

08351  
3



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

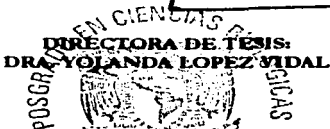
**POSGRADO EN CIENCIAS  
BIOLÓGICAS  
FACULTAD DE CIENCIAS**

COMPARACIÓN DE LA CAPACIDAD PROTECTORA DE  
SEIS SUBCEPAS DE *MBOVIS* BCG EN EL MODELO  
MURINO DE TUBERCULOSIS PULMONAR

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE:  
**MAESTRA EN CIENCIAS  
B I O L Ó G I C A S**  
(BIOLOGIA EXPERIMENTAL)

**P R E S E N T A :**  
**ANTONIA ISABEL CASTILLO RODAL**



MÉXICO, D.F.

MARZO DEL 2003.

COORDINACIÓN

A

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

# **PAGINACIÓN DISCONTINUA**



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
COORDINACIÓN**

Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez  
Director General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas  
UNAM a difundir en formato electrónico e imp  
contenido de mi trabajo recepc

NOMBRE: Castillo Rodal Isabel

FECHA: 6 marzo 2003

UNAM: [Firma]

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 3 de junio de 2002, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado de Maestría en Ciencias Biológicas (Biología Experimental) del alumno(a) Castillo Rodal Antonia Isabel, con número de cuenta 99809793, y número de expediente 3991080, con la tesis titulada: "Comparación de la capacidad protectora de seis subcepas *Mycobacterium bovis* BCG en el modelo murino de tuberculosis pulmonar.", bajo la dirección de la Dra. Yolanda López Vidal.

Presidente:	Dr. Eduardo Sada Díaz
Vocal:	Dra. Clara Inés Espitia Pinzón
Secretario:	Dra. Yolanda López Vidal
Suplente:	Dr. Alejandro Rafael Cravioto Quintana
Suplente:	Dr. Rogelio Hernández Pando

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Cd. Universitaria, D.F., a 2 de diciembre de 2002

*[Firma]*  
Dra. Tila María Pérez Ortiz  
Coordinadora del Programa

c.c.p. Expediente del interesado

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

13

**Esta tesis fue realizada en la Facultad de Ciencias, el Programa de Inmunología Molecular Microbiana en el edificio de Investigación de la Facultad de Medicina y el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y de la Nutrición "Salvador Zubirán" con el apoyo financiero de CONACYT proyecto G-38923 y apoyo de beca 130055**

**SUSTENTANTE: Dra. Antonia Isabel Castillo Rodal**

**Tutora Principal Dra Yolanda López Vidal  
Comité tutoral Dr. Alejandro Cravioto Quintana  
Dr. Eduardo Sada Díaz**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

C

## **AGRADECIMIENTOS**

**A Dios por darme la vida**

**A mis padres: Serafin e Isabel : por ese gran ejemplo a seguir**

**A Luis, Alejandra, Paola y Adriana verdaderos pilares para el desarrollo de este objetivo**

**A mi tutora y amiga Yolanda López Vidal**

**A todos los que participaron en la elaboración de éste proyecto**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

## CONTENIDO

	Página.
ABREVIATURAS.	iv
INDICE DE TABLAS.	v
INDICE DE FIGURAS.	vi
INDICE DE GRAFICAS.	vii
RESUMEN.	viii
INTRODUCCION.	1
Epidemiología.	2
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> .	6
Patogenia.	7
Vacuna BCG.	13
HIPOTESIS.	20
OBJETIVOS.	21
Objetivo general.	21
Objetivos particulares.	21
METODOLOGIA.	22
Cultivo de <i>M. bovis</i> BCG.	22
Curva de crecimiento de <i>M. bovis</i> BCG.	22
Animales de estudio.	23
Grupos de ratones y esquema de Inmunización.	23
Modelo murino experimental de tuberculosis pulmonar.	23
Hipersensibilidad de tipo tardía IV.	24
Sacrificio de ratones.	24
Preparación histológica.	24
Determinación de áreas neumónica	
Determinación y conteo de granulomas	
Análisis estadístico.	25

<b>RESULTADOS.</b>	<b>26</b>
Cultivo de <i>M. bovis</i> BCG.	26
Curva de crecimiento de <i>M. bovis</i> BCG.	27
Hipersensibilidad de tipo tardía IV.	27
Determinación de Unidades Formadoras de Colonias	29
Determinación de áreas neumónicas y de granulomas	30
Cortes histológicos	33
<b>DISCUSION.</b>	<b>35</b>
<b>CONCLUSIONES.</b>	<b>42</b>
<b>BIBLIOGRAFIA.</b>	<b>43</b>



## ABREVIATURAS

BCG	Bacilo de Calmette y Guerin
Cfp	Proteína filtrada de cultivo
CO <sub>2</sub>	Dióxido de Carbono
DO	Densidad óptica
DTH	Hipersensibilidad de tipo tardía
ESAT-6	Antígeno blanco de secreción temprana
IL	Interleucina
IFN $\gamma$	Interferón gamma
MIRU	Unidades repetidas interdiseminadas
mm	milímetros
ml	mililitros
<i>M.bovis</i>	<i>Mycobacterium bovis</i>
<i>M.tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
OMS	Organización Mundial de la Salud
ORF	Marco de lectura abierto
PBS	Amortiguador salino de fosfatos
PBD	Derivado proteico purificado
RD	Región deletada
RNA $\mu$	Ácido ribonucleico mensajero
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
SSI	Solución Salina Isotónica
TAES	Tratamiento acortado estrictamente supervisado
UFC	Unidades formadoras de colonias
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## INDICE DE TABLAS

	Página.
<b>Tabla 1.</b> Cuadro comparativo de modelo de ratón, cuyo y conejo de tuberculosis pulmonar.	10
<b>Tabla 2.</b> Cuadro cronológico en la investigación de tuberculosis pulmonar y vacunación.	11
<b>Tabla 3.</b> Diferencias Bioquímicas y genéticas de subcepas <i>M. bovis</i> BCG.	15
<b>Tabla 4.</b> Crecimiento de las subcepas <i>M. bovis</i> BCG por cultivo	27

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## INDICE DE FIGURAS

	Página.
<b>Figura 1.</b> Diagrama de Venn. Tuberculosis, infección con VIH y coinfección.	3
<b>Figura 2.</b> Incidencia mundial de tuberculosis, OMS 2000.	5
<b>Figura 3.</b> Genealogía histórica de <i>M. bovis</i> BCG incorporando diferencias genéticas de ausencia de genes previos y recientes.	17
<b>Figura 4.</b> Estudios clínicos controlados de la vacunación con <i>M. bovis</i> BCG. <i>Molecular Medicine Today</i> , 1999.	18
<b>Figura 5.</b> Cortes histológicos de pulmón.	33

## INDICE DE GRAFICAS

	Página.
<b>Grafica 1.</b> Curva de crecimiento de las diferentes subcepas <i>M. bovis</i> BCG.	26
<b>Gráfica 2.</b> DTH en el modelo murino de tuberculosis pulmonar.	28
<b>Gráfica 3.</b> Determinación de la carga bacilar en pulmón en los diferentes grupos de ratones inmunizados con las subcepas <i>M. bovis</i> BCG comparadas con el grupo control.	29
<b>Gráfica 4.</b> Determinación de la carga bacilar en pulmón entre los diferentes grupos de ratones inmunizados con las subcepas <i>M bovis</i> BCG	30
<b>Grafica 5.</b> Determinación del porcentaje de neumonía en los diferentes grupos de ratones inmunizados con las subcepas de <i>M. bovis</i> BCG.	31
<b>Grafica 5.</b> Determinación del porcentaje de granulomas en los diferentes grupos inmunizados con las subcepas <i>M bovis</i> BCG	33

## RESUMEN

La tuberculosis es una enfermedad contagiosa crónica, el agente causal es *Mycobacterium tuberculosis* y es la segunda causa de muerte a nivel mundial. La única vacuna existente en el mundo contra la tuberculosis es la vacuna de *M. bovis* Bacilo de Calmette y Guerin (BCG) que sufrió cambios genotípicos y fenotípicos, estas diferencias inmunogénicas son ausente en modelos animales que mimetizan la tuberculosis pulmonar del humano. **Objetivo:** Estandarizar y comparar la capacidad protectora de seis diferentes subcepas de *M. bovis* BCG en modelo murino de tuberculosis pulmonar. **Metodología:** Ratones Balb-C se inmunizaron vía subcutánea con dosis  $10^4$  y  $10^8$  ufc/ml, el reto fue con  $10^5$  ufc/ml vía intratraqueal con *M tuberculosis H37Rv* con dosis  $10^5$ . A los dos meses del reto se determinó la respuesta a hipersensibilidad de tipo IV y se sacrificaron los ratones para el estudio histológico y unidades formadoras de colonia. **Resultados:** La cinética de crecimiento in Vitro de cada subcepa BCG mostró para Frappier el menor y para la mexicana el mayor tiempo de crecimiento. La respuesta a hipersensibilidad de tipo tardía fue estadísticamente significativa al compararse con el grupo control, a excepción de la Phipps que fue menor. El menor número de unidades formadoras de colonias en pulmón la presentó el grupo vacunado con la subcepa Phipps ( $10^2$  UFC/ml) mientras que el mayor fue para la Tice ( $10^4$ UFC/ml). El grupo vacunado con la Frappier mostró una neumonía de 11.1%, Phipps 13.07%, Mexicana 21.17%, Sueca con 24%, Tice 37.9% y Moreau con el 47% y el grupo control con 85%. La presencia y tamaño de granulomas fue irrelevante a excepción del grupo Tice. **Conclusiones:** El modelo de ratón con infección intratraqueal fue la mejor elección para evaluar la protección generada por las diferentes subcepas BCG además de su reproductividad con la infección del humano. Los diferentes resultados de los parámetros evaluados mostraron la presencia de diferencias importantes entre las distintas subcepas *M. bovis* BCG no observándose relación entre los cambios genéticos descritos y grado de protección.

## INTRODUCCION

La tuberculosis es una enfermedad infecto-contagiosa crónica que altera gravemente y por largo tiempo la respuesta inmunológica, afecta a personas de todas las edades predominando en adultos jóvenes (30 a 50 años), que se encuentran en la etapa productiva de su vida, principalmente en países en desarrollo. La forma más común es la tuberculosis pulmonar aunque puede afectar otros órganos.

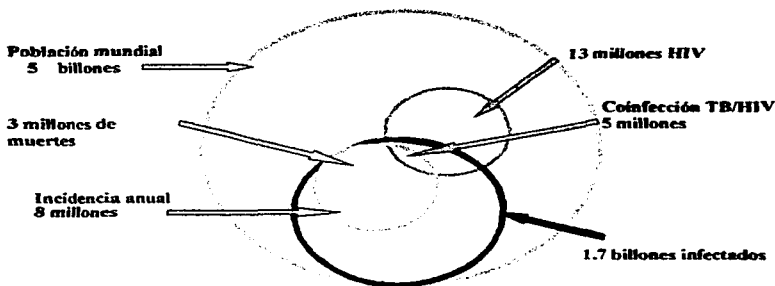
*Mycobacterium tuberculosis* es el agente causal de la tuberculosis en el hombre, se piensa que la enfermedad inició cuando el hombre se volvió sedentario y empezó su convivencia con los animales al momento de la domesticación. La aparición de las primeras ciudades aumentó la posibilidad de transmisión, aunque su comportamiento epidémico se dio en la industrialización de los países favorecida por las actividades grupales que mantenían condiciones de vida insalubres y deficientes, favoreciendo el contagio y disminuyendo la inmunidad.

Una vez identificado el agente infeccioso de la tuberculosis (1882) empezó la lucha para su tratamiento y erradicación, y a pesar de los esfuerzos de un gran número de países la tuberculosis sigue siendo un problema grave de salud a nivel mundial y es la segunda causa de muerte producida por un sólo agente bacteriano.<sup>1</sup>

Existen diversos factores que impiden el control y erradicación de la tuberculosis entre los que se encuentra la pobreza, el hacinamiento, la desnutrición, factores genéticos enfermedades inmunes, factores ambientales, y desarrollo de farmacorresistencia. La infección con el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) es un factor de riesgo muy importante para la tuberculosis ya que favorece la reactivación y/o evolución a tuberculosis activa con formas más graves, que debido a las condiciones del paciente dificulta el tratamiento y curación además del surgimiento de bacilos con resistencia primaria o secundaria a los antifímicos <sup>1,2</sup>

## Epidemiología

En 1991 Kochi realizó la estimación de la presencia de 7.6 millones de casos nuevos de tuberculosis en países en desarrollo y 400, 000 casos nuevos en países desarrollados obteniendo un total de 8 millones de casos nuevos de tuberculosis en el mundo correspondiendo el 95% de los casos a países en desarrollo y el 5% a países desarrollados. El mismo autor declaró en base a reportes de la OMS que una tercera parte de la población mundial (1.7 billones de personas) se encontraba infectada con *M. tuberculosis*. La OMS, en la misma época mostró que el mayor porcentaje de casos y muertes por tuberculosis ocurrieron en grupos con edades económicamente productivas, con promedio de edad entre 15 y 59 años, estimando que 3 millones de casos de tuberculosis y 450 000 de muertes ocurren en personas menores de 15 años de edad. La pandemia de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) incrementó la notificación de casos nuevos de tuberculosis de una manera alarmante convirtiéndose en el factor de riesgo mas importante para la progresión de la misma sobre todo en tuberculosis latente presentando un cálculo de mas de 5 millones de personas en el mundo con la coinfección (tuberculosis/SIDA). En este mismo año se estimó que el 4.6% de todas las muertes en el mundo, fue por tuberculosis así como el 4.2% de todos los casos de tuberculosis fueron atribuibles a su asociación con la infección de VIH. Estimaciones realizadas entre 1995 y 1999 por la OMS nos proporcionan un promedio anual de esta asociación del 3% global, 7% en Europa del este y 10% en países africanos.<sup>3,4</sup> Figura 1



**Figura 1. Diagrama de Venn. Tuberculosis, infección con VIH y coinfección. Clinical Infectious Disease (2000).**

El problema mundial ocasionado por la tuberculosis es tan grave que en 1993 la Organización Mundial de la Salud (OMS) la decretó en estado de emergencia global.

El objetivo principal de reportes epidemiológicos de tuberculosis en el año 2001 de la OMS de 211 países que implementaron la estrategia de tratamiento acortado estrictamente supervisado (TAES) para la erradicación de la tuberculosis, fue asegurar el progreso para la detección de casos nuevos de tuberculosis hacia el año 2005, así

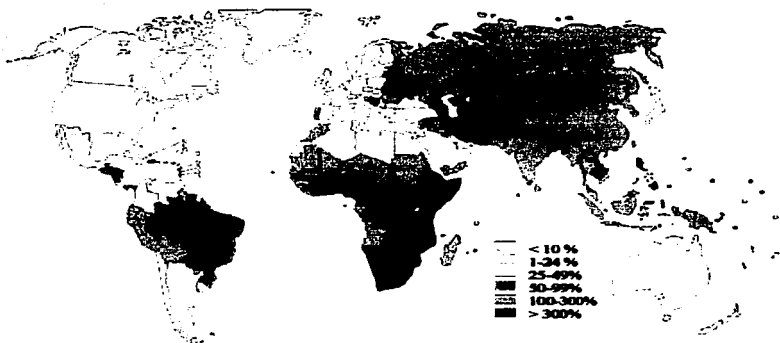


como alcanzar el 85% de éxito en los tratamientos anti-tuberculosos, además de la evaluación del impacto epidemiológico del diagnóstico y cura de gran número de pacientes.

En éste último reporte realizado en 1999 por la OMS, (5° reporte del control global de la tuberculosis) se estimó la existencia de 8.4 millones de casos nuevos y se espera que para el año 2005 se incrementará a 10.2 millones de casos nuevos debido a un aumento en la incidencia principalmente en países africanos que los más afectados por el SIDA.

La estimación realizada por la OMS de 1998 a 1999 reporta un aumento importante en el número total de casos de tuberculosis reportados con baciloscopías positivas de primera vez, (1.4 millones de casos nuevos reportados en los 2 años). Se presentó un incremento de 120, 000 casos nuevos de baciloscopías positivas cada año desde 1994. Tomando como base los reportes anteriores se estimó que para finales del año 2000 se acumularán 90 millones de casos nuevos de tuberculosis de los que 8 millones serán atribuibles a la infección por VIH y ocurrirán 30 millones de muertes en este mismo periodo incluyendo 2.9 millones atribuibles a la infección por VIH. (Figura 2).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



**Figura 2. Incidencia mundial de tuberculosis, OMS 2000.**

La morbilidad por tuberculosis en México es importante. En 1993 la Secretaría de Salud notificó la presencia de 15 145 casos con una tasa de 17.1 casos por 100 000 habitantes. Para el año de 1994 García ML y col<sup>1</sup> aplicando el modelo de historia natural de la enfermedad desarrollado por Miller y publicado por la OMS estimaron un total de 45 815 casos con una tasa de 51.7 casos por 100 000 habitantes proporcionando una tasa estimada del triple de la notificada. México en 1997 fue uno de los trece países considerados por la OMS como de alto riesgo para la tuberculosis. La tuberculosis en México se presenta como una infección pulmonar crónica en zonas marginadas y áreas urbanas. De acuerdo con la información proporcionada por la OMS, México ocupa el

lugar 142 en incidencia a escala mundial y el lugar 19 en la región Americana. La tuberculosis se encuentra en el lugar 17 como causa de muerte en el ámbito nacional y las tasas mas altas se encuentran en el grupo de mayor edad.<sup>2,6</sup>

El Análisis del Registro Nacional de Casos de SIDA en México en 1994 mostró que de los 19 352 casos notificados de SIDA desarrollaron tuberculosis el 8.3%. La frecuencia de SIDA y tuberculosis de pacientes con SIDA realizada en dos hospitales de la Ciudad de México, se presentó entre 25 y 27% de las autopsias realizadas de 1984 a 1989.<sup>2</sup>

### ***Mycobacterium tuberculosis***

Miembro del orden Actinomyceto y perteneciente a la familia Mycobacteriaceae. *M. tuberculosis* es un bacilo aeróbico obligado de 0.2 a 0.6 micras de ancho y de 1 a 6 micras de largo. *M. tuberculosis* es una bacteria grampositiva con tinción irregular, no forma esporas, no presenta flagelos ni cápsula. Su pared celular compleja separada de la membrana celular por el espacio periplásmico presenta cuatro capas. La mas interna es el glicopéptido o peptidoglicano con moléculas de N-acetilglucosamina y ácido N-glucorilmurámico, con cadenas cortas de alanina formando el esqueleto de la bacteria que le da forma y rigidez. Otra capa está compuesta por polímeros de arabinosa y galactosa, la tercera capa formada por ácidos micólicos (ácidos grasos derivados), y la última capa, la superficial formada por lípidos como los sulfolípidos, el factor cordón denominado así por su aparente asociación por la forma acordeonada con que se agrupan las micobacterias virulentas, y los micósidos (glicolípidos). Estas paredes la protegen de medio ácido, alcalino o seco; y la complejidad de la pared le confiere la propiedad de adquirir la tinción ácido – alcohol- resistente que identifica a estos organismos (BAAR), retiene el colorante básico sin decolorarse con alcohol ácido, las paredes favorecen su sobrevivencia, estimulan el disparo de la respuesta inflamatoria del huésped ya que son altamente inmunogénicas.<sup>7,8</sup> *M. tuberculosis* tiene un genoma formado por 4 411,529 pares de bases con un 65% de contenido en G-C.

Más de 53 especies micobacterianas descritas y cuando menos 27 aisladas en entidades clínicas humanas, aunque el 95% de los casos de tuberculosis son causadas por las especies pertenecientes al complejo tuberculosis (*M. tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium bovis* BCG, *Mycobacterium africanum* y *Mycobacterium microti*).

Las micobacterias se dividen por su crecimiento en dos grandes grupos: a) de crecimiento lento y b) de crecimiento rápido. Siendo el primero el que agrupa la mayoría de las micobacterias patógenas en humanos y animales, mientras que; las de crecimiento rápido incluyen especies no patógenas como *M. smegmatis*.<sup>8</sup> *M. tuberculosis* es de crecimiento lento (2 a 3 semanas) lo que contribuye a la naturaleza de la enfermedad, con un tiempo de generación en medio sintético de alrededor de 24 h.

## Patogenia

El bacilo tuberculoso puede infectar cualquier parte del cuerpo, la forma más común de infección es por inhalación de pequeñas partículas o núcleos de microgotas que son expulsados por el enfermo tuberculoso y contiene bacilos viables. Los bacilos inhalados llegan a los alvéolos en donde los macrófagos alveolares residentes, primera defensa que el bacilo encuentra en el organismo, pueden destruirlos inmediatamente por mecanismos bactericidas propios de los macrófagos<sup>7,9</sup>, cuando estos mecanismos fallan ya sea por la capacidad del microorganismo para evadirlos, ó la incapacidad de respuesta del huésped para destruir los bacilos fagocitados pueden seguir dos vías; los macrófagos no eliminan los bacilos, se multiplican ilimitadamente en pocos días dentro del macrófago hasta que la célula muere y las bacterias liberadas son ingeridas por otros macrófagos repitiéndose este proceso hasta formar la lesión primaria en donde interviene la replicación del organismo y la implantación del sitio inicial de la infección pulmonar con la formación de pequeños granulomas estableciéndose focos de infección

latentes en diversos sitios del organismo, esta fase casi siempre es asintomática y son controladas la replicación y diseminación del microorganismo sin poder ser erradicado y se mantiene en estado de latencia en un equilibrio en el que se replica activamente pero es eliminado por la respuesta inmune o metabólicamente alterado con ciclos replicativos limitados o infrecuentes en donde la única evidencia clínica de la infección por *M tuberculosis* es la hipersensibilidad de tipo tardío. Cuando *M tuberculosis* no es controlado invade el torrente linfático y sanguíneo diseminándose como una infección pulmonar primaria clínicamente aparente produciendo otros focos infecciosos pulmonares o extrapulmonares; presentándose esta fase en la minoría de pacientes infectados (5 a 10%).<sup>10</sup>

Las principales vías que usa el macrófago para inhibir el crecimiento de *M. tuberculosis* es la fusión fago-lisosoma, la generación de intermediarios de oxígeno y la producción de intermediarios de nitrógeno. Dentro de los mecanismos que usa el bacilo para evitar ser fagocitado se encuentra la evasión de la fusión fago-lisosoma, evasión del efecto tóxico de los intermediarios del oxígeno reactivo e interacción de diferentes componentes micobacterianos con diferentes miembros de la familia TLR.<sup>12</sup>

Cuando se rompe el equilibrio entre el patógeno y el hospedero se desarrolla la infección, presentándose principalmente en el pulmón, ésta infección, da como consecuencia un proceso inflamatorio pulmonar con neumonía, formación de granulomas, fibrosis y necrosis, resultado de una respuesta inmune con interacción entre diferentes poblaciones celulares que secretan citocinas y quimocinas que dirigen hacia una inmunidad mediada por células, demostrándose su importancia en la defensa del huésped contra *M. tuberculosis*, aunque se generan anticuerpos contra productos micobacterianos, hasta la fecha no existen evidencias de su importancia clínica.<sup>9</sup>

La única evidencia clínica de infección por *M. tuberculosis* es la respuesta de hipersensibilidad de tipo tardío contra antígenos micobacterianos demostrado por la presencia de una prueba positiva de tuberculina o PPD<sup>11</sup>.

Estudios realizados en humanos y en el modelo animal muestran que, las células que participan en la defensa del huésped son los macrófagos, las células T CD4<sup>+</sup> y T CD8<sup>+</sup> existiendo evidencias tanto en humanos y en animales que las células T presentan dos fenotipos: Th1 y Th2 diferenciables por el tipo de citocinas secretada. La característica principal de las células Th1 es la producción de Interferon gamma (IFN $\gamma$ ), citocina clave para la inmunidad protectora contra *M. tuberculosis*, interleucina-2 (IL-2) e IL-12. Las células Th2 secretan las interleucinas 4, 5 y 10 que no han mostrado un papel preponderante en la inmunidad protectora del huésped contra la tuberculosis.

La respuesta inmune de tuberculosis pulmonar en humanos es incierta y muestra un amplio espectro de manifestaciones que reflejan el balance entre los factores de virulencia producidos por la bacteria invasora y la respuesta inmune del huésped. Las investigaciones que existen de tuberculosis en humanos se basan en pacientes con tuberculosis pulmonar avanzada o contactos PPD positivos sanos, utilizan un gran número de muestras de sangre periférica, lavados bronquiales y raramente de la lesión.

Diversos autores describen alteraciones en el balance de las citocinas de células T sin evidenciar una división clara entre la respuesta Th1 y Th2 contrario a lo que sucede en el modelo animal en donde hay una tendencia clara hacia la respuesta TH1 o Th2. En 1995 P. Barnes y col observaron en células mononucleares de sangre periférica de individuos sanos PPD positivos y paciente con tuberculosis recientemente diagnosticados por expectoración positiva la cuantificación de RNA mensajero de citocinas y concentración de las mismas, la producción y expresión de RNAm de las citocinas Th1 en células mononucleares de sangre periférica de pacientes con tuberculosis se encontraron disminuidas sin presentar cambios en la producción de la expresión de RNAm de las citocinas Th2 <sup>17</sup>

Doris Tse y col observaron en muestras obtenidas por lavado broncoalveolar la presencia de células T ayudadoras que mostraron moléculas de superficie asociadas a

etapas tempranas y tardías (DC29, CD45RA y CD45RO), sin presentar diferencia entre los marcadores de zonas sanas y con lesión, sin embargo; estos marcadores se encontraron disminuidos en sangre periférica <sup>18</sup>, Lukey y col. encontraron la presencia del RNAm para el TNF $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e IL-4 con producción elevada en granulomas tuberculosos sin necrosis caseosa, los pacientes que presentaban necrosis caseosa mostraron escasa presencia de IFN- $\gamma$  e IL-4<sup>19</sup>.

Ante la imposibilidad de reproducir en el humano los mecanismos inmunogénicos desencadenados por *M. tuberculosis* se han ensayado varios modelos experimentales en animal (Tabla 1), la infección reproducible de tuberculosis pulmonar que semeje las condiciones humanas es una labor difícil, desde 1950 diversos modelos de tuberculosis experimental han permitido conocer diferentes eventos de la patogenia (Tabla 2).<sup>13,14</sup>

**Tabla 1.** Cuadro comparativo de modelo de ratón, cuyo y conejo de tuberculosis pulmonar.

Cuadro de la enfermedad	huésped humano	modelo animal experimental		
		ratón	conejo	cobayo
Susceptibilidad a MTb	++	+	+	+++
Diseminación extrapulmonar	++	++	++	++
Diseminación a lóbulos apicales	++	?	?	++
Granulomas (cel mononucleares)	++	++	++	++
Necrosis caseosa	++	-	++	++
Licuefacción/cavitación	++	-	++	-
DTH	++	+/-	++	++
Protección por vacuna BCG	++/-	+	++	++
Requerimiento de espacio	NA	+	+++	++
Costo de mantenimiento	NA	+	++++	++
Reactivos inmunológicos	++++	++++	++	+

+ escaso, ++ medio, +++ moderado, ++++ abundante, NA no aplicable, ? se desconoce.

**Tabla 2. Cuadro cronológico en la investigación de tuberculosis pulmonar y vacunación.**

<b>AUTOR</b>	<b>AÑO</b>	<b>ESTUDIO</b>
R. Koch	1882	Aisó el bacilo de la tuberculosis
Calmette y Guerin	1921	Vacuna originada de una cepa viva atenuada derivada de <i>M bovis</i>
Middlebrook	1952	Desarrollo de la cámara de aerosol para la infección con tuberculosis
Mitchison	1964	Virulencia del bacilo tuberculoso en ratón proveniente de pacientes tuberculosos
Mackness	1970	Interacción entre ICM y activación del macrófago
Smith DW	1970	Eventos tempranos en la infección de cobayos vacunados y no vacunados
Dannenber	1975	Eventos fundamentales en el desarrollo de la inmunidad y DTH
Harding GE	1977	Influencia de la vacunación con BCG en tuberculosis pulmonar
Ho RS Smith	1978	Búsqueda del bacilo tuberculoso en focos metastásicos en pulmón
ten Dam	1982	Patogénesis de la tuberculosis y la efectividad de la vacuna

utores que trabajaron recientemente en modelo animal, usando la vía de infección que sucede normalmente en la tuberculosis pulmonar (intratraqueal), con la micobacteria que produce tuberculosis en el humano (*M tuberculosis* H37Rv) y la dosis adecuada para estudiar la evolución normal de la tuberculosis en ratón, es el grupo del Dr. Hernández-Pando, además investigaron en el modelo el balance de la respuesta inmune Th1-Th2, determinaron en función de tiempo, dosis, expresión genética de citocinas, distribución histológica de linfocitos y la respuesta de anticuerpos específicos. La evolución de la patología pulmonar la dividió en dos fases. La primera fase o Th1 del día 1 al 28, se caracterizó en los cortes histológicos por la presencia de infiltrado inflamatorio peribronquial, perivascular y presencia de macrófagos en el lumen alveolar; en esta misma fase el perfil inmunológico mostró mediante PCR la presencia de IL-2, IFN $\gamma$  e IL-12. Los estudios de citometría de flujo en lavado bronquial mostraron elevada cantidad de macrófagos así como de células CD4 $^{+}$ . La segunda fase o Th2 (fase crónica) empezó el día 28 y finalizó a los 4 meses de la infección observándose infiltrado



inflamatorio intenso, extensas áreas neumónicas, abundantes granulomas y fibrosis, la presencia de IFN gamma e IL-4; títulos altos de anticuerpos IgG1 e IgG2. Es un modelo experimental de tuberculosis disponible que usa una ruta natural de infección con *M. tuberculosis* H37Rv, y el bacilo se aloja preferencialmente en el pulmón.<sup>15,16</sup>

Diversos componentes del sistema inmune se necesitan para el desarrollo de una buena inmunidad protectora. Además de la mencionada respuesta Th1 y la formación del granuloma, huella típica de la tuberculosis. La formación del granuloma alrededor de un macrófago infectado es secundario a una respuesta celular eficaz a la infección por *M. tuberculosis*. El granuloma está formado por láminas de matriz extracelular que encierra un micro-ambiente de células infectadas y un intenso infiltrado inflamatorio, su función es evitar la diseminación del bacilo así como proteger los tejidos adyacentes de una respuesta inflamatoria destructiva. La ausencia del granuloma hace que la infección micobacteriana se disemine ampliamente y la enfermedad sea letal.<sup>20</sup>

Actualmente, se conoce gran parte de la patogénesis y la regulación de la respuesta inmune apoyada tanto en modelos animales experimentales como en estudios realizados en humano lo que ha permitido clasificar a los componentes de *M. tuberculosis* en factores de virulencia, importantes inmunógenos y estructuras bacterianas relevantes para la sobrevivencia; así como también la regulación de la respuesta inmune en los diferentes estadios de la enfermedad tuberculosa.

Con todo este conocimiento obtenido de la respuesta inmune secundario a la infección por tuberculosis, y a partir de la declaración de la OMS en 1995 se cuenta con gran avance en el área y permite retomar medidas preventivas más eficaces en el combate a la tuberculosis como son las vacunas.

## Vacuna BCG

La vacuna BCG liofilizada es la única vacuna que existe en el mundo contra la tuberculosis, está constituida por bacilos vivos y atenuados. *M. bovis* BCG desarrollada en 1921 por Calmette y Guérin, en un lapso de 13 años a partir de un aislamiento de *M. bovis* con más de 230 subcultivos en medio de glicerol, papa e impregnado con sales biliares; al término de este tiempo se observó pérdida de virulencia de la micobacteria evidenciado en la patología del modelo animal en estudio. Desde su introducción para uso clínico como vacuna, la cepa original se distribuyó a diferentes países del mundo y cada laboratorio trabajó su propia vacuna BCG pero la carencia de métodos de preservación y la necesidad de conservar mayor número de subcultivos originó diferencias en ciertas características de las subcepas como en su estructura antigénica, en la presencia de ácidos micólicos ó en la secreción del perfil proteico entre otros. De los trabajos mas recientes referentes a diferencias importantes en las subcepas BCG se encuentra el de G. Mahairas y K. Stover<sup>24</sup> quienes usaron hibridación genómica para determinar grado de diversidad genética entre las cepas *M. bovis* BCG no virulenta, *M. bovis* virulenta y *M. tuberculosis*, así como de los miembros relacionados cercanamente al complejo *M. tuberculosis*. En la diversidad genética se encontró: una región genómica (RD3) con 9.3kb cuyo origen no es claro en cepas de laboratorio de *M. bovis* y *M. tuberculosis* pero ausente en la gran mayoría de los aislados clínicos así como ausente en todas las subcepas BCG estudiadas. La presencia de (RD2), segmento de ADN de 10.7 kb contiene un elemento repetitivo nuevo y el gen *mpt64*, previamente identificado; se encontró presente en todas las cepas de *M. tuberculosis* y de *M. bovis* virulenta probadas y ausente solo en las subcepas originadas de la BCG Pasteur después de 1925, este gen es responsable de la regulación de algunas proteínas entre ellas MPB64. La región cromosomal (RD1) estuvo presente en todas las cepas de aislados clínicos de *M. tuberculosis* y cepas de laboratorio virulentas (H37Rv y Erdman) pero ausente en todas las subcepas BCG estudiadas. La región RD1 codifica para la proteína ESAT-6 y siete marcos de lectura abiertos de los cuales uno puede ser el gen regulador. La reintroducción de RD1 expresó fuertemente diez proteínas y reguló la expresión de otras

observado en estudios de geles de poli-acrilamida de doble dimensión; genes reporteros indican que varias de estas proteínas pueden ser proteínas de estrés o de choque térmico.

Magdalena J y Loch C puntualizaron diferencias específicas entre *M bovis* BCG y cepas virulentas del complejo *M tuberculosis* desarrollando un método de PCR basado en la región intergénica denominada *Sen X3-RegX3*, región específica para las cepas del complejo *M tuberculosis*, esta región intergénica contiene unidades repetidas interdiseminadas (MIRU). Las cepas del complejo *M tuberculosis* presentan dos tipos de secuencias repetidas nuevas una de 77pb y una de 53pb en la región intergénica *SenX3-regX3IR*, mientras que, las diferentes subcepas BCG estudiadas solo presentaron un tipo de secuencia repetida nueva en la región *SenX3-regX3IR* (MIRU 77pb) y el número de copias presente en las subcepas BCG varía entre ellas por lo que se pueden clasificar en tres diferentes grupos en base al tamaño de los productos de PCR conteniendo 3, 2 o un MIRU de 77pb. Sin embargo no existe evidencia de relación entre el número de copias de MIRU y persistencia e inmunogenicidad de las cepas.

La caracterización de las exoquelinas, (sideróforos que toman el hierro unido a las proteínas para uso propio) presentes en las diferentes subcepas BCG, *M bovis* y *M tuberculosis* realizada por Govin y Hortwitz mostraron que la mayoría de exoquelinas se encontraron en *M. tuberculosis* y en *M. bovis* aunque con diferencia en su producción, presentándose en mayor cantidad en 2 cepas de *M. tuberculosis*, en cantidades intermedias en *M. bovis* virulenta y producción muy escasa en 5 cepas de *M. bovis* BCG.

En 1999 Oettinger, realizó una revisión histórica basada en la literatura, así como en los últimos conocimientos genéticos, antigénicos y resultados obtenidos de su laboratorio en diferentes subcepas BCG mostrando diferencias genéticas y proteicas. La ausencia de la región RD1 que incluye el gen ESAT-6 y *cfp10* que codifican la proteína de 10 kDa en el mismo operón está ausente en todas las subcepas BCG por lo que indica un evento temprano que sucedió antes de 1924/25, la región RD2 ausente en

algunas subcepas obtenidas del Instituto Pasteur después de 1926 que afectaron los genes *mpb64* y *cfp21* clasifican a las subcepas BCG en tempranas y tardías; aunque, la producción de la proteína *mpb70* también las clasifica en productoras altas y bajas de la proteína *mpb70*.

Estudios genéticos usando una sonda sobre la secuencia de inserción IS6110 muestran que todas las subcepas tempranas (antes de 1926) tienen dos copias de esta secuencia mientras que las subcepas tardías sólo presentan una.

Tabla 3.

**Tabla 3. Diferencias Bioquímicas y genéticas de subcepas *M. bovis* BCG.**

Subcepas	Explotación y años	IS6110	Gen/proteína <i>cfp10/ESAT 6</i>		Gen/proteína <i>mpb64/fpb2</i>		Gen/proteína <i>mpb70</i>		Gen/proteína <i>mpb51</i>	
<i>M. bovis</i>		1-6	+	+	++	+	+	+	+	+
<i>M. bovis</i> BCG		2	-	-	+	+	+	+	+	+
Moreau	1924	2	-	-	+	+	+	+	+	+
Tokio	1925	2	-	-	+	+	+	+	+	+
Gotemburgo	1926	1	-	-	+	+	+	+	+	+
Danesa	1931	1	-	-	+	+	+	(+)	++	+
Tice	1934	1	-	-	+	+	+	(+)	++	+
Montreal	1937	1	-	-	+	+	+	(+)	++	+
Glaxo	1954	1	-	-	+	+	+	(+)	++	+
Pasteur	1961	1	-	-	-	-	+	(+)	++	+

Estudios bioquímicos del patrón de ácido micólico de diferentes subcepas BCG muestra que las subcepas tempranas y tardías se diferenciaron sobre las bases de su estructura lipídica ya que las subcepas BCG Gotemburgo, Moreau y Tokio evidenciaron la presencia de metoximicolatos mientras que las subcepas BCG Danesa, Glaxo y Pasteur

Behr y col. en 1999, por medio de una filogenia histórica relató el lugar, el año y el nombre de las diferentes subcepas BCG distribuidas a diferentes países y observó una relación estrecha entre estos resultados y las huellas dactiloscópicas moleculares realizadas a las mismas subcepas BCG. Las observaciones reportadas coincidieron con las obtenidas por otros investigadores verificando la micro evolución genética de las subcepas BCG y confirmando que los genes ausentes en las diferentes subcepas fueron secundarios al mantenimiento de las mismas en los diferentes laboratorios del mundo. La reciente determinación de la secuencia genómica completa de *M. tuberculosis* H37Rv (Nature 1999) proporcionó un marco de lectura para el análisis genómico de las diferentes subcepas BCG por lo que los experimentos de hibridación comparativa sobre microarreglos de DNA tomando como referencia la cepa *M. tuberculosis* H37Rv mostraron la ausencia de 11 regiones en las cepas virulentas de *M. bovis* y cinco regiones ausentes adicionales en algunas de las subcepas BCG, es decir 16 regiones ausentes en total en las diferentes subcepas. Comparando los genes ausentes de todas las vacunas BCG con *M. bovis* se observó que la ausencia de la región RD1 probablemente sucedió entre 1908-1921, la ausencia de RD2 se presentó en el Instituto Pasteur entre 1927 y 1931, la ausencia del gen RD14 era específico de la BCG Pasteur indicando un evento posterior de la BCG Pasteur 575 y antes de la era de la liofilización de la BCG Pasteur 1173 en 1961.

La pérdida del gen RD8 en la subcepa BCG Montreal (1937-1946) y del gen RD16 en la subcepa BCG Uruguay o Brasil (después de 1925) indican que la evolución de las subcepas BCG por la pérdida de estos genes ocurrieron fuera del Instituto Pasteur. (Figura 3) Behr y col analizaron las funciones de 38 ORFs ausentes en las

subcepas BCG y encontraron que ninguno de los ORFs presentes en *M. bovis* pero ausentes en *M. bovis* BCG fueron clasificados virulentos, lo que refleja una adaptación progresiva de las subcepas BCG a las condiciones de los laboratorios y comprometieron su capacidad para sobrevivir dentro del huésped al mismo tiempo que comprometieron su capacidad para estimular una respuesta inmune duradera.

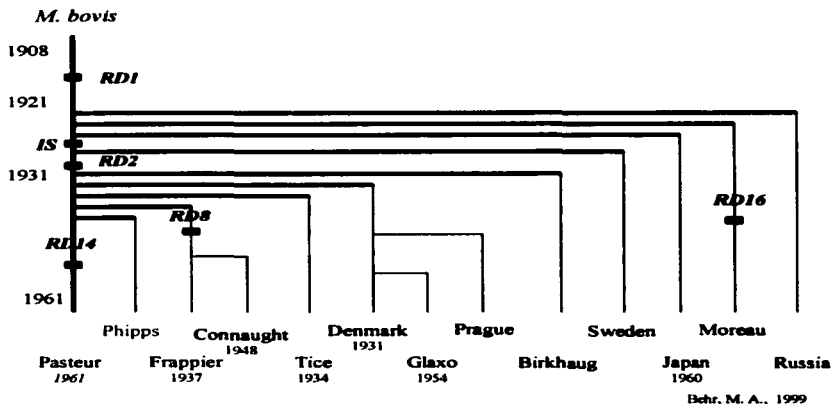
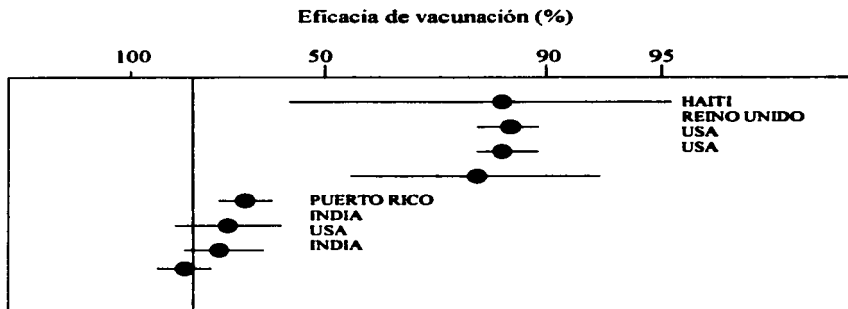


Figura 3. Genealogía histórica de *M. bovis* BCG incorporando diferencias genéticas de ausencia de genes previos y recientes.

El mercado Internacional cuenta con diversas vacunas BCG desarrolladas de las subcepas BCG Glaxo 1077, BCG Tokio 172 y Pasteur 1173P2 Danesa 1331 y Moreau.

La eficacia protectora de la vacuna BCG evaluada en un meta-análisis de vacunación en humanos en diferentes regiones del mundo, mostró que de los 10 estudios controlados de vacunación con BCG en las diferentes regiones se determinó un intervalo muy amplio en la protección, regiones como el sureste de Estados Unidos o el sur de la India no presentaron protección mientras que en Inglaterra o Haití la protección fue del 80%<sup>28</sup> (Figura 4)



**Figura 4.** Estudios clínicos controlados de la vacunación con *M. bovis* BCG. Molecular Medicine Today, 1999.

A pesar de que la vacuna BCG es ampliamente usada en el mundo la incidencia y prevalencia de la tuberculosis aumentó, probablemente por su interacción con la pandemia del virus de la inmunodeficiencia adquirida (VIH), así; como al aumento en la farmacoresistencia.

Se estima que más de un billón de personas están vacunados con BCG, su producción es fácil, económica e inocua y su administración evita la forma mas grave de tuberculosis (meningitis), así como reducción en el riesgo de contraer tuberculosis

pulmonar en un 50%. También se ha observado que el refuerzo efectivo de la respuesta inmune contra la infección limita sus efectos en la reactivación y la infección latente es decir la protección de la vacuna después de 10 o 15 años es mínima o inexistente.

Actualmente, la vacuna BCG se aplica en los países en desarrollo a los infantes durante el primer año de vida, mientras que en los países desarrollados solo se usa cuando se presenta una conversión positiva a la prueba de intradermo reacción a la tuberculina ( PPD).

Evaluar el impacto de la vacuna BCG en su totalidad no ha sido posible por los múltiples factores que la acompañan; entre estos; las diferencias genotípicas de cada una de las subcepas, diferencias en la eficacia protectora realizadas en un meta-análisis en el mundo, diferencias en la prevalencia de infecciones con micobacterias del medio ambiente (P. Andersen 2002)<sup>27</sup>, probables mecanismos inmunológicos diferentes en periodos diferentes de la enfermedad y/o diferencias fisiológicas o genéticas entre las poblaciones en estudio.

Para evaluar la eficacia de la vacuna BCG deberán utilizarse diferentes criterios, el estudio experimental se debe realizar en un modelo animal que semeje la enfermedad del humano <sup>28</sup>, la vacuna seleccionada debe estar viva pero atenuada ya que induce mayor protección contra la infección (M. Chambers y D. Young 1996),<sup>29</sup> la vía de vacunación (subcutánea)<sup>28,30</sup>, debe inducir respuesta inmune de memoria y la vía de infección (aérea) debe ser como normalmente ocurre en el hombre <sup>28,32</sup> la dosis de vacunación generará una respuesta Th1 y un número mínimo de Unidades Formadoras de Colonias y el periodo de infección debe permitir su estudio a largo plazo al menos 2 a 4 meses.<sup>28,33,34</sup>

Para el desarrollo de este proyecto, se decidió estudiar seis subcepas BCG : Frappier, Mexicana, Moresau, Sueca, Phipps, Tice.



## HIPÓTESIS

La vacuna BCG es la única medida preventiva de inmunización contra la tuberculosis, su eficacia es altamente controversial en gran parte debida a subcepas *M. bovis* BCG utilizadas. La protección que inducen las diferentes vacunas BCG en el modelo murino experimental de tuberculosis pulmonar será variable.

## **OBJETIVO GENERAL**

**Comparar la capacidad de protección de seis subcepas BCG en modelo murino contra tuberculosis pulmonar**

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Estandarizar los cultivos *in vitro* de *M. tuberculosis* y *M. bovis* BCG.
2. Determinar el tiempo de crecimiento de las diferentes subcepas BCG.
3. Determinar la concentración de bacilos de BCG que induzca una respuesta protectora con el criterio de índice de mortalidad .
4. Determinar el porcentaje de daño histológico pulmonar y presencia de granulomas.
5. Determinar Unidades Formadoras de Colonia de *M. tuberculosis*.
6. Determinar el grado de hipersensibilidad retardada tipo IV (DTH) antes y después del reto.

## **MATERIAL Y METODO.**

### **Cultivo de *M. bovis* BCG.**

Las diferentes subcepas BCG fueron cultivadas en medio Middelbrook 7H9 enriquecido con ADC. Una colonia de la subcepa *M. bovis* BCG se toma con asa estéril y se deposita en un tubo estéril de 3 ml con esferas de cristal de 0.5 mm y se agrega una gota de agua estéril. Se agita vigorosamente en el vortex y una vez separadas las esferas se agrega 1 ml de agua estéril, se sedimenta por 15 minutos y se toman 100  $\mu$ l del sobrenadante que se deposita en un frasco para cultivo que contiene 180 ml de medio líquido Middelbrook enriquecido con ADC. Se coloca en incubador con agitación a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> hasta el final de la fase media logarítmica; se realizan las diluciones correspondientes para obtener 10<sup>4</sup> UFC/ml, se almacenan en tubos eppendorf a -70° C hasta su uso.

### **Curva de crecimiento de *M. bovis* BCG.**

El cultivo de cada subcepa, se resuspende con una pipeta estéril de 10 ml y se toma una alícuota de 1 ml y se deposita en una cubeta para espectrofotómetro y se lee a  $\lambda$  660nm por duplicado. Una vez que el cultivo alcanza una D.O. entre 1 y 1.2 se cosecha. Adicionalmente se determinó la viabilidad de los cultivos utilizando una solución de Diacetato de Fluoresceína (DAF) (5 mg/1ml de acetona fría (-20° C)). El conteo de bacterias viables se realizó en una cámara de Neubauer.

Un tercer método empleado para determinar las Unidades Formadoras de Colonias fue la siembra de cada subcepa en placas agar Middlebrook, hasta alcanzar 10<sup>8</sup> ufc/ml, se registró el tiempo en días y se congeló a -70° C hasta su uso.

### **Animales de estudio.**

Ratones machos BALB/c de 6 a 8 semanas de edad libres de patógenos específicos, provenientes del bioterio del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y de la Nutrición Salvador Zubirán

### **Grupos de ratones y esquema de inmunización.**

Grupos de 10 ratones Balb/c se inmunizaron vía subcutánea en la base de la cola, con dos dosis independientes ( $10^4$  y  $10^8$  UFC/ml) diluidas en 100  $\mu$ L de PBS de cada una de las subcepas de BCG (Frappier, Mexicana Moreau Phipps Sueca y Tice). Se trabajaron un total 7 grupos (6 grupos de ratones vacunados y un grupo control). El estudio se realizó por duplicado. Al término de 2 meses de la inmunización se retaron por vía intratraqueal con *M. tuberculosis* H37Rv a una dosis de  $10^6$  UFC/ml diluida en solución salina isotónica (SSI).

### **Modelo murino experimental de tuberculosis pulmonar.**

El estudio experimental de tuberculosis pulmonar se realizó basándose en el modelo murino de infección pulmonar descrito por el Dr. Hernández-Pando con algunas modificaciones. Brevemente consistió en utilizar ratones BALB/c de 6 a 8 semanas de edad, se vacunaron, a los dos meses se infectaron con *M. tuberculosis* H37Rv, se anestesiaron intraperitonealmente con pentotal (56 mg/kg), se realizó una incisión media en la tráquea separando los músculos hasta la exposición de la misma, se inoculó la bacteria viable con una jeringa de 1 ml a una dosis de  $10^8$  diluida en 100  $\mu$ L de SSI estéril, se suturó la incisión con seda estéril y se mantuvieron los ratones en posición vertical en cajas con micro aisladores hasta su recuperación espontánea. El sacrificio, se realizó al día 120 anestesiando al ratón se extrajo la sangre vía plexo braquial y los pulmones para estudio histopatológico y cuenta bacilar

### **Hipersensibilidad de tipo tardía DTH.**

La preparación de los antígenos utilizados para la prueba de DTH fue *M. tuberculosis* H37Rv cultivado en medio líquido de Proskauer y Beck modificado de Youmans durante 5 a 6 semanas, posterior a la cosecha se obtuvieron antígenos del filtrado de cultivo precipitados con sulfato de amonio al 45% ( peso/vol) y diluidos en PBS. Se seleccionaron 4 ratones de cada grupo inmunizado y del grupo control de manera aleatoria, El antígeno preparado se inoculó en el cojinete plantar en un volumen de 20  $\mu$ l y la hipersensibilidad de tipo tardío se realizó midiendo el espesor del cojinete plantar del ratón antes y 24 h después con Matotuyo (micrómetro) de ingeniero.

### **Sacrificio de ratones.**

Los ratones utilizados para los estudios histológicos fueron anestesiados con cloroformo y se sacrificaron por exsanguinación vía plexo axilar, se colectó la sangre en tubos ependorf y congelando el suero después de centrifugación. Se hizo una incisión media anterior por capas, se extrajeron los pulmones separándolos con una pinza, se seccionó un pulmón para su congelación y el otro se perfundió con 1 ml de etanol absoluto fijándolos por 24h.

### **Preparación de cortes de tejido.**

Después de fijar los pulmones por 24h, se realizó un corte parasagital a través del hilo y se hidrataron en xilol puro realizándolo en 3 pasos: 3 baños con parafina líquida a 60° C para posteriormente hacer los bloques. Los cortes se leyeron en micrómetros cuadrados con el analizador de imágenes Zidas Zeiss realizando los parámetros de lectura en neumonía y granulomas.

### **Análisis estadístico.**

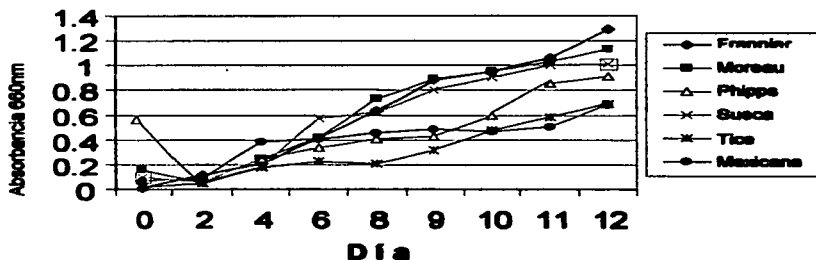
El análisis de varianza (ANOVA) se realizó para comparar las diferencias existentes de los porcentajes en daño histológico y de crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis*.

## Resultados.

El cultivo de las diferentes subcepas de *M. bovis* BCG se realizó en igualdad de condiciones. El crecimiento fue en fase logarítmica y se detuvo al alcanzar la absorbancia a 660 nm esperada; (1000 -1200nm) ,12 días después de iniciado el cultivo. La cinética de crecimiento de cada subcepa de BCG fue diferente de acuerdo a la densidad óptica.

La subcepa BCG Frappier obtuvo la mayor absorbancia y la menor absorbancia la mostraron la subcepa BCG Mexicana y la subcepa BCG Tico.

Al obtener los cultivos se determinó en cámara de Neubauer la viabilidad por Diacetato de Fluoresceína (DAF) expresando bacterias por ml. Así como se presentaron diferencias en las medidas de DO, también se presentaron diferencias en la cuenta de viabilidad con DAF.



Gráfica 1. Curva de crecimiento de las diferentes subcepas *M. bovis* BCG.

Así mismo, la obtención de cultivos de las subcepas de BCG comparables al tubo 3 de McFarland ( $10^8$  ufc/ml) se obtuvo de la siguiente manera en orden creciente expresado en días.

Cepa BCG	Tiempo de generación $10^8$ UFC/ml
Freppler	5.6
Mexicana	7.4
Moreau	6.9
Phipps	6.8
Sueca	7.8
Tice	6.1

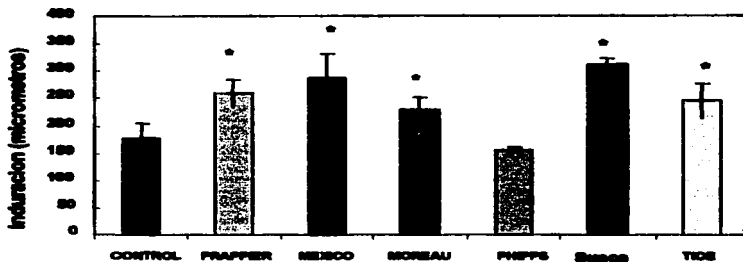
**Tabla 4.** Crecimiento de las subcepas *M. bovis* BCG en Middelbrook sólido comparables al tubo 3 de McFarland  $10^8$ .

#### **Respuesta de Hipersensibilidad de tipo tardío (DTH).**

El análisis de la respuesta a la prueba de hipersensibilidad de tipo tardío en ratones Balb/c infectados dos meses después de inmunizados por vía subcutánea con seis diferentes subcepas BCG se realizó inyectando en el cojinete plantar del ratón  $20\mu$ l



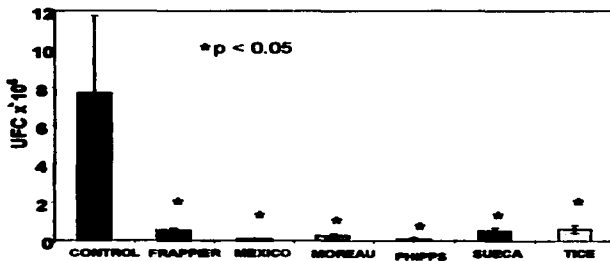
de concentrado de cultivo purificado de *M. tuberculosis* H37Rv diluido en 40µl de PBS. Se seleccionaron 4 ratones de cada grupo de manera aleatoria midiendo el cojinete plantar antes y 24 h después de la inyección; a excepción de la subcepa Phipps la respuesta a la prueba de DTH fue mayor en todos los grupos inmunizados comparados con el grupo control. La mayor respuesta a DTH la presentó el grupo vacunado con la subcepa Susca con 310.72 µm y en orden decreciente la subcepa BCG Mexicana con 287.02 µm, la subcepa BCG Frappier con 259.06 µm, la subcepa BCG Tice con 244.66 µm y la subcepa BCG Moreau con 229.35 µm. Una diferencia estadísticamente significativa se presentó para todas las subcepas al compararse con el grupo control a excepción de la subcepa BCG Phipps que mostró cifras por abajo del grupo control. Gráfica2



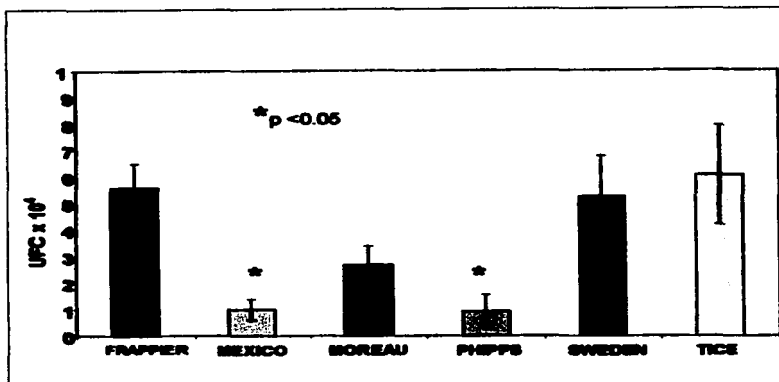
Gráfica 2. DTH en el modelo murino de tuberculosis pulmonar. Con excepción del grupo Phipps todos presentaron hipersensibilidad de tipo tardío mayor que el grupo control

### Unidades Formadoras de colonias de *M. tuberculosis* en pulmón

La capacidad de crecimiento de *M. tuberculosis* H37Rv se comparó en los grupos inmunizados con las diferentes subcepas BCG. Las unidades formadoras de colonias obtenidas de los pulmones mostraron diferencias en la cuenta total entre las 6 subcepas BCG y el grupo control. El grupo vacunado por la subcepa BCG Phipps presentó varios logaritmos por abajo de la dosis de infección seguida en orden creciente por la subcepa BCG Mexicana, Moreau, Frappier, Sueca y Tice. Todas las subcepas presentaron una diferencia estadísticamente significativa por la prueba de ANOVA ( $p < 0.05$ ) comparada con el grupo control (Grafica 3 y 4).



Grafica 3. La cuenta total de unidades formadoras de colonias entre los grupos vacunados con las subcepas *M. bovis* BCG y el grupo control muestran diferencia estadísticamente significativa

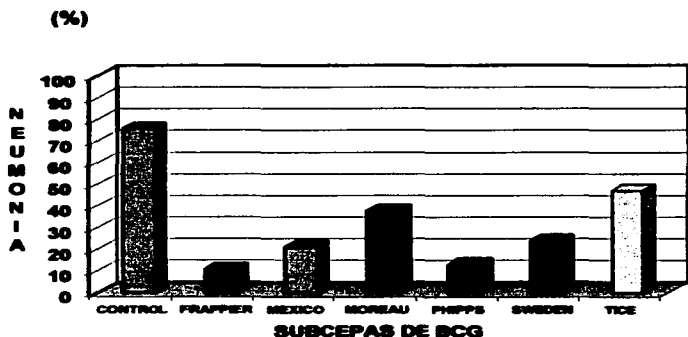


**Gráfica 4.** Cuenta bacilar de los grupos de ratones vacunados y retados. El grupo Phipps y Mexicana presentaron disminución importante de la carga bacilar en relación a los demás grupos.

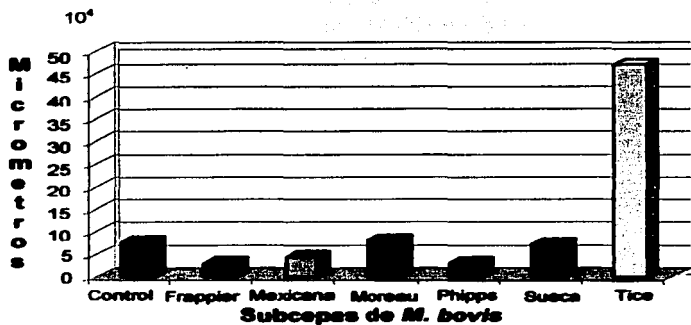
#### **Cambios histopatológicos de los ratones inmunizados con las subcepas de BCG**

A los dos meses de establecida la infección pulmonar, los cambios histológicos en el grupo control mostraron áreas neumónicas entre el 55 y 75% del área total, con abundantes macrófagos vacuolados con citoplasma eosinófilo, células gigantes multinucleadas, abundantes linfocitos, escasos polimorfonucleares, infiltrado perivascular y peribronquial en abundancia, se observó la presencia de algunos granulomas. Los grupos vacunados con las diferentes subcepas presentaron daño

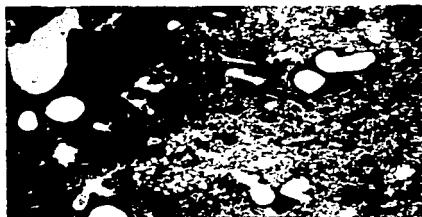
tisular significativamente reducido. El grupo vacunado con la subcepa Frappier mostró un porcentaje de área neumónica en un 11.1% con escaso infiltrado inflamatorio así como la presencia de escasos granulomas pequeños; el grupo vacunado con la subcepa BCG Phipps en el 13.07%, la Mexicana 21.17%, Sueca 24%, Tice 37.9% y la Moreau 47%. El análisis multivariado de ANOVA mostró que todos los grupos vacunados con BCG presentan diferencia estadísticamente significativa comparada con el grupo control (Gráfica 4 y Tabla 5).



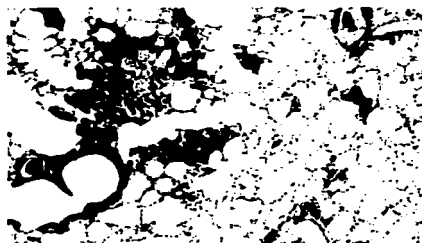
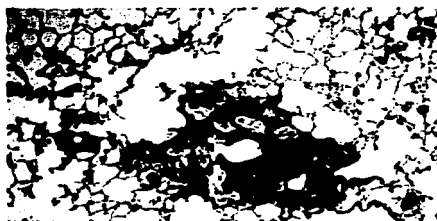
Gráfica 4. Determinación del porcentaje de neumonía en los diferentes grupos de ratones inmunizados con las subcepas de *M. bovis* BCG. El grupo Frappier mostró menor porcentaje de neumonía mientras que el grupo Tice fue el que presentó mayor neumonía



**Tabla 5.** Porcentaje de granulomas en los grupos vacunados con las subcepas de *M. bovis* BCG expresado en micrómetros x 10<sup>4</sup>. La cantidad de granulomas se relacionó al porcentaje de neumonía. El grupo Tice presentó mayor cantidad de granulomas y mas grandes.



A)

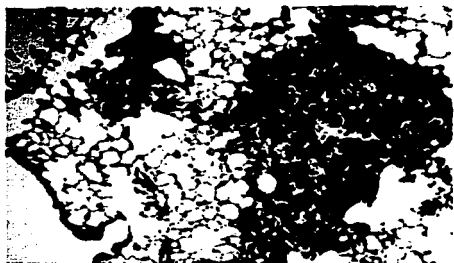


C)

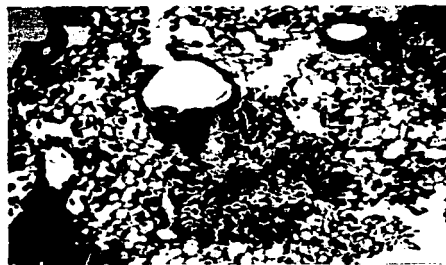


D)

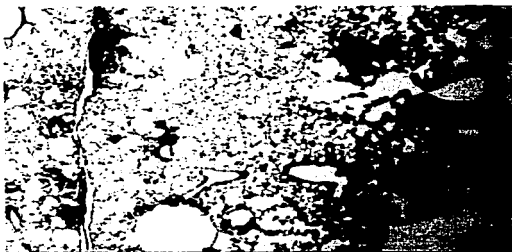
**Figura 5. Cortes histológicos de pulmón a los dos meses de infección posterior a la vacunación A) grupo control B) Grupo vacunado con la subespa Frappier, C) grupo vacunado con la subespa Mexicana y D) grupo vacunado con la subespa Moreau.**



E)



F)



**Figura 6. Cortes histológicos de tejido pulmonar infectados con *M. tuberculosis* H37Rv dos meses después de vacunados. E) Subcepa Susca, F) Subcepa Tico y G) Subcepa Phippa.**

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## Discusión.

El presente trabajo estudió la capacidad protectora de seis diferentes subcepas de *M. bovis* BCG en modelo murino de tuberculosis pulmonar con infección intratraqueal. De los modelos animales reportados en la literatura para el estudio de la tuberculosis se seleccionó el ratón por su fácil manejo, bajo costo, presencia de numerosos reactivos comerciales disponibles que miden la función inmune; la tecnología en delección dirigida que ha mostrado las funciones esenciales de varias citocinas sólo existe en el ratón y un factor primordial es su semejanza con la historia natural de tuberculosis pulmonar humana teniendo como ventaja que el ratón es mas resistente y que la formación de granulomas rara vez llega a la necrosis. Además gran parte del conocimiento de la patogenia y respuesta inmune que preceden a la del humano fueron primordialmente realizados en ratón.<sup>28</sup> Siendo el modelo de ratón con infección intratraqueal uno de los mas adecuados para reproducir tanto la infección como para la generación de la respuesta inmune *in situ*.

De los primeros retos del presente trabajo fue determinar el tiempo óptimo de crecimiento de las diferentes subcepas *M. bovis* BCG en donde se encontró que el menor tiempo fue de 5.6 días para la subcepa BCG Frappier y el mayor fue de 7.4 días para la subcepa BCG Mexicana con una diferencia entre éstas de 1.7 días, este es el primer reporte relacionado a la cinética de crecimiento para las subcepas de *M. bovis* BCG que crecen en tiempos diferentes. En la subcepa BCG Frappier que presentó el menor tiempo de crecimiento están ausentes las regiones RD1 (9 orf deletados), RD2 (11 orf), RD8 (4 orf) descritas por ensayos de microarreglos<sup>29</sup>. La subcepa Mexicana que presentó el mayor tiempo de crecimiento no fue estudiada en ensayos de microarreglos, aunque se esperaría las mismas regiones ausentes que de la subcepa Danesa 1331 ya que deriva de ésta y a su vez originada de la Pasteur 423 con 908 cultivos mas, la subcepa Danesa presentó dos regiones ausentes: RD1 y RD2. La subcepa Sueca tiene un tiempo similar de



crecimiento a la subcepa BCG Mexicana y su asociación con región genómica ausente es sólo RD1. Al comparar la subcepa BCG Moreau cuyo uso fue como vacuna y BCG Phipps usada en estudios clínicos presentaron el mismo tiempo de crecimiento y difieren en tipo de regiones pero no en número de deleciones, siendo para la primera RD1 y RD16 con una copia de inserción IS6110(6 orf ) y para la segunda RD1, RD2 y dos copias de IS6110<sup>36</sup>. Los hallazgos encontrados podrían sugerir que la disminución en genes acelerará el crecimiento de las micobacterias aunque estas observaciones deberá ser sujeto de estudio.

En base a la experiencia de algunos investigadores, entre ellos Bretcher <sup>33,34</sup> que demostró que a menor dosis de *M. bovis* BCG se obtiene una mejor respuesta Th1 confirmada por la presencia de IL-2 e IFN-  $\gamma$ ; y que el uso de dosis altas produce una respuesta inmune Th2 con presencia de IL-4 e IL-10, se usaron las dosis de vacunación de  $10^4$  UFC /ml para el estudio de protección y la dosis de  $10^5$  UFC/ml por no haber antecedente de estas dosis en vacunación con diferentes subcepas *M bovis* BCG en modelo murino. La vía de inmunización subcutánea en la base de la cola fue seleccionada basada en la literatura existente de la protección ofrecida por algunas de estas subcepas de *M. bovis* BCG en modelo animal. La dosis empleada para el reto ( $10^6$  UFC/ml) con *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv establecida previamente en el modelo de tuberculosis pulmonar. [Es importante señalar que la mayoría de los ratones inmunizados con dosis alta de  $10^5$  ufc/ml fallecieron cerca de 72 h posterior al reto y al realizarse los estudios histopatológicos de los pulmones mostraron infiltrado inflamatorio agudo sugiriendo el inóculo como el responsable]. A pesar de que existe un sin número de estudios evaluando la protección de la vacuna *M bovis* BCG en tuberculosis pulmonar así como la diferencia existente entre cada una de las subcepas BCG son ausentes de criterios ya que las condiciones de realización en cada uno de estos es diferente; ya sea por la vía de vacunación y/o reto, tipo de subcepa BCG y condiciones propias de cada estudio siendo difícil la asociación que pudiera existir entre cada una de ellas.

Evidencias definitivas de la protección inmunológica de las subcepas BCG que induce cada una de las subcepas *M bovis* BCG es aún inexistente bajo nuestras condiciones. El estudio más parecido al presente trabajo fue el realizado por Legranderie y col. En el que se demostró que la capacidad protectora fue variable en las siguientes subcepas de *M bovis* BCG: Praga, Japonesa, Glaxo, Pasteur y Rusa, siendo las dos primeras incapaces de conferir protección. Sin embargo; estos hallazgos a pesar de realizarse en ratones difieren de forma importante de los nuestros ya que usan la vía de infección fue intravenosa para la inmunización y la cepa utilizada en el reto fue *M bovis* BCG recombinante con B-galactosidasa<sup>36</sup>. Mientras que, nuestro trabajo estudió en modelo murino a seis diferentes subcepas BCG que también son usadas en inmunizaciones humanas y en estudios clínicos en diferentes países del mundo con la misma vía de vacunación que en el humano y la vía de infección intratraqueal (la mas parecida al humano) con la cepa *M tuberculosis* H37 Rv que es la que infecta con mayor frecuencia al humano.

En relación a los estudios de protección inducido por las subcepas BCG se observó diferencia en el estado general de los ratones ya que los grupos vacunados con las subcepas Mexicana y Sueca presentaron mejor estado general basado en la conservación de peso y apetito mas una disminución de dos logaritmos en las unidades formadoras de colonias en el tejido pulmonar de los animales comparado al grupo control y que resultaron estadísticamente significativas mediante la prueba de ANOVA.

El grupo vacunado con la subcepa BCG Tice presentó desde los primeros días de vacunación un notorio incremento de ataque al estado general y pérdida de peso, esta subcepa es la segunda mas usada en Estados Unidos y desde su origen la clasificaron en 6 diferentes grupos de los cuales dos mostraron atenuación importante en estudios de laboratorio y; finalmente, una de las cuatro vacunas

restantes fue combinada con una nueva cepa originaria del Instituto Pasteur y es la que se mantiene en la actualidad. Sus antecedentes en protección son variables aunque los últimos no refieren beneficio alguno.

Un segundo hallazgo en este estudio fue la diferencia de la respuesta a la hipersensibilidad de tipo tardío (DTH) presentada por las diferentes subcepas *M. bovis* BCG en la que se mostró una importante respuesta inmune celular para los diferentes grupos vacunados comparado con el grupo control con excepción de la subcepa BCG Phipps. La subcepa *M. bovis* BCG que presentó mayor induración fue la Sueca seguida en orden decreciente la Mexicana, Frappier, Tice y Moreau.

Por diversas investigaciones realizadas de la respuesta a la prueba cutánea (PPD) que evalúa la hipersensibilidad tardía a *M. tuberculosis* hasta el momento se desconoce que exista una asociación directa del tamaño de induración con el estado inmune, lo que si evidenció, es; que existe memoria inmunológica y en nuestro estudio la magnitud de la respuesta a DTH resultó con diferencias estadísticamente significativas entre los grupos vacunados con las diferentes subcepas de *M. bovis* BCG y el grupo control, que la excepción fue la subcepa *M. bovis* BCG Phipps cuyo DTH fue inferior. La respuesta a DTH no correlacionó con la protección generada por cada subcepa BCG ya que no se encontró una asociación entre DTH y el porcentaje de neumonía y/o unidades formadoras de colonias.

De los hallazgos histológicos encontrados a los 2 meses de infección en los distintos grupos de animales vacunados con las subcepas de BCG se observó una gran variación en la protección con cada una de ellas. La subcepa BCG Frappier fue la que presentó menor porcentaje de neumonía (11.1%), tiene como antecedentes históricos en protección dos estudios en los que se usó esta subcepa BCG proporcionando el 80% de protección en ambos, llamando la atención la similitud del porcentaje aun cuando fueron lotes diferentes con

muchos pases entre ellas y un periodo de 4 décadas entre cada estudio, la subcepa BCG Phipps que también presentó un porcentaje bajo de neumonía se acompañó de pequeño número de unidades formadoras de colonia y tiene como antecedente 83% y 40% de protección, la subcepa BCG Mexicana se caracterizó por una pequeña variación en el mismo grupo ya que hubo cortes de pulmón que presentaron mayor daño histológico que otros y el porcentaje de neumonía fue del 21.17% la subcepa BCG Sueca con 24% de neumonía; la subcepa BCG Moreau y la subcepa BCG Tice presentaron un cuadro neumónico mayor, con 37.9 y 47%, respectivamente; con mayor infiltrado inflamatorio y granulomas grandes; estas dos subcepas *M. bovis* BCG mostraron una protección moderada tanto en estudios en animales como en humanos concluyendo que la disminución de la eficacia sugiere disminución de la atenuación de ambas subcepas.<sup>21,22</sup>

Analizando los ensayos de microarreglos los autores refieren que ninguno de los ORFs ausentes de las subcepas se clasificaron como elementos de virulencia y si podrían sugerir tener un papel de adaptación a los cambios del medio ambiente inducido por las condiciones de laboratorio, que a su vez ha producido incapacidad de estimular una respuesta inmune durable. Por otro lado M. Behr refiere que la capacidad de producción de ácido metoximicólico en las subcepas *M. bovis* BCG en estudio mostró ser diferente entre ellas, sugiriendo la posibilidad que la pérdida en la capacidad de producir el ácido metoximicólico se puede relacionar directamente con la incapacidad de estas subcepas de crecer en macrófagos<sup>20</sup>. Pensamos que si estas dos observaciones fueran del todo ciertas se hubiera presentado una asociación directa entre las subcepas BCG que presentan mayor número de genes y producción de ácido metoximicólico con protección, pero nuestros resultados no apoyan éstas hipótesis.

Un segundo parámetro que mostró el grado de protección fue el tamaño y número de granulomas en donde la mayor cantidad de granulomas presentes en el grupo vacunado tanto con la subcepa BCG Frappier como la subcepa Phipps

fueron pequeños, mientras que el resto del grupo de subcepas BCG presentó variación tanto en número como en tamaño con excepción del grupo vacunado con la subcepa BCG Tice que mostró prácticamente similar porcentaje de granulomas grandes y chicos.

Este modelo tiene la virtud de mimetizar la infección pulmonar del hombre. La dosis que se determinó para la vacunación óptima ( $10^4$  UFC/ml) se encontró en el intervalo de protección demostrado ya que el número de decesos al término de la vacunación fue nulo aún sumándole el reto.

Los resultados obtenidos en este estudio mostraron la presencia de diferencias entre las distintas subcepas BCG estudiadas también descritas por diferentes autores en el modelo murino, resaltando; que no se presentó relación directa entre las subcepas con pérdida de genes y falta de capacidad de producción del ácido metoximicólico. El daño histológico y las UFC/ ml revelaron que, en las mismas condiciones las diferencias de protección encontradas por las diferentes subcepas *M. bovis* BCG son importantes.

La asociación entre el contenido genómico y la capacidad de inducir respuesta inmune no son sinónimas ya que las subcepas BCG Phippe y Tice pertenecientes al mismo grupo mediante ensayos de microarreglos son muy diferentes en la capacidad de inducir inmunidad en modelo animal lo que podría sugerir que la regulación de la expresión de los componentes bacterianos en el hospedero participan de forma importante en la capacidad de inferir protección. Estos hallazgos nos ayudaron a seleccionar la mejor subcepa que fue *M. bovis* BCG Frappier que proporcionó la mayor protección y la menor protección fue *M. bovis* BCG Tice cuya protección fue muy baja.

En esta comparación en eficacia de vacunación, se debe considerar que; al realizarse estudios controlados de vacunación en humanos la subcepa *M. bovis*

BCG Frappier proporcionó la mayor protección y la menor fue para *M. bovis* BCG Tice.

Finalmente, es muy importante mencionar que este estudio no previene infección por *M. tuberculosis* pero si la gravedad de la enfermedad tuberculosa.

## CONCLUSIONES

- 1.- El tiempo de crecimiento de las subcepas *M bovis* BCG en el cultivo fue diferente
- 2.- El modelo de tuberculosis pulmonar murina fue útil al implantarse la inmunización previa a la enfermedad.
- 3.-La mejor dosis de vacunación fue  $10^4$  UFC de *M bovis* BCG
- 4.- La prueba de PPD se presentó en los animales vacunados con diferencias estadísticamente significativas comparados con el grupo control.
- 5.-El grado de reactividad al PPD, no correlacionó con protección.
- 6.- La protección proporcionada por las seis subcepas *M bovis* BCG fue diferente. La mayor protección fue obtenida con la subcepa *M. bovis* BCG Phipps. La menor protección fue obtenida con la subcepa *M bovis* BCG Tice.
- 7.-Las subcepas *M bovis* BCG disminuyeron de manera importante la infección por *M. tuberculosis* H37Rv.

## **BIBLIOGRAFÍA.**

- 1.-Snider D, Onorato I. 1994. *Epidemiology*. In: Rossman M, MacGregor R. *Tuberculosis*. (Ed) McGraw Hill. Cap 1. pag 3-17. New York.
- 2.-Sada DE, Sifuentes OJ. 1995. *Temas de Medicina Interna*. Asociación de Medicina Interna de México.; volumen III numero 4:809-822.
- 3.-OMS consejo ejecutivo EB/25. 1993. Programa de tuberculosis, informe del director general sobre los progresos 93ª reunión.7 : 2568-2573.
- 4.-Raviglione MC, Snider DE, & Kochi. 1995. Global epidemiology of tuberculosis, morbidity and mortality of a world wide epidemic. *JAMA*. 273:220-226.
- 5.-World Health Organization. 2001. *Global Tuberculosis Control*. WHO report, Switzerland, WHO/cds/Rb .1-34.
- 6.-García L, Valdespino JL. 1999. La Salud en México a la Vuelta del Siglo. Instituto Nacional de Salud Pública, Secretaría de Salud. *Epidemiología de la tuberculosis*. Breve resumen de los trabajos presentados en la XII conferencia mundial sobre SIDA. Salud Publica de México. Cap 7, 53-58
- 7.-Pacheco CA, Vázquez RV, Badillo N.1996. Vacuna del Bacilo Calmette Guérin en Vacunas Ciencia y Salud. cap 12:187-201.
- 8.-Cole S.T. Brosch R. Parkhill J. Garnier T.,Churcher C. Harris,D. Gordon S.V. Eiglmeirer, K. Gas,S. Barry,C.E.,3<sup>rd</sup> et al 1998. Deciphering the Biology of *Mycobacterium tuberculosis* from Complete Genome Sequence. *Nature*. 393:537-544.



- 9.-Schluger NW. 2001. Recent Advances in our Understanding of Human Host Responses to Tuberculosis *Respir Res.* 2:157-163.
- 10.-Glickman MS and Jacobs WR jr. 2001. Microbial Pathogenesis of *Mycobacterium tuberculosis* dawn of a Discipline. *Cell.* 104:477-485.
- 11.-Andersen P, Munk M, Pollock J, Doherty T. 2000. Specific Immune-Based Diagnosis of Tuberculosis. *Lancet.* 356:1099-104.
- 12.-Rook GAW, Hernandez-Pando R. 1996.The Pathogenesis of Tuberculosis . *Annu. Rev Microbiol.* 50:259-284.
- 13.-Smith D , Wiegshaus H. 1989. What Animal Models Can Teach Us About the Pathogenesis of Tuberculosis in Humans. *Review of Infect Dis.* 11(Suppl 2):S385-S392.  
L.,
- 14.-Flynn J.and Chan J.2001. Immunology of Tuberculosis. *Ann Cooper AM, Callahan JE, Keen M, Belisle JT, Orme IM. 1997. Expression of Memory Immunity in the lung following re-exposure to Mycobacterium Tuberculosis. Tubercle and Lung Disease.* 78:67-73.
- 15.-Hernandez-Pando R, Orozco H, Sampieri A, Pavón L, Velazquillo C, Lariva –Sahd J, Alcocer JM, Madrid MV. 1996. Correlation between the kinetics of Th1/Th2 cells and pathology in a murine model of experimental pulmonary tuberculosis. *Immunology.* 89:26-33.
- 16.-Hernández-Pando R. and Rook GA. 1994. The Rol of TNF- $\alpha$  in T Cell Mediate Inflammation Depends on the Th1/Th2 Cytokine Balance. *Immunology.* 82:591-595.
- 17.-Zhang M, Lin Y, Iyer VV, Gong J, Abrams JS, Barnes P. 1995. T- Cell Cytokine Response in Human Infection with *Mycobacterium tuberculosis*.

Infect Immun.63:3231-3234.

18.-Bindu Raju,Chung FT, Cheng D, Yousefzadeh N, Condos R, Room WN, Tse DB. 2001. In Situ Activation of Helper T Cells in the Lung Infection and Immunity. 69:4790-4798.

19.-Fenhalls G, Wong A, Bezuidenhout J, Van Heiden P, Bardin P and Lukey PT. 2000. In Situ Production of Gamma Interferon, Interleukin-4 and Tumor Necrosis Factor Alpha mRNA Human Lung Tuberculous Granulomas Infection and Immunity. 68:2827-2836.

20.-González-Juarrero M, Tumer CO, Marieta P, Brooks BJ, Lukey PT and Orme I.M. 2000. Temporal and Spatial Arrangement of Lymphocytes withing Lung Granulomas Induced by Aerosol Infection with *Mycobacterium tuberculosis*. Infect Immun.69:2827-2836.

21.-Oettinger T, Jorgensen M, Ladefoged A, Aslov K & Andersen P. 1999. Development of the *Mycobacterium bovis* BCG vaccine: Review of the Historical and Biochemical Evidence for a Genealogical Tree Tubercle Lung Dis. 79:243-247.

22.-Behr MA and Small P. 1999. A Historical and molecular Phylogoy of BCG Strains. Vaccine. 17:915-922.

23.-Gobin J, Wong DK, Bradford W, Horwitz G and Howirtz.1999.Characterization of Exochelins of the *Mycobacterium bovis* Type Strain and CG. Infect Immun. 67:2035-2039

24.-Mahairas GG, Sabo GP, HickeyMJ, Singh DC and Kendall SC. 1996. Molecular Analysis of Genetic Differences Between *Mycobacterium bovis* BCG and Virulent *M. bovis*. J Bacteriol. 178:1274-1282.

25.-Magdalena J, Supply P, and Locht C. 1998. Specific Differentiation between *Mycobacterium bovis* BCG and Virulent Strains of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex. J Clin Microbiol. 38:2471-2476.

26.-Fine P and Rodriguez L. 1990. L. Mycobacterial Diseases. Modern Vaccines. Lancet . 335:1010-1020.

27.-Brandt L, Cunha JF, Olsen WA, Chilima B, Hirsch P, Appelberg R and Andersen P. 2002. Failure of the *Mycobacterium bovis* BCG Vaccine: Some Species of Environmental Mycobacteria Block Multiplication of BCG and Induction of Protective Immunity to Tuberculosis. Infect Immun. 70:672-678

28.-McMurray D. 2001. Disease model Trends in Molecular Medicine. 7:135-137

29.-Chambers MA, Marshall BG, Wangoo A, Bune A, Cook T, Shaw R, Young D. 1997. Differential Response to Challenge with live and Dead *Mycobacterium bovis* BCG Calmette –Guerin. J Immunol. 158:1742-1748.

30.-Abolhassani M, Lagranderie M, Chavarot P, Balazuc A, Marchal G. *Mycobacterium bovis* BCG Induces Similar Immune Responses and Protection by Rectal and Parenteral Immunization Routes. Infect Immun. 68:5657-5662.

31.-Lagranderie M, Chavarot P, Balazuc AM, Marchal G. 2000. Immunogenicity and protective capacity of *Mycobacterium bovis* BCG after oral or intragastric administration in mice. Vaccine. 18:1196-1195.

32.-North R, Lacourse R, Ryan L. 1999. Vaccinated Mice Remain More Susceptible to *Mycobacterium tuberculosis* Infection Initiated via the Respiratory Route than via the Intravenous Route. Infec Immun. 67:2010-2012.

- 33.-Hernandez\_Pando R, Pavon L, Arriaga K, Orozco H, Madrid-Marina V Rook G. 1997. Pathogenesis of tuberculosis in Mice Exposed to a Low and High Doses of an Environmental Mycobacterial Saprophyte before Infection. *Infect Immun.* 65:3317-3327.
- 34.-Power CA, Wei G, Bretcher P. 1998. Mycobacterial Dose Defines the Th1/Th2 Nature of the Immune Response Independently of Whether Immunization is Administered by the Intravenous, Subcutaneous or Intradermal Route. *Infect Immun.* 66:5743-5750.
- 35.-Behr MA, Wilson MA, Gill WP, Salamon H, Schoolnik GK, Rane S and Small P. 1999. Comparative Genomics of BCG Vaccine by Whole-Genome DNA Microarray. *Science.* 284:1520-1522.
- 36.-Lagranderie RRM, Balazuc A-M, Deriaud E, Leclerc DC, Gheorghiu M. 1996. Comparison of Immune Response of Mice Immunized with Five Different *Mycobacterium bovis* BCG Vaccine Strains. *Infect Immun.* 64:1-9.
- 37.-Behr Marcel. 2001. Correlation between BCG Genomics and Protective Efficacy. *Scand J Infect Dis.* 33:249-252.