1 replication in the lung. *Am. J. Resp. Crit. Care Med.* **155** (3): 996-1003.**
- 89.- van Crevel, R., T. Ottenhoff, and J. van der Meer. 2002. Innate Immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin. Microbiol. Rev.* **15**(2):294-309.**
- 90.- Somoskovi, A. Zissel, G. Zipfel, P. Different cytokine patterns correlate with the extension of disease in pulmonar tuberculosis. *Eur. Cytokine Newt.* June, 1999.**
- 91.- Arellano-Rangel, G. Determinación de citocinas en liquido broncoalveolar de pacientes con tuberculosis. Tesis de Maestría. 2002.**
- 92.- Kurashima, K., N. Mukaida, M. Fujimura, M. Yasui, Y. Nakazumi, T. Matsuda and K. Matsushima. 1997. Elevated chemokine levels in brochoalveolar lavage fluid of tuberculosis patients. *Am J Respir Crit Care Med.* **159**: 1474 –1477.**

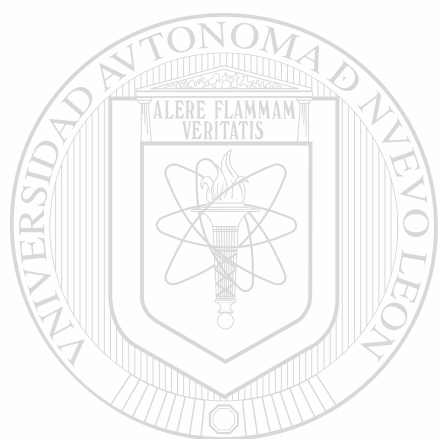


UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



