



Universidad de León

Departamento de Biología Molecular

**“Comportamiento biológico de fagocitos
frente a micobacterias.
Producción de quimiocinas”**

Carolina González Cortés

2011

Octavio Miguel Rivero Lezcano, doctor en Veterinaria y contratado por el Instituto de Estudios de Ciencias de la Salud de Castilla y León, hace constar,

Que la licenciada en Biología Carolina González Cortés ha realizado en la Unidad de Investigación del Complejo Asistencial Universitario de León, y bajo su dirección, la memoria de doctorado titulada:

“Comportamiento biológico de fagocitos frente a micobacterias. Producción de quimiocinas”,

considerando que reúne las condiciones necesarias para optar al grado de Doctor en Biología por la Universidad de León

Fdo: Octavio Miguel Rivero Lezcano

Las investigaciones realizadas en esta Memoria de Tesis Doctoral han sido financiadas por el Fondo de Investigación Sanitaria [PI05/1288], por la Junta de Castilla y León [LE07/04] y Fondo Caja Burgos a la Investigación Clínica.

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento

Al director de esta Tesis Doctoral, el Dr. Octavio Miguel Rivero Lezcano, por tener siempre una respuesta a mis múltiples y continuadas preguntas, por su ejemplo de disciplina y su eterno optimismo. Gracias por ponérmelo siempre fácil, por todo lo que me has enseñado y por el tiempo y esfuerzo que me has dedicado.

A la Dra. Cristina Diez Tascón, por haberme mostrado otro camino y por su corrección crítica y minuciosa de este manuscrito.

Al personal de extracciones por su ayuda desinteresada en la toma de muestras sanguíneas.

A mi familia, por su apoyo incondicional, por enseñarme que la perseverancia y el esfuerzo son el camino para lograr objetivos. Gracias a mi padre por sus consejos, a mi madre por su infinita paciencia, a mis hermanos, Nacho y Enano, por su gran ironía, y en especial a mi hermana Pili, no solo por su ayuda “técnica”, sino porque aunque en muchas ocasiones la saque de sus casillas siempre está cuando la necesito.

Al resto de familiares, directos e indirectos, por su interés, preocupación y apoyo.

A mis amigos por su simple y sincera pregunta “¿cómo lo llevas?”. Gracias por esas conversaciones interminables tomándonos una cervecita.

A Dani, la persona que sin duda más ha aguantado mis malos momentos. Gracias por ser como eres, por no decirme lo que quiero oír y por retarme en cada paso de nuestro camino. Gracias por enseñarme que no hay límites, que lo que me proponga lo puedo conseguir y solo depende de mí.

GRACIAS

A todos los que siempre estan ahi

Índice

Revisión Bibliográfica

IMPORTANCIA DE LA TUBERCULOSIS	1
CLASIFICACIÓN DE LAS MICOBACTERIAS.....	3
Complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	3
Micobacterias no tuberculosas, atípicas u oportunistas	4
<i>Legionella pneumophila</i>: MODELO COMPARATIVO CON <i>M. tuberculosis</i>	5
VIRULENCIA EN MICOBACTERIAS	5
PATOGENESIS Y CLÍNICA DE LA TUBERCULOSIS	6
Patogénesis y desarrollo de la enfermedad.....	6
Tratamiento	8
RESPUESTA INMUNOLÓGICA FRENTE A LA TUBERCULOSIS.....	9
RESPUESTA INMUNOLÓGICA INNATA	9
Neutrófilos.....	10
Monocitos y macrófagos alveolares	11
Células epiteliales.....	14
Células NK.....	14
Células dendríticas	14
RESPUESTA INMUNOLÓGICA ADAPTATIVA	15
Formación del granuloma tuberculoso	17
MECANISMOS ANTIMICROBIANOS.....	18
Producción de especies reactivas del oxígeno. NADPH oxidasa	18
Apoptosis.....	20
CITOCINAS Y QUIMIOCINAS EN TUBERCULOSIS.....	23
CITOCINAS	23
Interferón gamma (IFN γ)	23
Factor de necrosis tumoral alfa (TNF α)	24
Otras citocinas	25
QUIMIOCINAS	26
CCL20	26
CXCL7	28

Planteamiento y Objetivos.....	33
---------------------------------------	-----------

Material y Métodos

MATERIAL

CEPAS BACTERIANAS	35
PLÁSMIDOS	36
LÍNEAS CELULARES	37
REACTIVOS	37
PROGRAMAS INFORMÁTICOS.....	38

METODOLOGÍA

PURIFICACIÓN DE FAGOCITOS.....	39
Purificación de neutrófilos	39
Purificación de monocitos	41
INDIVIDUALIZACIÓN DE MICOBACTERIAS.....	42
INFECCIÓN CELULAR	43
Infección para determinar actividad antimicrobiana	43
FAGOCITOSIS.....	44
Tinción kinyoun	44
Tinción bacteriana con FITC	45
PCR CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL (qPCR)	46
ELISA	48
QUIMIOTAXIS	49
MEDICIÓN ANIÓN SUPERÓXIDO MEDIANTE LUMINOL	50
APOPTOSIS	50
Casase-Glo 3/7 Assay	50
Frag EL TM DNA Fragmentation Detection Kit, Fluorescent-TdT Enzyme	51
ESTUDIO PROMOTOR DE PPBP.....	52
CLONACIÓN PPBP	52
EXPRESIÓN DE VARIANTES DE PPBP	53
WESTERN BLOT.....	54
ADHESIÓN CELULAR.....	55

Resultados

CARACTERIZACIÓN DEL COMPORTAMIENTO BIOLÓGICO DE NEUTRÓFILOS EN TUBERCULOSIS	57
Influencia de la densidad de neutrófilos en la actividad antimicobacteriana.....	57
Influencia de la producción de ROS en la actividad antimicobacteriana de neutrófilos	60
Expresión de las subunidades de la NADPH oxidasa	61
Apoptosis en neutrófilos infectados con micobacterias.....	62
PRODUCCIÓN E INFLUENCIA DE QUIMIOCINAS EN FAGOCITOS INFECTADOS CON MICOBACTERIAS Y <i>L. pneumophila</i>.....	65
CXCL7	66
Expresión génica de <i>CXCL7</i> en MDM infectados con <i>M. tuberculosis</i> y <i>L. pneumophila</i>	66
Expresión proteica de <i>CXCL7</i> en MDM.....	66
Expresión génica y proteica de <i>CXCL7</i> en neutrófilos. Ausencia de polimorfismos en el promotor proximal	67
Producción de las diferentes variantes de <i>CXCL7</i> en fagocitos y K562	68
Quimiotaxis mediada por <i>CXCL7</i>	70
Influencia de NAP-2 en la actividad antimicrobiana de MDM y neutrófilos.....	72
Actividad antimicrobiana de NAP-2 en células U937.....	73
Adherencia de U937 transfectadas con NAP-2	75
CCL20	76
Expresión génica de <i>CCL20</i> en MDM infectados con <i>M. tuberculosis</i> y micobacterias no tuberculosas.....	76
Expresión proteica de <i>CCL20</i>	76
Quimiotaxis de DC mediada por <i>CCL20</i>	78
Actividad antimicrobiana de <i>CCL20</i> en MDM y DC.....	80
Producción de ROS en monocitos infectados con <i>M. tuberculosis</i> y activados con <i>CCL20</i> .	
Influencia de los linfocitos.	81
Influencia de <i>CCL20</i> en la apoptosis mediada por <i>M. tuberculosis</i>	83

Discusión

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA	85
EXPLOSIÓN OXIDATIVA. RELACIÓN CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA	90
APOPTOSIS. RELACIÓN CON ROS Y ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA.....	92
PRODUCCIÓN DE LAS DIFERENTES VARIANTES DE CXCL7 EN FAGOCITOS Y CÉLULAS K562.....	95
ADHERENCIA DE CÉLULAS U937 TRANSFECTADAS CON NAP-2	97

Conclusiones.....	99
Resumen/Summary.....	101
Bibliografía.....	103
Índice de tablas.....	131
Índice de figuras.....	133
Abreviaturas.....	135
Publicaciones.....	137

Revisión Bibliográfica

IMPORTANCIA DE LA TUBERCULOSIS

Consumición, tisis, peste blanca... de todos estas formas se ha conocido a la tuberculosis a través de su historia. Existen evidencias de su presencia en la humanidad que datan del 2400 a. C. En los siglos XVII y XVIII la tuberculosis fue la responsable de una cuarta parte de las muertes de adultos en Europa. Con la revolución industrial se convirtió en un grave problema, debido al hacinamiento, la pobreza, las jornadas de trabajo excesivamente largas, las deficientes condiciones de humedad y ventilación de las viviendas, muy propicias para la propagación de gérmenes [1]. Pero no se conoció el agente causante de esta enfermedad hasta que lo descubrió Robert Koch en 1882 quien, además, fabricó la primera tuberculina (extracto purificado de medio de cultivo del bacilo de la tuberculosis), que posteriormente sería utilizada con fines diagnósticos. El seguimiento y diagnóstico de la enfermedad fue posible a partir de 1895 con el descubrimiento de los rayos X por Wilhelm Konrad von Rontgen. El medio de transmisión por vía aerógena, lo describió Flüge a finales del siglo XIX [2]. Sin embargo, el establecimiento de sanatorios especializados junto con la mejora progresiva de las condiciones de vida, determinaron que los casos comiencen a disminuir muchos años antes de que aparecieran los primeros fármacos.

La estreptomycinina fue el primer antibiótico eficaz frente a esta enfermedad, pero en 1952 se desarrolló un nuevo agente antimicrobiano, la isoniazida, que hizo posible que la tuberculosis se convirtiera en una enfermedad curable [3]. En los años sesenta, la rifampicina consiguió que los regímenes terapéuticos se acortaran de forma significativa. De este modo, se produjo un descenso progresivo de casos hasta mediados de los ochenta, en los que la aparición del sida, la inmigración desde países donde la

enfermedad era muy prevalente, junto con la escasez de recursos sanitarios, hicieron de la tuberculosis un problema creciente, con la adquisición y propagación epidémica de nuevos casos [4]. La situación se agrava cuando aparecen y se diseminan cepas resistentes por incumplimiento de los tratamientos con antibióticos [5].

En la actualidad, la tuberculosis sigue siendo la enfermedad infecciosa de origen bacteriano que más muertes causa en el mundo, siendo Asia, África y parte de América del Sur, las zonas de mayor incidencia (Figura 1). La organización mundial de la salud (OMS) ha publicado en su informe del 2010 que en el 2009 hubo 9,4 millones de nuevos casos de tuberculosis, de los cuales el 11-13% eran positivos para el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV), y murieron 1,7 millones de enfermos observándose que, aunque de forma muy lenta, la incidencia de la tuberculosis en todo el mundo está comenzando a disminuir. Lo que actualmente preocupa es el aumento del número de pacientes diagnosticados con tuberculosis multirresistente, siendo en el 2010 casi el doble que en el año anterior [6]. España es, después de Portugal, el país de la Unión Europea con la incidencia más elevada. Ceuta, Galicia y Cataluña presentan las tasas de incidencia más elevadas [4]. En Castilla y León, León es la provincia con mayor número de casos totales de tuberculosis y la incidencia ha ido aumentando desde el 2005, con una tasa del 18,73 a 20,91 en el 2007 [7].

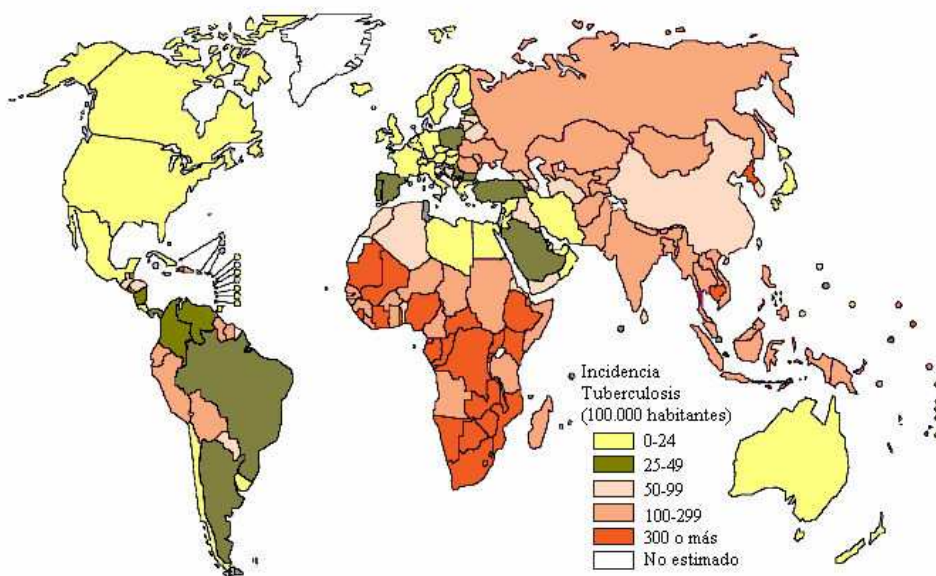


Figura 1: Incidencia de tuberculosis a nivel mundial en el año 2007 [6]

CLASIFICACIÓN DE LAS MICOBACTERIAS

Se conocen más de 50 especies de micobacterias, de las cuales casi la mitad han sido aisladas en procesos infecciosos humanos. Las micobacterias son microorganismos ampliamente distribuidos (tierra, agua, alimentos) con excepción de algunas especies como *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) y *M. leprae* que son patógenos obligados. Desde el punto de vista clínico se agrupan las micobacterias en dos grupos:

Complejo *Mycobacterium tuberculosis*

M. tuberculosis es el agente principal causante de la tuberculosis pulmonar humana. Se trata de un bacilo, de extremos redondeados cuyo tamaño oscila entre 0,2-0,6 μm , aerobio, no móvil, parásito estricto, de crecimiento lento, de multiplicación y virulencia variable. Su temperatura óptima de crecimiento es de 37° C. Es ácido alcohol resistente y Gram-positivo. Se puede observar al microscopio mediante las tinciones de Ziehl-Neelsen, Kinyoun o auramina-rodamina. La clasificación científica es la siguiente: Reino: Bacteria, Filo: Actinobacteria, Clase: Actinobacteria, Orden: Actinomycetales, Familia: Mycobacteriaceae, Género: Mycobacterium, Especie: *Mycobacterium tuberculosis*.

El complejo *M. tuberculosis* comprende además otras bacterias patógenas que genéticamente comparten más de un 99 % de la secuencia nucleotídica total, siendo idéntica la del RNA ribosómico 16S [8; 9]. Los distintos miembros se diferencian en el rango de huéspedes que infectan, en su epidemiología, fenotipo y en su presentación clínica en humanos. Dentro del complejo *M. tuberculosis*, *M. canettii* es el miembro más ancestral; *M. caprae* produce una rara enfermedad en el ganado, además de una tuberculosis zoonótica en humanos. *M. bovis* es la bacteria causante de la tuberculosis bovina. *M. bovis* (Bacilo Calmette-Guérin; BCG) es una cepa de laboratorio atenuada usada en vacunación. *M. microti* es causante de la tuberculosis en roedores de campo, y también se ha aislado de humanos. Por último, *M. africanum* es una micobacteria que se subdivide en dos tipos, el tipo I, que se considera epidémico en el Este de África y el tipo II, en el Oeste de África [10].

Micobacterias no tuberculosas, atípicas u oportunistas

El número de especies de micobacterias no tuberculosas conocidas está aumentando [11; 12]. Hasta hace unas décadas, cuando la prevalencia de la tuberculosis disminuyó con la introducción de la antibioterapia, no se les había dado mucha importancia por ser bacterias ambientales. Sin embargo, producen un gran variedad de enfermedades, como, infecciones articulares (*M. avium*, *M. intracellulare*), de la piel (*M. marinum*) infecciones nosocomiales (*M. fortuitum*, *M. chelonae*) o infecciones pulmonares (*M. avium*, *M. kansasii*) [13; 14]. Los síntomas clínicos son algo diferentes dependiendo de cual sea la especie de micobacterias no tuberculosa infectante. Su detección es difícil y a veces no se diagnostican porque no producen manifestaciones clínicas específicas. Los tratamientos son variables en tiempo y agentes antimicrobianos en función de la especie aislada [12; 14].

M. gordonae es una micobacteria saprofita, de crecimiento lento. Habitualmente está presente en la tierra y el agua, así como en el medio hospitalario, donde se han documentado aislamientos en aguas de abastecimiento, máquinas de hielo y broncoscopios. Sin embargo, a pesar de su amplia distribución en el medio ambiente, pocos son los casos clínicos atribuibles a esta bacteria por lo que parece razonable asumir que tiene baja patogenicidad. Las infecciones descritas que se relacionan con *M. gordonae*, son de pulmón y, con menor frecuencia, de otros órganos [15].

M. avium es un bacilo ácido alcohol resistente, no pigmentado y de crecimiento lento, distribuido por todo el mundo. *M. avium* es la micobacteria aislada con más frecuencia en pacientes inmunodeprimidos o con HIV, en los que produce micobacteriosis pulmonar. [13; 14].

M. kansasii es una micobacteria de crecimiento lento, fotocromogénica y es, después de *M. avium*, la micobacteria más frecuentemente causante de enfermedad pulmonar en pacientes inmunocompetentes. Ambas especies de micobacterias son detectadas con elevada frecuencia en personas de avanzada edad [13; 14].

Legionella pneumophila*: MODELO COMPARATIVO CON *M. tuberculosis

Legionella pneumophila (*L. pneumophila*) es un cocobacilo, Gram- negativo, aerobio estricto, ubicuo, oportunista y de crecimiento rápido. Su temperatura de crecimiento óptima es 37° C. Su hábitat habitual se encuentra en ambientes acuáticos. Sobrevive a la cloración de las aguas y puede producir enfermedad nosocomial por microaspiración de agua contaminada. Presenta dos formas clínicas: la caracterizada por neumonía con enfermedad grave multisistémica y la semejante a una gripe habitual.

L. pneumophila es un modelo conveniente en el estudio de patógenos intracelulares por varias razones. Por un lado, se trata de una bacteria de crecimiento intracelular que infecta preferiblemente monocitos y macrófagos alveolares [16; 17], principalmente mediante los receptores de complemento [18], aunque también infecta células polimorfonucleares, células epiteliales y células no fagocíticas [19; 20]. Por otro lado, y a diferencia de *M. tuberculosis*, en 72 horas de cultivo se observan colonias [21]. Finalmente, monocitos/macrófagos activados con INF γ son capaces de matar a *L. pneumophila* [22; 23; 24] pero no a *M. tuberculosis*.

VIRULENCIA EN MICOBACTERIAS

La patogenicidad de las micobacterias es multifactorial y depende de su capacidad para colonizar las superficies mucosas, penetrar, multiplicarse y dañar las células y tejidos del huésped, así como de su capacidad de interferir en los mecanismos de defensa del hospedador. La pared celular, por ejemplo, protege a las micobacterias de las enzimas fagolisosomales de la célula huésped, siendo a su vez una verdadera coraza lipídica difícilmente atravesable por la mayoría de los agentes antimicrobianos, lo que permite su permanencia dentro de las células infectadas en estado latente durante largos periodos de tiempo [25]. Además, son capaces de influir en la maduración del lisosoma mediante la liberación de derivados sulfatados [26] o mediante la retención de la proteína de cubierta que contiene aspartato y triptófano (TACO) evadiéndose de los

mecanismos antimicrobianos de los fagolisosomas. Las micobacterias alteran la actividad de la bomba de protones [27] e inhiben el incremento de calcio citosólico [28] impidiendo la acidificación del fagosoma micobacteriano, condición que parece necesaria en la lucha frente a *M. tuberculosis*. A su vez, si la fusión entre fagosoma y lisosoma tiene lugar, las micobacterias liberan gran cantidad de amonio y alcalinizan el contenido intralisosomal, inactivando enzimas hidrolíticas [29].

La virulencia también está relacionada con las características de las colonias. Por ejemplo, las cepas con colonias lisas y transparentes de *M. avium*, crecen con mayor rapidez, inducen un patrón distinto de expresión de citocinas en macrófagos, con menores niveles del factor tumoral de necrosis alfa (TNF α) que sus isotipos menos virulentas de colonias lisas, no transparentes [30]. Además, estudios en animales han correlacionado la cepa rugosa de *M. avium* con mayor mortalidad y capacidad de multiplicación [31]. Las variantes lisas de otras micobacterias no tuberculosas como *M. abscessus* son menos virulentas que las rugosas. Una de las razones por la que se podría explicar esta característica sería por poseer una mayor cantidad de determinados glucolípidos en su superficie que hacen que la infección sea menos invasiva [32]. A su vez, una cepa rugosa de *M. kansasii*, es más virulenta que la cepa lisa correspondiente en modelo de ratón [33].

PATOGÉNESIS Y CLÍNICA DE LA TUBERCULOSIS

Patogénesis y desarrollo de la enfermedad

La tuberculosis pulmonar, la forma más común de tuberculosis, se adquiere principalmente por vía aérea. El microorganismo entra a través del tracto respiratorio en pequeñas gotas procedentes de pacientes con tuberculosis pulmonar infecciosa que contienen unos pocos bacilos tuberculosos (núcleos goticulares de Wells). Una vez en los alvéolos, *M. tuberculosis* es fagocitada por los macrófagos alveolares. Si eliminan o inhiben el crecimiento bacteriano, la respuesta cutánea al derivado proteico purificado

del cultivo de *M. tuberculosis* (prueba clínica conocida como Mantoux), es negativa. Esta prueba se realiza con antígenos que son reconocidos por las células del sistema inmune que hayan estado en contacto con la bacteria [34], resultando positiva si se forma una pápula mayor de 5 mm de diámetro. Las consecuencias de esta etapa dependen de la capacidad antimicrobiana de la célula huésped y de la virulencia de la micobacteria [35].

La tuberculosis primaria, observada con más frecuencia en niños y en adultos jóvenes nunca expuestos a esta bacteria, se presenta de forma asintomática o como una infección latente. En un 5-10 % de la población infectada, la bacteria no eliminada comienza a multiplicarse en los macrófagos y los bacilos que son liberados son fagocitados por nuevos macrófagos alveolares. Monocitos, neutrófilos y otras células del sistema inmune son atraídas al foco de infección, desarrollándose la inmunidad mediada por linfocitos T y liberándose interferón gamma (IFN γ). Esta citocina activa al macrófago para destruir las bacterias [36]. En los alvéolos pulmonares se desarrolla el granuloma tuberculoso que tiene tendencia a producir una necrosis central (caseosis) y calcificación. En este punto, se desarrolla la enfermedad o la bacteria puede dejar de multiplicarse exponencialmente, entrar en estado de latencia y permanecer de ese modo durante meses, años e incluso no volver a activarse nunca [35; 36].

Por otro lado, también puede tener lugar la tuberculosis secundaria o post-primaria, la cual es debida a la reactivación endógena de una infección tuberculosa latente. En ambos casos, tanto en la tuberculosis primaria como en la secundaria, si el crecimiento bacteriano no se controla, se puede extender a otras partes del pulmón, produciéndose la formación de nuevos granulomas, fibrosis y calcificación del pulmón o bien producir una diseminación bacilar vía linfática o hemática a todo el organismo (tuberculosis miliar). Como resultado, se producen lesiones tuberculosas en diversos órganos como el cerebro, las meninges, los huesos, el hígado, el riñón, el abdomen, la piel y el tracto urogenital [37]. En todos estos casos el Mantoux es positivo. El resultado final de la infección por *M. tuberculosis* dependerá del balance entre la respuesta del hospedador y de la bacteria, así como de la extensión de la necrosis, la fibrosis y la regeneración tisular [25].

Tratamiento

El tratamiento de la tuberculosis se basa en conceptos muy distintos a las demás infecciones bacterianas. Los fármacos antituberculosos presentan un perfil de actividad diferenciado en función de la localización del bacilo (en los tejidos, en el interior de los macrófagos, en las cavidades pulmonares, en el pus o en el material acuoso). El tratamiento estándar empleado es una combinación de los fármacos de primera línea (isoniazida, rifampicina, pirazinamida y etambutol) prescritos normalmente durante dos meses seguido por cuatro meses con isoniazida y rifampicina. La estreptomina suele administrarse en los casos en los que alguno de los fármacos nombrados anteriormente no pueda ser empleado. Los fármacos de segunda línea (ácido paraaminosalicílico, kanamicina, cicloserina, rifamicinas, cicloserina y etionamida, entre otros) se emplean cuando existen efectos secundarios producidos por los fármacos de primera línea o en tuberculosis resistentes. La curación es superior al 95 %, sin embargo el mal uso y la falta de adherencia al tratamiento por parte de los pacientes ha contribuido a la aparición de cepas multiresistentes y, más recientemente, de cepas extremadamente resistentes. Estas resistencias surgen como consecuencia de mutaciones en los genes implicados en la síntesis de los blancos sobre los que actúan los fármacos [38; 39]. La elección de cada tratamiento, el uso de unos fármacos u otros, así como su duración, va a depender de varios factores como son la edad, el historial clínico, la toxicidad que producen y si se trata de una infección primaria o secundaria o si es un paciente positivo para el HIV [40].

RESPUESTA INMUNOLÓGICA FRENTE A LA TUBERCULOSIS

La capacidad de respuesta inmunitaria de cada individuo a la infección por *M. tuberculosis* es muy distinta y, aunque resulta difícil de probar, tradicionalmente se ha sospechado que algunos individuos son resistentes a la infección [41]. Esta observación podría reflejar la importancia del balance que se establece después de la infección entre el huésped y el patógeno, y que influirá en gran medida, el curso de la enfermedad [42].

Los eventos inmunitarios que tienen lugar durante la tuberculosis se pueden describir de la siguiente forma: a) penetración del bacilo tuberculoso y anidamiento del mismo en los alvéolos; b) fagocitosis del bacilo por los macrófagos alveolares; c) fusión del fagosoma- lisosoma; d) reacción de defensa de macrófagos alveolares y neutrófilos, que es de tipo inespecífico (inmunidad innata); e) desarrollo de la inmunidad adaptativa; f) formación del granuloma [43].

RESPUESTA INMUNOLÓGICA INNATA

Cuando el bacilo de Koch es inhalado, y ha atravesado las primeras barreras naturales (piel y mucosas), y consigue llegar al espacio pulmonar, comienza a desarrollarse la respuesta inmunitaria innata. El arsenal celular innato del organismo frente a agentes externos se compone de monocitos/macrófagos, neutrófilos, células asesinas naturales (NK) y células dendríticas (DC). Su función es eliminar completamente a la micobacteria, pero en los casos en los que la inmunidad innata no es suficiente terminará desarrollándose la respuesta adaptativa [29].

Neutrófilos

Las investigaciones en la inmunidad frente a tuberculosis se han centrado en macrófagos alveolares o en macrófagos derivados de monocitos (MDM). No hay un consenso general acerca de la capacidad de estas células para eliminar *M. tuberculosis*, sugiriendo que otros tipos celulares presentes en el sitio de infección, juegan un papel relevante en la resistencia innata. La importancia de los neutrófilos como primera línea de defensa está ampliamente aceptada [44; 45], pero su papel en la respuesta frente a tuberculosis continua siendo poco conocida y muy controvertida. Los neutrófilos son glóbulos blancos de tipo granulocito, siendo el tipo de leucocito más abundante en sangre. Parece que la concentración base de neutrófilos en sangre es importante en los primeros estadios frente a tuberculosis. Estudios *in vitro* han determinado que hay un punto crítico de concentración de neutrófilos para una eficaz eliminación de otras bacterias como *Escherichia coli* o *Staphylococcus aureus*, independientemente del número de bacterias por célula [46]. Se ha sugerido que la concentración de neutrófilos modula algunos de sus aspectos estructurales y funcionales [47].

Los neutrófilos son fagocitos profesionales equipados con un amplio rango de receptores que reconocen bacterias, las fagocitan y las engloban en la vacuola denominada fagosoma. La mayoría de las bacterias son eliminadas por el amplio arsenal de moléculas antimicrobianas contenidas en los gránulos de los neutrófilos cuando se produce la fusión de fagosoma con el lisosoma [48; 49]; sin embargo, parece que las micobacterias inhiben la fusión de los gránulos azurófilos con el fagosoma como mecanismo de defensa frente al neutrófilo [50]. Por otro lado, Pedrosa et al. sugieren que el papel protector de los neutrófilos en infecciones por tuberculosis no implica fagocitosis del bacilo sino que tal vez está participando en la producción de radicales intermediarios del nitrógeno (RNI) liberados por los neutrófilos cuando son infectados, o en la liberación de citocinas como el IFN γ [51]. De hecho, los neutrófilos secretan numerosas citocinas y quimiocinas en respuesta a las micobacterias [52; 53; 54; 55] atrayendo otras células tanto de la inmunidad innata como adaptativa constituyendo un línea de defensa frente al bacilo tuberculoso cuya actividad tendrá que ser muy precisa en tiempo y lugar.

Los resultados de los estudios *in vivo* en modelo de ratón presentan una visión contradictoria sobre la importancia de los neutrófilos en la inmunidad frente a la tuberculosis. Algunos autores muestran que la eliminación total de neutrófilos en estadios tardíos de la infección no tiene un efecto cuantitativo en el crecimiento de micobacterias, pero su ausencia en los estadios iniciales representa una defensa insuficiente frente al crecimiento micobacteriano [51; 56; 57]. Sin embargo, otro estudio sugiere que la eliminación de los neutrófilos anterior a la infección no influye en la multiplicación micobacteriana [58]; incluso se ha apuntado que los neutrófilos podrían contribuir más a la enfermedad que a la protección [59].

Pocos son los estudios *in vitro* relacionados con la actividad antimicobacteriana directa o indirecta de los neutrófilos, siendo los resultados variables y controvertidos. Algunos autores han observado en el modelo humano que los neutrófilos activados con citocinas y otras moléculas como el calcio, el forbol 12-miristato 13-acetato (PMA), leucotrienos o defensinas son capaces de eliminar micobacterias como *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. fortuitum* o *M. bovis* [60; 61; 62; 63; 64; 65]. Resultados similares se han obtenido en el modelo de ratón [57; 66]. Sin embargo, otros autores, empleando las mismas condiciones no han corroborado dichos resultados [58; 59; 67; 68; 69; 70].

Durante muchos años, se ha asumido que la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) esta asociada a la actividad antimicrobiana de los neutrófilos. La evidencia mas convincente que sostiene esta idea es que los individuos con la enfermedad granulomatosa crónica, en los cuales la actividad de la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa (NADPH oxidasa) es defectuosa, son mas propensos a infecciones bacterianas [71]. Sin embargo, aquellos autores que han observado actividad de los neutrófilos frente a las micobacterias, no han encontrado relación con la explosión oxidativa [63; 65; 72].

Monocitos y macrófagos alveolares

Los macrófagos son células mononucleares que juegan un doble papel en la respuesta inmune del hospedador. Por un lado son las primeras células en fagocitar

agentes extraños y, por otro lado, actúan como células accesorias importantes en la respuesta inmune adaptativa, siendo su activación y regulación muy compleja [73; 74]. Su participación en la respuesta inmune incluye la fagocitosis del microorganismo, la presentación de antígenos, la producción de citocinas y quimiocinas y otras actividades biológicas como la quimiotaxis, la producción de ROS y RNI [43; 75], la liberación de enzimas lisosomales en los fagosomas, la producción de moléculas tóxicas, la limitación de la disponibilidad de hierro para la micobacteria, la apoptosis [76] o la fagocitosis de neutrófilos apoptóticos con adquisición de sus gránulos [77] que ayudaran a estas células a combatir bacterias como *M. tuberculosis*.

M. tuberculosis es fagocitada por monocitos/macrófagos mediante el reconocimiento de ligandos antimicobacterianos por múltiples receptores de membrana, como son los de complemento, de manosa, de proteína surfactante A, CD14, receptores “scavenger” y receptores Fcγ. Estudios de bloqueo de los distintos receptores de la célula huésped muestran que, aunque se bloquee un receptor, la micobacteria entra igualmente a través de un receptor distinto, demostrando el gran desarrollo y evolución que ha experimentado la micobacteria [78]. El fagolisosoma es el orgánulo principal para la eliminación de patógenos. Sin embargo, algunos de ellos consiguen eludir su actividad. Por ejemplo, *M. marinum* escapa de su acción lisando la membrana fagosomal y estableciéndose en el citosol. *M. tuberculosis*, por su parte, bloquea el funcionamiento del fagolisosoma impidiendo su maduración y evadiendo las respuestas inmunitarias oxidativas [79; 80]. Por otro lado, la unión del fagosoma con el lisosoma es un proceso dependiente del calcio tanto en neutrófilos como en macrófagos. *M. tuberculosis* inhibe, en macrófagos, el flujo del calcio [81], bloqueando las señales iniciales para la maduración del fagosoma a fagolisosoma [82; 83].

Al igual que en neutrófilos, los resultados obtenidos en relación a la actividad antimicobacteriana *in vitro* de los monocitos/macrófagos son muy debatidos. La razón de esta controversia puede atribuirse a la diferencia en los modelos de cultivo e infección, así como a la variedad de cepas empleadas [22; 69; 84; 85; 86; 87; 88]. Se ha obtenido actividad bacteriostática y bactericida de los macrófagos frente a *M. tuberculosis* y otras especies de micobacterias mediante su activación con citocinas

como IFN γ y/o TNF α [88; 89; 90; 91; 92; 93]. De este modo, se ha observado esta actividad en macrófagos humanos activados con IFN γ en cocultivo con linfocitos [94], activados con TNF α frente a *M. avium* [95], o activados con factor estimulante de colonias de granulocitos/macrófagos (GM-CSF) frente a *M. tuberculosis* [96]. Además, Flesch et al. han obtenido actividad antimicrobiana de macrófagos activados con IFN γ frente a BCG y la cepa H37Rv de *M. tuberculosis* [97]. Por otro lado, empleando una combinación de IFN γ con calcitriol, Denis et al. han apreciado una disminución de la multiplicación de este bacilo [98]. Por último, se han estudiado moléculas como la lipoproteína 19-KD de *M. tuberculosis* [99], el adenosin trifosfato [100], la esfingosina-1 fosfato [101], la vitamina D3 [102] o la fosfolipasa D [103], observándose muerte de micobacterias como *M. tuberculosis* o *M. smegmatis*, en modelo de ratón o humano. No han sido definitivamente determinados los mecanismos por los que se obtiene esta actividad antimicrobiana, si bien destaca la producción de RNI, cuya influencia ha sido demostrado mediante estudios en ratones knock-out para el gen óxido nítrico sintasa (iNOS) [104]. Sin embargo en el modelo humano las evidencias obtenidas son muy discutidas [27; 105; 106].

Estos resultados no han sido reproducidos por otros autores, que han observado que los macrófagos humanos, aunque sean activados con IFN γ , no previenen la multiplicación de *M. tuberculosis* [22; 102; 107]. De hecho, en un estudio se ha descrito el efecto contrario, que monocitos humanos estimulados con TNF α promueven la multiplicación de *M. tuberculosis* [108]. Además, experimentos realizados con la cepa BCG de *M. bovis* mostraron que ni factores estimulantes de colonias ni ninguna citocina analizada, desde la interleucina-1 (IL-1) hasta la IL-15, con la excepción de la IL-3 y el GM-CSF, podían inducir actividad antimicrobiana de los macrófagos humanos frente a esta micobacteria [109]. Estudios realizados incluso con micobacterias no patógenas como *M. phlei*, muestran ausencia de esta actividad [110]. La experiencia obtenida en nuestro grupo concuerda con aquellos estudios en los que se concluye que los monocitos/macrófagos humanos no son capaces de eliminar *M. tuberculosis* [69].

Células epiteliales

La capacidad de las micobacterias de unirse e invadir las células epiteliales ha sido estudiada por varios autores. En dichos estudios se ha observado la facultad de *M. avium* de penetrar en las células epiteliales intestinales y en células del epitelio laríngeo [111; 112]. Bermudez et al. demostraron que *M. tuberculosis* y *M. avium* invaden las células epiteliales alveolares A549, (pneumocitos tipo II), y que se replican intracitoplasmáticamente [113]. Estas células poseen receptores a los que se unen las micobacterias, como receptores tipo toll-like (TLR), lectinas de unión a manosa, CD14 y receptores del complemento entre otros. Se produce entonces la penetración de la bacteria en la célula, desencadenándose en esta una serie de eventos como la producción de citocinas, quimiocinas y péptidos antimicrobianos que favorecen el reclutamiento de neutrófilos, linfocitos y monocitos para la eliminación del agente [114; 115].

Células NK

Las células NK representan aproximadamente el 10 % de los linfocitos en sangre periférica. Se dividen en dos poblaciones: aquellas con función citotóxica y una segunda población con capacidad de producir abundantes citocinas como IFN γ , TNF α , IL-10 o GM-CSF, las cuales pueden inducir la activación de los monocitos [116]. El papel protector de las células NK frente a la tuberculosis no es bien conocido. *In vitro* se ha observado que las células NK pueden contribuir a la resistencia frente a las micobacterias mediante la inducción de apoptosis en monocitos infectados [117] o por la lisis directa de monocitos infectados con *M. avium complex* [118], BCG [119] o con *M. tuberculosis* tras activación con IL-12 [120]. Además, la IL-12 secretada por los macrófagos activa a las células NK para producir IFN γ y promover la respuesta “T helper” (Th1) [121].

Células dendríticas

Las DC son otro tipo celular que forma parte de la inmunidad innata siendo capaces de fagocitar patógenos como las micobacterias [122; 123]. Sin embargo, su principal función es la de presentar antígenos, actuando como vínculo entre la

inmunidad innata y la inmunidad adaptativa. Mientras son inmaduras, su función es la búsqueda de cuerpos extraños y cuando encuentran un antígeno válido, maduran y migran hacia órganos linfoides secundarios donde presentan el antígeno a los linfocitos T [124; 125; 126]. Esta diferenciación y maduración está provocada por factores como la fagocitosis de micobacterias o la presencia de péptidos antimicrobianos como la catelicidina LL-37 [127]. Algunos autores consideran a estas células capaces de contener el crecimiento intracelular de las micobacterias [123], aunque otros están en desacuerdo [128]. Las DC infectadas producen IL-12, activando a las células NK y a otras células, las cuales producen a su vez citocinas necesarias para enfrentarse a este microorganismo [128; 129].

RESPUESTA INMUNOLÓGICA ADAPTATIVA

La respuesta inmune adaptativa es específica y su desarrollo depende en gran medida de la eficiencia de la inmunidad innata. Las principales células involucradas en la respuesta inmune adaptativa celular frente a la tuberculosis son los linfocitos T, los cuales responden a las células presentadoras de antígeno (fundamentalmente macrófagos y DC). Se diferencian en células T de tipo CD4⁺ o “T helper” (Th) y CD8⁺ o “T citotóxicos” (Tc). La importancia de la respuesta de las células CD4⁺ queda muy bien reflejada en pacientes infectados por HIV, los cuales son muy susceptibles a la reactivación de la tuberculosis debido a la disminución del número de células CD4⁺ [27]. Los macrófagos que albergan a la micobacteria en su vacuola presentan los antígenos, vía complejo mayor de histocompatibilidad clase II (MHC-II), a las células T CD4⁺, las cuales pueden manifestar dos fenotipos (Th1 ó Th2) en función de las citocinas que produzcan [43].

Las células Th1, tras ser activadas por IL-12 producen citocinas como IFN γ (activadora de los macrófagos), TNF α (que activa el endotelio para inducir la unión de los macrófagos y su salida de los vasos sanguíneos al foco de infección), IL-12 (que induce la proliferación de las células T y aumenta el número de células efectoras) e IL-13 (que junto con GM-CSF induce la diferenciación de los macrófagos en la médula

ósea). Cuando esta respuesta es la que se genera en el organismo, la enfermedad progresa lentamente y por lo general el paciente sobrevive. Las células Th2, activadas por la IL-4, producen grandes cantidades de esta misma citocina, así como de IL-5 e IL-10 [27; 43; 130]. Si este es el fenotipo preferentemente inducido, la respuesta inmune es principalmente humoral y el paciente desarrolla la tuberculosis [131]. Por lo tanto, que la respuesta sea de tipo Th1 o Th2 determina si el organismo puede establecer una lucha efectiva contra la tuberculosis. A esta conclusión han llegado mediante estudios realizados en poblaciones de niños observándose una relación entre una defectuosa producción de IFN γ o de la IL-12 y su elevada susceptibilidad a la tuberculosis [132].

Las células CD8⁺, aunque consideradas de menor relevancia en el control de la tuberculosis, participan en la actividad antimicobacteriana mediante la producción de granulinsina, péptido antibacteriano eficaz frente a las micobacteria tanto intracelulares como extracelulares [133], así como mediante la lisis e inducción de apoptosis de las células infectadas, y mediante la producción de citocinas (IFN γ e IL-4), que desempeñan un papel en la regulación del equilibrio de las células Th1 y Th2 en los pacientes con tuberculosis pulmonar [134; 27; 43; 135]. Otros linfocitos, las células T γ/δ , parecen tener importancia en enfermos de tuberculosis latente, ya que su concentración es superior en aquellos pacientes con capacidad inmunológica protectora activa frente a la tuberculosis [43].

Hasta hace unas décadas, la participación de la respuesta inmune humoral no parecía jugar un papel protector frente a la tuberculosis, ya que se trata de una micobacteria intracelular y los componentes séricos no tienen acceso a ella [43]. A pesar de esto, la presencia de los linfocitos B en el granuloma tuberculoso y su influencia en la diferenciación, proliferación y supervivencia de las células T [136; 137] han hecho reconsiderar esta postura. Además células B activadas pueden producir una amplia gama de citocinas asociadas tanto a la respuesta Th1 como Th2 [138].

Formación del granuloma tuberculoso

La enfermedad tuberculosa crónica es controlada por la formación de granulomas tuberculosos, estructuras protectoras que impiden a la micobacteria extenderse, localizan la inflamación y disminuyen el daño tisular. Su formación se inicia con la infección de los macrófagos alveolares que, junto con los no infectados, constituyen el componente mayoritario de esta estructura. Los otros componentes son células gigantes multinucleadas, DC, células T ($CD4^+$, $CD8^+$, células $T\gamma\delta$), células B y fibroblastos [139; 140] (Figura 2). En los humanos, a diferencia de en los ratones, el granuloma posee un área central necrótica donde están presentes micobacterias extracelulares rodeadas de macrófagos y linfocitos. Alrededor de esta área se localizan unas estructuras parecidas a folículos linfoides que son ricas en células B, T y macrófagos [141]. Todas estas células van a tener su papel en el mantenimiento del granuloma y la contención de la bacteria. Una hipótesis sobre la actividad celular en el granuloma sugiere que los antígenos son presentados a las células T activándolas para producir citocinas y quimiocinas. El $IFN\gamma$ activa a los macrófagos y parece que limita la multiplicación de la bacteria vía producción de ROS y RNI [142]. La producción de $TNF\alpha$ es muy importante, ya que se trata de la citocina clave en la formación y el mantenimiento del granuloma. Otras citocinas como CXCL9 o CXCL10 son producidas durante este proceso interaccionando con el $TNF\alpha$ [143].

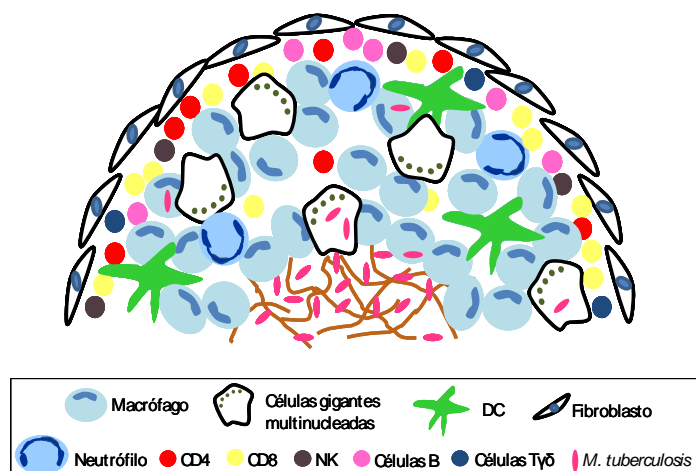


Figura 2: Granuloma tuberculoso humano

MECANISMOS ANTIMICROBIANOS

Las células poseen diferentes mecanismos con los que enfrentarse a los agentes externos. Entre ellos están la producción de ROS, RNI y péptidos antimicrobianos (catelicidina LL-37, defensinas, protegrinas y granulinas) [144; 145], así como la actividad de enzimas (como catepsina G, lisozima, lactoferrina), la restricción de acceso al hierro, imprescindible para el crecimiento micobacteriano [146; 147] y la producción de algunas citocinas y quimiocinas que juegan papel en la regulación de la respuesta inmune [148].

Dos de los mecanismos mas estudiados empleados por los fagocitos en su lucha frente a las micobacterias son la producción de ROS y la inducción de apoptosis mediada por el bacilo tuberculoso.

Producción de especies reactivas del oxígeno. NADPH oxidasa

La enzima NADPH oxidasa, está presente en los fagocitos y juega un papel crucial en la defensa del organismo mediante la producción de ROS. Es un complejo enzimático constituido por varias proteínas que se encuentran distribuidas entre el citoplasma (p40phox, p47phox, p67phox y dos proteínas G: Rac1 y Rac2) y la membrana plasmática del fagocito y de los gránulos específicos (p22phox y gp91phox) cuando la célula está en reposo. Las proteínas p22phox y gp91phox componen un heterodímero conocido como flavocitocromo b558. La separación de los componentes citosólicos y de membrana asegura que esta enzima se encuentra inactiva [149]. La activación de la NADPH oxidasa puede estar mediada por estímulos como N-formil-

metionina-leucina-fenilalanina, C5a, leucotrienos B4, quimiocinas, integrinas, PMA, zymosan o fagocitosis bacteriana [150]. Cuando la célula es así activada, la proteína p47phox es fosforilada e interacciona con p67phox. A continuación, el complejo es translocado a la membrana y se establece interacción entre p47phox y p22phox. La activación requiere de la participación de Rac1 y Rac2 [151; 152]. Como consecuencia, la enzima cataliza la producción del anión superóxido, el cual es convertido posteriormente en peróxido de hidrógeno, ácido hipoclorhídrico y otros productos microbicidas [153] (Figura 3).

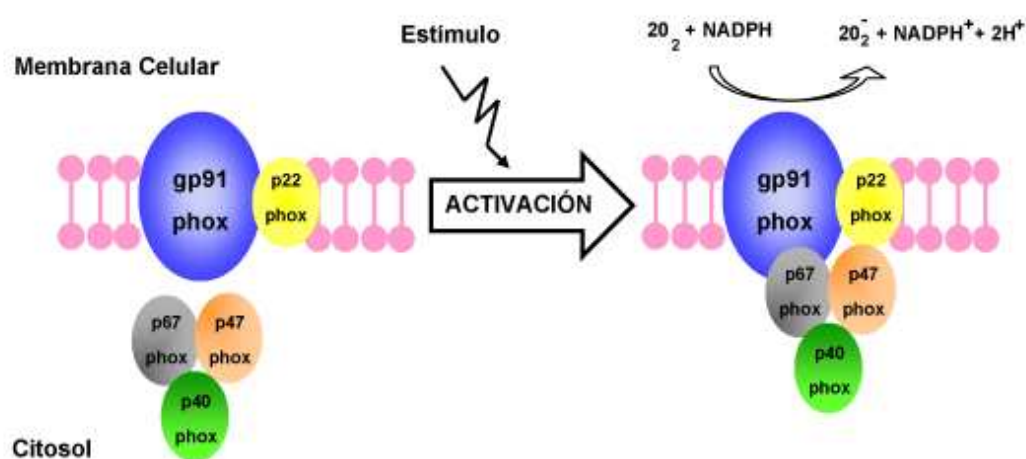


Figura 3: Activación del complejo enzimático de la NADPH oxidasa.

Se ha asumido por largo tiempo que la explosión oxidativa de los fagocitos está relacionada directamente con su capacidad antimicrobiana. La mejor evidencia que apoya esta idea son los síntomas clínicos presentados por pacientes con la enfermedad granulomatosa crónica [71] en los que la actividad de la NADPH oxidasa está dañada, razón por la cual son más propensos a infecciones bacterianas. En la actualidad, se está contemplando la hipótesis de que la función de la NADPH oxidasa es crear las condiciones apropiadas en las vacuolas y en el medio que rodea los fagocitos [152]. Por ejemplo, la producción de ROS puede repercutir en moléculas de señalización, como se

ha observado para factores de transcripción, proteínas tirosina kinasas o proteínas G pequeñas [154]. Además, la capacidad de bacterias como *M. tuberculosis* y de moléculas como IFN γ de influir en la expresión de los distintos componentes del complejo enzimático pueden ser reflejo de la actividad observada [155; 156]. Aunque en varios estudios se ha detectado una elevada producción de ROS en fagocitos infectados con *M. tuberculosis*, su asociación con la actividad antimicrobiana de dichas células es dudosa. [63; 67; 72; 80; 157].

Apoptosis

La apoptosis es el término con el que se designa a la muerte celular programada. Se trata de un fenómeno biológico fundamental, permanente, dinámico, interactivo y regulado genéticamente. [158]. La apoptosis se caracteriza por activación de las caspasas (enzimas proteolíticas), reducción del volumen celular, empaquetamiento del contenido citoplasmático, fragmentación nuclear, exposición del lípido fosfatidilserina en la cara externa de la membrana plasmática, y formación de cuerpos apoptóticos [159]. El proceso depende de factores externos a la célula o de factores internos, que determinan que la célula exprese metabólicamente su programa de muerte como consecuencia de un daño celular. [158].

En el mecanismo molecular que controla la apoptosis actúan varios agentes, de los cuales las caspasas son los mejor estudiados. Se han descrito 12 caspasas en humanos divididas en dos familias; caspasas inflamatorias (caspasas-1, -4, -5 y -12) y las caspasas de muerte celular, las cuales a su vez se dividen en iniciadoras (caspasa-2,-8, -9 y -10) y efectoras (caspasa-3, -6 y -7) del proceso catalítico, actuando sobre endonucleasas, las cuales son las responsables de la fragmentación del DNA. Las caspasas son sintetizadas como precursores inactivos, procaspasas, activadas por cambios conformacionales o cuando se unen con otras caspasas maduras. La apoptosis puede ser inducida, principalmente, por dos vías. En la vía extrínseca, participan los receptores de la proteína FAS y del TNF α . Cuando la proteína FAS enlaza con un factor denominado factor asociado al dominio de reconocimiento de muerte (FADD), las

caspasas -8 y -10 son activadas; cuando el receptor del TNF α se une a otras proteínas como la TNF receptor asociada al dominio de reconocimiento de muerte (TRADD), se activan caspasas -3, -6 y -7, iniciando en ambos casos la muerte celular. En la vía intrínseca, las proteínas de la familia Bcl-2 regulan la apoptosis produciendo un poro en la membrana de la mitocondria permitiendo liberar al espacio extracelular proteínas como por ejemplo la proteína SMAC/DIABLO o el citocromo c, el cual a su vez activa un complejo proteico llamado "apoptosoma", activando la caspasa-9, la cual activa caspasas efectoras como la caspasa-3, lo que desencadena las últimas fases de la apoptosis [160].

Varios autores han descrito la capacidad de las micobacterias (*M. tuberculosis*, BCG, *M. kansasii*, *M. avium*) de inducir apoptosis [55; 161] vía extrínseca dependiente del TNF α [159] o vía intrínseca [162] y cómo el grado de apoptosis va a depender del número de bacterias que infectan cada neutrófilo [159; 163]. También se sabe que *M. tuberculosis* estimula la producción de ROS, lo cual podría inducir apoptosis en fagocitos vía activación caspasas-3 y -8 y alterando la expresión de las proteínas de la familia Bcl-2. Este hecho ha sido observado mediante estudios de inhibición de la producción de ROS, cuyo resultado es la inhibición paralela de la apoptosis [164; 165; 166; 167]. Otros autores han descrito, por el contrario, que las micobacterias son capaces de inhibir, reducir o evadir la apoptosis en las células que infectan [168; 169; 170].

En el caso de los neutrófilos, una vez que han cumplido su función, sufren apoptosis espontánea para preservar la integridad de sus membranas y prevenir la liberación incontrolada de los contenidos tóxicos de la célula. A su vez, se producen cambios en su membrana para poder ser reconocidos por los macrófagos [163; 171]. Se ha sugerido que la fagocitosis de neutrófilos apoptóticos infectados por los macrófagos induce una respuesta proinflamatoria, y que esto puede ser un mecanismo útil de activación del macrófagos frente a las micobacterias [164; 172; 173].

La apoptosis ha sido considerada un mecanismo de defensa de la célula hospedadora porque dificulta que el ambiente sea favorable para el desarrollo del bacilo, y porque las células apoptóticas infectadas, en contacto con macrófagos frescos, reducen la viabilidad de la micobacteria [159; 160; 174]. Pero también se ha reconocido la posibilidad de que en algunas circunstancias la apoptosis inducida por la infección puede ser de interés para el patógeno. En este sentido, *M. tuberculosis* podría manipular el proceso de apoptosis como estrategia para, por ejemplo, ser capaz de multiplicarse intracelularmente [159; 160; 162; 174; 175; 176].

CITOCINAS Y QUIMIOCINAS EN TUBERCULOSIS

Las citocinas son proteínas de bajo peso molecular que afectan al comportamiento de otras células. Su expresión está estrictamente controlada para que se produzcan en los momentos adecuados, evitando daño en el organismo por su producción excesiva o prolongada. Poseen una vida media muy corta y actúan a bajas concentraciones mediante la unión a receptores de alta afinidad. Las quimiocinas son pequeñas citocinas que participan en la migración y activación de células como los fagocitos y los linfocitos [148].

CITOCINAS

Interferón gamma (IFN γ)

Es una citocina producida fundamentalmente por células NK y linfocitos T [27]. Recientemente se ha descrito la capacidad de monocitos/macrófagos activados con IL-12, IL-18 y/o factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) de producir IFN γ [177]. Esta citocina potencia en los fagocitos la producción de ROS, aumenta la generación de nitritos, regula la expresión del receptor de Fc [178], del MHC-I [179] y la expresión de las quimiocinas inducibles por el IFN γ [180], aumentando el reclutamiento adicional de leucocitos al foco de infección. A su vez, inhibe indirectamente la producción de quimiocinas como mecanismo importante para evitar daño tisular [178]. El IFN γ junto con la IL-12 coordina la respuesta inmune adaptativa amplificando la respuesta Th1 [181].

La dilucidación del papel del IFN γ en la lucha frente a la tuberculosis es muy controvertida, ya que los monocitos/macrófagos humanos activados *in vitro* con esta molécula son incapaces de matar a las micobacterias. Sin embargo, su importancia es indiscutible, ya que se ha comprobado que mutaciones deletéreas en el receptor del IFN γ aumentan la susceptibilidad a la micobacteriosis, incluyendo aquellas causadas por especies consideradas no patogénicas [132; 182; 183; 184]. De este modo, mientras que el IFN γ es necesario en la respuesta inmune frente a la tuberculosis, no parece suficiente para terminar con la infección como se muestra en numerosos estudios y ensayos clínicos [185; 186; 187; 188; 189; 190; 191; 192; 193]. En el modelo de ratón se ha observado la misma actividad que en humanos [194]; ratones knock-out para el IFN γ desarrollan una mayor susceptibilidad a *M. tuberculosis*. La diferencia es que, en el ratón, el IFN γ es el mayor activador de los macrófagos y, ya sea solo, o en sinergia con GM-CSF, es capaz de inhibir el crecimiento de *M. tuberculosis in vitro* [195].

Factor de necrosis tumoral alfa (TNF α)

El TNF α es una de las citocinas proinflamatorias más importantes identificadas en la respuesta inmune frente a tuberculosis, y está producida por monocitos/macrófagos, DC, fibroblastos, células NK y linfocitos T y B. Posee un efecto pleiotrópico en la respuesta innata frente a microorganismos y un papel muy importante en la formación del granuloma tuberculoso. Favorece la fagocitosis, la muerte intracelular, la necrosis tisular y la activación de células T [196; 197]. No es mediador directo de la migración de leucocitos, pero regula la expresión y la producción de moléculas que contribuyen a la extravasación y el reclutamiento de linfocitos, neutrófilos y monocitos al foco de infección [148].

Estudios con ratones deficientes en TNF α o en su receptor, han demostrado que la infección por *M. tuberculosis* lleva a una muerte rápida con un aumento importante del crecimiento bacteriano en comparación con los ratones control [196; 198]. La importancia del TNF α frente a tuberculosis se ha revelado en pacientes tratados con terapias biológicas anti-TNF α , en los que se produce una reactivación y diseminación fatal de la tuberculosis [199; 200; 201].

Otras citocinas

Destacan entre las citocinas proinflamatorias la IL-12, la IL-1 β y la IL-6. La IL-12 estimula la actividad citotóxica de las células T y NK, induce la diferenciación de las células Th1 y la producción óptima de IFN γ que, a su vez, activa los macrófagos en la defensa frente a estas bacterias [132]. En humanos, mutaciones en el gen que codifica para la IL-12p40 o el receptor de la IL-12, provocan reducción de la producción del IFN γ por parte de las células T, siendo más susceptibles a la infección por BCG y *M. avium* [194]. En ratones knock-out para la IL-1 β y su receptor se produce un mayor crecimiento micobacteriano, así como una formación defectuosa del granuloma tuberculoso. Se ha observado, en pacientes con tuberculosis, un exceso de producción de IL-1 β en el foco de infección [37]. La IL-6, también considerada anti-inflamatoria, parece tener un papel protector frente a *M. tuberculosis*, ya que ratones knock-out muestran una mayor susceptibilidad. Sin embargo, estudios *in vitro* con *M. avium* muestran su papel dañino ya que promueve su multiplicación e inhibe la producción de TNF α e IL-1 β [37; 43].

Las citocinas anti-inflamatorias más importantes en tuberculosis son la IL-10, la IL-4 y el factor de crecimiento tumoral β (TGF- β). La IL-10 regula la producción de IL-12 mediada por los macrófagos e inhibe la respuesta de las células CD4 $^{+}$ y de las células presentadoras de antígenos infectadas con micobacterias. La IL-10 puede contrarrestar las propiedades de activación de los macrófagos mediadas por el IFN γ [27]. La influencia de la IL-4 en la actividad frente a la tuberculosis es discutida. Se considera que reduce la inmunidad y aumenta la inmunopatología de la enfermedad porque regula negativamente la respuesta Th1 [202] e inactiva a los macrófagos [134]. Sin embargo, no parece que su expresión aumente en pacientes con tuberculosis [203]. El TGF- β es liberado en exceso durante la tuberculosis, inhibe la inmunidad celular mediada por las células T. Posee efectos antiinflamatorios importantes (inhibición de la producción de ROS y RNI, proliferación de las células T y regulación de la liberación de IFN γ , TNF α e IL-1 β) [27].

QUIMIOCINAS

Son un tipo de citocinas de bajo peso molecular, caracterizadas por su función quimiotáctica. Ejercen sus efectos biológicos a través de la interacción con sus receptores transmembrana acoplados a proteínas G [204]. Tienen un papel crítico como iniciadoras y promotoras de las reacciones inflamatorias, regulando el trasvase de leucocitos hacia órganos y tejidos. Algunas son consideradas pro-inflamatorias y otras homeostáticas. Poseen otras funciones, como su participación en la angiogénesis, en la producción de colágeno y en la proliferación de los precursores hematopoyéticos [205].

Presentan una homología nucleotídica del 20-50 % idéntica entre sí. Se clasifican de acuerdo a la posición relativa de sus residuos cisteína amino terminal, que se unen formando puentes disulfuro. Así, cuando los dos residuos están separados por un aminoácido, se designan quimiocinas-CXC y cuando ambas cisteínas están unidas se las denomina quimiocinas-CC [206]. La subfamilia de quimiocinas CXC comprende dos grupos: a) las que tienen el motif ELR (ácido glutámico-leucina-arginina) entre el amino terminal y la primera cisteína y b) las que no tienen este motif. Las primeras son conocidas como quimiocinas inflamatorias con capacidad de atracción y estimulación, principalmente de neutrófilos. Las segundas, que reciben el nombre de inmunoquimiocinas, actúan principalmente sobre linfocitos. Las quimiocinas CC son las más numerosas y atraen principalmente a monocitos, DC, células NK y linfocitos. Regulan además la degranulación y liberación de enzimas por las células NK y T citotóxicas, modulan la apoptosis, controlan el crecimiento de las células hematopoyéticas, modulan la diferenciación de las células T y aumentan la producción de inmunoglobulinas [207].

CCL20

CCL20, también conocida como proteína macrofágica inflamatoria 3 α (MIP-3 α), fue descrita por primera vez mediante técnicas bioinformáticas y técnicas de secuenciación automática. Muestra relativamente poca homología (20-31 %) con otras

quimiocinas CC [208; 209]. Su receptor es CCR6, siendo CCL20 su único ligando conocido. Se expresa constitutivamente en muchos tipos celulares, como linfocitos T y B, macrófagos, DC o queratinocitos. La expresión de CCL20 es inducida por una gran variedad de agentes (lipopolisacárido bacteriano (LPS), TNF α , IFN γ , IL-1 β o PMA) sugiriendo que esta molécula interviene en procesos normales y patológicos. Juega un papel importante en enfermedades asociadas a los tejidos mucosos, incluido el pulmón. Es considerada como una importante conexión entre la inmunidad innata y adaptativa, debido a su papel en el reclutamiento de leucocitos (linfocitos T y B) y DC inmaduras bajo condiciones fisiológicas e inflamatorias [208].

Varios son los estudios que muestran la regulación transcripcional de CCL20 por distintos patógenos microbianos como son *Helicobacter pylori* en células epiteliales gástricas, *Streptococcus pyogenes* y *Lactobacillus rhamnosus* en macrófagos humanos, *Streptococcus mutans* en células de la pulpa dental humana, *Shigella flexneri* en células humanas epiteliales y bacterias probióticas (*Staphylococcus thermophilus*) en DC derivadas de monocitos [210, 211; 212; 213; 214; 215]. En todos estos casos la expresión se ve aumentada. Sin embargo, también se ha descrito que su secreción y producción se ve inhibida en células epiteliales intestinales humanas por bacterias comensales como es el caso de *Bacillus infantis* [216]. Otros estudios muestran la capacidad de diferentes tipos celulares, hematopoyéticos y otros, de expresar y secretar CCL20 ante la presencia de distintos estímulos. Kao et al. demostraron la capacidad de células alveolares epiteliales de humanos y de ratón de expresar CCL20 tras ser estimuladas con IL-17 así como por IL-1 β o TNF α [217]. Scarpini et al. han mostrado la capacidad de los neutrófilos de expresar y liberar biológicamente CCL20 tras ser estimulados con LPS, N-formil-metionin-leucin-fenilalanina (fMLP) y/o IFN γ [218; 219]. Los fibroblastos gingivales, cuando son estimulados con IL-1 β , LPS o TNF α producen mayor cantidad de CCL20. Por el contrario, la producción debida a la IL-1 β es inhibida cuando las células son estimuladas con IFN γ [220].

Un artículo reciente muestra que esta quimiocina es producida en pacientes con tuberculosis activa. Macrófagos de estos pacientes activados con el antígeno 30 KDa de *M. tuberculosis* producen una elevada cantidad de esta molécula, así como de CCR6,

con respecto a los macrófagos de voluntarios sanos. A su vez, TNF α e IFN γ , pero no IL-10, aumentan dicha expresión en los mismos casos [221]. De hecho, estudios realizados en rata sugieren la implicación de CCL20 y CCR6 en la formación del granuloma tuberculoso [222]. Todas estas evidencias apuntan a una implicación de esta quimiocinas en la respuesta inmunológica frente a *M. tuberculosis*.

Las DC son capaces de fagocitar a las micobacterias, que se multiplican en su interior sin dificultad [123; 223]. El bacilo inhalado alcanza el alvéolo pulmonar donde las DC pueden fagocitarlo. La migración de estas células inmaduras parece dependiente de CCL20/CCR6 [224; 225; 226; 227; 228]. Cuando las DC maduran al responder frente a un patógeno, la expresión del receptor es disminuida, a la vez que es inducida la de CCR7, cuyos ligandos, CCL19 y CCL21, promueven la migración de las DC a los nódulos linfáticos [229].

Además de su papel quimiotáctico, CCL20 posee otras funciones, como la degranulación de los leucocitos, la proliferación de las células NK, la maduración de las células DC, el desarrollo de los linfocitos B y T, la angiogénesis o el crecimiento tumoral [229; 230]. Tras descubrirse las similitudes entre las estructuras tridimensionales de CCL20 y péptidos antimicrobianos como las defensinas, se reveló la capacidad de esta quimiocinas de matar numerosas bacterias y hongos [231].

CXCL7

CXCL7, también conocida como PPBP ó LDGF, es una quimiocina de 128 aminoácidos, poco caracterizada y conocida principalmente por ser una proteína almacenada en los gránulos α de las plaquetas, donde es la proteína mas abundante, alcanzando en suero concentraciones en el rango de 1,6 a 4,8 μ M [232]. Pertenece a la familia CXC, posee el motif ELR, y se une a los receptores CXCR1 y CXCR2 presentes en neutrófilos [232; 233; 234], a los que atrae [235].

Al contrario de otras quimiocinas, CXCL7 se caracteriza por sufrir proteólisis post-traducciona en el extremo amino de la molécula precursora pro-proteína básica de plaquetas (PPBP) dando lugar a distintas variantes; incluyendo proteína básica de plaquetas (PBP), proteína activadora del tejido conectivo III (CTAPIII) [236; 237], tromboglobulina β (β -TG) [238; 239] y proteína activadora de neutrófilos 2 (NAP-2) [240; 241]. Además, existen otras variantes por deleción de cuatro aminoácidos en el carboxilo terminal de NAP-2 (NAP-2 (1-66)) [242] y las trombocidinas TC1 y TC2, variantes de NAP-2 y CTAPIII, a las que les falta 2 aminoácidos respectivamente [243]. El procesamiento de PPBP, es llevado a cabo principalmente y con mayor eficiencia por la enzima proteinasa G de monocitos [241] y neutrófilos [244], aunque hay estudios que reflejan la actividad de otras proteinasas [245]. Se ha observado que la secuencia líder de PPBP parece importante para que esta proteína ejerza sus funciones biológicas [237] como la inducción de la migración transendotelial en los procesos de adhesión celular [246; 247], quimiotaxis [233; 235] o degranulación [240; 242] (Figura 5).

Además de su presencia en plaquetas, también se ha observado expresión de CXCL7 en células T [248] y en monocitos [249]. Pillai et al. detectaron la expresión de dicha proteína únicamente en cocultivo de monocitos con células estromales [250]. Sin embargo, otros autores han hallado expresión génica de PBP en cultivo de monocitos humanos expuestos a bacterias (*Salmonella typhimurium*) o componentes microbiano como el LPS o el zymosan [251].

Todas las quimiocinas de la familia CXC, exceptuando PF4 [232], atraen neutrófilos. En el caso de CXCL7, la variante NAP-2 es la única con actividad quimiotáctica, y necesita una concentración 100 veces mayor que la CXCL8 (IL-8) para ejercer el mismo efecto [233]. Además, NAP-2 estimula la producción de ROS y provoca cambios en la concentración citosólica del calcio en neutrófilos, aunque no en monocitos, por lo que se ha deducido que esta variante parece más específica de neutrófilos [252]. Por otro lado, NAP-2 influye en la expresión y función de los receptores de adhesión en neutrófilos, aumentando la expresión de algunos receptores de complemento (CR1 y CR3) y disminuyendo la de otros (como la molécula de adhesión leucocitaria-1 (LFA-1)). También modulan la estructura de los

microfilamentos del citoesqueleto, aumentando la capacidad fagocítica de los neutrófilos. Todo esto puede determinar el reclutamiento de los neutrófilos al lugar de infección y la respuesta antimicrobiana de éstos [253]. Además, se ha encontrado que dan lugar a la degranulación de distintos tipos celulares. De este modo, induce la liberación de la elastasa en neutrófilos tratados con citocalasina B [240] y al igual que CTAPIII, libera histamina de basófilos humanos [254]. La variante de NAP-2 con ausencia de cuatro aminoácidos en su carbono terminal es la que tiene una mayor capacidad de generar degranulación en neutrófilos así como de aumentar la unión específica en esas células [242; 255]. Por otro lado, las trombocidinas 1 y 2, poseen actividad bactericida frente a bacterias como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis* [243]. Esta actividad antimicrobiana es compartida, a su vez, por PBP y CTAPIII [256].

Se ha analizado poco el papel de CXCL7 en la inmunidad frente a la tuberculosis. Un estudio reciente, describe la diferencia de expresión de esta quimiocina en monocitos diferenciados con GM-CSF o con M-CSF e infectados con BCG siendo mayor en el segundo caso. Además compararon la producción de ROS y la actividad frente a la cepa de tuberculosis H37Ra observando que monocitos diferenciados con GM-CSF y estimulados con concentraciones entre 0,05 a 0,5 µg/ml de CXCL7, producían mayor cantidad de ROS e inhibían, a los seis días, la multiplicación de esta micobacteria, indicando que ROS puede desempeñar un papel en la resistencia frente a la micobacteria [257].

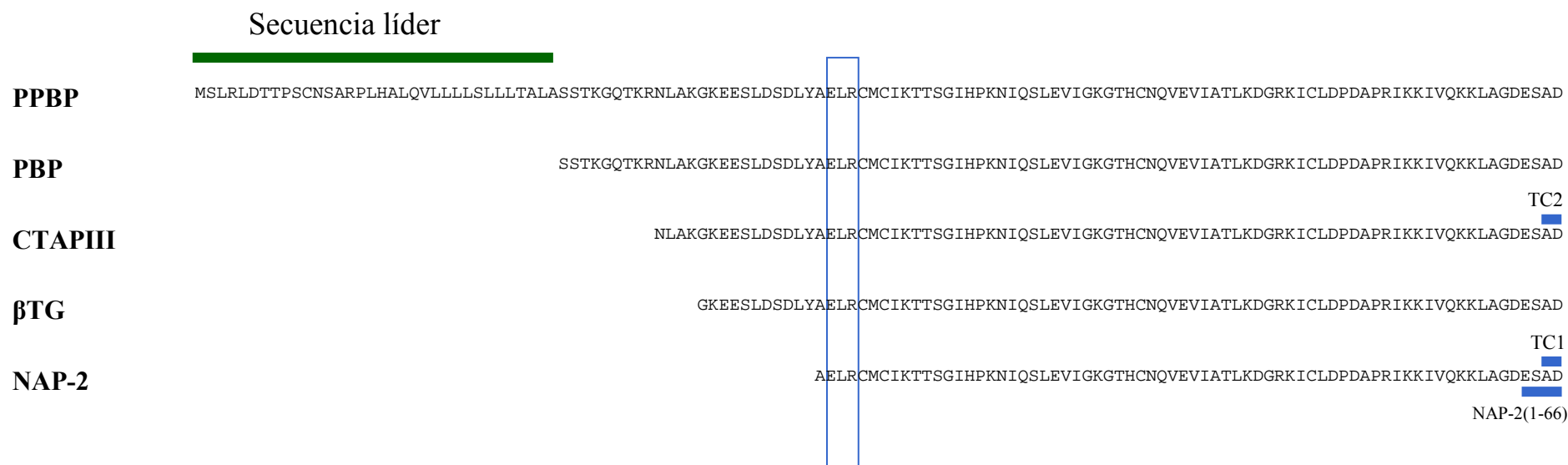


Figura 4: Variantes post-traduccionales de PPBP. Las variantes se diferencian en el extremo amino terminal. PPBP, 128 aminoácidos; PBP, 90 aminoácidos; CTAPIII, 85 aminoácidos; βTG, 81 aminoácidos y NAP-2, 70 aminoácidos

Motif ELR: aminoácidos necesarios para la unión a los receptores CXCR1 y CXCR2.

■ Secuencia líder: secuencia señal para el transporte del polipéptido desde el citoplasma al espacio extracelular.

■ Variantes por delección en el extremo carboxilo terminal de CTAPIII y NAP-2. La línea azul representa el número de aminoácidos delecionados.

NAP-2(1-66); TC1 (NAP-2(1-68)) y TC2 (CTAPIII(1-83))

Planteamiento y Objetivos

La tuberculosis, enfermedad conocida desde la antigüedad, ha sido profundamente estudiada por ser una de las enfermedades infecciosas más importantes que ha plagado la existencia del ser humano. A pesar de los inmensos recursos que se han dedicado a su investigación, son muchas las lagunas de conocimiento respecto a su etiopatología. Se ha estimado que el 70-80 % de las personas en contacto directo con pacientes con tuberculosis activa no muestran infección, de lo cual se puede deducir que su respuesta innata es suficiente para eliminar a la micobacteria. Pero un 20-30 % de los individuos acaban desarrollando la enfermedad o presentan una infección latente. En la actualidad no se conoce la razón por la que el sistema inmune de algunas personas, tiene éxito frente a esta enfermedad, mientras que en otros casos fracasa. Una de las razones que explican esta situación es la complejidad del modelo de estudio, dificultado por la imposibilidad de activar, *in vitro*, las células del sistema inmune para matar a *Mycobacterium tuberculosis*. Este trabajo parte de un protocolo de infección establecido, caracterizado por no utilizar suero, una multiplicidad de infección baja y lisis celular por ultrasonidos. Además, partimos de un modelo comparativo idóneo para estudiar los mecanismos de defensa de los fagocitos, ya que se ha obtenido una cepa atenuada de *M. gordonae* por sucesivos pases en el laboratorio durante más de un año, la cual es eliminada tanto por monocitos/macrófagos como por neutrófilos, principales células del sistema inmune innato, en ausencia de activación inducida experimentalmente. Además la existencia en el laboratorio de una genoteca de substracción obtenida de monocitos activados con IFN γ , molécula de indiscutible importancia en tuberculosis, e infectados con *M. tuberculosis* y *L. pneumophila* (patógeno de crecimiento intracelular eliminado por macrófagos activados con IFN γ), nos ha permitido detectar la presencia de genes diferencialmente expresados en función de la infección, como es el caso de la quimiocina CXCL7. A su vez realizamos un estudio de expresión diferencial de genes que participan en la actividad antimicrobiana, entre los cuales se identificó la quimiocina CCL20.

En la literatura se han descrito distintas estrategias antimicrobianas empleadas por las células del sistema inmune innato en su lucha contra los agentes patógenos, entre las cuales destacamos la producción de especies reactivas del oxígeno y la apoptosis, así como la participación, directa o indirecta de citocinas y quimiocinas. El objetivo general

de este trabajo es dilucidar, *in vitro*, el papel antimicrobiano de monocitos/macrófagos y de neutrófilos frente a *M. tuberculosis*, esclareciendo la participación de los mencionados mecanismos, así como la contribución de dos quimiocinas, CXCL7 y CCL20 en la lucha frente a la tuberculosis. Para ello nos planteamos específicamente los siguientes objetivos:

1. Establecer la relación y participación de la producción de especies reactivas del oxígeno y de la apoptosis en los mecanismos antimicrobianos empleados por los neutrófilos frente a micobacterias de diferente patogenicidad.
2. Caracterizar las funciones biológicas en las que participa o influye la quimiocina CXCL7 en MDM y neutrófilos infectados con *M. tuberculosis* y *L. pneumophila*
3. Caracterizar el papel biológico de la quimiocina CCL20 en células infectadas por *M. tuberculosis* y *L. pneumophila*.

Material y Métodos

MATERIAL

CEPAS BACTERIANAS

M. tuberculosis HL186T, *M. gordonae* HL184G, *M. kansasii* HL228K y *M. avium* HL70A fueron aislados en el Servicio de Microbiología del Complejo Asistencial Universitario de León. Se cultivaron en medio agar 7H11 suplementado con 0,2 % de glicerol y 10 % de suplemento OADC (Ácido oleico/Albúmina/Dextrosa/Catalasa) [258]. Tras pasar *M. gordonae* HL184G en nuestro laboratorio durante más de un año, obtuvimos una cepa atenuada a la que hemos llamado *M. gordonae* atenuada (HL184Gat), una variante lisa de la cepa original rugosa [69] (Figura 5).

L. pneumophila Philadelphia ATCC 13151 fue amablemente proporcionada por Carmen Pelaz y crecida en medio agar BCYE (Agar de carbón tamponado y extracto de levadura) [259].

DH5 α de *Escherichia coli* fue crecida en medio Luria Bertani y empleada para el mantenimiento, amplificación y purificación del DNA plasmídico.

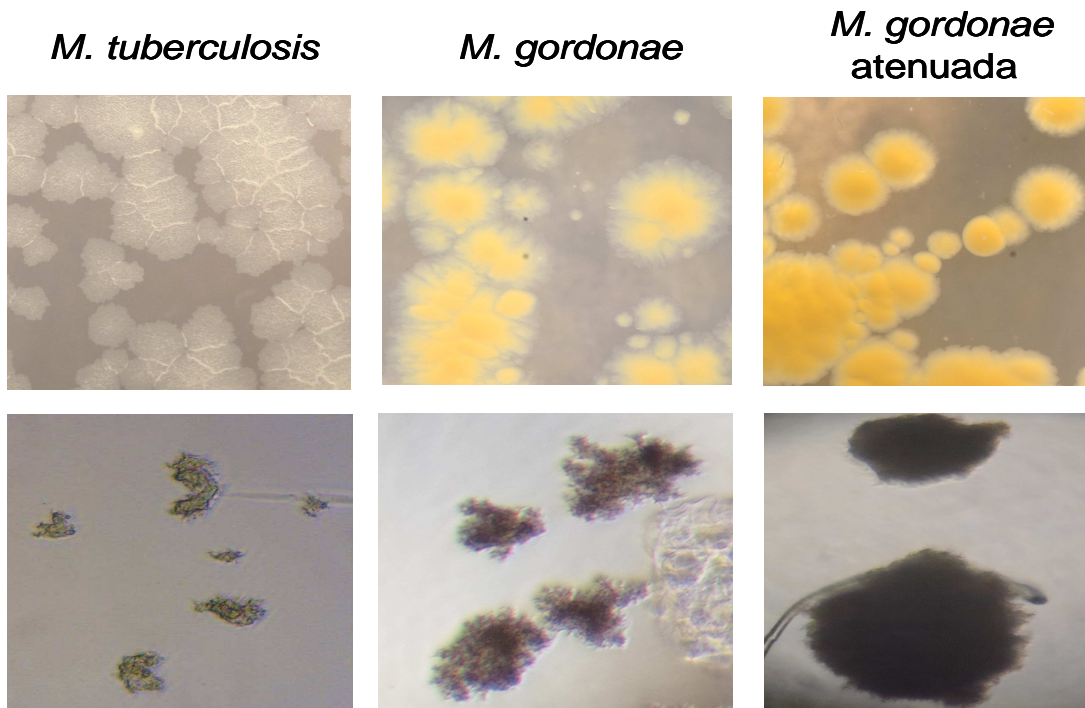
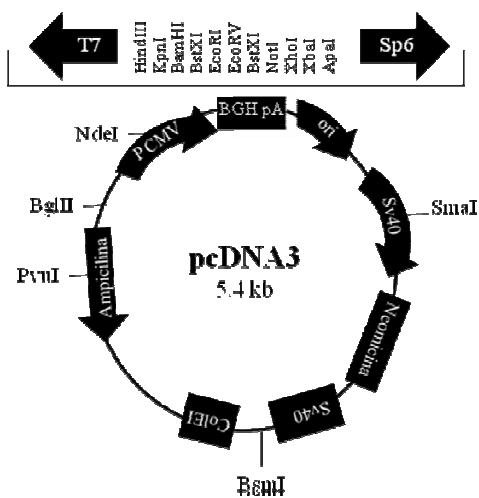


Figura 5: Crecimiento micobacterias en medio 7H11 (fila superior) y en medio 7H9 (fila inferior)

PLÁSMIDOS



pcR4TOPO: Plásmido de 3,9 Kb linearizado con una timidina en el extremo 3'-OH y una topoisomerasa covalentemente unida al vector. Contiene el gen de resistencia a ampicilina para la amplificación en bacterias.

pcDNA3: Plásmido de 5,4 Kb que contiene el promotor del citomegalovirus y el gen de resistencia a ampicilina para la amplificación en bacterias.

LÍNEAS CELULARES

U937: Línea celular humana establecida a partir de un linfoma histocítico difuso. Muestra muchas características monocíticas. Son fácilmente diferenciadas a células semejantes a macrófagos maduros mediante estímulos solubles como el PMA [260].

K562: Línea celular derivada de un paciente con leucemia mieloide crónica en crisis blástica [261; 262].

Ambos tipos celulares se cultivan en medio RPMI-1640, 25 mM HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) suplementado con 10% (v/v) suero fetal bovino (FBS), 2 mM de glutamina, 250 µg/ml de anfotericina B y 100 U/ml de penicilina G potásica. Periódicamente se hacen controles de calidad internos de los cultivos celulares mediante el análisis de la posible contaminación por distintas especies de mycoplasma y acholeplasma mediante el kit Mycoplasma Detection for Convencional PCR.

REACTIVOS

OADC, ADC, 7H11, 7H9, anti-CD45, anti-CD66b, anti-CD14, CD209, BD OptEIA human monocyte chemoattractant proteína MCP-1, Falcon Cell Culture Inserts, Fibronectina (Becton Dickinson Microbiology Systems); Mycoplasma Detection for Convencional PCR (Minerva Biolabs, LabClinics), EasySep Kit (StemCell Technologies); PMA, TMB, NaCl, carbonato sódico, Frag ELTM DNA Fragmentation Detection Kit, Fluorescent-TdT Enzyme, péptido GRGDSP (Calbiochem, Merk Chemicals); Luminol, iodoacetamida, Tritón X-100, azul negro de naphtol combinado, Ácido Cítrico, Tris, Dextrano-500,000, FITC, Zymosan, DPI, Urea (Sigma-Aldrich); Ficoll-Paque Plus, GammaBind G Sepharose, Peptide Marker Kit, ECL Advance Western Blotting Detection Kit, DNAasa, CAPS (General Electric Healthcare, Life Sciences); IFN γ , IL-4, GM-CSF, TGF- β 1, NAP-2, IL-8, CCL20, anticuerpo

neutralizante anti-CCL20, anti-CCL2 (Preprotech); qScript cDNA síntesis Kit (Quanta Biosciences); Anticuerpo secundario (Pierce); Hind III, Xho I, T4 DNA ligasa (Fermentas); RPMI-1640 HEPES, M-SFM, G418, PBS sin calcio ni magnesio, HBSS, suero fetal bovino, glutamina, anfotericina B, penicilina G potásica (Gibco, Invitrogen); LIVE/DEAD BacLight bacterial kit, SYBR-Green, pcR4TOPO, pcDNA3, kit TOPO TA Cloning Kit for Sequencing (Invitrogen); Ultraclean Tissue RNA Isolation Kit, Ultraclean Plasmid Prep Kit (MoBio Laboratories); BigDye terminator V3.1 Cycle sequencing Kit (Applied Biosystems); anti-NAP-2 Humano, anti-IL-8 Humano, Human CXCL7/NAP-2 y Human CXCL8/IL-8 DuoSet ELISA development system, Human CCL20/macrophage inflammatory proteína (MIP)-3 α DuoSet (R&D Systems); Citrato Sódico, Dextrosa, HCl, Metanol, Etanol, Glicerol, Poliacrilamida, Dodecil Sulfato, Tricina, EDTA (Applichem); BCYE (Pronadisa); Kinyoun (bioMérieux SA); DNA polimerasa Hotmaster (5 Prime).

PROGRAMAS INFORMÁTICOS

Los análisis estadísticos se realizaron con el paquete estadístico SPSS v 14,0; PASW Statistics 18 (SPSS Ibérica, Madrid, España) y G-Stat v. 2,0 (Dunn's test, GlaxoSmithKline, Brentford, Middleses, UK).

El diseño de los primers se realizó con el programa Primer3 v 4,0 de libre acceso en Internet (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3>).

METODOLOGÍA

PURIFICACIÓN DE FAGOCITOS

La sangre periférica empleada para la purificación de fagocitos se obtuvo de voluntarios sanos de entre 20 y 50 años tras firmar el consentimiento informado. Dicho protocolo fue aprobado por la Comisión Ética de Investigación del Complejo Asistencial Universitario de León.

Purificación de neutrófilos

Para la purificación de neutrófilos se siguió el protocolo de Böyun A con modificaciones [263]. Cada experimento se realizó con sangre de un voluntario distinto. Por cada 5 ml de sangre se agrega 1 ml de ACD (Ácido cítrico 65 mM, Citrato sódico 85 mM, Dextrosa 2 %. Esterilizado por filtración (Steritop, Millipore)) y 3 ml de dextrano-500,000 (6 %. Esterilizado por filtración (Steritop, Millipore)), se mezcla suavemente por inversión 20 veces para posteriormente dejarlo en reposo durante 45 minutos a temperatura ambiente con la finalidad de separar los eritrocitos, que van al fondo del tubo, del resto de las células sanguíneas. Tras recuperar el sobrenadante (rico en leucocitos y pobre en eritrocitos) se eliminan los eritrocitos restantes mediante generalmente dos ciclos de lisis hipotónica añadiendo 3 ml de agua destilada durante 20 segundos tras los cuales se agrega 1 ml de KCl 0,6 M para restablecer la fuerza iónica y

se centrifuga a $300 \times g$ durante 5 minutos a temperatura ambiente. Los reactivos para la lisis hipotónica se mantienen a $4^\circ C$. Se desecha el sobrenadante y se resuspende el pellet en 3 ml de PBS sin calcio ni magnesio. En este pellet se encuentran tanto células mononucleares como polimorfomucleares. Dicho pellet se deposita sobre un lecho de 3 ml de Ficoll-Paque Plus en un tubo de 10 ml para separar los neutrófilos mediante gradiente de sedimentación, centrifugándolos a $400 \times g$ durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después de desechar el sobrenadante, los neutrófilos fueron recuperados del fondo del tubo y resuspendidos en medio de cultivo RPMI-1640 25 mM HEPES y 2 mM de glutamina en presencia o ausencia del 10 % de FBS o en medio de macrófagos libre de suero (M-SFM), según necesidades del experimento (Figura 6). Todos los cultivos se incubaron a $37^\circ C$ 95 % de aire y con un contenido de CO_2 al 5 %, en placas de cultivo celular de fondo plano de 24, 48 y 96 pocillos.

El recuento celular se realizó en una cámara de Neubauer, en un microscopio de contraste de fases. Las células fueron puestas en cultivo a las tres horas de la venipunción. La pureza de las muestras es determinada por citometría de flujo (FacScan, Becton Dickinson Microbiology Systems) usando anticuerpos anti-CD45 (panleucocitario) y anti-CD66b (que reconocen neutrófilos). El porcentaje de células $CD66b^+$ fue $> 95 \%$ en todas las purificaciones.

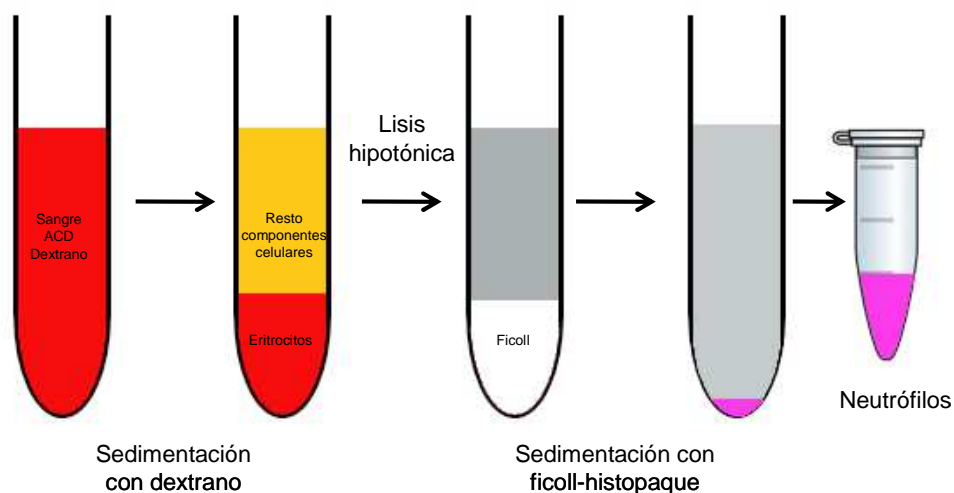


Figura 6: Purificación de neutrófilos

Purificación de monocitos

La purificación de las células mononucleares se realizó mediante un gradiente de sedimentación con Ficoll-Paque Plus y las células CD14⁺ fueron aisladas siguiendo las instrucciones del kit EasySep por separación magnética y resuspendidas en el medio apropiado de cultivo en cuatro horas después de su venipunción (figura 7). El recuento se realizó de igual manera que en el caso de los neutrófilos. La pureza de los monocitos fue determinada por citometría de flujo (FacScan) usando los anticuerpos apropiados anti-CD45 (panleucocitario) y anti-CD14 (que reconocen monocitos) obteniendo una pureza > 94 % en todas las purificaciones.

Para algunos ensayos fue necesario diferenciar los monocitos a células dendríticas (DC) inmaduras, para lo cual se siguió el protocolo usado por Sallusto et al. [264] con modificaciones. Los monocitos fueron cultivados durante cinco días en presencia de IL-4 (20 ng/ml, $\geq 5 \times 10^6$ unidades/mg) y GM-CSF (10 ng/ml, $\geq 1 \times 10^7$ unidades/mg). En algunos casos para inducir la expresión del receptor de CCL20 (CCR6) también se añadió TGF- β 1 (5 ng/ml, $\geq 2 \times 10^7$ unidades/mg) [265]. El medio de cultivo y las citocinas se renovaron después de dos días de cultivo. El proceso de diferenciación de estas células se determinó por la expresión de CD209 (que reconocen DC) mediante citometría de flujo (FacScan) > 98 % de las células CD14⁺ CD209⁻ cambiaron a CD14⁻ CD209⁺.

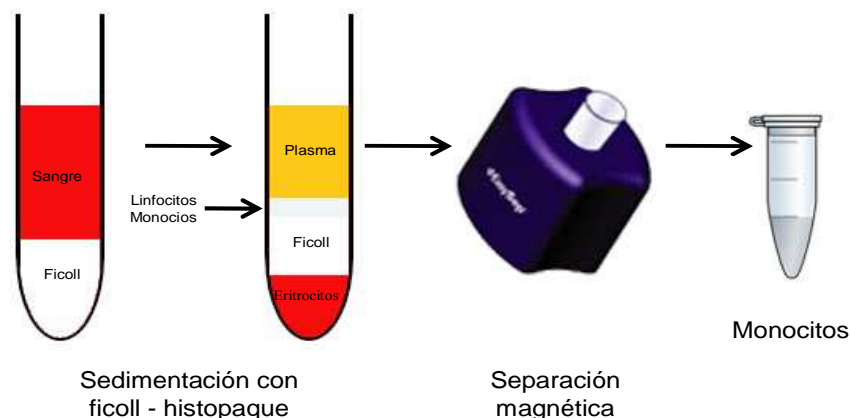


Figura 7: Purificación de monocitos

INDIVIDUALIZACION DE MICOBACTERIAS

Partiendo de un cultivo fresco de micobacterias crecidas en agar 7H11 suplementado con OADC se tomó un inóculo y se resuspendió en medio RPMI-1640 sin suero. Para obtener las micobacterias individualizadas, el inóculo se sonicó en hielo durante diez segundos a una amplitud al 10 % (2W) con un disruptor celular ultrasónico digital S-450 (Branson Ultrasonics). Posteriormente a la sonicación, el inóculo se centrifugó a $100 \times g$ durante un minuto a temperatura ambiente de donde recuperamos el sobrenadante en el que permanecen las bacterias individualizadas. Estos pasos se repitieron tantas veces como fue necesario para obtener las bacterias bien individualizadas, generalmente de tres a cuatro ciclos. La individualización y la viabilidad de las bacterias se determinó con el kit de tinción LIVE/DEAD BacLight bacterial. La mayoría de las bacterias estaban individualizadas, y las escasas agrupaciones fueron ≤ 5 bacterias por grupo. Este tratamiento de individualización no fue necesario para *L. pneumophila* ya que esta bacteria se disgrega perfectamente. La conservación y almacenamiento de las bacterias se realizó a $-80^{\circ} C$ con glicerol al 20 % en alícuotas de un solo uso.

La cuantificación de las micobacterias se realiza mediante el recuento de las unidades formadoras de colonias (CFU). Diluciones decimales de las micobacterias se inocularon por triplicado en placas de 96 pocillos en medio líquido 7H9 suplementado con ADC (Albúmina/Dextrosa/Catalasa) e inspeccionadas bajo un microscopio invertido [266]. El recuento de las colonias de *L. pneumophila* se realizó en medio BCYE. La incubación se realizó a $37^{\circ} C$ durante seis a diez días para las micobacterias y cuatro días para *L. pneumophila*.

INFECCIÓN CELULAR

Infección para determinar actividad antimicrobiana

Los experimentos se hicieron en placas de cultivo de 96 pocillos, en un volumen final de 100 μ l. En función de las necesidades, distintas concentraciones de células fueron empleadas e infectadas con las bacterias a una multiplicidad de infección (MOI) de 0,01. Trascorridas 24 horas de incubación para los neutrófilos, y 96 horas para los macrófagos derivados de los monocitos (MDM) y células U937, las células se lisaron por sonicación con un disruptor digital ultrasónico celular S-450 (Branson Ultrasonics), amplitud al 10 % (2W) durante 3 segundos para liberar las bacterias. De esta manera las células son lisadas sin afectar la viabilidad de las bacterias. Se inoculan 100 μ l por triplicado de diluciones decimales seriadas de cada pocillo sonicado en medio líquido 7H9 suplementado con ADC (10^{-1} hasta 10^{-4}) para las micobacterias o en medio agar BCYE (10^{-1} hasta 10^{-5}) para *L. pneumophila*. Las CFU fueron contadas en un microscopio invertido a 100 aumentos, excepto para *L. pneumophila*, transcurridos entre 6-15 días de incubación en función de la bacteria. El recuento de *L. pneumophila* se realizó a los 4 días, el de ambas cepas de *M. gordonae* así como *M. avium* y *M. kansasii* se hizo entre los 5-8 días de cultivo, mientras que el recuento de *M. tuberculosis* se efectuó a los 10-15 días.

Para determinar la actividad de NAP-2 en las células U937 que expresan las distintas variantes de PPBP, fueron infectadas con *L. pneumophila* cuatro días después de haber eliminado el marcador de selección, G418. La noche anterior a la infección, las células fueron diferenciadas con 50 nM de PMA. La infección se realizó como se ha descrito anteriormente.

En el caso de la actividad antimicrobiana de CCL20, el periodo de incubación total de los monocitos/macrófagos y las DC antes de la lisis fue de nueve días. Los primeros cinco días, para la diferenciación de las DC, a las cuales en el momento de la

infección se le añadió IL-4 (20 ng/ml), GM-CSF (10 ng/ml) y TGF- β 1 (5 ng/ml) fresco. Cuatro días después, las células se lisaron del mismo modo descrito anteriormente.

Las citocinas que se testaron para ver su influencia en la actividad antimicrobiana fueron IFN γ (25 ng/ml o 100 ng/ml, $> 2 \times 10^7$ unidades/mg), CCL20 (20 ng/ml), NAP-2 (25 ng/ml) e IL-8 (25 ng/ml).

FAGOCITOSIS

Dos técnicas fueron empleadas para observar fagocitosis de las micobacterias expuestas a distintas condiciones de cultivo: tinción de Kinyoun, empleando como contraste celular la tinción de Giemsa y citometría de flujo de bacterias teñidas con isotiocianato de fluoresceína (FITC). Para ambas técnicas 4×10^5 neutrófilos y 10^5 monocitos fueron infectados con *M. gordonae* y/o *M. gordonae* atenuada con un MOI = 20.

Tinción Kinyoun

Las paredes celulares lipídicas de las micobacterias poseen una característica única, la gran afinidad y fijación del colorante carbofuccina (Kinyoun). Esta fijación es tan fuerte que resiste el desteñido con intensos agentes decolorantes como alcoholes y ácidos fuertes. Esta tinción permite teñir las bacterias ácido-alcohol resistente sin tener que calentar a la llama la preparación. Las micobacterias se teñirán de color rojo mientras que con la tinción de Giemsa los núcleos celulares y el citoplasma de las células se verán azul oscuro o morado.

La tinción se realizó siguiendo el protocolo de Kinyoun [267] con algunas modificaciones como se describe brevemente a continuación:

Las células cultivadas sobre un cubreobjetos en la placa de cultivo de 48 pocillos se fijaron durante mínimo 15 minutos con metanol a temperatura ambiente. Una vez fijadas, las micobacterias se tiñeron durante 1 hora en un baño a 60° C con el colorante Kinyoun. Lavar con agua y decolorar metiendo cubreobjetos en una solución de etanol 70 % y HCl 37 % hasta que no salga color. Los núcleos celulares se tiñeron mediante el colorante Giemsa durante 1 hora. Lavar con agua y decolorar pasando el cubreobjetos tres veces por una solución que contiene etanol 100 % y dos gotas de ácido acético glacial y posteriormente pasarlo por una batería de etanol (96 %-100 %-100 %) para deshidratar la muestra. Finalmente se pasó por xilol para la eliminación del alcohol y aclarar la preparación. Se añadió líquido de montar en el portaobjetos y se colocó encima el cubreobjetos teñido (Figura 8).

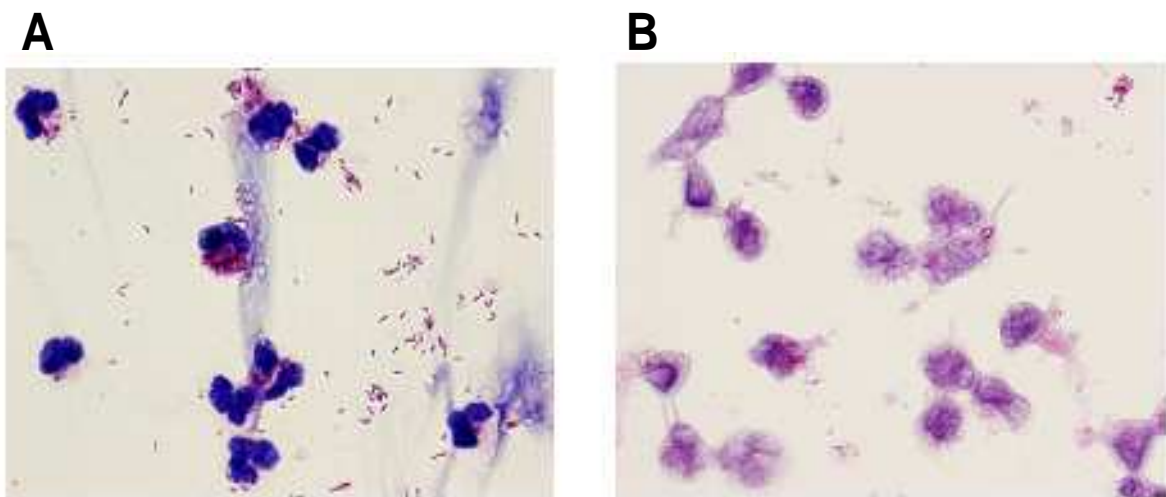


Figura 8: Tinción Kinyoun de (A) neutrófilos y (B) monocitos infectados con *M. tuberculosis*

Tinción bacteriana con FITC

El protocolo se realizó siguiendo las indicaciones del “Current Protocols in Cytometry” [268] con algunas modificaciones, según se describe a continuación:

Un inóculo de bacterias frescas se resuspendió en 500 μ l de carbonato sódico 0,1 M y sonicó hasta obtener bacterias individualizadas (condiciones como en el apartado de individualización de micobacterias). 135 μ l de las bacterias se mezclaron con 15 μ l

de FITC 1 mg/ml e incubaron, en oscuridad, durante 1h a temperatura ambiente. Posteriormente se elimina el FITC sobrante mediante lavados con PBS, centrifugando durante 20 segundos a $800 \times g$. Los lavados son repetidos hasta eliminar completamente el FITC sobrante. El pellet se resuspendió en 100 μ l de medio HBSS. Las bacterias fueron teñidas con LIVE/DEAD BacLight bacterial kit para determinar el grado de individualización y hacer recuento de bacterias por mililitro. Posteriormente se incubó, en oscuridad, la mezcla de las bacterias con los fagocitos en medio HBSS en un volumen final de 100 μ l durante 2 horas a 37° C en agitación. Finalmente se añadieron 600 μ l de PBS/0,02 % EDTA y determinó el porcentaje de fagocitosis. Mantener las muestras en hielo (no tardar más de dos horas) hasta el momento de adquirir en el citómetro de flujo (FacScan).

PCR CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL (qPCR)

Los estudios de expresión diferencial se realizaron mediante qPCR de células infectadas (10^5 o 5×10^5) con un MOI = 1 en un volumen final de 400 μ l en placas de 48 pocillos para las subunidades de la NADPH oxidasa y CXCL7 y en un volumen final de 1.100 μ l en placas de 24 pocillos para los estudios de CCL20. En todos los casos la incubación fue durante 18-20 horas. La metodología empleada para todos los genes se realizó siguiendo las siguientes etapas:

1. **Cálculo de la eficiencia de la reacción:** Con ayuda del software del iCycler (Bio-Rad), se determinó la eficiencia mediante la construcción de una recta a partir de diluciones 1/8 del amplicón purificado de geles de agarosa, y aplicando la ecuación $E = 10^{-1/\text{valor de la pendiente}}$

2. **Extracción RNA mensajero:** El RNA total de las células infectadas fue obtenido siguiendo el protocolo de Ultraclean Tissue RNA Isolation Kit. Para eliminar los restos de DNA genómico se aplicó un tratamiento con DNAasa.

3. **Obtención DNA complementario (cDNA):** el cDNA se obtuvo mediante una transcripción reversa del RNA mensajero siguiendo las instrucciones del fabricante del kit qScript cDNA síntesis que permite retrotranscribir RNA total en un volumen final de 20 μ l utilizando la enzima qScript transcriptasa reversa, en un tampón que contiene las concentraciones optimizadas de $MgCl_2$, dNTPs, inhibidores de la RNAasa, primers de secuencia aleatoria (octonucleótidos), oligo (dT) primer y estabilizantes. Las muestras se guardaron en alícuotas diluidas 1:3 en TE (Tris-HCl 10 mM pH 8; EDTA 1 mM) a $-20^\circ C$.

4. **qPCR:** la reacción de amplificación se llevó a cabo siguiendo el sistema de iCycler (Bio-Rad), empleando SYBR-Green. Cada amplificación se desarrolló en un volumen final de 20 μ l. La composición de la mezcla de reacción que se empleó de manera sistemática es la siguiente: 50 ng de cDNA; 5 mM $MgCl_2$; 0,2 mM dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP); SYBR Green (1:10.000); 0,5 U Taq DNA polimerasa (Hotmaster). Se indican en la Tabla 1 la secuencia de los primers. En todos los casos, los ciclos de temperatura (30 segundos) fueron precedidos de un periodo de desnaturalización inicial a $95^\circ C$, 5 minutos. La temperatura de hibridación de los primers fue de $65^\circ C$. En todos los casos se realizaron 30 ciclos.

5. **Cálculo expresión diferencial:** los valores del ciclo umbral (C_q) de cada gen en estudio fueron normalizados con los valores C_q del factor de elongación 1α ($EF1\alpha$), gen normalizador. La expresión génica en células infectadas (muestra) en relación con las células no infectadas (control) fue calculada siguiendo la siguiente proporción: $[(E_{ref})^{C_q \text{ muestra}} / (E_{muestra})^{C_q \text{ muestra}}] / [(E_{ref})^{C_q \text{ control}} / (E_{muestra})^{C_q \text{ control}}]$. En el caso del estudio de CXCL7 los cálculos se realizaron siguiendo la siguiente proporción: $(E_{EF1\alpha})^{C_q \text{ EF1}\alpha} / (E_{CXCL7})^{C_q \text{ CXCL7}}$ [269]. Los resultados obtenidos fueron analizados con el programa estadístico SPSS.

GEN	PRIMER	
EF1- α	5' -TGTTCCTGTTGGCCGAGTG-3'	5' -ATTGAAGCCCACATTGTCCC-3'
gp91^{phox}	5' -GGGACACACATGCCTTTGAGT-3'	5' -TCATGGTGCACAGCAAAGTGA-3'
p22^{phox}	5' -TTTGGTGCCTACTCCATTGTG-3'	5' -AGTAATTCCTGGTAAAGGGCC-3'
p67^{phox}	5' -GCCAGACATTCCAAAATCG-3'	5' -CGTCGCCTTGCCTAGGTAATC-3'
p40^{phox}	5' -AGGCTTCACCAGCCACTTTG-3'	5' -GGCCAGGGCACTGCTCTT-3'
p47^{phox}	5' -TCCGAGATGGCTCTGTCCAC-3'	5' -GAGGGTCTTCCGTCTCGTCA-3'
RAC2	5' -TCAGCCAATGTGATGGTGGA-3'	5' -CATAAGAGGCTGGGCTGACG-3'
CCL20	5' -GGCTGCTTTGATGTCAAGTGC-3'	5' -GATGTCACAGCCTTCATTGGC-3'
NAP-2	5' -GCGAGACCACTTCATGCCTT -3'	5' -TGCAGCGGAGTTCAGCATA-3'

Tabla 1: Secuencias de los primers para los estudios de expresión diferencial

ELISA

El método ELISA es un método colorimétrico en el que el anticuerpo secundario biotinilado unido al anticuerpo frente a la proteína en estudio, reacciona con la estreptavidina que lleva acoplada covalentemente la enzima peroxidada de rábano. La cantidad de citocina es proporcional a la cantidad de color detectado espectrofotométricamente cuando se añade el sustrato TMB (3,3', 5,5'-tetrametilbencidina). La lectura de la reacción se midió en un lector de ELISA OPSYSMR, DYNEX a 450 nm. Los sobrenadantes analizados fueron obtenidos de la infección descrita en el siguiente apartado. En todos los casos, el control negativo fue el medio de cultivo. Las muestras fueron analizadas por duplicado.

CXCL7 y CXCL8 fueron cuantificadas mediante el kit Human CXCL7/NAP-2 y Human CXCL8/IL-8 DuoSet ELISA development system. CCL20 fue cuantificado con

el kit de ELISA “Human CCL20/macrophage inflammatory proteína (MIP)-3 α DuoSet”. CCL2 mediante “BD OptEIA human monocyte chemoattractant proteína MCP-1”. En todos los casos se siguieron las indicaciones de cada fabricante.

QUIMIOTAXIS

Mediante este protocolo se determina la capacidad de las diferentes quimiocinas de atraer monocitos, neutrófilos o DC. Los sobrenadantes se obtuvieron de 5×10^5 células infectadas con un MOI = 1 en un volumen final de 800 μ l en placas de 48 pocillos para CXCL7 y en un volumen final de 1100 μ l en placas de 24 pocillos para los estudios de CCL20. En ambos casos la incubación fue durante 18 horas. Anteriormente a la realización de este ensayo, los sobrenadantes fueron centrifugados durante 3 minutos a $8.000 \times g$ a temperatura ambiente en filtros de 0,45 μ m (ultrafree-MC filter units; Millipore Iberica) para eliminar las bacterias y congelados a -80° C.

Para CXCL7, 750 μ l de cada sobrenadante sin diluir fueron empleados para realizar el ensayo. En el caso de CCL20, 250 μ l de sobrenadante obtenido de las células infectadas en presencia o ausencia de la quimiocina se diluyó hasta un volumen final de 750 μ l en medio de cultivo. Los sobrenadantes de células no infectadas y el medio sin presencia de citocinas fueron utilizados como controles. Cada sobrenadante se dispensó en una placa de 24 pocillos sobre la cual se coloca un inserto de 0,8 μ m de poro (Falcon Cell Culture Inserts) con las células recién purificadas (10^5 neutrófilos en un volumen final de 100 μ l o 5×10^4 DC en un volumen final de 200 μ l). Para ver migración de neutrófilos la incubación se realizó durante 30 minutos. En el caso de las DC, el tiempo de incubación fue de 16 horas.

El recuento de los neutrófilos se realizó en una cámara Neubauer mientras que el recuento de las DC se realizó directamente bajo microscopio invertido. Para los cálculos estadísticos, el índice de migración fue calculado dividiendo el número de células migradas bajo cada tratamiento por el número de células migradas en el pocillo control.

MEDICIÓN ANIÓN SUPERÓXIDO MEDIANTE LUMINOL

Esta técnica detecta la producción del anión superóxido mediante la utilización del luminol, sólido capaz de atravesar las membranas de las células reaccionando con el anión superóxido emitiendo luz que es captada, en nuestro caso, por los detectores del TOP-COUNT NXT microplate scintillation y luminiscence counter (Packard). La producción de ROS fue expresada en cuentas por segundo (cps).

Para llevar a cabo esta técnica, se mezcló en un tubo Eppendorf 10^5 o 4×10^5 células junto con el medio HBSS y el luminol a una concentración final de 500 μ M en un volumen de 50 μ l. Esta mezcla se repartió en una placa opaca de 96 pocillos. Posteriormente se añadieron las bacterias (MOI = 1 o MOI = 5), 10^5 CD14⁻ células mononucleares o quimiocinas (NAP-2 (25 ng/ml), IL-8 (25 ng/ml), CCL20 (20 ng/ml)), en función del objetivo de cada experimento. Como control positivo de la actividad se trataron las células con 3 mg/ml de zymosan ó 150 nM de PMA. Como inhibidor de la actividad de la NADPH oxidasa fue añadido 5 μ M de DPI. Finalmente HBSS fue añadido hasta un volumen final de 100 μ l. La mezcla se incubó durante 30 minutos, 5 horas u 8 horas. La luz emitida fue medida a 21° C, 5 segundos por pocillo realizando una única medición.

APOPTOSIS

En este apartado se describen dos metodologías para determinar la apoptosis inducida en los fagocitos infectados con las distintas especies de micobacterias.

Caspase-Glo 3/7 Assay (Promega)

4×10^5 neutrófilos se infectaron con 4×10^5 (MOI = 1) o 2×10^6 (MOI = 5) bacterias. El cultivo se realizó en placas de 96 pocillos en un volumen final de 100 μ l.

Mediante este kit se mide la actividad de la caspasas 3 y 7, proteínas pertenecientes al grupo de las proteasas cisteín-ácido aspártico, mediadoras esenciales de los procesos de

apoptosis, las cuales son activadas en los últimos pasos del proceso. Las caspasas liberadas mediante lisis celular con un disruptor celular ultrasónico, se unen al sustrato luminogénico y, como consecuencia, se produce una señal luminiscente. La luminiscencia detectada será proporcional a la actividad de las caspasas presentes en la muestra.

Se mezclaron 20 μ l del reactivo Kit Caspase-Glo 3/7 con 20 μ l del lisado celular, tratado e infectado según conveniencia del experimento, en placas opacas de 96 pocillos. Se dejó en oscuridad durante 30 minutos, y se midió a 21° C durante 5 segundos por pocillo en el TopCount-NXT microplate scintillation y luminiscent counter (Packard). La apoptosis es expresada en cps.

Frag EL™ DNA Fragmentation Detection Kit, Fluorescent-TdT Enzyme (TUNEL)

Se infectaron 4×10^5 o 2×10^5 fagocitos con 2×10^6 o 1×10^6 bacterias (MOI = 5) respectivamente, en un volumen final de 40 μ l. El cultivo se realizó en placas de 24 pocillos sobre cristales circulares estériles de 11 mm de diámetro. Cuando fuera indicado se añadió NAP-2 (25 ng/ml), CCL20 (20 ng/ml), anti-CCL20 (6 μ g), anticuerpo no específico frente a CCL20 (6 μ g anti-GST Mock) o DPI (5 μ M). Todos estos reactivos se añaden con anterioridad a la adición de la bacteria.

Durante el proceso de apoptosis se activan endonucleasas endógenas que cortan el ADN en oligonucleosomas generando extremos 3'-OH. La enzima dexosinucleotidil transferasa terminal introduce desoxinucleótidos marcados con fluoresceína en dichos extremos de tal forma que detectamos mediante microscopía de fluorescencia las células apoptóticas (verdes) cuando son excitadas a una longitud de onda de 330-380 nm dentro de las células totales, cuyo núcleos son visualizados con DAPI, que se excita a 330-380 nm (azules). Se calculó el porcentaje de células apoptóticas del total de células (Figura 9).

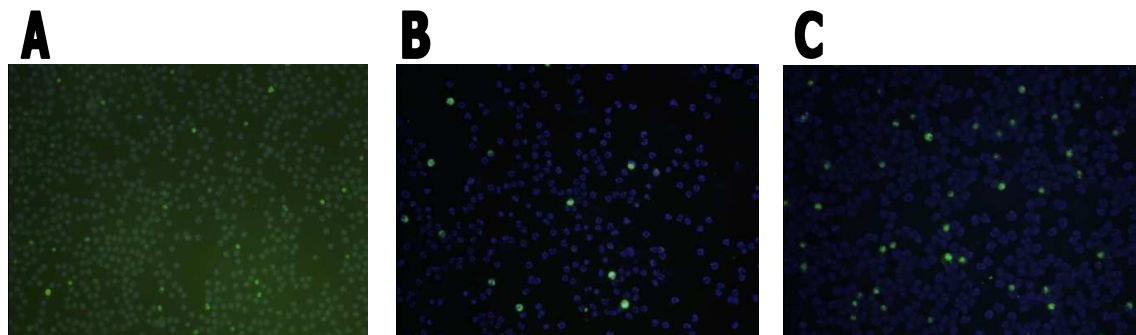


Figura 9: Apoptosis de neutrófilos infectados con micobacterias (TUNEL). (A) neutrófilos sin infectar; (B) neutrófilos infectados con *M. gordonae* y (C) neutrófilos infectados con *M. tuberculosis*.

ESTUDIO PROMOTOR DE PPBP

La posibilidad de la presencia de polimorfismos en la región proximal del promotor de CXCL7 (Transcripcional Regulatory Element Database, número de acceso 32462) que regule la expresión de este gen fue estudiada amplificando el promotor de PPBP a partir de DNA genómico (método “Salting Out” [270]) extraído de sangre de los distintos voluntarios. Los primers empleados (PPBPPr, tabla 2) incluyen sitios de restricción para Xho I y Hind III. La secuencia amplificada comprende la región del nucleótido -14 al -670, considerados desde el nucleótido de inicio de la transcripción. El producto de PCR fue secuenciado en un secuenciador automático de electroforesis capilar Abi Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) siguiendo el protocolo de BigDye terminator V3.1 Cycle sequencing Kit, que consiste en la incorporación de nucleótidos marcados con distintos fluorocromos durante la reacción de amplificación.

CLONACIÓN PPBP

El gen se amplificó partiendo de cDNA obtenido de un voluntario, previa firma del consentimiento informado. La reacción de amplificación se llevó a cabo en el termociclador iCycler (Bio-Rad) con una temperatura de hibridación del cebador de 68° C (el resto de condiciones como en el apartado de qPCR). Los primers (HindIII PPBP y

PPBPXhoI, tabla 2) se diseñaron en función de la secuencia publicada en el Instituto Europeo de Bioinformática, número de acceso CR456805, en los que se incorporaron las secuencias de reconocimiento de las enzimas de restricción Hind III y Xho I. El gen fue clonado en el vector pcR4-TOPO siguiendo las indicaciones del fabricante del kit TOPO TA Cloning Kit for Sequencing, que aprovecha la presencia de una adenina en los extremos del fragmento amplificado, incorporada por la propia polimerasa. La preparación del DNA plasmídico a partir de células competentes DH5 α de *Escherichia coli* transformadas siguiendo el método estándar del cloruro cálcico del “Current Protocols in Molecular Biology” [271] se obtuvo siguiendo las instrucciones del fabricante (Ultraclean Plasmid Prep Kit). El ADN clonado fue comprobado por secuenciación.

EXPRESIÓN DE VARIANTES DE PPBP

La digestión del DNA para obtener el PPBP clonado en pcR4-TOPO e introducirlo en pcDNA3, se realizó con las enzimas de restricción Xho I y Hind III en las condiciones de reacción recomendadas por los respectivos proveedores, y se ligó con la T4 DNA ligasa. A continuación realizamos una mutagénesis dirigida por solapamiento de productos mediante PCR [272], para obtener por delección las variantes post-traduccionales CTAPIII y NAP-2. En ambos casos se mantuvo la secuencia líder (aminoácidos 1-34). El primer paso consistió en realizar dos PCR por cada variante. La primera con el primer pcDNA3_730_750 y CTAPIIIR o NAP-2R y una segunda PCR con el primer pcDNA3_1170_1150 y CTAPIIIF o NAP-2F. De esta manera se eliminó la secuencia que codifica desde el aminoácido 35 al 44 para CTAPIII, y desde el aminoácido 35 al 59 para NAP-2. Con los dos amplicones solapantes se realizó una nueva PCR en la que sólo se incluyeron los primers Hind III-PPBP y PPBP-Xho (tabla 2). Este amplicón fue cortado con Hind III y Xho I, subclonado también en pcDNA3, y el producto comprobado por secuenciación.

Una vez obtenido las tres variantes de PPBP, las células mielocíticas K562 y las células U937 fueron transfectadas de forma transitoria y estable, respectivamente. En ambos casos, 2×10^6 células fueron electroporadas, en medio RPMI-1640 sin suero, con

10 µg de las construcciones en pcDNA3 a 260 V, 1 mF, empleando el Gene-Pulser II (Bio-Rad). Las células fueron cultivadas en 3 ml de medio RPMI-1640 con 10 % de FBS durante dos días en placas de 6 pocillos. A las células U937 se les añadió el antibiótico de selección (G418 200 µg/ml), que a partir de entonces siempre estuvo presente en el medio de cultivo.

GEN	PRIMER
NAP2delF	5´-GCTCTGGCTTCTGAACTCCG-3´
NAP2delR	5´-CGGAGTTCAGAAGCCAGAGC-3´
CTAPIIIIdelF	5´-GCTCTGGCTTACTTTGGCGAA-3´
CTAPIIIIdelR	5´-TTCGCCAAGTAAGCCAGAGC-3´
pcDNA3_730_750	5´-GGACTTTCCAAAATGTCGTA-3´
pcDNA3_1170_1150	5´-ACCTACTCAGACAATGCGAT-3´
PPBPPrF	5´-TACTACTCGAGGGTACTCTTAGGTGGTAG-3´
PPBPPrR	5´-TACAAAGCTTGCAGATAAGTGGCTTCTC-3´
Hind III PPBP	5´-ATCAAAGCTTATGAGCCTCAGACTTG-3´
PPBPXhoI	5´-ATCACTGAGTTAATCAGCAGAT-3´

Tabla 2: Secuencia de los primers utilizados en los estudios del promotor de *CXCL7* y de las variantes de PPBP

WESTERN BLOT

Las muestras analizadas fueron inicialmente inmunoprecipitadas. Para ello, la muestra fue incubada con 1,5 µl de anticuerpo monoclonal anti-NAP-2 durante 1 hora a 4° C en agitación. Posteriormente se añadieron 25 µl de proteína G (GammaBind G Sepharose). Después de incubar la mezcla durante 30 minutos, se realizaron dos lavados con tampón de lisis (10 mM Tris-HCl pH 7,5; 5 mM EDTA; 10 % Glicerol; 1 % TritónX-100) y se añadió el buffer de carga (0.1 M Tris-Cl pH 6,8/ 4 % Glicerol/ 8%

SDS/ 0,2 M DTT), que fue incubado 10 minutos a 95° C. Posteriormente, para mantener las proteínas en su forma reducida, 4 % de iodoacetamida (concentración final) fue añadido e incubado durante 30 minutos a temperatura ambiente. Como marcador de peso molecular se empleó el Peptide Marker Kit.

El Western blot se realizó siguiendo las indicaciones de Schägger H (Nature Protocols) y del “Current Protocol in Molecular Biology” [273; 274]. Al tratarse de proteínas de masa molecular pequeña la electroforesis se realizó en buffer Tris (ánodo)/Tricina (cátodo) en mini-gel de poliacrilamida con dodecil sulfato al 16 %, en altas condiciones reductoras con 6 M de urea durante 70 minutos a 200 V. Las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF (Millipore Iberica) a 100 V durante 60 minutos en tampón de transferencia (CAPS pH 11/ 20 % de metanol). Las membranas fueron bloqueadas con el agente bloqueante proporcionado en el ECL Advance Western Blotting Detection Kit durante 1 hora y posteriormente incubadas con 1 µg/ml anticuerpo anti-NAP-2 humano. Después de tres lavados de cinco minutos en TEN (10 mM Tris-HCl pH 8 /1 mM EDTA/150 mM NaCl), se añadió una dilución 1:1.000 del anticuerpo secundario en tampón de bloqueo, y se incubó durante 20 minutos. Tras tres lavados en tampón TEN, se reveló con el ECL Advance Kit, previamente mencionado.

ADHESIÓN CELULAR

La influencia de NAP-2 en el proceso biológico de adhesión celular se realizó como se describe a continuación: 50 µl de fibronectina (100 µg/ml) fueron incubados durante una noche a temperatura ambiente en placas de 96 pocillos. Se lavaron tres veces con PBS y se añadieron 2×10^4 células U937 que se dejaron incubando durante 90 minutos a 37° C. En los experimentos de inhibición, 30 minutos antes de la adición de las células, 1 mg/ml del péptido con la secuencia GRGDSP fue añadido. Las células no adheridas fueron eliminadas con tres lavados con PBS. Se empleó el método de Nakagarawa para el recuento de las células adheridas, mediante la adición de un tampón de lisis con negro amido para teñir los núcleos celulares (1 % tritón X-100, 0,05% de negro amido, 0,1 M ácido cítrico, pH 2,2) [275]. Se realizó el recuento de núcleos teñidos en una cámara de Neubauer.

Resultados

CARACTERIZACIÓN DEL COMPORTAMIENTO BIOLÓGICO DE NEUTRÓFILOS EN TUBERCULOSIS

Los estudios sobre la inmunidad innata frente a *M. tuberculosis* se han centrado principalmente en los monocitos y los macrófagos alveolares. Los macrófagos alveolares están presentes en el alveolo pulmonar y son las primeras células en fagocitar la micobacteria. Sin embargo, no hay un consenso general sobre la habilidad de estas células para matar *M. tuberculosis* sugiriendo que, otros tipos celulares que participan en la inmunidad innata juegan un papel importante en la resistencia frente a esta enfermedad. El papel que desempeñan los neutrófilos frente a la tuberculosis es controvertido y ha sido considerado de poca relevancia y, sin embargo, son las primeras células en acudir al foco de infección. Por este motivo, decidimos estudiar el papel que desempeñan los neutrófilos frente a *M. tuberculosis* y otras bacterias consideradas no patógenas, mediante la caracterización de la actividad antimicrobiana y la influencia de estas micobacterias en el comportamiento biológico de los neutrófilos en relación a la producción de ROS e inducción de apoptosis.

Influencia de la densidad de neutrófilos en la actividad antimicobacteriana

Li et al. consideran que la capacidad antimicrobiana de los neutrófilos está directamente relacionada con la densidad de éstos y que el umbral crítico es de $3-4 \times 10^5$ neutrófilos/ml [46]. La concentración fisiológica de neutrófilos en sangre es aproximadamente de $3-6 \times 10^6$ células/ml, y concentraciones inferiores a 5×10^5 células/ml son consideradas como neutropénicas [276].

M. gordonae atenuada (HL184Gat) ha sido obtenida como consecuencia de pases sucesivos de *M. gordonae* (HL184G) durante más de un año en la Unidad de Investigación del Complejo Asistencial Universitario de León. Se trata de una bacteria con distinta pigmentación y más fácil de dispersar en medio líquido, pudiendo ser considerada la variante lisa de la cepa original rugosa [69].

Haciendo uso de esta cepa atenuada hemos estudiado la posible influencia de la densidad de neutrófilos en dicha actividad. Para ello, las infecciones fueron realizadas en medio M-SFM con dos concentraciones de neutrófilos (5×10^4 y 5×10^5). Estas cantidades corresponden con 5×10^5 células/ml, característico de individuos con neutropenia, y 4×10^6 células/ml, concentración fisiológica del cuerpo humano. Para reducir la variabilidad experimental, las infecciones se hicieron en ausencia de suero autólogo. Los neutrófilos son células de vida media corta por lo que las infecciones fueron realizadas durante 24 horas.

Los resultados de los experimentos se muestran en la Figura 10. Cuando 5×10^4 neutrófilos fueron infectados, recuperamos significativamente más *M. tuberculosis* de la que partimos, implicando que permiten la multiplicación intracelular de dicha bacteria. A su vez, los mismos neutrófilos no fueron capaces de matar *M. gordonae*, pero tampoco permitieron su multiplicación. Sin embargo, sí fueron capaces de eliminar *M. gordonae* atenuada ya que recuperamos menos bacterias de las inoculadas ($p = 0,019$).

Incrementar la concentración de neutrófilos, no mejoró la capacidad antimicrobiana de estos fagocitos, ya que no observamos diferencias significativas en la cantidad de bacterias entre las dos densidades. Por lo tanto, concluimos que a excepción de *M. gordonae* atenuada, los neutrófilos no son capaces de matar micobacterias inclusive cuando se encuentran a elevada concentración.

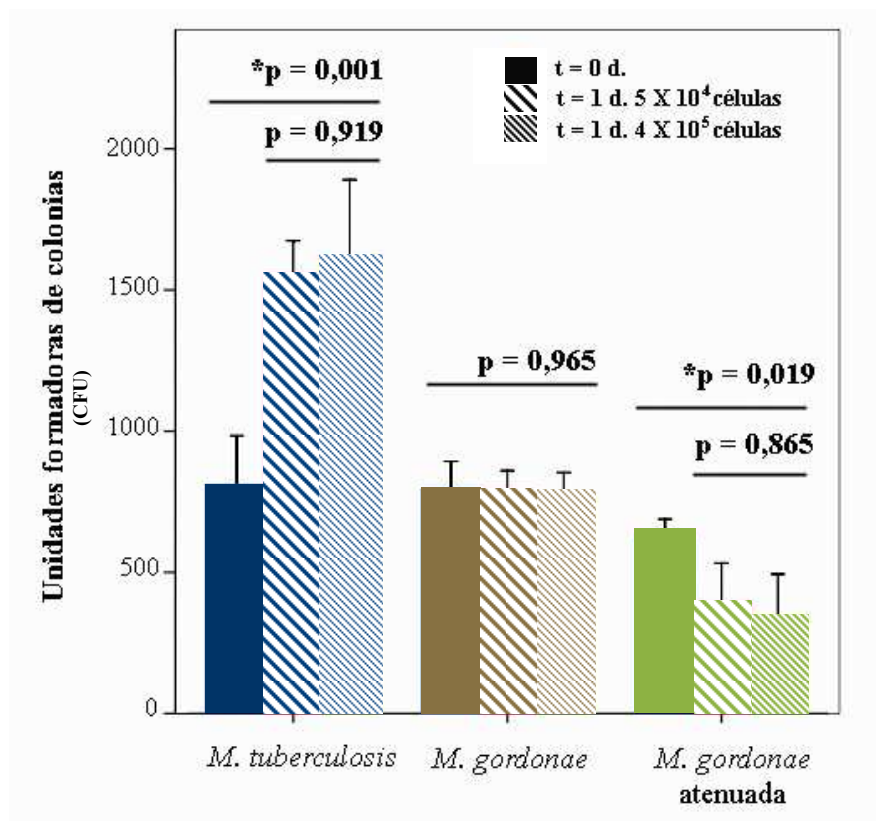


Figura 10: Actividad antimicobacteriana de neutrófilos. Los datos representan las CFU en el momento de infección ($t = 0$) y en el momento de la lisis celular al día de infección ($t = 1$ d) de cada una de las concentraciones (5×10^4 o 4×10^5) de neutrófilos utilizada. Las células fueron infectadas aproximadamente con 10^3 bacterias y los datos representan la media + desviación estándar (SD) de CFU en cuatro experimentos independientes. Las líneas largas corresponden a una prueba ANOVA y las líneas cortas a la prueba de Tukey HSD. * $p < 0,05$ se consideró significativo.

En estos momentos desconocemos el motivo de la mayor susceptibilidad de la cepa atenuada. Una causa puede residir en que sea peor fagocitada por la existencia de cambios estructurales en la pared bacteriana y no en la capacidad del neutrófilo para eliminar el bacilo, que es la actividad que realmente nos interesa. Por este motivo analizamos mediante citometría de flujo con bacterias marcadas con FITC, la internalización de cada una de las cepas. En infecciones realizadas durante 60 minutos con 20 bacterias por cada neutrófilo, la media de células infectadas por *M. gordonae* (34,0 SD 13,9 %) no fue significativamente diferente de las infectadas por *M. gordonae* atenuada (37,3 SD 12,7 %, $n = 4$, $p = 0,736$ mediante el test de t- Student).

Influencia de la producción de ROS en la actividad antimicrobiana de neutrófilos

Los neutrófilos producen ROS cuando son infectados por bacterias como *M. tuberculosis*. Algunos autores consideran que emplean este mecanismo como estrategia para destruir las bacterias fagocitadas [67]. Como hemos constatado que *M. gordonae* atenuada es eliminada por los neutrófilos, decidimos medir la producción de ROS en neutrófilos infectados (*M. gordonae*, *M. gordonae* atenuada y *M. tuberculosis*, MOI = 5) o no infectados con micobacterias para averiguar si su capacidad para matar *M. gordonae* atenuada es dependiente de este mecanismo.

ROS es medido a los 30 minutos, a las 5 y a las 8 horas después de la infección en medio M-SFM. Como control positivo empleamos el zymosan; partícula inerte procedente de paredes de levaduras cuya fagocitosis induce elevadas cantidades de dichos radicales. Transcurridos 30 minutos de la infección, observamos que *M. tuberculosis* induce significativamente ($p < 0,001$) mayor cantidad de ROS que las células no infectadas. Por el contrario, ambas cepas de *M. gordonae* producen cantidades similares de ROS entre ellas y con respecto a las células sin infectar ($p > 0,8$). Cuando el ROS es medido a las 5 y 8 horas post-infección, la producción en células sin infectar, estimuladas con zymosan e infectadas con *M. tuberculosis* es menor, aunque las diferencias siguen siendo significativas ($p < 0,001$). Sin embargo, la producción de ROS en neutrófilos infectados con *M. gordonae* y *M. gordonae* atenuada se mantiene en el tiempo. Por esta razón, al comparar la producción de ROS de estas dos micobacterias, con la obtenida en células no infectadas, es estadísticamente significativa con una $p \leq 0,002$.

Según estos resultados podríamos concluir que la capacidad de los neutrófilos de matar *M. gordonae* atenuada no está asociada a la producción de ROS. De hecho, *M. tuberculosis* se replica en neutrófilos a pesar de la explosión oxidativa que se produce cuando estas células son infectadas por esta micobacteria (Figura 11).

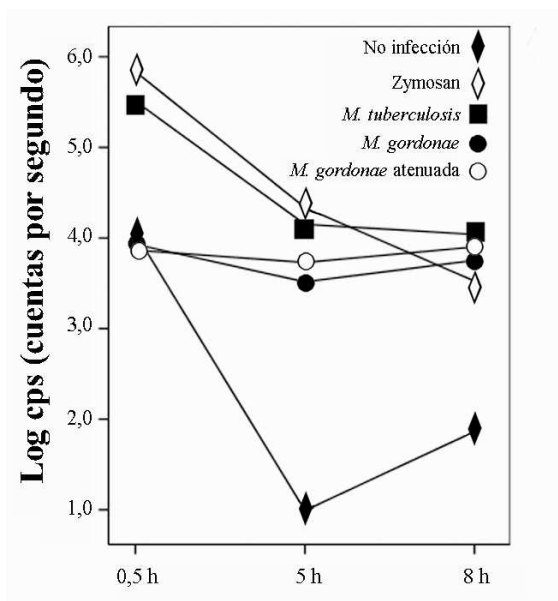


Figura 11: Producción de ROS en neutrófilos infectados con micobacterias. 4×10^5 neutrófilos fueron estimulados con zymosan y 2×10^6 bacterias. Las células no infectadas fueron empleadas como control. La producción de ROS fue medida a los 30 minutos, 5 y 8 horas. Los datos son el logaritmo de cps emitidos en presencia de luminol, representando la media de cuatro experimentos independientes. * $p < 0,05$ se consideró significativo.

Expresión de las subunidades de la NADPH oxidasa

Como consecuencia de las diferencias observadas en la producción de ROS, decidimos determinar si la infección de los neutrófilos con *M. gordonae*, *M. gordonae atenuada* y *M. tuberculosis* repercutía en variaciones de expresión de las distintas subunidades de la NADPH oxidasa. Para ello infectamos neutrófilos en medio M-SFM durante 18 horas con las distintas micobacterias (MOI = 1), y analizamos mediante PCR a tiempo real el nivel de expresión relativa del complejo enzimático ($gp91^{phox}$, $p22^{phox}$, $p47^{phox}$, $p40^{phox}$, $p67^{phox}$ y RAC2). No encontramos variaciones significativas en expresión génica de ninguna de las subunidades de dicha enzima cuando los neutrófilos son sometidos a infección con las distintas micobacterias en comparación con las células no infectadas (datos no mostrados).

Apoptosis en neutrófilos infectados con micobacterias

Los neutrófilos son células con una vida media breve y sufren apoptosis espontánea. *M. tuberculosis* provoca apoptosis en neutrófilos [55] y macrófagos. Algunos autores proponen que la inducción de apoptosis puede influir en la supervivencia de las micobacterias [277], por este motivo, se analizó la relación entre la inducción de apoptosis y la capacidad antimicobacteriana de los neutrófilos.

El nivel de apoptosis fue medido mediante dos métodos: luminometría, empleando un sustrato de caspasas que emite luz cuando es hidrolizado; y microscopía fluorescente con el Kit FragEL DNA fragmentation, en el que se cuantifica el número de células apoptóticas con respecto al número total de neutrófilos. El nivel de apoptosis de las células sin infectar representa la apoptosis espontánea.

Como se observa en la Tabla 3, mientras que *M. tuberculosis* induce apoptosis, ni *M. gordonae* ni *M. gordonae* atenuada alcanzan niveles estadísticamente significativos cuando son comparados con las células sin infectar, aunque los niveles de apoptosis de *M. gordonae* fueron más elevados que los de la cepa atenuada.

Tabla 3: Apoptosis en neutrófilos infectados con micobacterias (Luminometría)

	Apoptosis	p
No Infección	4,79 SD 0,25 (4,58-5,00)	
<i>M. tuberculosis</i>	5,33 SD 0,45 (4,61-6,05)*	0,040
<i>M. gordonae</i>	5,26 SD 0,30 (4,78-5,74)	0,080
<i>M. gordonae</i> atenuada	4,73 SD 0,35 (4,17-5,28)	0,985

4×10^5 neutrófilos en medio M-SFM fueron infectados con un MOI = 5. Las células sin infectar fueron incluidas como control negativo. Los datos representan el logaritmo del número de cps con su SD (intervalo de confianza del 95 %). La prueba de Dunnett's fue empleada para comparar el control negativo (n = 8) y cada uno de los otros grupos (n = 4). * p < 0,05 se consideró significativo.

La cuantificación de apoptosis por microscopía de fluorescencia se realizó a la 2, 5 y 8 horas post-infección. La Figura 12 muestra que la apoptosis obtenida en células no infectadas e infectadas con *M. gordonae* permanece estable durante el tiempo de infección, pero la apoptosis en células infectadas con *M. tuberculosis* y *M. gordonae* atenuada es algo más elevada. *M. tuberculosis* es la única bacteria que aumenta significativamente el nivel de apoptosis en los tres tiempos estudiados con respecto a las células sin infectar ($p \leq 0,009$).

Estos resultados coinciden con los realizados mediante luminometría aunque los niveles obtenidos para ambas cepas de *M. gordonae* son más cercanos cuando la apoptosis es determinada por microscopía fluorescente que por luminometría. Como no hay diferencias entre las cepas de *M. gordonae*, a pesar de las grandes diferencias de susceptibilidad a la actividad antimicrobiana de los neutrófilos, concluimos que la apoptosis no juega un papel importante en la actividad antimicrobiana de neutrófilos frente a *M. gordonae* atenuada.

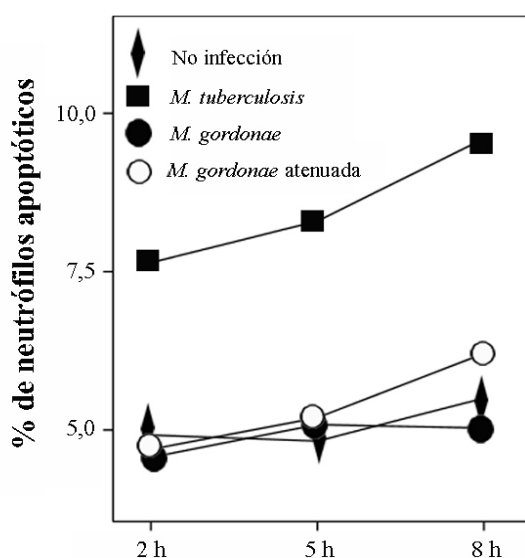


Figura 12: Apoptosis en neutrófilos infectados con micobacterias (TUNEL). 4×10^5 neutrófilos fueron infectados con 2×10^6 bacterias. Las células sin infectar son el control de la apoptosis espontánea. Los datos son las proporciones (expresados en porcentajes) de células marcadas con fluoresceína (apoptóticas) con respecto a las células marcadas con DAPI (número total de células). Los datos representan la media de cuatro experimentos independientes.

Algunos autores, han observado una conexión entre la producción de ROS y apoptosis en neutrófilos [164]. En modelo de ratón, sin embargo, se ha descrito que la inducción de apoptosis de macrófagos infectados con *M. tuberculosis* es independiente de ROS [278]. Para determinar si en nuestro sistema existe dicha relación añadimos DPI, un inhibidor de la NADPH oxidasa, a los neutrófilos infectados con *M. tuberculosis*. Los resultados obtenidos confirman nuestra hipótesis. DPI induce una disminución significativa en la producción de ROS (Figura 13, panel A), con una consiguiente disminución del porcentaje de apoptosis celular (Figura 13, panel B). Con estos resultados, podemos concluir que ROS induce apoptosis pero no incrementa la actividad antimicrobacteriana de los neutrófilos infectados con *M. tuberculosis*.

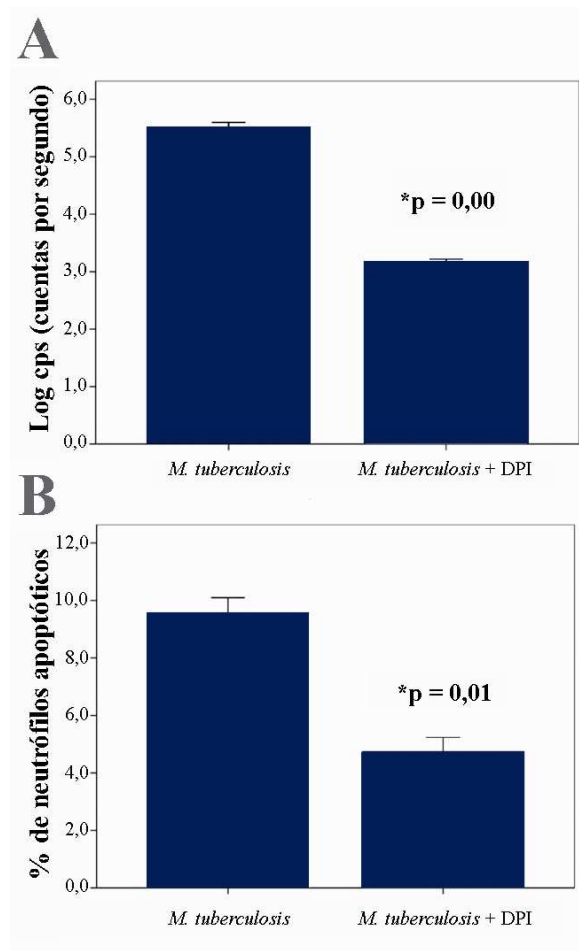


Figura 13: Influencia del inhibidor de la NADPH oxidasa, DPI, en la producción de ROS y apoptosis de neutrófilos infectados con *M. tuberculosis*. (A) 4×10^5 neutrófilos fueron infectados con 2×10^6 bacterias y DPI ($5 \mu\text{M}$). Los datos representan el logaritmo de cps emitidos en presencia de luminol. (B) 2×10^5 neutrófilos fueron infectados con 1×10^6 bacterias. Los datos son las proporciones (expresados en porcentajes) de células marcadas con fluoresceína (apoptóticas) con respecto a las células marcadas con DAPI (número total de células). En ambos paneles los datos representan la media + SD de cuatro experimentos independientes. El test estadístico empleado fue el de t-Student. * $p < 0,05$ se consideró significativo.

PRODUCCIÓN E INFLUENCIA DE QUIMIOCINAS EN FAGOCITOS INFECTADOS CON MICOBACTERIAS Y *L. pneumophila*

Los monocitos/macrófagos alveolares y los neutrófilos producen, cuando son infectados por micobacterias, un amplio rango de citocinas y quimiocinas para llevar a cabo el complejo mecanismo de defensa frente al patógeno [52; 74; 197] Estas moléculas van a participar en la inmunidad mediante distintos mecanismos. Dado el interés del grupo en el análisis de las diferencias de expresión génica en MDM infectados por micobacterias y *L. pneumophila*, se iniciaron dos líneas de investigación paralelas.

Por un lado, se escogieron genes que pudieran estar relacionados con la respuesta antimicrobiana de MDM. Entre los genes analizados se incluyen receptores de citocinas, subunidades de la NADPH oxidasa, genes de susceptibilidad como la proteína de macrófagos asociada a resistencia natural 1, subunidades de la bomba de protones vacuolar y algunas quimiocinas CXC/CC (CXCL1, CXCL4, CXCL9, CXCL10, CCL5, CCL20) descritas por su capacidad antimicrobiana [231]. CCL20 fue la única quimiocina cuya expresión, en los estudios preliminares, parecía ser modificada por la infección con *M. tuberculosis*, razón por la cual decidimos continuar con su estudio y determinar su papel en la lucha frente a las micobacterias.

Por otro lado, en el laboratorio está disponible una genoteca de substracción, realizada con un kit de hibridación subtractiva por PCR (Clontech), de MDM activados con IFN γ e infectados o bien con *M. tuberculosis* o con *L. pneumophila*. Este modelo fue elegido porque MDM activados con IFN γ son capaces de eliminar *L. pneumophila*

pero no *M. tuberculosis*, permitiéndonos tener un control de activación de los MDM. Una de las moléculas identificadas, la cual está más expresada en MDM infectados con *M. tuberculosis*, fue *CXCL7*, una quimiocina que atrae neutrófilos (modelo celular en el que se había centrado el trabajo) y que está poco caracterizada en fagocitos humanos y en la inmunidad frente a la tuberculosis.

Puesto que la función biológica de ambas moléculas es similar, atraer células a los focos de infección, se estudiaron simultáneamente, y se indagó si cumplían funciones alternativas a la quimiotaxis durante las infecciones con micobacterias.

CXCL7

Expresión génica de *CXCL7* en MDM infectados con *M. tuberculosis* y *L. pneumophila*

CXCL7 ha sido identificado, en un estudio previo a este trabajo, como un gen expresado en mayor medida en MDM activados con IFN γ e infectados con *M. tuberculosis*, que con respecto a los infectados con *L. pneumophila* en una genoteca de substracción disponible en el laboratorio. Para corroborar la expresión diferencial de este gen, obtuvimos una muestra independiente de cDNA de MDM de voluntarios sanos. 5×10^5 células activadas con IFN γ fueron infectadas con 5×10^5 bacterias durante 18-20 horas en medio RPMI con 10 % FBS. Como esperábamos, *CXCL7* se expresó más en MDM activados con IFN γ e infectados con *M. tuberculosis* que infectados con *L. pneumophila* (Figura 14). La diferencia obtenida no fue estadísticamente significativa ($p = 0,13$), pero suficiente para ser detectada en la genoteca.

Expresión proteica de *CXCL7* en MDM

Mediante ELISA, detectamos la expresión de *CXCL7* en los sobrenadantes de MDM activados con IFN γ e infectados con ambas bacterias. Obtuvimos una elevada concentración de esta proteína aunque sin diferencias entre MDM infectados con *M. tuberculosis* (Mediana = 12,7 ng/ml) y *L. pneumophila* (Mediana = 11,3 ng/ml). A

efectos comparativos, también determinamos la producción de CXCL7 en células sin infectar (Mediana = 12,6 ng/ml). A pesar de no haber diferencias, continuamos estudiando el significado biológico de esta proteína en células infectadas por ser producida en ng/ml y haber muy poca información sobre ella.

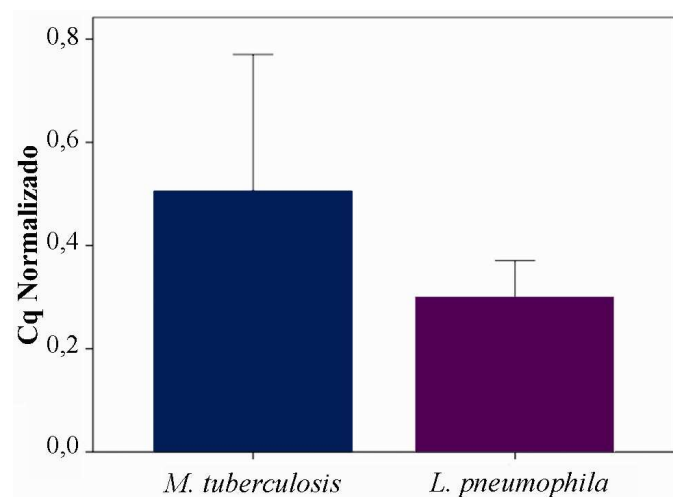


Figura 14: Expresión de CXCL7 en MDM activados con IFN γ . Los datos representan la media \pm SD del Cq normalizado (n = 5) medido mediante qPCR. La comparación mediante el test t-Student no fue estadísticamente significativo ($p > 0,05$).

Expresión génica y proteica de CXCL7 en neutrófilos. Ausencia de polimorfismos en el promotor proximal

NAP-2, una variante de CXCL7, es una quimiocina descrita principalmente por atraer neutrófilos [233]. Por esta razón decidimos caracterizar su actividad en estas células. La producción de esta proteína por los monocitos ya se conoce desde hace algún tiempo [249], pero no hemos encontrado en la literatura ninguna descripción sobre su producción en neutrófilos, aunque dichas células hayan sido empleadas en múltiples estudios de modificaciones post-traduccionales. Por este motivo, fue sorprendente detectar expresión génica en dos de los cinco voluntarios estudiados. Mediante ELISA confirmamos expresión proteica en los sobrenadantes de estos dos voluntarios cuando los neutrófilos son infectados en medio RPMI con 10 % FBS tanto por *M. tuberculosis* (Mediana = 7,8 y 30,9 ng/ml) como por *L. pneumophila* (Mediana = 10,3 y 32,1 ng/ml). Las células de los otros tres voluntarios no produjeron CXCL7.

Como consecuencia de estas diferencias de expresión, consideramos la posibilidad de la presencia de polimorfismos en la región proximal del promotor de CXCL7 (Transcripcional regulatory Element Database, número de acceso 32462) que

regule la expresión de este gen. Para ello amplificamos el promotor por PCR (ver apartado de material y métodos). La secuencia amplificada y estudiada comprende la región del nucleótido -14 al -670, considerados desde el nucleótido de inicio de la transcripción. En los cinco voluntarios estudiados, las secuencias fueron idénticas a la secuencia del promotor de la base de datos. Por lo tanto no conocemos el mecanismo responsable de las diferencias encontradas en la expresión de este gen entre individuos.

Producción de las diferentes variantes de CXCL7 en fagocitos y células K562

Han sido descritas varias variantes post-traduccionales originadas a partir del gen *CXCL7*. Nuestro objetivo es determinar qué formas del PPBP, la mayor proteína codificada a partir de *CXCL7*, son producidas en los sobrenadantes de neutrófilos y MDM infectados y sin infectar. Para ello, construimos, conservando la secuencia líder, tres plásmidos los cuales expresan PBP, CTAPIII y NAP-2. Dichos plásmidos son transfectados en las células mielocíticas K562. Consideramos apropiado esta línea celular porque poseen marcadores megacariocíticos cuando son diferenciadas con PMA [279] y las plaquetas producen gran cantidad de NAP-2 [232].

Los sobrenadantes de las células transfectadas se inmunoprecipitaron y analizaron mediante Western blot (Figura. 15, A). Los pesos moleculares correspondientes a PPBP, PBP, CTAPIII y NAP-2 son respectivamente 14,0, 10,3, 9,3 y 7,6 KD. No obtuvimos ninguna proteína reconocida por el anticuerpo anti-NAP-2 en las células K562 no transfectadas (línea 6). La construcción de NAP-2 (línea 2) genera una proteína que tiene el mismo peso molecular que la proteína recombinante NAP-2 (línea 1). La construcción de PPBP (línea 4) genera tres productos proteicos con los pesos moleculares coincidentes a los de las proteínas PPBP, PBP y NAP-2.

Estos resultados muestran la capacidad de éstas células, aún no siendo diferenciables a macrófagos [280], de proteolizar PBP a NAP-2. Además de estas tres bandas, observamos una de mayor tamaño molecular la cual no corresponde con ninguna de las variantes de *CXCL7*. No conocemos la naturaleza de esta banda aunque sospechamos que es una forma oxidada de la PPBP que ha resistido las fuertes condiciones reductoras de la electroforesis. De hecho, esta banda no aparece en el lisado

de éstas células transfectadas (línea 5), que claramente muestran PPBP y PBP. La construcción de CTAPIII (línea 3), genera una proteína que migra similarmente a la PBP ya que sólo hay 1KD de diferencia entre ambas proteínas.

Cuando analizamos los sobrenadantes de las células fagocíticas (Figura 15, B, líneas 1 y 2), observamos, tanto en MDM como en neutrófilos, una proteína que migra como la proteína PBP en el sobrenadante de K562 (línea 3). Además, en el caso de los MDM, detectamos una pequeña cantidad de PPBP. Como esperábamos, ambos tipos celulares producen PBP y generan NAP-2 en muy pequeñas cantidades. Además, no observamos diferencias de expresión de las distintas variantes de CXCL7 cuando ambos fagocitos son infectados con *M. tuberculosis* o *L. pneumophila* (datos no mostrados).

Al realizar estudios preliminares sobre la presencia de CXCL7 en los sobrenadantes de MDM y neutrófilos, el suero humano interfería en su detección ya que observamos la presencia de CXCL7 en grandes cantidades. Estos resultados fueron los que nos llevaron a realizar los cultivos celulares en FBS. Cuando analizamos en el suero humano las variantes de CXCL7, observamos una proteína que migra como PBP y otra, en muy pequeña concentración, que migra como la PPBP (línea 5).

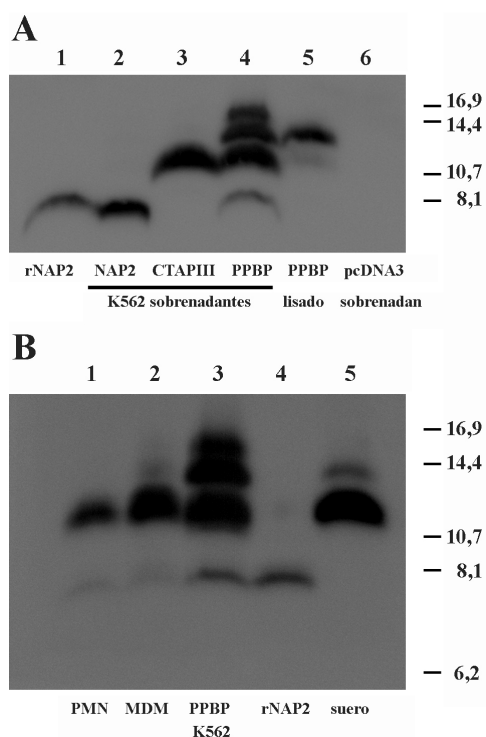


Figura 15: Análisis, mediante Western blot, de los sobrenadantes de las células K562 transfectadas y de los fagocitos humanos. rNAP-2, 2 ng de NAP-2 recombinante. (A) inmunoprecipitación de 75 μ l de los sobrenadantes de K562 transfectadas con la construcción indicada o con pcDNA3 (pcDNA3 sobrenadantes); lisado de 4×10^6 células transfectadas con PPBP. (B) Inmunoprecipitación de 600 μ l de sobrenadante de neutrófilos (PMN) y MDM infectados con *M. tuberculosis*; PPBP K562, 75 μ l de sobrenadantes de células K562 transfectadas; suero, 0,2 μ l de suero humano.

Quimiotaxis mediada por CXCL7

Una de las actividades biológicas mejor caracterizadas de las quimiocinas CXC, es su capacidad de atraer neutrófilos. Se conoce que *M. tuberculosis* induce la producción de CXCL8 [281], quimiocina que se une a los mismos receptores (CXCR1 y CXCR2) que CXCL7 [234] y que también atrae neutrófilos. Consecuentemente, analizamos el nivel de quimiotaxis inducido por CXCL7 presente en sobrenadantes de MDM infectados con *M. tuberculosis* en comparación con la CXCL8.

Previamente a la realización del ensayo de quimiotaxis confirmamos, mediante ELISA, la presencia de ambas quimiocinas en los sobrenadantes de MDM (mediana de 8,3 ng/ml de CXCL7 y 102 ng/ml de CXCL8). CXCL8 también fue detectada en los sobrenadantes de las células sin infectar (Mediana = 66,9 ng/ml) con una concentración inferior con respecto a los sobrenadantes de células infectadas.

La Figura 16 refleja los resultados obtenidos. Por un lado, detectamos poca quimiotaxis en los sobrenadantes de células no infectadas cuando se comparó con el medio sin células (control negativo). Por otro lado, los neutrófilos fueron eficazmente atraídos por moléculas presentes en los sobrenadantes de MDM infectados con *M. tuberculosis*, y las diferencias con el control negativo fueron estadísticamente significativas.

Para identificar las moléculas involucradas en esta actividad, utilizamos anticuerpos anti-NAP-2 (el cual reconoce todas las variantes de CXCL7) y anti-IL-8 (1 µg en ambos casos). En presencia de anti-NAP-2 detectamos algo de inhibición, pero la quimiotaxis fue totalmente abolida en presencia de anti-IL-8. El índice de migración calculado fue inferior incluso al observado para el sobrenadante de células no infectadas.

Estos resultados sugieren que CXCL8, es la principal quimiocina responsable de atraer neutrófilos, aunque parte de la quimiotaxis puede ser inducida por las variantes de CXCL7. Es difícil concluir que la principal función de CXCL7 en este modelo celular sea atraer neutrófilos, ya que parece que la CXCL8 es la quimiocina que principalmente realiza esta función. Como consecuencia, nos preguntamos acerca de otras funciones biológicas que pueda desempeñar esta proteína.

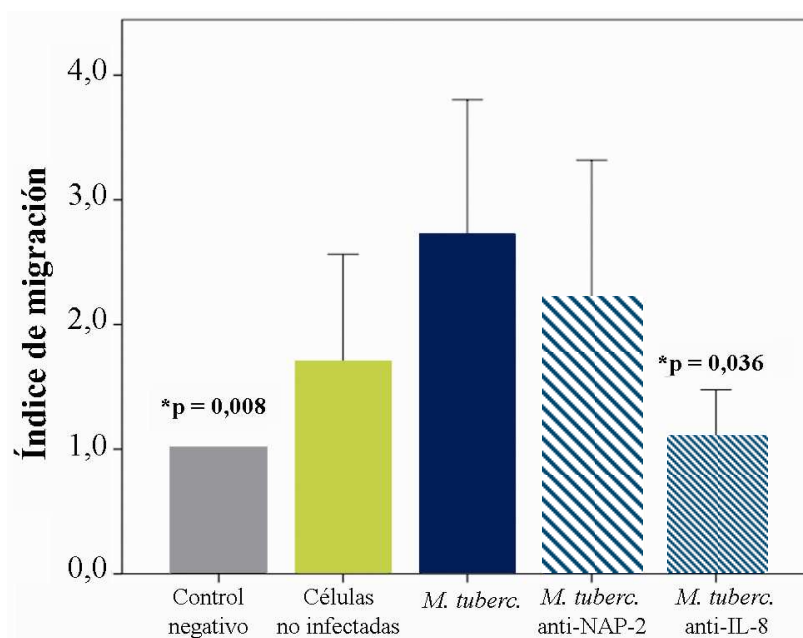


Figura 16: Actividad quimiotáctica de CXCL7 en neutrófilos. Los datos representan la media del índice de migración \pm SD de los neutrófilos ante la presencia de los sobrenadantes de MDM infectados con *M. tuberculosis*. Como control empleamos medio sin células el cual es considerado por tener siempre un índice de 1 (SD = 0). Las comparaciones por parejas con los sobrenadantes de las células infectadas con *M. tuberculosis* son consideradas significativas cuando * $p < 0,05$.

Influencia de NAP-2 en la actividad antimicrobiana de MDM y neutrófilos

Los resultados obtenidos en el transcurso de este trabajo corroboran los obtenidos por otros autores; que *M. tuberculosis* se multiplica en MDM [282] y neutrófilos [72], y añadir NAP-2 no afecta a este comportamiento (datos no mostrados). Una situación diferente fue observada, sin embargo, para *L. pneumophila* (Tabla 4). Como esperábamos [17], los neutrófilos matan una pequeña proporción de esta bacteria después de un día de exposición a la infección, porque hay una significativa disminución en el número de bacterias recuperadas si son comparadas con el inóculo inicial. Sin embargo, no fueron detectadas diferencias cuando las células fueron tratadas con IFN γ o con NAP-2.

Por el contrario, *L. pneumophila* se multiplica en MDM sin activar, y tras cuatro días se produce un incremento de 3 órdenes de magnitud en el número de bacterias recuperadas. Añadir NAP-2 a la infección, no altera este nivel de multiplicación. Sin embargo, cuando comparamos con el inóculo inicial en MDM infectados, NAP-2 parece cooperar con IFN γ para matar bacterias o inhibir su multiplicación. Cuando únicamente añadimos IFN γ en el medio de cultivo, observamos disminución en el número de bacterias viables, pero sin alcanzar significación estadística. Estos resultados implican un efecto bacteriostático de esta quimiocina porque inhibe la multiplicación intracelular de *L. pneumophila*. La capacidad antimicrobiana inducida por IFN γ alcanza significación estadística en presencia de NAP-2, disminuyendo en 0.5 órdenes de magnitud el número de CFU recuperadas tras el periodo de incubación. Este resultado sugiere que aunque IFN γ es la citocina crítica que controla la infección por *L. pneumophila*, otros factores como NAP-2, tiene una acción sinérgica que optimiza la actividad antimicrobiana de MDM.

Tabla 4: Influencia de NAP-2 en la actividad antimicrobiana de fagocitos frente a *L. pneumophila*

	Neutrófilos	P	MDM	P
Bacteria inoculada	2,83 SD 11 (2,66-3,00)		2,85 SD 0,23 (2,57-3,13)	
No tratamiento	2,51 SD 0,10 (2,35-2,66)*	0,002	5,11 SD 1,31 (3,49-6,73)	0,012
NAP-2	2,49 SD 0,07 (2,38-2,60)*	0,002	5,13 SD 1,19 (3,64-6,60)*	0,012
IFNγ	2,54 SD 0,12 (2,35-2,73)*	0,021	1,96 SD 0,73 (1,05-2,87)	0,196
IFNγ + NAP-2	2,49 SD 0,13 (2,28-2,70)*	0,009	1,44 SD 1,07 (0,12-2,77)*	0,032

10⁵ células infectadas con 10³ bacterias en medio RPMI suplementado con 10 % FBS en presencia o ausencia de 25 ng/ml de IFN γ y/o 25 ng/ml de NAP-2. Los datos son la media de logaritmo del número de colonias con su SD (intervalo de confianza del 95 %) de cuatro (neutrófilos) y cinco (MDM) experimentos independientes. Fueron consideradas significativas las comparaciones por pares frente al inóculo inicial de la bacteria cuando * p < 0,05.

Actividad antimicrobiana de NAP-2 en células U937

Para obtener evidencias adicionales sobre la influencia de NAP-2 en la capacidad antimicrobiana de MDM, realizamos una transfección estable de la línea monocítica U937 con la construcción de NAP-2. Dichas células fueron diferenciadas a macrófagos con PMA e infectadas con *L. pneumophila* en presencia de IFN γ (Tabla 5). Como control negativo empleamos las mismas células transfectadas únicamente con el vector pcDNA3.

El nivel de multiplicación obtenido en este caso, es tres veces mayor al inóculo inicial el cual se ve inhibido cuando añadimos IFN γ aunque las diferencias no fueron significativas. En las células transfectadas con NAP-2, el crecimiento de *L. pneumophila* fue significativamente inhibido, a pesar de que el IFN γ no posee la misma actividad que la observada en MDM. Por lo tanto concluimos que, NAP-2 aumenta la actividad antimicrobiana de las células U937 transfectadas.

Estos resultados no son un reflejo perfecto de lo que ocurre en las células primarias, pero debemos tener en cuenta que estas células expresan constitutivamente NAP-2 (no PBP), y que no se comportan exactamente como los MDM, porque en estas células, el IFN γ sólo inhibe parcialmente la multiplicación de *L. pneumophila*.

Tabla 5: Influencia de NAP-2 en la actividad antimicrobiana de las células U937 infectadas con *L. pneumophila*

	Log CFU	P
Bacteria inoculada	2,88 SD 0,23 (2,51-3,26)*	< 0,001
pcDNA3	5,77 SD 0,26 (5,35-6,19)	
pcDNA3 + IFNγ	5,60 SD 0,13 (5,40-5,80)	0,798
pcDNA3-NAP-2	5,23 SD 0,24 (4,86-5,61)*	0,023
pcDNA3-NAP-2 + IFNγ	5,22 SD 0,19 (4,91-5,52)*	0,018

10⁵ células infectadas con 10³ bacterias en medio RPMI suplementado con 10 % FBS en presencia o ausencia de 25 ng/ml de IFN γ y/o 25 ng/ml de NAP-2. Los datos son la media del logaritmo del número de colonias con su SD (intervalo de confianza del 95 %) de cuatro experimentos independientes. Fueron consideradas significativas las comparaciones por pares frente al grupo pcDNA3 cuando * p < 0,05.

Adherencia de U937 transfectada con NAP-2

Mientras cultivamos las células U937 observamos que las células transfectadas con la construcción de NAP-2, pero no con las transfectadas únicamente con el vector pcDNA3, se adherían a la superficie de las placas de cultivo. Ésta puede ser una actividad biológica, ya descrita previamente [253], que puede conferir a CXCL7 un papel importante durante la infección.

En estudios preliminares analizamos la capacidad de adhesión de las células U937, modelo excelente para el estudio de este fenómeno, y observamos un aumento dramático cuando el sustrato era fibronectina con respecto al plástico de la placa de cultivo, a la albúmina de suero bovino, a la laminina y al colágeno IV. Para caracterizar mejor esta actividad, utilizamos un inhibidor de la fibronectina, un péptido con la secuencia GRGDSP, el cual incluye el motif para la fibronectina RGD reconocido por las integrinas [253]. El resultado final obtenido es que la presencia de este péptido compite con la fibronectina para el establecimiento de la adhesión celular (Figura 17).

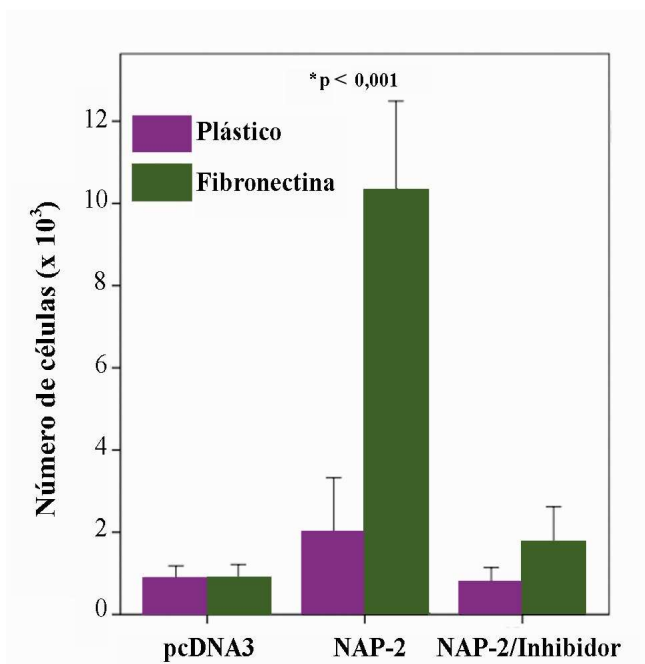


Figura 17: Adhesión de las células transfectadas con NAP-2 tanto en plástico como en pocillos con fibronectina. Los datos representan la media del número de células \pm SD remanentes en cada pocillo después del lavado de las células no adherentes. El control negativo son las células transfectadas con el vector pcDNA3. La inhibición de la unión a fibronectina fue acompañada por la incubación de las células en presencia del péptido GRGDSP. Fueron consideradas significativas las comparaciones por pares cuando $* p < 0,05$.

CCL20

Expresión génica de *CCL20* en MDM infectados con *M. tuberculosis* y micobacterias no tuberculosas

Los macrófagos son la diana principal de *M. tuberculosis*, los cuales como consecuencia de la infección producen un abanico de citocinas que van a influir en la respuesta inmune del organismo [74]. Como CCL20 es una quimiocina que puede ser muy importante en los primeros estadios de la enfermedad, y en estudios preliminares hemos observado diferencias de expresión cuando las células son infectadas, decidimos corroborar estos resultados. Para ello se infectaron 5×10^5 MDM con 5×10^5 *M. tuberculosis* en medio M-SFM y se observó que el nivel de expresión se ve incrementado drásticamente (39 veces) cuando las células están infectadas con dicha micobacteria. Para conocer si esta diferencia de expresión era específica para *M. tuberculosis*, los MDM fueron infectados con otras bacterias no tuberculosas (*M. kansasii* y *M. avium*) observando que *CCL20* fue, en ambos casos, más expresada en MDM infectados que sin infectar, pero las diferencias no fueron tan significativas (Figura 18). La importancia del IFN γ en la inmunidad frente a la tuberculosis es ampliamente conocida [132]. Para determinar la influencia del IFN γ en la expresión de *CCL20* en MDM no infectados e infectados con *M. tuberculosis*, añadimos dicha citocina (100 ng/ml) al medio de cultivo M-SFM. Observamos que en ambos casos la expresión de *CCL20* esta inhibida aunque la diferencia es únicamente significativa en el caso de las células sin infectar (Figura 18).

Expresión proteica de CCL20

Constatada la expresión de RNA mensajero, cuantificamos, mediante ELISA, la cantidad de proteína en los sobrenadantes de MDM infectados con las distintas micobacterias en presencia o ausencia del IFN γ . Aunque la expresión de *CCL20* en MDM es constitutiva, en la Figura 19 se observa que no se detectó dicha proteína en algunos de los sobrenadantes. CCL20, sin embargo, fue detectada en todos los sobrenadantes de MDM infectados con *M. tuberculosis* y en tres y dos de los cinco

sobrenadantes de MDM infectados con *M. kansasii* y *M. avium* respectivamente. La media de CCL20 detectada en MDM activados con IFN γ estén o no infectados con *M. tuberculosis* fue inferior a sin activar. Únicamente se observó diferencias significativas en la cantidad de CCL20 producido en células infectadas con *M. tuberculosis* con respecto a las células no infectadas o infectadas y activadas con IFN γ (100 ng/ml).

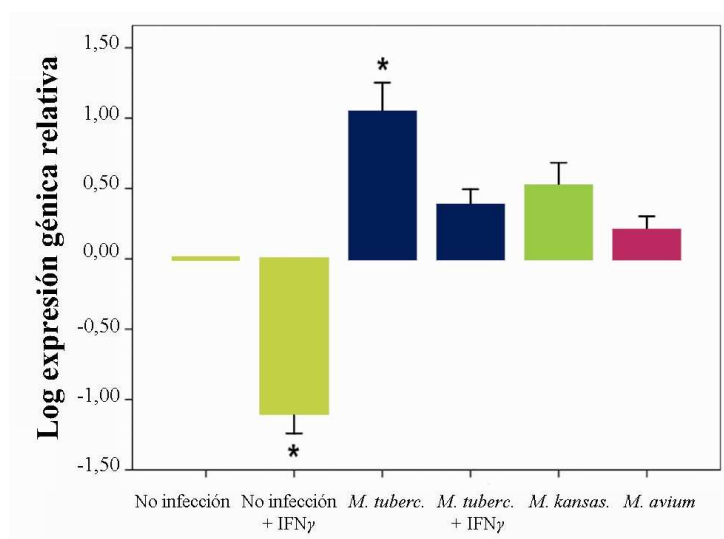
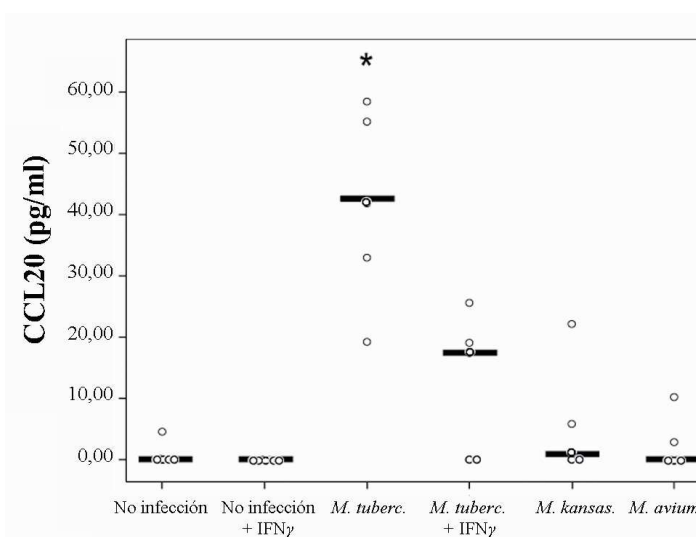


Figura 18: Cuantificación de la expresión de CCL20 en MDM.

Expresión relativa medida mediante qPCR. Los datos representan la media + SD del logaritmo de la expresión relativa de los distintos grupos en comparación con las células no infectadas (grupo control) en cuatro experimentos independientes. La expresión relativa en el grupo control es siempre 1,0, su logaritmo 0,0 y no posee SD. Para comparaciones entre parejas se empleó el test HSD de Tukey.

Figura 19: Cuantificación mediante ELISA de la expresión proteica de CCL20 en MDM.

Las barras representan la mediana. El método de Dunnet fue empleado para las comparaciones entre parejas. Se consideraron significativas las comparaciones con respecto al grupo control cuando * $p < 0,05$.



Quimiotaxis de células dendríticas mediada por CCL20

CCL20 representa una conexión entre la inmunidad innata y la adaptativa porque atrae DC inmaduras las cuales a su vez presentan los antígenos a los linfocitos [226; 227]. Los sobrenadantes de MDM infectadas con *M. tuberculosis* y *M. kansasii* fueron utilizados para comprobar la capacidad del CCL20 secretado por estas células de atraer DC derivadas de monocitos. Como se muestra en la Figura 20, no encontramos diferencias en el índice de migración de las DC expuestas a los sobrenadantes de los MDM infectados con *M. tuberculosis* ni con *M. kansasii* en comparación con los sobrenadantes de las células sin infectar. A pesar de ello, en ambos casos, la migración fue mayor que en células sin infectar. Mediante el empleo de anticuerpos neutralizantes (1 µg) frente a CCL20, observamos que la quimiotaxis es bloqueada en los sobrenadantes de los MDM infectados con *M. tuberculosis* sugiriendo que CCL20 es, en estos sobrenadantes, la quimiocina más abundante y activa para las DC. Estas observaciones nos dan un apropiado control de la bioactividad de la proteína detectada por ELISA. Como control adicional, empleamos un anticuerpo policlonal no específico de ratón (Mock-Ab), observando no inhibición de la migración celular.

Quizás CCL2 sea la quimiocina CC más estudiada en tuberculosis [283], la cual también atrae DC inmaduras [284]. Mediante ELISA comprobamos la presencia de esta quimiocina en los sobrenadantes de MDM infectados con *M. tuberculosis* (366,9 SD 274,6 pg/ml, n = 3). Bloquear esta proteína con un anticuerpo neutralizante (anti-CCL2, 1µg), no varió el índice de migración (Figura 20). Estos datos refuerzan la evidencia de que CCL20 es la quimiocina principal encargada de la quimiotaxis en nuestro modelo de cultivo.

Un resultado sorprendente fue que los MDM infectados con *M. kansasii* producen un índice de migración igual a los MDM infectados con *M. tuberculosis* aún siendo la producción de proteína muy diferente. Como consecuencia de que los resultados no alcanzan diferencia significativa, esta observación puede no corresponder con un efecto biológico real, sin embargo, es posible que los MDM infectados con *M. kansasii* induzcan expresión de una quimiocina cuya naturaleza desconocemos, la cual sea la responsable de la migración de las DC.

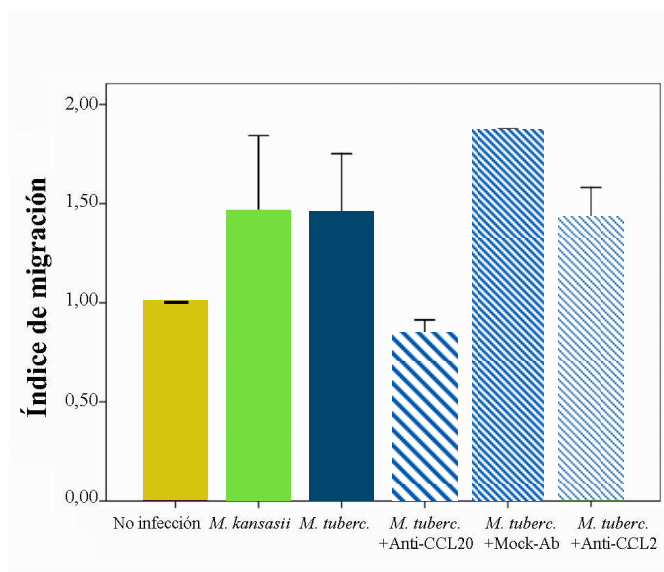


Figura 20: Actividad quimiotáctica del CCL20 producido por MDM infectados. Los datos representan la media del índice de migración \pm SD de sobrenadantes de MDM infectados ($n = 3$). Los controles son los sobrenadantes de células sin infectar. El índice de migración en el grupo control es siempre 1,00 y sin SD. Se realizó el test de Dunnett's para comparación por parejas. * $p < 0,05$ se consideró significativo.

Hemos visto que empleando sobrenadantes de MDM infectados existen diferencias en el índice de migración, pero que estas no son significativas. Hemos querido corroborar que realmente CCL20 atrae DC. Añadimos 10 ng/ml de CCL20 recombinante a las mismas DC y bloqueamos con un anticuerpo anti-CCL20 (1 μ g). Como muestran los resultados de la Figura 21, la presencia de CCL20 en el medio induce migración significativa de las DC viéndose esta migración inhibida en presencia del anticuerpo anti-CCL20. Creemos, por lo tanto, que la pequeña migración observada cuando usamos sobrenadantes, es consecuencia directa, de la pequeña cantidad de CCL20 que se ha producido (< 100 pg/ml).

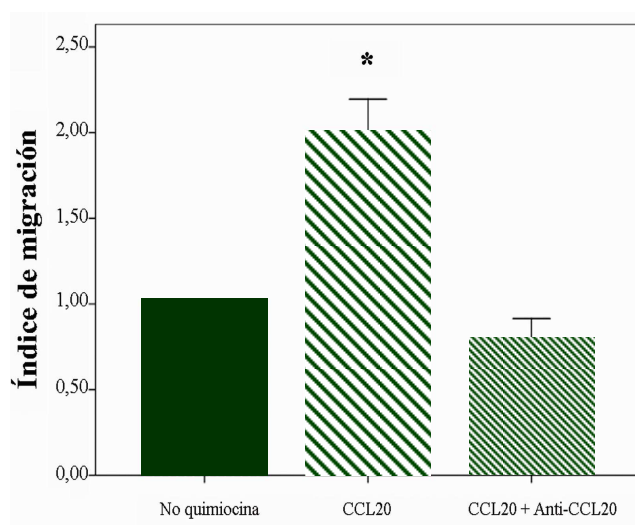


Figura 21: Actividad quimiotáctica de CCL20 recombinante. Los datos representan la media del índice de migración \pm SD de CCL20 purificado ($n = 4$). El control es el medio de cultivo M-SFM sin quimiocinas. El índice de migración en el grupo control es siempre 1,00 y sin SD. Se realizó el test de Dunnett's para comparación por parejas frente al grupo control y frente al grupo CCL20 + anti-CCL20. * $p < 0,05$ se consideró significativo.

Actividad antimicrobiana de CCL20 en MDM y DC

Los macrófagos alveolares son críticos en la respuesta innata, y la producción de CCL20 puede ser importante en el reclutamiento de DC inmaduras, las cuales estarán continuamente expuestas a concentraciones crecientes de la quimiocina. La producción de CCL20 cuando la célula es infectada por micobacterias aumenta. Yang et al. estudiaron la capacidad antimicrobiana de esta quimiocina frente a bacterias como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* o *Candida albicans* [231]. Por todas estas razones decidimos investigar si esta proteína realizaba otras funciones distintas a la quimiotaxis (actividad antimicrobiana, influencia en ROS y producción de apoptosis).

En primer lugar se estudió la influencia de CCL20 sobre la capacidad antimicrobiana en MDM y DC derivadas de monocitos infectadas con *M. tuberculosis*, *M. kansasii* y *M. avium*. Con este objetivo, 10^5 MDM o DC fueron infectados con 10^3 micobacterias o *L. pneumophila* en presencia o ausencia de CCL20 (20 ng/ml) en medio M-SFM. La infección con *L. pneumophila* la realizamos únicamente en MDM activados con IFN γ como control de la capacidad de restringir el crecimiento bacteriano. A su vez, sabemos que CCL20 es biológicamente activo porque promueve la migración de las DC como se mostró en la gráfica anterior.

Los resultados obtenidos reflejan la capacidad de *M. tuberculosis*, *M. kansasii* y *M. avium* de multiplicarse intracelularmente tanto en MDM como en DC derivadas de monocitos, alcanzando diferencias significativas para el crecimiento de *M. tuberculosis* en MDM y en DC. En el caso de las micobacterias no tuberculosas únicamente se observaron diferencias significativas en el caso de las DC. La adición de CCL20 al medio de cultivo, no conlleva a una disminución en la multiplicación intracelular de las bacterias. De hecho, CCL20 parece favorecer marginalmente el aumento de esa multiplicación aún sin alcanzar la significancia estadística cuando se compara con células infectadas sin adición de la quimiocina (Tabla 6).

La conclusión que obtenemos de este experimento es que CCL20 no ejerce ninguna influencia sobre la actividad antimicobacteriana ni de MDM ni de DC.

Tabla 6: Actividad antimicrobiana de MDM y DC en presencia de CCL20

	Inóculo	MDM		DC	
		No tratam.	Citocina ^a	No tratam.	Citocina ^a
<i>M. tuberculosis</i>	2,91 ± 0,06	3,52 ± 0,06 ^b	3,60 ± 0,12 ^b	3,79 ± 0,25 ^b	3,83 ± 0,31 ^b
<i>M. kansasii</i>	2,78 ± 0,06	3,30 ± 0,25	3,34 ± 0,31	3,37 ± 0,24 ^b	3,40 ± 0,24 ^b
<i>M. avium</i>	3,08 ± 0,06	3,74 ± 0,28	3,76 ± 0,31 ^b	3,83 ± 0,43 ^b	3,93 ± 0,51 ^b
<i>L. pneumophila</i>	2,75 ± 0,11	6,59 ± 0,32 ^c	5,46 ± 0,49 ^c		

Los datos representan la media del logaritmo de CFU ± SD de cinco experimentos independientes. Todos los análisis del test de varianza (ANOVA) fueron significativos (* p < 0,05). La actividad antimicrobiana de MDM fue controlada por la infección con *L. pneumophila*. ^a Las células infectadas con micobacterias fueron tratadas con CCL20 (20 ng/ml) y las células infectadas con *L. pneumophila* fueron tratadas con IFN γ (100 ng/ml). ^b La comparación de Pairwise fue únicamente significativo frente al número de bacterias iniciales * p < 0,05 se consideró significativo. ^c Todas las comparaciones pairwise fueron significativas, * p < 0,05.

Producción de ROS en monocitos infectados con *M. tuberculosis* y activados con CCL20. Influencia de los linfocitos

La generación de ROS es una función celular que puede estar influida por la presencia de quimiocinas; de hecho, PF4, por ejemplo, induce la producción de ROS en monocitos [285]. A su vez, la capacidad de *M. tuberculosis* de inducir ROS en monocitos/macrófagos está bien caracterizada [43], y es interesante averiguar si CCL20 aumenta la producción de ROS en monocitos infectados con dicha micobacteria.

Sorprendentemente, observamos el efecto contrario. CCL20 inhibe la producción de ROS (Tabla 7). Al infectar las células en medio M-SFM con un MOI = 1, la producción de ROS aumentó por encima del nivel basal (células sin infectar) y aunque CCL20 inhibe la producción total de ROS generado, las diferencias que observamos no alcanzaron una significación estadística. Únicamente observamos esa significación, cuando las células fueron infectadas con MOI = 5, donde la producción de ROS fue superior y la inhibición debida a la presencia del CCL20 fue más notable.

A su vez, consideramos la posibilidad de obtener este mismo efecto cuando tratamos las células con otros inductores de ROS como el PMA y el zymosan. Observamos que la inducción de ROS fue muy superior con estas dos moléculas que la observada cuando las células son infectadas con *M. tuberculosis* aunque el nivel de inhibición fue inferior. Estos resultados sugieren que el nivel de inhibición de CCL20 es dependiente del inductor de radicales del oxígeno, y que la producción de ROS mediada por *M. tuberculosis* es particularmente afectada por esta quimiocina.

Al purificar los monocitos, sabemos que la pureza en la preparación no es del 100 % y que los linfocitos son el principal contaminante. Los linfocitos, al igual que los monocitos, expresan CCR6, el receptor de CCL20, por lo que los datos obtenidos podrían ser fruto de la presencia de linfocitos en el ensayo.

Por esta razón, realizamos un experimento para ver la influencia de los linfocitos en la producción de ROS. Para ello añadimos 10^5 células CD14⁻ a los monocitos infectados con *M. tuberculosis*. Como se muestra en la Tabla 7, ni la cantidad de producción de ROS ni la inhibición se ve modificada. Por esta razón concluimos que los linfocitos no juegan ningún papel ni en la producción de radicales del oxígeno ni en el efecto inhibitorio observado en presencia de CCL20. En el caso de *L. pneumophila*, estímulo comparable a *M. tuberculosis*, observamos que la producción de ROS es algo superior a las células sin infectar y muy inferior a las células infectadas con *M. tuberculosis*, pero igualmente observamos inhibición aunque esta sea estadísticamente no significativa.

Tabla 7: Influencia de CCL20 en la producción de ROS en monocitos infectados con *M. tuberculosis*

	Sin quimiocina	CCL20	p
Monocitos no infectados	4.888 ± 4.537		
Monocitos no infectados + PMA	342.154 ± 231.468	329.078 ± 224.854	0,311
Monocitos no infectados + Zymosan	424.823 ± 275.434	403.337 ± 246.498	0,446
<i>M. tuberculosis</i> (MOI 1)	12.965 ± 5.391	11.667 ± 5.161	0,102
<i>M. tuberculosis</i> (MOI 5)	28.360 ± 11.698	17.423 ± 10.492*	0,017
<i>M. tuberculosis</i> (MOI 5) + células CD14 ⁺	21.759 ± 8.005	16.155 ± 6.458*	0,038
<i>L. pneumophila</i> (MOI 5)	5.771 ± 6.069	4.077 ± 3.669	0,350

Los datos representan la media de cps ± SD de cuatro experimentos independientes. El test utilizado fue el de t-Student apareado. * p < 0,05 se consideró significativo.

Influencia de CCL20 en la apoptosis mediada por *M. tuberculosis*

Aunque la producción de ROS en monocitos infectados con *M. tuberculosis* es elevada, esto no promueve actividad antimicrobiana. No obstante, puede tener influencia en otros mecanismos biológicos como es el caso de la apoptosis, la cual puede estar mediada por la producción de ROS [164; 165; 166; 167]. Además, en el transcurso de este trabajo hemos visto que en los neutrófilos, la apoptosis se ve influida por la producción de ROS. Por estas razones, decidimos estudiar el desarrollo de la apoptosis producida por *M. tuberculosis* bajo la influencia de CCL20.

La Figura 22 muestra, en primer lugar, la capacidad de *M. tuberculosis* de inducir apoptosis en MDM. En segundo lugar, se observó que CCL20 (20 ng/ml) inhibe la apoptosis promovida por *M. tuberculosis* a unos niveles semejantes a la apoptosis espontánea de estas células sin infectar. En tercer lugar, se comprobó que la inhibición observada era consecuencia del CCL20 porque la inhibición inducida por CCL20 fue bloqueada mediante un anticuerpo neutralizante anti-CCL20 pero no por un anticuerpo no específico frente a CCL20 (Mock-Ab). Finalmente, para conocer si la apoptosis en MDM es dependiente de la producción de ROS, incluimos un pocillo donde añadimos DPI (5 μ M) al cultivo infectado con *M. tuberculosis*. Puesto que el DPI también inhibe la apoptosis, concluimos que en estas células la apoptosis es dependiente de la producción de ROS.

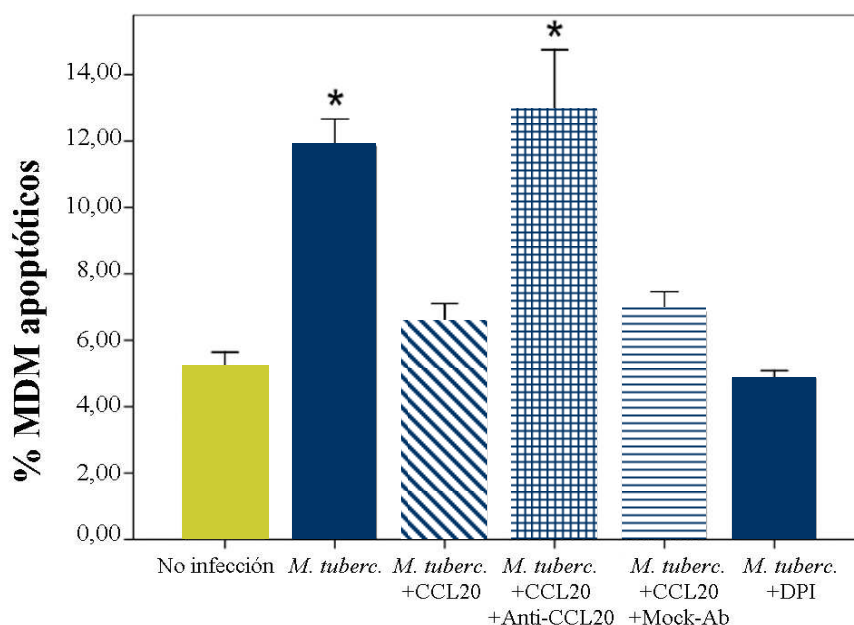


Figura 22: Influencia de CCL20 en la producción de apoptosis mediada por *M. tuberculosis* en MDM infectados. 2×10^5 MDM fueron infectados con MOI = 5 y como control negativo utilizamos las células sin infectar. Los datos son las proporciones (expresados en porcentajes) de células marcadas con fluoresceína (apoptóticas) con respecto a las células marcadas con DAPI (número total de células). Las barras representan la media \pm SD de cinco experimentos independientes. El test HSD Tukey's fue utilizado para las comparaciones entre el control negativo y el resto de grupos. * $p < 0,05$ se consideró significativo.

Discusión

El objetivo general del proyecto de investigación desarrollado es el análisis de la capacidad antimicrobacteriana de las células del sistema inmune innato, principalmente monocitos/macrófagos y neutrófilos. En este contexto, en el presente trabajo se estudia el papel de diferentes mecanismos antimicrobianos (concretamente la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS), apoptosis y fagocitosis) así como la actividad de quimiocinas como CXCL7 y CCL20 que pueden influenciar o regular dicha capacidad.

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

La infección con *M. tuberculosis* puede derivar hacia una tuberculosis activa o, como comúnmente ocurre, hacia una infección latente. El 70-80 % de las personas en contacto directo con individuos infectados permanecen Mantoux negativo, lo que sugiere que la inmunidad innata juega posiblemente un papel importante frente a esta enfermedad [41]. Por lo tanto, identificar los mecanismos inmunes innatos es imprescindible para la comprensión de la respuesta inmunológica a la tuberculosis.

El uso de diferentes modelos de infección *in vitro* así como de diferentes cepas micobacterianas para el estudio del comportamiento de los fagocitos humanos, no permite una comparación de resultados sencilla. Por este motivo, hemos estandarizado un protocolo caracterizado por el empleo de medio de cultivo sin suero y por una MOI baja (1 bacteria por cada 100 neutrófilos). El modelo bacteriano de infección utilizado ha sido una cepa de *M. gordonae* atenuada, que posee un morfotipo liso con respecto al morfotipo rugoso de la cepa original sin atenuar, que mantenemos congelada. Esta cepa es eficientemente eliminada tanto por macrófagos derivados de monocitos (MDM) como por neutrófilos humanos [69] convirtiéndose en un modelo adecuado para analizar la respuesta de las células del sistema inmune innato, principalmente monocitos/macrófagos y neutrófilos.

La función de los neutrófilos en el desarrollo de la tuberculosis frente a infecciones micobacterianas está insuficientemente caracterizada. De hecho, en algunos estudios se ha llegado a la conclusión de que tienen poca relevancia en la lucha frente a

tuberculosis [59; 68; 286] a pesar de ser las primeras células que acuden al foco de infección [287] y de estar presentes en el transcurso de la enfermedad [53; 57; 288; 289].

En experimentos previos realizados en nuestro grupo, se había observado que 10^5 MDM o 10^5 neutrófilos infectados son capaces de matar a *M. gordonae* atenuada pero no a *M. gordonae* ni a *M. tuberculosis* [69]. Algunos autores destacan la importancia de la concentración de neutrófilos en la lucha frente a patógenos; por ejemplo, Li et al. consideran que por debajo de una concentración crítica ($3-4 \times 10^5$ neutrófilos/ml), el crecimiento de *Staphylococcus epidermidis* es superior a la capacidad celular de matar la bacteria [46]. Por otra parte, Boechat et al. han descrito que el crecimiento de *M. bovis* (BCG) es inhibido cuando se emplea una elevada concentración de macrófagos [303]. Sin embargo, nuestros datos no han corroborado, en el modelo de micobacterias, los resultados de estos autores, ya que el nivel de multiplicación observado, en el caso de *M. tuberculosis* y *M. gordonae*, o de inhibición en el caso de *M. gordonae* atenuada, no fue estadísticamente significativo en comparación con la infección inicial, realizada con 5×10^4 y 4×10^5 neutrófilos. Este hallazgo podría explicar por qué la elevada concentración de neutrófilos encontrados en los lavados bronqueoalveolares en pacientes con tuberculosis [290] es insuficiente por sí misma para controlar la enfermedad.

Se han descrito grandes diferencias en la actividad antimicrobiana ejercida por los MDM frente a distintos patógenos. De esta forma, se ha encontrado que si bien el $\text{IFN}\gamma$ es capaz de activar los macrófagos humanos para eliminar *L. pneumophila*, no es efectivo para inducir una respuesta semejante frente a *M. tuberculosis*. Por este motivo, se ha construido en nuestro laboratorio una genoteca de substracción de MDM activados con $\text{IFN}\gamma$ e infectados con *L. pneumophila* o con *M. tuberculosis*, con el objeto de identificar genes candidatos que participen en una respuesta inmunológica que tiene éxito (frente a *L. pneumophila*) o que fracasa (frente a *M. tuberculosis*). Los genes identificados han sido posteriormente analizados también en neutrófilos, para determinar su participación en la actividad antimicrobiana de este fagocito.

CXCL7 fue uno de los genes identificados, pues se encontró que está más expresado en MDM infectados con *M. tuberculosis* que con *L. pneumophila*. Con el fin de constatar dicha diferencia, se tomó una muestra independiente y, realizando el ensayo en las mismas condiciones, se corroboraron estos resultados. Cuando se analizó la correspondiente producción de proteína, sorprendió encontrar que los MDM expresan constitutivamente *CXCL7* y que la cantidad de proteína detectada en los sobrenadantes no varía en células infectadas, al margen de la especie bacteriana empleada.

Es preciso tener en cuenta que *CXCL7* es una quimiocina que atrae principalmente neutrófilos, por lo que se decidió estudiar su influencia en neutrófilos infectados. Un dato importante que aportamos con este estudio es que los neutrófilos no expresan este gen en todos los individuos, ya que únicamente se expresó en dos casos de los cinco voluntarios analizados. Mediante la secuenciación de los promotores proximales de este gen en los distintos individuos, encontramos que la variabilidad de expresión entre individuos no se debe a polimorfismos en esta región. Por este motivo, dedujimos que las diferencias en la transcripción de *CXCL7* dependen de otros mecanismos regulatorios aún no determinados. Si bien es cierto que no se observaron diferencias significativas en la expresión de este gen en neutrófilos y MDM infectados con *M. tuberculosis* y *L. pneumophila*, se decidió continuar estudiando el papel de esta proteína en la infección, en primer lugar porque su considerablemente elevada producción (a niveles de ng/ml) sugiere que desarrolla una función biológica relevante y, en segundo lugar, porque se trata de un gen poco explorado, como se deduce del limitado número de estudios detectados en la bibliografía.

En un artículo reciente, Khajooe et al. mostraron que, en monocitos diferenciados con GM-CSF, el crecimiento de *M. tuberculosis* es inhibido cuando se incuban en presencia de *CXCL7* [257]. Nosotros no hemos confirmado dicho resultado, aunque es preciso tener en cuenta que las condiciones de cultivo presentan ciertas diferencias. En primer lugar, nosotros empleamos MDM activados con IFN γ . En segundo lugar, su modelo bacteriano es *M. tuberculosis* H37Ra, una cepa atenuada, mientras que nuestro grupo trabaja con un aislado clínico virulento. En tercer lugar, la lisis celular la realizan estos investigadores a los seis días después de la infección,

mientras que nosotros lo hacemos a los cuatro días. En sus experimentos, también la osteopontina, una proteína que posee propiedades quimiotácticas, inhibe el crecimiento de *M. tuberculosis*. La actividad que nosotros detectamos es de NAP-2 frente a *L. pneumophila*. Aunque NAP-2, variante post-traducciona de CXCL7, no promueve ningún cambio en la multiplicación de la bacteria en MDM, sí aumenta la actividad bactericida inducida por IFN γ , citocina conocida por activar a los macrófagos e inhibir el crecimiento de *L. pneumophila* [23]. Por esta razón, concluimos que NAP-2 influye en la actividad microbica de MDM humanos.

Tang et al. demostraron que las variantes de CXCL7, PBP y CTAPIII, son además, péptidos antimicrobianos [256]. A su vez, Schaffner et al. identificaron las variantes antes mencionadas, como productos de los monocitos con actividad antimicrobiana [251], lo cual puede explicar la actividad observada frente a *L. pneumophila*. No obstante, ninguno de estos trabajos aborda el estudio de NAP-2. Por otro lado, Krijgsveld et al. no detectaron actividad antimicrobiana para NAP-2 [243]. Según estos últimos resultados, consideramos que el efecto observado de los MDM frente a *L. pneumophila* no depende de la actividad antimicrobiana directa de NAP-2 (como péptido antimicrobiano) porque en ausencia del IFN γ no ejerce ninguna actividad aparente ni en neutrófilos ni en MDM.

Con el fin de constatar en condiciones diferentes si la presencia de NAP-2 puede modular la inhibición del crecimiento de la bacteria, se empleó un modelo clásico en el estudio de las infecciones con *L. pneumophila*, la línea celular monocítica U937 [291]. En este modelo se observó una pequeña influencia del IFN γ , porque promueve una modesta inhibición de la multiplicación bacteriana. Pero tras la infección de células transfectadas con la construcción de NAP-2, recuperamos 3,5 veces menos bacterias que con las correspondientes al vector sin inserto, con un logaritmo de unidades formadoras de colonias que disminuye desde 5,77 a 5,23.

Otro de los genes analizados fue *CCL20*, para el cual se había observado expresión diferencial en MDM en función de la bacteria infectante. *CCL20* es una quimiocina que atrae células dendríticas (DC) inmaduras. Por un lado, en modelo de

ratón, parece que son las DC, y no los macrófagos, las células que migran a los nódulos linfáticos después de la infección con BCG [292]. Por otro lado, la producción de CCL20 es inducida por antígenos de *M. tuberculosis* [221]. Teniendo en cuenta estos datos, se consideró conveniente incluir el análisis de las funciones biológicas de este gen para conocer su posible implicación frente a las micobacterias.

Antes de conocer la influencia de CCL20 en la actividad antimicrobiana, se estudió el patrón de expresión génica de dicho gen. Aunque varios tipos celulares expresan constitutivamente *CCL20*, *M. tuberculosis* favorece una fuerte inducción de sus niveles de transcripción en MDM humanos de voluntarios sanos. Además, se indagó en la influencia de micobacterias no tuberculosas en la expresión de dicho gen, ya que está descrito que *M. avium* también induce su expresión [293]. Los resultados mostraron que los MDM infectados tanto con *M. avium* como *M. kansasii* expresan *CCL20*, aunque en menor proporción que cuando son infectados con *M. tuberculosis*. También se analizó la influencia del IFN γ , citocina crítica en la respuesta frente a tuberculosis [132], observándose una inhibición de la expresión de *CCL20* tanto en células sin infectar como infectadas con *M. tuberculosis*. Este resultado es difícil de interpretar, puesto que Lee et al. observaron que el IFN γ incrementa la producción de CCL20 en monocitos activados con el antígeno de 30-KD de *M. tuberculosis* [221], lo cual difiere de nuestros resultados cuando empleamos el bacilo vivo. En otro modelo de células, como son los fibroblastos, la producción de CCL20 inducida por IL-1 β es también inhibida por el IFN γ [220]. Es posible que, en el inicio de la infección, la producción de CCL20 sea importante para facilitar la instauración de la respuesta adaptativa, pero que luego juegue un papel menos relevante cuando comienza la producción de IFN γ por linfocitos activados.

Aunque parece que CCL20 es responsable del control apropiado de la enfermedad en la mayoría de los individuos [75], no se conoce si la producción de CCL20 representa un mecanismo exitoso en la respuesta inmune frente a la tuberculosis, aunque participe en los primeros estadios de la inmunidad adaptativa [208]. Cuando la tuberculosis no puede ser controlada, la habilidad de *M. tuberculosis* para multiplicarse en las DC atraídas por CCL20 puede contribuir a la supervivencia y

diseminación del bacilo. De esta forma, en el modelo de ratón, se ha mostrado que la exposición de dichas células a *M. tuberculosis* determina su acumulación e infección en el pulmón [292].

La habilidad de las micobacterias de multiplicarse en las DC es controvertida. Algunos autores han mostrado la capacidad de las micobacterias de multiplicarse en estas células [123; 294]. Sin embargo, otros autores, lejos de corroborar dichos resultados, han observado el efecto contrario, la disminución de la supervivencia bacteriana. Una posibilidad para explicar estas contradicciones es que las diferencias pueden ser debidas a la inactivación, durante los días de cultivo, de los agentes necesarios para la diferenciación de los monocitos a DC (IL-4 y GM-CSF) [128]. No obstante, en nuestro modelo de infección repositamos las citocinas durante todo el periodo de infección, sin observar efecto alguno en la multiplicación intracelular de este microorganismo. Además, también determinamos la capacidad de las micobacterias no tuberculosas de multiplicarse en estas células, confirmando los resultados obtenidos por Mohaghehpour et al. con *M. avium*. [295]. Por lo tanto, concluimos que, en determinadas circunstancias, la infección de las DC podría ser beneficiosa para *M. tuberculosis*.

EXPLOSIÓN OXIDATIVA. RELACIÓN CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

La producción de ROS en fagocitos infectados ha sido estudiada por su posible implicación directa en la actividad antimicrobiana. Se ha visto que *M. tuberculosis* induce ROS en estas células [63; 67; 72; 80; 157; 166] y que, además, puede modular a los macrófagos afectando a moléculas de señalización, como se ha observado, por ejemplo, para factores de transcripción o proteínas tirosina-kinasas [154]. Para profundizar en la caracterización de este fenómeno, se estudió la producción de ROS en fagocitos infectados con distintas micobacterias y la participación de CXCL7 y CCL20 en dicho proceso.

Hay muy pocos estudios sobre la influencia de la producción de ROS en la actividad antimicrobiana de los fagocitos. Nosotros hemos observado que los neutrófilos infectados con *M. tuberculosis*, incluso sin opsonización, producen una elevada cantidad de ROS, y que la presencia de NAP-2 no modifica el patrón de producción (datos no mostrados). *M. tuberculosis* expresa varias proteínas que confieren resistencia frente a ROS [296], lo que podría explicar por qué la explosión oxidativa no influye negativamente sobre la multiplicación intracelular. Ha sido descrito que otras micobacterias no opsonizadas como *M. phlei*, *M. smegmatis* y *M. kansasii*, poseen un comportamiento diferente porque no son capaces de inducir la producción de ROS [157; 297], observaciones que nosotros hemos extendido a *M. gordonae*.

Aunque Jones et al. en un artículo relacionado con los procesos oxidativos han descrito la susceptibilidad de los neutrófilos a una cepa de *M. tuberculosis* atenuada (H37Ra) [72], no estudiaron la producción de ROS en las células infectadas. Nuestro modelo es muy informativo porque *M. gordonae*, además de no inducir producción de ROS, tampoco es eliminada por los neutrófilos. Si ROS influyera en la actividad antimicrobiana de las células, esperaríamos un incremento en su producción cuando las células son infectadas con *M. gordonae* atenuada. Sin embargo, nuestros resultados no apoyan dicha hipótesis, ya que la bacteria, que es eficientemente eliminada por los neutrófilos, no induce una producción de ROS superior a la que producen las células sin infectar.

Actualmente, la relación entre la producción de ROS con actividad antimicrobiana directa es muy controvertido. Sobre esta cuestión, la hipótesis más recientemente explorada es que la función de la NADPH oxidasa sea crear, a largo plazo, unas condiciones adecuadas en las vacuolas de los neutrófilos que favorezcan su capacidad antimicrobiana. La activación de este complejo enzimático coincide con la degranulación de los neutrófilos, que exponen así todo su arsenal, pero que no será activo frente al microorganismo mientras no se produzca un descenso en el pH provocado por la despolarización de la membrana. Además, la actividad de esta enzima, junto con la de las proteasas neutras, es necesaria para que tenga lugar la muerte

microbiana [152]. A pesar de todo, aunque esto ocurriera en neutrófilos infectados con micobacterias, tampoco parece que tenga influencia en la actividad antimicrobiana.

En otros modelos de infección con hongos como *Candida albicans* en células THP-1 [298], se produce un incremento en el nivel de transcripción de los genes que codifican para las subunidades de la NADPH oxidasa, pudiendo influir el ambiente intracelular horas después de la infección. No hemos detectado cambios en los niveles de transcripción de las distintas subunidades que conforman la NADPH oxidasa en los neutrófilos infectados con micobacterias, por lo que, en este modelo, no contamos con evidencias que apoyen esta posibilidad.

En lo que se refiere a la producción de ROS y su participación en la actividad antimicrobiana de monocitos infectados, según nuestras observaciones, la infección con *M. tuberculosis* también aumenta la producción de estos radicales como sucede en los neutrófilos. Por otra parte, aunque NAP-2 no posee ningún efecto en esta producción, CCL20 inhibe la explosión oxidativa generada en monocitos infectados con *M. tuberculosis*. Este papel inhibitorio es digno de mencionar, considerando que parece contrario al que juegan otras quimiocinas como CXCL4, CCL2, CCL3 o CCL5, que aumentan la producción de ROS en monocitos [285; 299]. Además, permite pensar que CCL20 puede ser importante para otras funciones de los monocitos/macrófagos, distintas de su actividad quimiotáctica.

APOPTOSIS. RELACIÓN CON ROS Y ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA

Se ha descrito que la generación de ROS induce apoptosis en neutrófilos [165], incluyendo apoptosis por fagocitosis [166]. Los resultados obtenidos están de acuerdo con esta relación, porque *M. tuberculosis* induce tanto ROS como apoptosis. Además, cuando un inhibidor de la NADPH oxidasa, el DPI, es añadido a los neutrófilos infectados con *M. tuberculosis*, tanto el nivel de ROS como de apoptosis es inhibido. Si bien es cierto que neutrófilos infectados con *M. gordonae* y con *M. gordonae* atenuada

no indujeron producción de ROS, se observó un cierto nivel de apoptosis cuando se analizó este proceso mediante una técnica de luminiscencia. Dado que este método es muy reciente y no ha sido lo suficientemente bien caracterizado, se decidió determinar la muerte celular producida por estas micobacterias mediante la técnica TUNEL, con la que no se observó ninguna diferencia de inducción de apoptosis entre las dos cepas de *M. gordonae*. En estos momentos desconocemos la razón de la disparidad de los resultados obtenidos con ambas técnicas.

Muchos autores consideran que el proceso de apoptosis es beneficioso para la célula hospedadora, porque elimina el nicho intracelular, inhibiendo la multiplicación y permitiendo una fusión más eficiente de los fagosomas y los lisosomas [160]. En nuestro modelo de estudio, no se observó relación entre apoptosis y actividad antimicrobiana. De hecho, en un modelo micobacteriano distinto, la cepa atenuada de *M. tuberculosis* H37Ra es eliminada por los neutrófilos [61], aunque ambas cepas H37Ra y H37Rv inducen niveles comparables de apoptosis [164]. A pesar de esto, afirmar que la apoptosis no influye sobre la actividad antimicrobiana frente a H37Ra es arriesgado. Sin embargo, nuestros resultados ofrecen evidencias de que esto es así. La susceptibilidad de *M. gordonae* atenuada a la capacidad antimicrobiana del neutrófilo no puede atribuirse a la apoptosis celular, puesto que el nivel de apoptosis es similar cuando la cepa infectante es la original no atenuada, que no puede ser eliminada por los neutrófilos y, en ambos casos, este nivel se asemeja al que se observa por apoptosis espontánea en las células no infectadas.

En la línea de estas afirmaciones, la apoptosis también es considerada un mecanismo de defensa de las células del hospedador. Por ejemplo, se ha descrito que macrófagos frescos fagocitan neutrófilos cuya apoptosis está inducida por *M. tuberculosis*, provocando una respuesta pro-inflamatoria de activación de los macrófagos [172, 173]. A su vez, macrófagos infectados adquieren el arsenal antimicrobiano de neutrófilos apoptóticos justo después de su fagocitosis liberando dicho contenido al fagosoma del macrófago que contiene la micobacteria y dando lugar a una reducción de la viabilidad de las micobacterias [77; 121, 160; 164]. En este contexto, la inhibición de la actividad apoptótica mediada por CCL20 debería ser

considerada perjudicial para la célula hospedadora, ya que permite que el microorganismo sobreviva durante más tiempo en su célula diana, retardando su fagocitosis por macrófagos frescos. En consecuencia, aunque CCL20 puede ser esencial para el desarrollo de la inmunidad adaptativa frente a la tuberculosis, también es posible que *M. tuberculosis* se beneficie de determinadas actividades de la quimiocina.

Otros grupos han detectado producción de CCL20 en pacientes que no controlan la enfermedad. Lee et al. encontraron esta quimiocina en lavados broncoalveolares de pacientes con tuberculosis. Además, MDM de pacientes con tuberculosis producen una mayor concentración de CCL20 cuando son activados con el antígeno de 30KD de *M. tuberculosis*, que las células de los individuos control [221], lo cual puede reflejar una correlación entre la expresión de *CCL20* y el fracaso inmunológico frente a la tuberculosis. Esta idea está en relación directa con los resultados obtenidos por Thuong et al., quienes analizaron el patrón de expresión génica de MDM estimulados con lisados de *M. tuberculosis* H37Rv en voluntarios expuestos a *M. tuberculosis* pero sin enfermedad activa, en pacientes con tuberculosis pulmonar y en pacientes con meningitis tuberculosa. Observaron que, entre otros genes, *CCL20* se expresó más en pacientes con alguna de las dos formas de tuberculosis en comparación con los voluntarios sin tuberculosis activa [300]. La relación entre la producción de CCL20 y la gravedad de la enfermedad puede no ser evidente, pero no podemos excluir que en una enfermedad como es la tuberculosis, CCL20 pueda tener algún efecto negativo.

Algunos autores consideran la apoptosis vinculada a la infección por *M. tuberculosis* independiente de la producción de ROS [278]. Sin embargo, volvemos a corroborar esta relación en el estudio de CCL20, ya que al añadir el DPI al medio de cultivo, el número de células apoptóticas, así como la producción de ROS, disminuye. Esta situación es similar a la descrita para neutrófilos infectados con *M. tuberculosis* [164].

De nuestros resultados se deduce que aún somos incapaces de activar *in vitro* a los fagocitos humanos para matar a las micobacterias. Por otro lado, concluimos que la producción de ROS influye directamente en la apoptosis, pero que ninguno de estos dos

procesos parece estar relacionado con la capacidad de ambos fagocitos de matar directamente *M. tuberculosis*.

PRODUCCIÓN DE LAS DIFERENTES VARIANTES DE CXCL7 EN FAGOCITOS Y CÉLULAS K562

Hemos observado que CXCL7, y en especial NAP-2, la variante en la que nos hemos enfocado principalmente, no ejercen una influencia aparente en las actividades funcionales de neutrófilos infectados por micobacterias. En el caso de los MDM sólo hemos detectado un efecto sinérgico con el IFN γ para la actividad frente a *L. pneumophila*. Sin embargo, hemos obtenido datos novedosos sobre el procesamiento de esta proteína en células K562. Aunque El-Gedaily et al. han detectado PBP únicamente en lisados de monocitos [249], nuestros resultados reflejan, por primera vez, la presencia de distintas variantes de CXCL7 en los sobrenadantes de MDM y de neutrófilos. Mediante la técnica Western blot, observamos que la proteína de mayor tamaño posee un peso molecular similar al que tiene PBP (10,3 KD), aunque CTAPIII (9,3 KD) y β -TG (8,8 KD) migrarían muy cerca. Adicionalmente, y aunque parece producirse en muy pequeñas cantidades, observamos una banda con un peso molecular comparable al de la proteína recombinante NAP-2 (7,6 KD). La habilidad tanto de neutrófilos como de monocitos de proteolizar PPBP a su variante NAP-2 ha sido descrita [244, 241] y, por lo tanto, su presencia en los sobrenadantes era esperada.

Iida et al. identificaron una proteína que reaccionaba con un anticuerpo para el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), y a la que denominaron factor de crecimiento derivado de leucocitos (LDGF). Empleando este anticuerpo, clonaron el gen correspondiente y concluyeron que representa lo que hoy se conoce como *CXCL7*. Este anticuerpo fue capaz de reconocer en los sobrenadantes de neutrófilos una proteína con un peso molecular cercano a 16 KD. Además, en los sobrenadantes de monocitos y linfocitos T, también detectó una proteína de menor peso molecular (unos 14 KD) [301]. No fueron capaces de detectar proteínas con un peso molecular semejante o igual al de NAP-2. Es difícil determinar la naturaleza de la proteína de 16 KD ya que el

anticuerpo no era específico para CXCL7, y ningún otro método fue empleado para caracterizar dicha banda. Nuestro grupo no ha detectado en los sobrenadantes de neutrófilos, ninguna proteína de ese tamaño. El estudio de Iida et al. es la única referencia de la presencia de CXCL7 en los sobrenadantes de neutrófilos. Otros autores han analizado el RNA mensajero de neutrófilos y no han encontrado expresión de *CXCL7* [249]. Además, la diferenciación granulocítica de la línea celular promielocítica HL60 con dimetil sulfóxido, no induce expresión de *CXCL7* [302].

Para facilitar la identificación de los distintos productos en los sobrenadantes de ambos fagocitos estudiados, transfectamos las células K562 con las distintas construcciones (PBP, CTAPIII y NAP-2) de PPBP, manteniendo la secuencia líder. Esta misma estrategia ha sido empleada por otros autores, aunque empleando un modelo procariota [301; 250] y, a pesar de ello, no consiguieron producir PPBP. Nuestro grupo consideró que un modelo eucariótico nos permitiría obtener las distintas variantes de CXCL7 en los sobrenadantes celulares. Nos pareció apropiado emplear las células K562, porque mediante la activación con PMA sufren una diferenciación megacariocítica [279] y CXCL7 es la quimiocina más abundante en plaquetas [232]. Empleando este método, fueron obtenidas las proteínas con los tamaños esperados para NAP-2 y CTAPIII, pero el patrón de bandas obtenido para la construcción PBP, fue inesperadamente más complejo. Detectamos una proteína cuyo tamaño correspondía con el de la proteína PPBP, la cual también fue detectada en los lisados de estas células. Es improbable que la procedencia de esta proteína venga de las células lisadas, ya que necesita de dos días para ser expresada y las células fueron procesadas inmediatamente. A su vez, una proteína del tamaño de NAP-2 fue también detectada.

Estos resultados muestran que la línea celular K562 representa el primer modelo en el cual la producción de PPBP y PBP puede ser analizada simultáneamente, y que estas células poseen la habilidad de proteolizar PBP a NAP-2. Según este patrón, fue inesperado que la banda de menor peso molecular no fuera detectada en los sobrenadantes de las células transfectadas con la construcción CTAPIII, ya que se ha descrito que tanto PBP como CTAPIII son buenos sustratos para la proteasa que

genera NAP-2 [241]. La importancia de este modelo para el estudio de la regulación de PPBP y sus modificaciones post-traduccionales justifica futuras investigaciones.

ADHERENCIA DE CÉLULAS U937 TRANSFECTADAS CON NAP-2

Durante los pases sucesivos de las células trasfectadas con las distintas variantes de CXCL7, se observó que las células trasfectadas se adherían más a la placa de cultivo que las células sin trasfectar. La influencia de la citocina CXCL7 en la adhesión celular ya ha sido estudiada. Detmers et al. determinaron que el incremento de la adherencia inducida era dependiente de la integrina CD11b/CD18 ($\alpha M\beta 2$) [253]. En el presente trabajo se ha ampliado el conocimiento sobre la influencia de NAP-2 en la inducción de la adhesión celular. Se observó una especificidad de la adherencia de las células trasfectadas, ya que se adhieren a la fibronectina, pero no a la laminina, al colágeno tipo IV ni a la albúmina sérica bovina. Las integrinas que median la unión a la fibronectina son diferentes de CD11b/CD18, porque no utilizan la subunidad $\beta 2$ (CD18). La fibronectina está presente en el plasma, en la lámina basal o en las superficies celulares, y los péptidos de la fibronectina inhiben la unión del leucocito vía integrinas y bloquean su reclutamiento para limitar el proceso inflamatorio [304], el cual está implicado en la respuesta inmune. Además la unión de los monocitos a la fibronectina aumenta la cascada de señalización inducida por el IFN γ [305]. Es posible que exista una relación entre la adherencia promovida por NAP-2 y el aumento observado en la actividad antimicrobiana inducida por el IFN γ .

Conclusiones

Primera: En ensayos *in vitro*, las micobacterias no patógenas inducen menor producción de ROS y apoptosis en neutrófilos que *M. tuberculosis*.

Segunda: No se ha encontrado relación entre la concentración de neutrófilos, las diferencias en la producción de ROS y la apoptosis con la capacidad antimicobacteriana *in vitro* de los neutrófilos.

Tercera: El gen *CXCL7* está diferencialmente expresado en MDM infectados con *M. tuberculosis* o *L. pneumophila*, siendo mayor con *M. tuberculosis*. La proteína *CXCL7* se produce constitutivamente y a una concentración elevada en los MDM de todos los voluntarios analizados y en los neutrófilos de sólo algunos. Su producción no varía cuando las células se infectan *in vitro*.

Cuarta: Los estudios de Western blot reflejan que se producen dos variantes de *CXCL7* en sobrenadantes de MDM, probablemente PBP y NAP-2.

Quinta: NAP-2 actúa sinérgicamente con $\text{IFN}\gamma$ aumentando la actividad antimicrobiana de MDM frente a *L. pneumophila*. Además, en células U937 transfectadas con NAP-2 *L. pneumophila* tiene un menor nivel de multiplicación.

Sexta: NAP-2 transfectado en células U937 induce adherencia a la fibronectina.

Séptima: CCL20 se expresa diferencialmente en células infectadas con distintas micobacterias, siendo mayor en MDM infectados con *M. tuberculosis* que con *M. avium* o *M. kansasii*. Dicha expresión se ve inhibida en presencia de $\text{IFN}\gamma$.

Octava: CCL20 no participa en la actividad antimicrobiana de DC ni de MDM frente a las micobacterias o a *L. pneumophila*.

Novena: CCL20 inhibe la producción de ROS en MDM infectados con *M. tuberculosis*, lo cual determina la inhibición de la apoptosis inducida por la infección.

Resumen/Summary

La tuberculosis sigue constituyendo un problema sanitario de primer orden. La respuesta inmunológica frente a *Mycobacterium tuberculosis* dista de conocerse bien, aunque parece claro que los macrófagos y los neutrófilos juegan un papel esencial. El presente trabajo aborda el estudio de distintos mecanismos antimicrobianos empleados por estos fagocitos y su posible relación, directa o indirecta, con su capacidad antimicobacteriana, principalmente frente a *M. tuberculosis*, pero también frente a *M. gordonae*, *M. avium* y *M. kansasii*. Se han empleado como modelos comparativos bacterias eficientemente eliminadas por los fagocitos, concretamente *Legionella pneumophila* y una cepa de *M. gordonae* atenuada en laboratorio. Además, se ha estudiado la influencia de dos quimiocinas: CXCL7 y CCL20.

En relación con la actividad antimicrobiana, hemos comprobado que ni los macrófagos derivados de monocitos (MDM) ni los neutrófilos son capaces de matar *in vitro* a las micobacterias, sean o no patógenas, aunque sí eliminan a *L. pneumophila* y a *M. gordonae* atenuada. La concentración de neutrófilos, variable importante en la actividad antimicrobiana frente a otros patógenos, no tiene influencia en el crecimiento micobacteriano intracelular. La presencia de NAP-2, variante post-traduccional de CXCL7, en sinergia con IFN γ , aumenta la capacidad de los MDM de matar a *L. pneumophila*, pero no a *M. tuberculosis*. A su vez, ni la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) ni la apoptosis influyen directamente en la capacidad antimicobacteriana de los neutrófilos, puesto que *M. gordonae* atenuada es eliminada por estas células, pero no induce ni producción de ROS ni apoptosis.

La expresión génica y proteica de CXCL7 ha sido detectada en MDM aunque sólo se ha observado expresión en los neutrófilos de dos de cinco individuos analizados. Por otro lado, la quimiotaxis sobre neutrófilos inducida por sobrenadantes de cultivos de MDM es atribuible principalmente a CXCL8 (IL-8), y no a CXCL7. También hemos advertido que CXCL7 modula la capacidad de adherencia de las células U937. La expresión génica y proteica de CCL20 en MDM aumenta tras una infección por micobacterias, siendo mayor cuando se emplea *M. tuberculosis* que con micobacterias de menor patogenicidad, y es inhibida por el IFN γ . La producción de ROS y la apoptosis se encuentran inhibidas en presencia de CCL20.

Tuberculosis remains a first order health problem. The immune response to *Mycobacterium tuberculosis* is far from being well understood, although it is known that macrophages and neutrophils play an essential role. This work deals with the study of the different mechanisms used by these phagocytes and their possible relationship, either direct or indirect, with their anti-mycobacterial ability, mainly against *M. tuberculosis*, but also against *M. gordonae*, *M. avium* and *M. kansasii*. As comparative models, both *Legionella pneumophila* and a laboratory-attenuated strain of *M. gordonae* were used, because they are efficiently eliminated by these phagocytes. The influence of two chemokines: CXCL7 and CCL20 was also studied.

Regarding the anti-mycobacterial activity, we found that neither monocyte-derived macrophages (MDM) nor neutrophils are able to kill pathogenic or non pathogenic micobacteria *in vitro*, but they eliminate *L. pneumophila* and *M. gordonae* attenuated. Neutrophils concentration, a critical variable on anti-microbial activity against other pathogens, has no influence on intracellular mycobacterial growth. NAP-2, a post-traduccional variant of CXCL7, in combination with with IFN γ increases the capacity of MDM to kill *L. pneumophila*, but no *M. tuberculosis*. At the same time, neither the production of reactive oxygen species (ROS) nor the apoptosis have a direct influence on the anti-mycobacterial capacity of neutrophils, because the attenuated *M. gordonae* strain was eliminated by these cells without ROS production and apoptosis induction.

Although the CXCL7 gene and protein expression were detected in MDM, the expression of CXCL7 in neutrophils was evidenced in only two out to five volunteers analyzed. On the other side, the chemotaxis induced by supernatants of MDM may be attributed to CXCL8 (IL-8), rather than CXCL7 activity. We have also found that CXCL7 changes the adherence properties of U937 cells. The CCL20 gene and protein expression increased at a much higher level in MDM infected with *M. tuberculosis* than in those infected with the less pathogenic mycobacteria. This expression was inhibited by IFN γ . CCL20 also down-regulated the characteristic ROS production and the apoptosis induced by *M. tuberculosis* in monocytes/macrophages.

Bibliografía

1. Smith I. *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis and molecular determinants of virulence. Clin Microbiol Rev 2003; 16: 463-496.
2. Schluger NW. The pathogenesis of Tuberculosis. The first one hundred (and twenty-three) years. Am J Respir Cell Mol Biol 2005; 32: 251-256
3. Thomas M. D. Captain of death: The Story of tuberculosis. University of Rochester Press 1997. Capítulos 13, 15, 21, 23.
4. Informe sobre la situación de la tuberculosis. Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica. España 2007; 1-21.
5. Enarson DA, Seita A, Fujiwara P. Global elimination of tuberculosis: implementation, innovation, investigation. Int J Tuberc Lung Dis 2003; 7(12 Suppl 3): S328-32.
6. World Health Organization. Global tuberculosis control: epidemiology, strategy, financing. WHO report 2009. Genova, Switzerland, WHO/HTM/TB/2009.411.
7. Servicio de Vigilancia Epidemiológica y Enfermedades transmisibles. Dirección general de Salud Pública e Investigación, Derecho e Innovación. Enfermedades de transmisión respiratoria. Boletín epidemiológico de Castilla y León 2007; 24: 5-12.
8. Böddinghaus B, Rogall T, Flohr T, *et al.* Detection and identification of mycobacteria by amplification of rRNA. J Clin Microbiol 1990; 28: 1751-1759.
9. Sreevatsan S, Pan X, Stockbauer KE, *et al.* Restricted structural gene polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis* complex indicates evolutionarily recent global dissemination. Proc Natl Acad Sci USA 1997; 94: 9869-9874.
10. Mostowy S, Behr MA. The origin and evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. Clin Chest Med 2005; 26: 207-216.
11. Brown-Elliott B. Micobacterias no tuberculosas recientemente identificadas en humanos. IIC 2004; 6-10. [papelhttp://www.siicsalud.com/dato/sic/126/expertos126](http://www.siicsalud.com/dato/sic/126/expertos126)
12. Griffith DE, Aksamit T, Brown-Elliott BA, *et al.* An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. Am J Respir Crit Care Med 2007; 175: 367-416.

-
13. Piersimoni C, Scarparo C. Pulmonary infections associated with non-tuberculous mycobacteria in immunocompetent patients. *Lancet Infect Dis* 2008; 8: 323-334.
 14. Caminero Luna JA. Micobacteria atípicas. *BSCP Can Ped* 2001; 25: 237-248.
 15. Weinberger M, Berg SL, Feuerstein IM, *et al.* Disseminated infection with *Mycobacterium gordonae*: report of a case and critical review of the literature. *Clin Infect Dis* 1992; 14: 1229-1239.
 16. Horwitz MA, Silverstein SC. Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) multiplies intracellularly in human monocytes. *J Clin Invest* 1980; 66: 441-450.
 17. Horwitz MA, Silverstein SC. Interaction of the legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) with human phagocytes. I. *L. pneumophila* resists killing by polymorphonuclear leukocytes, antibody, and complement. *J Exp Med* 1981; 153: 386-397.
 18. Payne NR, Horwitz MA. Phagocytosis of *Legionella pneumophila* is mediated by human monocyte complement receptors. *J Exp Med* 1987; 166: 1377-1389.
 19. Vogel JP, Isberg RR. Cell biology of *Legionella pneumophila*. *Curr Opin Microbiol* 1999; 2: 30-34.
 20. Molmeret M, Bitar DM, Han L, *et al.* Cell biology of the intracellular infection by *Legionella pneumophila*. *Microbes Infect* 2004; 6: 129-139.
 21. Friedman H, Yamamoto Y, Klein TW. *Legionella pneumophila* pathogenesis and immunity. *Semin Pediatr Infect Dis* 2002; 13: 273-279.
 22. Douvas GS, Looker DL, Vatter AE, *et al.* Gamma interferon activates human macrophages to become tumoricidal and leishmanicidal but enhances replication of macrophage-associated mycobacteria. *Infect Immun* 1985; 50: 1-8.
 23. Bhardwaj N, Nash TW, Horwitz MA. Interferon- γ -activated human monocytes inhibit the intracellular multiplication of *Legionella pneumophila*. *J Immunol* 1986; 137: 2662-2669.

24. Deng JC, Tateda K, Zeng X, *et al.* Transient transgenic expression of gamma interferon promotes *Legionella pneumophila* clearance in immunocompetent hosts. *Infect Immun* 2001; 69: 6382-6390.
25. Araujo Z, Acosta M, Escobar H, *et al.* Respuesta inmunitaria de tuberculosis y el papel de los antígenos de secreción de *Mycobacterium tuberculosis* en la protección, patología y diagnóstico. Revisión. *Invest Clin* 2008; 49: 411-441.
26. Goren MB, Hart PD, Young MR, *et al.* Prevention of phagosome-lysosome fusion in cultured macrophages by sulfatides of *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Nat Acad Sci USA* 1976; 73: 2510-2514.
27. Flynn JL, Chan J. Immunology of tuberculosis. *Annu Rev Immunol* 2001; 19: 93-129.
28. Vergne I, Chua J, Singh SB, *et al.* Cell biology of *Mycobacterium tuberculosis* phagosome. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2004; 20: 367-394.
29. Rivas-Santiago B, Vieyra-Reyes P, Araujo Z. Respuesta de la inmunidad celular en la tuberculosis pulmonar. *Invest Clin* 2005; 46: 391-412.
30. Shiratsuchi H, Toossi Z, Mettler MA, *et al.* Colonial morphotype as a determinant of cytokine expression by human monocytes infected with *Mycobacterium avium*. *J Immunol* 1993; 150: 2945-2954.
31. Barry CE. Interpreting cell wall 'virulence factors' of *Mycobacterium tuberculosis*. *Trends Microbiol* 2001; 9: 237-241.
32. Howard ST, Rhoades E, Recht J, *et al.* Spontaneous reversion of *Mycobacterium abscessus* from a smooth to a rough morphotype is associated with reduced expression of glycopeptidolipid and reacquisition of an invasive phenotype. *Microbiol* 2006; 152: 1581-1590.
33. Belisle JT, Brennan PJ. Chemical basis of rough and smooth variation in mycobacteria. *J Bacteriol* 1989; 171: 3465-3470.
34. Huebner RE, Schein MF, Bass JB Jr. The tuberculin skin test. *Clin Infect Dis* 1993; 17: 968-975.

-
35. Leung AN. Pulmonary tuberculosis: the essentials. *Radiology* 1999; 210: 307-322.
 36. Milburn HJ. Primary tuberculosis. *Curr Opin Pulm Med* 2001; 7: 133-141.
 37. van Crevel R, Ottenhoff THM, van der Meer JWM. Innate immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15: 294-309.
 38. Ramos RG, Lado FLL, Bastida VT, *et al.* Tratamiento actual de la tuberculosis. *An Med Interna (Madrid)* 2003; 20: 91-100.
 39. Coll P. Fármacos con actividad frente a *Mycobacterium tuberculosis*. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2009; 27: 474-480.
 40. Ruiz-Manzano J, Blanquer R, Calpe JL, *et al.* Diagnosis and treatment of tuberculosis. *Arch Bronconeumol* 2008; 44: 551-566.
 41. Lin PL, Flynn JL. Understanding latent tuberculosis: a moving target. *J Immunol* 2010; 185: 15-22.
 42. Pasquinelli V. Contribución de la respuesta inmune del huésped al control de la infección por *Mycobacterium tuberculosis*. *Química Viva* 2008; 2: 135-159.
 43. Raja A. Immunology of tuberculosis. *Indian J Med Res* 2004; 120: 213-232.
 44. Appelberg R. Mycobacterial infection primes T cells and macrophages for enhanced recruitment of neutrophils. *J Leukoc Biol* 2007; 51: 472-477.
 45. Nauseff WM. How human neutrophils kill and degrade microbes: and integrated view. *Immunol Rev* 2007; 219: 88-102.
 46. Li Y, Karlin A, Loike JD, *et al.* A critical concentration of neutrophils is required for effective bacterial killing in suspension. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 8289-8294.
 47. Peters SP, Cerasoli F, Albertine KH, *et al.* "Autoregulation" of human neutrophil activation in vitro: regulation of phorbol myristate acetate-induced neutrophil activation by cell density. *J Leukoc Biol* 1990, 47: 457-474.
 48. Borregaard N, Cowland JB. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood* 1997; 89: 3503-3521.

49. Borregaard N, Sorensen OE, Theilgaard-Mönch K. Neutrophil granules: a library of innate immunity proteins. *Trends Immunol* 2007; 28: 340-345.
50. N'Diaye EN, Darzacq X, Astarie-Dequeker C, *et al.* Fusion of azurophil granules with phagosomes and activation of the tyrosine kinase Hck are specifically inhibited during phagocytosis of mycobacteria by human neutrophils. *J Immunol* 1998, 161; 4983-4991.
51. Pedrosa J, Saunders BM, Appelberg R, *et al.* Neutrophils play a protective nonphagocytic role in systemic *Mycobacterium tuberculosis* infection of mice. *Infect Immun* 2000; 68: 577-583.
52. Cassatella MA. The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils. *Immunol Today* 1995; 16: 21-26.
53. Riedel DD, Kaufmann SHE. Chemokine secretion by human polymorphonuclear granulocytes after stimulation with *Mycobacterium tuberculosis* and lipoarabinomannan. *Infect Immun* 1997; 65: 4620-4623.
54. Alemán M, Beigier-Bompadre M, Borghetti C, *et al.* Activation of Peripheral blood neutrophils from patients with active advanced tuberculosis. *Clin Immunol* 2001; 100: 87-95.
55. Kasahara K, Sato I, Ogura K, *et al.* Expression of chemokines and induction of rapid cell death in human blood neutrophils by *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis* 1998; 178: 127-137.
56. Murray HW. Interferon-gamma, the activated macrophage, and host defense against microbial challenge. *Ann Intern Med* 1988; 108: 595-608.
57. Appelberg R, Castro AG, Gomes S, *et al.* Susceptibility of beige mice to *Mycobacterium avium*: role of neutrophils. *Infect Immun* 1995; 63: 3381-3387.
58. Seiler P, Aichele P, Raupach B, *et al.* Rapid neutrophil response controls fast-replicating intracellular bacteria but not slow-replicating *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis* 2000; 181: 671-680.

-
59. Eruslanov EB, Lyadova IV, Kondratieva TK, *et al.* Neutrophil responses to *Mycobacterium tuberculosis* infection in genetically susceptible and resistant mice. *Infect Immun* 2006; 73: 1744-1753.
60. Brown AE, Holzer TJ, Andersen BR. Capacity of human neutrophils to kill *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis* 1987; 156: 985-989.
61. Majeed M, Perskvist N, Ernst JD, *et al.* Roles of calcium and annexins in phagocytosis and elimination of an attenuated strain of *Mycobacterium tuberculosis* in human neutrophils. *Microb Pathog* 1998; 24: 309-320.
62. Hartmann P, Becker R, Franzen C, *et al.* Phagocytosis and killing of *Mycobacterium avium* complex by human neutrophils. *J Leukoc Biol* 2001; 69: 397-404.
63. Geertsma MF, Nibbering PH, Pos O, *et al.* Interferon- γ -activated human granulocytes kill ingested *Mycobacterium fortuitum* more efficiently than normal granulocytes. *Eur J Immunol* 1990; 20: 869-873.
64. Coffey MJ, Phare SM, Peters-Golden M. Role of leukotrienes in killing of *Mycobacterium bovis* by neutrophils. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2004; 71: 185-190.
65. Kisich KO, Higgins M, Diamond G, *et al.* Tumor necrosis factor alpha stimulates killing of *Mycobacterium tuberculosis* by human neutrophils. *Infect Immun* 2002; 70: 4591-4599.
66. Bermudez LE, Petrofsky M, Stevens P. Treatment with recombinant granulocyte colony-stimulating factor (FilgrastinTM) stimulates neutrophils and tissue macrophages and induces an effective non-specific response against *Mycobacterium avium* in mice. *Immunol* 1998; 94: 297-303.
67. May ME, Spagnuolo PJ. Evidence for activation of a respiratory burst in the interaction of human neutrophils with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 1987; 55: 2304-2307.
68. Denis M. Human neutrophils, activated with cytokines or not, do not kill virulent *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis* 1991; 163: 919-920.

-
69. Reyes-Ruvalcaba D, González-Cortés C, Rivero_Lezcano OM. Human Phagocytes lack the ability to kill *Mycobacterium gordonae*, a non-pathogenic mycobacteria Immunol Lett 116: 72-78. 2008
70. Goncalves AS, Appelberg R. Effects of recombinant granulocyte-colony stimulating factor administration during *Mycobacterium avium* infection in mice. Clin Exp Immunol 2001; 124: 239-247.
71. Assari T. Chronic granulomatous disease; fundamental stages in our understanding of CGD. Med Immunol 2006; 5:4 doi: 10.1186/1476-9433-5-4.
72. Jones GS, Amirault HJ, Andersen BR. Killing of *Mycobacterium tuberculosis* by neutrophils: a nonoxidative process. J Infect Dis 1990; 162: 700-704.
73. Russell DG. Of microbes and macrophages: entry, survival and persistence. Curr Opin Immunol 1995; 7: 479-484.
74. Ma J, Chen T, Mandelin J, *et al.* Regulation of macrophage activation. Cell Mol Life Sci 2003; 60: 2334-2346.
75. Bhatt K, Salgame P. Host innate immune response to *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Immunol 2007; 27: 347-362.
76. Leemans JC, Thepen T, Weijer S, *et al.* Macrophages play a dual role during pulmonary tuberculosis in mice. J Infect Dis 2005; 191: 65-74.
77. Tan BH, Meinken C, Bastian M, *et al.* Macrophages acquire neutrophil granules for antimicrobial activity against intracellular pathogens. J Immunol 2006; 177: 1864-1871.
78. Ernst JD. Macrophage receptors for *Mycobacterium tuberculosis*. Infect Immun 1998; 66: 1277-1281.
79. Esparza I. Función de los macrófagos. Med Clin (Barc) 1986; 87: 429-434.
80. Ehrt S, Schnappinger D. Mycobacterial survival strategies in the phagosome: defence against host stresses. Cell Microbiol 2009; 11: 1170-1178.

-
81. Malik ZA, Denning GM, Kusner DJ. Inhibition of Ca²⁺ signalling by *Mycobacterium tuberculosis* is associated with reduced phagosome-lysosome fusion and increased survival within human macrophages. *J Exp Med* 2000; 191: 287-302.
82. Malik ZA, Iyer SS, Kusner DJ. *Mycobacterium tuberculosis* phagosomes exhibit altered calmodulin-dependent signal transduction: contribution to inhibition of phagosome-lysosome fusion and intracellular survival in human macrophages. *J Immunol* 2001; 166: 3392-3401.
83. Malik ZA, Thompson CR, Hashimi S, *et al.* Cutting edge: *Mycobacterium tuberculosis* blocks Ca²⁺ signaling and phagosome maturation in human macrophages via specific inhibition of sphingosine kinase. *J Immunol* 2003; 170: 2811-2815.
84. Cheon SH, Kampmann B, Hise AG, *et al.* Bactericidal activity in whole blood as a potential surrogate marker of immunity after vaccination against tuberculosis. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002; 9: 901-907.
85. Al-Attayan R, El-Shazly A, Mustafa AS. Assessment of *in vitro* immunity to *Mycobacterium tuberculosis* in a human peripheral blood infection model using a luciferase reporter construct of *M. tuberculosis* H37Rv. *Clin Exp Immunol* 2006; 145: 520-527.
86. Hoft DF, Worku S, Kampmann B, *et al.* Investigation of the relationships between immune-mediated inhibition of mycobacterial growth and other potential surrogate markers of protective *Mycobacterium tuberculosis* immunity. *J Infect Dis* 2002; 186: 1448-1457.
87. Silver RF, Li Q, Ellner JJ. Expression of virulence of *Mycobacterium tuberculosis* within human monocytes: virulence correlates with intracellular growth and induction of tumor necrosis factor alpha but not with evasion of lymphocyte-dependent monocyte effector functions. *Infect Immun* 1998; 66: 1190-1199.
88. Mendelson M, Walters S, Smith I, *et al.* Strain-specific mycobacterial lipids and the stimulation of protective immunity to tuberculosis. *Tuberculosis* 2005; 85: 407-413.
89. Rook GAW, Steele J, Ainsworth M, *et al.* Activation of macrophages to inhibit proliferation of *Mycobacterium tuberculosis*: comparison of the effects of recombinant

- gamma-interferon on human monocytes and murine peritoneal macrophages. *Immunol* 1986; 59: 333-338.
90. Flesch IEA, Kaufmann SHE. Activation of tuberculostatic macrophage functions by gamma interferon, interleukin-4, and tumor necrosis factor. *Infect Immun* 1990; 58: 2675-2677.
91. Zlotnik A, Crowle AJ. Lymphokine-induced mycobacteriostatic activity in mouse pleural macrophages. *Infect Immun* 1982; 37: 786-793.
92. Alexander J, Smith CC. Growth of *Mycobacterium Lepraemurium* in nonstimulated and stimulated mouse peritoneal-derived and bone marrow-derived macrophages in vitro. *Infect Immun* 1978; 22: 631-636.
93. Saunders BM, Briscoe H, Britton WJ. T cell-derived tumour necrosis factor is essential, but not sufficient, for protection against *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Clin Exp immunol* 2004, 137: 279-287.
94. Bonecini-Almeida MG, Chitale S, Boutsikakis I, *et al.* Induction of in vitro human macrophages anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity: requirement for IFN- γ and primed lymphocytes. *J Immunol* 1998; 160: 4490-4499.
95. Denis M, Gregg EO. Recombinant tumour necrosis factor-alpha decreases whereas recombinant interleukin-6 increases growth of a virulent strain of *Mycobacterium avium* in human macrophages. *Immunol* 1990; 71: 139-141.
96. Denis M, Ghadirian E. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor restricts growth of tubercle bacilli in human macrophages. *Immunol Lett* 1990; 24: 203-206
97. Flesch I, Kaufmann SHE. Mycobacterial growth inhibition by interferon- γ -activated bone marrow macrophages and differential susceptibility among strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* 1987; 138: 4408-4413.
98. Denis M. Killing of *Mycobacterium tuberculosis* within human monocytes: activation by cytokines and calcitriol. *Clin Exp Immunol* 1991; 84: 200-206.

-
99. Thoma-Uszynski S, Stenger S, Takeuchi O, *et al.* Induction of direct antimicrobial activity through mammalian toll-like receptors. *Science* 2001; 291: 1544-1547.
100. Fairbairn IP, Stober CB, Kumararatne DS, *et al.* ATP-mediated killing of intracellular mycobacteria by macrophages is a P2X₇-dependent process inducing bacterial death by phagosome-lysosome fusion. *J Immunol* 2001; 167: 3300-3307.
101. Garg SK, Volpe E, Palmieri G, *et al.* Sphingosine 1-phosphate induces antimicrobial activity both in vitro and in vivo. *J Infect Dis* 2004; 189: 2129-2138.
102. Rook GAW, Taverne J, Leveton C, *et al.* The role of gamma-interferon, vitamin D₃ metabolites and tumour necrosis factor in the pathogenesis of tuberculosis. *Immunol* 1987; 62: 229-234.
103. Auricchio G, Garg SK, Martino A, *et al.* Role of macrophage phospholipase D in natural and CpG-induced antimycobacterial activity. *Cell Microbiol* 2003; 5: 913-920.
104. MacMicking JD, North RJ, LaCourse R, *et al.* Identification of nitric oxide synthase as a protective locus against tuberculosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 5243-5248.
105. Shiloh MU, Nathan CF. Reactive nitrogen intermediates and the pathogenesis of *Salmonella* and mycobacteria. *Curr Opin Microbiol* 2000; 3: 35-42.
106. Flynn JL, Chan J. Immune evasion by *Mycobacterium tuberculosis*: living with the enemy. *Curr Opin Immunol* 2003; 15: 450-455.
107. Warwick-Davies J, Dhillon J, O'Brien L, *et al.* Apparent killing of *Mycobacterium tuberculosis* by cytokine-activated human monocytes can be an artefact of a cytokine effect on the monocytes. *Clin Exp Immunol* 1994; 96: 214-217.
108. Byrd TF. Tumor necrosis factor α (TNF α) promotes growth of virulent *Mycobacterium tuberculosis* in human monocytes. *J Clin Invest* 1997; 99: 2518-2529.
109. Bonay M, Bouchonnet F, Pelicic V, *et al.* Effect of stimulation of human macrophages on intracellular survival of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159: 1629-1637.

110. Robertson AK, Andrew PW. Interferon gamma fails to activate human monocyte-derived macrophages to kill or inhibit the replication of a non-pathogenic mycobacterial species. *Microb Pathog* 1991; 11: 283-288.
111. Mapother ME, Songer JG. In vitro interaction of *Mycobacterium avium* with intestinal epithelial cells. *Infect Immun* 1984; 45: 67-73.
112. Bermudez LE, Young LS. Factors affecting invasion of HT-29 and HEP-2 epithelial cells by organisms of the *Mycobacterium avium* complex. *Infect Immun* 1994; 62: 2021-2026.
113. Bermudez LE, Goodman J. *Mycobacterium tuberculosis* invades and replicates within type II alveolar cells. *Infect Immun* 1996; 64: 1400-1406.
114. Rivas-Santiago B, Schwander SK, Sarabia C, *et al.* Human β -defensin 2 is expressed and associated with *Mycobacterium tuberculosis* during infection of human alveolar epithelial cells. *Infect Immun* 2005; 73: 4505-4511.
115. Rivas-Santiago B, Vieyra-Reyes P, Fernández de Larrea C, *et al.* Células epiteliales en la inmunidad del pulmón. *Kasmera* 2006; 34: 61-68.
116. Cooper MA, Fehninger TA, Caligiuri MA. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol* 2001; 22: 633-640.
117. Brill KJ, Li Q, Larkin R, *et al.* Human natural killer cells mediate killing of intracellular *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv via granule-independent mechanism. *Infect Immun* 2001; 69: 1755-1765.
118. Bermudez LEM, Young LS. Natural killer cell-dependent mycobacteriostatic and mycobactericidal activity in human macrophages. *J Immunol* 1991; 146: 265-270.
119. Molloy A, Meyn PA, Smith KD, *et al.* Recognition and destruction of *Bacillus Calmette-Guerin*-infected human monocytes. *J Exp Med* 1993; 177: 1691-1698
120. Denis M. Interleukin-12 (IL-12) augments cytolytic activity of natural killer cells toward *Mycobacterium tuberculosis*-infected human monocytes. *Cell Immunol* 1994; 156: 529-536.

-
121. Korbelt DS, Schneider B, Schaible UE. Innate immunity in tuberculosis: myths and truth. *Microbes Infect* 2008; 10: 995-1004.
 122. Henderson RA, Watkins SC, Flynn JL. Activation of human dendritic cells following infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* 1997; 159: 635-643.
 123. Förtsch D, Röllinghoff M, Stenger S. IL-10 converts human dendritic cells into macrophage-like cells with increased antibacterial activity against virulent *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* 2000; 165: 978-987.
 124. Satthaporn S, Eremin O. Dendritic cells (I): biological functions. *J R Coll Surg Edinb* 2001; 46: 9-20.
 125. Robinson SP, Patterson S, English N, *et al.* Human peripheral blood contains two distinct lineages of dendritic cells. *Eur J Immunol* 1999; 29: 2769-2778.
 126. Reis e Sousa C, Sher A, Kaye P. The role of dendritic cells in the induction and regulation of immunity to microbial infection. *Curr Opin Immunol* 1999; 11: 392-399.
 127. Davidson DJ, Currie AJ, Reid GSD, *et al.* The cationic antimicrobial peptide LL-37 modulates dendritic cell differentiation and dendritic cell-induced T cell polarization. *J Immunol* 2004; 172: 1146-1156.
 128. Tailleux L, Neyrolles O, Honoré-Bouakline S, *et al.* Constrained intracellular survival of *Mycobacterium tuberculosis* in human dendritic cells. *J Immunol* 2003; 170: 1939-1948.
 129. Gerosa F, Baldani-Guerra B, Nisii C, *et al.* Reciprocal activating interaction between natural killer cells and dendritic cells. *J Exp Med* 2002; 195: 327-333.
 130. Kaufmann SHE. Protection against tuberculosis: cytokines, T cells, and macrophages. *Ann Rheum Dis* 2002; 61: ii54-ii58.
 131. Rook GAW; Seah G, Ustianowski A. M. tuberculosis: immunology and vaccination. *Eur Respir J* 2001; 17: 537-557.
 132. Ottenhoff THM, Verreck FAW, Hoeve MA, *et al.* Control of human host immunity to mycobacteria. *Tuberculosis* 2005; 85: 53-64.

133. Stenger S, Rosat JP, Bloom BR, *et al.* Granulysin: a lethal weapon of cytolytic T cells. *Trends Immunol* 1999; 20: 390-394.
134. Murray PJ. Defining the requirements for immunological control of mycobacterial infections. *Trends Microbiol* 1999; 7: 366-372.
135. Hoft D. Tuberculosis vaccine development: goals, immunological design, and evaluation. *Lancet* 2008; 372: 164-175.
136. LeBien TW, Tedder TF. B lymphocytes: how they develop and function. *Blood* 2008; 112: 1570-1580.
137. Rivero-Lezcano OM. Cytokines as immunomodulators in tuberculosis therapy. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov* 2008; 3: 000-000
138. Abebe F, Bjune G. The protective role of antibody responses Turing *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Clin Exp Immunol* 2009; 157: 235-243
139. Tufariello JM, Chan J, Flynn JL. Latent tuberculosis: mechanisms of host and bacillus that contribute to persistent infection. *Lancet Infect Dis* 2003; 3: 578-590.
140. Ulrichs T, Kosmiadi GA, Trusov V, *et al.* Human tuberculous granulomas induce peripheral lymphoid follicle-like structures to orchestrate local host defence in the lung. *J Pathol* 2004; 204: 217-228.
141. Co DO, Hogan LH, Kim SI, *et al.* Mycobacterial granulomas: keys to a long-lasting host-pathogen relationship. *Clin Immunol* 2004; 113: 130-136.
142. Ulrichs T, Kaufmann SHE. New insights into the function of granulomas in human tuberculosis. *J Pathol* 2006; 208: 261-269.
143. Algood HMS, Lin PL, Flynn JL. Tumor necrosis factor and chemokine interactions in the formation and maintenance of granulomas in tuberculosis. *Clin Infect Dis* 2005; 41: S189-193.
144. Håvard J, Hamill P, Hancock REW. Peptide antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev* 2006; 19: 491-511.
145. Wiesner J, Vilcinskan A. Antimicrobial peptides. The ancient arm of the human immune system. *Virulence* 2010; 1: 440-464.

-
146. Ong ST, Ho JZS, Ho B, *et al.* Iron-withholding strategy in innate immunity. *Immunobiology* 2006; 211: 295-314.
147. Ratledge C. Iron, mycobacteria and tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)* 2004; 84: 110-130.
148. Strieter RM, Belperio JA, Keane MP. Cytokines in innate host defense in the lung. *J Clin Invest* 2002; 109: 699-705.
149. Babior BM. NADPH oxidase: an update. *Blood* 1999; 93: 1464-1476.
150. DeCoursey TE, Ligeti E. Regulation and termination of NADPH oxidase activity. *Cell Mol Life Sci* 2005; 62: 2173-2193.
151. DeLeo FR, Allen LAH, Apicella M, *et al.* NADPH oxidase activation and assembly during phagocytosis. *J Immunol* 1999; 163: 6732-6740.
152. Segal AW. How neutrophils kill microbes. *Annu Rev Immunol* 2005; 23: 197-223.
153. Leusen JHW, Verhoeven AJ, Roos D. Interactions between the components of the human NADPH oxidase: a review about the intrigues in the *phox* family. *Front Biosci* 1996; 1: 72-90.
154. Forman HJ, Torres M. Signaling by the respiratory burst in macrophages. *IUBMB Life* 2001; 51: 365-371.
155. Amezcaga MA, Bazzoni F, Sorio C, *et al.* Evidence for the involvement of distinct signal transduction pathways in the regulation of constitutive and interferon γ -dependent gene expression of NADPH oxidase components (gp91-phox, p47-phox, and p22-phox) and high-affinity receptor for IgG (Fc γ R-I) in human polymorphonuclear leukocytes. *Blood* 1992; 79: 735-744.
156. Carlyon JA, Chan WT, Galán J, *et al.* Repression of *rac2* mRNA expression by *Anaplasma phagocytophila* is essential to the inhibition of superoxide production and bacterial proliferation. *J Immunol* 2002; 169: 7009-7018.
157. LeCabec V, Cols C, Maridonneau-Parini M. Nonopsonic phagocytosis of zymosan and *Mycobacterium kansasii* by CR3 (CD11b/CD18) involves distinct

molecular determinants and is or is not coupled with NADPH oxidase activation. *Infect Immun* 2000; 68: 4736-4745.

158. Nagata S, Hanayama R, Kawane K. Autoimmunity and the clearance of dead cells. *Cell* 2010; 140: 619-630.

159. Lee J, Hartman M, Kornfeld H. Macrophage apoptosis in tuberculosis. *Yonsei Med J* 2009; 50: 1-11.

160. Labbé K, Saleh M. Cell death in the host response to infection. *Cell Death Differ* 2008; 15: 1339-1349.

161. Alemán M, Schierloh P, de la Barrera SS, *et al.* *Mycobacterium tuberculosis* triggers apoptosis in peripheral neutrophils involving toll-like receptor 2 and p38 mitogen protein kinase in tuberculosis patients. *Infect Immun* 2004; 72: 5150-5158.

162. Persson A, Blomgram-Julinder R, Eklund D, *et al.* Induction of apoptosis in human neutrophils by *Mycobacterium tuberculosis* is dependent on mature bacterial lipoproteins. *Microb Pathog* 2009; 47: 143-150.

163. Fox S, Leitch AE, Duffin R, *et al.* Neutrophil apoptosis: relevance to the innate immune response and inflammatory disease. *J Innate immun* 2010; 2: 216-227.

164. Perskvist N, Long M, Stendahl O, *et al.* *Mycobacterium tuberculosis* promotes apoptosis in human neutrophils by activating caspase-3 and altering expression of Bax/Bcl-x_L via an oxygen-dependent pathway. *J Immunol* 2002; 168: 6358-6365

165. Melley DD, Evans TW, Quinlan GJ. Redox regulation of neutrophil apoptosis and the systemic inflammatory response syndrome. *Clin Sci* 2005; 108: 413-424.

166. Zhang B, Hirahashi J, Cullere X, *et al.* Elucidation of molecular events leading to neutrophil apoptosis following phagocytosis. *J Biol Chem* 2003; 278: 28443-28454.

167. Simon HU, Haj-Yehia A, Levi-Schaffer F. Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction. *Apoptosis* 2000; 5: 415-418.

168. Spira A, Carroll JD, Liu G, *et al.* Apoptosis genes in human alveolar macrophages infected with virulent or attenuated *Mycobacterium tuberculosis*. A pivotal role for tumor necrosis factor. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003; 99: 545-551.

-
169. Balcewicz-Sablinska MK, Keane J, Kornfeld H, *et al.* Pathogenic *Mycobacterium tuberculosis* evades apoptosis of host macrophages by release of TNF-R2, resulting in inactivation of TNF- α . *J Immunol* 1998; 161: 2636-2641.
170. Sly LM, Hingley-Wilson SM, Reiner NE, *et al.* Survival of *Mycobacterium tuberculosis* in host macrophages involves resistance to apoptosis dependent upon induction of antiapoptotic Bcl-2 family member Mcl-1. *J Immunol* 2003; 170: 430-437.
171. Hart SP, Ross JA, Ross K, *et al.* Molecular characterization of the surface of apoptotic neutrophils: implications for functional downregulation and recognition by phagocytes. *Cell Death Differ* 2000; 7: 493-503.
172. Persson YAZ, Blomgram-Julinder R, Rahman S, *et al.* *Mycobacterium tuberculosis*-induced apoptotic neutrophils trigger a pro-inflammatory response in macrophages through release of heat shock protein 72, acting in synergy with the bacteria. *Microbes Infect* 2008; 10: 233-240.
173. Savill JS, Wyllie AH, Henson JE, *et al.* Macrophage phagocytosis of aging neutrophils in inflammation. Programmed cell death in the neutrophil leads to its recognition by macrophages. *J Clin Invest* 1989; 83: 865-875.
174. Kornfeld H, Mancino G, Colizzi V. The role of macrophage cell death in tuberculosis. *Cell Death Differ* 1999; 6: 71-78.
175. Miller JL, Velmurugan K, Cowan MJ, *et al.* The type I NADPH dehydrogenase of *Mycobacterium tuberculosis* counters phagosomal NOX2 activity to inhibit TNF- α -mediated host cell apoptosis. *PloS Pathogen* 2010; 6: e1000864. doi: 10.1371/journal.ppat.1000864.
176. Briken V, Millar JL. Living on the edge: inhibition of host cell apoptosis by *Mycobacterium tuberculosis*. *Future Microbiol* 2008; 3: 415-422.
177. Darwich L, Coma G, Peña R, *et al.* Secretion of interferon- γ by human macrophages demonstrated at the single-cell level after costimulation with interleukin (IL)-12 plus IL-18. *Immunol* 2008; 126: 386-393.
178. Ellis TN, Beaman BL. Interferon- γ activation of polymorphonuclear neutrophil function. *Immunol* 2004; 112: 2-12.

179. Driggers PH, Ennist DL, Gleason SL, *et al.* An interferon γ -regulated protein that binds the interferon-inducible enhancer element of major histocompatibility complex class I genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 3743-3747.
180. Fenton MJ, Vermeulen MW, Kim S, *et al.* Induction of gamma interferon production in human alveolar macrophages by *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 1997; 65: 5149-5156.
181. Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, *et al.* Interferon- γ : an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol* 2004; 75: 163-189.
182. Cooper AM, Dalton DK, Stewart TA, *et al.* Disseminated tuberculosis in interferon γ gene-disrupted mice. *J Exp Med* 1993; 178: 2243-2247.
183. Flynn JL, Chan J, Triebold KJ, *et al.* An essential role for interferon γ in resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Exp Med* 1993; 178: 2249-2254.
184. Jouanguy E, Altare F, Lamhamedi S, *et al.* Interferon- γ -receptor deficiency in an infant with fatal bacille Calmette-Guérin infection. *N Engl J Med* 1996; 335: 1956-1961.
185. Holland SM, Eisenstein EM, Kuhns DB, *et al.* Treatment of refractory disseminated nontuberculous mycobacterial infection with interferon gamma. A preliminary report. *N Engl J Med* 1994; 330: 1348-1355.
186. Wallis RS. Reconsidering adjuvant immunotherapy for tuberculosis. *Clin Infect Dis* 2005; 41: 201-208.
187. Condos R, Raju B, Canova A, *et al.* Recombinant gamma interferon stimulates signal transduction and gene expression in alveolar macrophages *in vitro* and in tuberculosis patients. *Infect Immun* 2003; 71: 2058-2064.
188. Suárez-Méndez R, García-García I, Fernández-Olivera N, *et al.* Adjuvant interferon gamma in patients with drug-resistant pulmonary tuberculosis: A pilot study. *BMC Infect Dis* 2004; 4: 44-51.
189. Koh WJ, Kwon OJ, Suh GY, *et al.* Six-month therapy with aerosolized interferon- γ for refractory multidrug-resistant pulmonary tuberculosis. *J Korean Med Sci* 2004; 19: 167-171.

-
190. Kawakami K. Promising immunotherapies with Th1-related cytokines against infectious diseases. *J Infect Chemother* 2003; 9: 201-209.
191. Park SK, Cho S, Lee IH, *et al.* Subcutaneously administered interferon-gamma for the treatment of multidrug-resistant pulmonary tuberculosis. *Int J Infect Dis* 2007; 11: 434-440.
192. Kjaergard LL, Villumsen J, Gluud C. Reported methodologic quality and discrepancies between large and small randomized trials in meta-analyses. *Ann Intern Med* 2001; 135: 982-989.
193. National Heart LaBIN. Effects of Interferon-Gamma on cavitary pulmonary tuberculosis in the lungs. *ClinicalTrials.gov Identifier: NCT00201123* 2005.
194. Ottenhoff THM, Kumararatne D, Casanova JL. Novel human immunodeficiencies reveal the essential role of type-I cytokines in immunity to intracellular bacteria. *Trends immunol* 1998; 19: 491-494.
195. Blanchard DK, Michelini-Norris MB, Pearson CA, *et al.* Production of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) by monocytes and large granular lymphocytes stimulated with *Mycobacterium avium-M. Intracellulare*: activation of bactericidal activity by GM-CSF. *Infect Immn* 1991; 59: 2396-2402.
196. Flynn JL, Goldstein MM, Chan J, *et al.* Tumor necrosis factor- α is required in the protective immune response against *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Immunity* 1995; 2: 561-572.
197. Algood HMS, Chan J, Flynn JL. Chemokines and tuberculosis. *Cytokine Growth Factor Rev* 2003; 14: 467-477.
198. Bean AGD, Roach DR, Briscoe H, *et al.* Structural deficiencies in granuloma formation in TNF gene-targeted mice underline the heightened susceptibility to aerosol *Mycobacterium tuberculosis* infection, which is not compensated for by lymphotoxin. *J Immunol* 1999; 162: 3504-3511.
199. Dinarello CA. Anti-cytokine therapeutics and infections. *Vaccine* 2003; 21: S2/24-S2/34.

200. Winthrop KL. Update on tuberculosis and other opportunistic infections associated with drugs blocking tumour necrosis factor α . *Ann Rheum Dis* 2005, 64: iv29–iv30.
201. Maini R, St Clair EW, Breedveld F, *et al.* Infliximab (chimeric anti-tumour necrosis factor α monoclonal antibody) versus placebo in rheumatoid arthritis patients receiving concomitant methotrexate: a randomised phase III trial. *Lancet* 1999; 354: 1932-1939.
202. Rook GAW, Hernandez-Pando R, Dheda K, *et al.* IL-4 in tuberculosis: implications for vaccine design. *Trends Immunol* 2004; 25: 483-488.
203. Lin Y, Zhang M, Hofman F, *et al.* Absence of a prominent Th2 cytokine response in human tuberculosis. *Infect Immun* 1996; 64: 1351-1356.
204. Allen SJ, Crown SE, Handel TM. Chemokine: receptor structure, interactions, and antagonism. *Annu Rev Immunol* 2007; 25: 787-820.
205. Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity*, 2000; 12: 121-127.
206. Rot A, von Andrian UH. Chemokines in innate and adaptative host defense: basic chemokine grammar for immune cells. *Annu Rev Immunol* 2004; 22: 891-928.
207. Cano NF, Montoya CJ. Las quimiocinas: citoquinas proinflamatorias y reguladoras del tráfico celular. *Iatreia* 2001; 14: 57-72.
208. Schutyser E, Struyf S, Van Damme J. The CC chemokine CCL20 and its receptor CCR6. *Cytokine Growth Factor Rev* 2003; 14: 409-26.
209. Hoover DM, Boulègue C, Yang D, *et al.* The structure of human macrophage inflammatory protein-3 α /CCL20. *J Biol Chem* 2002; 277: 37647-37654.
210. Yoshida A, Isomoto H, Hisatsune J, *et al.* Enhanced expression of CCL20 in human *Helicobacter pylori*-associated gastritis. *Clin Immunol* 2009; 130: 290-297.
211. Tomimori K, Uema E, Teruya H *et al.* *Helicobacter pylori* induces CCL20 expression. *Infect Immun* 2007; 75:5223-5232.

-
212. Veckman V, Miettinen M, Matikainen S, *et al.* Lactobacilli and streptococci induce inflammatory chemokine production in human macrophages that stimulates Th1 cell chemotaxis. *J Leukoc Biol* 2003; 74: 395-402.
213. Takahashi K, Nakanishi T, Yumoto H, *et al.* CCL20 production is induced in human dental pulp upon stimulation by *Streptococcus mutans* and proinflammatory cytokines. *Oral Microbiol Immunol* 2008; 23: 320-327.
214. Sperandio B, Regnault B, Guo J, *et al.* Virulent *Shigella flexneri* subverts the host innate immune response through manipulation of antimicrobial peptide gene expression. *J Exp Med* 2008; 205:1121-1132.
215. Latvala S, Pietilä TE, Veckman V, *et al.* Potentially probiotic bacteria induce efficient maturation but differential cytokine production in human monocyte-derived dendritic cells. *World J Gastroenterol* 2008; 14:5570-5583.
216. Sibartie S, O'Hara AM, Ryan J, *et al.* Modulation of pathogen-induced CCL20 secretion from HT-29 human intestinal epithelial cells by commensal bacteria. *BMC Immunol* 2009; 10: doi:10.1186/1471-2172-10-54.
217. Kao CY, Huang F, Chen Y, *et al.* Up-regulation of CC chemokine ligand 20 expression in human airway epithelium by IL-17 through a JAK-independent but MEK/NF- κ B-dependent signaling pathway. *J Immunol* 2005; 175: 6676-6685.
218. Scapini P, Lapinet-Vera JA, Gasperini S, *et al.* The neutrophil as a cellular source of chemokines. *Immunol Rev* 2001; 177: 195-203.
219. Scarpini P, Crepaldi L, Pinardi C, *et al.* CCL20/macrophage inflammatory protein-3 α production in LPS-stimulated neutrophils is enhanced by the chemoattractant formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine and INF- γ through independent mechanisms. *Eur J Immunol* 2002; 32: 3515-3524.
220. Hosokawa Y, Hosokawa I, Ozaki K, *et al.* Increase of CCL20 expression by human gingival fibroblasts upon stimulation with cytokines and bacterial endotoxin. *Clin Exp Immunol* 2005; 142:285-291.
221. Lee JS, Lee JY, Son JW *et al.* Expression and regulation of the CC-chemokine ligand 20 during human tuberculosis. *Scand J Immunol* 2008; 67:77-85.

222. Qiu B, Frait KA, Reich F, *et al.* Chemokine expression dynamics in mycobacterial (type-1) and schistosomal (type-2) antigen-elicited pulmonary granuloma formation. *Am J Pathol* 2001; 158: 1503-1515.
223. Wolf AJ, Linas B, Trevejo-Nuñez GJ *et al.* *Mycobacterium tuberculosis* infects dendritic cells with high frequency and impairs their function in vivo. *J Immunol* 2007; 179: 2509-2519.
224. Osterholzer JJ, Ames T, Polak T, *et al.* CCR2 and CCR6, but not endothelial selectins, mediate the accumulation of immature dendritic cells within the lungs of mice in response to particulate antigen. *J Immunol* 2005; 175:874-883.
225. Siervo F, Dubois B, Coste A, *et al.* Flagellin stimulation of intestinal epithelial cells triggers CCL20-mediated migration of dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 13722-13727
226. Dieu MC, Vanbervliet B, Vicari A, *et al.* Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites. *J Exp Med* 1998; 188: 373-386.
227. Thorley A, Goldstraw P, Young A, *et al.* Primary human alveolar type II epithelial cell CCL20 (macrophage inflammatory protein-3 α)-induced dendritic cell migration. *Am J Respir Mol Biol* 2005; 32: 262-267.
228. Starmer TD, Barker CK, Jia HP, *et al.* CCL20 is an inducible product of human airway epithelia with innate immune properties. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003; 29: 627-633.
229. Esche C, Stellato C, Beck LA. Chemokines: key players in innate and adaptive immunity. *J Invest Dermatol* 2005; 125: 615-628.
230. Rossi D, Zlotnik A. The biology of chemokines and their receptors. *Annu Rev Immunol* 2000; 18: 217-242.
231. Yang D, Chen Q, Hoover DM, *et al.* Many chemokines including CCL20/MIP-3 α display antimicrobial activity. *Leukoc Biol* 2003; 74: 448-455.

-
232. Brandt E, Petersen F, Ludwig A, *et al.* The β -thromboglobulins and platelet factor 4: blood platelet-derived CXC chemokines with divergent roles in early neutrophil regulation. *J Leukoc Biol* 2000; 67: 471-478.
233. Leonard EJ, Yoshimura T, Rot A, *et al.* Chemotactic activity and receptor binding of neutrophil attractant/activation protein-1 (NAP-1) and structurally related host defense cytokines: interaction of NAP-2 with the NAP-1 receptor. *J Leukoc Biol* 1991; 49: 258-265.
234. Moser B, Schumacher C, von Tschärner V, *et al.* Neutrophil-activating peptide 2 and *gro*/melanoma growth-stimulatory activity interact with neutrophil-activating peptide 1/interleukin 8 receptors on human neutrophils. *J Biol Chem* 1991; 266: 10666-10671.
235. Ludwig A, Petersen F, Zahn S, *et al.* The CXC-chemokine neutrophil-activating peptide-2 induces two distinct optima of neutrophil chemotaxis by differential interaction with interleukin-8 receptors CXCR-1 and CXCR-2. *Blood* 1997; 90: 4588-4597.
236. Castor CW, Miller JW, Walz DA. Structural and biological characteristics of connective tissue activating peptide (CTAP-III), a major human platelet-derived growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983; 80: 765-769.
237. Wenger RH, Wicki AN, Walz A, *et al.* Cloning of cDNA coding for connective tissue activating peptide III from a human platelet-derived λ gt11 expression library. *Blood* 1989; 73: 1498-1503.
238. Varma KG, Niewiarowski S, Holt JC, *et al.* Human platelet basic protein its relation to low affinity platelet factor 4 and β -thromboglobulin. *Biochim Biophys Acta* 1982; 701: 7-11.
239. Majumdar S, Gonder D, Koutsis B, *et al.* Characterization of the human β -thromboglobulin gene. Comparison with the gene for platelet factor 4. *J Biol Chem* 1991; 266: 5785-5789.
240. Walz A, Baggiolini M. A novel cleavage product of β -thromboglobulin formed in cultures of stimulated mononuclear cells activates human neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 159: 969-975.

241. Walz A, Baggiolini M. Generation of the neutrophil-activating peptide NAP-2 from platelet basic protein or connective tissue-activating peptide III through monocyte proteases. *J Exp Med* 1990; 171: 449-454.
242. Ehlert JE, Gerdes J, Flad HD, *et al.* Novel C-terminally truncated isoforms of the CXC chemokine β -thromboglobulin and their impact on neutrophil functions. *J Immunol* 1998; 161: 4975-4982.
243. Krijgsveld J, Zaat SAJ, Meeldijk J, *et al.* Thrombocidins, microbicidal proteins from human blood platelets, are C-terminal deletion products of CXC chemokines. *J Biol Chem* 2000; 275: 20374-20381.
244. Brandt E, Van Damme J, Flad HD. Neutrophils can generate their activator neutrophil-activating peptide 2 by proteolytic cleavage of platelet-derived connective tissue-activating peptide III. *Cytokine* 1991; 3: 311-321.
245. Car BD, Baggiolini M, Walz A. Formation of neutrophil-activating peptide 2 from platelet-derived connective-tissue-activating peptide III by different tissue proteinases. *J Biochem* 1991; 275: 581-584.
246. Schenk BI, Petersen F, Flad HD, *et al.* Platelet-derived chemokines CXC chemokine ligand (CXCL) 7, connective tissue-activating peptide III, and CXCL4 differentially affect and cross-regulate neutrophil adhesion and transendothelial migration. *J Immunol* 2002; 169: 2602-2610.
247. Walz A, Meloni F, Clark-Lewis I, *et al.* $[Ca^{2+}]_i$ changes and respiratory burst in human neutrophils and monocytes induced by NAP-1/interleukin-8, NAP-2, and gro/MGSA. *J Leukoc Biol* 1994; 50: 279-286.
248. Skerka C, Irving SG., Bialonski A, *et al.* Cell type specific expression of members of the IL-8/NAP-1 gene family. *Cytokine* 1993; 5: 112-116.
249. El-Gedaily A, Schoedon G, Schneemann M, *et al.* Constitutive and regulated expression of platelet basic protein in human monocytes. *J Leukoc Biol* 2004; 75: 495-503.
250. Pillai MM, Iwata M, Awaya N, *et al.* Monocyte-derived CXCL7 peptides in the marrow microenvironment. *Blood* 2006; 107: 3520-3526.

-
251. Schaffner A, King CC, Schaer D, *et al.* Induction and antimicrobial activity of platelet basic protein derivatives in human monocytes. *J Leukoc Biol* 2004; 76: 1010-1018.
252. Walz A, Meloni F, Clark-Lewis I, *et al.* $[Ca^{2+}]_i$ changes and respiratory burst in human neutrophils and monocytes induced by NAP-1/Interleukin-8, NAP-2, and GRO/MGSA. *J Leukoc Biol* 1991; 50: 279-286
253. Detmers PA, Powell DE, Walz A, *et al.* Differential effects of neutrophil-activating peptide 1/IL-8 and its homologues on leukocyte adhesion and phagocytosis. *J Immunol* 1991; 147: 4211-4217.
254. Reddigari SR, Kuna P, Miragliotta GF, *et al.* Connective tissue-activating peptide-III and its derivative, neutrophil-activating peptide-2, release histamine from human basophils. *J Allergy Clin Immunol* 1991; 89: 666-672.
255. Ehlert JE, Petersen F, Kubbutat MHG, *et al.* Limited and defined truncation at the C terminus enhances receptor binding and degranulation activity of the neutrophil-activating peptide 2 (NAP-2). Comparison of native and recombinant NAP-2 variants. *J Biol Chem* 1995; 270: 6338-6344.
256. Tang YQ, Yeaman MR, Selsted ME. Antimicrobial peptides from human platelets. *Infect Immun* 2002; 70: 6524-6533.
257. Khajoev V, Saito M, Takada H, *et al.* Novel roles of osteopontin and CXC chemokine ligand 7 in the defence against mycobacterial infection. *Clin Exp Immunol* 2006; 143: 260-268.
258. Cohn ML, Waggoner RF, McClatchy JK. The 7H11 medium for the cultivation of mycobacteria. *Am Rev Respir Dis* 1968; 98: 295-296.
259. Edelstein PH. Improved semiselective medium for isolation of *Legionella pneumophila* from contaminated clinical and environmental specimens. *J Clin Microbiol* 1981; 14: 298-303.
260. Sundström C, Nilsson K. Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *Int J Cancer* 1976; 17: 565-577.
261. Lozzio BB, Lozzio CB. Properties of the K562 cell line derived from a patient with chronic myeloid leukemia. *Int J Cancer* 1977; 19: 136.

262. Klein E, Ben-Bassat H, Neumann H, *et al.* Properties of the K652 cell line, derived from a patient with chronic myeloid leukemia. *Int J Cancer* 1976; 18: 421-431.
263. Böyun A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand J Clin Lab Invest* 1968 Suppl 97: 77-89.
264. Sallusto F, Lanzavecchia A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor α . *J Exp Med* 1994; 179: 1109-1118.
265. Sato K, Kawasaki H, Nagayama H, *et al.* TGF- β 1 reciprocally controls chemotaxis of human peripheral blood monocyte-derived dendritic cells via chemokine receptors. *J Immunol* 2000; 164: 2285-2295.
266. Fazal N, Bartlett R, Lammas DA, *et al.* A comparison of the different methods available for determining BCG-macrophage interactions in vitro, including a new method of colony counting in broth. *Microbiol Immunol* 1992; 105: 355-362.
267. Kinyoun JJ. A note on uhlenhuths method for sputum examination, for tubercle bacilli. *Am J Public Health (NY)* 1914; 5: 867-870.
268. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, *et al.* *Current Protocols in Cytometry*; New York, NY: John Wiley and Sons Inc 1987; 9.19.
269. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2001; 29: e45.
270. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988; 16: 1215.
271. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, *et al.* *Current Protocols in Molecular Biology*; New York, NY: John Wiley and Sons Inc 1987; 1.8.1.
272. Ho SN, Hunt HD, Horton RM, *et al.* Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* 1989; 77: 51-59.
273. Schäger H. Tricine-SDS-PAGE. *Nat Protoc* 2006; 1: 16-23.
274. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, *et al.* *Current Protocols in Molecular Biology*; New York, NY: John Wiley and Sons Inc 1987; 10.2.A.

-
275. Nakagawara A, Nathan CF. A simple method for counting adherent cells: application to cultured human monocytes, macrophages and multinucleated giant cells. *J Immunol Methods* 1983; 56: 261-268.
276. Lane TA. Granulocyte storage. *Transfus Med Rev* 1990; 4: 23-34.
277. Bocchino M, Galati D, Sanduzzi A, *et al.* Role of mycobacteria-induced monocyte/macrophage apoptosis in the pathogenesis of human tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis* 2005; 9: 375-383.
278. Rojas M, Barrera LF, García LF. Induction of apoptosis in murine macrophages by *Mycobacterium tuberculosis* is reactive oxygen intermediates-independent. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 247: 436-442.
279. Alitalo R. Induced differentiation of K562 leukemia cells: a model for studies of gene expression in early megakaryoblasts. *Leuk Res* 1990; 14: 501-514.
280. Koefler H P, Bar-Eli M, Territo MC, *et al.* Phorbol ester effect on differentiation of human myeloid leukemia cell lines blocked at different stages of maturation. *Cancer Res* 1981; 41: 919-926.
281. Zhang Y, Broser M, Cohen H, *et al.* (1995) Enhanced interleukin-8 release and gene expression in macrophages after exposure to *Mycobacterium tuberculosis* and its components. *J. Clin. Invest* 1995; 95: 586-592.
282. Crowle AJ, May M. Preliminary demonstration of human tuberculoimmunity in vitro. *Infect Immun* 1981; 31: 453-464.
283. Flores-Villanueva PO, Ruiz-Morales JA, Song CH, *et al.* A functional promoter polymorphism in *monocyte chemoattractant protein-1* is associated with increased susceptibility to pulmonary tuberculosis. *J Exp Med* 2005; 202: 1649-1658.
284. Zhu K, Shen Q, Ulrich M, *et al.* Human monocyte-derived dendritic cells expressing both chemotactic cytokines IL-8, MCP-1, RANTES and their receptors, and their selective migration to these chemokines. *Chin Med J* 2000; 113: 1124-1128.
285. Pervushina O, Scheuerer B, Reiling N *et al.* Platelet factor4/CXCL4 induces phagocytosis and the generation of reactive oxygen metabolites in mononuclear phagocytes independently of Gi protein activation or intracellular calcium transients. *J Immunol* 2004; 173: 2060-2067.

286. Aston C, Rom WN, Talbot AT, *et al.* Early inhibition of mycobacterial growth by human alveolar macrophages is not due to nitric oxide. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157: 1943-1950.
287. Sibelle Y, Reynolds HY. Macrophages and polymorphonuclear neutrophils in lung defense and injury. *Am Rev Respir Dis* 1990; 141: 471-501.
288. Silva MT, Silva MNT, Appelberg R, *et al.* Neutrophil-macrophage cooperation in the host defense against mycobacterial infections. *Microb Pathog* 1989; 6: 369-380.
289. Newmann GW, Guarnacvia JR, Remold HG, *et al.* Cytokines enhance neutrophils from human immunodeficiency virus-negative donors and AIDS patients to inhibit the growth of *Mycobacterium avium* in vitro. *J Infect Dis* 1997; 175: 891-900.
290. Condos R, Rom WN, Liu YM, *et al.* Local immune responses correlate with presentation and outcome in tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157: 729-735.
291. Pearlman E, Jiwa AH, Engleberg NC, *et al.* Growth of *Legionella pneumophila* in a human macrophage-like (U937) cell line. *Microb. Pathog* 1988; 5: 87-95.
292. Humphreys IR, Stewart GR, Turner DJ, *et al.* A role for dendritic cells in the dissemination of mycobacterial infection. *Microbes Infect* 2006; 8: 1339-1346.
293. Blumenthal A, Lauber J, Hoffmann R, *et al.* Common and unique gene expression signatures of human macrophages in response to four strains of *Mycobacterium avium* that differ in their growth and persistence characteristics. *Infect Immun* 2005; 73:3330-3341.
294. Buettner M, Meinken C, Bastian M *et al.* Inverse correlation of maturity and antibacterial activity in human dendritic cells. *J Immunol* 2005; 174: 4203-4209.
295. Mohagheghpour N, Vollenhoven VA, Goodman J, *et al.* Interaction of *Mycobacterium avium* with human monocyte-derived dendritic cells. *Infect Immun* 2000; 68: 5824-5829.
296. Akhtar P, Srivastava S, Srivastava A, *et al.* Rv3303c of *Mycobacterium tuberculosis* protects tubercle bacilli against oxidative stress in vivo and contributes to virulence in mice. *Microbes Infect* 2006; 8: 2855-2862.
297. Astarie-Dequeker C, N'Diaye EN, Le Cabec V, *et al.* The mannose receptor mediates uptake of pathogenic and nonpathogenic mycobacteria and bypasses bactericidal responses in human macrophages. *Infect Immun* 1999; 67: 469-477.

-
298. Barker KS, Liu T, Rogers PD. Coculture of THP-1 human mononuclear cells with *Candida albicans* results in pronounced changes in host gene expression. *J Infect Dis* 2005; 192: 901-912.
299. Vaddi K, Newton RC. Comparison of biological responses of human monocytes and THP-1 cells to chemokines of the intercrine- β family. *J Leukoc Biol* 1994; 55: 756-762.
300. Thuong NT, Dunstan SJ, Hong Chau TT, *et al.* Identification of tuberculosis susceptibility genes with human macrophage gene expression profiles. *PLoS Pathog* 2008; 4: e1000229.
301. Iida N, Haisa M, Igarashi A, *et al.* Leukocyte-derived growth factor links the PDGF and CXC chemokine families of peptides. *FASEB J* 1996; 10: 1336-1345.
302. Sherka C, Irving SG, Bialonski A, *et al.* Cell type specific expression of members of the IL8/NAP-1 gene family. *Cytokine* 1993; 5: 112-116.
303. Boechat N, Bouchonnet F, Bonay M, *et al.* Culture at high density improves the ability of human macrophages to control mycobacterial growth. *J Immunol* 2001; 166: 6203-6211.
304. Wahl SM, Feldman GM, McCarthy JB. Regulation of leukocyte adhesion and signaling in inflammation and disease. *J Leukoc Biol* 1996; 59: 789-796.
305. McCarthy JB, Vachhani BV, Wahl SM, *et al.* Human monocyte binding to fibronectin enhances IFN- γ -induced early signaling events. *J Immunol* 1997; 159: 2424-2430.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Secuencia de los primers para los estudios de expresión diferencial	48
Tabla 2: Secuencia de los primers utilizados en los estudios de <i>CXCL7</i> y de las variantes de PPBP	54
Tabla 3: Apoptosis en neutrófilos infectados con micobacterias (Luminometría).....	62
Tabla 4: Influencia de NAP-2 en la actividad antimicrobiana de fagocitos frente a <i>L. pneumophila</i>	73
Tabla 5: Influencia de NAP-2 en la actividad antimicrobiana de las células U937 infectadas con <i>L. pneumophila</i>	74
Tabla 6: Actividad antimicrobiana de MDM y DC en presencia de CCL20.....	81
Tabla 7: Influencia de CCL20 en la producción en monocitos infectados con <i>M. tuberculosis</i>	83

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Incidencia de tuberculosis a nivel mundial en el año 2007	2
Figura 2: Granuloma tuberculoso humano	17
Figura 3: Activación del complejo enzimático de la NADPH oxidasa	19
Figura 4: Variantes post-traduccionales de PPBP	31
Figura 5: Crecimiento de micobacterias en medio 7H11 y en medio 7H9	36
Figura 6: Purificación de neutrófilos	40
Figura 7: Purificación de monocitos.....	41
Figura 8: Tinción Kinyoun de neutrófilos y monocitos infectados con <i>M. tuberculosis</i>	45
Figura 9: Apoptosis de neutrófilos infectados con micobacterias (TUNEL).....	52
Figura 10: Actividad antimicobacteriana de neutrófilos	59
Figura 11: Producción de ROS en neutrófilos infectados con micobacterias	61
Figura 12: Apoptosis en neutrófilos infectados con micobacterias (TUNEL).....	63
Figura 13: Influencia del inhibidor de la NADPH oxidasa, DPI, en la producción de ROS y apoptosis de neutrófilos infectados con <i>M. tuberculosis</i>	64
Figura 14: Expresión de <i>CXCL7</i> en MDM activados con IFN γ	67
Figura 15: Análisis, mediante Western blot, de los sobrenadantes de las células K562 transfectadas y de los fagocitos humanos	69
Figura 16: Actividad quimiotáctica de <i>CXCL7</i> en neutrófilos	71
Figura 17: Adhesión de las células transfectadas con NAP-2 tanto en plástico como en pocillos con fibronectina.....	75

Figura 18: Cuantificación de la expresión de CCL20 en MDM.....	77
Figura 19: Cuantificación mediante ELISA de la expresión proteica de CCL20 en MDM.....	77
Figura 20: Actividad quimiotáctica del CCL20 producido por MDM infectados.....	79
Figura 21: Actividad quimiotáctica de CCL20 recombinante	79
Figura 22: Influencia de CCL20 en la producción de apoptosis mediada por <i>M. tuberculosis</i>	84

ABREVIACIONES

ACD:	Ácido cítrico dextrosa
ADC:	Albúmina, Dextrosa y Catalasa
BCYE:	Agar de carbón tamponado y extracto de levadura
β-TG:	β-tromoglobulina
cDNA:	DNA complementario
CFU:	Unidades formadoras de colonias
CMT:	Complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
cps:	Cuentas por segundo
Cq:	Ciclo umbral de detección de fluorescencia
CTAPIII:	Péptido activador de tejido conectivo III
DAPI:	Diclorhidrato de 4',6-diamidino-2-fenilindol
DC:	Células dendríticas
DNA:	Ácido desoxirribonucleico
DPI:	Cloruro de difenil iodonio
EDTA:	Ácido etilen diamino tetraacético
ELISA:	Ensayo inmunoenzimático en fase sólida
FBS:	Suero fetal bovino
FITC:	Isotiocianato de fluoresceína
G-CSF:	Factor estimulante de colonias de granulocitos
GM-CSF:	Factor estimulante de colonias de granulocitos/ macrófagos
HBSS:	Solución salina balanceada de Hank
HIV:	Virus de la inmunodeficiencia adquirida humana
IFNγ:	Interferón gamma
IL:	Interleucina
LPS:	Lipopolisacárido bacteriano

M-CSF:	Factor estimulante de colonias de macrófagos
MDM:	Macrófagos derivados de monocitos
MHC-I/ II:	Complejo de histocompatibilidad clase I/II
MOI:	Multiplicidad de infección
M-SFM:	Medio de macrófagos libre de suero
NADPH oxidasa:	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa
NAP-2:	Péptido activador de plaquetas
NK:	Células naturales asesinas
OADC:	Ácido Oleico, Albúmina, Dextrosa y Catalasa
PBP:	Proteína básica de plaquetas
PMA:	Forbol 12-miristato 13-acetato
PPBP:	Pro- proteína básica de plaquetas
qPCR:	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
RNA:	Ácido ribonucleico
RNI:	Radicales intermediarios del nitrógeno
ROS:	Especies reactivas del oxígeno
SD:	Desviación estándar
TC1/2:	Trombocidina 1/2
TGF-β:	Factor de crecimiento tumoral β
Th:	T helper
TNFα:	Factor de necrosis tumoral alfa

Publicaciones

