



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"IZTACALA"

INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN
"SALVADOR ZUBIRAN"



"Localización de antígenos inmunodominantes de *Mycobacterium tuberculosis* durante la evolución de la enfermedad progresiva de tuberculosis pulmonar experimental y de infección tuberculosa latente".

T E S I S

QUE COMO REQUISITO PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I O L O G O

PRESENTA:

JUAN CARLOS LEON CONTRERAS

MÉXICO, D. F.

MAYO DEL 2004.





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

AGRADECIMIENTOS ESPECIALES.

**Al Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición
“Salvador Zubirán”.**

A todo el **Departamento de Patología.**

Al **Dr. Rogelio Hernández Pando** por haberme aceptado, orientado y ayudado en este trabajo y en las labores cotidianas que desempeño en el instituto.

A la **Dra. Leticia Moreno Fierros**, a la **Dra. Maria Rosa Avila Costa**, a la **M en C Carmen Álvarez Rodríguez** y al **M C Rafael Jiménez Flores** por el tiempo dedicado a revisar este trabajo y por las sugerencias que me dieron para que este trabajo quedara terminado.

iiiiGRACIAS!!!!

DEDICATORIA

A **Charly**; mi amigo, mi compañero, mi fuente de inspiración y conocimientos, MI HIJO. Este trabajo es para ti, es solo una parte de lo poco que te puedo dejar.

A **Nelly**, como parte del amor y agradecimiento que te tengo, por lo poco que hemos logrado juntos y para que sea un aliciente para todo lo que nos falta.

A mi **Tío Coco**, por que eres la persona a la que le debo mucho de lo que Soy
¡¡¡Gracias!!!.

A mi **Madre**, por ser como es, por que de una manera casi imperceptible aprendí cosas que nunca olvidare y otras que jamás haré.

A mis **Hermanos** y **Sobrinos**, solo espero que este pequeño logro que obtuve los impulse a hacer más grandes los suyos.

A los que estuvieron, A los que se fueron, A los que **NUNCA** estuvieron, A los que están, A los que vendrán y A los que **NUNCA** estarán conmigo.

Para todos Uds.

AGRADECIMIENTOS

A la **Universidad Nacional Autónoma de México**, tan solo por darme el orgullo de ser **PUMA**.

A la **Facultad de Estudios Superiores "IZTACALA"** por ser la mejor escuela de Biología del país y recibirme en sus instalaciones haciéndome parte de ella.

A todos con los que aprendí y conviví antes, durante y después de la carrera.

A los profesores (buenos y malos) que me han dado parte de su tiempo en clase y de los que aprendí algo antes y durante la carrera.

A mis **Hermanos**; CHAVO, NEGRO, EMILIO, FRED y a mis **Hermanas**; FLOR, RAQUEL, SUSI y MARTHA, por que sin quererlo cada uno de Uds. me enseñó algo y por que en los momentos que **No** estuvimos juntos y que me hicieron falta **No** los olvidé.

A todos mis **Sobrinos** y a sus hijos; espero que este trabajo no llegue demasiado tarde a Uds. Ojalá que puedan hacer mucho más que esto.

A **Pachus** y a mis primos **Luis** y **Mara**; por que estuvieron conmigo (¿o yo estaba con Uds.?) cuando me propuse lograr esto y aquí está!!!! ¡¡¡Gracias!!!

A mis **Suegros** (Sr. Antonio y Sra. Gloria) y **Cuñados** (Gus y Jessi), por que su ayuda y apoyo (poco o mucho) es importante para mi y sin eso no estaría escribiendo aquí. Mi más sincero agradecimiento para Uds.

A mis **amigos** y **cuates** con los que en algún momento e tenido puntos de vista diferentes, aventuras y platicas interminables que en algún momento servirán de pretexto para reunirnos de nuevo; Mac (Federico), Erika, Picapiedra (Víctor), China (Lian), Ale, Pablo (The Fantastic Four!)-, Compa (Luis), Carmen, Becza (Betzabe), Eu (Eunice), Myrna, Ana (Dalia), Otho (Alejandro), Jarocho (Iván), Romeo, Toluqueño (Víctor), Fresa (Carlos), Artemisa, Fernando, Rabo (Rabindranath), Angustias (Israel), Flaco (Sergio), Tifo (Luis), Güero (Oscar), Enrique, y a todo aquel que se me olvide en este momento...

A mis cuates de **PATO**; Joaquín, Juliana, Don Luis, Ere, Maricruz, a la Dra. Norma, Paquisimo, Gabriela (Chica y Grande), Mariana, Jaime, Maru, Irma y a todos con los que conviví todos los días y de los que he aprendido algo...

INDICE

ABREVIATURAS	1
RESUMEN	2
INTRODUCCIÓN	4
ANTECEDENTES	.8
OBJETIVO GENERAL	15
Objetivos Particulares	15
METODOLOGÍA	16
Modelo de Tuberculosis Pulmonar Experimental	16
Enfermedad Progresiva	16
Infección Latente	16
Micobacteria	16
Inmunohistoquímica	18
Inmunomicroscopía Electrónica	20
RESULTADOS	21
Inmunohistoquímica	21
MPT64	22
LAM	32
Inmunomicroscopía Electrónica	42
MPT64	42
LAM	43
DISCUSIÓN	46
CONCLUSIONES	50
APENDICE 1 "Mapa O. M. S."	52
APENDICE 2 "Ratones B6D2F1"	53
APENDICE 3 "Técnicas"	54
APENDICE 4 "Soluciones"	59
APENDICE 5 "Reactivos"	61
REFERENCIAS	62

RESUMEN

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa, contagiosa y crónica, causada por micobacterias del complejo tuberculosis como *Mycobacterium tuberculosis*, *M. microti*, *M. bovis*, *M. canetti* y *M. africanum*. Estos bacilos son patógenos facultativos intracelulares que generalmente entran por vía aérea, una vez que han entrado al organismo pueden por un lado mantenerse en estado latente o proliferar dentro del organismo causando enfermedad activa en cuyo caso el organismo es capaz de transmitir la enfermedad. En el modelo de Tuberculosis Pulmonar Experimental desarrollado por Hernández Pando, se han descrito dos fases de acuerdo con sus características histológicas e inmunopatológicas; la primera es una *Fase Temprana* que abarca el primer mes de infección; se caracteriza por presentar una respuesta inmunológica del tipo Th1, la segunda Fase corresponde a la *Crónica o Progresiva* la cual se desarrolla después del primer mes de infección y se caracteriza por una respuesta inmunológica de tipo Th2. La Infección latente no presenta ninguna manifestación clínica, es decir, no hay síntomas de enfermedad pero son portadores de la micobacteria en un estado que no representa un riesgo para la salud. Cuando las micobacterias están en crecimiento en los medios de cultivo secretan grandes cantidades de proteínas, lipoproteínas y glicoproteínas, no se conoce con exactitud el por que las secreta la micobacteria, algunos de estos productos han sido utilizados en pruebas de inmunológicas como PPD y DTH, sin embargo hasta ahora no hay reportes en los que se demuestre su presencia en algún modelo *in vivo*. El planteamiento para este trabajo consistió en determinar la localización de los antígenos inmunodominantes **MPT59**, **MPT64**, **MPB70**, **MPB83**, y **Lipoarabinomannan** por medio de Inmunohistoquímica e Inmunomicroscopía

electrónica usando anticuerpos contra estas proteínas en pulmones de ratones en los diferentes tiempos de la Enfermedad Progresiva y en ratones con Infección Latente.

Los resultados de inmunohistoquímica mostraron que solo los anticuerpos anti-**LAM** y anti-**MPT64** presentaron reacción positiva en linfocitos y macrófagos alveolares de ratones con enfermedad progresiva y con infección latente; lo que implica que ambas están siendo expresadas por *Mycobacterium tuberculosis* de la cepa H37Rv independientemente de la etapa de la enfermedad o de la infección y no son exclusivos del crecimiento de *M. tuberculosis* en el medio de cultivo.

Los anticuerpos MPT59, MPB70, MPB83 y MPB70 no presentan reacción positiva por inmunohistoquímica en los pulmones de ratones infectados con *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv en ningún tiempo del estudio.

INTRODUCCIÓN

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa, contagiosa y crónica, causada por micobacterias del complejo tuberculosis como *Mycobacterium tuberculosis*, *M. microti*, *M. bovis*, *M. canetti* y *M. africanum* (Brooks y col., 1992) estos bacilos son patógenos facultativos intracelulares, pertenecientes al orden *Actinomycetales*, familia *Mycobacteriaceae*, todos los organismos pertenecientes a esta familia son ácido resistentes, aeróbicos y poseen ácidos micólicos (Brooks y col., 1992; Rastrogi y col., 2001).

La pared celular de la micobacteria presenta particularidades interesantes, esta formada por 4 capas las 3 externas están formadas por lípidos, ácidos micólicos, glicolípidos, factor de cordón y cera D, la capa mas interna esta formada por peptidoglicanos (Brooks y col., 1992). Morfológicamente *M. tuberculosis* es delgado recto o ligeramente curvo sin cápsula y no forma esporas, es un bacilo alcohol ácido resistente (BAAR), es aeróbico y su crecimiento es lento, resiste la desecación pero es sensible al calor y a la luz ultravioleta (Brooks y col., 1992; Rastrogi y col., 2001).

Generalmente en humanos la transmisión del bacilo es por vía aérea cuando personas infectadas y enfermas tosen y arrojan pequeñas secreciones que acarrear bacilos, éstas se secan y los bacilos quedan suspendidas en el aire, al entrar en contacto con la vía respiratoria pueden ser fácilmente fijados en la mucosa nasal y transportados después hasta el pulmón mediante la inspiración (Brooks y col., 1992).

Los resultados de este contacto pueden ser, por una parte, la eliminación de los bacilos por el sistema inmune del huésped o en casos extremos desarrollar

tuberculosis activa en un lapso de tiempo promedio de 1 a 3 años. En las personas en las que se desarrolla la enfermedad su sistema inmune no es capaz de controlar la infección inicial ni de desarrollar una respuesta de tipo protector (Flynn y Chan, 2001).

El principal sitio de infección son los pulmones pero pueden afectar también la piel, los huesos, los ganglios linfáticos, el hígado, el tracto gastrointestinal y el sistema nervioso central y las vías de diseminación para que el bacilo llegue a estos órganos pueden ser linfática o hemática (Rastrogi y col., 2001; Bloom, 1994; Wiegshaus y col., 1989). Una vez que el bacilo ha entrado al organismo puede presentarse una de las dos condiciones siguientes; por una parte, el bacilo puede permanecer en un estado de infección latente, es decir, el número de bacilos se encuentra estable por lo que los pulmones no presentan cambios histopatológicos evidentes y el organismo portador de estos bacilos no presenta síntomas de enfermedad en un lapso relativamente largo de tiempo o puede por otro lado producir enfermedad progresiva (Arriaga y col., 2002).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) contempla a la tuberculosis dentro de las enfermedades que se pueden considerar como un problema de salud pública (World Health Organization-Global Tuberculosis Control 2001), puesto que aproximadamente un tercio de la población mundial es portadora de bacilos en estado latente (Kochi 1991). Aproximadamente de un 5 a un 10% de la población que presenta Infección latente desarrolla enfermedad progresiva (Flynn y Chan, 2001).

En el reporte de la OMS del año 2001 estimó que en el año de 1999 contrajeron la enfermedad mas de 3,600,000 personas y la cifra de personas a las que se les realizó la prueba de Derivado Proteico Purificado (PPD) con resultados positivos

fue de mas de 8 millones tanto en países desarrollados como subdesarrollados, con las cifras de los países que le reportan a la OMS y si la tendencia de infección continúa como hasta ahora, las cifras estimadas para el año 2005 serán de más de 10 millones de nuevos casos afectando principalmente a África y a Asia (World Healt Organization-Global Tuberculosis Control 2001; García y Valdespino, 2001; Mustafa 2002)(Ver Apéndice 1). De acuerdo a las cifras que se mencionaron anteriormente se puede estimar que a causa de la tuberculosis mueren aproximadamente 3 millones de personas anualmente y esta cifra aumenta considerablemente cada año (Rastrogi y col., 2001; World Healt Organization-Global Tuberculosis Control 2001; García y Valdespino, 2001; Mustafa 2002).

Únicamente las personas que presentan la enfermedad activa son capaces de contagiarla y dejan de serlo cuando el tratamiento con fármacos es seguido cuando menos por 2 meses (Bloom, 1994).

Existen factores sociales y económicos que contribuyen al resurgimiento de la enfermedad como la pobreza y la desnutrición, esto, como pudiera pensarse no es exclusivo de los países en vías de desarrollo; en países desarrollados con economías estables también se ha incrementado en los últimos años el número de infecciones debido principalmente a la asociación de la tuberculosis con el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) causado por el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH), a la falta de un diagnóstico oportuno, a la aparición de cepas multidrogorresistentes y a la falta de tratamientos terapéuticos efectivos (Palendira y col., 2002).

Debido a esta problemática y a los pocos conocimientos del mecanismo que utiliza la micobacteria para infectar y proliferar dentro de los pulmones se ha planteado un modelo de Tuberculosis Pulmonar Experimental (TPE) en el que se

desarrolla por un lado la Enfermedad Progresiva (E-P) e Infección Latente (I-L) en ratones con el objeto de contribuir al entendimiento de la patogénesis de la enfermedad. (Arriaga, Orozco, Aguilar, Rook y Hernández 2002).

ANTECEDENTES

En el modelo de TPE desarrollado por Hernández Pando con E-P y con I-L se han detallado minuciosamente los aspectos histológicos de la cinética bacteriana y el tiempo de expresión de citocinas relevantes por medio de Inmunohistoquímica (IHQ), Inmunoensayos de Unión a una Enzima (ELISA) y por Transcripción Reversa en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR) (Arriaga y col., 2002; Hernández-Pando y col., 1996).

Experimentalmente el modelo de E-P se divide en dos fases, la primera es una fase temprana que abarca el primer mes de infección, se caracteriza por presentar una respuesta inmunológica del tipo Th1 protagonizada por los Macrófagos Alveolares (MA) que fagocitan a los bacilos presentes en el alveolo pulmonar. Estos macrófagos se encuentran en un estado inactivo, también llamado no inmunitario y son los que estimulan la respuesta de los Linfocitos T para que expresen Interleucina-1 (IL-1), IL-2, IL-12, Interferón- γ (INF γ) y Factor de Necrosis Tumoral- α (TNF α), así como también infiltrado inflamatorio en el epitelio alveolar y en el intersticio pulmonar y capilar, en las zonas perivasculares y peribronquiales así como la formación de granulomas (Wiegshaus y col., 1989; Hernández-Pando y col., 1996; Cubillas y col., 2003; Yanagisawa y col., 1997; Rook y Hernández-Pando 1996; Barnes y col., 1993; Hernández-Pando y Rook, 1994).

Esta respuesta es importante en el desarrollo de la enfermedad, puesto que, durante ésta hay una eliminación bastante eficaz de bacterias durante los primeros 3 días de la infección y es contra lo que tiene que luchar la micobacteria para sobrevivir y permanecer sin ser eliminada del organismo infectado.

La segunda fase corresponde a la fase crónica o progresiva, la cual se desarrolla después del primer mes de infección y se caracteriza por una respuesta inmunológica de tipo Th2 expresando IL-4 e IL10, una alta tasa de mortalidad y por manifestaciones morfológicas como neumonía, necrosis y fibrosis extensa (Hernández-Pando y col., 1996; Cubillas y col., 2003; Yanagisawa y col., 1997; Rook y Hernández-Pando 1996; Barnes y col., 1993; Hernández-Pando y Rook, 1994). Contrario a lo que se pudiera pensar, ésta respuesta es menos agresiva para la micobacteria lo cual le proporciona un medio adecuado para su eventual proliferación.

Tanto los mecanismos que usa la micobacteria para permanecer en un estado de I-L durante un tiempo determinado, así como los factores por los cuales se activa la E-P en la población humana hacen difícil el planteamiento de un modelo experimental de I-L, puesto que durante ésta no se presenta ninguna manifestación clínica, es decir, no hay enfermedad pero son portadores de la micobacteria en un estado en el que no se está multiplicando por lo que no es transmisible y no representa un riesgo importante a la salud, histológicamente se pueden presentar pequeños granulomas o quistes fibróticos y las personas infectadas presentan una reacción positiva a la prueba de PPD, esta prueba es específica para demostrar que en algún momento el sistema inmunológico ha estado en contacto con la micobacteria.

Los estudios realizados en tuberculosis usando modelos de TPE en I-L y en E-P han contribuido a descubrir los mecanismos que se llevan a cabo por una parte el sistema inmunológico del huésped para contrarrestar a la micobacteria y por otro lado los mecanismos que desarrolla la micobacteria para mantenerse en el organismo sin ser eliminada, si bien, esto ha dado grandes resultados, no ha sido

suficiente este esfuerzo para su completo entendimiento y para el planteamiento de un método eficaz para su erradicación. (Arriaga y col., 2002; Bloom 1994; Elhay y col., 1998; Frehel y col., 1991; Hernández-Pando y col., 1997; Flynn y Chan 2001; Phyu y col., 1998; Hernández-Pando y col., 1996.)

Cuando las micobacterias están en crecimiento en los medios de cultivo secretan grandes cantidades de proteínas, lipoproteínas y glicoproteínas, no se conoce con exactitud el papel que juegan ni la utilidad de muchas de estas, sin embargo, algunas de estas ya han sido utilizadas en pruebas de PPD (Elhay y col., 1998) y mas recientemente los fragmentos de ADN que codifican a algunas se han usado como productos inmunogénicos formadores de anticuerpos (Palendira y col., 2002; Kamath y col., 1999; Yamaguchi y col., 1989).

Se les ha nombrado antígenos inmunodominantes a los productos que son expresados en grandes cantidades por la mayoría de las micobacterias que forman el complejo tuberculosis, estos productos son utilizados por el huésped para la producción de linfocitos T activados y de anticuerpos, estas características le confieren propiedades para considerarlas potencialmente útiles en estudios de inmunidad y de posible vacunación, de ahí la importancia biológica de estos productos.

A las proteínas con propiedades de antígenos inmunodominantes obtenidas a partir de medios de cultivo en donde crece *Mycobacterium bovis* BCG (Bacilo de Calmette-Güerin) se les ha designado el prefijo MPB seguida del número que denota su movilidad relativa en geles de poliacridamina, por otro lado, el prefijo MPT se ha designado a las proteínas de las mismas características secretadas por *Mycobacterium tuberculosis* seguida del número que denota su movilidad en los mismos geles (Nagai y col., 1981; Harboe y col., 1998).

El planteamiento para este trabajo consistió en buscar por medio de Inmunohistoquímica e inmunomicroscopía electrónica reacción positiva contra los anticuerpos anti-MPT59, anti-MPT64, anti-MPB70, anti-MPB83, y anti-Lipoarabinomannan (anti-LAM) en pulmones de ratones en los diferentes tiempos de la E-P y en ratones con I-L.

Mustafa (2002) y Mustafa y colaboradores (2000) proponen a la proteína MPT59 como un candidato viable para vacuna por las grandes cantidades que secreta *Mycobacterium tuberculosis*. Este antígeno es una proteína también conocida como Ag85b. Yanagisawa colaboradores (1997) demuestran en sus estudios que MPT59 induce una respuesta PPD positiva similar a la que presenta el derivado proteico usado comúnmente en la prueba de PPD y es mayor que la respuesta presentada por MPB70, MPT64, MPT57 y MPT47 por lo que lo proponen como el mayor antígeno de *M. tuberculosis*.

El peso de MPT64 es de 24 kDa, inicialmente fue aislada de filtrados de medio de cultivo de *M. bovis* BCG Tokio. También fue hallada en el filtrado de medio de cultivo de *M. tuberculosis* H37Rv. Elhay y colaboradores (1998) muestran una comparación entre el gen que codifica para MPT64 (*mpt64*) y el que codifica para MPB64 de *M. bovis* BCG Tokio y resultó idéntica excepto por una mutación silente. Experimentos de "Southern blot" en el ADN genómico de *Mycobacterium* mostraron la presencia de *mpt64* en las subcepas de *M. tuberculosis* H37Rv, H37Ra y Erdman mientras que en las subcepas de *M. bovis* BCG Glaxo, Pasteur, Canadian, Tice, Danis 1331 y *M. Leprae* no se presenta el gen.

Oettinger y Andersen (1994) aislaron cinco Anticuerpos Monoclonales (MAbs) que reconocen cuatro diferentes epítopes que son versiones de proteínas (designadas como MPT64). Las proteínas son producidas y secretadas por cepas

virulentas del complejo tuberculosis (*M. tuberculosis*, *M. Africanum*, y *M. bovis*, incluyendo *M. bovis* BCG). Sin embargo, recientemente se ha demostrado que no todas las subcepas de *M. bovis* BCG presentan este gen.

Experimentos de "Southern blot" mostraron la presencia de *mpt64* en tres aislados de *M. tuberculosis* y en *M. bovis* BCG en las subcepas Tokio, Moreau, y Russian mientras que en las subcepas Glaxo, Pasteur, Canadian, Tice, y Danis 1331 no está presente este gen. Un punto interesante es cómo y cuándo las subcepas de *M. bovis* que funcionan como vacunas perdieron el gen que codifica para MPT64. Todas estas subcepas se originaron de un ancestro común de *M. bovis* Pasteur, sin embargo, estudios de hibridación muestran diferencias en el patrón de enzimas de restricción en especies que integran el complejo tuberculosis.

Comúnmente MPB70 es aislada de los filtrados de medios de cultivo en donde crece *M. bovis* BCG. En el trabajo de Mioura y colaboradores (1983) la reacción en piel de MPB70 fue específica para BCG. La potencialidad de MPB70 en la reacción de piel fue aproximadamente veinte veces superior en número comparada con los otros componentes del filtrado. MPB70 fue el único antígeno considerado como específico de especie; es decir, dio una reacción retardada en cobayos sensibilizados con células muertas de BCG, cosa que no sucedió con ninguna otra especie de las micobacterias que se probaron. Es considerado como el componente principal del filtrado de medio de cultivo. El conteo de esta proteína fue de 8.9%, del total de proteínas del filtrado, originalmente se consideró que esta proteína representaba más del 10%. El alto contenido de MPB70 no es solo una propiedad de cepas BCG Tokio 172 también se encuentran propiedades similares de antigenicidad en otras cepas de BCG, es probable que MPB70 no

sea una proteína de autólisis puesto que se secretó en el medio como un producto natural que se activa con el crecimiento de las bacterias.

El peso molecular de MPB70 fue estimado en 18,000 por medio de Electroforesis en Geles de Poliacridamida con SDS (SDS-PAGE) y de 15,100 por análisis de equilibrio de sedimentación. Es de reacción específica para *M. bovis* BCG en cobayos sensibilizados con micobacterias muertas por calor. Esta alta producción, es una propiedad muy importante de MPB70, se considera que los purificados de esta proteína pueden ser utilizados en los estudios de fisiología de las bacterias, pruebas hipersensibilidad retardada (DTH), PPD y posiblemente en higiene y epidemiología de la tuberculosis, donde MPB70 podría ser utilizada en la verificación de la sensibilización en vacunación con BCG. (Nagai y col., 1981; Oettinger y Andersen, 1994; Mioura y col., 1983; Harboe y col., 1986)

La expresión de MPB83 se presenta en *M. bovis*, el gen que codifica esta proteína ha sido usado como vacuna contra la tuberculosis por Mioura y colaboradores (1983) y por Juárez y colaboradores (2001).

Harboe y colaboradores (1986) presentan la homología de las proteínas MPB83 y MPB70 sin embargo mencionan que son codificadas por genes diferentes, su peso molecular por geles de poliacridamida está estimado de 22 a 26 kDa. Es una lipoproteína de la pared celular de *M. bovis*, la función de esta proteína no se conoce con exactitud.

M. tuberculosis secreta la proteína MPT83 y la homología con la proteína MPB83 secretada por *M. bovis* es muy alta. (Juárez y col., 2001).

La proteína denominada LAM es producida en grandes cantidades por *M. tuberculosis* y *M. leprae*, es altamente inmunogénica. Es un glicolípido asociado a

la pared celular. Chan y col., (1991) lo han reportado como un fuerte inhibidor de $\text{INF}\gamma$. Estudios sobre los mecanismos por los que este glicolípido de la micobacteria regula negativamente las funciones efectoras de los macrófagos provee evidencias que LAM actúa a varios niveles y que puede ser un potencial acarreador citotóxico de radicales libres e inhibir la activación de los macrófagos (Gilleron y col., 2000).

La reacción positiva por medio de IHQ en los pulmones de ratones con I-L y con E-P usando los anticuerpos con estas proteínas haría evidente la expresión de estas proteínas por parte de la bacteria y más aun el hecho de que estén presentes tanto en I-L como en E-P es una razón mas que suficiente para un estudio mas minucioso y detallado y su posible utilización como presentadores inmunogénicos específicos para tuberculosis.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la localización de antígenos inmunodominantes de *Mycobacterium tuberculosis* en pulmones de ratones durante la evolución de la enfermedad progresiva de tuberculosis pulmonar experimental y de infección tuberculosa latente.

Objetivos Particulares.

Determinar por inmunohistoquímica la localización pulmonar de antígenos inmunodominantes mediante los anticuerpos anti-MPT64, anti-MPB83, anti-MPT59, anti-MPB70 y anti-LAM de la micobacteria H37Rv en los diferentes tiempos de la enfermedad progresiva e infección latente en ratones.

Determinar por inmunomicroscopía electrónica la localización celular de las micobacterias que secretan antígenos inmunodominantes mediante la utilización de los anticuerpos con reacción positiva en inmunohistoquímica tanto en infección latente como en enfermedad progresiva.

METODOLOGÍA

Modelo de Tuberculosis Pulmonar Experimental.

Enfermedad Progresiva

Se usaron ratones BALB/c de 6 a 8 semanas de edad, la *M. tuberculosis* virulenta que se usó fue la cepa H37Rv, la suspensión final para la inoculación quedó con un número de 1×10^6 bacterias/100 μ l de PBS.

Infección Latente

Se usaron ratones híbridos B6D2F1 (C57B1/6 x DBA/2 J) de los laboratorios Jakson (Bar Harbor, ME, USA) (Ver Apéndice 2) de 6 a 8 semanas de edad, la *M. tuberculosis* usada fue la cepa H37Rv, la suspensión final para la inoculación fue de 4×10^3 bacterias/100 μ l.

Micobacteria

La micobacteria *M. tuberculosis* de la cepa H37Rv se cultivó en medio Poskauer y Beck modificado por Youmans (PBY), después de un mes de crecimiento se ajustaron los volúmenes con las dosis mencionadas y mantenidas en alícuotas a -70° C hasta su utilización.

Para la infección, en ambos modelos se anestesió a los ratones con Pentobarbital sódico en una dosis de 56mg/Kg., se realizó una pequeña incisión en la línea media de la traquea del ratón para inyectar 100 μ l de PBS que contenían a las bacterias vivas y virulentas.

Sacrificio

Los ratones se sacrificaron a los días 1, 3, 60, 120, 180, 240, 300 y 360 después de la infección.

Anticuerpos.

Los anticuerpos contra los antígenos inmunodominantes MPT64, MPB83, MPT59, MPB70 y LAM que se usaron en este trabajo son policlonales y fueron hechos en conejo, el Dr. Morten Harboe del Instituto de Inmunología y Reumatología de la Universidad de Oslo, Noruega y los proporciono al Dr. Rogelio Hernández Pando para su utilización como una colaboración de trabajo.

Preparación de pulmones.

Los pulmones para Inmunohistoquímica se perfundieron a través de la traquea con Alcohol Etílico al 100% (Merck).

Ambos pulmones de cada uno de los ratones se seccionaron por la mitad, y se continuó el proceso para inclusión en parafina (Ver Apéndice 3.1)

Los pulmones para Inmunomicroscopía Electrónica se perfundieron a través de la traquea con Paraformaldehído al 4% en buffer de Sörensen y se tomaron fragmentos de 1 a 3 mm³ para su inclusión en resina acrílica hidrosoluble (Ver Apéndice 3.3).

Inmunohistoquímica (IHQ).

Inclusión, Corte e Incubación (Ver apéndice 3.1).

La inclusión de los pulmones se realizó en parafina.

Los cortes se realizaron en un micrótopo de rotación semiautomático marca “Leica” modelo RM2145, a un grosor de 4 μm . montados en laminillas previamente silanizadas.

Las laminillas se incubaron con anticuerpo primario (anti-MPT64, anti-MPB83, anti-MPT59, anti-MPB70 y anti-LAM) en todos los casos teniendo como fuente del anticuerpo conejo, la siguiente incubación se realizó usando anticuerpo secundario Inmunoglobulina G (IgG) de conejo biotinilado (VENTANA).

Se incubó con Avidina conjugada (A-HRPO C) (VENTANA) y se reveló con Diaminobenzidina (DAB). (VENTANA).

Observación y análisis de datos.

De los bloques de parafina se realizaron cortes y se montaron en laminillas para cada uno de los anticuerpos.

De cada laminilla se analizaron 5 venulas, 3 bronquiolos respiratorios y se contabilizaron las células con marca positiva que se encontraban en la periferia de ambas estructuras, 5 campos al azar para contabilizar células intersticiales y 5 campos al azar para contabilizar células alveolares.

El análisis y conteo de linfocitos y macrófagos positivos y negativos se realizó con el analizador computarizado de imágenes “Image Processing and Análisis System” V.1 1996. de “Leica Imaging System”. Ltd. Cambridge U. K.

Los resultados de los conteos celulares se presentaron en gráficos con los porcentajes de células con reacción positiva a los diferentes anticuerpos usados.

Inmunomicroscopía Electrónica (IME).

Inclusión, ultramicrotomía e incubación (Ver apéndice 3.3 y 3.4)

Los fragmentos de pulmón de 1 a 3 mm³ se procesaron para IME y su inclusión fue en resina acrílica hidrosoluble LR-White.

Los cortes finos fueron de 90 nm de grosor y montados en rejillas de níquel de 300 mesh hechos en un ultramicrotomo automático marca "Sorval" modelo MT-7000.

Las rejillas se incubaron con los anticuerpos primarios que resultaron con actividad positiva en Inmunohistoquímica (MPT64 y LAM).

El anticuerpo secundario fue IgG anti-conejo hecho en cabra acoplado a oro coloidal de 5 nm de diámetro.

El contraste se realizó con una solución acuosa saturada de Acetato de Uranilo durante 30 segundos.

Observación de las muestras al Microscopio Electrónico de Transmisión (MET).

La observación de las muestras se realizó en MET marca Carl Zeiss modelo EM-10C a 60 Kv.

RESULTADOS

Inmunohistoquímica.

De cada tiempo de estudio se sacrificaron 4 animales con I-L y 4 con E-P, de cada uno de los animales se realizaron cortes histológicos de pulmón para la localización de los antígenos MPT59, MPT64, MPB70, MPB83, y Lipoarabinomannan (LAM)

En cada una de las laminilla se analizaron 5 venulas con un diámetro promedio 89.3 μm , 3 bronquiolos respiratorios con un promedio 194 μm y se contabilizaron las células con marca positiva que se encontraban en la periferia de ambas estructuras, 5 campos al azar para contabilizar células intersticiales y 5 campos al azar para contabilizar células alveolares.

Los anticuerpos contra MPT59, MPB70 y MPB83 mostraron reacción inmunohistoquímica negativa en todos los tiempos de sacrificio del experimento en Infección Latente y en Enfermedad Progresiva.

La reacción de inmunohistoquímica positiva se presento solo con los anticuerpos contra MPT64 y LAM en todos los tiempos de la E-P y en los últimos días del experimento en la I-L.

MPT64

Enfermedad Progresiva

El análisis a nivel de microscopía de luz de la enfermedad progresiva muestra una lesión que aumenta a medida que transcurre el tiempo de infección, en los días 1 y 3 (fotomicrografía 1 a y b) muestran una reacción positiva en macrófagos dentro de los espacios alveolares formando parte de un proceso inflamatorio incipiente.

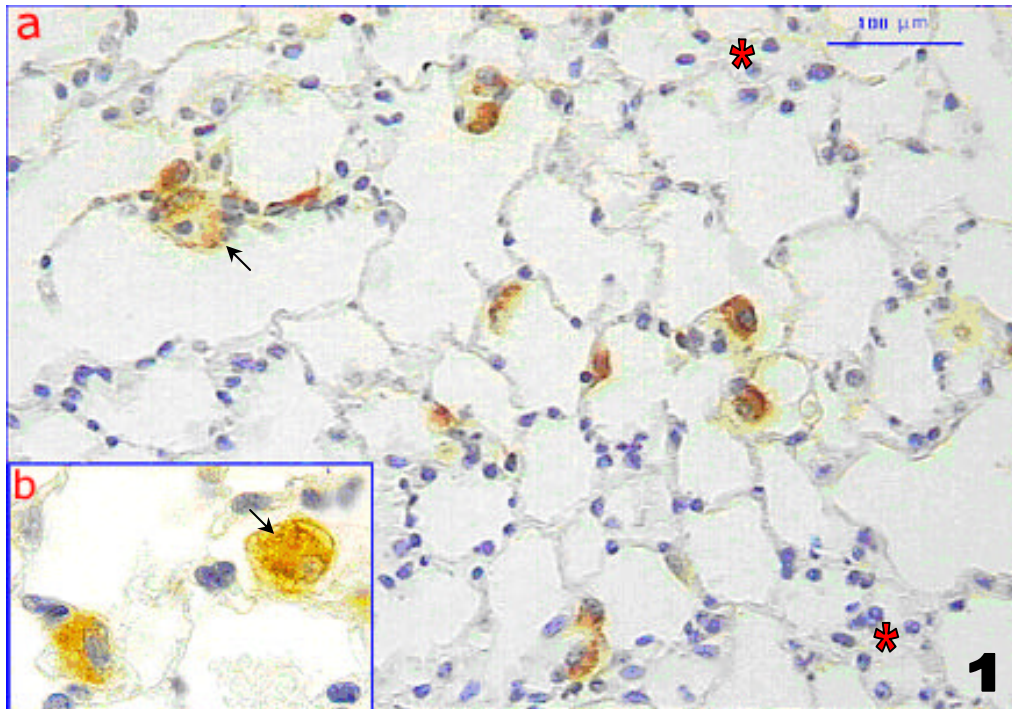
En los pulmones del día 60 (fotomicrografía 2 a y b) hay una acumulación de células de aspecto sólido con marca positiva a este anticuerpo alrededor de los granulomas que presenta el pulmón (fotomicrografía 2a) la inflamación en este tiempo es pronunciada.

Los granulomas en el día 120 presentan un tamaño más grande que en el día 60, las células positivas siguen localizándose alrededor de los granulomas (fotomicrografía 3).

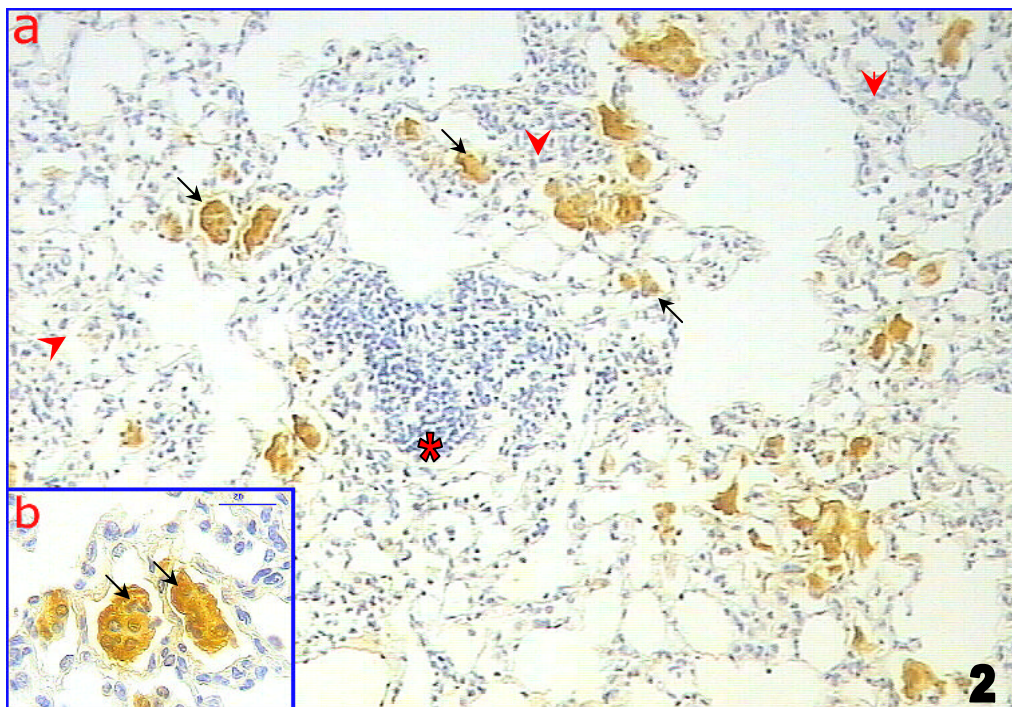
En el día 180 la lesión pulmonar se extiende y se presentan células positivas más dispersas (fotomicrografía 4).

En el Día 240 los granulomas e inflamación cubren casi la totalidad del pulmón y las células con marca positiva se acumulan en grupos compactos de aspecto sólido (fotomicrografía 5).

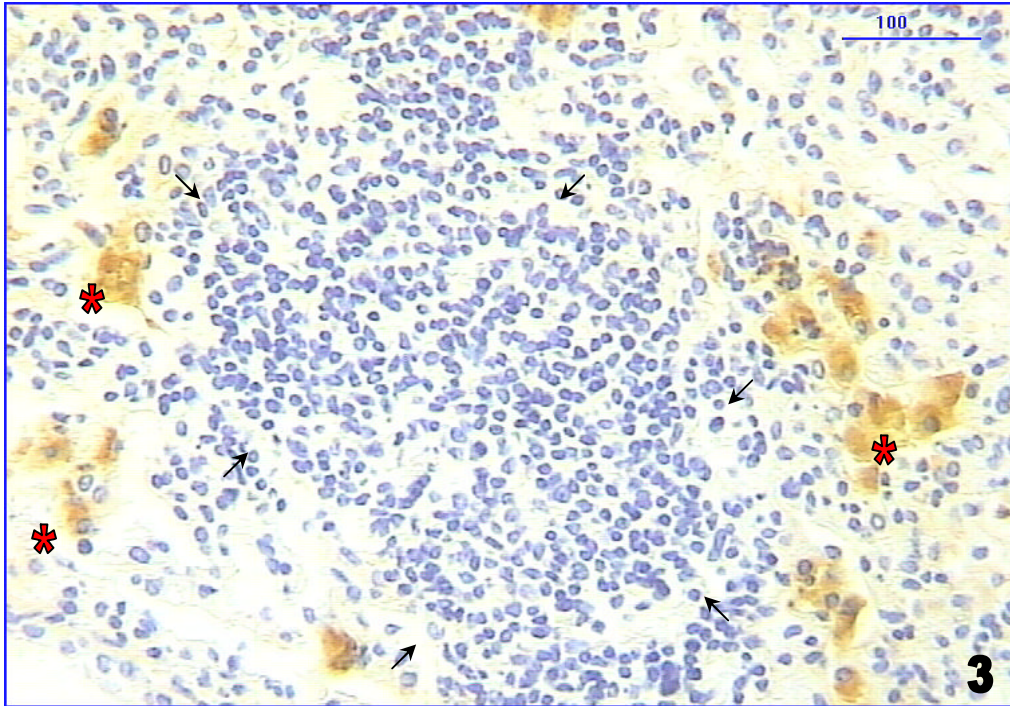
Los pulmones del día 300 presentan una predominancia de zonas con inflamación, los macrófagos presentan zonas citoplasmáticas positivas de aspecto bacilar (fotomicrografía 6 b y c).



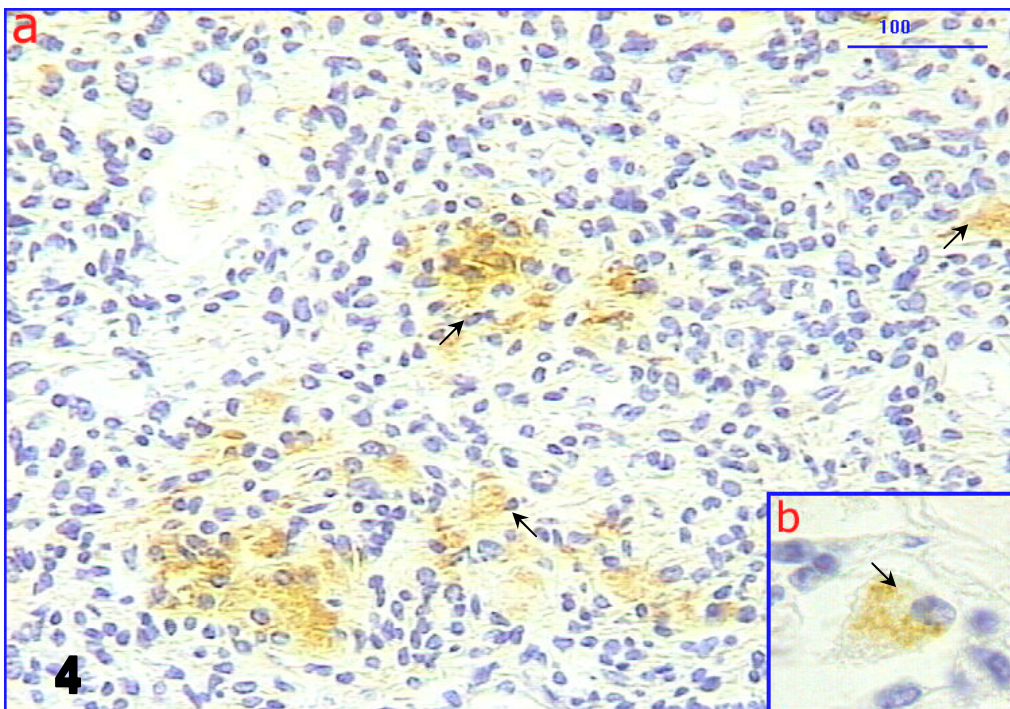
Fotomicrografía 1 a y b.- Reacción inmunohistoquímica positiva contra MPT64 en los días 1 (a 100x) y al día 3 (b 1000x) en macrófagos dentro de los espacios alveolares (flechas) y una inflamación leve (asterisco), la reacción positiva se presenta también en algunas células epiteliales.



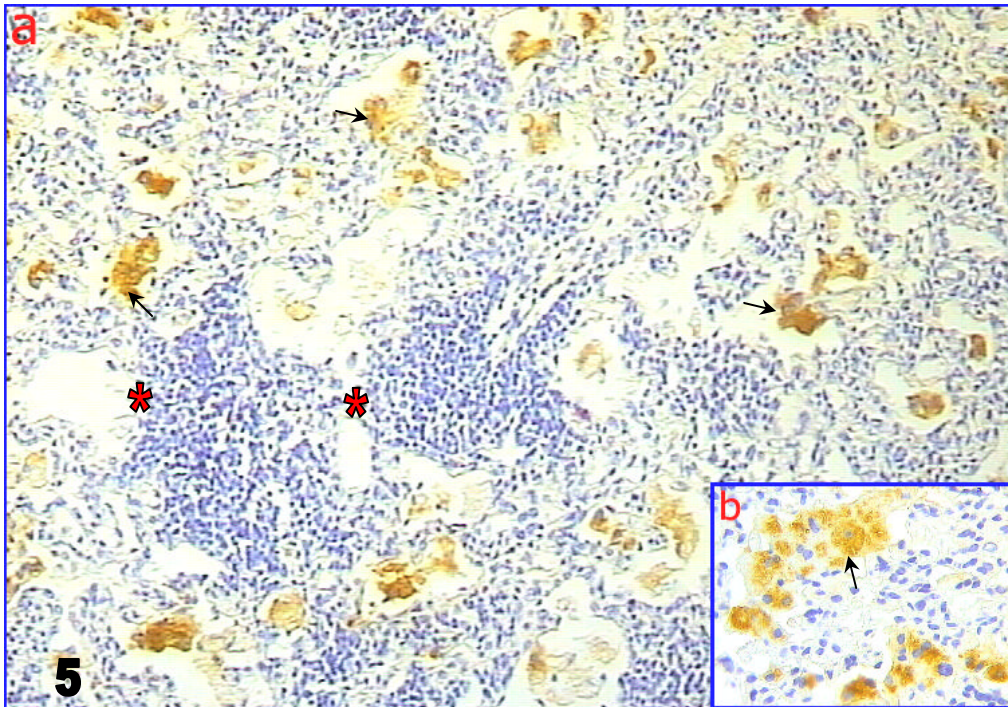
Fotomicrografía 2 a y b- Pulmón del día 60 con reacción positiva a MPT64 en acumulación de células de aspecto sólido con marca positiva (flechas) en la periferia de granulomas (asterisco), la inflamación en este tiempo es pronunciada (punta de flecha roja) (a 40x), en el recuadro b (400x) se muestra la reacción positiva cúmulos de células.



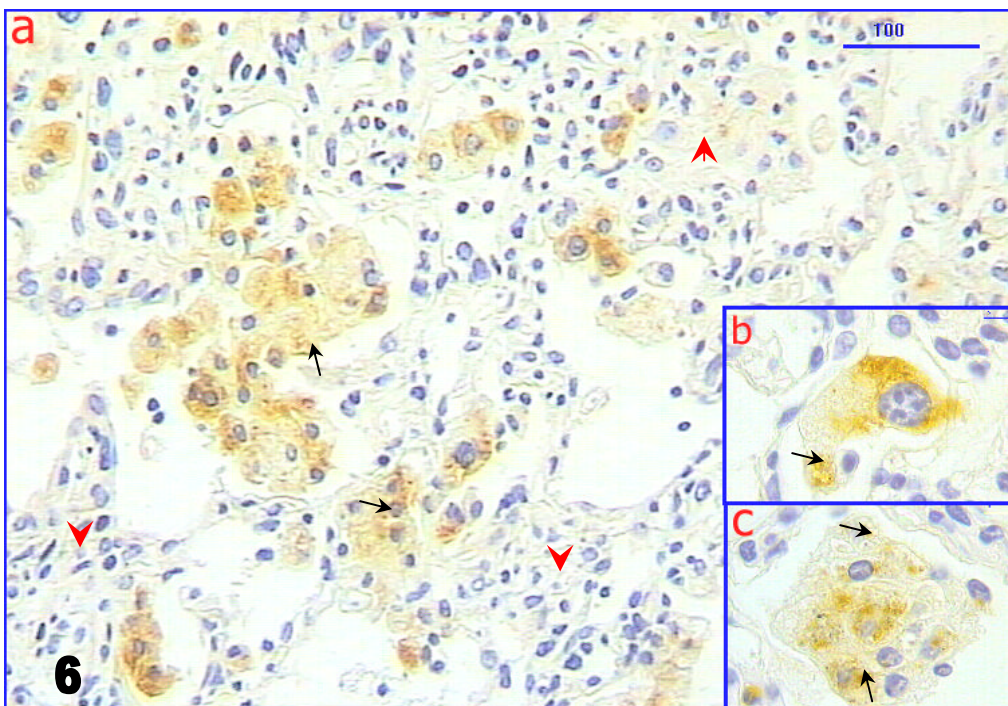
Fotomicrografía 3.- Pulmón del día 120 con granulomas de tamaño mayor que los del tiempo de sacrificio anterior (delimitado por flechas), las células positivas se presentan en la periferia de estos granulomas (asterisco) (1000x).



Fotomicrografía 4.a y b- En el día 180 la lesión pulmonar se extiende y se presentan células positivas más dispersas (flechas en **a** 100x) y la marca citoplasmática se hace evidente (flecha en **b** 1000x).



Fotomicrografía 5 a y b.- Pulmón del día 240 con granulomas (asteriscos) e inflamación, las células con marca positiva se acumulan en grupos compactos (Flechas en **a** 40x), la marca citoplasmática cubre casi la totalidad de las células (Flecha en **b** 400x).



Fotomicrografía 6 a, b y c.- Pulmones del día 300 con predominancia de zonas con inflamación neumónica (puntas de flecha roja en **a** 100x), la marca positiva se presenta con frecuencia en macrófagos vacuolados (flechas), los macrófagos presentan zonas citoplasmáticas positivas de aspecto bacilar (flechas en **b** y **c** 1000x),

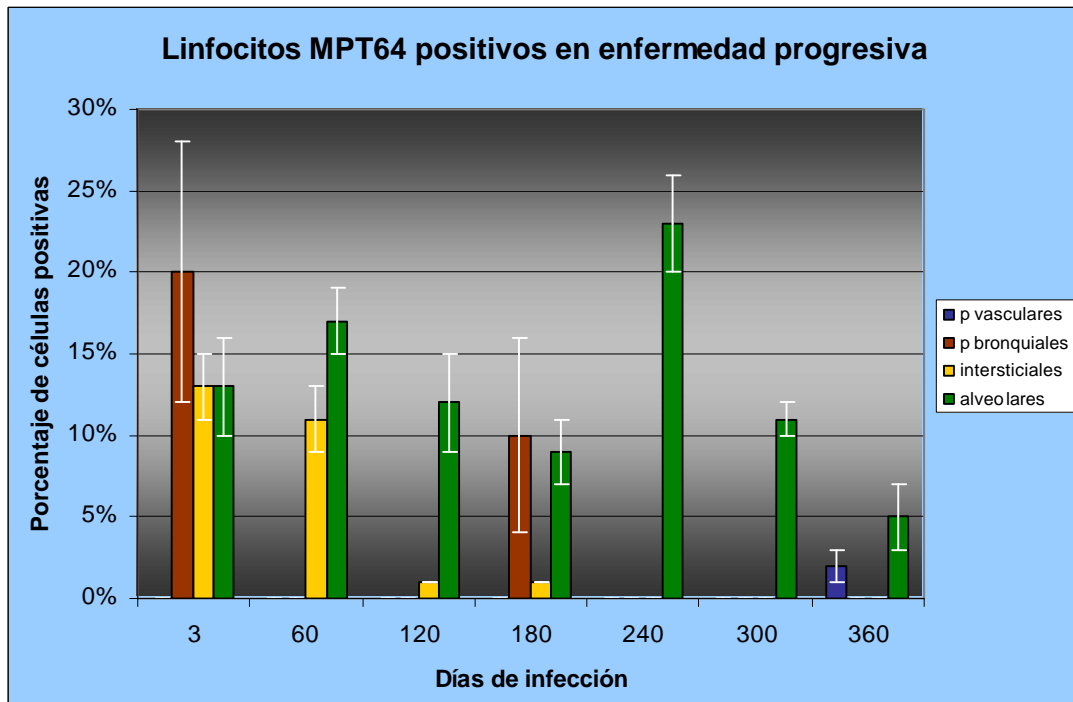


Gráfico 1.- Porcentaje de linfocitos con reacción positiva al anticuerpo anti-MPT64 en las 4 áreas de estudio en el modelo de enfermedad progresiva.

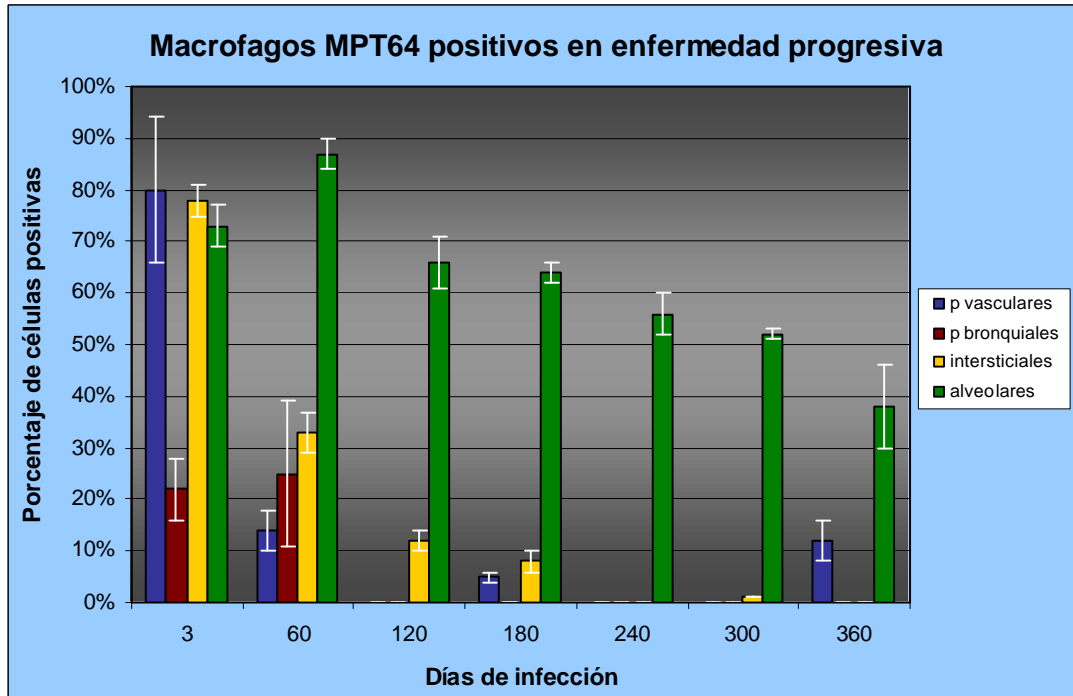


Gráfico 2.- Porcentaje de Macrófagos con reacción positiva al anticuerpo anti-MPT64 en las 4 áreas de estudio en el modelo de enfermedad progresiva

El Gráfico 1 muestra el porcentaje de linfocitos con reacción positiva al anticuerpo MPT64 en las diferentes zonas de estudio en los pulmones de ratones sacrificados en cada uno de los tiempos. El porcentaje de linfocitos positivos en el día 3 en la zona peribronquial es el mayor de esta zona durante el experimento, únicamente en el día 180 se presenta nuevamente esta reacción positiva en linfocitos.

La luz alveolar es la única zona de estudio que presentó linfocitos con marca positiva durante todo el experimento, los linfocitos positivos a MPT64 no presentaron un número constante o decreciente como lo presenta el intersticio pulmonar, el día con mayor número de células positivas fue el 240 con 23%.

En el Gráfico 2 se muestra el porcentaje de macrófagos MPT64 positivos en el modelo de enfermedad progresiva. A principio del experimento, se presenta un número similar de macrófagos positivos en las zonas perivascular, intersticial y alveolar, la zona peribronquial presenta células positivas solo en los dos primeros tiempos de estudio, en los alvéolos es la única zona en la que se presentan células positivas a lo largo de todo el experimento con un conteo máximo de 87% en el día 60 y un decremento a partir de este día que llega a ser de 38% en el día 360.

Infección Latente

A nivel de microscopía de luz los pulmones de ratones con infección latente no presentan células positivas durante los días 3, 60, 120 y 180 del experimento.

Los pulmones del día 240 presentan poca inflamación y lesiones pequeñas diseminadas sin marca. En los días 300 y 360 de experimento los pulmones presentan granulomas e inflamación con marca positiva para MPT64.

Los macrófagos y linfocitos marcados positivamente se localizaron exclusivamente en la luz alveolar y en la periferia de los granulomas.

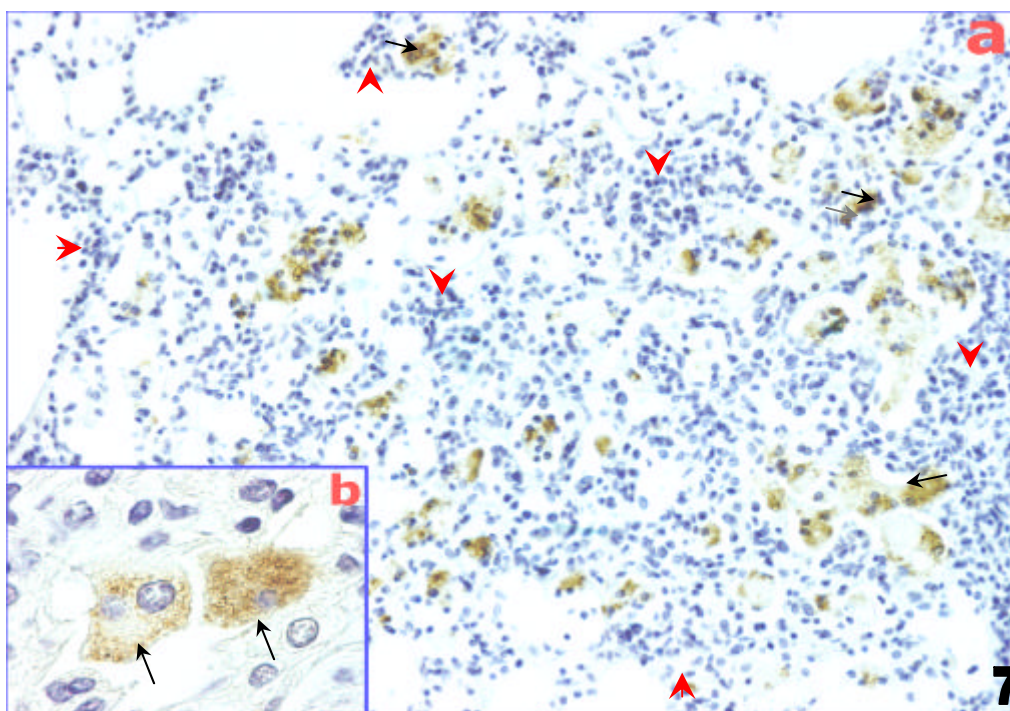


Foto micrografía 7 a y b.- Los pulmones del día 300 con infección latente muestran zonas con inflamación y pequeños granulomas (puntas de flecha roja en **a** 1000x), la marca positiva se presenta con mas frecuencia en macrófagos (flechas), los macrófagos presentan zonas citoplasmáticas positivas de aspecto granular y bacilar (flechas en **b** 1000x).

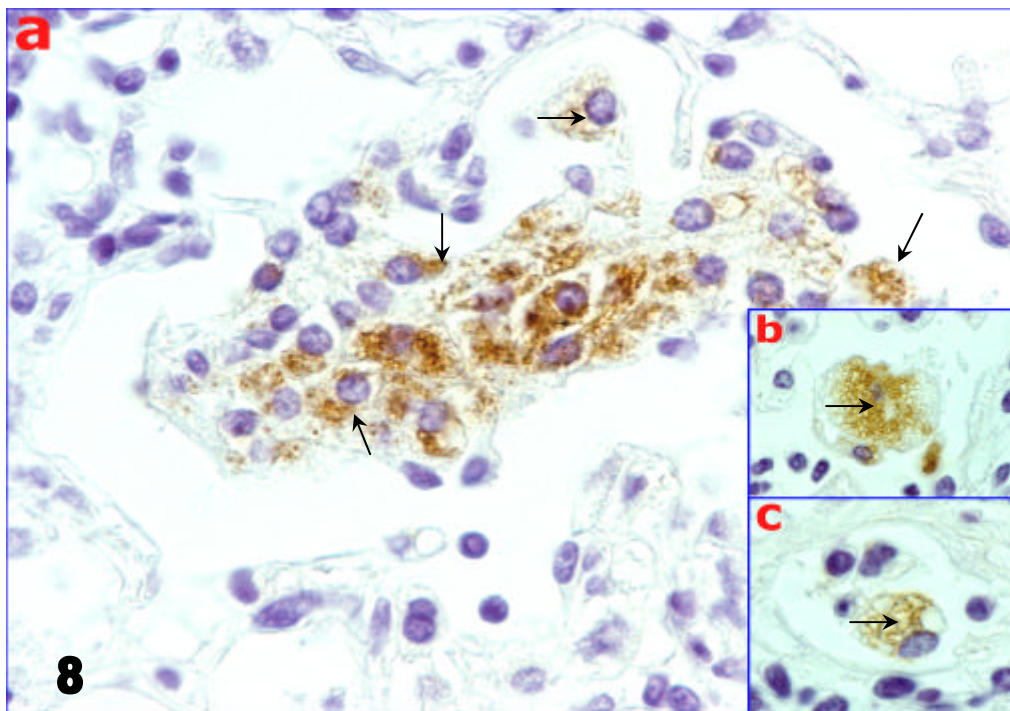


Foto micrografía 8 a, b y c – Los pulmones del día 360 con infección latente presentan zonas de alveolitis con cúmulos de células marcadas positivamente en los alvéolos pulmonares (flechas en **a** 400x) macrófagos con marca citoplasmática (**b** 1000x) y macrófagos vacuolados con marca citoplasmática (**c** 1000x).

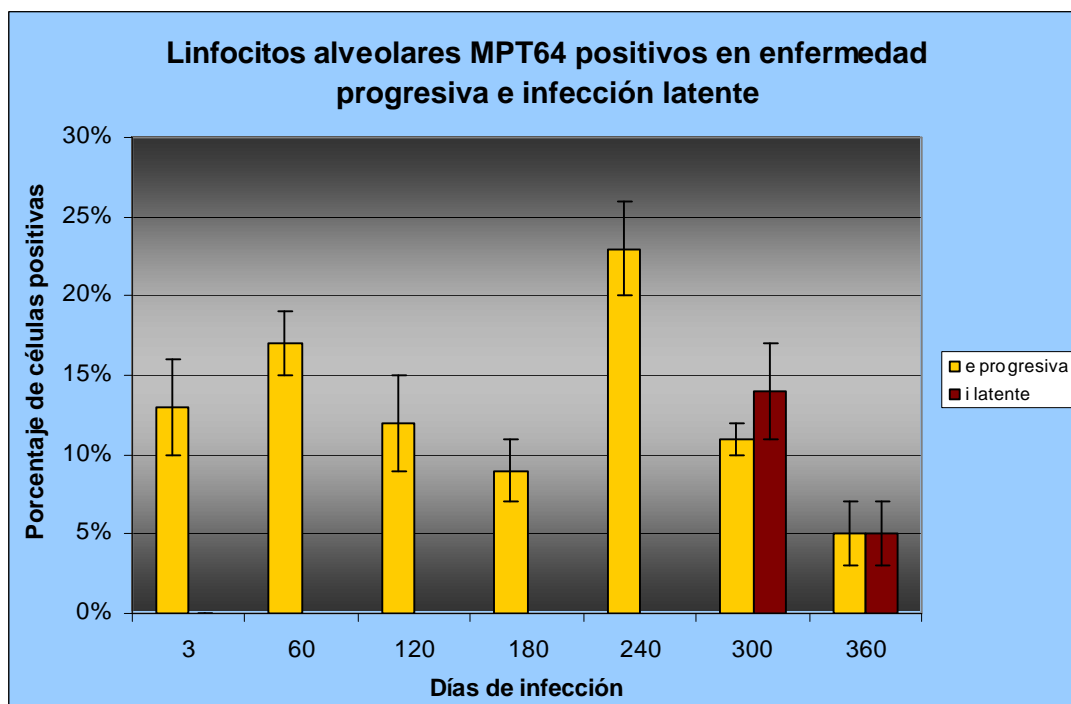


Gráfico 3.- Comparación de los porcentajes de linfocitos alveolares con reacción positiva al anticuerpo anti-MPT64 en infección latente y en enfermedad progresiva.

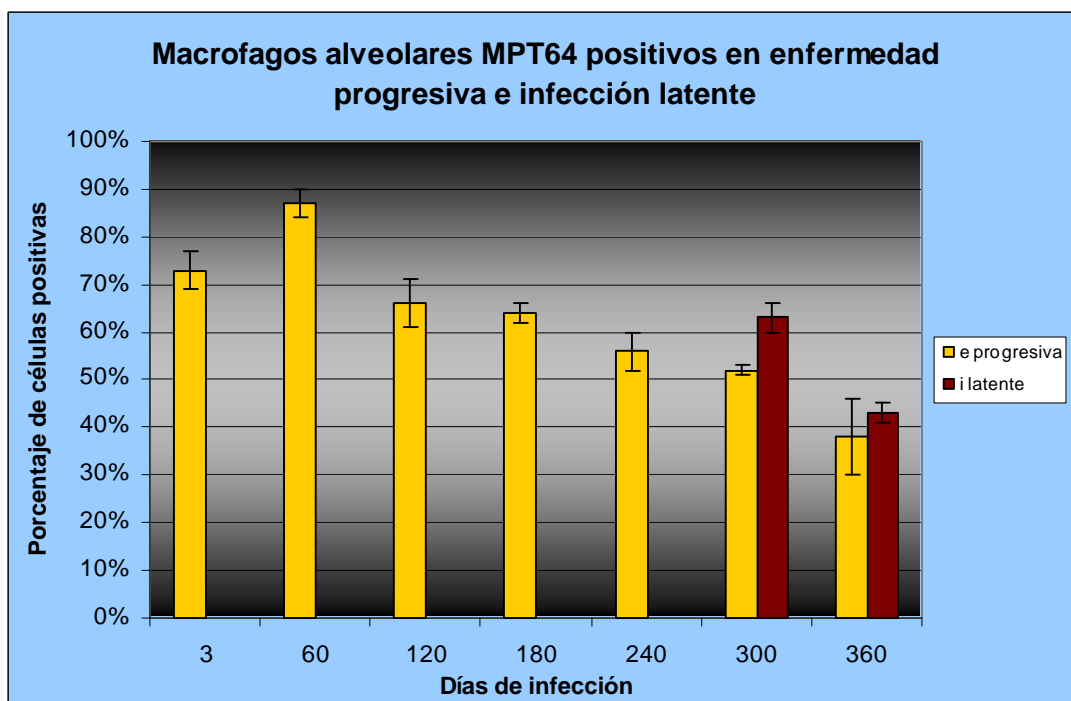


Gráfico 4.- Comparación de los porcentajes de macrófagos alveolares con reacción positiva al anticuerpo anti-MPT64 en infección latente y en enfermedad progresiva.

El Gráfico 3 muestra la comparación de los porcentajes de linfocitos con reacción positiva al anticuerpo MPT64 en los alvéolos pulmonares de ratones sacrificados en cada uno de los tiempos de estudio. El porcentaje de linfocitos positivos en el día 240 de la Enfermedad Progresiva es del 23% y es el tiempo en que se presenta el mayor número.

En el día 300 del experimento la Enfermedad Progresiva presenta un porcentaje del 11% de células positivas mientras que la Infección Latente un 14% .

En el día 360 se presenta una disminución de linfocitos positivos, en ambos casos es del 5%.

En el Gráfico 4 se muestra la comparación de porcentajes de macrófagos MPT64 positivos en el modelo de enfermedad progresiva e Infección Latente. El número de macrófagos positivos en el día 3 es de 73% y aumenta en el día 60 hasta 87%, a partir de éste día disminuye el porcentaje a medida que transcurre el tiempo del experimento. La Infección Latente en el día 300 presenta 63% de Macrófagos positivos mientras que la Enfermedad Progresiva presenta 52%. En el día 360 se presenta 38% en Enfermedad Progresiva y 42% en Infección Latente.

LAM

Enfermedad Progresiva

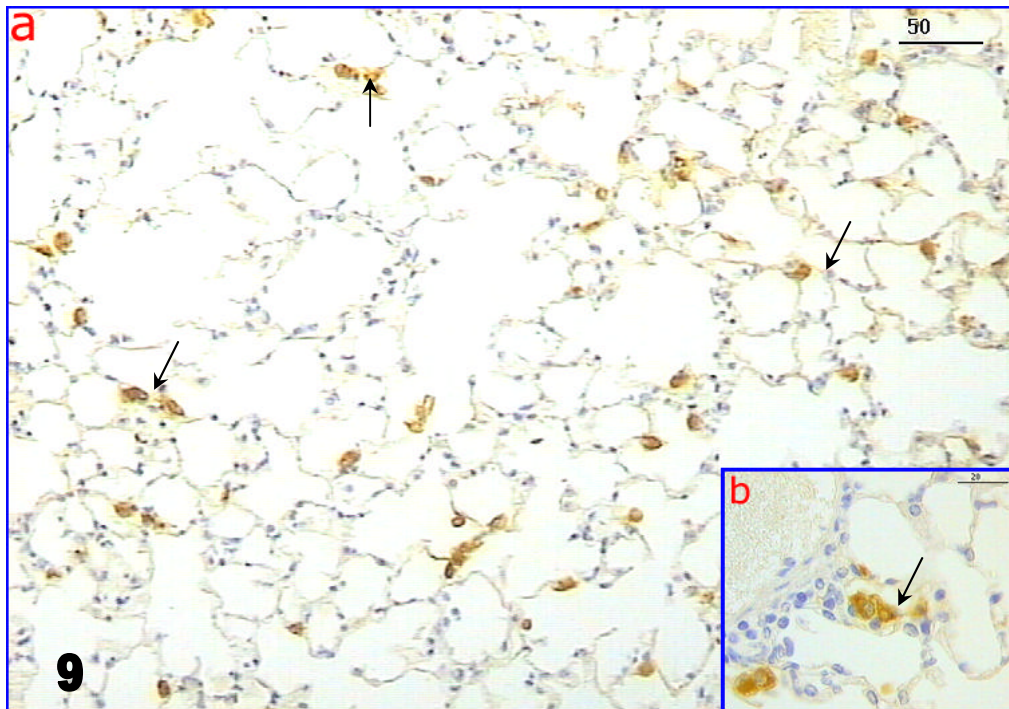
Las lesiones aumentan a medida que transcurre el tiempo de infección, en el día 3 (fotomicrografía 9 a y b) se muestra una reacción positiva en macrófagos diseminada en una gran parte de los espacios alveolares del pulmón y en linfocitos perivasculares, además de poca inflamación.

En el día 60 (fotomicrografía 10 a y b) se presenta la lesión más evidente y marca positiva anti-LAM al rededor de los granulomas que se presentan en el pulmón.

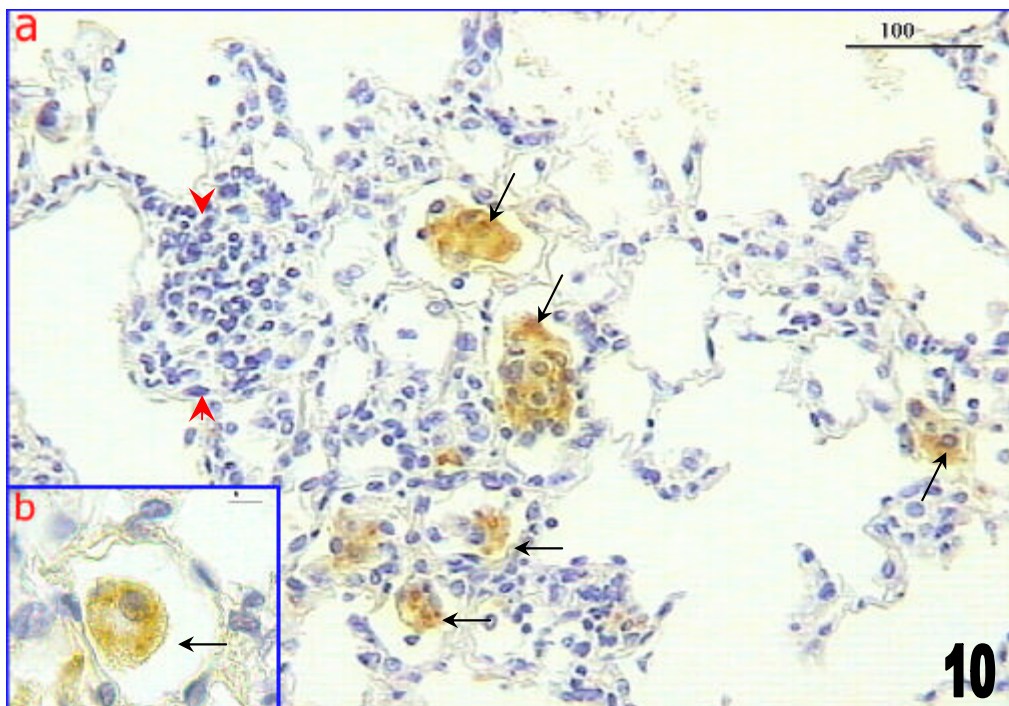
El infiltrado inflamatorio que se presentan en el día 120 es más evidente y la marca positiva se presenta predominantemente en los macrófagos alveolares (fotomicrografía 11 a y b).

Las lesiones pulmonares en el día 180 se extienden a la mayor parte del pulmón, se presentan células positivas con aspecto vacuolado dentro de los cúmulos de células que se encuentran en los espacios alveolares (fotomicrografía 12).

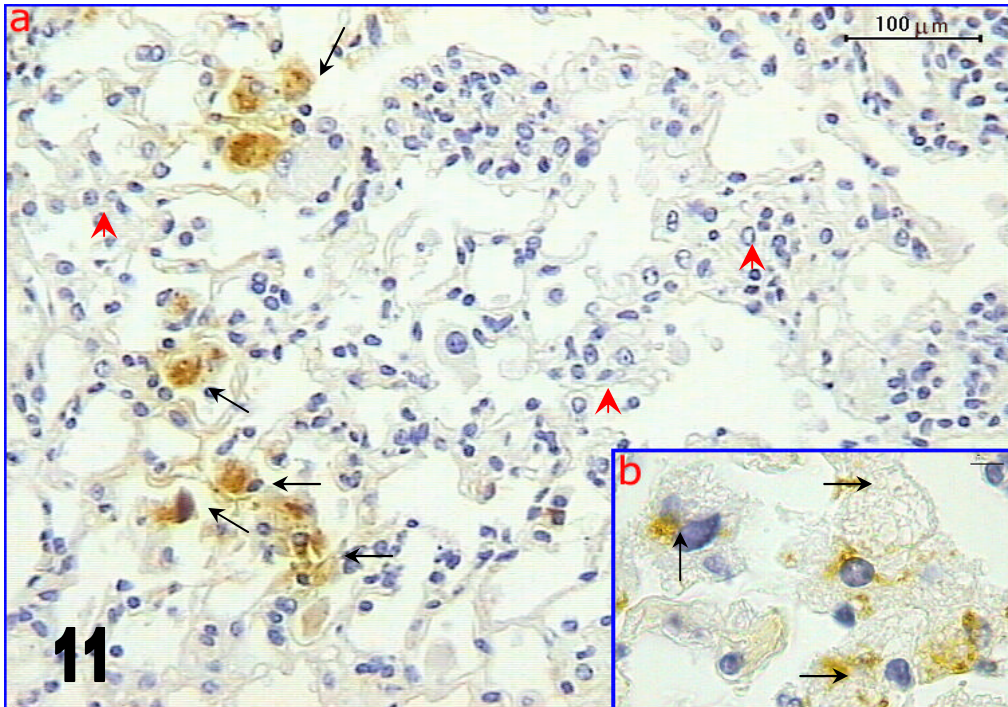
En los pulmones del día 300 hay neumonía extensa y marca positiva evidente en células agrupadas en los espacios alveolares (fotomicrografía 13).



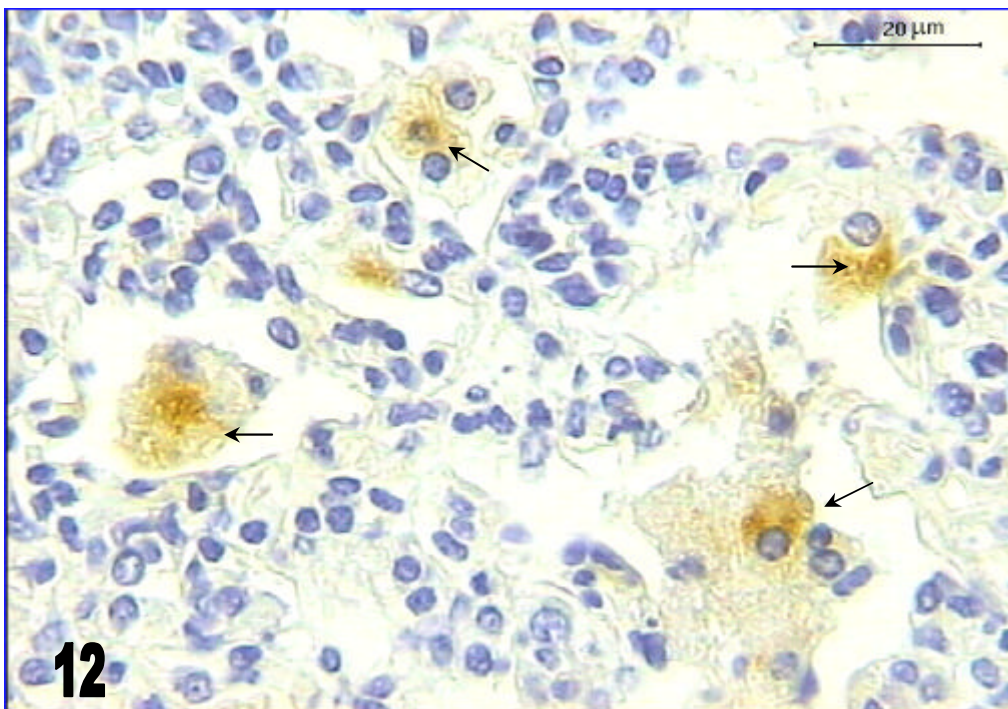
Fotomicrografía 9 a y b.- Los pulmones de ratones del día 3 con Enfermedad Progresiva presentan marca positiva contra LAM en los macrófagos alveolares (flechas en **a** 40x) y en linfocitos perivascuales (flecha en **b** 400x).



Fotomicrografía 10 a y b.- Los pulmones del día 60 con Enfermedad Progresiva presentan marca positiva en macrófagos alveolares (flechas en **a** 100x) agrupados en la periferia de los granulomas (cabeza de flecha) y un macrófago alveolar con marca de aspecto bacilar en **b** (1000x).



Fotomicrografía 11 a y b.- Los pulmones del día 120 con Enfermedad Progresiva presentan marca positiva en macrófagos alveolares (flechas en **a** 100x), infiltrado inflamatorio (cabeza de flecha), los macrófagos vacuolados presentan marca de forma bacilar y granular (flechas en **b** 1000x).



Fotomicrografía 12.- En el día 180 la lesión neumónica se extiende en una gran parte del pulmón las células positivas se encuentran dispersas (flechas) (400x).

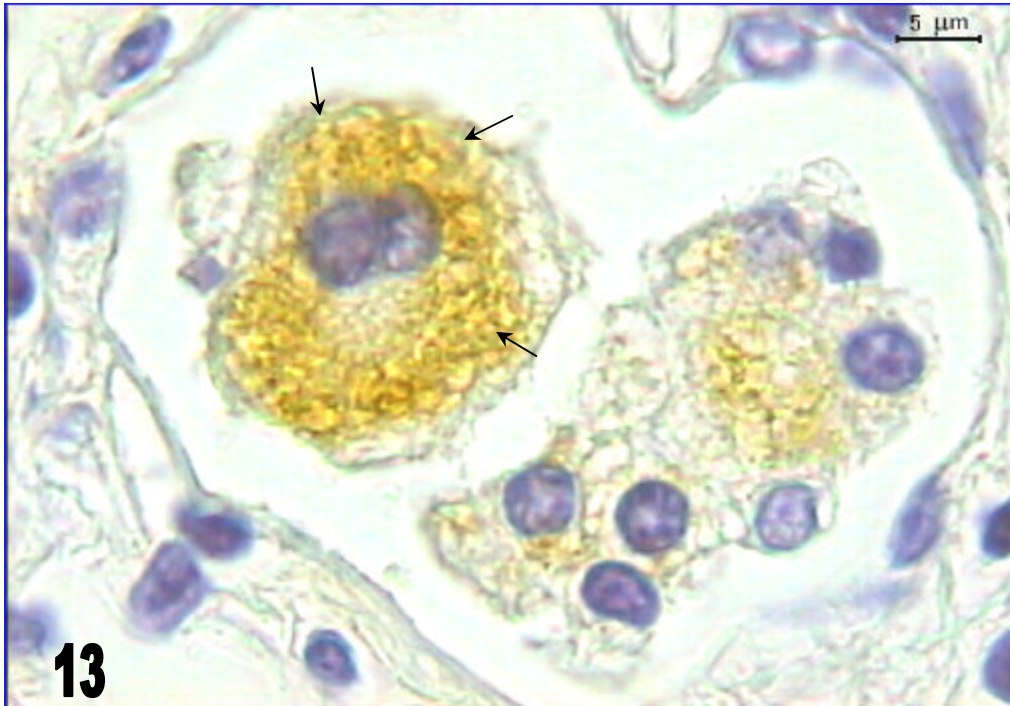


Foto micrografía 13.- Los pulmones del día 300 con Enfermedad Progresiva presentan marca positiva en células alveolares, los macrófagos presentan abundante marca citoplasmática (flechas) (1000x).

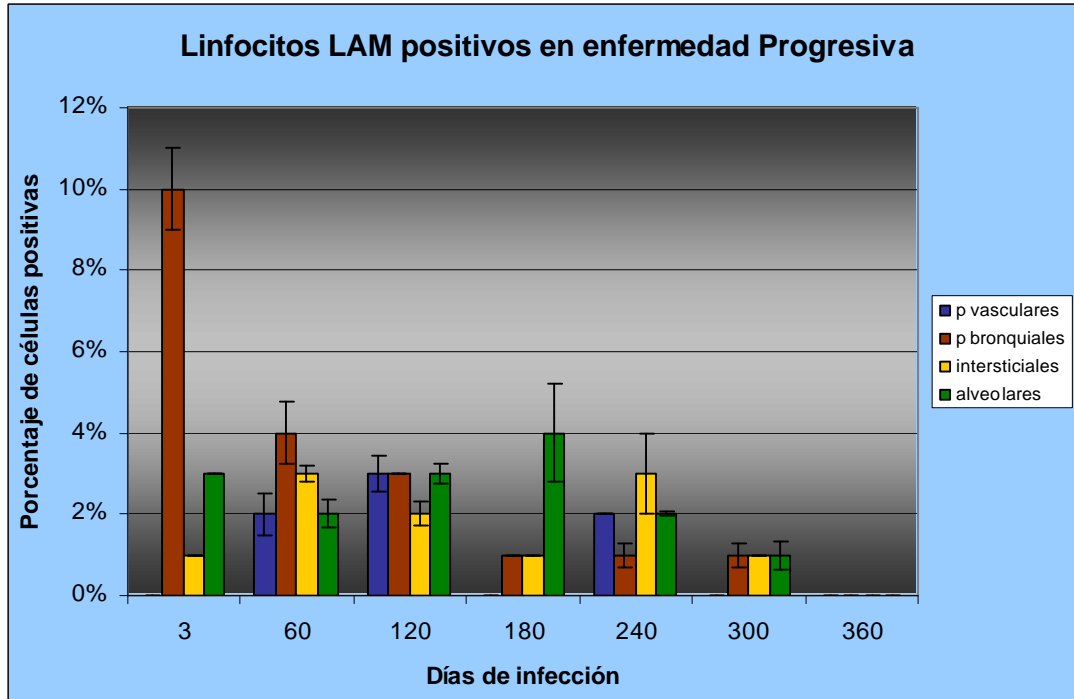


Gráfico 5.- Porcentaje de Linfocitos positivos al anticuerpo anti-LAM en las 4 áreas de estudio en los diferentes tiempos del experimento en el modelo de enfermedad progresiva.

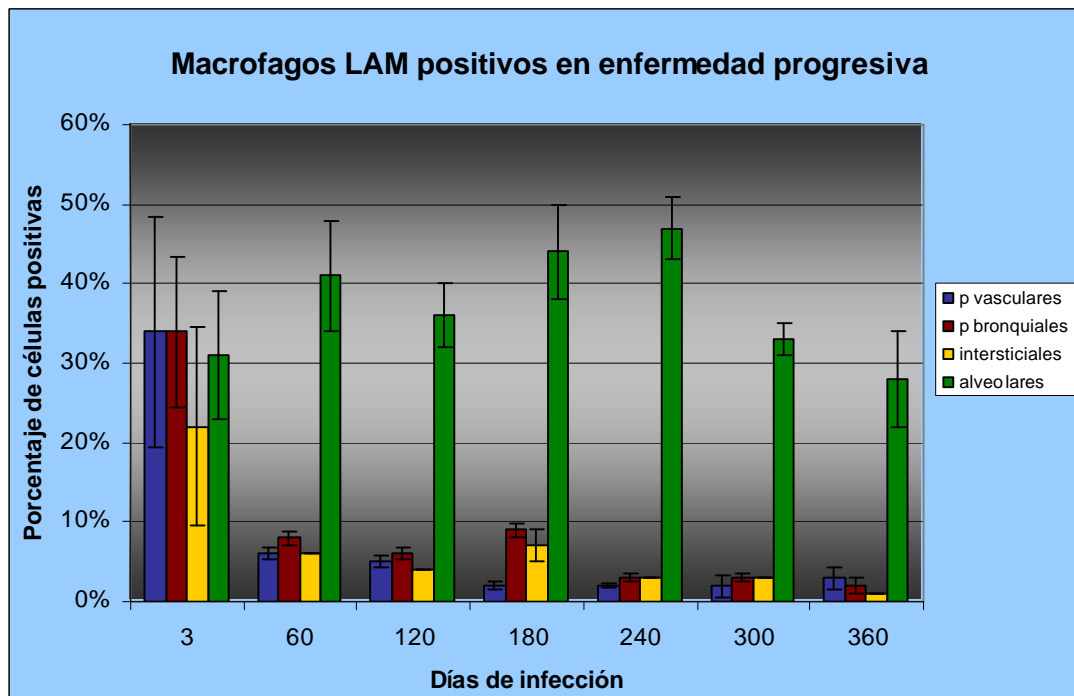


Gráfico 6.- Porcentaje de Macrófagos con reacción positiva al anticuerpo anti-LAM en las 4 áreas de estudio en los diferentes tiempos del experimento en el modelo de enfermedad progresiva.

El Gráfico 5 muestra el porcentaje de linfocitos con reacción positiva al anticuerpo LAM en los pulmones de ratones sacrificados en cada uno de los tiempos de estudio. El porcentaje de linfocitos positivos en el día 3 en la zona peri-bronquial es el mayor del experimento con 15% de células positivas, el intersticio y la zona peri-vascular presentan un porcentaje decreciente de células marcadas. El porcentaje de células marcadas positivamente presentes en la luz alveolar incrementan su número durante los primeros días del experimento hasta 7% en el día 180 y disminuyen hasta 1% en el día 360.

El gráfico 6 presenta los porcentajes de macrófagos con marca anti-LAM positiva en las cuatro zonas de estudio, en el día 3 todas las zonas presentan un número mayor al 22% de células positivas, sin embargo, solo en los alvéolos se incrementa este número con un máximo de 47% en el día 240, en las zonas del intersticio, peri-bronquial y peri-vascular el número de células positivas disminuye y nunca es mayor a 10%.

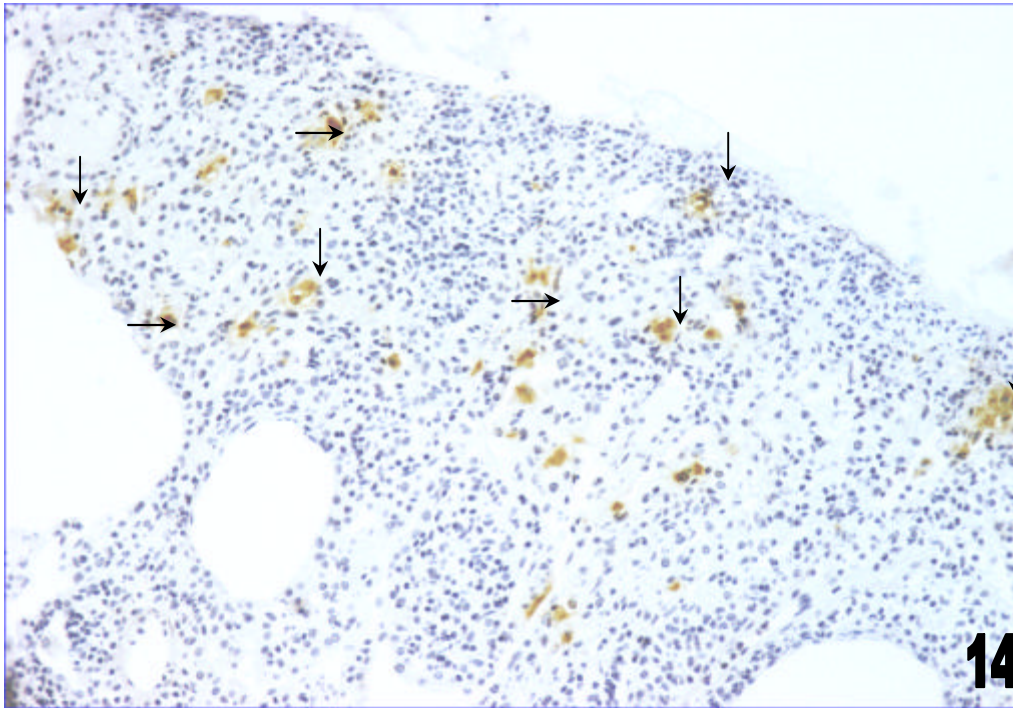
Infección Latente

Histológicamente los pulmones de ratones sacrificados a los días 3, 60, 120, y 180 no presentan células positivas y solo poca inflamación en el día 180.

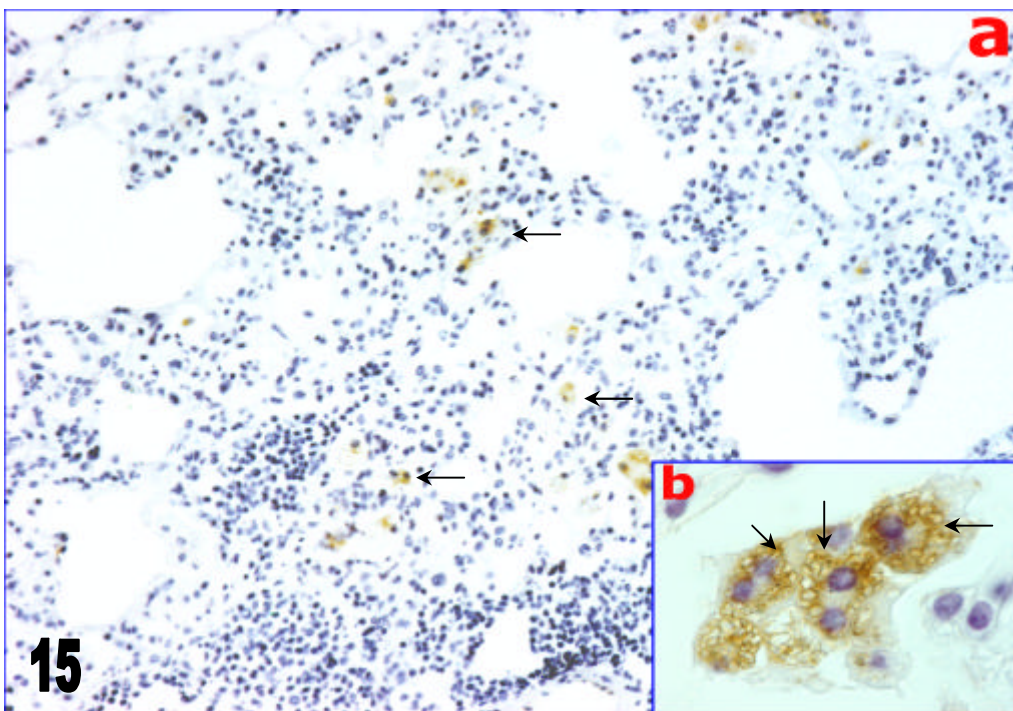
Pequeñas lesiones se presentan hasta el día 240, en este tiempo del experimento se presentan granulomas pequeños sin marca e inflamación esporádica.

En el día 300 del experimento las lesiones granulomatosas se hicieron evidentes y la inflamación se presentó en una mayor área del pulmón, las células LAM positivas se localizaron predominantemente dispersas en la luz alveolar (fotomicrografía 14).

En el día 360 los macrófagos y linfocitos positivamente marcados se localizaron exclusivamente en la luz alveolar y en la periferia de los pequeños granulomas (fotomicrografía 15 a y b).



Fotomicrografía 14.- Los pulmones del día 300 con Infección Latente presentan marca positiva predominantemente en macrófagos alveolares (flechas)(40x).



Fotomicrografía 15 a y b.- Los pulmones del día 360 con Infección Latente presentan marca positiva en macrófagos diseminados en los alvéolos pulmonares (flechas en **a** 40x) y en el citoplasma de células vacuoladas (flechas en **b** 1000x).

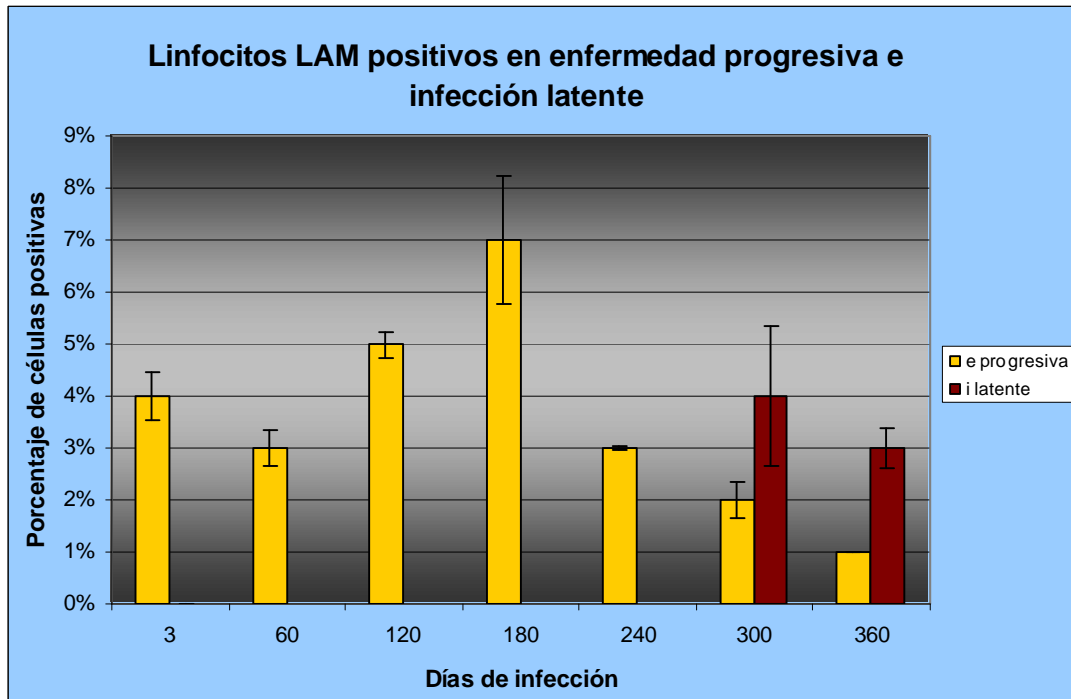


Gráfico 7.- Comparación de los porcentajes de linfocitos alveolares con reacción positiva al anticuerpo anti-LAM en los modelos de infección latente y de enfermedad progresiva.

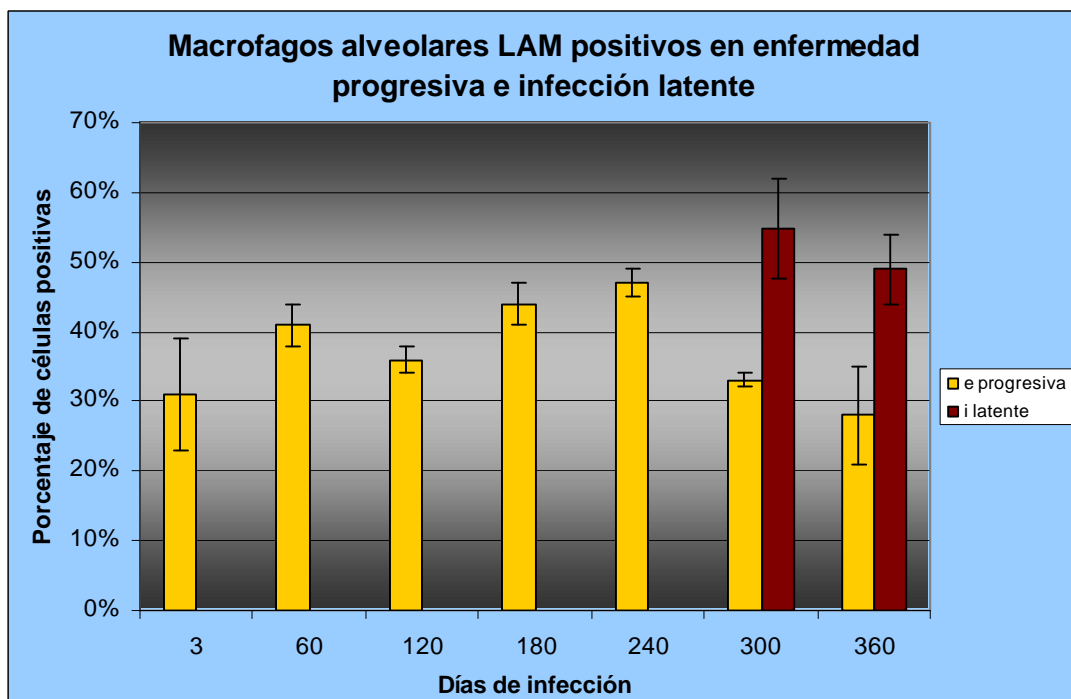


Gráfico 8.- Comparación de los porcentajes de macrófagos alveolares con reacción positiva al anticuerpo anti-LAM en los modelos de infección latente y en el de enfermedad progresiva.

En el Gráfico 7 se presenta la comparación de los porcentajes de linfocitos con reacción positiva al anticuerpo LAM en los alvéolos pulmonares de ratones sacrificados en cada uno de los tiempos de estudio. Los porcentajes de linfocitos positivos tanto en la Enfermedad Progresiva como en la Infección latente en ningún día son mayores al 7%.

El porcentaje de linfocitos positivos en el día 180 de la Enfermedad Progresiva es del 7% éste es el día en que se presenta el porcentaje más alto de linfocitos marcados, a partir de este día disminuye siendo del 1% en el día 360. En la Infección Latente se presentan linfocitos positivos a partir del día 300, en este día el porcentaje es de 2% y disminuye conforme avanza el tiempo de infección siendo del 1% en el 360.

El Gráfico 8 se muestra los porcentajes de Macrófagos positivos para LAM en Enfermedad Progresiva e Infección Latente en los alvéolos pulmonares. La Enfermedad Progresiva presenta un aumento en el porcentaje de Macrófagos positivos hasta el día 240 con excepción del día 120, en los últimos 2 tiempos de estudio el porcentaje disminuye a 33% en el día 300 y a 28% en el día 360.

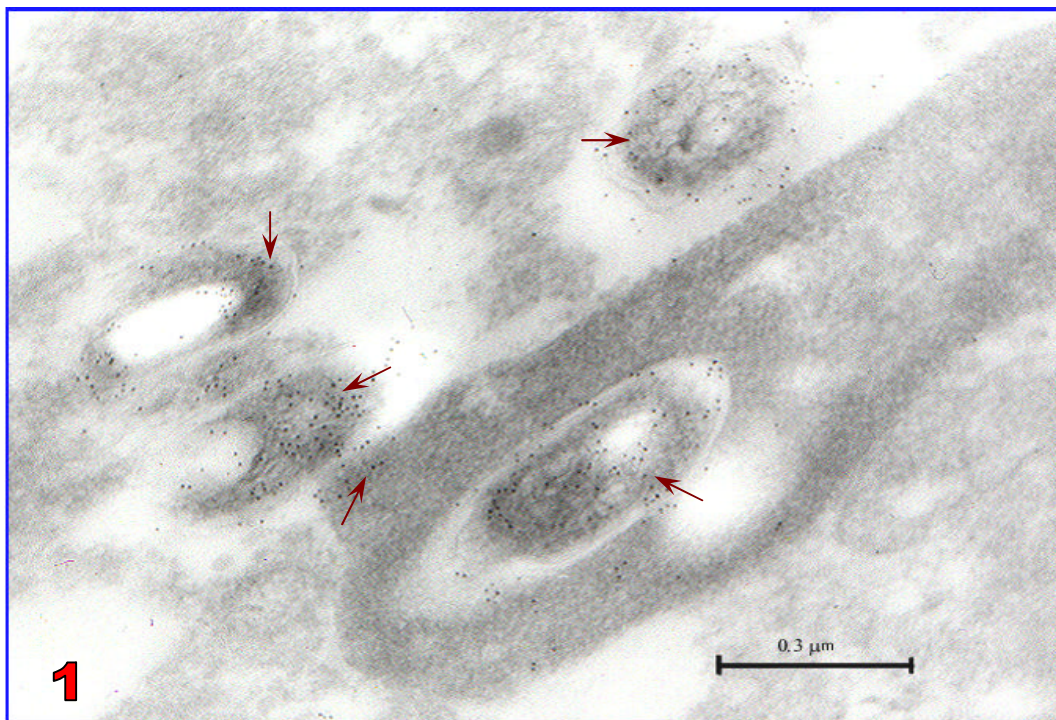
Immunomicroscopía Electrónica.

Para los estudios de IME se evaluaron a nivel de microscopía de luz con cortes semifinos los pulmones que resultaron con actividad positiva en inmunohistoquímica, tanto en Enfermedad Progresiva como en Infección Latente, se delimitaron las zonas con lesión y se realizaron cortes finos de 1 bloque por cada uno de los tiempos de estudio.

Los cortes finos montados en rejillas de níquel se incubaron con los anticuerpos anti-MPT64 y anti-LAM para localizar subcelularmente cada uno de los antígenos.

MPT64

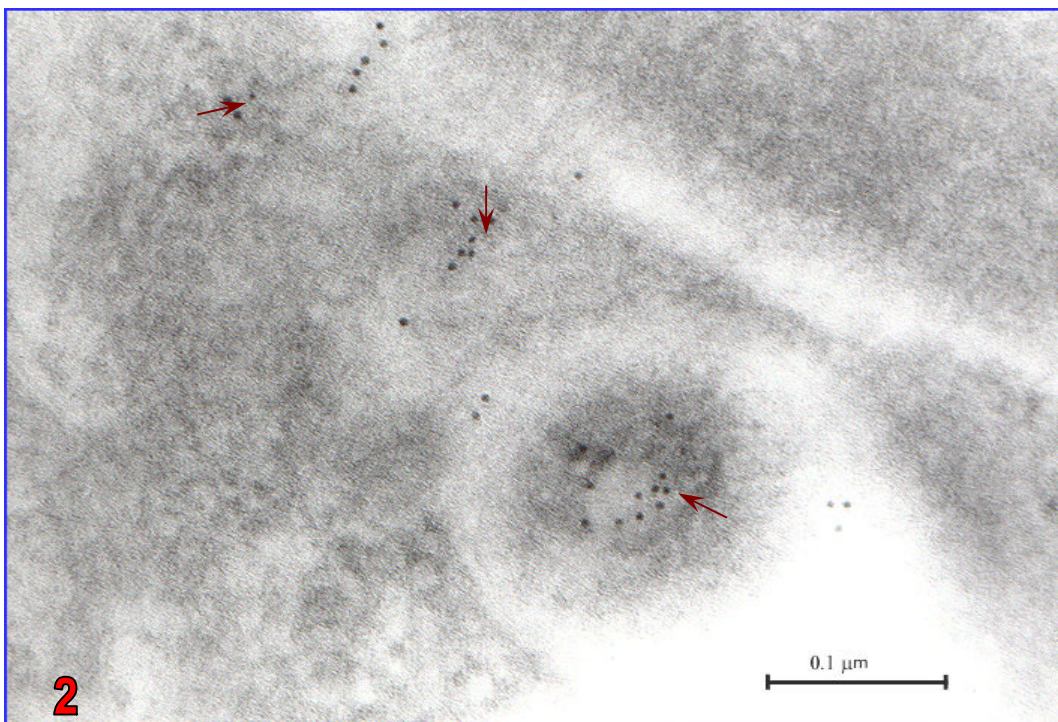
Enfermedad Progresiva



Fotomicrografía Electrónica 1.- Ultra estructuralmente la marca con oro coloidal (flechas) en el día 300 de la Enfermedad Progresiva se circunscribe a los bacilos presentes en los macrófagos alveolares.

En todos los tiempos de estudio de la Enfermedad Progresiva la marca positiva anti-MPT64 predominó en el citoplasma, pared celular y membrana de las micobacterias presentes en dentro de los macrófagos. La foto micrografía electrónica 1 muestra a cuatro bacilos dentro de un macrófago con marca abundante en el día 300.

Infeción Latente

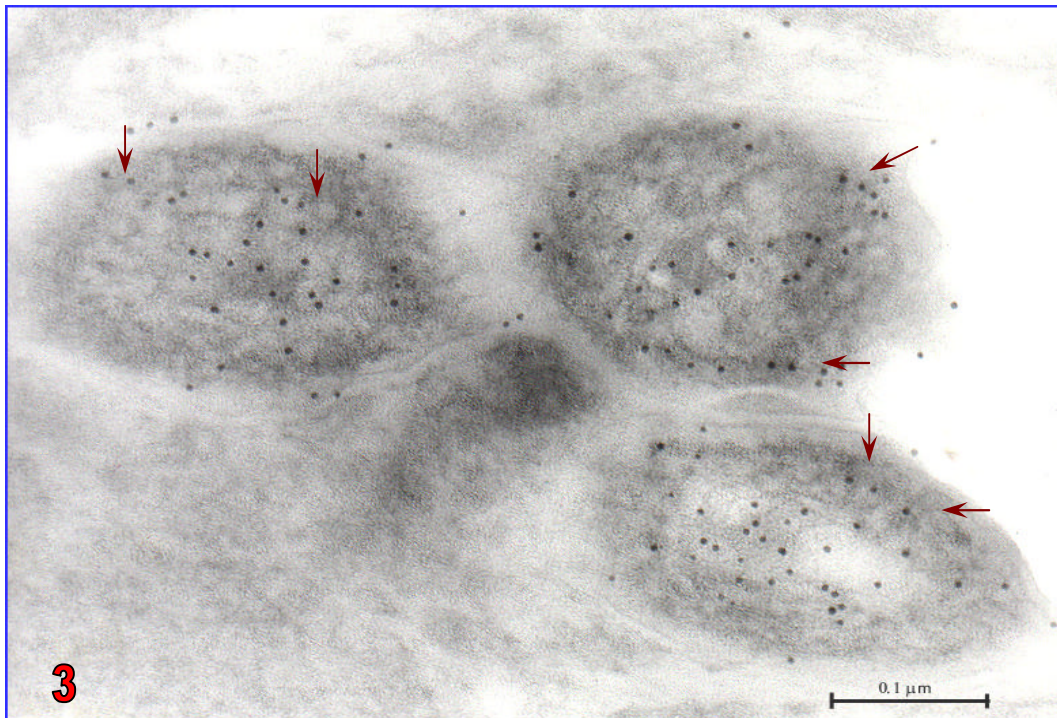


Fotomicrografía Electrónica 2.- Se muestra a un bacilo a gran aumento, las partículas de oro coloidal (flechas) son más escasas.

En la Infección Latente el oro coloidal que marca los sitios en los que se encuentra en anticuerpo MPT64 disminuye en número, la marca en los bacilos se presenta en citoplasma, pared y membrana celular. En este caso la exploración de las células y realizó a más grandes aumentos puesto que el número de partículas de oro fue menor.

LAM

Enfermedad Progresiva

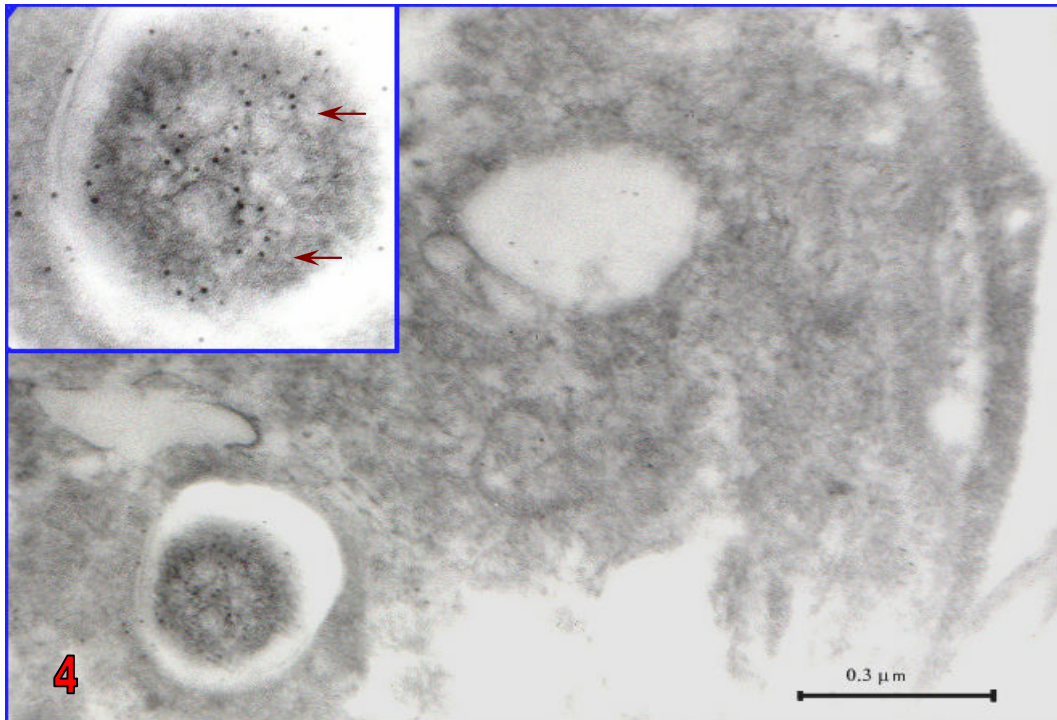


Fotomicrografía Electrónica 3.- Se muestran tres bacilos dentro de un macrófago del día 300 del experimento con partículas de oro coloidal (flechas).

La marca positiva ultra estructural del antígeno LAM en el modelo de Enfermedad Progresiva se presentó en bacilos dentro de macrófagos, la marca se localizó en el citoplasma, pared celular y membrana de las micobacterias.

El número de partículas de oro coloidal dentro de los bacilos muestra la especificidad del anticuerpo por el antígeno presente dentro de las micobacterias.

Infección Latente



Fotomicrografía Electrónica 4.- Se presenta parte del citoplasma de un macrófago con un bacilo, la marca de oro coloidal es específica al bacilo (flechas).

En el modelo de Infección Latente disminuyó el número de bacilos dentro de los macrófagos, la marca de oro coloidal contra LAM se presentó en el citoplasma, en la pared y en la membrana celular de los bacilos.

El número de partículas de oro coloidal dentro de los bacilos muestra la especificidad del anticuerpo por el antígeno presente dentro de las micobacterias.

Los linfocitos no se encontraron en los cortes finos de los últimos días del experimento, en los primeros días se presentaron en un bajo número.

DISCUSIÓN

El resurgimiento de la tuberculosis como un problema de salud pública hace evidente la necesidad de un conocimiento más detallado de la micobacteria para un control de esta enfermedad y hacer que estos conocimientos eventualmente se puedan aplicar en diagnósticos oportunos y en vacunas eficientes (Palendira y col., 2002; Harboe y col., 1998; Mark y col., 2002.; Kamath y col., 1999), además de estudios detallados en los que se discutan los mecanismos que usa la micobacteria para su sobrevivencia dentro de células especializadas en su eliminación y su proceso de adaptabilidad a diferentes células tanto dentro del pulmón como fuera de él (García y Valdespino 2001; Rook y Hernández-Pando R. 1996.).

En estudios previos (Yamaguchi y col., 1989.; Andersen y col., 1991.; De Mendonca-Lima y col., 2001; Berthet y col., 1995) se analizan proteínas que secretan las diferentes cepas de micobacterias pertenecientes al complejo tuberculosis en los medios de cultivo durante su crecimiento y demuestran que estas proteínas son sintetizadas específicamente por estos organismos.

La alta especificidad de estas proteínas las provee de cualidades para considerarlas como una alternativa de inmunización y así predisponer al sistema inmunológico para un adecuado control de la enfermedad (Yamaguchi y col., 1989.; Andersen y col., 1991).

Algunas de estas proteínas posiblemente estén relacionados con algún mecanismo de multiplicación de la micobacteria puesto que su expresión es evidente mientras cuenta con condiciones óptimas para su crecimiento (Harboe y col., 1998; De Mendonca-Lima y col., 2001; Berthet y col., 1995) sin embargo, las condiciones que se presentan dentro del pulmón una vez que la micobacteria entro

al hospedero por vía aérea no son las mismas en las que se mantienen durante el cultivo, puesto que para sobrevivir dentro del pulmón tiene que enfrentar al sistema inmunológico del hospedero, estas condiciones son adversas para la micobacteria y es precisamente esto lo que hace interesante que la micobacteria exprese las mismas proteínas en ambos casos.

La utilidad de las proteínas que secretan las micobacterias durante su crecimiento ha sido ampliamente cuestionada y probada en modelos de infección intravenosa y en las pruebas de PPD en modelos animales y en humanos (Elhay y col., 1998), también se han usado fragmentos de DNA que codifican para estas proteínas como presentadores de antígenos (Mustafa 2002; Palendira y col., 2002.; Kamath y col., 1999.), sin embargo, los estudios realizados con filtrados de medios de cultivo no aseguran que dentro de los pulmones las micobacterias siguen sintetizando estas proteínas aun cuando se encuentran en crecimiento, con la técnica de IHQ se demostró que de los 5 anticuerpos probados en los modelos de E-P y en I-L (anti-MPT59, anti-MPB83, anti-MPB70, anti-MPT64 y anti-LAM) solo 2 (anti-MPT64 y anti-LAM) presentaron reacción positiva lo cual demuestra que están presentes en los pulmones de los ratones, mientras que los anticuerpos contra las proteínas MPT59, MPB83 y MPB70 no presentaron reacción positiva.

La proteína MPT59 provoca una considerable reacción cutánea positiva en ratones expuestos previamente a componentes de *Mycobacterium tuberculosis* (Yanagisawa y col., 1997; Kariyone y col., 2003.) sin embargo en los pulmones de enfermedad progresiva y de infección latente no se encontró reacción positiva con el anticuerpo anti-MPT59.

La proteína MPB70 presenta una alta homología con la proteína MPB83, ambas son expresadas por *Mycobacterium bovis* (Nagai y col., 1981.; Oettinger y Andersen

1994.; Mioura y col., 1983. Harboe y col., 1986) sin embargo en el modelo de tuberculosis pulmonar experimental usando *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv no se presenta reacción positiva con IHQ, pese a que pertenecen al complejo tuberculosis.

La entrada de cuerpos extraños como las micobacterias al organismo es controlada por los macrófagos, una vez que éstos han fagocitado estos cuerpos se aglutinan formando granulomas (Frehel y col., 1991.) por lo que no es extraño que presenten marca positiva suponiendo que son las micobacterias las productoras de las proteínas y por lo tanto de la reacción positiva de IHQ, sin embargo, en los MA se encuentra reacción positiva en todos los tiempos del experimento.

Por otro lado, los linfocitos no son células fagocíticas y a largo del experimento presentan reacción positiva, esta marca positiva es también contra los anticuerpos anti-MPT64 y anti-LAM. La posible explicación de la reacción positiva que presentan los linfocitos es la eventual presencia de epítopes específicos contra las proteínas que secreta la micobacteria, en este caso las proteínas MPT64 y LAM y que posiblemente estén siendo reconocidas por el anticuerpo anti-MPT64 y anti-LAM.

La importancia de los productos que secretan las micobacterias durante su cultivo radica en su posible utilización como productos inmunogénicos tanto para vacunación como para diagnóstico, por lo que la utilidad de las proteínas que secretan las micobacterias toman importancia significativa, algunas de estas proteínas han sido probadas en modelos de tuberculosis por infección intravenosa y en las pruebas de PPD en modelos animales y en humanos (Elhay y col., 1998), también se han usado los fragmentos de DNA que codifican estas proteínas como presentadores de antígenos (Mustafa 2002; Palendira y col., 2002.; Kamath y col., 1999.), sin embargo, la presencia de estos productos dentro de los pulmones de

ratones usados el modelo de TPE tanto con E-P y con I-L, les confieren un papel importante dentro de la enfermedad, puesto que pueden ser candidatos viables para ser utilizados como productos inmunogénicos específicos de *Mycobacterium*.

Los resultados negativos con IHQ sugieren que las proteínas MPT59, MPB83 y MPB70 no son sintetizadas por la micobacteria durante el estado latente ni cuando la micobacteria está provocando en el huésped Enfermedad Progresiva, sin embargo los estudios previos en los que las reacciones de DTH y PPD son positivas usando algunos de estos productos muestran que estos componentes son reconocidos por el sistema inmunológico como productos inmunogénicos (Yanagisawa y col., 1997; Mioura y col., 1983), por lo que los resultados en los que se obtuvo reacción negativa con IHQ pueden ser atribuibles tal vez a la sensibilidad de la técnica que se empleó y no solo por la ausencia de la proteína, para complementar este estudio es importante plantear el uso de una técnica más sensible que la IHQ para tener la seguridad de que en verdad no se están sintetizando estos productos.

Con la microscopía de luz se hizo evidente la reacción positiva en MA y en linfocitos, sin embargo no se tenía la certeza que esta marca fuera específica de los bacilos que se encuentran dentro de ellas, para demostrar que el bacilo es el responsable de la reacción positiva se usó la técnica de IME, para esta técnica se utilizaron los anticuerpos que presentaron reacción positiva en IHQ (anti-MPT64 y anti-LAM), los objetivos buscados al utilizar la técnica de IME fueron alcanzados quedando así demostrado que la marca positiva presente en los MA es específica de las micobacterias.

CONCLUSIONES

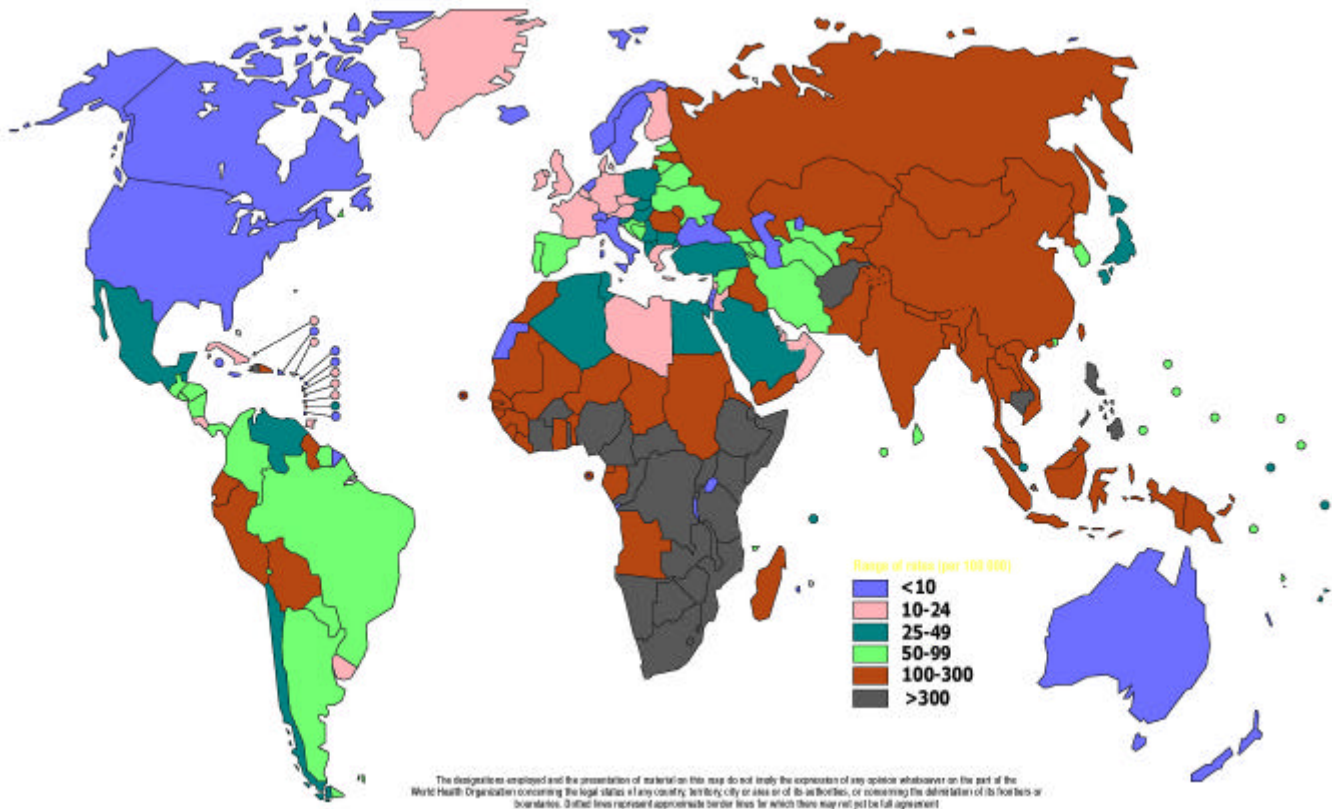
Con los estudios Inmunohistoquímicos y de Inmunomicroscopía Electrónica utilizando anticuerpos inmunodominantes de micobacterias en el modelo de tuberculosis pulmonar experimental con infección latente y enfermedad progresiva se encontró que:

- Los anticuerpos MPT59, MPB70, MPB83 y MPB70 no presentan reacción positiva por inmunohistoquímica en los pulmones de ratones infectados con *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv
- Los anticuerpos contra MPT64 y LAM presentan reacción positiva en los linfocitos y macrófagos alveolares de ratones infectados con *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv desde la infección y hasta el día 360 en el modelo de tuberculosis pulmonar experimental con enfermedad progresiva.
- En el modelo de infección latente con *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv los linfocitos y los macrófagos solo presentan reacción positiva contra MPT64 y LAM a partir del día 300 post-infección.
- En el intersticio y en las zonas perivasculares y peribronquiales presentan linfocitos y macrófagos con reacción inmunohistoquímica positiva contra los anticuerpos anti-MPT64 y anti-LAM durante los primeros días de estudio del modelo de tuberculosis pulmonar experimental con enfermedad progresiva y disminuyen su número a medida que transcurren los días de infección.
- Los macrófagos con reacción positiva con el anticuerpo anti-LAM en las zonas perivasculares, peribronquiales y en el intersticio se presentan a lo largo de todo el tiempo de estudio en el modelo de tuberculosis pulmonar experimental con

enfermedad progresiva aunque el porcentaje en los primeros día es similar a los encontrados en los alvéolos se reduce drásticamente y de manera decreciente después del día 60.

APENDICE 1

”Mapa O. M. S.”



Mapa de la estimación hecha por la Organización Mundial de la Salud en el año de 1999, los colores representan el numero de casos por cada 100,000 habitantes (World Health Organization. Global Tuberculosis Control 2001).

APENDICE 2

”Ratones B6D2F1”

Los ratones usados para este experimento son una cruce de 2 cepas, la C57BL/6J y la DBA/2J.

Para diferenciar la cepas de ratones resistentes a tuberculosis es tomada en cuenta la carga bacilar en bazo de los ratones infectados con micobacterias de la cepa BCG 3 semanas después de la infección. C57BL/6J es susceptible a Bcg (Bcg^s) mientras que DBA/2J es resistente a Bcg (Bcg^r).

Sin embargo, cuando los ratones de ambas cepas son infectados con *Mycobacterium tuberculosis* y son comparados los tiempos de supervivencia entre C57BL/6J (Bcg^s) y DBA/2J (Bcg^r) el tiempo de sobre vivencia de la primer cepa es más largo que el de la segunda

Se ha reportado que tanto en ratones como en humanos los genes MHC (HLA o H2) confieren resistencia al organismo en contra de la infección con *Mycobacterium tuberculosis* (Buschmann, Apt, Nickonenko, Moroz, Averbakh, Skamene. 1988; Medina, Nort. 1998.) aunque esta resistencia se basa en la formación de granulomas en el sitio de inoculación

Estudios previos realizados con la cepa B6D2F1 muestran que el tiempo promedio de supervivencia de estos animales cuando son infectados con 1×10^5 UFC es de 203 a 270 días (Dunn, North. 1995; Arriaga, Orozco, Aguilar, Rook & Hernández. 2002).

APENDICE 3

"Técnicas"

- **3.1.- Técnica Histológica para Inmunohistoquímica.**

Fijación: Alcohol etílico al 100% por 24 hr.

Deshidratación: Alcohol Etílico al 80% por 1 hr. en agitación.
Alcohol Etílico al 80% por 1 hr. en agitación.
Alcohol Etílico al 96% por 1 hr. en agitación.
Alcohol Etílico al 96% por 1 hr. en agitación.
Alcohol Etílico al 100% por 1 hr. en agitación.
Alcohol Etílico al 100% por 1 hr. en agitación.

Aclaración: Xilol absoluto-alcohol etílico absoluto (1/1 v/v) por 1 hr. en agitación.
Xilol absoluto-alcohol etílico absoluto (1/1 v/v) por 1 hr. en agitación.
Xilol absoluto por 1 hr. en agitación.
Xilol absoluto por 1 hr. en agitación.

Infiltración: Parafina (Paraplast) a 56° C 1 hr. en agitación.
Parafina (Paraplast) a 56° C 1 hr. en agitación.

Inclusión: Parafina (Paraplast) a 50° C enfriada a 0° C.

- **3.2.- Técnica de Inmunohistoquímica DAB para localización de antígenos en parafina.**

Desparafinar: Las laminillas con cortes de tejidos de 3-4 μm de espesor montadas en laminillas previamente cubiertas con silano se desparafinan a 60° C.
Xilol absoluto 10 min.
Xilol absoluto 10 min.

Hidratación: Xilol absoluto-alcohol etílico absoluto (1/1 v/v) por 10 min.
Xilol absoluto-alcohol etílico absoluto (1/1 v/v) por 10 min.
Alcohol etílico absoluto por 10 min.
Alcohol etílico absoluto por 10 min.
Alcohol etílico al 96% por 10 min.
Alcohol etílico al 96% por 10 min.

Inhibición de Peroxidasa endógena: Peróxido de hidrogeno al 15% en Metanol por 1 hr.

Lavado: Alcohol etílico al 96% por 10 min.
Agua corriente 10 min.
Buffer de Fosfatos Salino (PBS) por 10 min.

Bloqueo: Albúmina Sérica Bovina (BSA) al 3% en PBS por 30 min.

Anticuerpo Primario: Diluido con BSA al 1% en PBS por 12 hr.

Lavado: PBS por 15 min.

Anticuerpo Secundario: IgG de conejo biotinilado diluido en BSA al 1% en PBS por 1 ½ hr.

Lavado: PBS por 15 min.

Incubación con Avidina: con solución pura por ½ hr.

Lavado: PBS por 10 min.
PBS por 10 min.

Revelado: Solución de Diaminobenzidina-Peróxido de Hidrogeno al 30% (1/1 v/v) por 45 seg.

Lavado: PBS por 10 min.
PBS por 10 min.
Agua corriente 15 min.

Contraste: Hematoxilina de Harris por 7 min.
Lavado con agua corriente por 2 min.
Lavado rápido con alcohol ácido.

Lavado con agua corriente por 2 min.
Lavado rápido con solución saturada de Carbonato de Litio
Lavado en agua corriente por 5 min.

Deshidratación:

Alcohol etílico al 96% por 10 min.
Alcohol etílico al 96% por 10 min.
Alcohol etílico absoluto por 10 min.
Alcohol etílico absoluto por 10 min.
Xilol absoluto-alcohol etílico absoluto (1/1 v/v) por 10 min.
Xilol absoluto-alcohol etílico absoluto (1/1 v/v) por 10 min.
Xilol absoluto 10 min.
Xilol absoluto 10 min.

Montaje.

• **3.3.- Técnica de inclusión para Inmunomicroscopía Electrónica.**

<u>Fijación:</u>	Paraformaldehído al 4% en Buffer de Sörensen con pH 7.3, 0.2M, por 2 hr a 4° C.
<u>Lavado:</u>	Buffer de Sörensen con pH 7.3, 0.2M por 10 min. a 4° C. Buffer de Sörensen con pH 7.3, 0.2M por 10 min. a 4° C. Buffer de Sörensen con pH 7.3, 0.2M por 10 min. a 4° C.
<u>Bloqueo:</u>	Cloruro de Amonio al 0.5M en Buffer de Sörensen con pH 7.3, 0.2M por 45 min. a Temperatura Ambiente
<u>Lavado:</u>	Buffer de Sörensen con pH 7.3, 0.2M por 10 min. a 4° C. Buffer de Sörensen con pH 7.3, 0.2M por 10 min. a 4° C.
<u>Deshidratación:</u>	Alcohol Etílico al 50% por 30 min. a 4° c. Alcohol Etílico al 70% por 30 min. a 4° c. Alcohol Etílico al 80% por 30 min. a 4° c. Alcohol Etílico al 90% por 30 min. a 4° c. Alcohol Etílico al 96% por 1 hr. a 4° c. Alcohol Etílico al 96% por 1 hr. a 4° c. Alcohol Etílico al 100% por 1 hr. a 4° c. Alcohol Etílico al 100% por 1 hr. a 4° C.
<u>Infiltración:</u>	Alcohol etílico absoluto/Resina acrílica Hidrosoluble (LR-White) 2:1 por 12 hrs. Alcohol etílico absoluto/Resina acrílica Hidrosoluble (LR-White) 1:1 por 2 hrs. Alcohol etílico absoluto/Resina acrílica Hidrosoluble (LR-White) 1:2 por 2 hrs. Resina acrílica Hidrosoluble (LR-White) pura por 3 hrs.
<u>Inclusión:</u>	Resina acrílica Hidrosoluble (LR-White) pura en cápsulas cerradas a 50° C. por 12 hr.

- **3.4.- Técnica de Inmunomicroscopía Electrónica para la localización de antígenos.**

Cortes: Los cortes deben ser de 70 a 90 nm. Montados en rejillas de níquel. Las rejillas usadas fueron de 300 mesh.

Permeabilización: Lavado por goteo con PBS/BSA/Tween 20.
Lavado por flotación con PBS/BSA/Tween 20 durante 45 min.

Bloqueo: Suero normal de animal distinto a la fuente del anticuerpo primario (el usado fue de caballo) durante 1hr.

Anticuerpo Primario: Diluido con PBS/BSA por 12 hrs. a 4° C.

Lavado: PBS/Tween 20 por goteo.
Por flotación con PBS/Tween 20 por 10 min.

Anticuerpo Secundario: conjugado a oro (el usado fue IgG anti-conejo conjugado a oro 5 nm de diámetro hecho en cabra) por 1 hr.

Lavado: PBS/Tween 20 por goteo.
PBS/Tween 20 por flotación 15 min.
Agua bidestilada por goteo.
Agua bidestilada por flotación 10 min.

Contraste: Solución de saturada de Acetato de Uranilo por 30 seg.

APENDICE 4

"Soluciones"

- **Solución Amortiguadora de Fosfatos Salino para inmunohistoquímica. (PBS).**

8.0 g de NaCl (Cloruro de Sodio).
1.16g de Na₂HPO₄ (Fosfato de Sodio Dibásico).
0.20g de KH₂PO₄ (Fosfato de Potasio Monobásico).
0.20g KCl (Cloruro de Potasio)

se afora a 1 litro
con las cantidades proporcionadas el pH queda en 7.0

- **Solución Buffer de Fosfatos para Inmunomicroscopía Electrónica. (Sörensen) 0.2M pH 7.3**

Solución A	
Fosfato de Sodio Monobásico (NaH ₂ PO ₄ *H ₂ O)	2.76 g.
Agua Bidestilada	100 ml.

Solución B	
Fosfato de Sodio Dibásico (NaHPO ₄ *7H ₂ O)	5.66 g.
Agua bidestilada	100 ml.

Se mezclan 23 ml. de la Solución A y 77 ml. de la Solución B.

- **Solución de Alcohol Ácido.**

1ml de Ácido clorhídrico en 99ml de alcohol al 96%.

- **Solución saturada de Carbonato de Litio.**

1.54gm de carbonato de Litio en 100 ml de agua destilada.

- **Solución PBS para Inmunomicroscopía Electrónica.**

Solución A	
Buffer de Fosfatos (Sörensen) 0.2M pH 7.3	

Solución B	
Cloruro de sodio al 0.9% en Agua bidestilada.	

Se mezclan una parte de Solución A y una Parte de Solución B.

- **Solución PBS/Tween 20.**

Se prepara con PBS para Inmunomicroscopía Electrónica y Tween 20 al 0.05% (v/v)

- **Solución PBS/BSA.**

Se prepara con PBS para Inmunomicroscopía Electrónica y Albúmina Sérica Bovina (BSA) al 1%.

- **Solución PBS/BSA/Tween 20.**

Se prepara con PBS para Inmunomicroscopía Electrónica, Tween 20 al 0.05% y Albúmina Sérica Bovina (BSA) al 1%.

- **Medio *PBY modificado*** (Medio líquido de Proskauer y Beck Modificado por Youmas y Karlson, 1947.

KH ₂ PO ₄	5.0g
Asparagina	5.0g
MgSO ₄ (7H ₂ O)	0.6g
Citrato de Magnesio	1.5g
Glicerol	20.0 ml.

Se afora a 1,000 ml con agua bidestilada.

Se disuelven los componentes en el orden de la lista, se ajusta el pH a 7.8 con NaOH al 40% (p/v). Agregar el citrato una vez ajustado el pH.

Esterilizar a 10 libras de presión durante 20 minutos. Bajar el pH a 7.4 por filtración, envasar en 1/3 del volumen del recipiente y esterilizar a 10 libras de presión por 20 minutos.

APENDICE 5

"Reactivos"

- **Paraplast.** Oxford Labware, Division of Sherwood Medical. No. Cat. 8889-501006. St Louis, MO. U.S.A.
- **Silano** PC4100 Methacryloxypropyl-trimethoxysilane No. cat. 2530-85-0. Powerchemicals.
- **Alcohol Etílico.** C₂H₅OH Etanol Absoluto para análisis. MERCK. KgaA, Darmstadt. Germany
- **Rabbit IgG biotinilade, Avidin-HRPO, 3,3'-Diaminobenzidin tetrahydrochloride (DAB).** Basic DAB Detection kit. Ventana Medical Systems, Inc. Tucson Arizona. U. S. A.
- **Paraformaldehído.** HO (CH₂O) nH EM Grade, Purified. No. Cat. 19200. Electron Microscopy Sciences.
- **Cloruro de Amonio.** NH₄Cl. Fermont. Productos químicos de Monterrey. S.A. de C.V. México.
- **Xilenos.** C₆H₄(CH₃)₂. J. T. Baker. No. Cat. 9490-02. Mallinckrodt Baker. México.
- **Albúmina Sérica Bovina. (BSA).**
- **Fosfato de Sodio Monobásico.** NaH₂PO₄*H₂O. Monohidratado Cristal. Baker Analyzed. Mallinckrodt Baker. México
- **Fosfato de Sodio Dibásico.** Na₂HPO₄. Cristal Anhidro. Baker Analyzed. Mallinckrodt Baker. México.
- **Peróxido de Hidrógeno 30%** H₂O₂ (Perhydrol). MERCK. KgaA, Darmstadt. Germany.
- **Harris Hematoxylin Solution, Modified.** Cat. No. HHS-128. Sigma Diagnostic. St Louis MO. U. S. A.
- **Resina Acrílica Hidrosoluble LR-White.** Med. Gradre. London Resin Company Limited. England.

REFERENCIAS

- Abou-Zeid C., Harboe M. & Rook G. A. 1987. **Characterization of the secreted antigens of *Mycobacterium bovis* BCG: Comparison of the 46-kD dimeric protein with proteins MPB64 and MPB70.** Infection and Immunity 55 (12); 3213-3214.
- Andersen P., Askgaard D., Ljungqvist L., Bennedsen J. & Heron I. 1991. **Protein released from *Mycobacterium tuberculosis* during growth.** Infection and immunity 59; (6); 1905-1910.
- Andersen P., Askgaard D., Ljungqvist L., Weis-Bentzon M. & Heron I. 1991. **T Cell proliferative response to antigens secreted by *Mycobacterium tuberculosis*.** Infection and immunity 59 (4); 1558-1563.
- Arriaga A. K., Orozco E. H., Aguilar L. D., Rook G. A. W. & Hernández Pando R. 2002. **Immunological and pathological comparative analysis between experimental latent tuberculous infection and progressive pulmonary tuberculosis.** Clinical and experimental Immunology. 128; 229-237
- De Mendonca-Lima L, Picardeau M., Raynaud C., Rauzier J., de la Salmoniere Y.O., Barker L., Bigi F., Cataldi A., Gicquel B. & Reyrat J.M. 2001. **Erp, an extracellular protein family specific to mycobacteria.** Microbiology. 147; 2315-2320.
- Dykstra M. S. 1992. **Biological Electron Microscopy. Theory, Techniques and Troubleshooting.** Plenum Press Corp. U. S. A.
- Barnes P. F., Lu S., Abrams J. S., Wang E., Yamamura M., Modlin R. L. 1993. **Cytokine production and the site of disease in tuberculosis.** Infect. Immune. 61 ; 3482-89.
- Berthet F.X., Rauzier J., Lim E.M., Philipp W., Gicquel B. & Portnoi D. 1995. **Characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* *erp* gene encoding a potential cell surface protein with repetitive structures.** Microbiology. 141; 2123-2130.
- Buschmann E., Apt A. S., Nickonenko B. V., Moroz A. M., Averbakh M. H., Skamene E. 1988. **Genetic aspects of innate resistance and acquired immunity to micobacteria in inbred mice.** Spring Semin immunol 10; 319-336.
- Bloom B. 1994. **Tuberculosis. Pathogenesis, protection and control.** Edited by A. S. M.
- Brooks G. F., Butel J. S. & ORNSTON L. N.. 1992. **Microbiología Medica de Jawets, Melinck y Aldelberg.** Manual Moderno. 14ª edición.

- Chan J., Fan X., Hunter S. W., Brennan P. J. & Bloom B. R. 1991. **Lipoarabinomannan, a possible virulence factor involved in persistence of *Mycobacterium tuberculosis* within macrophages.** Infection and immunity 59 (5); 1755-1761.
- Cubillas T. A. C., Ruiz A. A., Bernal F. G., Quiroz C. L., López D. A., Reynaga H. E., González A. R. 2003. **Cytoquine production and expresión of leucocyte-differentiation antigens by human mononuclear cells in response to *Mycobacterium tuberculosis* antigens** Scan. J. Immunol. 57; 115-124.
- Dunn P. L., North R. J. 1995. **Virulence ranking of some *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* stains according to their ability to multiply in the lung, induce lung pathology, and cause mortality in mice.** 63; 3428-37.
- Elhay M. J., Oettinger T. & Andersen P. 1998. **Delayed-Type Hypersensitivity Responses to ESAT-6 and MPT64 from *Mycobacterium tuberculosis* in the Guinea Pig.** Infection and immunity 66 (7); 3454-3456
- Flynn J. L., Chan J. 2001. **Tuberculosis: Latency and Reactivation.** Infection and immunity 69 (7); 4195-4201
- Frehel C., Chastellier C., Offredo C. & Berche P. 1991. **Intramacrophage growth of *Mycobacterium avium* during infection of mice.** Infection and immunity 59 (6); 2207-2214
- García G. M., Valdespino J. L. 2001. ***Mycobacterium tuberculosis* en pulmones sin lesiones tuberculosas, ¿santuario inmunológico?.** Rev. Inv. Clin. 53 (5); 460-461.
- Gilleron M., Bala L., Brando T., Vercellone A. & Puzo G. 2000. ***Mycobacterium tuberculosis* H37Rv Parietal and Cellular Lipoarabinomannans** J. Biol. Chemistry. 275 (1); 677-684.
- Halsleton P. S. 1996. **Spencer's Pathology of the Lung.** Fifth Edition. McGraw-Hill. International Edition.
- Harboe M., Nagai S., Patarroyo M. E., Torres M., Ramirez C. & Cruz N. 1986. **Properties of protein MPB64, MPB70 and MP80 of *Mycobacterium bovis* BCG.** Infection and immunity, 52,(1); 293-302.
- Harboe M., Wiker H. G., Ulvund G., Lund-Pedersen B., Andersen Å. B., Hewinson R. G. & Nagai S. 1998. **MPB70 and MPB83 as indicators of protein localization in mycobacterial Cells.** Infection and immunity, 66 (1); 289-296
- Hatful G. F., Jacobs W. R., 2000. **Molecular Genetics of Mycobacteria.** ASM Press. Washington DC. USA.

- Hayat M. A. 1981. **Fixation for Electron Microscopy**. Academic Press. U. S. A.
- Hernández-Pando R., Orozco E. H., Sampieri A., Pavon L., Velasquillo C., Larriva-Sahd J., Alcocer M. & Madrid M. V. 1996. **Correlation between the kinetics of Th1/Th2 cells and pathology in a murine model of experimental pulmonary tuberculosis**. *Immunology*. 89 (1); 26-33.
- Hernández P. R., Pavon R. L., Arriaga K., Orozco E. E., Madrid M. V., Rook G. 1997. **Pathogenesis of Tuberculosis in mice Exposed to Low and High Doses of an Environmental Mycobacteria Saprophyte before Infection**. *Infection and Immunity* 65 (8); 3317-3327.
- Hernández-Pando R. & Rook G. A. W. 1994. **The role of TNF- α in T-Cell-mediated inflammation depends on the Th1/Th2 cytokine balance**. *Immunology* 82: 591-595.
- Juarez M. D., Torres A., Espitia C. 2001. **Characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* region containing the mpt83 and mpt70 genes**. *FEMS Microbiology Letters* 203; 95-102
- Kamath A. T., Feng C. G., MacDonald M., Briscoe H. & Britton W. J. 1999. **Differential Protective Efficacy of DNA Vaccines Expressing Secreted Proteins of *Mycobacterium tuberculosis***. *Infection and immunity* 67 (4); 1702-1707.
- Kariyone A, Tamura T., Kano H., Iwakura Y., Takeda K., Akira S. & Takatsu K. 2003. **Immunogenicity of Peptide-25 of Ag85B in T_H1 development: role of IFN-g**. *International Immunology*.15 (10); 1183-1194.
- Kochi A. **The global tuberculosis situation and the new control strategy of the World Health Organization**. *Tubercle*. 72:1-6.
- Mark A. C., Ann W., Graham H., Gavier-Widen D., Graham H., Kris H., Douglas L., Philip D. M. & Glyn H. 2002. **Vaccination of ginea pigs with DNA encoding the mycobacterial antigen MPB83 influences pulmonary pathology but not hematogenous spread following aerogenic infection with *Mycobacterium bovis***. *Infection and immunity* 70; 2159-2165.
- Medina E., Nort R. J. 1998. **Resistance ranking of some common inbred mouse strains to *Mycobacterium tuberculosis* and relationship to major histocompatibility complex haplotype and *Nramp 1* genotype**. *Immunology* 93; 270-4.
- Michell S. L., Whelan A. O., Wheeler R., Panico M., Easton R. L., Etienne A. T., Stuart M. Dell H. A., Morris H. R., Reason A. J., Herrmann J. L., Young D. B., and Hewinson R. G. 2003. **The MPB83 antigen from *Mycobacterium bovis* contains O-linked mannose and (1 \rightarrow 3) mannoiose moieties**. *J Biol Chem*. 278 (18); 16423-32.

- Mioura K., Nagai S., Kinomoto M., Haga S. & Tokunaga T. 1983. **Comparative Studies with Various Substrains of *Mycobacterium bovis* BCG on the production of an Antigenic Protein, MPB70.** Infection and immunity, 39 (2); 540-545.
- Mustafa A. S. 2002. **Development of new vaccines and diagnostic reagents against tuberculosis.** Molecular Immunology 39; 113-119.
- Mustafa A. S.; Shaban F. A., Abal A. T., Al-Attiyah R., Wiker H. G., Lundin K. E., Oftung F. & Huygen K. 2000. **Identification and HLA Restriction of Naturally Derived Th1-Cell Epitopes from the Secreted *Mycobacterium tuberculosis* Antigen 85B Recognized by Antigen-Specific Human CD4⁺ T-Cell Lines** Infection and Immunity. 68 (7); 3933-3940.
- Nagai S., Matsumoto J., & Nagasuga T. 1981. **Specific skin reactive protein from culture filtrate of *Mycobacterium bovis* BCG.** Infection and immunity. 31; 1152-1160.
- Oettinger T. & Andersen A. 1994. **Cloning and B-Cell-epitope mapping of MPT64 from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv.** Infection and immunity. 62 (5); 2058-2064
- Palendira U., Kamath A. T., Feng C. G., Martin E., Chaplin P. J., Triccas J. A. & Britton W. J. 2002. **Coexpression of Interleukin-12 Chains by a Self-Splicing Vector Increases the Protective Cellular Immune Response of DNA and *Mycobacterium bovis* BCG Vaccines against *Mycobacterium tuberculosis*** Infection and immunity 70 (4); 1949-1956.
- Phyu S., Mustafa T., Hofstad T., Nilsen R., Fosse R. & Bjune G. 1998. **A Mouse Model for Latent Tuberculosis.** Scand J Infect Dis 30; 59-69
- Rastrogi N., Legrand E. & Sola C.. 2001. **Introducción a la nomenclatura y la patogénesis de las micobacterias.** Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. 20 (1), 21-54
- Rook G. A. W., Hernández-Pando R. 1996. **The Patogénesis of Tuberculosis.** Annu. Rev. Microbiol. 50; 259-84.
- Ross M. H., Reith E J., Romrell L. J. 1992. **Histología. Texto y atlas.** Ed. Panamericana. México.
- Sabatini D. D., Bensch K. & Barnett R. J. 1963. **Cytochemistry and Electron Microscopy. The Preservation of Cellular Ultrastructure and Enzymatic Activity by Aldehyde Fixation.** Journal Cell Biology 17; 19-58.
- Santander R. G. 1969. **Técnicas de Microscopía Electrónica en biología.** Ed. Aguilar. España.

- Shinnick T. M. 1987. **The 65-Kilodalton antigen of *Mycobacterium tuberculosis***. J Bacteriology 169 (3);.1080-1088.
- Sjöstrand F. S. 1971. **Electron Microscopy of cells and tissues. Vol. 1. Instrumentation and techniques**. Fourth Printing. Academic Press INC. U. S. A.
- Stoward P. J. 1973. **Fixation in histochemistry**. Hapman and Hall Ltd. U. S. A.
- Vázquez N. G., Echeverría M. O. 2000. **Introducción a la Microscopía Electrónica aplicada a las ciencias biológicas**. UNAM-Fondo de Cultura Económica. México.
- Vordermeier H.M., Cockle P. J., Whelan A. O., Rhodes S., Chambers M. A., Clifford D., Huygen K., Tascon R., Lowrie D., Colston M. J., Hewinson R. G. 2001. **Effective DNA vaccination of cattle with the mycobacterial antigens MPB83 and mpb70 does not compromise the specificity of the comparative intradermal tuberculin skin test**. Vaccine 19; 1246-1255
- Wiegshaus E., Balasubramanian V. & Smith D. W.. 1989. **Immunity to tuberculosis from perspective of phatogenesis**. Infection and immunity 57; 3671-3676.
- World Heart Organization, **Global Tuberculosis Control**, Report 2001.
- Wilcke J. T., Jensen. B. N., Ravn P., Andersen A. B. and Haslov.K. 1996. **Clinical evaluation of MPT-64 and MPT-59, two proteins secreted from *Mycobacterium tuberculosis*, for skin test reagents**. Tubercle Lung Dis. 77: 250–256.
- Yamaguchi R., Matsuo K., Yamazaki A., Abe C., Nagai S., Terasaka K. & Yamada T. 1989. **Cloning and characterization of the gene for immunogenic protein MPB64 of *Mycobacterium bovis* BCG**. Infection and immunity 57 (1); 283-288.
- Yanagisawa S., Koike M., Kariyone A., Nagai S. & Takatsu K. 1997. **Mapping of Vb11⁺ helper T cell epitopes on mycobacterial antigen in mouse primed with *Mycobacterium tuberculosis***. International Immunology, 9 (2); 227–237

ABREVIATURAS

- ADN:** Ácido desoxirribonucleico (DNA).
- BAAR:** Bacilo ácido alcohol resistente.
- BCG:** Bacilo de Calmette-Güerin.
- DAB:** Diaminobenzidina.
- DTH:** Hipersensibilidad retardada. (Delayed-type Hypersensitivity)
- ELISA:** Inmunoensayos de unión a una enzima. (Enzyme-linked immunosorbent assay)
- E-P:** Enfermedad progresiva.
- RT-PCR:** Reacción en Cadena de la Polimerasa-Transcripción Reversa.
- IHQ:** Inmunohistoquímica.
- IL:** Interleucina
- I-L:** Infección latente
- IME:** Inmunomicroscopía Electrónica.
- IgG:** Inmunoglobulina G.
- KDa:** Kilodaltones.
- LAM:** Lipoarabinomannan.
- MA:** Macrófagos alveolares.
- MABS:** Anticuerpos monoclonales (Monoclonal Antibodies).
- OMS:** Organización Mundial de la Salud.
- PAGE:** Electroforesis en gel de poliacridamida. (polyacrilamide gel electrophoresis).
- PBS:** Amortiguador de Fosfatos Salino. (Phosphate Buffer Saline).
- PPD:** Derivado Proteico purificado. (Purified Protein Derivative).
- SDS-PAGE:** Electroforesis en gel de poliacridamida con Dodecil Sulfato Sódico (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)
- SIDA:** Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida.
- TPE:** Tuberculosis Pulmonar Experimental.
- UFC:** Unidades Formadoras de Colonias. (CFU)
- VIH:** Virus de Inmunodeficiencia Humana.