

La infección con *Mycobacterium tuberculosis* incrementa la producción de óxido nítrico y TNF- α en macrófagos alveolares de contactos intradomiciliarios de pacientes con tuberculosis

CLAUDIA CARRANZA*
ESMERALDA JUÁREZ*
CARMEN SARABIA*
DANTE ESCOBEDO†
EDUARDO SADA*
MARTHA TORRES*✉

* Departamento de Investigación en Microbiología, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas (INER).

† Subdirección de Servicios Auxiliares de Diagnóstico y Paramédico Broncoscopia y Endoscopia (INER).

Trabajo recibido: 11-XII-2009; aceptado: 02-III-2010

Conflicto de intereses: ninguno

163

RESUMEN

Los contactos intradomiciliarios de pacientes con tuberculosis parecen ser una población protegida que desarrolla una memoria específica contra *Mycobacterium tuberculosis*. En este trabajo se evaluó la capacidad de los macrófagos

Palabras clave: Óxido nítrico, factor de necrosis tumoral, macrófagos alveolares, tuberculosis.

Key words: Nitric oxide, tumor necrosis factor, alveolar macrophages, tuberculosis.

alveolares de contactos intradomiciliarios y de sujetos controles de la comunidad para producir óxido nítrico (NO) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) en respuesta a la infección con *M. tuberculosis* cepas H37Ra (avirulenta) y H37Rv (virulenta). Nuestros resultados muestran que la producción de NO y TNF- α en los sobrenadantes de cultivos de macrófagos alveolares provenientes de controles intradomiciliarios se incrementó en los días 4 y 7. En contraste, la producción de NO y TNF- α fue menor en los macrófagos de los controles comunitarios. Estos resultados sugieren que la producción local de NO y TNF- α desempeña un papel importante en el control de la tuberculosis en individuos expuestos a la infección.

ABSTRACT

Household contacts of patients with tuberculosis seem to be a protected population that develops specific memory against *Mycobacterium tuberculosis*. In this work, alveolar macrophages from household contacts and control individuals from community were evaluated for their capability to produce nitric oxide (NO) and tumor necrosis factor alpha (TNF- α) in response to the infection with strains H37Ra (non-virulent) and H37Rv (virulent) of *M. tuberculosis*. Our results showed that production of NO and TNF- α in supernatants of alveolar macrophages cultures from household contacts increased on days 4 and 7. By contrast, NO and TNF- α production was lower in alveolar macrophages from community controls. These results suggest that local production of NO and TNF- α plays an important role in the control of tuberculosis in individuals exposed to the infection.

INTRODUCCIÓN

La tuberculosis (TB) continúa siendo uno de los principales problemas de salud a nivel mundial, siendo *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) el agente etiológico que la origina.¹ Los mecanismos de defensa en TB son altamente eficientes en humanos y sólo del 5 al 10% de los individuos infectados con *M. tuberculosis* desarrollarán tuberculosis pulmonar (TBp) activa, es decir, la forma latente de TBp es la que mayor incidencia tiene. Se ha reportado que aproximadamente el 75% de los individuos que han estado en contacto con pacientes con TBp, como son los contactos intradomiciliarios (CI) manifiestan una respuesta positiva PPD,² parecieran ser una población protegida que puede desarrollar una memoria específica contra *M. tuberculosis*.

Los macrófagos alveolares (MA) son la primera línea celular de defensa contra *M. tuberculosis*, poseen diferentes mecanismos efectores por medio de los cuales controlan el crecimiento de las micobacterias. Entre ellas se encuentran la fusión fagolisosoma, la generación de los intermediarios reactivos del oxígeno y la producción de los intermediarios reactivos del nitrógeno (IRN). Los MA también secretan citocinas, como el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) que inducen la producción de óxido nítrico (ON), uno de los principales mecanismos efectores con los que cuentan los MA contra *M. tuberculosis*; además, el TNF- α es producido por los MA y linfocitos T, éste está involucrado de manera compleja en el control de la infección, participa en la expresión de la enzima óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS), interviene en la migración celular, así como en la localización de *M. tuberculosis* en los tejidos, y promueve la formación, organización y mantenimiento del granuloma.³ La producción de ON por los MA es considerado un eficiente mecanismo de defensa contra patógenos intracelulares.

En modelos animales infectados con *M. tuberculosis* el ON es esencial en el control de la infección;^{4,5} en el ratón, los IRN participan en la protección, tanto en la fase aguda como en la fase crónica de la infección con *M. tuberculosis*. En modelos murinos han demostrado que al inhibir la expresión de iNOS o de óxido nítrico sin-

tetasa 2 (NOS2), la infección con *M. tuberculosis* persiste y llega a ser crónica.⁶

La importancia del ON y de otros IRN en la respuesta de defensa contra *M. tuberculosis* en humanos sigue siendo controversial. El desarrollo de TB en humanos no necesariamente está relacionado a la inhibición de la producción de ON, en individuos sanos los MA producen IRN en respuesta a la infección *in vitro* con *M. tuberculosis*. Asimismo, al inhibir NOS2 los MA infectados con el bacilo de Calmette Guérin (BGC) no limitan el crecimiento del bacilo y éste puede multiplicarse intracelularmente de manera normal;⁷ además, en los MA obtenidos de pacientes con TBp se ha detectado una alta expresión de NOS2, en adición a que los niveles de ON exhalado por pacientes se incrementan.^{8,9}

A pesar de que la producción de IRN es esencial para el control de la infección con *M. tuberculosis*, tanto en modelos animales como en humanos no se elimina completamente a las micobacterias, infiriendo que *M. tuberculosis* puede producir moléculas que contrarrestan los efectos bactericidas o bacteriostáticos de los IRN. No es de sorprender que el bacilo haya desarrollado estrategias complementarias para combatir la actividad micobactericida de los IRN que le permiten persistir dentro del macrófago, p. ej., inhibir la producción de citocinas, inhibir la fusión fagosoma-lisosoma, así como las características genéticas de virulencia.¹⁰ Los factores de virulencia tienen efecto directo sobre los mecanismos bactericidas de los MA. Los factores de alternancia llamados factores- σ están involucrados en la transcripción de un grupo de genes que incrementan los mecanismos en *M. tuberculosis* para evadir los efectos bactericidas de su hospedero.¹¹

El estudio de la TB en el pulmón con lavado bronquioloalveolar (LBA) ha servido para el entendimiento de la inmunopatogénesis de la enfermedad. Una de las metas de este estudio fue trabajar con los MA humanos obtenidos del sitio local de la infección, planteamos que la mayor capacidad de controlar el crecimiento de *M. tuberculosis* de los MA de los CI se asocia con la reciente exposición a *M. tuberculosis* e indica una respuesta efectiva para el control de la infección.

MATERIALES Y MÉTODOS

Grupos de estudio

Se incluyeron 13 CI de pacientes con TBp (6 hombres y 7 mujeres); 11 controles de la comunidad (CC [7 hombres y 4 mujeres]). Las edades fluctuaron entre los 18 y 60 años, la media de edad para ambos grupos fue de 33 años. Todos los sujetos fueron reclutados en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas (INER) donde se les informó sobre los estudios que se les realizarían y dando su consentimiento por escrito. El proyecto fue aprobado por el Comité de Ética del INER.

Criterios de inclusión. Para CI: individuos que vivieran en el mismo domicilio que el paciente con TBp, por lo menos haber estado en contacto directo y continuo con el paciente tres meses antes del diagnóstico del paciente índice; el paciente índice debía ser virgen al tratamiento antimicobacteriano, o bien no llevar más de dos semanas de tratamiento y contar con tres baciloscopias positivas. Los CC: no tienen historia de exposición a *M. tuberculosis*.

Los sujetos seleccionados no tenían síntomas clínicos ni radiográficos de TBp o alguna otra enfermedad respiratoria y todos fueron seronegativos para el virus de la inmunodeficiencia humana. A ambos grupos se les realizó estudios de laboratorio clínicos y se les aplicó la prueba intradérmica usando el derivado proteico purificado de *M. tuberculosis* (PPD).

Obtención de células bronquioloalveolares

A cada sujeto se le realizó LBA en el Servicio de Broncoscopia del INER. Las células bronquioloalveolares (CBA) fueron obtenidas del LBA. El LBA fue centrifugado a 1,200 rpm, por 15 min a 4 °C. Las CBA fueron resuspendidas a una concentración de 1×10^6 células/mL en medio de cultivo RPMI. Los MA fueron enriquecidos a partir de CBA utilizando eritrocitos de carnero.³ La viabilidad de los MA fue determinada con azul de tripano.

Infección de *M. tuberculosis* H37Ra y *M. tuberculosis* H37Rv en MA *in vitro*

En placas de cultivo de 24 pozos se colocaron 5×10^5 MA resuspendidos en RPMI por pozo, los MA se dejaron adherir toda la noche a 37 °C en 5% CO₂. Al día siguiente, los sobrenadantes se descartaron y los MA se infectaron a los MOI 0.1 y MOI 1 con *M. tuberculosis* H37Ra y *M. tuberculosis* H37Rv, respectivamente, durante 1 h a 37 °C en 5% CO₂. Los pozos fueron lavados tres veces para remover las bacterias no fagocitadas. Las células infectadas se incubaron por 1 h (día 0), 4 y 7 días (día 4 y 7) posinfección a 37 °C en 5% CO₂. Al término de los diferentes períodos de incubación se recolectaron los sobrenadantes para la determinación de ON y TNF- α .

Determinación de óxido nítrico

El ON se determinó en los sobrenadantes de los cultivos de los MA utilizando el método de Griess.¹² Se mezclaron 50 μ L del sobrenadante con 50 μ L del reactivo de Griess en una placa de cultivo de 96 pozos de fondo plano, se incubó en oscuridad durante 10 min. Se determinó la absorbancia a 550 nm en un lector de ELISA (ensayo inmunoenzimático absorbente [Labsystems Multiskan MCC/340, Labsystems, Finland]). Para la curva de referencia se utilizó nitrato de sodio. Las concentraciones de nitritos fueron expresadas en micromoles (μ M) después de sustraer el valor del medio RPMI como valor de fondo.

ELISA para TNF- α

En los sobrenadantes de los cultivos de los MA de los días 0, 4 y 7 se determinó la producción de TNF- α por medio de ELISA case-ro. Los sobrenadantes se incubaron en placas de ELISA recubiertas con IgG antiTNF- α , después se detectó con anticuerpo antiTNF- α biotilado y el sistema de detección estrep-toavidina-peroxidasa, sustrato de peroxidasa. Se utilizó una curva patrón de TNF- α humano recombinante y las concentraciones se expresaron en pg/mL.

Análisis estadístico

Se comparó la producción de ON entre ambas poblaciones utilizando la prueba U de Mann-Whitney, las comparaciones entre cepas y días posinfección se hicieron con la prueba de rangos de Wilcoxon y de Friedman. Se probó la correlación entre la producción de ON y TNF- α utilizando la ρ de Spearman. Para el análisis estadístico se utilizó el programa SPSS 14 (Mapinfo, NY).

RESULTADOS

La producción de ON por MA infectados con *M. tuberculosis* se incrementa a través del tiempo

Para evaluar si la infección con *M. tuberculosis* induce la producción de ON en el modelo humano, se midieron los niveles de ON en los sobrenadantes de cultivo de los MA infectados con *M. tuberculosis* H37Ra y *M. tuberculosis* H37Rv a través del tiempo, y en ambas poblaciones de estudio CI y CC.

Los resultados mostraron (Figura 1) que la concentración de ON producida por los MA de los CI aumenta con el tiempo de incubación. La concentración de ON para la infección con H37Ra fue 0.052, 2.65, 20.9 μ M; y con H37Rv, 0.5, 1.6, 164 μ M, en la razón de infección 0.1:1, para los días 0, 4 y 7, respectivamente.

En la razón de infección 1:1 con la cepa H37Ra, las concentraciones de ON fueron 2.1, 34.4, 204.1 μ M; y para la H37Rv, 1.45, 4.1, 99.1 μ M (día 0, 4 y 7). Los resultados mostraron que la producción de ON depende del tiempo posinfección, encontrándose diferencias significativas (Friedman $p < 0.005$) para ambas cepas y ambas dosis.

En el grupo de los CC, la producción de ON no se vio incrementada a través del tiempo y tampoco se observó un comportamiento diferente entre las cepas. Al comparar la producción de ON entre los CI vs. CC, se observó una diferencia significativa el día 7 con la cepa virulenta H37Rv en ambas relaciones de infección 0.1:1 y 1:1 ($p = 0.034$ y $p = 0.002$, respectivamente). En la infección con la cepa H37Ra en 0.1:1 se observó diferencia significativa entre los CI vs. CC

para el día 7 ($p = 0.001$) y en la relación de infección 1:1 en los días 4 y 7 ($p = 0.002$ y $p = 0.003$, respectivamente).

Producción de ON en respuesta a la infección con diferentes cepas de *M. tuberculosis*

No se observó una diferencia significativa en la producción de ON cuando se compararon entre cepas (Figura 2), pero hay una clara tendencia de mayor producción de ON en la infección con la cepa avirulenta para el día 7 en ambas relaciones de infección.

La producción de TNF- α por MA infectados con *M. tuberculosis*

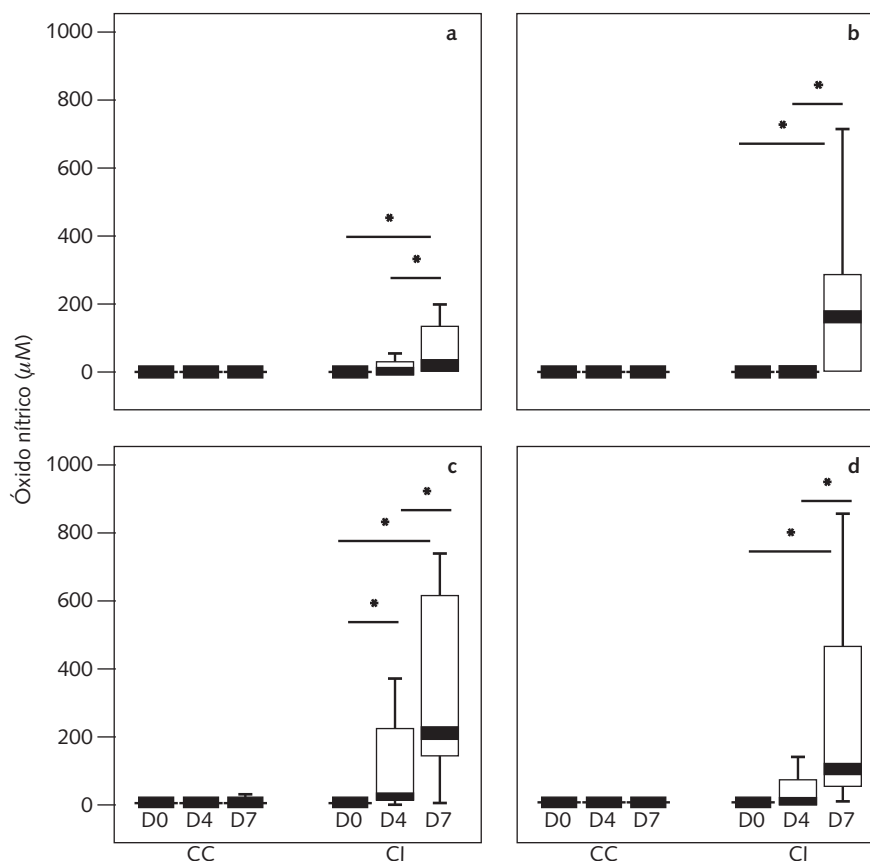
La producción de TNF- α por ambos grupos es diferente, es menor en los CC con respecto a los CI, al comparar ambos grupos se mostró una diferencia significativa ($p = 0.011$) en la infección con H37Rv en el día 4 (100 y 396 pg/mL, respectivamente). La producción en los CI es mayor en la dosis 1:1, pero no se encontró una diferencia significativa en la producción de TNF- α .

Al comparar el comportamiento de la producción de ON y de TNF- α , se encontró una correlación significativa entre ambas variables (ρ de Spearman 0.424, $p < 0.001$) (Figura 3).

DISCUSIÓN

A pesar de la capacidad de *M. tuberculosis* de sobrevivir y multiplicarse dentro de MA, sólo un pequeño porcentaje de las personas infectadas desarrollan la enfermedad y los mecanismos responsables de controlar la infección están pobremente caracterizados.

El resultado de la interacción entre los factores de virulencia de *M. tuberculosis* y los mecanismos iniciales de la respuesta inmune del huésped determinan el desarrollo de la TBp. En este trabajo abordamos ambos aspectos de la relación huésped-parásito utilizando dos cepas de *M. tuberculosis* con marcada diferencia en su virulencia y dos poblaciones de estudio: sujetos no expuestos a *M. tuberculosis* (CC) y de individuos que por su cercanía con pacientes con TBp se han



Los MA humanos producen ON en respuesta a la infección con *M. tuberculosis*.

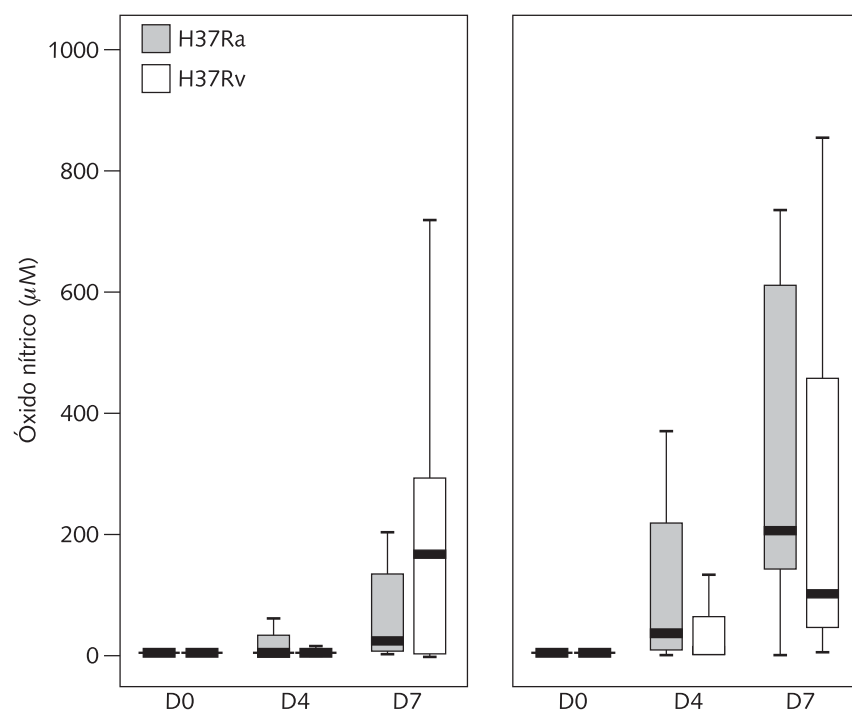
Figura 1. Las células de CC y CI de pacientes con TBp activa (CI) fueron infectadas con *M. tuberculosis* H37Ra (a y c) y H37Rv (b y d) en razón de infección 0:1 (a y c) y 1:1 (b y d). La concentración de ON se determinó por el método de Griess a los días 0, 4 y 7 posinfección. CI, n = 13; CC, n = 11; * p < 0.05.

considerado como un modelo humano que posee una respuesta inmune protectora específica hacia *M. tuberculosis* (CI).⁴ Tomamos este modelo para investigar el papel que juega el ON en la infección por *M. tuberculosis* en humanos, cuya función en los macrófagos murinos es crucial para la eliminación del patógeno pero en células humanas es controversial.^{13,14}

A todos los sujetos incluidos en el estudio les fue aplicado el PPD de acuerdo con la norma establecida por la Organización Mundial de la Salud. Se les administró subcutáneamente 0.1 mL de PPD, el cual contiene 5 TU (tuberculina). La reacción intradérmica fue medida a las 72 h, 8 de 13 CI y 3 de 11 CC fueron PPD+. Fue com-

parada la producción de ON y TNF- α en los grupos de estudio en función a su respuesta al PPD usando la prueba de Mann-Whitney. No se obtuvo una correlación entre la respuesta al PPD y la producción de ON y TNF- α , por tanto, las poblaciones se analizaron de manera conjunta.

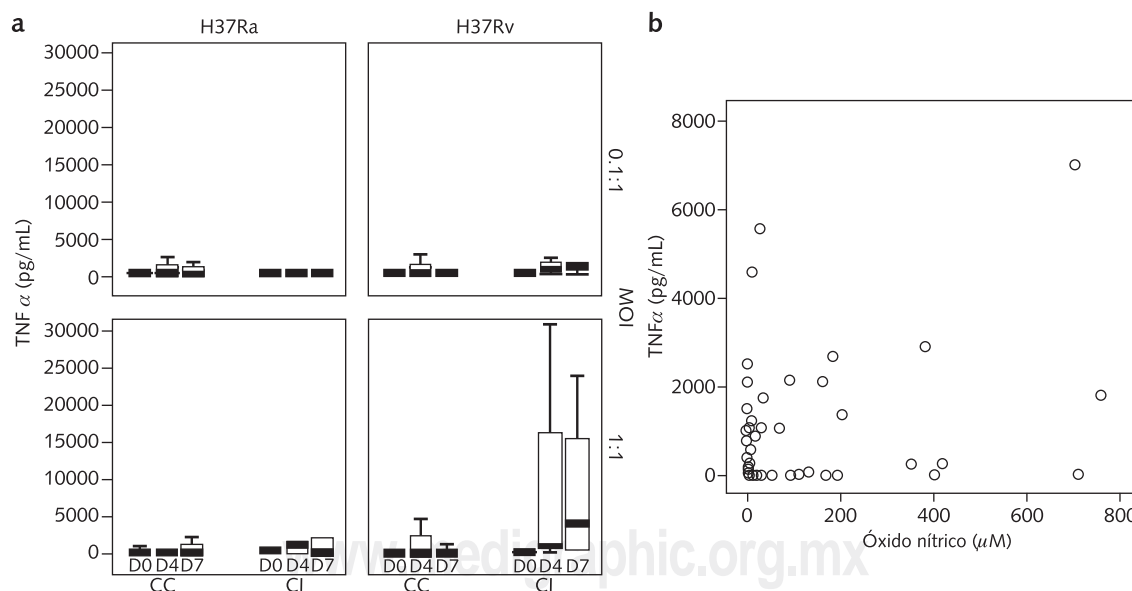
En este estudio se determinó el ON en los sobrenadantes de los cultivos de MA infectados con las dos cepas de *M. tuberculosis* de los CI y los CC en los días 0, 4 y 7 posinfección. Nuestros resultados muestran que los MA de los CI producen cantidades significativamente mayores de ON en respuesta a la infección con ambas cepas de *M. tuberculosis* en comparación con los MA del grupo control. Es posible que la diferen-



Producción de ON en respuesta a la infección con diferentes cepas de *M. tuberculosis*.

Figura 2. Se presenta la concentración de ON medida con el método de Griess a los días 0, 4 y 7 posinfección para el grupo de los CI a diferentes razones de infección; $n = 12$, * $p < 0.05$.

168



Producción de $\text{TNF-}\alpha$ por MA y su correlación con la producción de ON en respuesta a la infección con *M. tuberculosis*.

Figura 3. a) La concentración de $\text{TNF-}\alpha$ se determinó por el método de ELISA para los días 0, 4 y 7 posinfección en los sobrenadantes del cultivo de MA infectados con *M. tuberculosis* H37Ra y H37Rv. **b)** se muestra la correlación entre ON y $\text{TNF-}\alpha$. El ON fue cuantificado por el método de Griess de los mismos sobrenadantes de cultivo; $n = 84$ ($p = 0.424$, $p < 0.001$).

cia se asocie a un mayor número de linfocitos específicos en el espacio alveolar de los CI. Aunque el porcentaje de linfocitos presente en CC y CI es similar, el incremento en la producción de ON en los CI es un indicador de la activación por IFN γ y éste, a su vez, es un indicador de generación de inmunidad. En ratones inmunizados con *M. tuberculosis* y retados aerogénicamente con la cepa virulenta, los pocos linfocitos presentes en el pulmón (equivalentes a los de los ratones sin previa exposición a *M. tuberculosis*) son suficientes para producir, de manera temprana, pequeñas cantidades de IFN γ antígeno-específico e influir en la producción de ON.¹⁵ En los CI podría ocurrir este mismo fenómeno.

Nuestros resultados mostraron que la producción de ON en los sobrenadantes de los cultivos de MA de los CI fue ligeramente más alta en los cultivos infectados con la cepa no virulenta, que los infectados con la cepa virulenta, especialmente en la razón de infección 1:1. Estos resultados son similares a un reporte previo, donde la mayor inducción de ON por la cepa no virulenta (H37Ra) ya había sido descrita para células de sangre infectadas con *M. tuberculosis* de individuos sanos.¹⁶ Previamente, también se reportó que la infección con cepas atenuadas (como BCG y H37Ra) inducen apoptosis en los macrófagos infectados por un mecanismo dependiente de ON y TNF- α ; asimismo, observamos correlación entre la producción de ON y TNF- α en MA infectados con las diferentes cepas de *M. tuberculosis*. La cepa virulenta, es un inductor de moléculas antiapoptóticas como mecanismo de supervivencia.¹⁷ En nuestro estudio observamos que los MA de los CI producen ON en respuesta a la infección con H37Rv, para ello existen dos posibles explicaciones: a) la capacidad de respuesta de los MA de los CI se impone a los factores de virulencia de *M. tuberculosis*; y b) en términos de patogénesis este ON es irrelevante porque la cepa virulenta de *M. tuberculosis*, también puede impedir el tráfico de ON al fagosoma como mecanismo de evasión de la respuesta inmune.¹⁸

Serán necesarias futuras investigaciones para dilucidar el papel preciso que el ON juega en los MA humanos, considerando que la participación del ON en la eliminación de *M. tuberculosis* en células humanas es controversial¹⁹ y tomando en

cuenta las otras funciones atribuidas al ON en macrófagos murinos, como la regulación de la apoptosis, regulación del proceso inflamatorio y la restauración de la maduración fagosomal impedida por la cepa virulenta.²⁰⁻²²

CONCLUSIÓN

La constante exposición a *M. tuberculosis* induce la activación de los mecanismos innatos y adquiridos de la respuesta inmune a nivel pulmonar; por esta razón, los MA de los CI presentan una mayor capacidad de producir ON en respuesta a la infección por la cepa no virulenta como virulenta de *M. tuberculosis*. La respuesta innata y la respuesta adquirida contra *M. tuberculosis* en los humanos es muy compleja y toda la red de este sistema debe estar entrelazada para obtener el éxito que se observa al controlar la infección por *M. tuberculosis* en la mayoría de los sujetos infectados.

Limitaciones del estudio

El estudio en humanos es complicado por la variabilidad genética y las diferencias en las respuestas que ésta involucra. Estos factores no pueden ser medidos o controlados al trabajar con células humanas *ex vivo*, aun con criterios de inclusión y exclusión rigurosos como los que se utilizaron en este trabajo para la selección de los sujetos que participaron en el estudio. Adicionalmente, no se evaluó el impacto directo sobre la micobacteria y los mecanismos de señalización que permitan esclarecer el papel real del ON en las etapas iniciales de la infección.

REFERENCIAS

1. The World Health Organization. *Global Tuberculosis Control. Surveillance, Planning*. WHO report, 2004:7-9.
2. Grybowski S, Allen E. *The challenge of tuberculosis in decline*. Am Rev Respir Dis 1974;90:707-720.
3. Schwander S, Torres M, Carranza CC, et ál. *Pulmonary mononuclear cell responses to antigens of Mycobacterium tuberculosis in healthy household contacts of patients with active tuberculosis and healthy controls from the community*. J Immunol 2000;165:1479-1485.
4. Mohan VP, Scanga CA, Yu K, et ál. *Effects of tumor necrosis factor alpha on host immune response in*

- chronic persistent tuberculosis: possible role for limiting pathology.* Infect Immun 2001;69:1847-1855.
5. Giacomini E, Iona E, Ferroni L, et ál. *Infection of human macrophages and dendritic cells with Mycobacterium tuberculosis induces a differential cytokine gene expression that modulates T cell response.* J Immunol 2001;166:7033-7041.
 6. MacMiking JD, North RJ, LaCourse R, Mudgett JS, Shah SK, Nathan CF. *Identification of nitric oxide synthase as a protective locus against tuberculosis.* Proc Natl Acad Sci 1997;94:5243-5248.
 7. Scanga CA, Mohan VP, Tanaka K, Alland D, Flynn JL, Chan J. *The inducible nitric oxide synthase locus confers protection against aerogenic challenge of both clinical and laboratory strains of Mycobacterium tuberculosis in mice.* Infect Immun 2001;69:7711-7717.
 8. Nozaki Y, Hasegawa Y, Ichiyama S, Nakashima I, Shimokata K. *Mechanism of nitric oxide-dependent killing of Mycobacterium bovis BCG in human alveolar macrophages.* Infect Immun 1997;65:3644-3647.
 9. Wang CH, Liu CY, Lin HC, Yu CT, Chung KF, Kuo HP. *Increased exhaled nitric oxide in active pulmonary tuberculosis due to inducible NO synthase up-regulation in alveolar macrophages.* Eur Respir J 1998;11:809-815.
 10. Chan ED, Chan J, Schluger NW. *What is the role of nitric oxide in murine and human host defense against tuberculosis? Current knowledge.* Am J Respir Cell Mol Biol 2001;25:606-612.
 11. De Maio J, Zhang Y, Ko C, Young DB, Bishai WR. *A stationary-phase stress-response σ factor from Mycobacterium tuberculosis.* Proc Natl Acad Sci USA 1996;93:2790-2794.
 12. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. *Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids.* Anal Biochem 1982;126:131-138.
 13. Rich EA, Torres M, Sada E, Finegan CK, Hamilton BD, Tossi Z. *Mycobacterium tuberculosis (MTB)-stimulated production of nitric oxide by human alveolar macrophages and relationship of nitric oxide production to growth inhibition of MTB.* Tuber Lung Dis 1997;78:247-255.
 14. Nicholson S, Bonecini-Almeida Mda G, Lapa e Silva J, et ál. *Inducible nitric oxide synthase in pulmonary alveolar macrophages from patients with tuberculosis.* J Exp Med 1996;183:2293-2302.
 15. Jung YL, Ryan L, LaCourse R, North RJ. *Properties and protective value of the secondary versus primary T helper type 1 response to airborne Mycobacterium tuberculosis infection in mice.* J Exp Med 2005;201:1915-1924.
 16. Kim HC, Kim JH, Park JW, et ál. *Difference of nitric oxide production in peripheral blood mononuclear cells and airway epithelial cells between healthy volunteer and patients with tuberculosis.* Tubercul Respir Dis 1997;44:72.
 17. Lee J, Remold HG, Jeong MH, Kornfeld H. *Macrophage apoptosis in response to high intracellular burden of Mycobacterium tuberculosis is mediated by a novel caspase-independent pathway.* J Immunol 2006;176:4267-4274.
 18. Davis AS, Vergne I, Master SS, Kyei GB, Chua J, Deretic V. *Mechanism of inducible nitric oxide synthase exclusion from mycobacterial phagosomes.* PLoS Pathog 2007;3:e186.
 19. Aston C, Rom WN, Talbot AT, Reibman J. *Early inhibition of mycobacterial growth by human alveolar macrophages is not due to nitric oxide.* Am J Respir Crit Care Med 1998;157(6 Pt 1):1943-1950.
 20. Hortelano S, Través PG, Zeini M, Alvarez AM, Boscá L. *Sustained nitric oxide delivery delays nitric oxide-dependent apoptosis in macrophages: contribution to the physiological function of activated macrophages.* J Immunol 2003;171:6059-6064.
 21. Beisiegel M, Kursar M, Koch M, et ál. *Combination of host susceptibility and virulence of Mycobacterium tuberculosis determines dual role of nitric oxide in the protection and control of inflammation.* J Infect Dis 2009;199:1222-1232.
 22. Axelrod S, Oschkinat H, Enders J, et ál. *Delay of phagosome maturation by a mycobacterial lipid is reversed by nitric oxide.* Cell Microbiol 2008;10:1530-1545.

✉ **Correspondencia:**

Dra. Martha Torres Rojas,
Departamento de Investigación en
Microbiología. Instituto Nacional de
Enfermedades Respiratorias Ismael
Cosío Villegas. Calzada de Tlalpan
4502, colonia Sección XVI.
México, D.F.
Correo electrónico:
marthatorres98@yahoo.com

www.medigraphic.org.mx