

La participación de los neutrófilos en el control y activación inmunológica temprana en la tuberculosis pulmonar experimental

Jorge Barrios-Payán,^a Diana Aguilar- León,^a Ricardo Lascurain-Ledezma^b y Rogelio Hernández-Pando^{a,*}

^aSección de Patología Experimental, Departamento de Patología, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. México D.F., México

^bDepartamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias. México D.F., México

Recibido en su versión modificada: 27 de abril de 2006

Aceptado: 28 de abril de 2006

RESUMEN

Antecedentes. Macrófagos y neutrófilos son fagocitos profesionales que contribuyen en el control de la tuberculosis.

Objetivo. Comparar la producción de citocinas proinflamatorias entre ambos tipos de células.

Material y métodos. Se infectaron ratones Balb/c con la cepa virulenta H37Rv y se realizó citofluorometría en células de lavado bronquial.

Resultados. Se observó mayor emigración de neutrófilos durante los tres primeros días postinfección, posteriormente disminuyó su número mientras aumentó el de los macrófagos. El número de neutrófilos positivos para interleucina 1, factor de necrosis tumoral alfa e interleucina 8, fue significativamente mayor durante la primera semana de infección. En una segunda parte de este estudio, se trataron ratones con el anticuerpo monoclonal citolítico de neutrófilos RB6-8C5 y se analizó la evolución de la enfermedad. Los ratones neutropénicos presentaron más bacterias en los pulmones y en el bazo, menor inflamación y tamaño de los granulomas así como disminución de la hipersensibilidad retardada.

Conclusiones. Estos resultados muestran que los neutrófilos son las células inflamatorias más abundantes durante la infección tuberculosa temprana en ratones, que contribuyen en la eliminación bacilar, participando en la contención de la diseminación hematogena y que son una fuente importante de citocinas proinflamatorias que promueven el reclutamiento y activación temprana de linfocitos y macrófagos.

Palabras clave:

Neutrófilos, tuberculosis, modelos experimentales

SUMMARY

Background. Macrophages and neutrophils are professional phagocytes that participate in the control of mycobacterial infection.

Objective. We compared the pro-inflammatory cytokine production of both cell types during early pulmonary tuberculosis.

Material and methods. Balb/c mice were infected by intratracheal route with the H37Rv virulent strain, and bronchial washing cells were studied by cytofluorometry.

Results. A higher number of neutrophils with immunoreactivity against interleukin 1, interleukin 8 and tumor necrosis factor alpha were observed during the first week of infection. After, macrophages were the predominant cell type. In a second part of the study, infected mice were treated with the RB6-8C5 anti-neutrophil monoclonal antibody, and the course of the infection was observed. In comparison with controls, neutropenic mice showed higher bacillary loads in lungs and spleen, lower inflammatory infiltrate, smaller granulomas and lesser cutaneous delayed type hypersensitivity.

Conclusions. These results show that neutrophils are the most abundant inflammatory cell type during early murine pulmonary tuberculosis, and they participate in the lung bacilli clearance and prevention of blood dissemination. Neutrophils are also an important source of proinflammatory cytokines, contributing to the early recruitment and activation of macrophages and lymphocytes, favoring cell mediated immunity against mycobacterial infection.

Key words:

Neutrophils, tuberculosis, experimental animal models

Introducción

La tuberculosis es una importante enfermedad infecto-contagiosa que afecta principalmente a los pulmones y produce profundas alteraciones en el sistema inmunológico.¹ Actualmente se calcula que, a nivel mundial, esta enferme-

dad produce tres millones de defunciones y ocho millones de nuevos casos por año, lo cual la convierte en la enfermedad infecciosa más importante en la población de más de cinco años, por lo que la Organización Mundial de la Salud la ha declarado emergencia mundial.²

*Correspondencia y solicitud de Sobretiros: Dr. Rogelio Hernández-Pando, Sección de Patología Experimental, Departamento de Patología, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán", Vasco de Quiroga 15, Tlalpan 14000 México D.F. Tel.: (55) 5485-3491, Fax: (55) 5655-1076. Correo electrónico: rhpando@quetzal.innsz.mx

Los neutrófilos son las células inflamatorias distintivas de la inflamación aguda. Después de realizar los procesos de adherencia, emigración transendotelial y quimiotaxis, son rápidamente reclutados en el sitio de la inflamación donde fagocitan y eliminan microorganismos a través de la generación de radicales libres de oxígeno y degranulación lisosomal. A pesar de que los neutrófilos son células de vida media corta y de vía final de diferenciación, son capaces de sintetizar una restringida pero importante variedad de proteínas importantes en la regulación de la respuesta inmunológica, tales como las proteínas de clase 1 del complejo mayor de histocompatibilidad y las citocinas como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), la interleucina 1 (IL-1), la interleucina 8 (IL-8), el factor de transformación tumoral beta (TGF), factores estimulantes de colonia, la interleucina 3, la interleucina 12, las quimiocinas como la proteína inflamatoria macrofágica 1-alfa³⁻⁹ y los péptidos antimicrobianos como la defensina alfa, un factor bactericida distintivo de la inmunidad innata el cual es capaz de lisar micobacterias.¹⁰

En humanos y ratones, la infección por *M. tuberculosis* es esencialmente controlada por linfocitos T, cooperadores de clase 1 (Th-1), y por macrófagos activados. El interferón gama (IFN- γ) y el TNF- α tienen una participación fundamental en este proceso, debido a que inducen la activación macrofágica al aumentar la producción de la enzima óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS) y del óxido nítrico, factor esencial para la destrucción de la micobacteria.^{11,12} Esta actividad protectora es ineficiente si coexiste una alta producción de citocinas producidas por los linfocitos T, cooperadores de clase 2 (Th-2).^{13,14} Este proceso complejo de interacciones celulares y moleculares del sistema inmunológico se reproduce fielmente en ratones Balb/c con tuberculosis progresiva, inducida por una dosis alta de la cepa virulenta de laboratorio H37Rv, administrada por inyección intratraqueal.¹⁵⁻¹⁷

En este modelo experimental, se presentan una fase temprana durante la cual predomina una alta producción de citocinas Th-1, TNF- α e iNOS con formación de granulomas, lo que permite controlar temporalmente la infección. Cuatro semanas después se inicia la fase progresiva de la infección, en la cual la presencia de las citocinas Th1, TNF- α e iNOS disminuye progresivamente mientras aumenta el número de las citocinas Th-2. Se observa gradualmente un gran incremento en la carga bacilar y del área pulmonar afectada por la neumonía, produciendo insuficiencia respiratoria y muerte.

En las lesiones tuberculosas tempranas, tanto en la tuberculosis humana¹⁸ como en la experimental,¹⁵ existe infiltrado abundante de neutrófilos. Diversos estudios han mostrado que estas células pueden tener una participación importante en la eliminación de la micobacteria.¹⁹⁻²⁰

El objetivo del presente trabajo fue comparar la producción de citocinas proinflamatorias (IL-1, TNF- α , IL-8) entre neutrófilos y macrófagos, estudiando células obtenidas por lavado bronquial con citometría de flujo durante la fase temprana (día 1 a 21 postinfección) del modelo experimental de tuberculosis pulmonar progresiva en ratones Balb/c. En una segunda parte, se estudió la evolución de la infección en ratones en los cuales se eliminaron experimentalmente los neutrófilos con la administración intraperitoneal de anticuerpos monoclonales específicamente citolíticos.

Material y métodos

Modelo experimental de tuberculosis pulmonar progresiva en ratones Balb/c

Aunque el modelo experimental de tuberculosis pulmonar ha sido previamente descrito en detalle,¹⁵⁻¹⁷ se explicará brevemente: ratones machos singénicos Balb/c de 6 a 8 semanas de edad fueron anestesiados con pentobarbital sódico por vía intraperitoneal (56 mg/kg). Posteriormente, se realizó una pequeña incisión quirúrgica media en la cara anterior del cuello a través de la cual se expuso la tráquea. Se inyectaron directamente en los pulmones de los ratones a través de la tráquea con una jeringa de insulina 1 \times 10⁶ bacterias vivas y virulentas de la cepa prototipo H37Rv, suspendidas en 100 μ l de solución amortiguada de fosfatos (PBS). La herida quirúrgica se suturó con hilo de algodón estéril y los ratones se mantuvieron en posición vertical hasta desaparecer el efecto de la anestesia. Finalmente se albergaron los animales infectados en grupos de cinco en microaisladores conectados a un sistema de presión negativa con flujo continuo de aire. Se sacrificaron por exsanguinación y bajo anestesia grupos de 6 ratones en los días 1, 2, 3, 7, 14 y 21 postinfección. Todos los procedimientos de infección y sacrificio se realizaron en una campana de seguridad biológica nivel 3, bajo condiciones estrictas de bioseguridad. Los procedimientos experimentales descritos fueron aprobados por el Comité de Investigación en Animales de Experimentación del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán", siguiendo las normas internacionales.

Lavados bronquiales y estudios de citometría de flujo

Después de sacrificar a los animales de experimentación en los diversos días postinfección, se realizaron lavados bronquiales en tres ratones en dos experimentos diferentes con el objetivo de realizar estudios de citometría de flujo comparando macrófagos y neutrófilos en la producción de las citocinas TNF- α , IL-1 e IL-8. Para obtener las células inflamatorias por lavado bronquial, se expuso la tráquea quirúrgicamente y a través de ella se insertó un catéter que se conectó a una jeringa de insulina con la cual se perfundió 500 μ l de medio RPMI 1640 (GIBCO, Invitrogen Corporation) con 1500 U de colagenasa tipo 2 (Worthington, CLSS 2). El medio se dejó por un minuto en los pulmones y posteriormente se extrajo lentamente. Este procedimiento se repitió seis veces. Posteriormente, se adicionó a las células obtenidas 2 ml de solución de lisis (Cell Lysis Buffer, Becton Dickinson) para eliminar eritrocitos y se lavaron dos veces con RPMI. Después de centrifugar, el botón celular se suspendió de nuevo en amortiguador de FACS (PBS 1X, pH 7.2, BSA 1%). Las células se contaron y se ajustaron a una concentración de 10⁶ para cada anticuerpo a determinar. El anticuerpo monoclonal de ratón RB6-8C5 se usó para marcar específicamente los neutrófilos; el anticuerpo monoclonal anti CD-11b-FITC se usó para marcar los macrófagos. Las células se incubaron con estos anticuerpos diluidos 1/300 en PBS a 6°C por 20 minutos. Posteriormente se lavaron dos veces con

amortiguador de FACS (10 veces el volumen). Después de centrifugar, el botón celular se suspendió de nuevo en 100 μ l de amortiguador de FACS con anticuerpo de conejo anti-IgG de ratón marcado con FITC diluido 1/400 y se incubó a 6°C por 20 minutos. Finalmente las células se lavaron dos veces y se estudiaron con el citómetro de flujo.

Para determinar las citocinas intracelulares, el botón celular se suspendió otra vez en 100 μ l de saponina 0.1% en PBS (Sigma, St Louis, USA) por 10 minutos a 6°C, después de lavarlas extensamente éstas se incubaron por 10 min a 6°C con los anticuerpos monoclonales de rata anti IL-8, IL-1 y TNF- α de ratón marcados con ficoeritrina (BD Pharmingen, Cal USA) diluidos 1/300. Después de lavar las células, se suspendieron otra vez en amortiguador de FACS y se analizaron 10,000 células por citocina en el citómetro de flujo (FACS Scalibur BD). Como control, se usó el mismo procedimiento y células incubadas con anticuerpos control de isotipo (BD Pharmingen).

Eliminación experimental de neutrófilos con la administración de anticuerpos monoclonales citolíticos

El anticuerpo monoclonal de ratón RB6-8C5 es específico de los neutrófilos y produce eficiente citólisis.

Para estudiar la participación de los neutrófilos en la respuesta inmunológica temprana en nuestro modelo experimental, un día antes de la infección, se administraron, a cada animal de un grupo de 40 ratones Balb/c, 200 μ g de este anticuerpo diluidos en 400 μ l de solución salina estéril por vía intraperitoneal. Posteriormente se administró, durante tres semanas, la misma cantidad de anticuerpo monoclonal por la misma vía cada tercer día después del primer día de infección.

Se sacrificaron grupos de seis ratones los días 1, 2, 3, 7, 14 y 21 postinfección. Se perfundió a tres ratones el pulmón derecho o el izquierdo con formaldehído al 10% en PBS para realizar estudios histológicos, mientras que el otro pulmón se congeló por inmersión en nitrógeno líquido para cuantificar el número de bacterias vivas por la determinación de unidades formadoras de colonia (UFC). Se extrajo el bazo a todos los ratones y en estos se determinaron las UFC. El grupo control tuvo un número igual de ratones a los que se inyectó por vía peritoneal exclusivamente el solvente (solución salina fisiológica).

Determinación de la cantidad de bacterias vivas en los pulmones por cuenta de Unidades Formadoras de Colonia (UFC)

El pulmón derecho o izquierdo de cada ratón fue macerado en 3 ml de solución salina estéril con un homogenizador de tejidos Politron (Kinematica, Luzern, Suiza). Posteriormente se efectuaron diluciones seriadas decimales en solución salina fisiológica estéril con Tween 80 al 0.05%. Se tomaron 20 μ l de cada dilución y del concentrado y se sembraron por duplicado en medio 7H10 suplementado con ácido oleico, albúmina, dextrosa y catalasa (OADC, Difco Labs, Detroit MI, USA). Una vez absorbidas en las placas, éstas se invirtieron

e incubaron a 37° C en una atmósfera de CO₂ al 5% durante 15-21 días. Las colonias bacterianas fueron identificadas y contadas en el día 21 de cultivo.

Estudio morfológico

De los pulmones incluidos en bloques de parafina se obtuvieron cortes histológicos con un micróscopo semiautomático (Leica RM 2145 Milton Keynes, Cambridge, UK), los cuales se tiñeron con hematoxilina-eosina. La medición del área ocupada por las células inflamatorias en los diferentes compartimentos pulmonares (área perivascular y espacio intersticial alveolo-capilar), así como del tamaño de los granulomas se hizo con analizadores de imagen computarizados (Zidas Zeiss, Carl Zeiss Ltd., Herts, UK; Leica QWin, Milton Keynes, Cambridge, UK). Las áreas inflamatorias en los diferentes compartimentos pulmonares se determinaron por cada pulmón en 10 campos seleccionados aleatoriamente, en grupos de tres ratones por tiempo de sacrificio en tres experimentos diferentes. Todos los granulomas presentes en los cortes se midieron determinando el área en micras cuadradas. Posteriormente se realizó recuento diferencial de linfocitos y macrófagos en estas mismas áreas, que se expresaron en porcentajes.

Determinación de la respuesta de hipersensibilidad retardada a antígenos micobacterianos solubles

Para evaluar *in vivo* la actividad de la inmunidad mediada por células, se determinó en tres ratones la respuesta de hipersensibilidad tardía cutánea (DTH) inducida por antígenos totales solubles de *M. tuberculosis* en dos experimentos diferentes. En los días postinfección establecidos, el grosor del cojinete plantar de los ratones control y del grupo tratado con los anticuerpos antineutrófilos fue medido con un calibrador de ingeniero (Código 7308, Mitutoyo, Japón). Posteriormente se inyectaron subcutáneamente 20 μ g de antígenos micobacterianos solubles disueltos en 40 μ l de PBS. La inflamación producida se determinó al medir el cojinete plantar 24 horas después de la administración de los antígenos. La diferencia entre el grosor del cojinete plantar a las 24 horas y al tiempo basal fue multiplicada por 25.4 para obtener el diámetro de induración en micras.

Análisis estadístico

Con la prueba de Kolmogorov-Smirnoff, se determinó normalidad. Al encontrar distribución normal de los datos, se realizó prueba de ANOVA de dos vías para comparar la cantidad de neutrófilos y macrófagos positivos para las citocinas y las unidades formadoras de colonia, la hipersensibilidad tardía cutánea y la morfometría de los animales infectados con *M. tuberculosis* y tratados con el anticuerpo monoclonal RB6-8C5 y de los ratones control no tratados. Se consideró como significativa una $p < 0.05$.

Resultados

Comparación de la producción de citocinas por macrófagos y neutrófilos determinada por citometría de flujo durante la fase temprana de la infección

La figura 1 muestra la cinética de macrófagos y neutrófilos durante las tres primeras semanas de infección. Los neutrófilos son más abundantes que los macrófagos en los días uno y dos postinfección, pero en el día siete su número se iguala con el de los macrófagos y en los días 14 y 21 disminuye en forma acentuada. En comparación, los macrófagos incrementaron su número progresivamente llegando a su máximo en el día 21.

La determinación por citometría de flujo del número de neutrófilos y macrófagos con inmunoreactividad para IL-1 mostró más del doble de neutrófilos positivos en los días uno y dos postinfección, el día siete el número se igualó al de los macrófagos y los días 7, 14 y 21 la cantidad de macrófagos positivos fue significativamente mayor que la de los neutrófilos (Figura 1). En relación con la producción de TNF- α , el día uno el número de los neutrófilos positivos fue tres veces mayor que el de los macrófagos, posteriormente el número de células TNF- α positivas fue muy similar hasta el día 14, mientras que el día 21 la cantidad de macrófagos TNF- α positivos duplicó al de los neutrófilos. La producción de IL-8

se observó en ambos tipos de células exclusivamente durante los tres primeros días postinfección, pero el primer día el número de neutrófilos positivos fue cuatro veces mayor que el de los macrófagos (Figura 1).

Análisis comparativo del curso de la infección en animales neutropénicos y controles

La administración intraperitoneal del anticuerpo monoclonal RB6-8C5 generó una eliminación del 98% de neutrófilos tanto en sangre periférica como en lavados bronquiales de ratones infectados con *M. tuberculosis* (datos no mostrados). En comparación con los animales control, la cuantificación de bacterias vivas en los pulmones de los ratones tratados mostró el doble de UFC en los días dos y siete postinfección (Figura 2A), mientras que en el bazo desde el día uno postinfección se observó el doble de UFC en los animales tratados y el día siete existieron cuatro veces más UFC en los animales neutropénicos que en los control. Posteriormente en los días 14 y 21 se determinó un número igual de UFC en animales tratados y control (Figura 2B).

El estudio histológico morfométrico mostró disminución de la inflamación, aunque ésta no fue significativa, en el espacio intersticial alveolo-capilar de los animales tratados, siendo éste más acentuado durante la primera semana postinfección (Figuras 3 y 4). El análisis diferencial *in-situ* de estas áreas

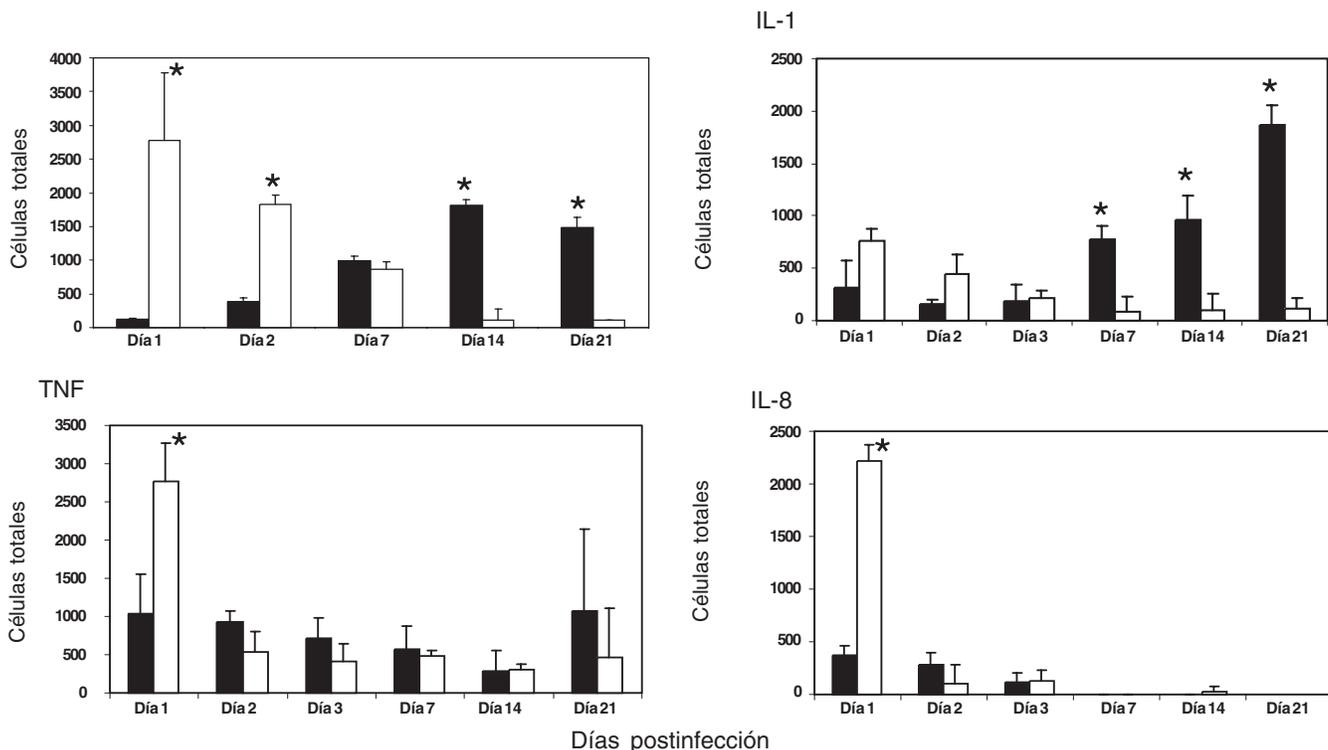


Figura 1. El panel superior izquierdo muestra la cinética comparativa de macrófagos (barras negras) y neutrófilos (barras blancas) determinada en células de lavado bronquial por citometría de flujo durante las tres primeras semanas de la infección en ratones Balb/c. La comparación por la misma técnica del número de macrófagos y neutrófilos inmunoreactivos para factor de necrosis tumoral alfa (TNF), interleucina 1 (IL-1) y 8 (IL-8) muestra mayor cantidad de neutrófilos positivos sobre todo durante los tres primeros días postinfección. El asterisco indica significancia estadística ($p < 0.05$)

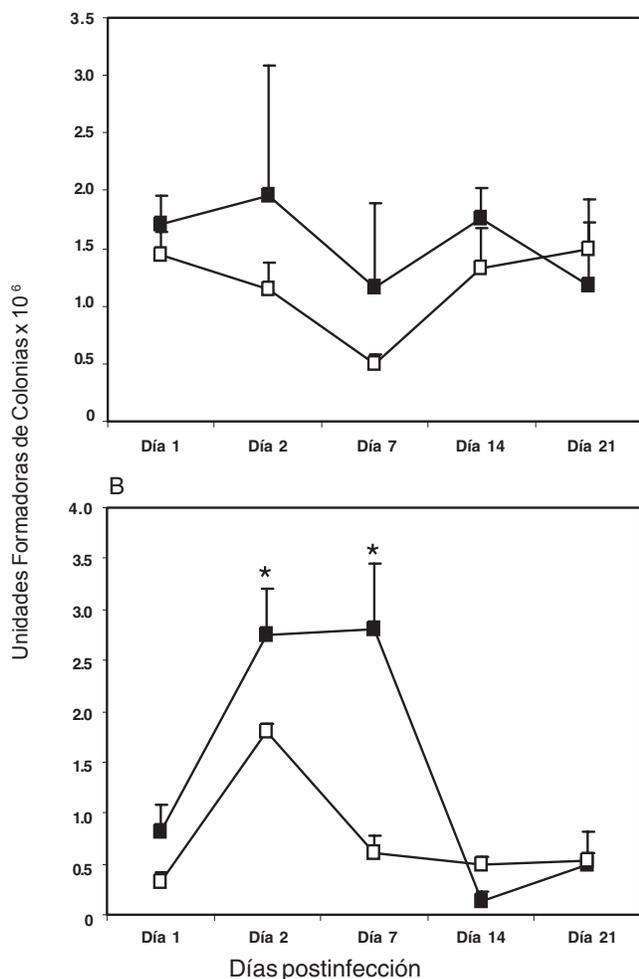


Figura 2. Comparación del número de unidades formadoras de colonia bacterianas (UFC) en pulmones (A) y bazo (B) de ratones neutropénicos (cuadros negros) y controles (cuadros blancos). Se presentan las medias y desviaciones estándar de tres ratones por tiempo de sacrificio en dos experimentos diferentes. El asterisco indica significancia estadística ($p < 0.05$).

mostró disminución no significativa en la cantidad de macrófagos y linfocitos en los animales tratados. Curiosamente, el menor número de linfocitos en el espacio intersticial de los animales tratados se observó el día 21 postinfección (Figura 2).

La cuantificación por morfometría automatizada de la inflamación perivascular mostró resultados similares. Los ratones tratados mostraron, durante la primera semana postinfección, menor inflamación perivascular que los ratones control (Figuras 3 y 4). El recuento diferencial *in-situ* de macrófagos fue menor en los ratones tratados durante la primera semana de infección, aunque no significativo (Figura 3), mientras que los linfocitos existieron en menor número en los animales neutropénicos durante las tres semanas de observación experimental (Figura 3).

En comparación con los animales control, el tamaño de los granulomas fue 30% y 100% menor en los animales tratados en los días 14 y 21 postinfección respectivamente (Figuras 3 y

4), con disminución de linfocitos en ambos tiempos y exclusivamente de macrófagos en el día 14.

La prueba de hipersensibilidad tardía cutánea (DTH) inducida por antígenos totales de *M. tuberculosis* fue tres veces menor en los días tres y siete postinfección en los ratones tratados que en los animales control (Figura 5).

Discusión

Los macrófagos son células esenciales en el proceso de eliminación de bacterias intracelulares como *M. tuberculosis*. Sin embargo, existen estudios experimentales que también señalan a los neutrófilos como células importantes en este proceso.¹⁹⁻²¹ Nuestros resultados confirman esto al mostrar que durante la fase temprana de la infección pulmonar (días uno a tres), los neutrófilos son más abundantes que los macrófagos. Este incremento en el número de los neutrófilos contribuye en la disminución rápida y temprana de micobacterias que hemos previamente reportado en este modelo,¹⁵ pues los animales neutropénicos tuvieron un número mayor de bacterias vivas en los pulmones durante las dos primeras semanas de la infección. Después de la infección tuberculosa pulmonar se produce diseminación hematogena temprana, pues en el bazo y el hígado se pueden cultivar bacterias vivas desde el primer día de la infección. Los resultados en los ratones neutropénicos también mostraron que los neutrófilos son células importantes en la contención de la diseminación hematogena temprana, pues en los bazo de éstos se observó una mayor cantidad de bacterias que en los ratones control, la cual fue de hecho proporcionalmente mayor que la observada en los pulmones.

Además de los macrófagos, los neutrófilos son células capaces de sintetizar y secretar citocinas diversas, sobre todo citocinas proinflamatorias como IL-1, TNF- α e IL-8.³⁻⁷ Por este motivo, un objetivo importante del presente estudio fue la comparación de ambos tipos de células en la producción de estas citocinas. Nuestros resultados mostraron que los neutrófilos son en efecto una fuente muy importante de citocinas proinflamatorias durante la fase temprana de la infección, y probablemente es a través de esta actividad funcional como estas células también participan en la activación de la inmunidad celular protectora. Nuestros resultados citofluorométricos mostraron que en comparación con los macrófagos, durante el primero y segundo día postinfección existe el doble de neutrófilos positivos para IL-1 y hay tres veces más neutrófilos positivos para TNF- α . Estos resultados son importantes pues la IL-1 es una citocina esencial en la estimulación de los linfocitos Th1 induciendo la producción de IL-2 y su receptor, a través de lo cual los linfocitos proliferan. El TNF- α es una citocina esencial en la eliminación de las micobacterias por los macrófagos a través de su activación y mayor expresión de la iNOS,^{11,12} además el TNF- α es fundamental en la formación de los granulomas. En este modelo experimental se ha informado que IL-1 y TNF- α tienen cinéticas de producción similares, pues se producen en gran cantidad en el día uno y tres postinfección (citocinas de alarma), y en el día 14 y 21, cuando los granulomas empiezan a formarse y alcanzan su máxima madurez respectivamente.¹⁶ Los resultados muestran que además de los macrófagos, los neutrófilos son

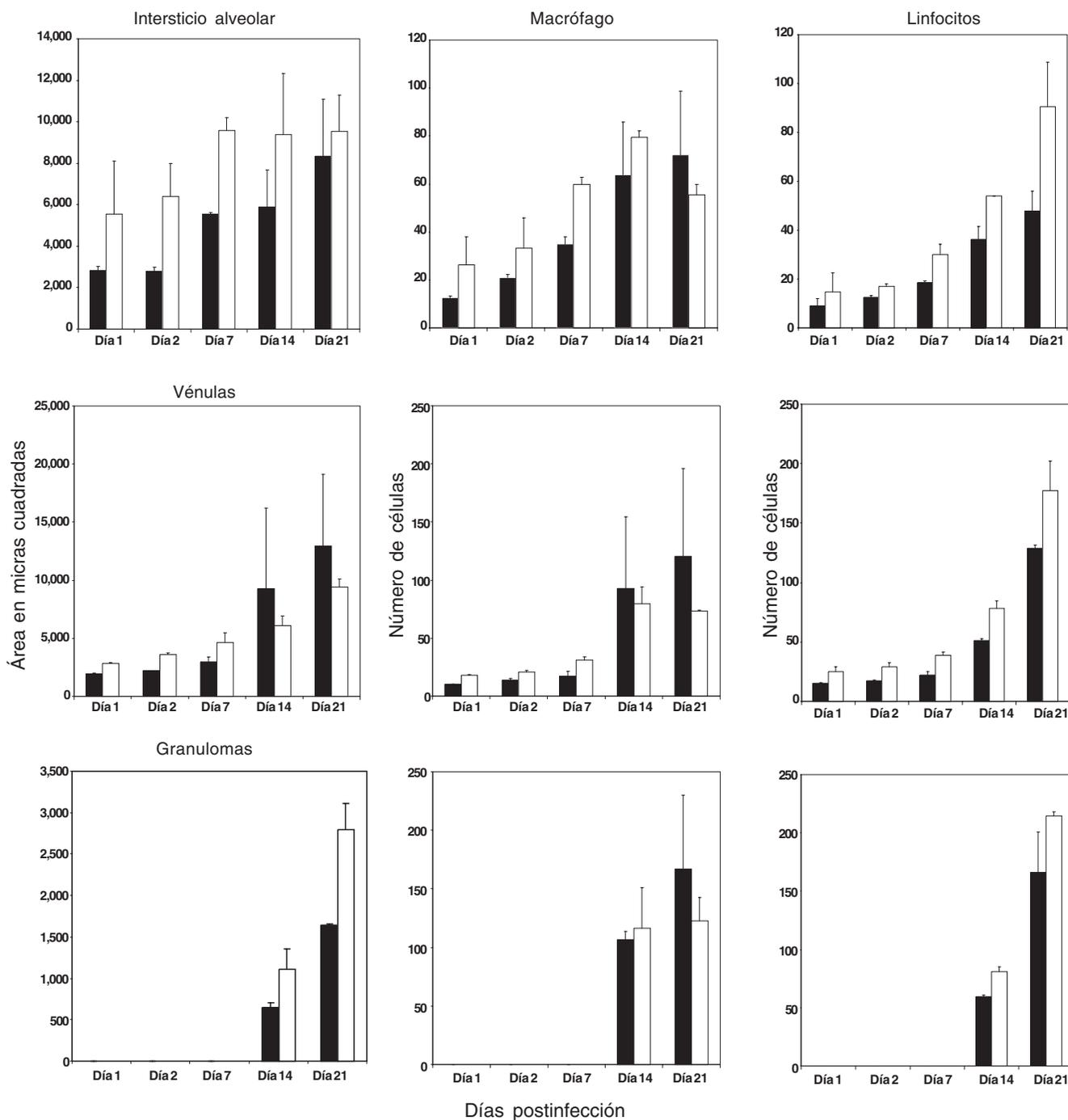


Figura 3. Comparación entre ratones neutropénicos (barras negras) y controles (barras blancas) del área ocupada por el infiltrado inflamatorio en el intersticio alveolo-capilar y alrededor de las vénulas, así como el tamaño de los granulomas determinados por morfometría automatizada. En las mismas áreas se determinó el número de linfocitos y macrófagos. Los animales neutropénicos tienen menos inflamación con menor número de linfocitos y macrófagos.

una fuente muy importante de ambas citocinas proinflamatorias, sobre todo durante los tres primeros días de infección. Sin embargo, esta actividad de los neutrófilos deja de ser importante después de la primera semana de contagio, al ser sustituidos por los macrófagos.

La IL-8 que pertenece en realidad a la familia de las quimiocinas, es producida principalmente por los neutrófilos y su principal actividad es la quimiotaxis y activación de estas células, por lo cual es un factor proinflamatorio importante.⁶ Los resultados mostraron que los neutrófilos son una fuente muy importante de

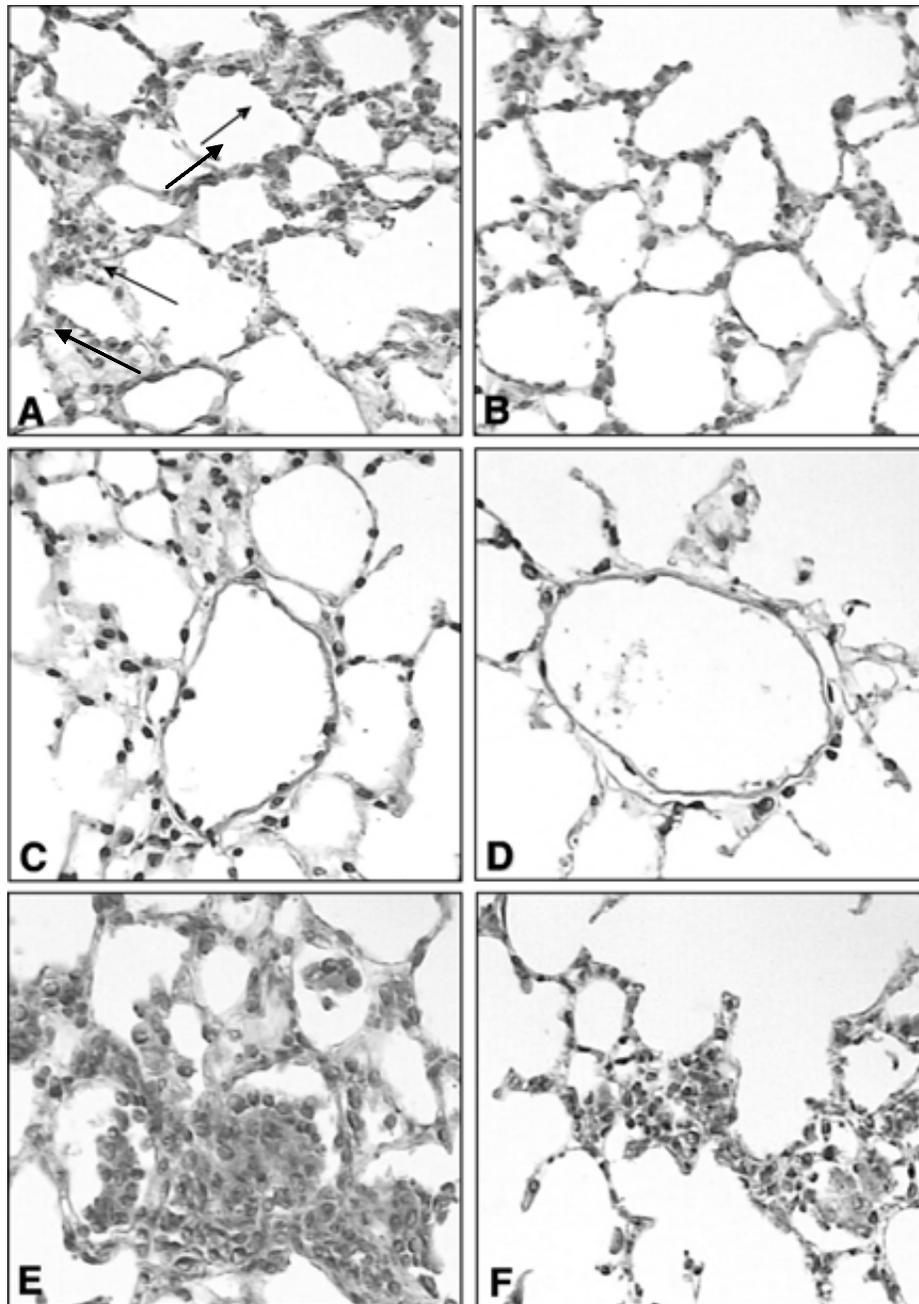


Figura 4. Imágenes histológicas representativas de los ratones infectados por vía intratraqueal con *M. tuberculosis* tratados y no tratados (controles) con el anticuerpo RB6-8C5 para inducir neutropenia. (A) En el día uno postinfección, el espacio intersticial (flechas) de los ratones control tiene más células inflamatorias que el de los ratones neutropénicos (B). (C) En el día tres postinfección, hay un número mayor de células inflamatorias perivenulares en los ratones control que en los animales neutropénicos (D). (E) El tamaño de los granulomas en el día 21 postinfección en los ratones control es mayor que en los animales neutropénicos (F).

IL-8 durante la tuberculosis temprana, sobre todo durante el primer día de la infección, cuando hubo cinco veces más neutrófilos positivos para IL-8 que macrófagos. Posteriormente este porcentaje disminuyó acentuadamente.

La actividad promotora de inflamación de los neutrófilos durante la primera semana de infección se demostró con el

estudio morfométrico comparativo entre ratones neutropénicos y controles, pues el área ocupada por las células inflamatorias en el espacio intersticial alveolo-capilar y en el área perivenular fue menor en los ratones neutropénicos y los recuentos diferenciales mostraron disminución tanto de linfocitos como macrófagos. Es notable que el tamaño de los granulomas fue

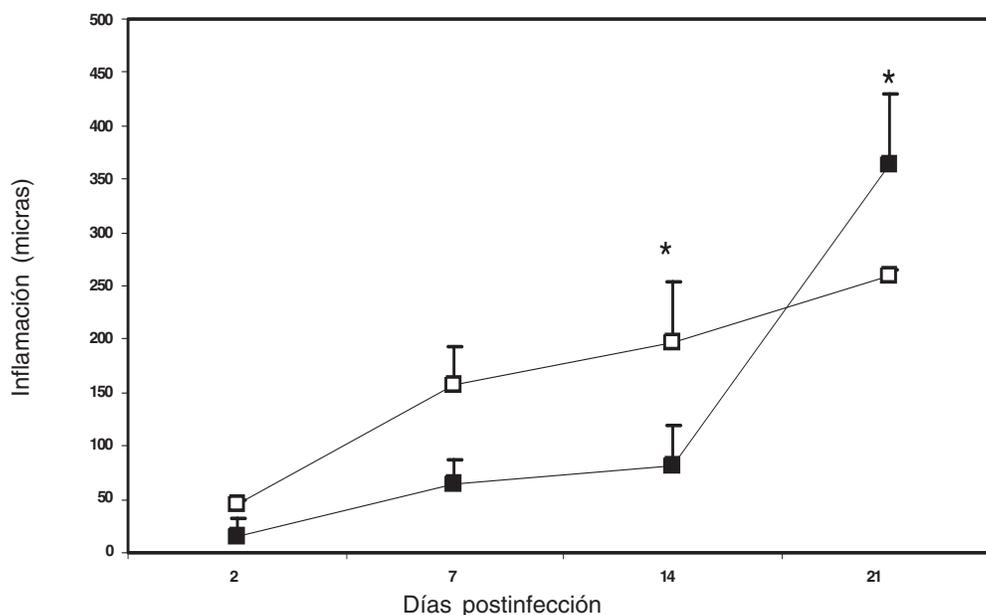


Figura 5. Determinación de la hipersensibilidad tardía cutánea inducida por la administración subcutánea de antígenos solubles totales de *M. tuberculosis* en ratones neutropénicos (cuadros blancos) y animales control (cuadros negros). Se presentan las medias y desviaciones estándar de tres ratones por tiempo de sacrificio en dos experimentos diferentes. El asterisco indica significancia estadística ($p < 0.05$).

también menor en los animales neutropénicos a expensas de la disminución en el porcentaje de linfocitos y macrófagos. Esta disminución en la inflamación producida en los animales neutropénicos fue seguramente debida a la disminución en la concentración de las citocinas IL-1 TNF- α e IL-8, pero además también es probable que haya contribuido la disminución de la concentración de otros factores proinflamatorios que no cuantificamos, como la quimiocina MIP-1 α ,⁸ que también es producida por los neutrófilos activados por la micobacteria o sus productos²² y su concentración es muy alta en el primer día postinfección de nuestro modelo.

La disminución en la cantidad de linfocitos y macrófagos en el pulmón de los ratones neutropénicos durante la infección temprana también produjo menor actividad de la inmunidad celular, manifestada por disminución significativa de la DTH. Esta disminución también pudo ser producida por una menor activación de los linfocitos Th1, pues en estudios similares a éste se ha demostrado menor producción de IFN- γ en los animales neutropénicos.¹⁹ Además, los neutrófilos también producen IL-12,²¹ un factor importante en la activación y diferenciación de las células Th-1. Sin embargo, el día 21 postinfección la presencia de macrófagos y linfocitos T activados en los ratones neutropénicos fue suficiente como para generar una adecuada respuesta de hipersensibilidad tardía.

En conclusión, estos resultados experimentales en un modelo murino bien caracterizado de tuberculosis pulmonar progresiva muestran que los neutrófilos son el tipo de célula inflamatoria más abundante durante la infección temprana, que contribuyen a la eliminación de las bacterias en los pulmones y en la contención de la diseminación hematogena, además promueven el reclutamiento y activación de linfocitos y macró-

fagos durante el inicio del establecimiento de la respuesta inmunológica protectora.

Agradecimientos

Este trabajo fue patrocinado por el CONACYT y por la Comunidad Europea (INCO DC ICA4-CT-2002-10063).

Referencias

1. Rook GAW, Hernández Pando R. The pathogenesis of tuberculosis. *Annu Rev Microbiol* 1996;50:259-284.
2. World Health Organization. TB-a global emergency. WHO report on the TB endemics. Geneva. WHO. 1994.
3. Cassatella MA. The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils. *Immunol Today* 1995;16:21-26.
4. Tiku K, Tiku ML, Skosey JL. Interleukin 1 production by human polymorphonuclear granulocytes. *J Immunol* 1986;136:3677-3685.
5. Cicco NA, Lindemann A, Content J. Inducible production of interleukin-6 by human polymorphonuclear neutrophils; role of granulocyte macrophage colony-stimulating factor and tumor necrosis factor alpha. *Blood* 1990;75:2049-2052.
6. Bazzoni F, Cassatella MA, Rossi P, Ceska M, De wald B, Baggiolini M. Phagocytosing neutrophils produce and release high amount of neutrophil-activating peptide 1/Interleukin 8. *J Exp Med* 1991;173:771-774.
7. Dubravec DB, Spriggs DR, Mannick JA, Rodrick ML. Circulating human peripheral blood granulocytes synthesize and secrete tumor necrosis factor alpha. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:6758-6761.
8. Kasama T, Strieter RM, Standiford TJ, Burdick MD, Kunkel SL. Expression and regulation of human neutrophil-derived macrophage inflammatory protein 1 alpha. *J Exp Med* 1993;178:63-72.
9. Cassatella MA, Meda L, Gasparini S, D'Andrea A, Mn X, Trinchieri G. Interleukin-12 production by human polymorphonuclear leukocytes. *Eur J Immunol* 1996;25:1-5.
10. Sharma S, Verma I, Khuller GK. Therapeutic potential of human neutrophil peptide 1 against experimental tuberculosis. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:639-640
11. Chan X, Xing Y, Magliozzo RS, Bloom BR. Killing of virulent Mycobacterium

- tuberculosis by reactive nitrogen intermediates produced by activated macrophages. *J Exp Med* 1992;175:1111-1122.
12. **MacMicking J, Xie QW, Nathan C.** Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol* 1997;15:323-350.
 13. **Seah GT, Scott GM, Rook GAW.** Type 2 cytokine gene activation and its relationship to extent of disease in patients with tuberculosis. *J Infect Dis* 2000;181:385-389.
 14. **Wangoo A, Sparer T, Brown IN et al.** Contribution of Th1 and Th2 cells to protection and pathology in experimental models of granulomatous disease. *J. Immunol.* 2001;166:3432-3439.
 15. **Hernandez-Pando R, Orozco EH, Sampieri A, Pavón L, Velasquillo C, Larriva-Sahd L, Madrid MW.** Correlation between kinetics of Th1/Th2 cells and pathology in a murine model of experimental pulmonary tuberculosis. *Immunology* 1996;89:26-33.
 16. **Hernandez-Pando R, Orozco EH, Arriaga AK, Sampieri A, Larriva-Sahd J, Madrid Marina V.** Analysis of the local kinetics and localization of interleukin 1a, tumor necrosis factor a and transforming growth factor b during the course of experimental pulmonary tuberculosis. *Immunology* 1997;90:607-617.
 17. **Hernandez-Pando R, Schön T, Orozco EH, Serafín J, Estrada-García I.** Expression of nitric oxide synthase and nitrotyrosine during the evolution of experimental pulmonary tuberculosis. *Exp Toxicol Pathol* 2001;53:257-65.
 18. **Schwander SK, Sada E, Torres M, Escobedo D, Sierra SG, Ait S, Rich FA.** T lymphocytic and immature macrophage alveolitis in active pulmonary tuberculosis. *J Infect Dis* 1996;173:1267-1272.
 19. **Pedrosa J, Saunders B, Appelberg R, Orme I, Silva M, Cooper A.** Neutrophils play a protective nonphagocytic role in systemic *Mycobacterium tuberculosis* infection of mice. *Infect Immun* 2000;68:577-583.
 20. **Appelberg R, Castro A, Gomes S, Pedroza J, Silva MT.** Susceptibility of beige mice to *Mycobacterium avium*, role of neutrophils. *Infect Immun* 1995; 63:3381-3387.
 21. **Petrofsky M, Bermudez L.** Neutrophils from *Mycobacterium avium* infected mice produce TNF alpha, IL-12 and IL-1 and have a putative role in early host response. *Clin Immunol* 1999;91:354-358.
 22. **Riedel DD, Kauffman S.** Chemokine secretion by human polymorphonuclear granulocytes after stimulation with *Mycobacterium tuberculosis* and lipoarabinomannan. *Infect Immun* 1997;65:4620-4623.