

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA



DETERMINACION DE CITOCINAS EN LIQUIDO
BRONCOALVEOLAR DE PACIENTES
CON TUBERCULOSIS

Por
GLORIA C. ARELLANO RANGEL

Como requisito para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIAS con especialidad en
Inmunología

MAYO 2003

© 2003
T.M. A.S.I.
KCSII

CLONORIB. CLORIANAC.
ARRIAC. AMO

RAMINGEL.
FAMINGEL.

RAMINGEL.
FAMINGEL.

RAMINGEL.
FAMINGEL.

RAMINGEL.
FAMINGEL.



1080117996

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

**DETERMINACIÓN DE CITOCINAS EN LIQUIDO
BRONCOALVEOLAR DE PACIENTES CON TUBERCULOSIS**

Por:
GLORIA C. ARELLANO RANGEL

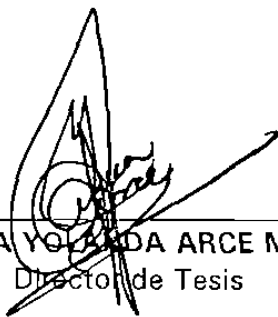
Como requisito para obtener el grado de MAESTRO EN CIENCIAS con
especialidad en Inmunología.

MAYO 2003

TM
RC311
.1
A74
C.1

**DETERMINACIÓN DE CITOCINAS EN LAVADO BRONCOALVEOLAR DE
PACIENTES CON TUBERCULOSIS PULMONAR**

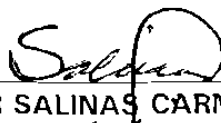
Aprobación de la Tesis:



DRA. ALMA YOLANDA ARCE MENDOZA
Director de Tesis



DRA. AGNES REVOL DE MENDOZA
Co-Director de Tesis



DR. MARIO CESAR SALINAS CARMONA
Miembro de la Comisión de Tesis



DR. DIONICIO A. GALARZA DELGADO
Subdirector
de Investigación y Estudios de Posgrado

DETERMINACIÓN DE CITOCINAS EN LIQUIDO BRONCOALVEOLAR DE PACIENTES CON TUBERCULOSIS PULMONAR

Presentado por: Q.C.B. Gloria C. Arellano Rangel.

Este trabajo se realizó en el Departamento de Inmunología y en La Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión Genéticas del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L. bajo la dirección de la Dra. Alma Y. Arce Mendoza y la Co-dirección de la Dra. Agnès Revol de Mendoza. Este proyecto fue apoyado parcialmente por PAYCIT.



DRA. ALMA YOLANDA ARCE MENDOZA
Directora de Tesis

INDICE

CONTENIDO	PAGINA
LISTA DE TABLAS	i
LISTA DE FIGURAS	ii
NOMENCLATURA	iii
RESUMEN	v

CAPITULO

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Tuberculosis	2
1.1.1 Tuberculosis Pulmonar	3
1.1.2 Granuloma	3
1.1.3 Aspectos Inmunopatológicos en la Tuberculosis	4
1.2 Diagnóstico de Tuberculosis	4
1.3 Tratamiento de la Tuberculosis	6
2. ANTECEDENTES	7
2.1 Respuesta Inmune en Tuberculosis	7
2.2 Citocinas	9
3. JUSTIFICACIÓN	13
4. OBJETIVO GENERAL	14
5. OBJETIVOS ESPECIFICOS	15

6. MATERIAL Y METODOS	16
6.1 Material Biológico	16
6.1.1 Lavado Broncoalveolar	16
6.1.2 Controles	16
6.2 Reactivos	17
6.3 Equipo	18
6.4 Métodos	19
6.4.1 Procesamiento de LBA	19
6.4.2 Análisis de poblaciones celulares	19
6.4.3 Cuantificación de citocinas por ELISA	20
6.4.4 Preparación de Leucocitos estimulados con PHA	21
6.4.4.1 Obtención de Leucocitos totales	21
6.4.4.2 Cultivo de Leucocitos totales con PHA	22
6.4.5 Obtención y análisis de RNA total a partir de células	22
6.4.5.1 Extracción del RNA	23
6.4.5.2 Análisis del RNA por electroforesis	24
6.4.6 Reacciones de RT-PCR	24
6.4.6.1 Amplificación por PCR de los DNAs	25
6.4.6.2 Observación del producto amplificado	29
7. RESULTADOS	30
7.1 Análisis de poblaciones celulares	30
7.2 Cuantificación de citocinas inflamatorias	30
7.2.1 Curvas de calibración	31
7.2.2 Cuantificación de citocinas por ELISA	34
7.3 Comparación de resultados	37
7.3.1 Comparación entre pacientes TB y grupo control	37
7.3.2 Comparación entre pacientes TB y pacientes NO TB	40
7.4 Estandarización de RT-PCR	41
7.4.1 Extracción y amplificación de RNA	41
7.4.2 Amplificación de IFN-g, IL-10 y TNF-a	42
7.5 Análisis de RNAs mensajeros	43

8. DISCUSIÓN	47
9. CONCLUSIONES	54
10. BIBLIOGRAFÍA	55

LISTA DE TABLAS	PAGINA
Tabla 1 Condiciones para la Transcripción Reversa (RT)	25
Tabla 2 Condiciones de PCR para GPDH	26
Tabla 3 Condiciones de temperatura para GPDH	26
Tabla 4 Condiciones de PCR para TNF- α , IL-10 e IFN- γ	27
Tabla 5 Condiciones de temperatura para TNF- α IL-10 IFN- γ	27
Tabla 6 Condiciones de PCR para IL-4	28
Tabla 7 Condiciones de temperatura para IL-4	28
Tabla 8 Concentración de citocinas proinflamatorias	34
Tabla 9 Concentración de citocinas TH1	35
Tabla 10 Concentración de citocinas TH2	36

LISTA DE FIGURAS

PAGINA

Figura 1. Curva de calibración para IFN- γ	31
Figura 2. Curva de calibración para IL-2	31
Figura 3. Curva de calibración para IL-4	32
Figura 4. Curva de calibración para IL-8	32
Figura 5. Curva de calibración para IL-10	33
Figura 6. Curva de calibración para TNF- α	33
Figura 7. Gráfica de concentración de citocinas proinflamatorias	37
Figura 8. Gráfica de concentración de citocinas TH1	38
Figura 9. Gráfica de concentración de citocinas TH2	39
Figura 10. Comparación entre los grupos de pacientes TB y NO TB	40
Figura 11. Extracción de RNA	41
Figura 12. Estandarización de PCR para las citocinas	42
Figura 13. Amplificación del control interno GPDH	43
Figura 14. Amplificación de IFN- γ y TNF- α	45
Figura 15. Amplificación de IL-10 e IL-4	46

NOMENCLATURA

BCG	Bacilo de Calmette Guerin
TB	Tuberculosis
MDR	Multidrogoresistentes
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana
IFN- γ	Interferón gamma
TNF- α	Factor de Necrosis Tumoral alfa
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-8	Interleucina 8
IL-10	Interleucina 10
PPD	Proteína purificada derivada
DNA	Acido desoxiribonucleico
TH1	Célula T cooperadora 1
TH2	Célula T cooperadora 2
CR1	Receptor para el complemento 1
CR2	Receptor para el complemento 2
CR4	Receptor para el complemento 4
LAM	Lipoarabinomanano
PGE2	Prostaglandina E2
NK	Asesinas naturales (Natural Killer)
RNA	Acido ribonucleico
RNA _m	Acido ribonucleico mensajero
LBA	Lavado broncoalveolar
RT	Transcripción reversa
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa

CMH	Complejo mayor de histocompatibilidad
GPDH	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
DO	Densidad óptica
STF	Suero de ternera fetal
DEPC	Diethylpirocarbonato
EDTA	Acido etilendiaminotetra-acético
UV	Ultravioleta
DNTPs	Desoxiribonucleósidos trifosfato
µg	Microgramos
µl	Microlitros
pg	Picogramos
ml	Mililitro
min	Minutos
rpm	Revoluciones por minuto
pb	Pares de bases
°C	Grados centígrados
Taq	DNA polimerasa de <i>Thermus aquaticus</i>
Std	Estándar

RESUMEN

Gloria Cristina Arellano Rangel

Fecha de Graduación: Mayo 2003

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Medicina

**Título del Estudio: Determinación de Citocinas en lavado
Broncoalveolar de pacientes con Tuberculosis.**

Número de páginas: 70

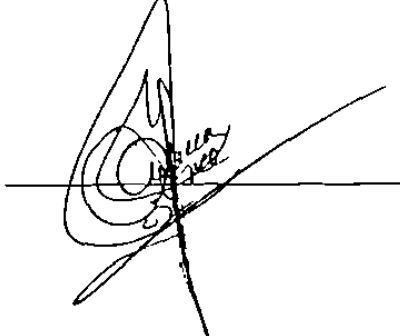
Candidata para el grado de Maestría
en Ciencias con especialidad en
Inmunología.

Área de estudio: Inmunología

Propósito y Método del estudio: La respuesta inmune protectora contra *Mycobacterium tuberculosis*, es mediada por células, principalmente el fagocito mononuclear y el linfocito T. Las células T median la inmunidad amplificando la capacidad de los macrófagos para matar y digerir al bacilo, estas células con la producción de sus citocinas atraen y activan macrófagos y linfocitos adicionales. En este trabajo nuestro principal objetivo fue, observar si existía un patrón de citocinas que presentaran los pacientes con diagnóstico de Tuberculosis Pulmonar que fueron estudiados. Se analizaron muestras de Lavado Broncoalveolar (LBA), y se incluyeron tres grupos: 19 pacientes con diagnóstico de tuberculosis pulmonar, 7 pacientes con diagnóstico de neumonía y un grupo control de 5 sujetos sanos, se analizaron el botón celular y el sobrenadante del LBA para la determinación de citocinas por la técnica de ELISA y RT-PCR, las citocinas que se midieron fueron: IL-2, IFN-g, TNF-a, IL-10, IL-8 e IL-4.

Contribuciones y Conclusiones: Al determinar la concentración de citocinas encontramos que no existía una diferencia significativa entre los valores que presentaban cada uno de los 2 grupos de pacientes, ya que las principales citocinas que se encontraron aumentadas fueron las proinflamatorias, lo que nos indicó que no existe un patrón característico independientemente del agente etiológico que cause la enfermedad, por otro lado si encontramos diferencias entre los grupos de pacientes comparados con el grupo control.

FIRMA DEL ASESOR:

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Gloria', written over a horizontal line. The signature is stylized and somewhat abstract.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Alma Yolanda Arce Mendoza, por aceptar asesorarme, guiarme y brindarme su tiempo para llevar a cabo este trabajo, además de aportarme sus conocimientos, por su confianza, por demostrarme siempre su apoyo y su cariño.

Al Dr. Mario César Salinas Carmona por aceptarme como estudiante del Departamento de Inmunología, por compartir sus conocimientos a través de sus clases y por el apoyo que me brindó durante mi estancia en este Departamento.

A la Dra. Agnès Revol, por aceptar ser mi co-asesora y permitirme trabajar en su laboratorio, por dedicarme su tiempo, por demostrarme su interés, apoyo y confianza siempre, además de su amistad y cariño.

Al Dr. Adrián Rendón por su importante contribución para llevar a cabo este trabajo.

Al Q.B.P. Adrián G. Rosas por colaborar en el análisis estadístico de los resultados.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por el apoyo económico para la realización de mis estudios.

A mis compañeros de generación, Diana, Carmen, Marco, Rafa y Adrián, por su amistad y apoyo.

A mis compañeros del Departamento de Inmunología: Andrés, Juan Manuel, Edith, Graciela, Adrián y Lorena por su amistad y apoyo.

A mis compañeros del Laboratorio de Biología Molecular: Lulú, Hiram, Rafael, Angélica, Ariana, Marisol y Lolita, por su amistad, por compartirme sus conocimientos, por sus sugerencias y apoyo.

A mi esposo y a mi hija por toda su paciencia y amor.

DEDICATORIA

A ANGEL:

Principalmente a ti, porque eres parte fundamental en todos mis logros, te amo.

A GALILEA:

Cualquier logro que yo realice, por grande que sea, siempre será poco para demostrarte lo mucho que te amo.

A MI PADRE Y HERMANO:

Con todo mi amor.

I. INTRODUCCION

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa crónica producida por *Mycobacterium tuberculosis*, un bacilo intracelular facultativo descubierto por Koch en 1880. La denominación bacilo tuberculoso incluye dos especies, *M. tuberculosis* y *M. bovis*, capaces de producir esta enfermedad. En el hombre, ésta es una enfermedad crónica, de larga duración y todavía es de las primeras causas de muerte en muchos países en vías de desarrollo (1). Es capaz de afectar cualquier órgano de la economía, en forma progresiva y crónica, por lo que su cuadro clínico está en relación con el órgano o sistema de ataque. Aproximadamente el 85% de los casos reportados de tuberculosis están limitados a los pulmones, provocando un cuadro crónico caracterizado por tos, expectoración, y fiebre; el 15% restante está dirigido a tejidos extrapulmonares (2).

Un cuarto de la población mundial está infectada con *Mycobacterium tuberculosis*. Este organismo es la causa de cerca de 4 millones de muertes en todo el mundo cada año, más que ningún otro patógeno por sí solo. En algunas áreas en donde la co-infección con el virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) y *Mycobacterium tuberculosis* es común, tales como África central, el índice de casos se ha doblado durante los últimos 4 años, a pesar de la extendida vacunación con *Mycobacterium bovis* (BCG) y la incrementada disponibilidad de quimioterapia antituberculosa. Anualmente en México se detectan unos 20,000 casos nuevos de tuberculosis, 95% pulmonar y es la causa de alrededor de 6,000 defunciones, aunque hay evidencias de que estas cifras puedan estar por debajo del número real. Estos datos, acoplados con la emergencia de infecciones multidrogoresistentes (MDR), han proveído un mayor ímpetu de estudios para identificar antígenos bacterianos para uso en vacunas y clarificar los mecanismos de inmunidad (3).

La epidemiología de la tuberculosis está influenciada por dos factores importantes. El primero de éstos es la exposición en el ambiente a *M. tuberculosis*. Esta bacteria es transmitida de un paciente infectado a un contacto susceptible, a través de los aerosoles, que son liberados cuando el paciente tose, o estornuda. El segundo factor, que es un factor de riesgo para adquirir la enfermedad, tal como el hacinamiento, es un prerrequisito para el desarrollo de la misma (4).

Un número de condiciones asociadas con la inmunidad alterada del huésped, incrementa el riesgo de desarrollar tuberculosis activa, éstas incluyen la infección por VIH, edad avanzada, diabetes, malnutrición, cirugías mayores, y aunque las causas no han sido bien esclarecidas, también el uso de drogas inyectables es una de las causas que ha aumentado este riesgo. Después de la infección inicial, ocurre la multiplicación intracelular del bacilo y la diseminación de los organismos puede llevarse a cabo por las rutas linfática o sanguínea (5).

I.1 TUBERCULOSIS

En la expresión de la enfermedad tras la infección, no sólo interviene la virulencia del bacilo, sino que existe una compleja serie de interacciones huésped-parásito, en las que se establece una competencia entre el agente patógeno, intentando establecerse en el pulmón y la inmunidad emergente del hospedero que intenta eliminarlo, limitar su crecimiento o al menos impedir su diseminación en el organismo. En este contexto podrían intervenir el terreno genético, el estado inmunitario, nutricional, edad, vía, forma y tamaño de la infección. Dependiendo

de estos factores, el bacilo puede ser inmediatamente eliminado (no-infección), quedar latente indefinidamente y causar enfermedad muchos años después (reactivación tuberculosa) (6).

I.1.1 Tuberculosis Pulmonar

La tuberculosis pulmonar es una enfermedad crónica que evoluciona con estadios activos. Las partes del pulmón más afectadas son los segmentos apicales posteriores de los lóbulos superiores y los segmentos superiores de los lóbulos inferiores. La tos crónica es el principal síntoma de la tuberculosis pulmonar. El esputo suele ser escaso no purulento. Es bastante frecuente que se produzca hemoptisis, generalmente en forma de esputo hemoptóico, en raras ocasiones como hemoptisis masiva (6,7).

I.1.2 Granuloma

Los granulomas están constituidos por macrófagos transformados en células epiteloideas, que tienen una mayor capacidad microbicida, en células gigantes multinucleadas tipo Langerhans, que son macrófagos cuyos núcleos se disponen periféricamente rodeando al antígeno tuberculoso. Cuando los linfocitos T activados, secretan IFN- γ , los macrófagos comienzan a producir una gran cantidad de enzimas líticas con capacidad bactericida capaces de producir necrosis celular (caseosis) que caracteriza al granuloma tuberculoso (7).

I.1.3 Aspectos Inmunopatológicos en la Tuberculosis

Mycobacterium tuberculosis contiene un gran número de sustancias antigénicas, fundamentalmente los lípidos de superficie (sulfátidos), el peptidoglicano de la pared celular, que intervienen en la función macrofágica permitiendo la supervivencia de las bacterias en su interior. Aunque la infección tuberculosa se asocia con una intensa respuesta de anticuerpos, no parece que la inmunidad humoral tenga un papel importante en la defensa del hospedero. En cambio, si desempeña un papel definitivo la inmunidad celular. Cuando *M. tuberculosis* consigue llegar al alvéolo pulmonar, se produce una ligera reacción inflamatoria, en la que predominan los polimorfonucleares. Estas células son pronto sustituidas por macrófagos alveolares que ingieren los bacilos para ser luego transportados al sistema de drenaje linfático. La capacidad de estos macrófagos es muy escasa para erradicar por sí solos al bacilo, hasta que los linfocitos T reconozcan los antígenos bacilares procesados por los macrófagos. Los linfocitos T encuentran al complejo macrófago-antígeno, son activados, produciéndose una expansión clonal de linfocitos T que producen citocinas y en consecuencia atraen más macrófagos al sitio de infección para constituir un granuloma (6).

I.2 Diagnóstico de Tuberculosis

El diagnóstico definitivo de tuberculosis, sólo puede establecerse cuando se cultiva *M. tuberculosis*. Sin embargo, existen otras pruebas diagnósticas, que ayudan a plantear el diagnóstico de esta enfermedad.

La prueba tuberculínica es una reacción cutánea, que indica la existencia de una infección tuberculosa previa. La prueba se lleva a cabo con un extracto proteico purificado (PPD) de *M. tuberculosis*, se administra vía intradérmica. Las

reacciones deben leerse midiendo el diámetro transversal de la zona de induración a las 48-72 hrs. (6,7).

Las características tintoriales de *M. tuberculosis*, permiten su rápida visualización (baciloscopia) en muestras clínicas mediante el uso de diferentes técnicas de tinción. El escaso número de bacilos presentes en la mayoría de estas muestras hace necesario la repetición del estudio para alcanzar un diagnóstico definitivo. La presencia de ácidos grasos en la pared celular la hace ser ácido-alcohol-resistente. En este hecho se basa la técnica de Ziehl-Neelsen, en la que se emplea como colorante la fucsina fenicada calentada, decolorada con alcohol-ácido y contrateñida con azul de metileno. La tinción Kinyoun es similar a la Ziehl Neelsen, pero no utiliza calor para favorecer la captación de la tinción. Las técnicas fluorocrómicas con auroamina-rodamina se basan en el mismo principio básico. Con cualquiera de estas técnicas, *M. tuberculosis* se observa como un bacilo de menos de 0.5 μm de diámetro que puede formar parejas o grupos característicos, en forma de cordones.

El hecho de que *M. tuberculosis* necesite de 5-20 horas para duplicarse explica que el cultivo de esta micobacteria exija un tiempo muy prolongado, entre 4 y 8 semanas, en los medios de cultivo convencionales como Lowenstein-Jensen o Middelbrok. Los modernos métodos radiométricos (sistema Bactec®), permiten acortar el tiempo. Otras técnicas modernas como la hibridación con sondas de DNA y la PCR permiten también la rápida identificación de la especie de micobacteria aislada en cultivo.

I.3 Tratamiento de la Tuberculosis

El tratamiento antituberculoso tiene que cumplir una serie de requisitos imprescindibles. En primer lugar, dado que puede haber resistencia del microorganismo a cualquiera de los fármacos, será necesaria la combinación de al menos dos fármacos para reducir el riesgo. En segundo lugar, debido a que *M. tuberculosis* requiere mucho tiempo para multiplicarse, el tratamiento antibiótico deberá siempre ser prolongado. Por último, debe considerarse que la respuesta inmunitaria del hospedero es esencial para el control de la infección, por lo que el tratamiento deberá modificarse según la enfermedad de base del paciente (7).

2. ANTECEDENTES

2.1 RESPUESTA INMUNE EN TUBERCULOSIS

La respuesta inmune protectora contra esta micobacteria es mediada por varios tipos celulares, siendo los principales: el fagocito mononuclear y el linfocito T (8). Ha sido bien documentado que esta inmunidad mediada por células juega un papel central en la resistencia del huésped a la infección por *M. tuberculosis*. Hace una década de años, Mosman y col. encontraron que los linfocitos T cooperadores estaban divididos en dos subgrupos, Th1 y Th2, basado en las citocinas que cada uno producía. Las células Th1 producen: IFN- γ , IL-2 e IL-12 mientras que las células Th2 secretan: IL-4, 5, 6, 10 y 13. Un tercer grupo de citocinas llamadas proinflamatorias incluye a: IL-1, IL-6 y TNF- α , éstas son secretadas por los fagocitos mononucleares, también en respuesta a infección (9).

La primera célula que tiene contacto con la bacteria es el macrófago alveolar, que se presenta como primera línea de defensa en el pulmón y además sirve como célula huésped para la micobacteria. Por medio de la fagocitosis lleva a cabo la internalización de ésta, provocando que los mecanismos bactericidas del macrófago se activen y colaboren por un lado con la eliminación del bacilo por medio de liberación de enzimas lisosomales, formación del fagolisosoma y producción de Oxido Nítrico (NO), y por otro lado con la secreción de citocinas como IFN- γ o IL-1 cuya función es la de activar a otros macrófagos y células T. Esto provoca en estas últimas la liberación de sus citocinas que estimulan una producción clonal de células T específicas hacia la micobacteria. Los receptores de estas células T reconocen los epítopes provenientes de la degradación parcial de *M. tuberculosis* por los macrófagos los cuales son presentados en el contexto del Complejo Mayor de Histocompatibilidad de tipo II (CMH II) hacia las células T para llevar a cabo la degradación completa de la bacteria.

La internalización de la bacteria en los macrófagos alveolares se realiza por fagocitosis convencional, con la ayuda del complemento, siendo importantes en este proceso la presencia de receptores CR1, CR4 y principalmente CR3, en la superficie del macrófago, además de receptores de manosa dirigidos hacia las estructuras de lipoarabinomananos (LAM) de la pared bacilar que tienen un papel crítico en las cepas virulentas. La expresión de todos estos receptores está bajo la influencia de varios mediadores. La Prostaglandina E2 (PGE2) y citocinas tipo Th2 como IL-4, estimulan la expresión de estos receptores, mientras que el IFN- γ disminuye su expresión, y por lo tanto la capacidad de estas micobacterias de adherirse a los macrófagos, aunque por el contrario esta citocina activa al macrófago e inhibe el crecimiento intracelular de las micobacterias (10).

También puede haber fagocitosis por otras células como las endoteliales, pero su importancia es mucho menor. En el interior del macrófago los bacilos son encerrados en vacuolas (fagosomas), donde posterior a la activación del macrófago, serán digeridos por enzimas lisosómicas, en la fusión de los fagosomas con los lisosomas (fagosoma-lisosoma) además los intermediarios reactivos el nitrógeno generados por vía metabólica pueden tener una gran importancia en la infección intracelular (11).

2.2 Citocinas

Las citocinas son un grupo de proteínas mediadoras que juegan papeles importantes en el desarrollo, función y control de las células del sistema inmune, así como en muchos otros sistemas.

Son producidas durante un corto período de tiempo después de la activación en el contexto de reacciones inmunes, o procesos inflamatorios patológicos. Actúan a bajas concentraciones (picomolar) y presentan un amplio rango de actividades.

Las citocinas son moléculas parecidas a las hormonas, que permiten a las células del sistema inmune comunicarse unas con otras. Los inmunólogos habían sugerido que estos mensajeros químicos estaban involucrados en la respuesta inmune. Pero no fue hasta 1980, que estas citocinas fueron aisladas y examinadas. En estos hallazgos se pudieron explicar las tempranas observaciones acerca de los diferentes tipos de respuesta inmune a la misma infección (12).

Las células T median la inmunidad amplificando la capacidad de los macrófagos para matar y digerir al bacilo, estas células con la producción de sus citocinas, atraen y activan macrófagos y linfocitos adicionales, secretando: IFN- γ , que tiene la capacidad de activar varias propiedades antimicrobianas de macrófagos. La función crítica del IFN- γ como factor activador de macrófagos en infecciones micobacterianas puede ser claramente demostrada en modelos murinos de tuberculosis. En estudios en humanos, algunos investigadores han sugerido que el IFN- γ puede promover, más que inhibir el crecimiento bacterial *in vitro* (11,12).

Los linfocitos T Th1 protegen contra la mayoría de las infecciones intracelulares incluyendo tuberculosis, las respuestas de Th2 pueden ser descritas como regulatorias, ellas promueven la producción de anticuerpos e inhiben la hipersensibilidad tardía. Modelos *in vitro* de macrófagos infectados con micobacterias sugieren que algunas de las citocinas de Th2, particularmente IL-10, promueven el crecimiento bacteriano intracelular (13). En modelos murinos de tuberculosis, una respuesta protectora inicial de Th1 es seguida de una respuesta de Th2, la cual podría servir para limitar la respuesta inflamatoria y minimizar el daño en el tejido en el sitio de la infección. Los macrófagos también producen citocinas moduladoras de manera autocrina después de tener interacción directa con varios productos micobacterianos (13,14).

Algunos estudios clínicos sugieren que los altos niveles inapropiados de citocinas circulantes, tales como el TNF- α , pueden ser responsables de algunos de los rasgos clínicos de la tuberculosis. TNF- α favorece la actividad antimicrobiana de los macrófagos y la formación del granuloma, y contribuye junto con IL-12 a la activación de las células NK, pero también produce fiebre favoreciendo el desarrollo de caquexia, cuando su producción es excesiva. Aunque la evidencia de la separación funcional de los dos subgrupos de linfocitos T no está bien comprendida en humanos, pareciera que la resistencia a la enfermedad en la tuberculosis depende de la predominancia de citocinas producidas por Th1 en respuesta a antígenos bacterianos .

La función inmune en el sitio de infección por tuberculosis, puede ser diferentemente regulada en comparación a sangre periférica, ya que las citocinas producidas por un tipo celular pueden suprimir o al menos moderar la actividad de otras citocinas producidas por otras células (15).

1993 Orme y col. han reportado que la secreción de IFN- γ e IL-4 se produce en dos tiempos distintos, apareciendo más tempranamente, el IFN- γ , lo que sugiere la existencia de dos formas separadas de inmunidad adquirida mediada por células T (16). Arce y col. han estudiado la producción *in vitro* de citocinas proinflamatorias e IL-12 estimuladas con *M. tuberculosis* reportando que disminuye la respuesta de producción de estas citocinas al aumentar la dosis de estimulación con la bacteria completa o fracciones de la misma; también se ha determinado la cinética de producción de citocinas para tener un tiempo óptimo de incubación y referencia para la producción de cada una de éstas, encontrándose que cada una de ellas requiere de un tiempo específico para alcanzar su pico máximo de producción (17).

Se ha publicado que existen niveles altos IFN- γ e IL-12, en muestras de lavado broncoalveolar de pacientes con tuberculosis pulmonar activa a diferencia de pacientes con tuberculosis pulmonar en forma inactiva, también IL-1 β e IL-6 que son otras citocinas importantes en la respuesta inflamatoria han presentado niveles significativamente aumentados en los sobrenadantes de las células del lavado broncoalveolar de pacientes con TB activa en comparación con voluntarios sanos (18).

A nivel molecular existen también varios reportes de algunos autores como Douglas y Robinson, quienes en 1994 encontraron altos niveles de expresión de RNAs mensajeros para citocinas TH1, principalmente IFN- γ en estudios hechos en pacientes con tuberculosis pulmonar (19). Por otro lado, en 1996, Law y Weiden reportaron que son principalmente las citocinas proinflamatorias como IL-1 β , IL-6 y TNF- α , las que expresan niveles detectables de RNAs mensajeros (20).

IL-6 favorece el crecimiento y diferenciación de los linfocitos B, por tanto contribuye a la producción de inmunoglobulinas. Además antagoniza la actividad antibacteriana de $\text{TNF-}\alpha$, por lo que su excesiva producción favorece el crecimiento intra y extracelular de los bacilos (21).

Otra citocina de importancia durante el proceso inflamatorio es la IL-8, considerada como un factor quimiotáctico para los neutrófilos, linfocitos T y basófilos. Su producción excesiva provoca acúmulos de neutrófilos, que se ven en algunos infiltrados y el reclutamiento de linfocitos T involucrados en la formación del granuloma (22).

Al revisar la literatura se han encontrado artículos referentes a la producción de citocinas, la mayor parte de ellos en modelos murinos. Es poca la información acerca de la producción de IL-1, 2, 4, 5, 6, 8, 10, 12, $\text{IFN-}\gamma$ y $\text{TNF-}\alpha$ en secreciones bronquiales, por lo que esto nos lleva a investigar más acerca del comportamiento de estos mediadores inmunológicos en el tejido infectado y la secreción, que es producida por el proceso inflamatorio *in situ* para poder entender mejor el papel que juegan estas citocinas en el proceso infeccioso activo.

3. JUSTIFICACION

Los reportes sobre la producción de citocinas en pacientes con tuberculosis se han enfocado sobre una citocina o cierto grupo de éstas en particular, además los estudios se han generado en modelos de roedores.

En este trabajo estudiamos la presencia de estos tres grupos tanto en forma extracelular en el lavado broncoalveolar, como a nivel celular, para tener una visión más global de la producción de algunas de estas citocinas durante el proceso infeccioso de Tuberculosis Pulmonar.

4. OBJETIVO GENERAL

Quantificar citocinas proinflamatorias, Th1 y Th2, en líquido broncoalveolar de pacientes con tuberculosis pulmonar e identificar sus RNAs mensajeros en las células del infiltrado pulmonar.

5. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Cuantificar las citocinas inflamatorias (TNF- α , IL-8), las derivadas de Th1 (IL-2 e IFN- γ) y Th2 (IL-4 IL-10) en muestras de LBA por la técnica de ELISA.
- Realizar un análisis estadístico de los resultados.
- Estandarizar la técnica RT-PCR para las citocinas: IL-4, IL-10, TNF- α , e IFN- γ .
- Demostrar la expresión de RNAs mensajeros para las citocinas en células de LBA

6. MATERIAL Y METODOS

6.1 MATERIAL BIOLÓGICO

6.1.1 Lavado Broncoalveolar

Se analizaron las muestras de Lavado Broncoalveolar (LBA) de 19 pacientes, con diagnóstico de TB, confirmado por baciloscopia y cultivo, además se incluyó un grupo de 7 pacientes con diagnóstico de neumonía, no causada por tuberculosis. Las muestras fueron obtenidas por broncoscopia, y fueron referidas de la clínica de tuberculosis del Departamento de Neumología del Hospital Universitario. El lavado broncoalveolar se obtuvo por aspiración de 20 ml de solución salina de los pacientes, una vez concedida su autorización para practicarlo, ya que es un procedimiento molesto para el mismo paciente, por tales motivos nuestro grupo a estudiar estuvo muy limitado.

6.1.2 Controles

Se obtuvieron muestras de sangre periférica de 5 sujetos sanos para cuantificar en el plasma la concentración basal de citocinas. El plasma se obtuvo después de centrifugar las muestras de sangre obtenidas con EDTA a 2500 rpm. Las muestras de plasma fueron almacenadas a -20°C, hasta su utilización.

Leucocitos Totales

Además, se aislaron los leucocitos totales de sujetos sanos a partir de muestras de sangre periférica recolectada con EDTA, los leucocitos fueron separados de la sangre completa, una vez lisados los eritrocitos. Estos leucocitos totales fueron utilizados para la estandarización de la extracción de RNA, y de las condiciones óptimas de PCR para las diferentes citocinas que fueron analizadas.

6.2 REACTIVOS

Los reactivos que fueron utilizados para la preparación de soluciones de separación, de lavado de células, de lisis, y los amortiguadores utilizados en las electroforesis, fueron de Sigma-Aldrich Inc. Los Kits de ELISA para la cuantificación de las citocinas provinieron de las casas comerciales: ENDOGEN, Inc. (Rockford, IL) Y ROCHE, (Mex, D.F).

Las polimerasas utilizadas para las reacciones de Transcripción Reversa (RT) y PCR fueron: MMLV, Superscript II Invitrogen Corporation (Carlsbad Ca, EUA) y Taq polimerasa Promega (Madison, WI, EUA).

Los juegos de primers utilizados para la amplificación de TNF- α , IL-10 e IFN- γ , nos fueron proporcionados por la Dra. Iris Estrada, del Instituto Politécnico Nacional, en México D.F. El juego de primers para IL-4 fue obtenido de la compra de un Kit para RT-PCR para IL-4 ROCHE (Mex, D.F), y por último el juego de primers para amplificar La gliceraldehído 3'fosfato deshidrogenasa (GPDH), utilizado como control interno de amplificación de las citocinas, provino del Depto. de Bioquímica.

6.3 EQUIPO

El equipo utilizado para llevar a cabo este trabajo, fue facilitado por los Departamentos de Inmunología, y el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, y éstos incluyeron: campana de flujo laminar (CCI BIO HAZARD HOOD), incubadora con CO₂ (LAB-LINE INSTRUMENTS), centrífuga refrigerada TJ-6 (BECKMAN), centrífuga eppendorf 5415 (BRINKMAN), cámara de Newbauer (BAXTER), microscopio K-7 (Zeiss) congelador So-Low Enviromental (Cincinnati, Ohio, EUA), potenciómetro (BECKMAN), balanza analítica 2024 MP (SARTORIOUS), campana de luz ultravioleta (CBS, Scientific Co), balanza granataria OHAUS (Camibb Göttingen Germany), termociclador Robocycler 96 (Stratagene, La Jolla Ca, EUA), baño de agua 188 (Precision, Chicago, EUA), fuente de poder ISSCO 494 (ISCO Nebraska, EUA), Gel-Doc 1000 Bio-Rad (Hercules, Ca EUA) .

6.4 METODOS

6.4.1 Procesamiento del LBA

La muestra de LBA una vez obtenida, fue filtrada con una gasa estéril para eliminar la mayoría del moco. Posteriormente, se centrifugó a 3500 rpm. para separar el sobrenadante del botón celular, éste fue almacenado a -20°C. El botón celular fue lavado con un buffer de fosfatos (PBS) pH=7.2 al menos 3 veces y se resuspendió para contar las células presentes en una cámara de Newbauer. Una vez determinada la cantidad de células, se descartó el volumen de PBS para dejar sólo el botón celular el cual fue almacenado a -70°C, hasta ser utilizado para la RT-PCR. Cabe mencionar que todo el proceso de separación y la manipulación en sí de las muestras de LBA se llevaron a cabo en una campana de flujo laminar, con el equipo de bioseguridad necesario: bata, guantes, gorra, cubrebocas y lentes de seguridad.

6.4.2 Análisis de poblaciones celulares

Previo al conteo celular, se realizaron extensiones celulares de las muestras para ser teñidas con la tinción de Wright y observadas al microscopio de luz para averiguar que tipo de células inflamatorias predominaba en la muestra.

6.4.3 Cuantificación de las citocinas mediante ELISA

El sobrenadante del LBA fue utilizado para medir la concentración de citocinas secretadas por las células, haciendo estas mediciones por la técnica de ELISA. Para realizar esto, se utilizaron Kits de la marca ENDOGEN y ROCHE para cada una de las diferentes citocinas a determinar. Los Kits Human-ELISA contienen anticuerpos anticitocinas adheridos a las placas lo cual permitió determinar la concentración de citocinas presente en el sobrenadante de cada una de las muestras de LBA de pacientes y en el plasma de los controles, la técnica que se llevó a cabo en la ELISA fue una técnica de sándwich en donde, una vez que el anticuerpo adherido a la placa captaba el antígeno, en este caso, la citocina a determinar, se agregó un segundo anticuerpo marcado con peroxidasa y posteriormente el sustrato, para desarrollar color y poder ser determinado por un lector de ELISA. Paralelamente se realizó una curva de calibración con los estándares proporcionados por los Kits para cada una de las diferentes citocinas. Los resultados fueron comparados mediante una prueba no paramétrica de Wilcoxon, con una $p < 0.05$.

6.4.4 Preparación de Leucocitos estimulados con PHA

Para estandarizar las condiciones de extracción de RNA y de RT-PCR, se preparó un cultivo de leucocitos que se estimuló con fitohemaglutinina (PHA).

6.4.4.1 Obtención de leucocitos totales

A partir de sangre periférica de sujetos sanos, se separó el botón de leucocitos totales, utilizando una solución de lisis para eliminar los eritrocitos de la sangre completa, posteriormente, después de realizar lavados para obtener un botón celular lo suficientemente limpio, estas células fueron contadas en cámara de Newbauer.

Se colocaron de 7-10 ml de sangre periférica con EDTA en un tubo cónico de 50 ml y se agregaron 35 ml de solución de lisis ($\text{NH}_4\text{Cl-NaHCO}_3$) durante 15 min. se dejó en hielo, agitando, ocasionalmente. Los tubos se centrifugaron, a 2000 rpm 10 min. y se decantó el sobrenadante. Se agregó al botón obtenido, 20 ml de solución de lisis, dejando en hielo por 5 min. bajo agitación. Posteriormente, se centrifugó a 2000 rpm por 10 min. y el botón celular obtenido, de nuevo se lavó con la solución de lisis. El botón final obtenido, se resuspendió en el 1 ml de PBS 1X estéril, y las células se contaron a partir de una alícuota.

6.4.4.2 Cultivo de Leucocitos totales con PHA

La concentración de fitohemaglutinina que utilizamos para estimular los cultivos varió, al principio entre 40 y 100 $\mu\text{g/ml}$, hasta que encontramos que la concentración ideal para obtener una buena estimulación era de 100 $\mu\text{g/ml}$. Las células fueron resuspendidas en aproximadamente 3 ml de RPMI 1640 fueron incubadas a 37°C con 10% de suero de ternera fetal (STF), durante 36 hrs, para lograr la producción de IL-10 e IFN- γ , ya que el tiempo óptimo de producción de éstas es de 36 hrs. Una vez que se retiró el cultivo de la incubadora, se procedió a eliminar el medio de cultivo, para trabajar con el botón celular, extrayendo el RNA.

6.4.5 Obtención y análisis del RNA total a partir de células (Chomczynski y Sacchi, 1987)

El RNA total se extrajo del botón celular obtenido de las muestras de LBA, de la sangre de los controles o del cultivo de leucocitos con PHA, por la técnica de isotiocianato de guanidina (IG) fenol-cloroformo, (Chomczynski y Sacchi, 1987) Después de lisar las células mediante isotiocianato de guanidina, las proteínas se eliminan con fenol y los RNAs se precipitan con etanol en presencia de acetato de sodio. La cantidad y calidad del RNA obtenido se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa-isotiocianato de guanidina, teñido con bromuro de etidio.

6.4.5.1 Extracción del RNA

1. En el caso de cultivo de leucocitos, las células se lavaron 3 veces con 5 ml de PBS 1X manteniendo la placa en hielo.
2. Se agregaron 500 μ l de la solución de lisis (IG-sarcosyl-citrato de sodio y β -mercaptoetanol). y se rasparon perfectamente las paredes de la caja para desprender las células.
3. El lisado se colocó en tubos eppendorf, y se agregaron 50 μ l de Acetato de sodio 2 M, pH 4, agitando por inversión.
4. Se agregaron 500 μ l de fenol saturado con H₂O DEPC (Dietilpirocarbonato) al tubo y se agita por inversión.
5. Se agregaron 100 μ l de Sevag, el tubo se agitó en el vortex y se dejó reposar 15 min. en hielo.
6. Después de centrifugar 10 min a 14000 rpm a 4°C. se recuperó la fase acuosa (fase superior) y se transfirió a un tubo nuevo para precipitar los RNAs con 2.5 volúmenes de etanol absoluto dejándolo a -70°C, por 1 hora.
7. Después de centrifugar a 14000 rpm por 20 min a 4°C, los ácidos nucleicos se extrajeron de la pastilla con 250 μ l de solución D y se repitió el paso de precipitación.
8. Se centrifugó posteriormente a 14000 rpm por 20-30 min a 4°C. Se decantó y la pastilla se lavó con 200 μ l de etanol al 70% en H₂O DEPC y se volvió a centrifugar a 14000 rpm por 10 min a 4°C.
9. Finalmente el sobrenadante se decantó y la pastilla se secó y se resuspendió en 20 μ l de H₂O DEPC.

6.4.5.2 Análisis del RNA por electroforesis

Para poder valorar la presencia y sobre todo la calidad del RNA de las muestras, se prepararon geles de agarosa al 1% en buffer de TBE (Trizma Base EDTA), agregando a éstos bromuro de etidio para poder observarlos en una lámpara de UV. El corrimiento de los geles se llevó a cabo iniciando con un voltaje de 80 volts, posteriormente aumentando a 100 volts por espacio de una hora.

6.4.6 Reacciones de RT-PCR

A partir del RNA extraído, obtuvimos el DNA complementario (DNAC) haciendo uso de una enzima transcriptasa reversa (Superscript II) siguiendo las condiciones descritas en la tabla 1. De los DNACs, se amplificaron específicamente los de las citocinas en estudio, así como el del control interno (GPDH) mediante PCR y utilizando primers específicos.

Tabla 1 Condiciones para la Transcripción Reversa (RT)

Reactivos	Volumen
Buffer 5x	2 μ l
dNTPs	1 μ l
DTT	1 μ l
H2O	2.9 μ l
<i>Random primers</i>	1 μ l
Enzima	0.1 μ l
RNA	2 μ l
Vol. Total de reacción	10 μ l

En un primer paso los RNAs se desnaturalizaron, incubándolos a 70°C por 10 min, después se agregaron los otros reactivos de la reacción en hielo. Después de incubar 10 min a 25°C el tubo de reacción, la polimerización se llevó a cabo por 1 hora a 42°C. Finalmente un paso de 15 min a 70°C permitió desnaturalizar la enzima.

6.4.6.1 Amplificación por PCR de los DNAC

Después de obtener el DNAC de cada una de las muestras de pacientes y controles, se hizo la PCR en las condiciones descritas en las tablas 2-7 establecidas después de la estandarización para cada una de las diferentes citocinas que fueron analizadas, TNF- α , IFN- γ , IL-4 e IL-10, así como para el control interno: GPDH, cada una con sus primers específicos.

Tabla 2 Condiciones de PCR para GPDH (control interno)

Reactivos	Volumen en μl
Buffer 10X	2.5 μ l
MgCl ₂	2.0 μ l
DNTPs	0.5 μ l
Oligo 5'	2.5 μ l
Oligo 3'	2.5 μ l
H ₂ O	11.5 μ l
Enzima	0.5 μ l
DNAc	3 μ l
Volumen total de reacción	25 μl

Tabla 3 Condiciones de temperatura para GPDH.

Tiempo	Temperatura	No. de ciclos
2 min	94°C	1
1 min	94°C	30
1 min	56°C	
1 min	72°C	
5 min	72°C	1

Tabla 4 Condiciones de PCR para TNF- α , IL-10 e IFN- γ

Reactivos	Volumen en μl
Buffer 10X	2.5 μ l
MgCl ₂	1.5 μ l
DNTPs	0.75 μ l
H ₂ O	14.5 μ l
Oligo 5'	1.25 μ l
Oligo 3'	1.25 μ l
Enzima	0.25 μ l
DNAc	3 μ l
Volumen total de reacción	25 μl

Tabla 5 Condiciones de Temperatura para TNF- α , IL-10 e IFN- γ

Tiempo	Temperatura	No. de ciclos
2 min	94°C	1
1 min	94°C	30
1 min	56°C	
1 min	72°C	
5 min	72°C	1

Tabla 6 Condiciones de PCR para IL-4

Reactivos	Volumen en μl
Buffer 10X	2.5 μ l
MgCl ₂	1.5 μ l
H ₂ O	16.3 μ l
DNTPs	0.75 μ l
Primers 5' y 3'	0.7 μ l
Enzima	0.25 μ l
DNAc	3 μ l
Volumen total de reacción	25 μ l

Tabla 7 Condiciones de Temperatura para IL-4

Tiempo	Temperatura	No. de ciclos
2 min	94°C	1
30 seg	94°C	40
30 seg	53°C	
1 min	68°C	
7 min	68°C	1

6.4.6.2 Observación del Producto Amplificado

Se prepararon geles de agarosa al 1.8% con bromuro de etidio para llevar a cabo el corrimiento de las muestras por electroforesis utilizando un marcador de peso molecular comercial que tiene una diferencia de 100pb entre cada una de sus bandas.

7. RESULTADOS

7.1 Análisis de las poblaciones celulares

A partir del botón celular de cada una de las muestras de LBA de los pacientes se realizaron frotis que fueron teñidos con Wright para observar las poblaciones celulares predominantes. Los resultados de estas observaciones fueron los siguientes: hasta en un 70% de las muestras predominaron en la población los neutrófilos, posteriormente los monocitos y por último los linfocitos.

7.2 Cuantificación de citocinas inflamatorias (TNF- α , IL-8), Th1 (IL-2 e IFN- γ) y Th2 (IL-4 IL-10) en muestras de LBA por la técnica de ELISA.

Las alícuotas del sobrenadante del LBA de los pacientes y controles fueron descongeladas, para medir la concentración de citocinas producidas. Las placas de ELISA incluyeron los estándares necesarios para llevar a cabo una curva de calibración para cada una de las mediciones y posteriormente, extrapolar la DO obtenida por nuestros controles y muestras de pacientes. Las muestras se depositaron en cada uno de los 96 pozos que contiene la placa de ELISA, éstas se hicieron por duplicado.

Se obtuvieron los valores de correlación de cada una de las mediciones por medio de la ecuación de la recta, y las concentraciones reales de citocinas para cada una de las muestras. Las curvas de calibración se muestran en las figuras 1-6.

7.2.1 Curvas de calibración

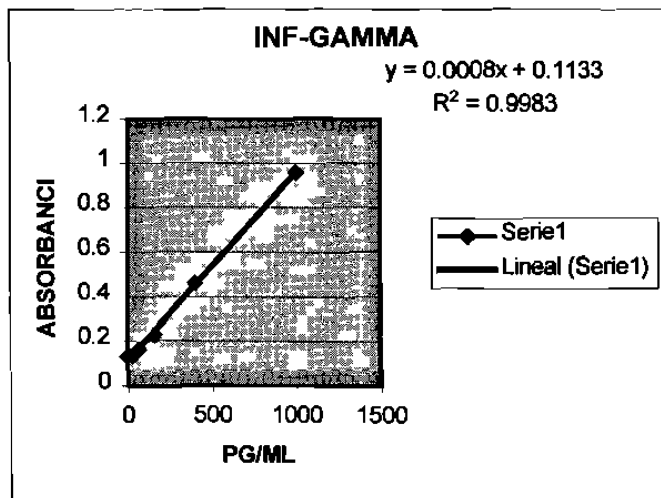


Fig 1) Curva de calibración para IFN- γ . Se representa la curva de calibración obtenida para el IFN- γ . Los valores obtenidos se graficaron, así como la recta estimada por el análisis de regresión.

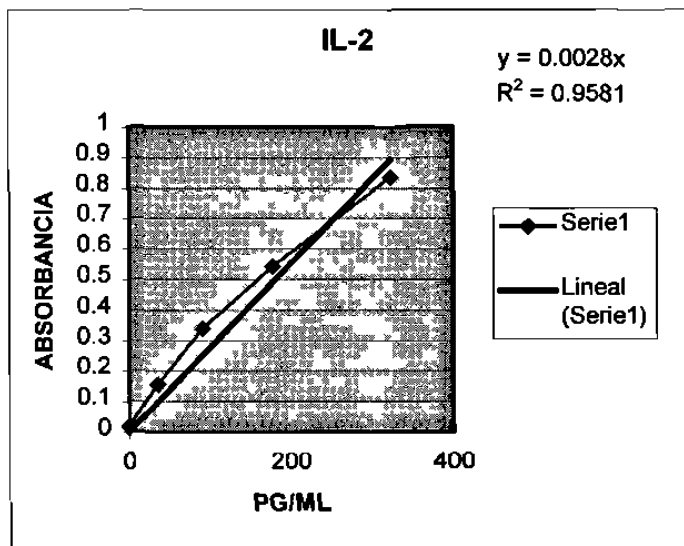


Fig 2) Curva de Calibración para IL-2. Se representa la curva de calibración obtenida para el IL-2. Los valores obtenidos se graficaron, así como la recta estimada por el análisis de regresión.

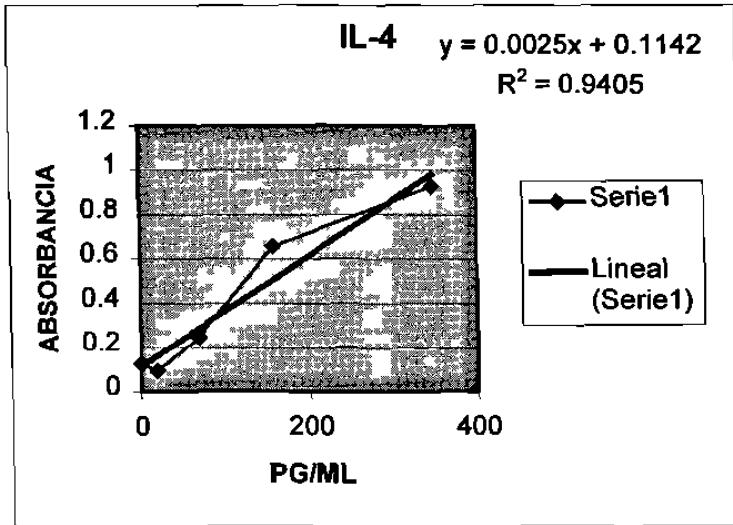


Fig 3) Curva de Calibración para IL-4. Se representa la curva de calibración obtenida para el IL-4. Los valores obtenidos se graficaron, así como la recta estimada por el análisis de regresión.

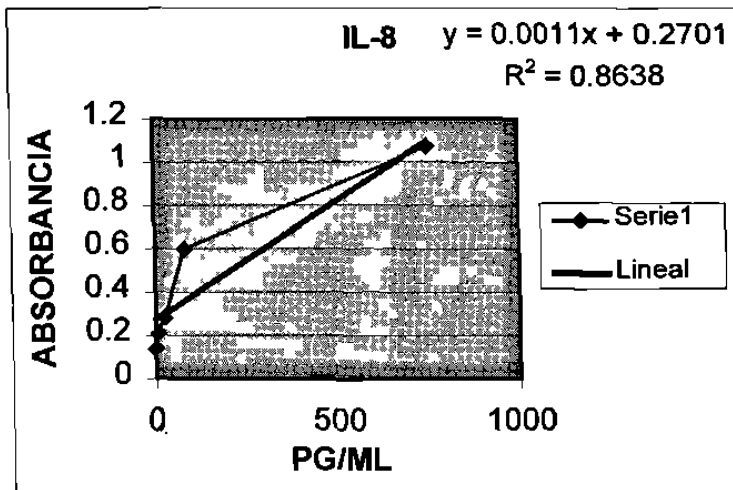


Fig 4) Curva de Calibración para IL-8. Se representa la curva de calibración obtenida para el IL-8. Los valores obtenidos se graficaron, así como la recta estimada por el análisis de regresión.

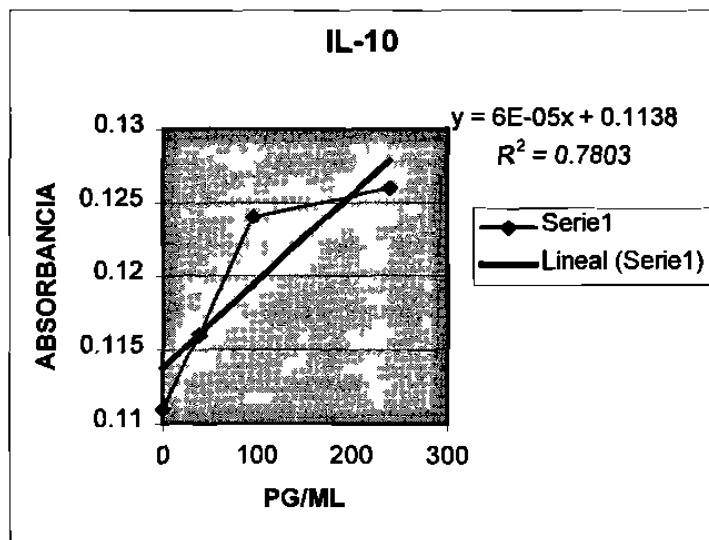


Fig 5) Curva de Calibración para IL-10. Se representa la curva de calibración obtenida para el IL-10. Los valores obtenidos se graficaron, así como la recta estimada por el análisis de regresión.

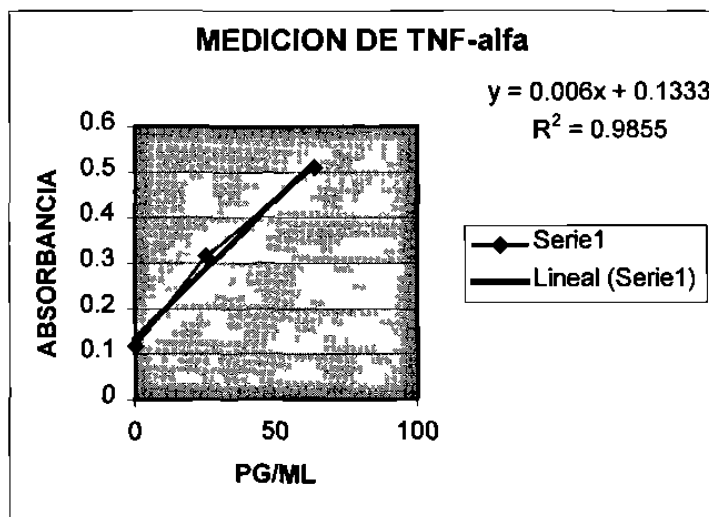


Fig 6) Curva de Calibración para TNF- α . Se representa la curva de calibración obtenida para el TNF- α . Los valores obtenidos se graficaron, así como la recta estimada por el análisis de regresión.

7.2.2 Cuantificación de citocinas por ELISA

La cuantificación de las citocinas por ELISA dio los resultados presentados en las tablas 8, 9 y 10.

Tabla 8 Concentración de citocinas proinflamatorias

No. de sujetos	TNF- α pg/ml			IL-8 pg/ml		
	Gpo control	Pac. TB	Pac. NO TB	Gpo control	Pac. TB	Pac. NO TB
1.-	0	22.7	21.03	0	755.4	731.1
2.-	16	25.33	25.33	0	733.6	710
3.-	0	22.7	21.03	0	742.7	697.2
4.-	0	23.2	25.03	0	568.1	543.6
5.-	0	18.2	19.03	0	740.9	736.3
6.-	--	16.2	20.36	--	745.4	742.7
7.-	--	28.7	24.06	--	721.8	539
8.-	--	23.86	--	--	730	--
9.-	--	20.2	--	--	730.9	--
10.-	--	21.86	--	--	310.9	--
11.-	--	29.03	--	--	730	--
12.-	--	18.86	--	--	591.8	--
13.-	--	25.33	--	--	644.5	--
14.-	--	26.7	--	--	0	--
15.-	--	24.36	--	--	738.1	--
16.-	--	19.7	--	--	727.2	--
17.-	--	23.86	--	--	745.4	--
18.-	--	22.36	--	--	253.6	--
19.-	--	19.7	--	--	741.8	--

Los valores de las citocinas proinflamatorias estuvieron por abajo del límite de detección del Kit de ELISA para las muestras del grupo control, mientras que llegaron a valores detectables en los dos grupos de pacientes (tabla 8).

Tabla 9 Concentración de citocinas TH1

No. de sujetos	IFN- γ pg/ml			IL-2 pg/ml		
	Gpo control	Pac. TB	Pac. NO TB	Gpo control	Pac. TB	Pac. NO TB
1.-	0	0	53.7	77.1	57.85	108.21
2.-	0	0	46.2	43.57	48.27	53.92
3.-	0	35	31.2	22.5	47.85	47.5
4.-	0	45	20	12.14	46.78	50.71
5.-	0	67.5	18.7	17.14	46.07	47.85
6.-	--	61.2	21.2	--	75	43.92
7.-	--	28.7	8.75	--	42.85	39.64
8.-	--	37.5	--	--	50	--
9.-	--	0	--	--	44.64	--
10.-	--	1.5	--	--	43.92	--
11.-	--	40	--	--	55	--
12.-	--	18.7	--	--	44.28	--
13.-	--	25	--	--	41.42	--
14.-	--	10	--	--	50.35	--
15.-	--	52.5	--	--	42.85	--
16.-	--	38.7	--	--	34.28	--
17.-	--	26.2	--	--	50	--
18.-	--	45	--	--	47.85	--
19.-	--	17.5	--	--	32.5	--

Para las citocinas TH1, sobre todo para IL-2 el grupo control si presentó lecturas detectables de producción de citocinas , más sin embargo éstas no fueron significativas. Ambos grupos de pacientes presentaron concentraciones más altas de IFN- γ e IL-2.

Tabla 10 Concentración de citocinas TH2

No. de sujetos	IL-4 pg/ml			IL-10 pg/ml		
	Gpo control	Pac. TB	Pac. NO TB	Gpo control	Pac. TB	Pac. NO TB
1.-	20.68	49.88	56.28	0	483.3	466.6
2.-	27.08	43.88	41.88	133.3	216.6	533.3
3.-	28.28	68.28	47.48	83.3	383.3	0
4.-	18.68	37.48	44.68	0	383.3	33.3
5.-	16.28	43.48	37.48	0	150	383.3
6.-	--	41.88	50.28	--	33.3	600
7.-	--	41.48	48.6	--	216.3	0
8.-	--	47.48	--	--	266.6	--
9.-	--	33.88	--	--	16.6	--
10.-	--	34.28	--	--	283.3	--
11.-	--	43.08	--	--	116.6	--
12.-	--	37.88	--	--	400	--
13.-	--	40.28	--	--	166.6	--
14.-	--	37.48	--	--	400	--
15.-	--	38.68	--	--	383.3	--
16.-	--	37	--	--	0	--
17.-	--	34.28	--	--	200	--
18.-	--	37.4	--	--	166.6	--
19.-	--	51	--	--	66.6	--

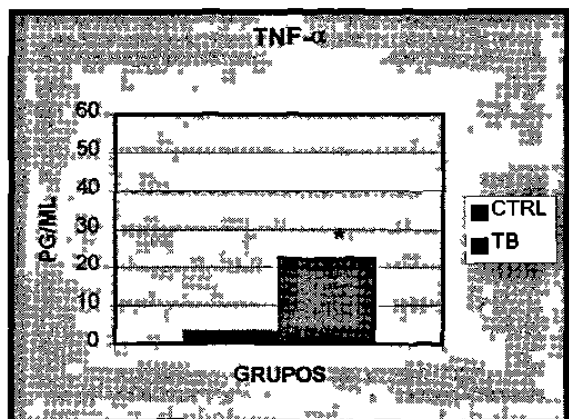
En el grupo de citocinas TH2 de igual manera el grupo control presento lecturas detectables por el Kit de medición, de igual manera no significativas, excepto para IL-10 en donde sólo un sujeto del grupo control presentó un valor de lectura alto detectable por el Kit de ELISA. Los pacientes presentaron concentraciones muy variables (0-60 pg/ml) de IL-10, pero éstas fueron más altas que las del grupo control.

7.3 Comparación de los resultados.

7.3.1 Comparación entre el grupo de pacientes con TB y el grupo control

Al analizar las citocinas se observa un aumento significativo en la concentración de TNF- α e IL-8, en los grupos de pacientes, comparándolos con el grupo control, aunque también podemos observar que IL-8 es la citocina proinflamatoria que presenta un aumento más marcado que TNF- α (X600), en el grupo de pacientes. (figura 7)

a)



b)

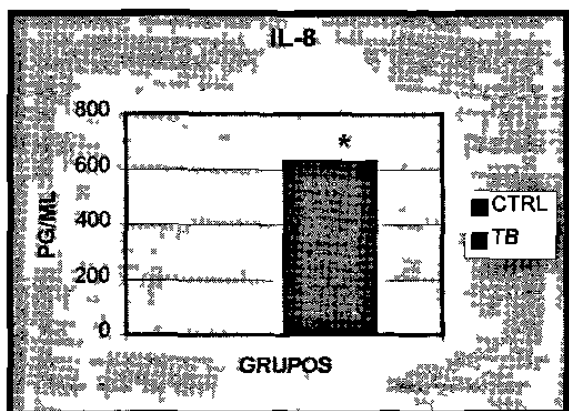
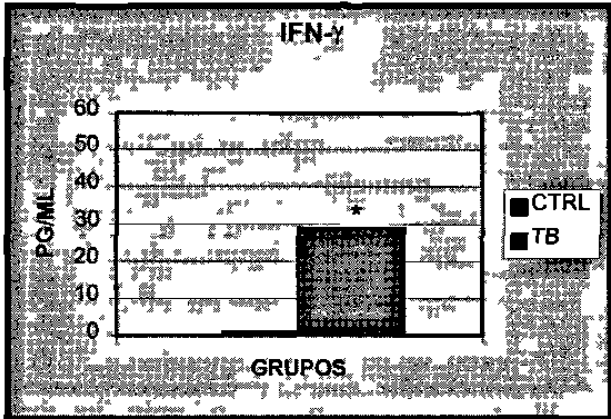


Fig.7) Gráfica de concentración de citocinas proinflamatorias comparación entre la concentraciones promedi obtenidas para el grupo control el grupo de pacientes con TB, a TNF- α b) IL-8.

* indica diferencia significativa.

IFN- γ , es la citocina TH1 que presentó un aumento significativo, comparado con el grupo control, a diferencia de IL-2, en la cual podemos observar que la concentración que presenta el grupo de pacientes no difiere mucho del grupo control.

a)



b)

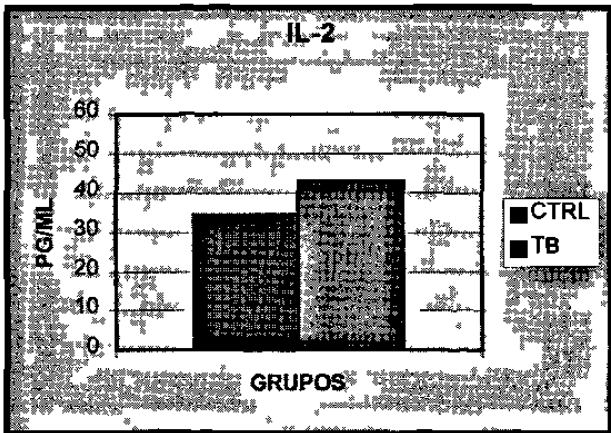
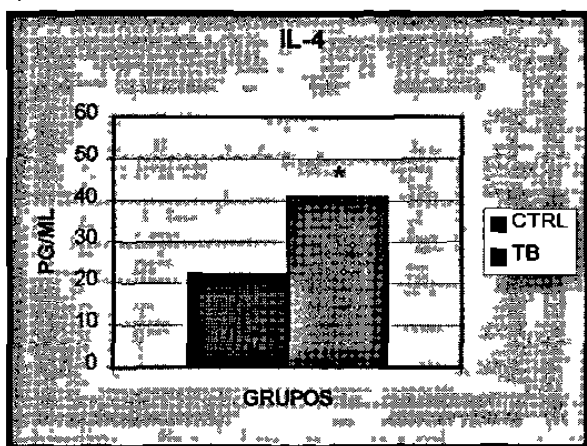


Fig.8) Gráfica d concentración de citocina TH1, comparación entre la concentraciones promedi obtenidas para el grupo contro y el grupo de pacientes con TB a) gráfica para IFN- γ b) gráfic para IL-2.

* indica diferencia significativa

Para las citocinas TH2, observamos que si se encontró un aumento significativo, al igual que en las proinflamatorias, entre el grupo de pacientes comparado con el grupo control. IL-10 es la citocina TH2 que presenta un mayor aumento(fig 8).

a)



b)

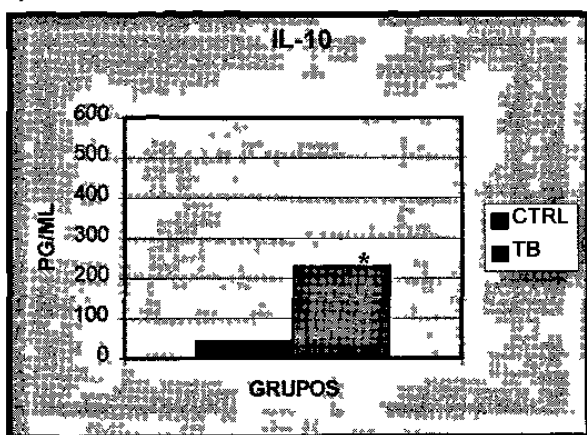


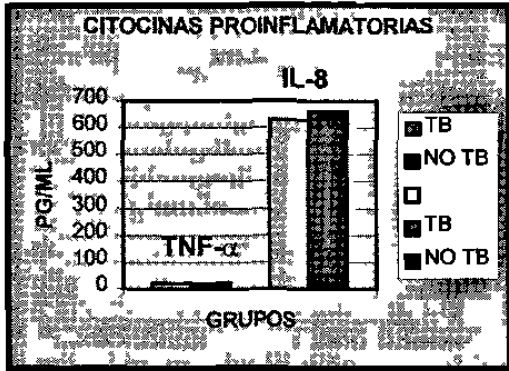
Fig.9), Gráfica d
Concentración de citocina
TH2, comparación entre la
concentraciones promedi
obtenidas para el grupo control
el grupo de pacientes con TB. a
gráfica para IL-4, b) gráfica par
IL-10.

* indica diferencia significativa.

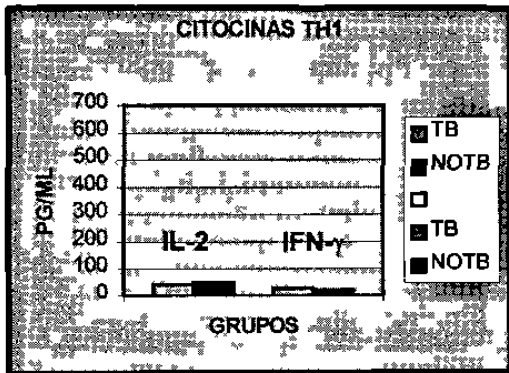
7.3.2 Comparación entre el grupo de pacientes TB y no TB.

En general, en estas tres gráficas de la figura 10 podemos observar que no se presentó una diferencia significativa en la concentración de las citocinas cuando se compararon los dos grupos de pacientes TB y NO TB. Los dos se comportaron de forma similar en cuanto a las medias de concentración para cada una de las citocinas. Sin embargo, observamos diferencias entre las citocinas de un mismo grupo, por ejemplo, IL-8 e IL-10 son las que presentan un aumento más marcado dentro de su grupo.

a)



b)



c)

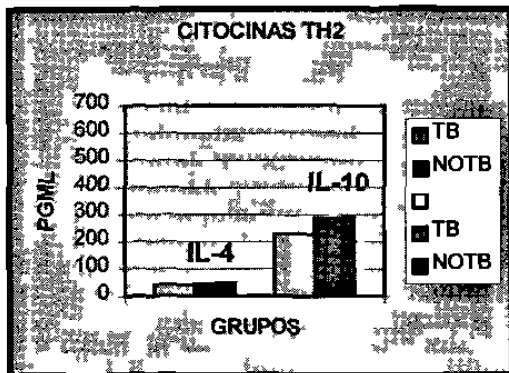


Fig.10) Comparación de la concentración de las citocinas entre los dos grupos de pacientes: TB y NO TB. Se representa la concentración promedio en el LBA de los pacientes con TB y con neumonía a) gráfico para las citocinas proinflamatorias. b) citocinas TH1. c) citocinas TH2. No se observaron diferencias significativas.

7.4.2 Amplificación de IFN- γ , IL-4, IL-10 y TNF- α

7.4 Estandarización de RT-PCR para las citocinas: IL-4, IL-10, TNF- α e IFN- γ a partir del cultivo de leucocitos con PHA

7.4.1 Extracción de RNA y amplificación

Se logró la extracción de RNA a partir de los leucocitos totales, que iban a ser utilizados para la estandarización de la técnica. En la figura 11 (a) se muestra un gel demostrativo de los RNAs obtenidos. Además corroboramos las condiciones de la reacción de RT, logrando la amplificación del control interno GPDH. La obtención del producto amplificado esperado de 1000 pb, permitió corroborar la buena calidad de los RNAs obtenidos y de los DNACs sintetizados fig 11 (b).

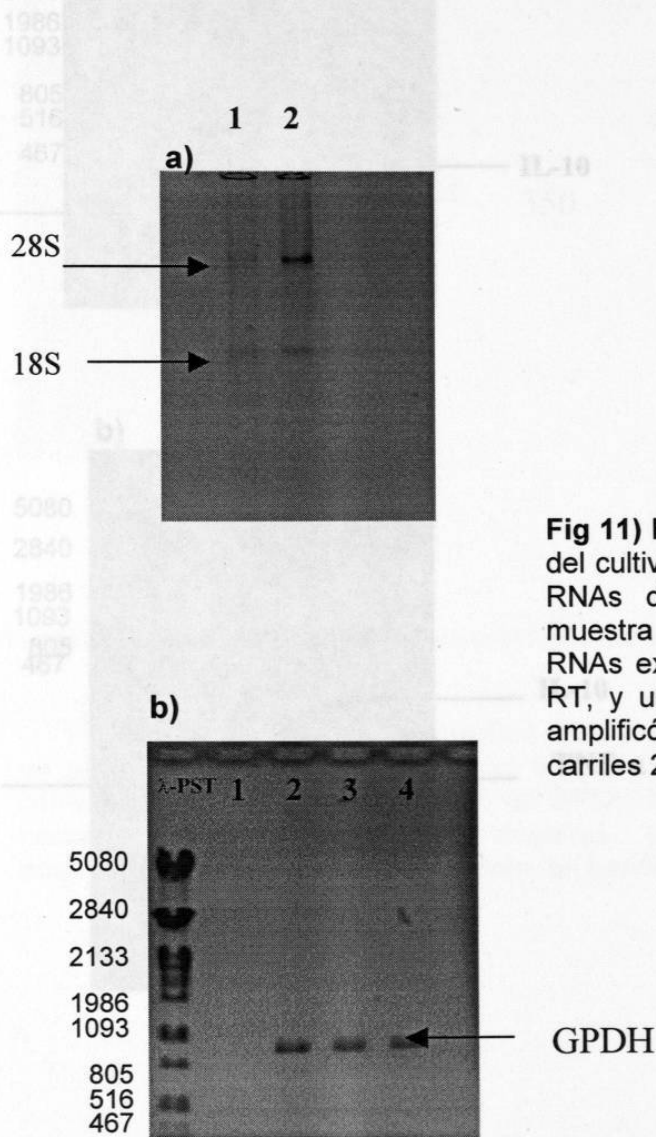
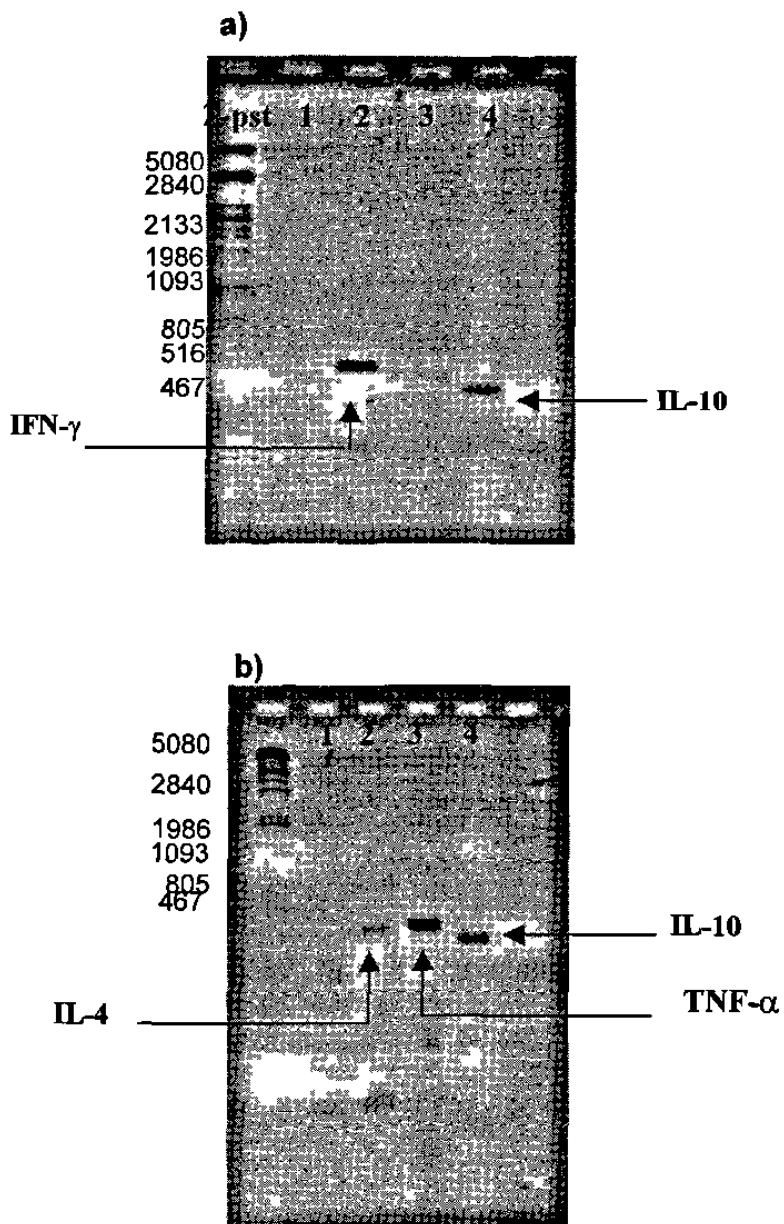


Fig 11) Extracción de RNA a) A partir del cultivo de leucocitos, se obtuvieron RNAs de buena calidad, como se muestra en los carriles 1 y 2. **b)** Los RNAs extraídos, se sometieron a un RT, y una alícuota de los DNACs se amplificó con los iniciadores de GPDH carriles 2,3 y 4.

7.4.2 Amplificación de IFN- γ , IL-4, IL-10 y TNF- α

Utilizando los RNAs de los leucocitos se estandarizaron las reacciones de RT-PCR para las diferentes citocinas. En la fig 12 se observan, los productos de amplificación correspondientes a las citocinas. Una vez que se logró esto, procedimos a repetirlo pero ahora para los controles y pacientes.



Al realizar la reacción de RT-PCR para las diferentes citocinas, no se observó
7.5 Análisis de la expresión de los RNAs mensajeros para el control interno y las citocinas en células de LBA.
 control. Los resultados fueron similares en el caso de IL-4 e IL-10, (fig. 15 a y b) obteniendo ninguna señal para las diferentes muestras, aunque los controles positivos sí dieron las bandas esperadas.

Una vez estandarizadas las condiciones de RT-PCR, éstas se aplicaron a los RNAs extraídos de las muestras de LBA de los pacientes, y de las células totales sanguíneas de los controles. Para todas las muestras analizadas se observa la banda de 1000 pb correspondiente a GPDH fig (13).

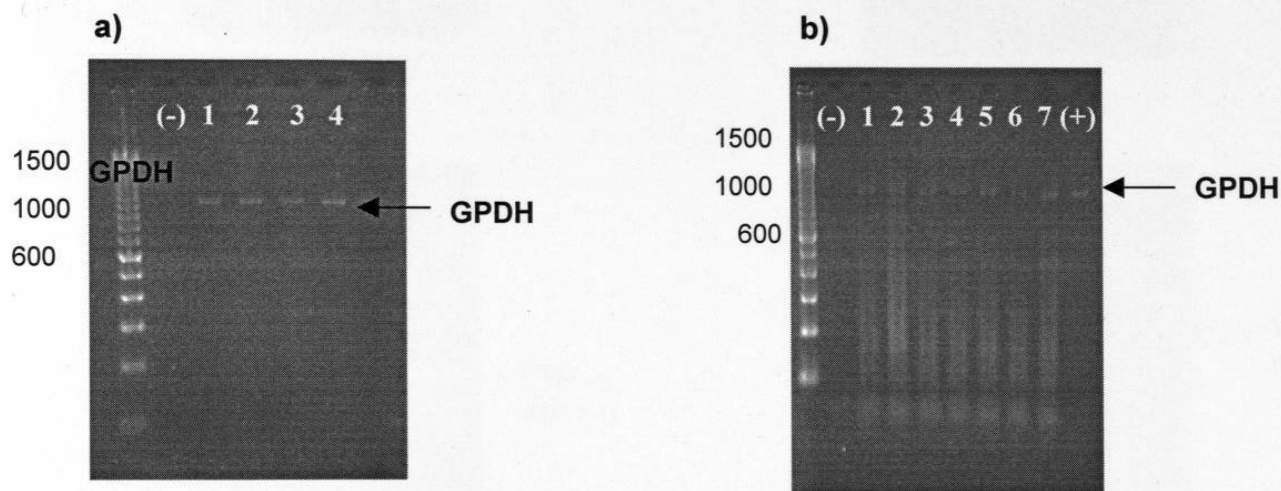


Fig 13) Amplificación del control interno Los RNAs extraídos se sometieron en un primer paso a una RT-PCR para GPDH. Se observan las bandas de 1000 pb correspondientes a la amplificación de GPDH a) en los sujetos control y b) en los 7 pacientes analizados. (-) control negativo, y (+) control positivo de la reacción, además en el primer carril se observan las bandas del marcador.

Al realizar la reacción de RT-PCR para las diferentes citocinas, no se observó una banda para IFN- γ (**fig 14 a**) a parte de la del control positivo, ni en los controles ni en los pacientes. Los resultados fueron similares en el caso de IL-4 e IL-10, (**fig. 15 a y b**) obteniendo ninguna señal para las diferentes muestras, aunque los controles positivos si dieron las bandas esperadas.

Al hacer la reacción de RT-PCR para TNF- α , se obtuvo un producto amplificado en todos los carriles de los pacientes y en uno de los controles. (**fig. 14 b**)

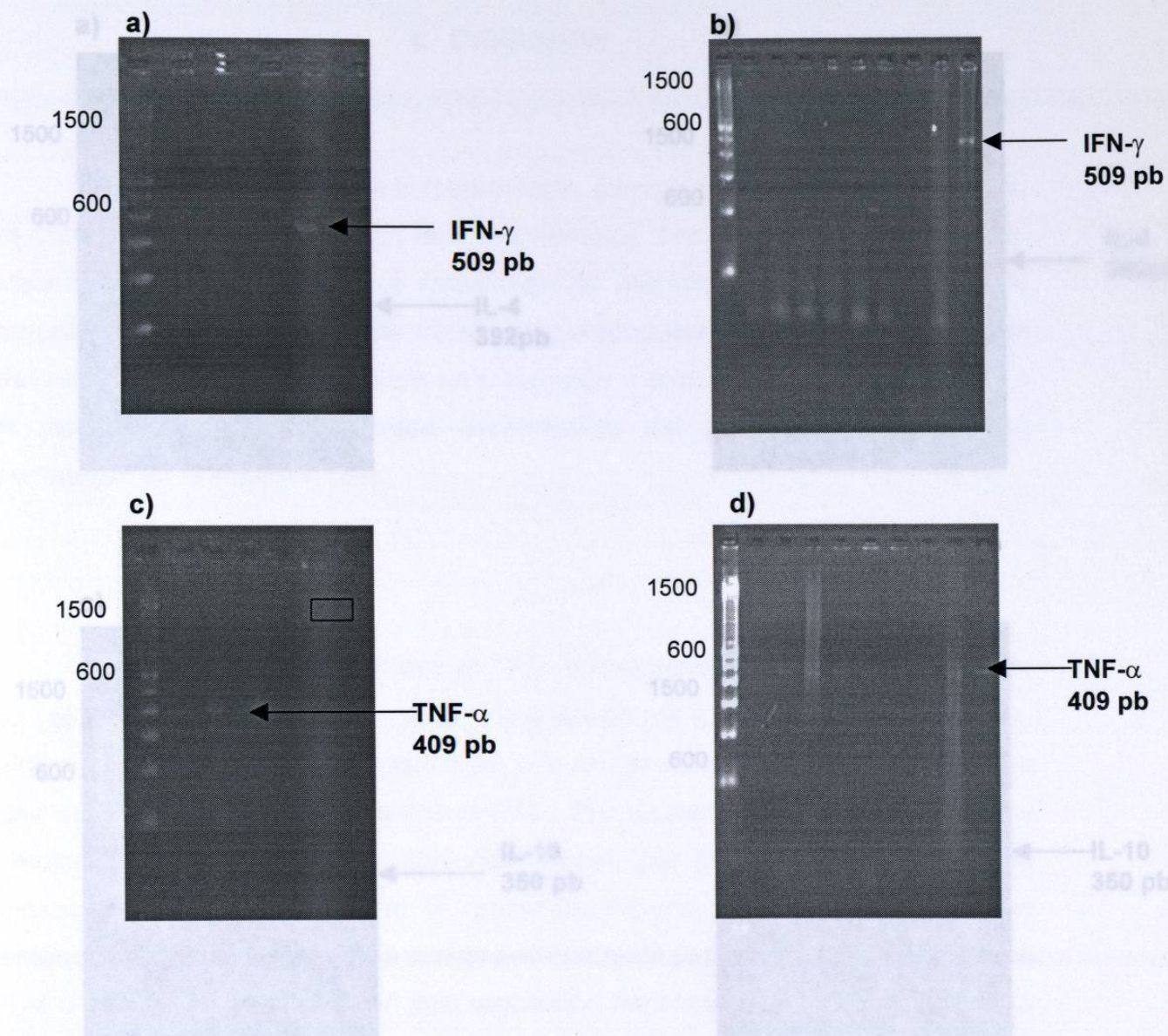


Fig. 14) Amplificación de TNF- α e IFN- γ Los productos amplificados correspondientes a IFN- γ se analizaron en un gel de agarosa. a) grupo control, b) grupo de pacientes. El último carril de cada gel corresponde al control positivo, que presenta la banda esperada. Al amplificar TNF- α , observamos la banda de 409 pb en el carril 1 del grupo control (c) y en todos los carriles de los pacientes (d).

Para IL-4, en ninguno de los gels se observa la banda correspondiente, solo la banda del control positivo. Para IL-10, en ninguno de los gels se observa la banda correspondiente, solo la banda del control positivo.

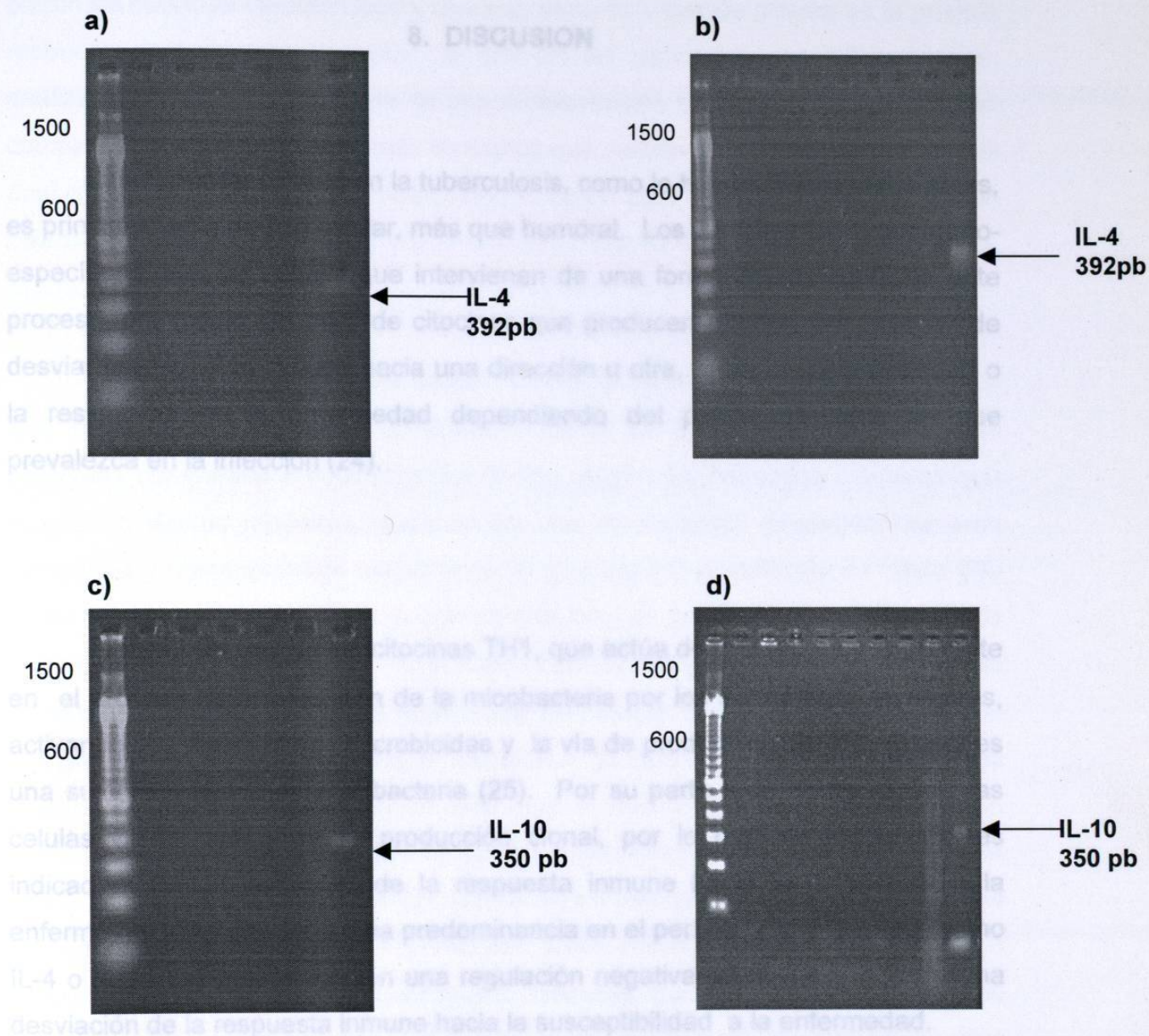


Fig.15) Amplificación de IL-10 e IL-4 observamos la amplificación sólo de los controles positivos para IL-4 de 392 pb **a)** grupo control y **b)** pacientes. Para IL-10, de 350 pb, en ninguno de los geles se observa la banda correspondiente, solo la banda del control positivo **c)** grupo control y **d)** grupo de pacientes.

8. DISCUSION

La respuesta inmune en la tuberculosis, como lo hemos mencionado antes, es principalmente de tipo celular, más que humoral. Los linfocitos CD4+ antígeno-específicos, son las células que intervienen de una forma determinante en este proceso, por medio del perfil de citocinas que producen pueden ser capaces de desviar la respuesta inmune hacia una dirección u otra, hacia la susceptibilidad o la resistencia en la enfermedad dependiendo del patrón de citocinas que prevalezca en la infección (24).

El IFN- γ , es una de las citocinas TH1, que actúa de manera muy importante en el proceso de erradicación de la micobacteria por los macrófagos alveolares, activando sus mecanismos microbicidas y la vía de producción del NO, el cual es una sustancia tóxica para la bacteria (25). Por su parte IL-2, actúa sobre las células CD4+, activando su producción clonal, por lo cual su producción es indicadora de un desarrollo de la respuesta inmune hacia la resistencia a la enfermedad. Por otro lado, una predominancia en el perfil de citocinas TH2, como IL-4 o IL-10, las cuales ejercen una regulación negativa sobre TH1, indicará una desviación de la respuesta inmune hacia la susceptibilidad a la enfermedad.

En este trabajo, nuestro principal objetivo fue el de observar si existía un patrón de citocinas característico y que nos diera información acerca de la posible respuesta inmune prevaleciente *in situ* en los pacientes con TB pulmonar, analizando su LBA. Para partir de una concentración basal de citocinas y poder comparar los grupos de pacientes teníamos que recurrir a un grupo control en el cual se llevaron a cabo las mediciones también pero en este caso fueron en plasma, ya que resultaba difícil contar con una muestra de LBA de un sujeto sano.

En las fig. 1 y 2, para las citocinas proinflamatorias nosotros encontramos que $TNF-\alpha$ e IL-8 presentan un aumento en su concentración en el grupo de pacientes comparado contra el grupo control, según los hallazgos celulares que obtuvimos de las muestras, observamos que la población predominante eran neutrófilos y posteriormente macrófagos, lo cual explica el aumento de hasta 600 veces la concentración de IL-8 comparado con el grupo control. Además de participar importantemente en el proceso inflamatorio presente. $TNF-\alpha$ por su parte es una citocina que se ha relacionado de manera importante en la formación del granuloma por los macrófagos alveolares, ya que éstos son los principales productores de esta citocina y en este caso el hecho de que no presentara un aumento tan marcado como el de IL-8, probablemente sea debido a que la población de macrófagos que encontramos en las muestras era menor en cantidad comparada con los neutrófilos presentes. Cabe mencionar que $TNF-\alpha$ es una citocina producida sólo por macrófagos, mientras que IL-8, la producen tanto neutrófilos como macrófagos. Además pudo existir una regulación de tipo negativo por IL-10 sobre $TNF-\alpha$, inhibiendo su producción.

Law y Weiden (20) en 1996, concluyeron que en células de LBA, los macrófagos alveolares liberaban grandes cantidades de citocinas proinflamatorias, nosotros en este trabajo coincidimos con ellos, aunque podría decirse que sólo parcialmente, ya que, en este trabajo nosotros observamos que la citocina proinflamatoria que presentó un mayor aumento fue IL-8, a diferencia de estos autores y otros como Tsao y Hong, en 1999, quienes encuentran que es TNF- α , además, de IL-1 e IL-6, las citocinas proinflamatorias que se encuentran en mayor concentración. En nuestro estudio los altos niveles de IL-8 probablemente se relacionan con el proceso infeccioso agudo e inicial en los pacientes de los cuales se obtuvo el LBA, aunque la tuberculosis como tal se considera una enfermedad crónica.

Esta hipótesis se refuerza también con la comparación de los dos grupos de pacientes, con TB confirmada y los que desarrollaron una neumonía no debida a TB. Ambos grupos presentaron una predominancia de neutrófilos en su LBA, y un fuerte aumento de IL-8, por lo cual en ambos casos estamos observando la fase aguda inicial de la enfermedad que es mayormente inflamatoria y no depende tanto del agente etiológico. Cabe remarcar que hubiera sido interesante conocer el estado en que encontraba la enfermedad en cada uno de los pacientes.

Somoskovi, Zissel y col. (22) han relacionado los niveles de IL-8 con el avance clínico de la enfermedad, a menor avance clínico, una respuesta inflamatoria más aguda y una concentración mayor de IL-8 y a mayor avance la principal respuesta es de tipo crónico. En este trabajo nosotros no pudimos averiguar el estado en que se encontraba la enfermedad en cada uno de los pacientes, pero el resultado revela que está en la etapa inicial activa.

Varios estudios (Douglas 1994 (19) y Gerosa, 1999 (18) mencionaron que el patrón de citocinas presente en pacientes con TB pulmonar, es más bien TH1, que TH2, siendo principalmente IFN- γ una de las citocinas que se encontraba *aumentada en cuanto a su producción e incluso la expresión de su RNAm*. De la misma manera, nosotros observamos que los niveles de IFN- γ en los pacientes eran mayores a los encontrados en el grupo control (fig 3 y 4), sin embargo el aumento no fue tan considerable, y no encontramos expresión del RNAm cuando llevamos a cabo la RT-PCR para esta citocina. Nuevamente podemos suponer una probable regulación negativa por parte de las citocinas TH2 sobre TH1. Además este resultado se explica por la baja cantidad de linfocitos que encontramos en las muestras de LBA, recordando que son éstos los principales productores de IFN- γ e IL-2. Para esta última ni siquiera observamos una diferencia significativa entre el grupo de pacientes y el grupo control. Por lo tanto, nuestros hallazgos indican que a diferencia de otros autores, no observamos un patrón predominante TH1.

En este trabajo la producción de citocinas TH2, IL-4 e IL-10, aumentó de manera significativa en el grupo de pacientes, aunque este resultado es menos evidente para IL-4. Para IL-10 esto es más obvio, ya que después de IL-8, IL-10 es la segunda citocina que encontramos con el mayor aumento en su producción, a pesar de que la población de linfocitos fue escasa en las muestras de LBA. Probablemente los altos niveles de IL-10 presentes indiquen que durante la etapa inicial de la enfermedad activa predomina la respuesta TH2. Se sabe que *M. tuberculosis* muerta activa de manera muy importante la producción de esta citocina (23). Además su alto nivel de producción podría tener como fin controlar un proceso ejerciendo sus propiedades antiinflamatorias principalmente. Por otro lado, es una de las principales citocinas reguladoras, y al encontrarse aumentada, su efecto podría ser mayor sobre las citocinas TH1, desviando así la respuesta

inmune hacia una participación más activa de las citocinas TH2. Sobre IL-4, la mayoría de estudios previos, no han hecho una mención importante en cuanto a

su producción, y nosotros encontramos lo mismo, los niveles encontrados no fueron significativos. Aunque cabe la posibilidad que esté asociada a su receptor en macrófagos, lo que incrementaría los niveles de receptores para el bacilo de *M. tuberculosis*.

Al comparar a los dos grupos de pacientes, TB y NO TB, en las fig. 7,8 y 9, podemos observar como el comportamiento de los tres grupos de citocinas que analizamos en este trabajo, se comportaron de la misma manera, presentando un patrón similar, y podríamos decir que era de esperarse al hacer las primeras observaciones sobre las poblaciones celulares que predominaban en las muestras. Todas presentaron un proceso inflamatorio muy importante, aunque cabe mencionar que hubiera sido de interés el conocer el agente etiológico causal en el grupo de pacientes con neumonía y poder establecer una integración más completa de los resultados obtenidos.

Los hallazgos de RT-PCR para estas citocinas, de la misma manera, fueron parcialmente diferentes a lo reportado por otros autores, los cuales han encontrado expresión de los RNAm para citocinas como IFN- γ o incluso IL-10, aunque la mayoría coincide en que son principalmente los RNAm de las citocinas TH1 los que se detectan. En este trabajo, nosotros encontramos expresión de RNAm sólo para TNF- α , analizando a 7 de los pacientes del grupo de TB, esto indica una fuerte actividad transcripcional de macrófagos aunque los niveles encontrados por ELISA no la reflejan todavía. Por lo tanto se observa una concordancia en cuanto a la expresión y producción de TNF- α . El hecho de evidenciar la presencia de los transcritos de TNF- α , aunque los macrófagos no son las células predominantes, podría indicar que se va a liberar una fuerte

cantidad de esta interleucina, lo que concordará con los hallazgos previamente descritos por varios autores. Dentro del grupo control, uno de los sujetos sanos expresó RNAm para TNF- α , nuestro grupo control estaba compuesto por sujetos sanos, posiblemente esto fue debido a una probable infección subclínica .

Es importante mencionar que la determinación RT-PCR del RNAm de IL-8 no se llevó a cabo, aunque consideramos que hubiera sido muy importante el haberla realizado por los resultados encontrados en el ELISA. Para las demás citocinas: IFN- γ , IL-4 e IL-10 no observamos los RNAs correspondientes, creemos que esto este relacionado nuevamente con el bajo número de linfocitos en las muestras y por lo tanto los RNAs para estas citocinas no se pudieron detectar. Otra probable hipótesis, es que la micobacteria haya influido bloqueando el proceso de transcripción en estas células, permitiendo así que lo único encontrado hayan sido los niveles de producción *in situ*, presentes en el sobrenadante de LBA.

El haber realizado la determinación de estas citocinas por ELISA y RT-PCR tuvo por objeto, observar su producción a dos niveles, 1) en cuanto a la expresión de sus RNAs mensajeros y 2) en cuanto a su producción o secreción ya de la proteína en sí. Creemos que aunque la relación entre estas dos técnicas no fue muy directa, los resultados encontrados nos permitieron hacer especulaciones sobre la probable situación presente en los pacientes con TB que analizamos. Proponemos que en el proceso local activo, el patrón de citocinas predominante es inflamatorio y TH2, lo que permite la persistencia de la infección. Es posible que esto cambie en el momento en que el paciente recibe y responde a la terapia con antifímicos

Los resultados y las explicaciones dadas en este trabajo nos ayudan a entender mejor la interacción huésped-parásito y la fisiopatogenia de la enfermedad, lo que tiene implicaciones importantes para que en su futuro el tratamiento también sea con inmunomoduladores que inhiban la respuesta de linfocitos TH2 y activen los linfocitos TH1 encargados de la resolución de la infección.

9. CONCLUSIONES

- 1) IL-8 e IL-10, fueron las citocinas que presentaron un mayor aumento en su concentración, y en menor grado se encontraron: TNF- α , IFN- γ , IL-2 e IL-4 .

- 2) No se presentaron diferencias en los niveles de producción de citocinas, independientemente del agente etiológico que esté causando el proceso pulmonar infeccioso en los dos grupos de pacientes.

- 3) TNF- α fue la única citocina en la que se observó la expresión de su RNAm, lo que indica transcripción importante, aunque los niveles no se reflejaron en la secreción.

- 4) No se pudo demostrar la presencia de RNAm para IFN- γ , IL-4 e IL-10 en las muestras de LBA.

- 5) Se propone que en la tuberculosis en la fase aguda inicial el patrón de citocinas predominante es el de citocinas proinflamatorias y las derivadas de linfocitos TH2.

10. BIBLIOGRAFIA

1. Kauffman, S.H.E. 1989. In vitro Analysis of the Cellular Mechanism Involved in Immunity to Tuberculosis. *Rev. Infect. Dis.* 11(2): 448-454.
2. Desprez. R.M.C.R. Hein. 1990. *Mycobacterium tuberculosis* In: Principles and Practice of Infectious diseases. Third Edition, New York:. Pp. 1877-1906.
3. Consejo Asesor en Epidemiología. 1990. México: Información Prioritaria en Salud. México. D.F. SSA.
4. Wallis, Robert. S. Ellner, Jerrold J. 1993. Cytokines and tuberculosis. *Journal Leukocyte Biology.* 55: 676-681.
5. Joklik, W.K. H.P. Willett, D.B. Amos. 1983. *Zinsser Microbiología.* 17 ed. Ed. Panamericana, Buenos Aires Argentina, pp. 611-634.
6. Johns Hopkins University. 2001. *Diseases: Tuberculosis-Epidemiology & Natural History, 1997-2000.*
7. Sanchez, E. Tardío, E. 2000. *Inmunología de la Tuberculosis.* *Pediatría.* 17:865-878.

8. Kawakami, K. 1999. Host factors promoting the occurrence and exacerbation of tuberculosis: Significance of Th1-Th2 cytokine balance. *Kekkaku*. 9:1141-45.

9. Blakeslee, Dennis. PhD. 1998. The two faces of Immunity: Th1 and Th2. *JAMA HIV/AIDS. Information Center*. 14:233-58.

10. Bhattacharya, S. Singla, R. Dey, A.B. 1999. Dichotomy of Cytokine Profiles in Patients and High-Risk Healthy Subjects Exposed to Tuberculosis. *Infect. Immun.* 62(7):2673-77.

11. Taha, R.A. Kotsimbos, TC. Song, YL. 1997. IFN-gamma and IL-12 are increased in active compared with inactive tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 155(3): 1135-9.

12. Abbas, A. K. Lichtman A. H Pober, J. S. 1994. *Cellular and Molecular Immunology*. 2da ed. W.B. Saunder Company. A division of Harcourt Brace & Company. Pp:369-74.

13. Mustafa, A.S. Oftung, F. 1995. Cytokine production and cytotoxicity mediated by CD4+ T cells from healthy subjects vaccinated with *Mycobacterium bovis* BCG and from pulmonary tuberculosis patients. *Nutrition II Suppl.* 698: 701.

14. Orme I. M. 1998. The Immunopathogenesis of Tuberculosis: A new working hypothesis. *Trends In Microbiology*. 138:293.
15. Murray, Peter. 1999. Defining the requirements for immunological control of mycobacterial infections. *Trends In Microbiology*. 128:823-27.
16. Orme I.M. Alan R.D. Griffin J.P. and Abrams J.S. 1993. Cytokine production by Mycobacterium tuberculosis in MHC class II expression by monocytes activated with riminophenazine and phagocyte stimulants, *Clin. Exp. Immunol*, 100(39: 434-9).
17. Arce, M.A.Y. Villarreal, Lilith. Cinética de producción de citocinas proinflamatorias, Th1 y Th2 estimuladas con M. tuberculosis. En prensa.
18. Gerosa, F. Nisii, C. Stefano, R. 1999. CD4+ T cells Clones Producing both Interferon- γ and Interleukin-10 Predominate in Bronchoalveolar Lavages of Active Pulmonar Tuberculosis Patients. *Clin. Immun.* 100(3):434-9.
19. Douglas S. Robinson, Sun Yin. 1994. Evidence for a Th1-like Bronchoalveolar T-Cell subset and Predominance of Interferon-gamma gene activation in Pulmonary Tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 72:248-54.



DONATIVO

