



**UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE MEDICINA  
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMEDICAS**

**INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS  
MÉDICAS Y NUTRICIÓN “*SALVADOR  
ZUBIRÁN*”**

**LA INTERLEUCINA 12 PRODUCIDA EN  
PLANTAS DE JITOMATE EJERCE UN  
EFECTO TERAPÉUTICO EN LA  
TUBERCULOSIS PULMONAR  
EXPERIMENTAL**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:**

**DOCTORA EN CIENCIAS**

**P R E S E N T A**

**M. en C. ANA LUCRECIA ELÍAS LÓPEZ**

**DIRECTOR DE TESIS:**

**DR. ROGELIO HERNÁNDEZ PANDO**

**Facultad de Medicina**



**MÉXICO, D. F. DICIEMBRE DE 2008**



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.

## DEDICATORIA

A mis padres Dr. Abraham Elias Ventura y a la Mtra. Ma: Elizabeth López Mathen, por haberme enseñado a luchar, pero sobretodo por enseñarme a hacer que mis sueños se hagan realidad. Con todo mi amor.



A mis adorados Mosqueteros Dr. Josué Elias, M en C Abraham Elias, Dr. Pablo Elias y Dr. Daniel Elias. Todos ellos ejemplos de perseverancia y fuentes inagotables de motivación e inspiración en mi vida.

### **A mi misma**

*Porque aquí y ahora me esforcé, luché e insistí. Me negué a que me arrollara la marea; y estuve dispuesta a ser como una fortaleza.....*

A mis queridas cuñadas Dra. Dora Correa y M en C Norma Márquez. Porque siempre han estado con nosotros alegres y felices. Y siempre con ustedes.

### **A mi amado esposo Oscar**

A mi suegra, la Mtra Norma Lilia Mesa, muchas gracias por habernos apoyado a Oscar y a mí. *No entiendo la vida sin ti, eres parte fundamental de mi proyecto de vida. Gracias por amarme y compartir tu vida conmigo.....*

A mis queridos cuñados, Mtra. Luliana y Lic. Armando Vázquez Mesa, por su alegre disposición a apoyarnos a Oscar y a mí.

A mis queridos amigos: Tofita, Anita, Francisco, Tofita II, José Luis, Blanquita, Mary, Maru, Josefina, Isela, Yola, Chenta, Pedro, Misa, Celina, Rosalina, Adan y a todos los que han sido, son y serán seres de luz en mi vida.



## AGRADECIMIENTOS

A mis padres **Dr. Abraham Elías Ventura y a la Mtra. Ma. Elizabeth López Matheu**, por haberme enseñado a luchar, pero sobretodo por enseñarme a hacer que mis sueños se hagan realidad. Con todo mi amor.

por haberme dado la oportunidad de realizar mis estudios en su laboratorio, y por enseñarme las lecciones que necesitaba aprender.

A mis adorados Mosqueteros **Dr. Josué Elías, M en C Abraham Elías, Dr. Pablo Elías y Dr. Daniel Elías**. Todos ellos ejemplos de perseverancia y fuentes inagotables de motivación e inspiración en mi vida.

por ser ejemplo de tenacidad, lucha, entusiasmo y sensibilidad.

A mi sobrinita, **Jade Ch´umil Elías Correa**. Princesita: tu sonrisa de ángel ha iluminado nuestras vidas.

Al Dr. Luis Llorente, porque gracias a su gran calidad humana me alentó en los momentos más difíciles y me fue posible seguir adelante y concluir. Muchas gracias por todo.

A mis queridas cuñadas **Dra. Dora Correa y M en C Norma Márquez**. Porque siempre han estado con nosotros alegres y perseverantes... y nosotros con ustedes.

A la Dra. Claudia Sánchez Castillo, por mostrarme siempre el camino. Tiene un lugar

A mi suegra, la **Mtra Norma Lilia Mena**, muchas gracias por habernos apoyado a Oscar y a mí en los momentos más difíciles de nuestra vida académica. Con cariño y respeto.

A mis queridos cuñados, **Mtra. Liliana y Lic. Armando Vázquez Mena**, por su alegre disposición a apoyarnos a Oscar y a mí.

ras bombalinas fue una fuente de apoyo y consejos acertados.

A mis queridos amigos: **Toñita, Anita, Francisco, Toñita II, José Luis, Blanquita, Mary, Maru, Josefina, Isela, Yola, Chenta, Pedro, Mine, Celina, Rosalina, Adan** y a todos los que han sido, son y serán seres de luz en mi vida.

A mis compañeros y amigos **Brenda Marquina, Jorge Barrios, Yuri Cortés, Raquel Hurtado, Dulce Mats y Yu-Mei Anguiano** porque en su compañía y con su apoyo todo fue más divertido y...llavadero. Gracias por todo !!

A **Paty y Eric**, mil gracias por brindarme su amistad y apoyo moral.

**AGRADECIMIENTOS**

Página

|  |    |
|--|----|
| RESUMEN.....   | 1  |
| ABSTRACT.....  | 3  |
| I. INTRODUCCIÓN.....   | 5  |
| Al Dr. Rogelio Hernández Pando, por haberme dado la oportunidad de realizar mis estudios en su laboratorio, y por enseñarme las lecciones que necesitaba aprender.....   | 8  |
| 1.2 Patogenicidad e inmunidad de la tuberculosis pulmonar.....   | 8  |
| 1.2.2 Los linfocitos T CD4+ y otras subpoblaciones de linfocitos de la inmunidad adaptativa contra la TB.....  | 12 |
| 1.2.2.1 Linfocitos T CD4+.....   | 12 |
| A la Dra. Yolanda López Vidal, por ser ejemplo de tenacidad, lucha, entusiasmo y sensibilidad.....   | 16 |
| 1.3 Participación de citocinas y moléculas de la respuesta inmune: tipo Th1 y tipo Th2 durante la respuesta inmune a TB pulmonar.....  | 16 |
| 1.3.1 Interferón-gamma (IFN $\gamma$ ).....  | 18 |
| 1.3.2 Óxido nítrico sintetasa (iNOS) y Óxido nítrico (NO).....   | 19 |
| 1.3.3 Factor de necrosis tumoral- $\alpha$ (TNF $\alpha$ ).....  | 20 |
| Al Dr. Luis Llorente, porque gracias a su gran calidad humana me alentó en los momentos más difíciles y me fue posible seguir adelante y concluir. Muchas gracias por todo.....  | 23 |
| 1.4 El papel de la IL-12 en la respuesta inmune contra la TB pulmonar.....   | 24 |
| 1.4.1 Biología de la IL-12.....  | 24 |
| 1.4.1.1 Estructura y evolución de la IL-12 y su receptor.....  | 26 |
| A la Dra. Claudia Sánchez Castillo, por mostrarme siempre el camino. Tiene un lugar especial en mi corazón.....  | 31 |
| 1.4.2 Funciones Biológicas de la IL-12.....  | 31 |
| 1.4.2.1 Efectos de la IL-12 sobre las subpoblaciones de linfocitos T.....  | 31 |
| 1.4.2.2 La IL-12 y la producción de IFN $\gamma$ .....   | 32 |
| 1.4.2.3 La IL-12 y la respuesta Th1.....   | 33 |
| 2. ANTECEDENTES.....   | 37 |
| Al Dr. Héctor Orozco, gracias porque tras bambalinas fue una fuente de apoyo y consejos acertados.....   | 38 |
| 2.1 Inmunoterapia para la Tuberculosis.....  | 38 |
| 2.2 Inmunoterapia apoyada por la Agricultura Molecular.....  | 40 |
| 2.2.1 Las Plantas como fábricas de proteínas terapéuticas.....   | 41 |
| 2.2.2 Proteínas expresadas en plantas: vacunas y otros ejemplos.....   | 43 |
| 3. JUSTIFICACIÓN Y ANTECEDENTES DEL PROBLEMA.....  | 46 |
| A mis compañeros y amigos Brenda Marquina, Jorge Barrios, Yuri Cortés, Raquel Hurtado, Dulce Mata y Yu-Mei Anguiano porque en su compañía y con su apoyo todo fue más divertido y....llevadero. Gracias por todo ;j..... | 51 |
| 6.1 Construcción del vector IL-12 y transformación del Jitomate.....   | 52 |
| 6.2 Selección de la dosis apropiada y determinación de la actividad biológica del TT-IL12 in vivo después de su absorción.....   | 54 |
| A Paty y Ere, mil gracias por brindarme su amistad y apoyo moral.....  | 54 |
| 6.2.2 Absorción del TT-IL12 por la vía oral.....   | 55 |

## ÍNDICE

|  | Página |
|--|--------|
| RESUMEN.....   | 1      |
| ABSTRACT.....  | 3      |
| 1. INTRODUCCIÓN .....  | 5      |
| 1.1 Aspectos epidemiológicos de la tuberculosis pulmonar .....   | 5      |
| 1.2 Patogenia e Inmunidad de la tuberculosis pulmonar.....   | 8      |
| 1.2.1 Factores de la inmunidad innata que controlan la enfermedad .....  | 4      |
| 1.2.2 Los linfocitos T CD4+ y otras subpoblaciones de linfocitos de la inmunidad adaptativa<br>contra la TB.....                           | 12     |
| 1.2.2.1 Linfocitos T CD4+ .....  | 12     |
| 1.2.2.2 Linfocitos T CD8+ y otras subpoblaciones.....  | 14     |
| 1.3 La participación de citocinas y moléculas de la respuesta inmune tipo Th1 y tipo Th2 durante<br>la respuesta inmune a TB pulmonar..... | 16     |
| 1.3.1 Interferon-gamma (IFN $\gamma$ ).....  | 18     |
| 1.3.2 Oxido nítrico sintetasa (iNOS) y Oxido nítrico (NO).....   | 19     |
| 1.3.3 Factor de necrosis tumoral-alfa (TNF $\alpha$ ) .....  | 20     |
| 1.3.4 Interleucina-4 (IL-4) .....  | 21     |
| 1.3.5 Otras citocinas.....   | 23     |
| 1.4 El papel de la IL-12 en la respuesta inmune contra la TB pulmonar .....  | 24     |
| 1.4.1 Biología de la IL-12 .....   | 24     |
| 1.4.1.1.Estructura y evolución de la IL-12 y su receptor .....   | 26     |
| 1.4.1.2 Regulación de la producción de IL-12 .....   | 29     |
| 1.4.2 Funciones Biológicas de la IL-12 .....   | 31     |
| 1.4.2.1 Efectos de la IL-12 sobre las subpoblaciones de linfocitos T .....   | 31     |
| 1.4.2.2 La IL-12 y la producción de IFN $\gamma$ .....   | 32     |
| 1.4.2.3 La IL-12 y la respuesta Th1 .....  | 33     |
| 2. ANTECEDENTES.....   | 37     |
| 3. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....   | 41     |
| 4. HIPÓTESIS.....  | 45     |
| 5. OBJETIVO GENERAL .....  | 46     |
| 5.1 Objetivos específicos .....  | 46     |
| 6. METODOLOGÍA .....   | 47     |
| 6.1 Construcción del vector IL-12 y transformación del jitomate .....  | 47     |
| 6.2 Selección de la dosis apropiada y determinación de la actividad biológica del TT-IL12 in<br>vivo después de su absorción.....          | 49     |
| 6.2.1 Preparación del TT-IL12 y del nonTT para su administración oral.....   | 49     |
| 6.2.2 Absorción del TT-IL12 por la vía oral.....   | 50     |
| 6.2.3 Determinación de la dosis terapéutica de IL-12 expresada en el TT-IL12 .....   | 51     |
| 6.3 Modelo murino de tuberculosis pulmonar progresiva.....   | 51     |
| 6.3.1 Descripción del modelo .....   | 51     |

|  |    |
|--|----|
| 6.3.2 Infección de los ratones Balb/c con las cepas de MTB H37Rv y un aislado clínico MDR .....  | 54 |
| 6.4 Diseño experimental .....  | 55 |
| 6.4.1 Tratamientos .....   | 55 |
| 6.4.2 Sacrificios .....  | 57 |
| 6.5 Evaluación del número de unidades formadoras de colonias en los pulmones de ratones infectados .....   | 59 |
| 6.6 Preparación del tejido pulmonar para estudios histológicos y morfométricos.....  | 59 |
| 6.7 Análisis de la expresión de citocinas Th1, Th2 e iNOS por PCR en tiempo real .....   | 61 |
| 6.7.1. Aislamiento del RNAm.....   | 61 |
| 6.7.2 Obtención del cDNA y diseño de primers .....   | 61 |
| 6.8 Estadística .....  | 62 |
| 7. RESULTADOS.....   | 63 |
| 7.1 Selección de la dosis apropiada y análisis de la absorción del TT-IL12 in vivo .....   | 63 |
| 7.2 La administración temprana y continua del TT-IL12 controla eficazmente la infección micobacteriana .....   | 65 |
| 7.2.1 Cepa H37Rv de MTB. Fase Temprana de la infección .....   | 65 |
| 7.3 La administración tardía y continua del TT-IL12 induce la reactivación de la respuesta Th1 protectora .....  | 69 |
| 7.3.1 Cepa H37Rv de MTB. Fase avanzada de la infección.....  | 69 |
| 7.4 El régimen oral y persistente con el TT-IL12 induce y mantiene un efecto terapéutico en ratones infectados con un aislado clínico de Mtb resistente a múltiples drogas (MDR) ..... | 72 |
| 7.4.1 Aislado clínico MDR. Fase avanzada de la infección.....  | 72 |
| 8. DISCUSIÓN .....   | 75 |
| 9. CONCLUSIONES .....  | 79 |
| 10. BIBLIOGRAFIA.....  | 81 |
| 11. ARTÍCULO ORIGINAL PUBLICADO.....   | 91 |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|  | Página |
|--|--------|
| <b>Figura 1.</b> Tasas de notificación mundial de casos nuevos y recaídas de Tuberculosis por 100,000 habitantes.....                              | 6      |
| <b>Figura 2.</b> Principales características de la TB. De la infección a las defensas del huésped .....  | 10     |
| <b>Figura 3.</b> Rutas de procesamiento, presentación antigénica y activación de diferentes subpoblaciones de linfocitos T por Mtb .....           | 13     |
| <b>Figura 4.</b> Estructura de la IL-12 y su receptor. Mecanismo de señalización de la IL-.....  | 25     |
| <b>Figura 5.</b> Biología de la IL-12.....   | 27     |
| <b>Figura 6.</b> Evolución de la IL-12 y su receptor.....  | 28     |
| <b>Figura 7.</b> Regulación transcripcional de gen IL-12p40 .....  | 30     |
| <b>Figura 8.</b> Modelo de la diferenciación de las células Th1 .....  | 35     |
| <b>Figura 9.</b> Niveles de la IL-12 en los extractos del TT-IL12 y nonTT y cinética de la concentración de la IL-12 en suero y BAL.....           | 64     |
| <b>Figura 10.</b> Efecto de la administración temprana del TT-IL12 .....   | 66     |
| <b>Figura 11.</b> Efecto de la administración temprana del TT-IL12 sobre la expresión de genes de citocinas Th1/Th2 e iNOS.....                    | 68     |
| <b>Figura 12.</b> Efecto de la administración del TT-IL12 durante la fase avanzada de la TB .....  | 70     |
| <b>Figura 13.</b> Efecto de la administración del TT-IL12 sobre la expresión de citocinas Th1/Th2 e iNOS durante la fase avanzada.....             | 71     |
| <b>Figura 14.</b> Efecto del TT-IL12 en ratones infectados con una cepa MDR, fase avanzada de la infección .....                                   | 73     |
| <b>Figura 15.</b> Efecto del TT-IL12 sobre la expresión de citocinas Th1/Th2 e iNOS durante la fase avanzada de la infección con una cepa MDR..... | 74     |

## ÍNDICE DE ESQUEMAS Y TABLAS

|   | Página |
|---|--------|
| <b>Tabla 1.</b> Carga estimada de TB en México, 2005 .....                                  |        |
| .....   | 7      |
| <b>Esquema 1.</b> Mapa que muestra la región Ti del plásmido p35SMIL12-2300.....            |        |
| .....   | 48     |
| <b>Esquema 2.</b> Detección in vivo de la IL-12 presente en los extractos del TT-IL12 ..... | 51     |
| <b>Esquema 3</b> Diseño experimental de la Fase Temprana.....                               | 56     |
| <b>Esquema 4.</b> Diseño experimental de la Fase avanzada infección con H37Rv .....         | 58     |
| <b>Esquema 5.</b> Diseño experimental de la Fase avanzada infección con MDR.....            | 60     |

## RESUMEN

La tuberculosis (TB) es una de las enfermedades más frecuentes en la actualidad, con más de un tercio de la población mundial infectada con su agente causal, *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb). La OMS informa que la TB ocasiona 2 millones de muertes cada año. Después de la infección primaria, sólo el 5-10% de los individuos infectados desarrollan la enfermedad activa, mientras que un alto porcentaje del resto experimenta la enfermedad latente. La terapia con antifímicos sigue siendo la piedra angular en el control de la enfermedad, sin embargo, otras opciones terapéuticas como los inmunomoduladores, podrían ser empleadas, teniendo en cuenta el aumento del número de individuos inmunosuprimidos en riesgo de enfermarse y el aumento de la prevalencia de cepas multi-resistentes a los fármacos (MDR). La respuesta inmune del hospedero, humano y murino, para combatir la enfermedad está determinada por la producción de IFN $\gamma$  por parte de los linfocitos T CD4+. Se sabe que la interleucina (IL) -12 es una citocina crucial en la diferenciación de células Th1 productoras de IFN $\gamma$ . En muchos estudios se ha demostrado la efectividad de la administración exógena de IL-12 (IL-12r) en la inducción de la respuesta Th1. A través de su administración parenteral e intermitente se ha podido controlar de manera eficaz el crecimiento de micobacterias en modelos murinos de infección. Sin embargo, estos estudios no abordan si la administración continua de la IL-12 a través de la vía oral, también es capaz de mantener la respuesta Th1 durante la TB en sus estadios iniciales, o para controlarla en estado avanzado, una vez que la respuesta inmune Th1 de protección ha disminuido. Debido a que los protocolos aprobados actualmente que utilizan IL-12r se han diseñado para su administración parenteral, la disponibilidad de un vehículo adecuado para la administración oral de productos farmacéuticos como la IL-12, sería muy beneficioso. En este sentido, las plantas representan una alternativa muy atractiva, pues a través de su transformación con genes externos, éstas pueden producirlos a gran escala. Es así que en este estudio informamos el uso de un cultivo comestible, el tomate, con una construcción que lleva una sola cadena del gen murino de la IL-12 (tomate transgénico que expresa IL-12, TT-IL12). Empleamos los extractos crudos del fruto para su administración oral a un modelo murino de tuberculosis pulmonar, con el fin de estudiar su eficacia terapéutica en animales infectados con cepas drogo-sensibles (laboratorio cepa H37Rv) o drogoresistentes (aislado clínico código 900). Ratones BALB / c fueron tratados

con una dosis oral diaria de TT-IL12. Para la fase temprana de la enfermedad (cepa H37Rv), el TT-IL12 se administró 1 día antes de la infección y continuó durante 60 días. En la fase avanzada de la TB (cepas H37Rv y MDR), el tratamiento se inició 60 días después de la infección y se continuó por otros 60 días. En ambas fases de la enfermedad, el tratamiento dio lugar a una reducción de la carga bacteriana y el daño tisular en comparación con el tipo silvestre de tomate (non- TT). La respuesta Th1 se incrementó y la respuesta Th2 se redujo. En la fase avanzada de la TB fue necesario un tratamiento a largo plazo con el TT-IL12. Demostramos que el TT-IL12 aumenta la resistencia a la enfermedad pulmonar y reduce el daño tisular durante las fases temprana y avanzada de la TB experimental ocasionada por cepas drogosensibles y drogoresistentes.

## ABSTRACT

Tuberculosis (TB) is one of the most pervasive diseases nowadays, with over one-third of the world population infected with *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) and 2 million deaths every year. After primary infection, only 5–10% of the infected hosts develop active disease, whereas a high percentage of the remainder experience latent infection. Anti-mycobacterial therapy remains the cornerstone in controlling TB. Given the increased number of immunosuppressed individuals at risk for infection and the rising prevalence of multi-drug-resistant (MDR) isolates, other therapeutic options for TB, such as immunomodulators, are becoming attractive. Host control of mycobacterial infection, in both human and mouse models, has been associated with the production of interferon (IFN)- $\gamma$  by CD4<sup>+</sup> T cells. Interleukin (IL)-12 is known to be a crucial cytokine in the differentiation of IFN- $\gamma$ -producing T helper 1 (Th1) cells. Many studies have established an essential role of exogenous administration of IL-12 (rIL-12) in the induction of Th1 response. The intermittent administration of rIL-12 through parenteral injection, can control mycobacterial growth efficaciously. However, these studies did not address whether continuous administration of IL-12 through the oral route is also able to maintain the Th1 response during early TB or to control advanced disease once the Th1 protective immune response has declined. Although the currently used licensed protocols of rIL-12 administration have been designed for parenteral administration, the availability of a suitable vehicle for oral delivery of pharmaceuticals would be highly beneficial. In this regard, plants represent a very attractive alternative. In this study we report the use of an edible crop, the tomato, with a construct bearing a single chain murine IL-12 [transgenic tomato (TT)-IL-12] gene. We employed crude fruit extracts for oral delivery of IL-12 in a murine model of pulmonary TB, aimed at studying its therapeutic efficacy in animals infected with drug-sensitive (laboratory strain H37Rv) or drug resistant bacilli (clinical isolate code 900). BALB/c mice were infected with any of the strains and treated with a daily oral dose of TT-IL12 crude fruit extracts. For the early H37Rv infection, TT-IL12 administration was started 1 day before infection and continued for 60 days. In the H37Rv or MDR late infection, treatment was started 60 days after infection and continued for another 60 days. In both phases of infection, TT-IL12 administration resulted in a

reduction of bacterial loads and tissue damage compared with wild-type tomato (non-TT). The Th1 response was increased and the Th2 response was reduced. In the late infection, a long-term treatment with TT-IL12 was necessary. We demonstrate that TT-IL12 increases resistance to infection and reduces lung tissue damage during early and late drug-sensitive and drug-resistant mycobacterial infection.

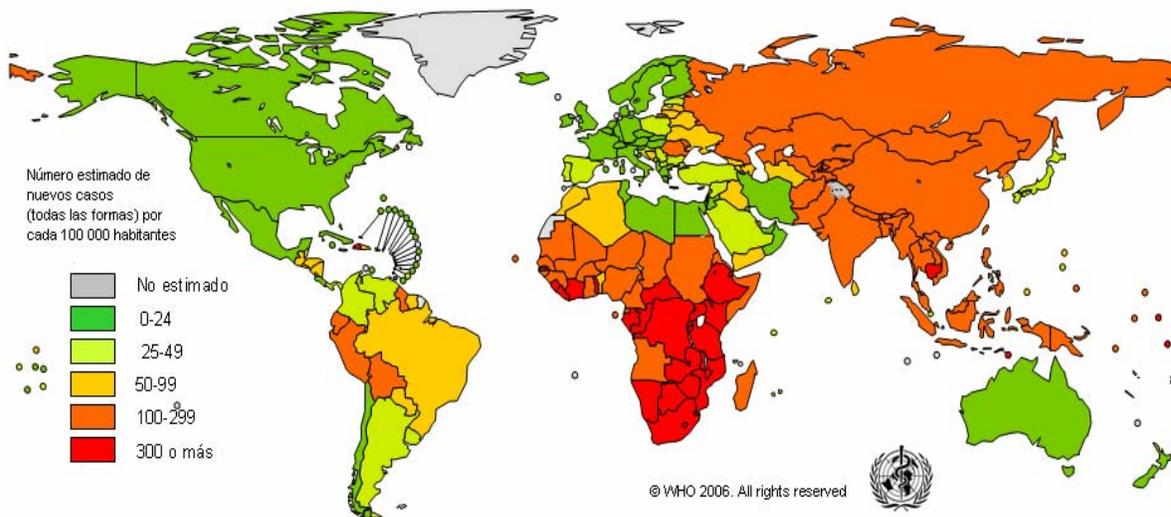
# 1. – INTRODUCCIÓN

## 1.1 Aspectos epidemiológicos de la Tuberculosis Pulmonar

El bacilo *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) es la causa de una de las enfermedades infecto-contagiosas más antiguas de la humanidad, la tuberculosis (TB). A pesar de que se han realizado grandes esfuerzos para su control, la TB sigue siendo una causa significativa de morbi-mortalidad en todo el mundo. De acuerdo a la Organización Mundial de la salud (OMS) esta enfermedad ocasiona de 2-3 millones de defunciones anuales que corresponden al 3% de las muertes prematuras – es decir ocasiona más muertes que la diabetes mellitus (1.4%), las anomalías congénitas (1.2%), la enfermedad de Alzheimer (0.5%) y la artritis reumatoide (0.01%) juntas-. Aunado a esto, se estima que una tercera parte de la población mundial se encuentra infectada, con 8 millones de nuevos casos por año (WHO, 2003). Se ha estimado que entre el 2002 y el 2020 se infectarán 1000 millones de personas, de las cuales 150 millones desarrollarán la enfermedad y 36 millones morirán a causa de ésta (WHO, 2002).

El número estimado de nuevos casos de tuberculosis en todo el mundo, en 2006 fue de 9.2 millones (139 por 100 000 habitantes), entre ellos 4.1 millones de nuevos casos bacilíferos (44% del total) y 0.7 millones de casos VIH-positivos (8% del total). El incremento respecto de los 9.1 millones de casos de 2005 se debe al crecimiento de la población. La India, China, Indonesia, Sudáfrica y Nigeria ocupan, en este orden, los cinco primeros puestos en cifras absolutas de casos. La Región de África es la de mayor tasa de incidencia (363 por 100 000 habitantes). Se estima que hubo 14.4 millones de casos prevalentes de esta enfermedad, la cifra estimada de casos de TB multirresistente fue de 0.5 millones y la cifra estimada de defunciones fue de 1.7 millones, incluidos 0.2 millones de personas infectadas por el VIH (WHO, 2006). En 2007, 202 de 212 países y territorios comunicaron a la OMS datos de notificación de la TB correspondientes a 2006. Para ese año, se notificó un total de 5.1 millones de casos nuevos (de una cifra estimada de 9.2 millones de casos nuevos) en esos 202 países y territorios, de los cuales 2.5 millones (50%)

eran nuevos casos bacilíferos. El 83% del total de casos correspondió a las Regiones de África, Asia Sudoriental y el Pacífico Occidental (WHO, 2007) (**Figura. 1**).



**Figura 1. Tasas de notificación mundial de casos nuevos de TB por 100,000 habitantes.** De acuerdo a la incidencia, prevalencia y mortalidad, África y el sureste Asiático son las regiones con las tasas más altas. Estas mismas tasas parecen estar estabilizándose en algunas regiones del mundo. Informe global de la OMS de 199 países. *WHO, report 2006.*

Este panorama es aún más dramático si se considera el incremento de la co-infección de *Mtb* con el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). Aunado a esto, el incremento en el número de cepas resistentes a múltiples drogas (MDR) complica enormemente los regímenes de tratamiento e incrementa el costo de los mismos en países industrializados. En países en desarrollo este tipo de TB prácticamente no es curable. Debido a este panorama, la OMS estima que si no se introducen medidas para reducir la prevalencia de la TB, cerca de 30 millones de personas morirán a causa de esta enfermedad en los próximos diez años (WHO, 2003). En México, la TB pulmonar ha mostrado una tendencia a la baja desde 1990, año en el cual se reportaron 61 casos por 100,000 habitantes (WHO report, 2008), mientras que en el año 2006 la incidencia fue de 21 casos por 100,000 habitantes. Nuestro país cuenta con una serie de indicadores clave para estimar la carga de TB, la cual como se muestra en la Tabla 1, ha mostrado una disminución importante

durante los últimos 15 años, aunque sigue siendo relativamente elevada en términos de incidencia. Ahora bien, la incidencia de la forma pulmonar de la enfermedad en nuestro país es de 14 casos por 100, 000 habitantes (Sistema Unico de Vigilancia Epidemiológica, DGE/SSA, 2008).

**Tabla 1. Carga estimada de tuberculosis en México. WHO report 2008.**

| Año         | Incidencia* | Prevalencia* | Mortalidad* |
|-------------|-------------|--------------|-------------|
| <b>1990</b> | 61          | 102          | 10          |
| <b>2006</b> | 21          | 25           | 2           |

\*Todas las formas de tuberculosis (WHO report, 2008). Total de casos por 100, 000 habitantes.

La TB afecta principalmente a los pulmones (80% de los casos) pero hasta en el 25% de los casos afecta a otros órganos (TB extrapulmonar), los cuales son afectados por orden de frecuencia: ganglios linfáticos, pleura, aparato genitourinario, huesos y articulaciones, meninges y peritoneo. La forma pulmonar de esta enfermedad se transmite por la vía aérea, cuando pacientes con TB pulmonar activa emiten al toser, aerosoles que contienen gotitas contagiosas; por lo que uno de los factores más importantes para la transmisión de los bacilos tuberculosos es el hacinamiento en espacios mal ventilados, porque intensifica el contacto con el enfermo. Otras vías de contagio del bacilo tuberculoso, como la piel o la placenta, son raras y no tienen significancia epidemiológica (Harper, 2007).

Es así como el riesgo de adquirir la infección por Mtb depende principalmente de factores exógenos, como el retraso en acudir a los servicios de salud y en diagnosticar la enfermedad en lugares con alta prevalencia de la misma. Está demostrado, por ejemplo, que cada caso de TB pulmonar habrá contagiado a 20 personas antes de que haya podido ser diagnosticado. Por otro lado, el riesgo de enfermar después de infectarse depende ante todo de factores endógenos, como la edad, el estado nutricional, la predisposición natural a la enfermedad, la eficacia funcional de la inmunidad celular del individuo, entre otros (Kaufmann, 2007).

A pesar de la participación compleja de estos factores, a partir de estudios epidemiológicos se calcula que solo una minoría de los individuos infectados desarrollarán TB activa, es decir, alrededor del 10% de las personas infectadas acabarán padeciendo TB activa durante su vida. De este porcentaje total, aproximadamente en el 5% de los individuos inmunocompetentes la infección progresará a activa durante los siguientes 2 años, mientras que en el porcentaje restante ésta se presentará en años posteriores (Small, 2001). Las razones para el desarrollo de la enfermedad no han sido claramente definidas. Por su parte aproximadamente el 90% de los individuos inmunocompetentes con infección latente, permanecerán saludables y sin síntomas a través de su vida (Small, 2001).

## 1.2 Patogenia e inmunidad de la Tuberculosis Pulmonar

### *1.2.1. Factores de la inmunidad innata que controlan la enfermedad.*

La interacción de Mtb con el hospedero humano comienza cuando un paciente con TB pulmonar contagiosa, expulsa el bacilo por medio de las gotitas respiratorias que la tos, el estornudo o la fonación convierten en aerosol (Saunders, 2000). Estas gotas diminutas se secan pronto y pueden permanecer suspendidas en el aire durante horas, y alcanzar las vías respiratorias terminales al ser inhaladas. La mayor parte de los bacilos quedan atrapados en esta zona, y son expulsados por el barrido ciliar de las células de la mucosa. Sin embargo, a pesar de este mecanismo de eliminación, una parte de ellos (por lo general menos del 10%) llega hasta los alvéolos. Allí son fagocitados específicamente por los macrófagos (Saunders, 2000).

Una vez que los bacilos han llegado a los alveolos pulmonares tienen cuatro destinos potenciales: 1) La respuesta inmune inicial del huésped puede ser completamente efectiva y matar al bacilo, de tal manera que el paciente no desarrollará la enfermedad (**Figura 2**); 2) Los microorganismos pueden multiplicarse inmediatamente después de la infección, causando TB primaria (**Figura 2**); 3) El bacilo puede causar una infección latente, detectable únicamente con la prueba de la tuberculina y 4) Los bacilos latentes pueden empezar a crecer causando enfermedad clínica, conocida como reactivación de la TB (Schluger, 1998) (**Figura 2**).

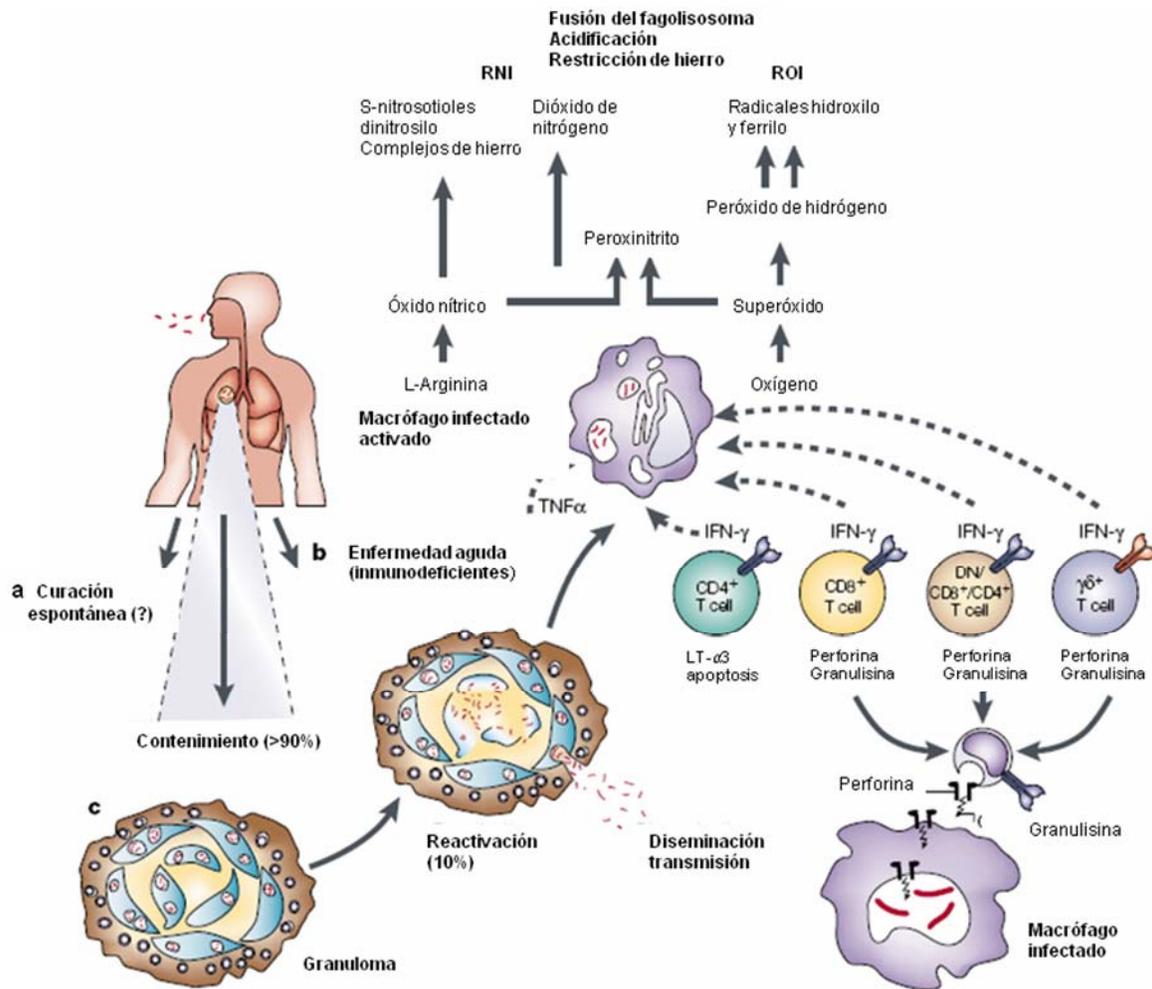
Cuando ocurre el segundo caso, la respuesta inmune protectora contra la TB puede ser definida como respuesta celular Th1 con la producción de  $IFN\gamma$  por los linfocitos T CD4+ y CD8+, que son críticos para el control de la infección en ratones y humanos (Cooper, 2002; Flynn, 2004; Ottenhoff, 2005). Una vez que las micobacterias han llegado al pulmón, los macrófagos y las células dendríticas (CD's) las fagocitan rápidamente. Es importante mencionar que además de la participación de estas células, en el espacio alveolar los mecanismos innatos de defensa también involucran a otras células como los neutrófilos, linfocitos B, células epiteliales, células alveolares tipo I y tipo II. Así como factores solubles como mucina, lisosima, lactoferrina, surfactantes, defensinas, catelicidinas, fosfolipasa A<sub>2</sub>, inminoglobulinas y proteínas del complemento, cuya función es mantener la homeostasis pulmonar y eliminar partículas o bacterias que entran por el tracto respiratorio (Ganz, 2002).

Durante la fagocitosis de las micobacterias por los macropofagos y las CD's la quimiocina CCR2 tiene un papel importante al reclutar ambos tipos de células a los pulmones infectados (Salgame, 2005). Durante este proceso la coordinación de las respuestas innata y adaptativa es esencial, aunque el papel que desempeña la respuesta inmune innata no ha sido completamente entendida, es claramente importante ya que los individuos expuestos por primera vez al bacilo no se infectan.

Uno de los principales actores inmunes que representan un factor clave en el reconocimiento de antígenos micobacterianos, así como en la activación de macrófagos y CD's son los receptores tipo Toll (TLR's). Los principales receptores de este tipo implicados en el reconocimiento de la micobacteria y los purificados de lipoarabinomanan, lipomanan, manosido de fosfatidil-myo-inositol, y la lipoproteína de 19 kDa son el TLR2 y en menor grado el TLR4 (Quesniaux, 2004), dando por resultado de esta interacción una reacción pro-inflamatoria, con la producción de moléculas como la IL-1, el  $TNF\alpha$  y el NO que se unen a sus respectivos receptores y activan diferentes vías de señalización que tienen en común el factor nuclear  $\kappa B$  (NF $\kappa B$ ), induciéndose la expresión de citocinas y moléculas involucradas en la respuesta inmune.

Así mismo, la activación del TLR2 por Mtb puede inducir también la producción de IL-10, una citocina antiinflamatoria, y esto puede representar un posible mecanismo de evasión micobacteriana de la respuesta inmune adaptativa (Schluger, 1998). Otra

participación importante de los TLR en el control de la infección, es la alta susceptibilidad que presentan los ratones deficientes en la molécula adaptadora de TLRs intracelular,



**Figura 2. Principales características de la tuberculosis. De la infección a las defensas del huésped.** Hay tres posibles caminos de la infección por Mtb en el humano: a) Curación espontánea, b) En el huésped inmunodeficiente, la enfermedad se puede desarrollar directamente después de la infección, c) En la mayoría de los casos, las micobacterias son contenidas y la enfermedad se desarrolla después como resultado de la reactivación. El granuloma es el sitio de la infección, de persistencia, patología y protección. RNI, intermediarios de nitrógeno, ROI, intermediarios reactivos de oxígeno. (Kaufmann, 2001)

Myd88 (factor de diferenciación mieloide), sin embargo, aunque estos animales mueren rápidamente, son capaces de generar una respuesta Th1 (Fremont, 2004).

Por otro lado, el bacilo utiliza diferentes vías de entrada a los macrófagos, debido a que *Mtb* favorece su propia fagocitosis, a través de diferentes receptores presentes en la superficie de dichas células como 1) receptores para Fc, 2) receptores del complemento como CR1 y CR3/CR4, 3) receptores de manosa, 4) receptores carroñeros o tipo basurero (scavenger) y 5) receptores para la proteína surfactante A (Fremond, 2004).

Una vez dentro de los macrófagos, la micobacteria induce un incremento en el RNAm de muchos genes pro-inflamatorios, como el TNF $\alpha$  (Algood, 2003). Este actúa como un disparador de la expresión de quimiocinas por dichas células en el sitio de la infección, principalmente de CCL-2, 3, 4, 5 y CXCL9 y 10 (Algood, 2003). Estas quimiocinas atraen más células al sitio de infección y son importantes en la formación y mantenimiento del granuloma. Otro proceso fundamental durante la TB es la apoptosis de macrófagos, el cual está asociado con protección, pues se sabe que cepas muy virulentas pueden inducir niveles muy elevados de la molécula antiapoptótica Bcl-2, evitando así dicho proceso y favoreciendo la sobrevivencia del bacilo (Ríos-Barrera, 2006). Otras proteínas de macrófagos que se ha descrito que causan susceptibilidad a la infección por micobacterias, son la proteína de resistencia natural de macrófagos murinos (*Nramp1*) cuya delección interfiere con el tráfico intracelular de vesículas; y su homóloga en humanos NRAMP que se ha asociado con susceptibilidad a TB primaria y por reactivación (Malik, 2005).

Por su parte las CD, transportan antígenos micobacterianos del pulmón a los nódulos linfáticos, esta ruta está bajo el control de CCR5 y CCR7 (Salgame, 2005). En estas células *Mtb* estimula fuertemente la producción de IL-12, un hecho que puede parecer paradójico respecto a la sobrevivencia intracelular del bacilo, ya que IL-12 es un potente inductor de respuesta Th1, fundamental en la resistencia a la infección (Flynn, 2006). Finalmente, defectos en la función de las vías de la lectina y alterna del complemento, así como la neutropenia no se han asociado con incremento en la susceptibilidad a la infección por este microorganismo (Doffinger, 2005).

Aunque se conoce que durante el curso de la enfermedad se produce una fuerte respuesta humoral, el papel de las células B en esta no se ha definido. Sin embargo, la participación de la inmunidad celular mediada por las células T es de vital importancia contra la TB, como se ha observado en pacientes con enfermedades hereditarias, tales como

la inmunodeficiencia mixta grave, durante las cuales se desarrolla infección por BCG diseminada y fatal, así como el incremento en la susceptibilidad de enfermedades por micobacterias en pacientes que usan drogas que suprimen la función de las células T (Doffinger, 2005). Además, debido a que este bacilo reside dentro de vacuolas intracitoplásmicas, sus antígenos son presentados preferencialmente a las células T por moléculas del MHC clase II, en consecuencia, las células TCD4<sup>+</sup> son primordiales en el control de la TB, como se describe en la siguiente sección.

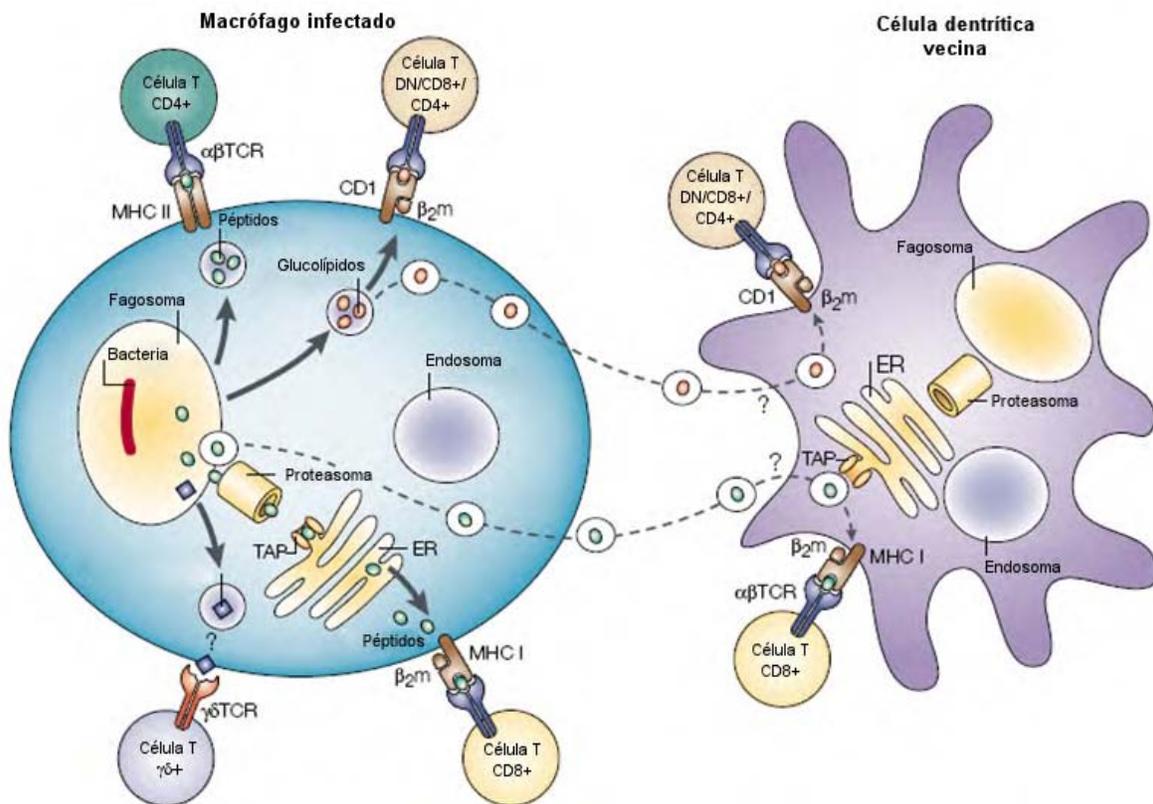
### *1.2.2. Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> y otras sub-poblaciones de linfocitos de la inmunidad adaptativa contra la TB pulmonar.*

La TB pulmonar es una enfermedad crónica por definición, por lo que la protección inmune contra ésta depende fuertemente de la contención de los bacilos tuberculosos dentro de los granulomas. Los mecanismos involucrados en dicha contención son complejos y dependen de diferentes poblaciones de linfocitos T. Aunque se sabe que los linfocitos T CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>,  $\gamma\delta$  y restringidos a CD1, son todos requerido para una protección óptima, un orden jerárquico parece más bien existir. En dicho orden los linfocitos T CD4<sup>+</sup> son los elementos más importantes, seguidos de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> (Kaufmann, 2005). Ahora bien, el papel de estas poblaciones de linfocitos en la protección está bien demostrada debido a la disponibilidad de modelos animales adecuados. Por el contrario, el papel de los linfocitos T  $\gamma\delta$  y los restringidos a CD1, es menos entendido debido a la carencia de dichos modelos. Las razones por la cuales diversas poblaciones de linfocitos T participan en la protección son desconocidas, sin embargo, esto permite el reconocimiento de un amplio repertorio de antígenos micobacterianos e incrementa la capacidad del hospedero para detectar al patógeno (Kaufmann, 2005) (**Figura 3**).

#### *1.2.2.1 Linfocitos T CD4<sup>+</sup>*

La actual pandemia de VIH proporciona evidencia directa de que la pérdida de linfocitos T CD4<sup>+</sup> en número y función aumenta el riesgo de TB primaria, así como de la

reactivación de la TB latente y el incremento en la susceptibilidad a la re-infección (Boom, 2003). En estudios sobre transferencia temprana de esta sub-población de linfocitos a ratones infectados con *Mtb*, se encontró que esta protegió a los animales contra la infección. De la misma manera, cuando se utilizaron anticuerpos monoclonales contra los linfocitos T CD4+ y/o al eliminar genes que codifican para las moléculas MHC clase II o CD4+ en ratones infectados, se encontró una marcada susceptibilidad de estos animales a la infección (Muller, 1987; Pedrazzini, 1987), confirmando el papel central de esta población de linfocitos en la protección.



**Figura 3. Rutas de procesamiento y presentación antigénica. Activación de diferentes sub-poblaciones de linfocitos T por *Mtb*.** Se muestran las diferentes rutas de procesamiento de antígenos que dan como resultado la activación de diferentes sub-poblaciones de células T, como son linfocitos T CD4+, CD8+, γδ y restringidos a CD1. Todas estas son requeridas para una protección óptima. (Kaufmann, 2001).

Los linfocitos T CD4+ humanos que son activados por antígenos de Mtb así como células T CD4+ específicas de antígeno, secretan citocinas encargadas de la activación macrófaga, que como se mencionó anteriormente son el IFN $\gamma$  y TNF $\alpha$ . Estas citocinas son citotóxicas (Ct) para los macrófagos infectados y les ayudan a controlar el crecimiento intracelular de las micobacterias (Tsukaguchi, 1999; Tsukaguchi, 1995; Boom, 2003). Así como sucede con los linfocitos Ct después de la activación por Mtb, los linfocitos T CD4+ expresan granzima, Fas-L, granzulina y perforina, sin embargo, no es claro si su función citotóxica está asociada con el control del crecimiento de las micobacterias en macrófagos. De la misma manera, por medio de la secreción de IL-2, los linfocitos T CD4+ ayudan a los linfocitos T  $\gamma\delta$  y CD8+. Todas estas funciones son importantes en el papel que desempeñan los linfocitos T CD4+ en la protección, aunque estas células son fundamentales en todos los estadios de la infección, pueden participar diferencialmente durante cada uno de ellos.

#### *1.2.2.2 Linfocitos T CD8+ y otras sub-poblaciones*

Entre las células T alveolares y periféricas de individuos PPD positivos se han encontrado linfocitos T CD8+ específicos para Mtb (Tan, 1997). Estas células también secretan IFN $\gamma$  pero en menor cantidad que los linfocitos T CD4+ (Canaday, 1999), además, expresan granzima, Fas-L, granzulina y perforina, lo cual les permite lisar a los macrófagos infectados (Canaday, 2001). Los linfocitos T CD8+ pueden ayudar a los macrófagos a controlar el crecimiento intracelular de las micobacterias, como ha sido demostrado en estudios con ratones en los que la protección ha estado mediada por esta sub-población, particularmente durante los estadios tardíos de la enfermedad. Sin embargo, no es claro si esta protección es debida a su actividad Ct. En humanos no se sabe en cual estadio de la infección la participación de los linfocitos T CD8+ es más importante.

Otra sub-población de linfocitos que es activada por Mtb son las células T  $\gamma\delta$ , que de manera similar a las células T CD4+ y T CD8+ (también secretan IFN $\gamma$ ), pueden lisar a los macrófagos infectados y ayudar a contener el crecimiento de las micobacterias (Tsukaguchi 1995, Dieli, 2001). Las células T  $\gamma\delta$  son encontradas en los pulmones de pacientes con TB, y existe una correlación entre la ausencia o pérdida de estas células en sangre y pulmón, y

la extensión de la enfermedad (Li, 1996). Por medio de estudios en modelos animales, particularmente en primates, se sabe que el número y reactividad de las células T  $\gamma\delta$  a fosfoantígenos se incrementa durante la infección primaria y posterior al reto con BCG, lo cual sugiere que están involucradas en la protección (Shen 2002). Así mismo, como se sabe los individuos sensibilizados a antígenos micobacterianos tienen mayor capacidad para responder a Mtb que los individuos PPD negativos (Kabelitz 1990, Barnes 1992) por lo que se ha observado que la vacunación de adultos con la BCG incrementa la expansión *in vitro* de las células T V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 después de estimularlas con antígenos de Mtb.

Una sub-población adicional de células T que responde a Mtb es la TCR+  $\alpha\beta$  restringida a CD1 (Ulrichs 2000). Las moléculas CD1 tienen muy pocos polimorfismos y tiene la capacidad de unir antígenos lipídicos de Mtb tales como ácidos micólicos y manósidos de fosfatidil-inositol (PIMs). Las células T restringidas a CD1 secretan INF $\gamma$ , son citotóxicas para los macrófagos infectados y pueden ayudarlos a controlar el crecimiento intracelular de las micobacterias.

En resumen, la respuesta de las células T humanas a Mtb está caracterizada por la participación de múltiples sub-poblaciones con funciones similares. Estas secretan INF $\gamma$  y TNF $\alpha$ , pueden lisar células infectadas, -como los linfocitos citotóxicos-, y pueden ayudar a los macrófagos a controlar el crecimiento del bacilo. Sin embargo, dichas poblaciones difieren en el rango de antígenos micobacterianos que reconocen, así como en los mecanismos de procesamiento de antígenos empleados para procesarlos y presentarlos a sus TCR. Así mismo, difieren también en cuanto al estadio de la infección en la que son más activas o esenciales, y en su capacidad para entrar a los sitios de enfermedad activa (granuloma, nódulos linfáticos). Algunos autores han sugerido que las células T  $\gamma\delta$  y las restringidas a CD1 establecen un puente entre las fases innata y adaptativa de la respuesta inmune a Mtb.

Finalmente, es importante resaltar que las células T CD4+ tienen un papel clave a través de todos los estadios de la infección pero puede diferir cuando la secreción de citocinas vs. su función citotóxica es lo más importante (Kabelitz 1990, Barnes 1992).

### 1.3 La participación de citocinas y moléculas de la respuesta inmune tipo Th1 (IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ e iNOS) y tipo Th2 (IL-4) durante la respuesta inmune a la TB pulmonar.

En el diseño de nuevas vacunas e inmunoterapias, el conocimiento del papel regulador de las citocinas en la patogénesis y en la protección contra la TB es de esencial importancia (Surcel, 1994; Buccheri, 2007). Hay observaciones que sugieren que en la respuesta inmune a Mtb pueden distinguirse de acuerdo a su perfil de secreción de citocinas, dos amplias categorías de células T, cuyas funciones posiblemente se sobreponen: Estas incluyen las tipo Th1 y Th2. Esta clasificación se basa en el patrón de citocinas que secretan como resultado de la estimulación antigénica. Las células tipo Th1 secretan IL-2 e IFN $\gamma$ , promueven la hipersensibilidad retardada y juegan un papel fundamental en la protección, mientras que las células tipo Th2 secretan citocinas como IL-4, IL-5 e IL-10, entre otras, y ejercen más bien una influencia negativa sobre la respuesta inmune a TB, en términos de protección, porque inducen una respuesta humoral ineficiente (Raja, 2004). El balance entre ambos tipos de respuesta se ve reflejado en la respuesta inmune del huésped contra la infección. Por otro lado, las células tipo Th0 muestran un patrón de secreción de citocinas mixto, y se ha descrito que la diferenciación de las células Th1 y Th2 a partir de las Th0 precursoras puede estar bajo el control de citocinas tales como la IL-12 (Orme, 1993).

A pesar de lo anteriormente descrito, existe controversia respecto a la presencia de ambos tipos de respuestas. En algunos reportes, por ejemplo, se ha demostrado la presencia de un patrón Th1 y Th2 en ratones infectados con cepas virulentas de Mtb. Sin embargo, en la literatura también existen reportes inconsistentes sobre la preponderancia de las citocinas Th1 o Th2, del incremento de ambas, de la reducción de la Th1 pero no del incremento de la Th2, etc. Además la respuesta parece variar entre la sangre periférica y el sitio de la lesión; y entre los diferentes estadios de la enfermedad dependiendo de su severidad. Por ejemplo, se ha reportado que las células mononucleares periféricas (PBMC) de pacientes con TB, estimuladas *in vitro* con PPD, secretan bajos niveles de IFN $\gamma$  e IL-2 comparados

con sujetos sanos PPD positivos (Huygen, 1988). Otros estudios han reportado también reducción en la secreción de IFN $\gamma$  e IL-4 (Sanchez, 1994) o incremento en el número de células que secretan IL-4 (Vilcek, 1986). En estos estudios se concluyó que los pacientes con TB tenían una respuesta Th2 en sangre periférica, mientras que los pacientes sanos PPD positivos tenían una respuesta Th1.

Ahora bien, se ha examinado la respuesta inmune celular en los sitios de la infección. Para lo cual, Zhang y cols. (Zhang, 1994) estudiaron la producción de citocinas en fluidos pleurales y encontraron niveles elevados de IL-12 después de estimular las células de estos fluidos con Mtb. Este mismo grupo observó que los linfocitos de nódulos linfáticos de pacientes con TB tenían una elevada producción de IFN $\gamma$  sin que hubiera secreción de IL-4 (Lin, 1996) y no se observó incremento de la respuesta Th2 en el sitio de la infección. Además, Robinson y cols. (Robinson, 1994) encontraron niveles elevados del RNAm de IFN $\gamma$  *in situ* en células de lavados bronquiales (BAL) de pacientes con TB activa.

A pesar de la evidencia anteriormente señalada, es importante destacar que en humanos con TB, la extensión de la respuesta inmune Th1 está directamente relacionada con las manifestaciones clínicas de la enfermedad. Como ha sido demostrado por Sodhi y cols. (Sodhi, 1997) quienes encontraron que bajos niveles de IFN $\gamma$  circulantes en sangre periférica están asociados con TB clínica grave. Adicionalmente, se ha demostrado que pacientes con TB limitada tienen linfocitosis alveolar en las zonas pulmonares infectadas, y los linfocitos en estas lesiones secretan altos niveles de IFN $\gamma$ . También se ha observado que en pacientes con enfermedad avanzada o cavitaria, la linfocitosis tipo Th1 no está presente (Condos, 1997). Es claro por lo tanto que la respuesta tipo Th1 en la TB es esencial para el control de la misma, independientemente de la presencia y/o ausencia de la respuesta Th2. En las siguientes líneas se describirá la manera en que las citocinas de ambos tipos, y otras moléculas como la iNOS, participan durante el desarrollo de esta enfermedad, para montar una respuesta protectora, así como para inducir un balance entre la protección y la patología.

### 1.3.1 Interferón-gamma ( $IFN\gamma$ )

Esta citocina es una de las más importantes en la regulación de las defensas antimicrobianas, es producida por los linfocitos T CD4+, CD8+ y las células NK; sus principales inductores son: la IL-12, IL-18 e IL-23. Más allá de sus mecanismos destinados a la eliminación de los bacilos, el  $IFN\gamma$  es también un regulador crítico de la función presentadora de antígenos, a través de su acción sobre la expresión de moléculas del MHC y de moléculas co-estimuladoras. De manera interesante, esta última actividad es esencial para tener respuestas de células T óptimas contra el bacilo, y puede representar el papel principal de esta citocina en la inmunidad contra dicho patógeno (de Jong 1998, Keane, 2001). El incremento en la presentación antigénica, conduce al reclutamiento de linfocitos T CD4+ y linfocitos citotóxicos al sitio de la infección, permitiendo la eliminación de las micobacterias.

La importancia del  $IFN\gamma$  durante la infección por Mtb, se ha demostrado por el incremento en la susceptibilidad en niños con defectos genéticos en el receptor para esta citocina (r $IFN\gamma$ ) y en ratones deficientes para esta misma molécula (Flynn 1993, Silver 1998). Aunque no es muy claro aun de que manera el  $IFN\gamma$  media la protección, en humanos por ejemplo, esta citocina sola es ineficiente para incrementar la capacidad de los macrófagos para controlar la infección. En ratones, la inmunidad protectora mediada por los linfocitos T CD4+ no puede ser explicada solo por la secreción de  $IFN\gamma$ , debido a que se ha encontrado que ratones deficientes en moléculas para el MHC clase II y CD4+, producen grandes cantidades de esta citosina y no son lo suficientemente capaces de controlar la infección (Caruso, 1999). Más adelante se subraya la compleja interacción de esta citocina con otras, y su singular importancia en la protección.

Como se señaló el  $IFN\gamma$  solo, es insuficiente para controlar la infección, aunque es requerido para montar una respuesta inmune protectora contra este patógeno, ya que es el responsable de regular una amplia variedad de funciones en los macrófagos, la principal es la activación de estas células, además de la producción de  $TNF\alpha$ . La activación

macrofágica por el  $\text{INF}\gamma$  junto con  $\text{TNF}\alpha$ , es el mecanismo por el cual estas células producen moléculas antimicobacterianas como el óxido nítrico (NO) y los intermediarios reactivos de nitrógeno (RNIs). Es por medio de la inducción de la enzima óxido nítrico sintetasa (iNOS), que el NO y las RNIs inhiben el crecimiento de Mtb (Flesch 1987; Flesch, 1991). Existe un mecanismo independiente de la ruta iNOS-NO, por el cual el  $\text{INF}\gamma$  activa macrófagos para la eliminación de micobacterias, el cual consiste en la inducción de LRG47, una GTPasa p47 pequeña, que incrementa la muerte de las micobacterias en estas células (MacMicking 2003). Este mecanismo induce autofagia en los macrófagos, evitando la maduración del fagosoma e inhibiendo la sobrevivencia intracelular del patógeno (Gutiérrez, 2004). De esta manera aunque el  $\text{INF}\gamma$  solo no puede controlar la infección, es indudablemente necesario para las respuestas protectoras generadas contra este patógeno.

### *1.3.2 Óxido nítrico sintetasa y Óxido nítrico (iNOS y NO)*

La iNOS es la principal generadora de RNI en células inmunes y es una enzima altamente regulada. En macrófagos, la expresión de la iNOS puede ser inducida por  $\text{INF}\gamma$  y  $\text{TNF}\alpha$  (o LPS). Esta isoforma de NOS, también llamada NOS2 difiere de la NOS neuronal (NOS1) y endotelial (NOS3) en que su actividad es independiente de los niveles de  $\text{Ca}^{++}$  intracelular, aunque como las otras isoformas, la iNOS no interactúa con calmodulina. La enzima iNOS cataliza la conversión de L-arginina a L-citrulina y NO; la producción de NO y otros metabolitos de nitrógeno reactivo han demostrado tener un papel muy importante en los mecanismos de defensa durante la inmunidad innata (Ohno, 2003).

El NO es un radical libre, altamente reactivo y difundible, soluble en lípidos y agua, capaz de reaccionar con oxígeno y ROI para formar peroxinitrilos como  $\text{NO}_2$ ,  $\text{NO}_3$ ,  $\text{N}_2\text{O}_3$  y el altamente micobactericida ONOO-. Los peroxinitrilos son compuestos muy inestables que se asocian rápidamente a diferentes constituyentes bioquímicos celulares, entre estos uno de los principales son las proteínas (en particular el aminoácido tirosina). Estas proteínas nitrosiladas experimentan cambios conformacionales con pérdida irreversible de sus funciones lo que contribuyen a la muerte celular (Ohno, 2003).

El NO y los RNI, generadas por la iNOS de macrófagos activados, constituye el principal mecanismo de defensa contra el bacilo Mtb en el ratón durante las fases aguda y

persistente de la enfermedad (Ohno, 2003). Evidencia abundante sugiere que los óxidos tóxicos de nitrógeno también tienen un papel significativamente protector en la TB en humanos (Nathan, 2002). Esto es materia de controversia aún, ya que muchas observaciones subrayan amplias diferencias entre humanos y ratones (Jackett 1978; Flesch 1991). Por ejemplo MacMicking y cols. (MacMicking 1991), han demostrado que en ratones deficientes en iNOS (iNOS<sup>-/-</sup>), Mtb se replica mucho más rápido que en los animales control. Por su parte, en macrófagos alveolares de humanos con TB se demostró mayor capacidad de estas células para generar ROI (principalmente H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), comparada con la capacidad de los obtenidos de los sujetos control (Kuo 1996). Así mismo, por medio de estudios inmunohistoquímicos se ha demostrado la presencia de expresión abundante de iNOS, así como de la producción *in situ* de RNI (Flynn, 1998; Scanga, 2000) en los granulomas pulmonares de ratones y humanos infectados con Mtb.

Por otro lado, se ha demostrado que el rápido consumo de NO debido a su exquisita reactividad, implica que la proximidad de la formación de NO con su blanco puede ser importante para su efectiva actividad antibacteriana. Debido a que como se señaló, los productos de la iNOS son altamente reactivos, si el NO es generado intracelularmente en sitios distantes de sus blancos (por ejemplo, lejos de los fagosomas que contienen a la micobacteria), puede ser consumido o aprovechado antes de que pueda alcanzar al patógeno y destruirlo. Es así que la proximidad de la iNOS a los blancos intracelulares es fundamental para ejercer sus funciones. Recientemente se ha reportado que Mtb inhibe el tráfico de iNOS al fagosoma micobacteriano (Scanga, 2000).

### 1.3.3 Factor de necrosis tumoral-alfa (TNF $\alpha$ )

Esta citosina pro-inflamatoria tiene varios papeles durante las respuestas inmune y patológica a la TB. Las micobacterias inducen la secreción de TNF $\alpha$  por los macrófagos, CD's y células T. Como se ha demostrado, los ratones deficientes en TNF $\alpha$  o en su receptor mueren de TB diseminada y con granulomas desorganizados (Flan, 2004), así como con un mayor número de micobacterias en los pulmones comparados con los controles (Flan, 1995). En consecuencia, esta citocina es importante para limitar la infección y prevenir la diseminación. Los datos que apoyan el papel fundamental que

desempeña el TNF $\alpha$  en la formación y mantenimiento de la estructura del granuloma (Flynn, 1995; García, 1997) han establecido que ejerce efectos sobre la localización y migración celular en los tejidos infectados. Así mismo, tiene influencia sobre la expresión de moléculas de adhesión así como sobre quimiocinas y receptores de quimiocinas, influyendo sobre la formación de granulomas funcionales en dichos tejidos. Por su parte, humanos con tratamiento anti-TNF $\alpha$  (Infliximab, Etanercept) desarrollan TB extrapulmonar y diseminada (Wallis, 2004).

A pesar de sus efectos en la protección, esta citocina también está implicada en la respuesta inmunopatológica y es con frecuencia el factor más frecuente en la destrucción del tejido pulmonar, ya que se ha observado que el incremento en su expresión correlaciona con tal destrucción, y sugiere que su función puede ser dosis-dependiente (Lasco 2005). (Moreira, 1997). Además, se ha demostrado que en el sitio de la lesión (fluido pleural) los niveles de TNF $\alpha$  son mayores comparados con la respuesta inmune periférica (sangre), demostrando que la respuesta inmune compartimentalizada debe de estar conteniendo a la infección (Prabha, 2003).

#### 1.3.4 Interleucina-4 (IL-4)

En una serie de observaciones se ha encontrado que la respuesta Th1 suprimida o pobremente expresada, en lugar de una respuesta Th2 potente, explica la falla de la respuesta inmune para controlar la infección por Mtb. En consecuencia, el papel de la respuesta Th2 y de citocinas como la IL-4 durante la TB ha sido objeto de controversia. Ahora bien, si la respuesta tipo Th1 representa el patrón protector necesario para controlarla, entonces citocinas supresoras de esta respuesta, como la IL-4, podrían estar involucradas en la progresión de la enfermedad. Tanto la IL-4 como otros marcadores de actividad Th2 tales como IgE e IgG4 son encontrados frecuentemente en pacientes con TB (Lienhardt, 2002), sin embargo, como se señaló anteriormente estudios en animales no demuestran una clara dicotomía en el patrón Th1/Th2 durante la respuesta inmune contra la enfermedad (Jung, 2002). Estudios realizados en diferentes cepas de ratones deficientes en IL-4 (IL-4<sup>-/-</sup>) han reportado resultados contradictorios. Por ejemplo, en ratones C57Bl/6 IL-4<sup>-/-</sup> e infectados con *Mycobacterium bovis* BCG, no se observó ninguna diferencia en la carga bacilar con respecto a los controles (Erb, 1998); de manera similar, ratones de esta

misma cepa deficientes en IL-4 o en su receptor (IL-4R $\alpha$ ) y ratones Balb/c deficientes en STAT6, tuvieron un número similar de bacilos que los controles cuando se les infectó con Mtb H37Rv (North, 1998; Jung, 2002). En contraste con estos estudios, existen en la literatura abundantes observaciones que señalan que el bloqueo de las funciones de la IL-4 durante los estadios tempranos o avanzados de la infección, puede ser benéfico en términos de la reducción en la carga bacilar. En este sentido se ha demostrado que ratones Balb/c deficientes en IL-4 e infectados con la cepa H37Rv mostraron una reducción de 100 veces en el número de bacilos viables recuperados de los pulmones comparados con los ratones tipo silvestre (Hernández-Pando, 2004). De la misma manera, recientemente se ha reportado que el uso de dosis bajas y altas de anticuerpos mono y policlonales anti-IL-4 a ratones infectados con H37Rv, los protegió contra la infección a través de la reducción de la carga bacilar (Roy, 2008). Además, la combinación de un anticuerpo anti-IL-4 con IgA anti- $\alpha$ -cristalina durante la infección redujo 40 veces el número de bacilos en los pulmones de ratones Balb/c (Buccheri, 2007).

De manera adicional, se ha evaluado por medio de microarreglos la transcripción global de genes de macrófagos murinos alternativamente activados por IL-4 e infectados con Mtb. Este tipo de activación, se comparó con la bien caracterizada *activación clásica* (inducida por IFN $\gamma$ ) (Kahnert, 2006). En este estudio se demostró que la *activación alternativa* dañó la producción de NO e incrementó la producción del receptor de transferrina en estas células, dando como resultado incremento en la disponibilidad de hierro para Mtb permitiendo su supervivencia. Así mismo, se observó que la activación alternativa de macrófagos se caracteriza por incremento en la expresión de metaloproteinasa de matriz (MMP)-12 y se identificó la presencia *in vivo* de macrófagos positivos para ésta durante los estadios tardíos de la enfermedad. Lo anterior sugiere que la activación alternativa ocurre durante la TB progresiva y no determina el control de la replicación de los bacilos mediada por macrófagos (Kahnert, 2006).

Por su parte en estudios en humanos, se ha reportado que las PBMC de pacientes con TB muestran disminución en la respuesta Th1 sin incremento en la respuesta Th2 (Lin, 1996; Zhang, 1997). En otros estudios se detectó en los granulomas de pacientes con linfadenitis tuberculosa, elevada expresión de IFN $\gamma$  y poca expresión de IL-4 (Lin, 1996). De manera similar por medio de *hibridación in situ*, se detectó la expresión de IL-4 en 3 de

5 pacientes con TB avanzada, pero nunca en la ausencia de  $INF\gamma$  (Fenhalls, 2000); por lo que la presencia o ausencia de IL-4 no correlacionó con el mejoramiento clínico o con las diferencias en los granulomas o en su patología. Es decir, al igual que en los modelos animales, no es claro aún si la IL-4 es causa o simplemente refleja la actividad de la infección en humanos con TB.

A pesar de lo anteriormente descrito, también existe evidencia de que linfocitos T CD4+ y CD8+ de pacientes con TB y estimulados con Mtb muertos o Mtb H37Ra vivos mostraron incremento en la producción de IL-4 (Bhattacharyya, 1999; Smith, 2002). En la mayoría de los estudios realizados en países con baja incidencia de TB, los resultados apoyan el hecho de que los pacientes presentan niveles bajos de  $IFN\gamma$  sin un incremento de los niveles de IL-4 (Das, 1999; Johnson, 1994; Sánchez, 1994; Zhang, 1994). Sin embargo, existen datos que demuestran niveles reducidos de  $IFN\gamma$  con un incremento en la respuesta de IL-4 en pacientes de países donde la TB es endémica (Bhattacharyya, 1999; Smith, 2002; Van Crevel, 2000). Aunado a esto, se ha reportado que sujetos cuyo perfil inmune temprano (antes del desarrollo de TB activa) consiste en un porcentaje moderado de células T productoras de  $IFN\gamma$ , acompañado de la producción de IL-4 por células T CD8+ y células T  $\gamma\delta$  se asocia con el desarrollo de TB pulmonar activa (Ordway, 2004).

#### 1.3.5 Otras citocinas

Se han descrito otras citocinas que participan activamente en el curso de la TB, entre ellas destacan la IL-1 y la IL-2. La IL-1 junto con el  $TNF\alpha$ , intervienen en la fase aguda de la enfermedad, siendo responsables de la caquexia y de la fiebre. La IL-1 también facilita la expresión de los receptores de IL-2 y su producción por los linfocitos T. Por su parte la IL-2 participa generando una respuesta inmune que favorece la expansión del pool de linfocitos T específicos de antígeno. Varios estudios han demostrado que la secreción de la IL-2 por las células Th1, puede influenciar el curso de la infección, sola o en combinación con otras citocinas (Blanchard, 1989).

Por su parte, la IL-10 y el *factor de crecimiento y transformación tumoral*  $-\beta$  (TGF- $\beta$ ), tienen efectos antiinflamatorios -la primera es producida por macrófagos y células T, y la segunda por monocitos- en respuesta al bacilo y al lipoarabinomano, respectivamente. La IL-10 posee propiedades desactivadoras de macrófagos las cuales incluyen la desregulación

de la producción de IL-12, lo cual a su vez reduce la producción de IFN $\gamma$  por las células T. Así mismo, la IL-10 inhibe directamente las respuestas de células T CD4+, así como las funciones de las APC infectadas con micobacterias (Rojas, 1999). Por su parte el TGF- $\beta$  inactiva la producción de ROI y RNIs por los macrófagos, inhibe la proliferación de las células T, interfiere con las NK y con la función de los CTL, desregula IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  y la producción de IL-1 (Ruscetti, 1993).

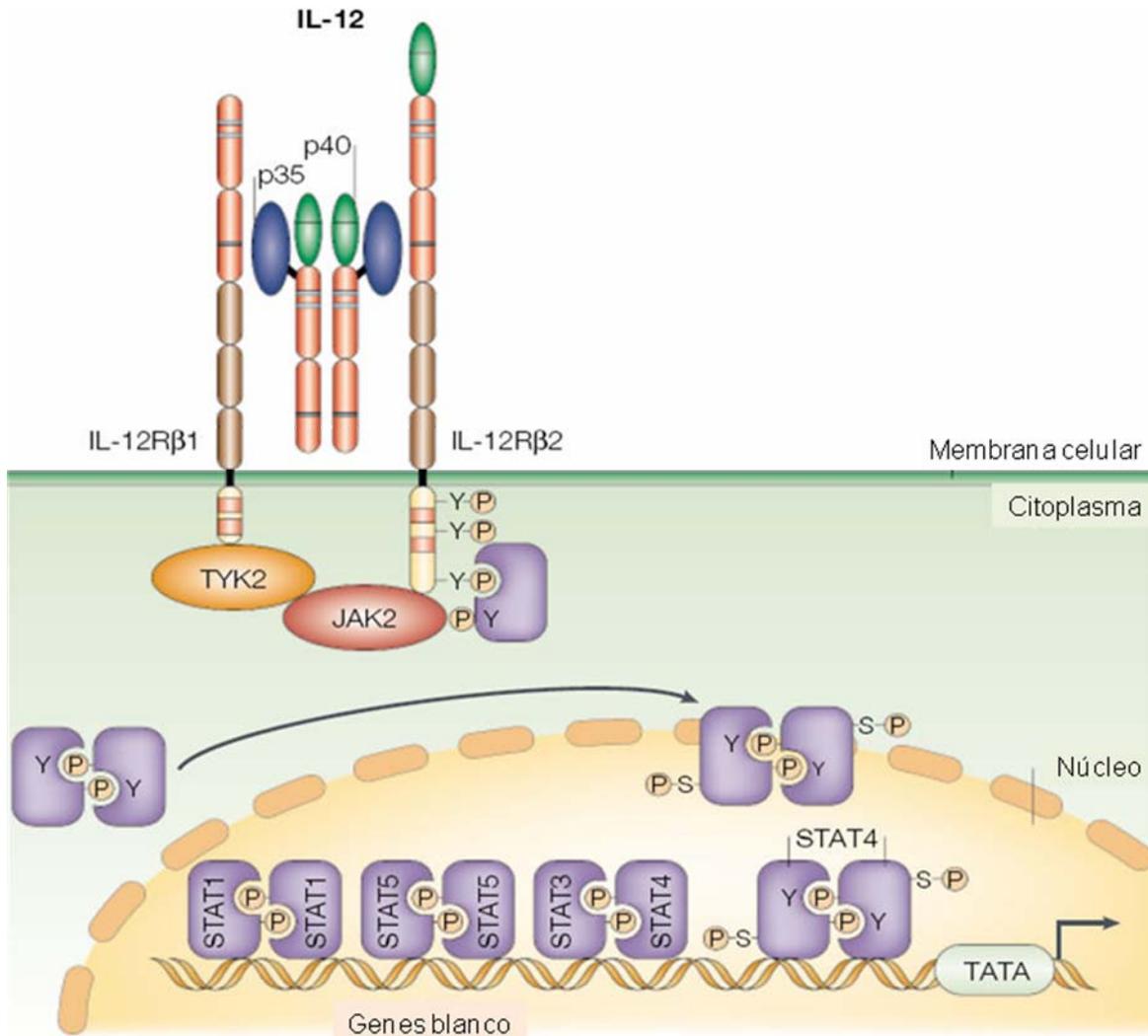
#### 1.4 El papel de la IL-12 en la respuesta inmune contra la tuberculosis pulmonar

##### 1.4.1 *Biología de la IL-12*

La IL-12 es una citocina heterodimérica compuesta por dos subunidades, p35 y p40 unidas por un puente disulfuro (**Figura 4**) (Gately, 1991; Gubler, 1991; Wolf, 1991; Trinchieri, 1995; Trinchieri, 1999; Esche, 2000). La subunidad p40 es homóloga a los receptores de citocinas, mientras que la p35 es similar a la IL-6 (Merberg, 1992).

Los genes que codifican para ambas subunidades en humanos y ratones están localizadas en diferentes cromosomas (3 y 5, 6 y 11, respectivamente), por lo que la expresión de sus proteínas es regulada de manera independiente. Cuando son co-expresadas en la misma célula, sus subunidades forman el heterodímero biológicamente activo, p70 (Gubler, 1991). Se le identificó por primera vez como un producto de la línea de células B transformada por el virus Epstein-Barr (EBV), que puede activar células NK, generar células citolíticas activadas por linfocinas (LAKs), inducir la producción de IFN $\gamma$  y la proliferación de células T (Kobayashi, 1989; Hsieh, 1993).

Los principales productores fisiológicos (Manetti, 1993; Stern, 1990) de la IL-12 son los fagocitos (monocitos/macrófagos y neutrófilos) y CD's en respuesta a patógenos (bacterias, hongos, parásitos intracelulares y virus) a través de TLRs y otros receptores; a señales solubles y unidas a la membrana de los linfocitos T activados; a células NK y a componentes de la matriz extracelular inflamatoria (por ejemplo, hialuronano de bajo peso molecular) a través de CD44 y TLRs (**Figura 5**).



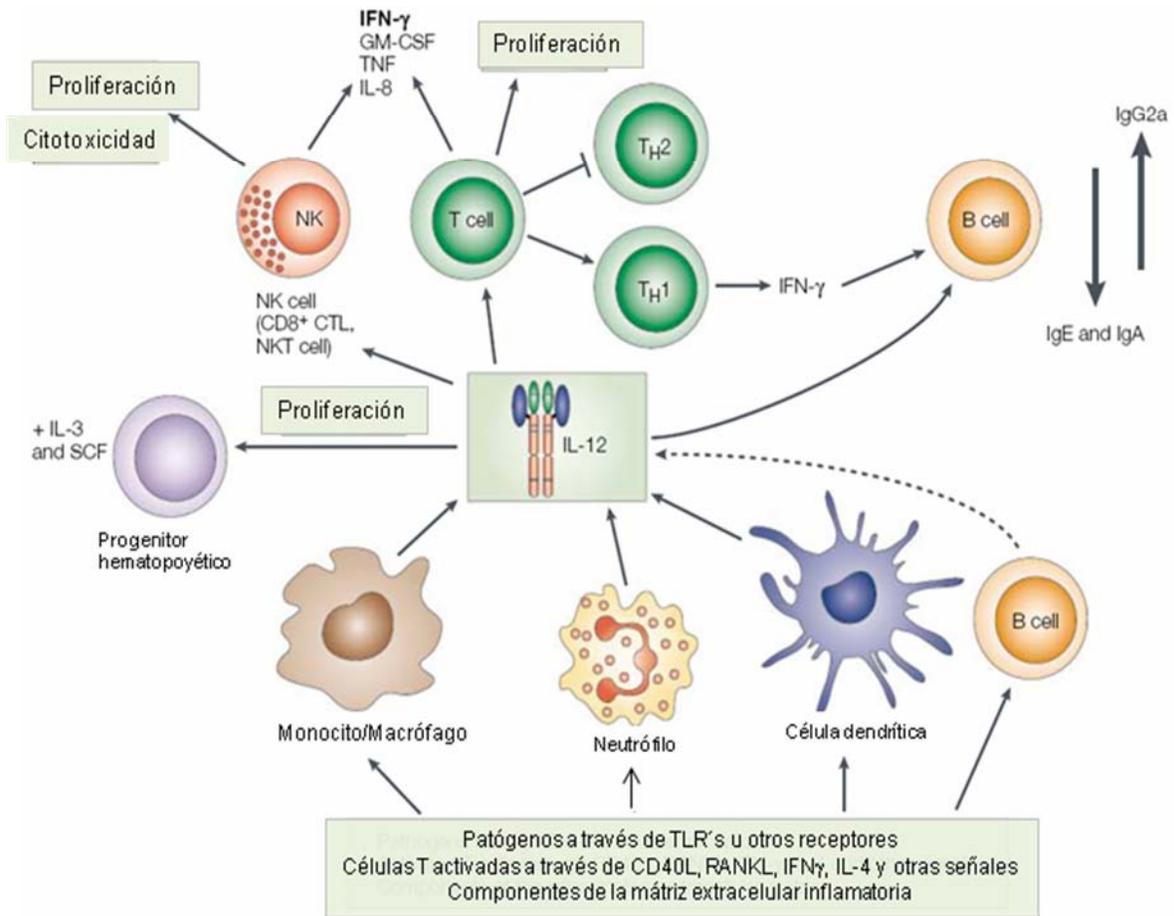
**Figura 4. Estructura de la IL-12 y su receptor. Mecanismo de señalización de IL-12.** Esta citocina heterodimérica está compuesta por dos subunidades p40 y p35 unidas por un puente disulfuro. Su receptor tiene dos subunidades  $\beta 1$  y  $\beta 2$ . La IL-12 activa la ruta JAK/STAT. Las subunidades p40 y p35 se unen a las subunidades  $\beta 1$  y  $\beta 2$  del receptor, respectivamente. Tirosinas específicas dentro del dominio citoplásmico de la subunidad  $\beta 2$  del receptor reclutan STAT4. (Trinchieri, 2003.)

Por otro lado, sus células blanco fisiológicas (Manetti, 1993; Stern, 1990) más importantes son: los progenitores hematopoyéticos para los cuales en sinergia con otros factores estimuladores de colonias, la IL-12 incrementa su formación y proliferación. Así mismo actúa sobre las células T, NK y NKT induciendo su proliferación e incrementando su citotoxicidad, además de la expresión de mediadores citotóxicos, la producción de citocinas (principalmente IFN $\gamma$ ) y favoreciendo su diferenciación a células que producen citocinas tipo Th1 (células T<sub>H1</sub>, T<sub>c1</sub>, NK1). Finalmente sobre las células B, la IL-12 incrementa directa o indirectamente a través de citocinas Th1 como IFN $\gamma$ , la activación y producción de inmunoglobulinas asociadas a la respuesta Th1 (como IgG2a en el ratón) (**Figura 5**).

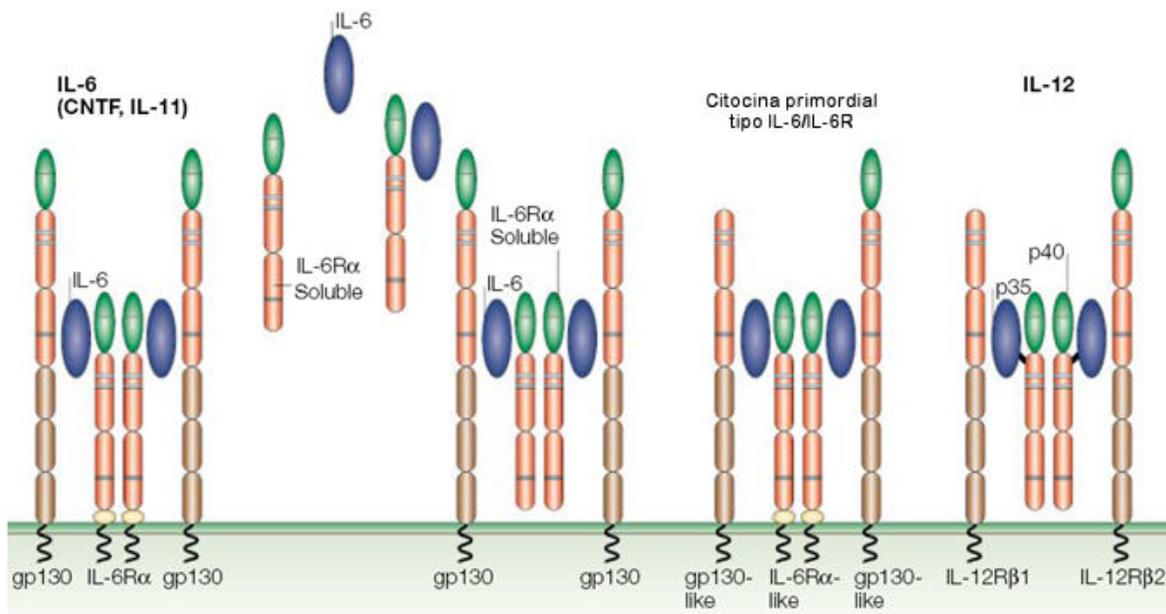
#### *1.4.1.1 Estructura y evolución de la IL-12 y su receptor*

Debido a la estructura inusual de la IL-12, se cree que pudo haber evolucionado a partir de una citocina primordial de la familia de la IL-6 y de uno de sus receptores. La subunidad p40 de la IL-12 es homóloga al receptor del factor neurotrófico ciliar (CNTFr) y a la cadena  $\alpha$  del receptor de IL-6; mientras que la proteína p35 tiene homología con la IL-6. Esto indica que la IL-12 evolucionó de un miembro de la familia de la IL-6 y de una cadena de su receptor original (Merberg, 1992) (**Figura 6**).

El receptor de la IL-12 (rIL-12) está compuesto por dos cadenas- el receptor de IL-12  $\beta$ 1 (RIL-12 $\beta$ 1) y el receptor de IL-12  $\beta$ 2 (RIL-12 $\beta$ 2) (**Figura 6**)- las cuales están relacionadas estructuralmente a la superfamilia de receptores de citocinas tipo 1 y son homólogas a gp130 (Chua, 1994; Chua, 1995; Presky, 1996; Esche2000). En humanos, la afinidad de IL-12 por las cadenas solas,  $\beta$ 1 y  $\beta$ 2 (del receptor) es baja, por lo que se requiere de la co-expresión de ambas cadenas para la generación de sitios de unión de alta afinidad.



**Figura 5. Biología de la IL-12.** Los principales productores fisiológicos de la IL-12 son los fagocitos y DC, sus más importantes células blanco son progenitores hematopoyéticos, células NK, NKT y células T. En estas últimas induce proliferación, formación de colonias, incremento de citotoxicidad, producción de citocinas como el IFN $\gamma$ . (Trinchieri, 2003.)



**Figura 6. Evolución de la IL-12 y su receptor.** Las subunidades de la IL-12 tienen homología con otras proteínas. La forma biológicamente activa de esta citocina se parece a una citocina covalentemente unida a una forma soluble de su receptor. Al parecer, la IL-12 proviene de una citocina primordial de la familia de la IL-6. (Trinchieri, 2003).

La subunidad IL-12p40 interactúa con la cadena  $\beta 1$  del receptor, y la subunidad p35 interactúa predominantemente con la cadena  $\beta 2$ . Esta última es la cadena de transducción de señales del receptor, y contiene múltiples residuos de tirosina intracelular tres de los cuales reclutan a STAT4 (**Figura 4 y 6**).

En humanos, la tirosina 800 es crítica para la unión de STAT4 (**Figura 4**) (Naeger, 1999), en contraste, las tirosinas murinas 757, 804 y 811 (los cuales corresponden a la tirosina humana 800) son todas independientemente capaces de favorecer la fosforilación de STAT4 en respuesta a la señal de IL-12 (Nishikomori, 2002). Por otro lado, la cadena IL-12R $\beta 1$  no tiene residuos de tirosina intracelular y probablemente no pueda participar en señalización, por lo que es más importante en la unión al ligando (Wu, 2000). El rIL-12 es expresado principalmente por las células T y NK, aunque también se ha detectado en células dendríticas (DC's) y en líneas de células B. La activación de células T por medio del receptor de células T (TCR) regula a la alta, la transcripción y expresión de ambas

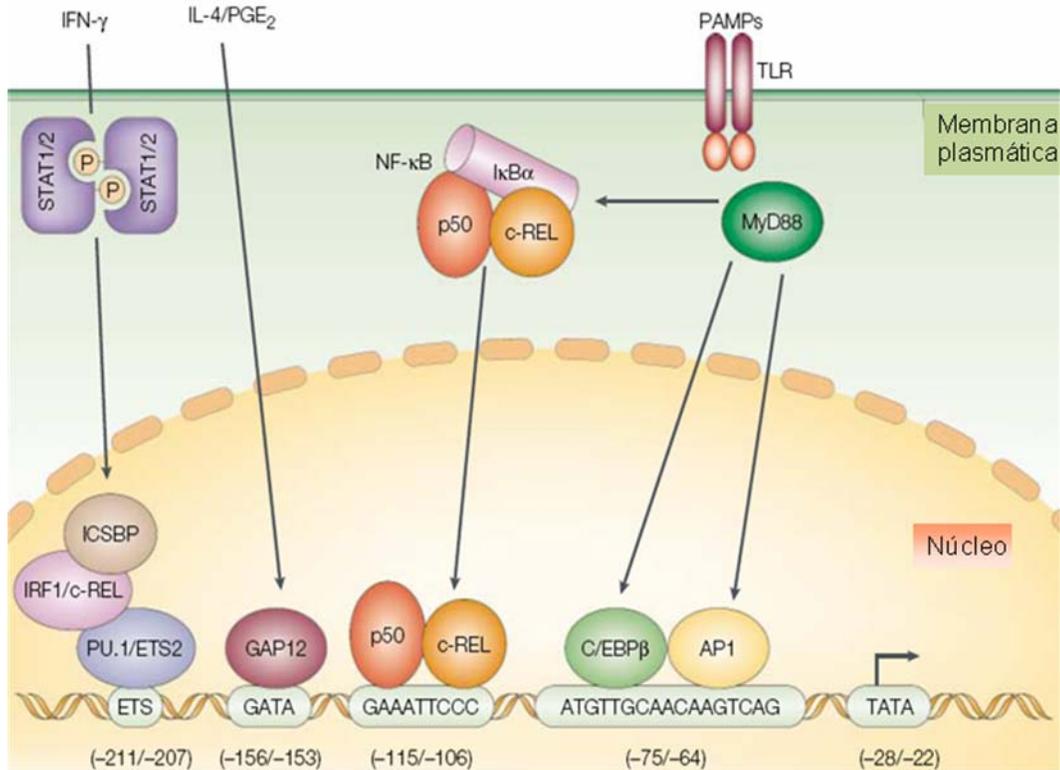
cadenas del rIL-12, y esta regulación- en particular de la cadena  $\beta 2$ - es aumentada por la propia IL-12, y por el IFN $\alpha$ , IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  y por co-estimulación por medio de CD28 (Rogge, 1999; Lighvani, 2001).

Se ha sugerido que la expresión de la cadena  $\beta 2$  del receptor es determinante del fenotipo Th. En la células Th1 se expresan ambas cadenas del receptor, sin embargo, la cadena  $\beta 2$  no se expresa en las células Th2 (Rogge, 1999). En las células Th1 la estimulación de IFN $\gamma$  regula a la alta la transcripción del factor T-bet, el cual a su vez mantiene la expresión de  $\beta 2$  (Lighvani, 2001; Afkarian, 2002). En contraste la IL-4 inhibe la expresión de  $\beta 2$  (Sinigaglia, 1999). Por lo tanto, los efectos opuestos de IFN $\gamma$  e IL-4 sobre la expresión del IL-12r puede contribuir a la diferenciación Th1/Th2.

#### 1.4.1.2 Regulación de la producción de IL-12

El gen p40 que codifica para la subunidad p40 de la IL-12, es regulado a nivel de la transcripción y es altamente inducido por productos microbianos. A las regiones promotoras del gen p40 en el ratón y en el humano, se unen varios factores transcripcionales incluyendo NF-kB, IRF-1, c-Rel, proteína consenso de unión a interferón (ICSBP), y miembros de la familia Ets (Murphy, 1995; Max, 1997; Plevy, 1997). Se han identificado dos elementos reguladores *cis-acting* en el gen p40: un sitio Ets (Max, 1997) y un sitio NF-kB, la delección o mutación en el elemento *cis* abate la actividad del promotor del gen p40 (Gri, 1998). Se ha demostrado que ratones deficientes en los factores de transcripción IRF-1 o ICSBP tienen dañada la producción de IL-12 (**Figura 7**).

Por su parte, la expresión del gen p35 es ubicua y está regulada a nivel transcripcional y postraducciona. Los sitios de inicio alternativos del RNAm de p35 producen transcritos con eficiencias traduccionales diferentes (Babik, 1999). A pesar de la síntesis constitutiva del mensajero de p35 en células no estimuladas, hay poca o nula proteína secretada debido a la presencia de un inhibidor en el codón ATG de inicio de la transcripción de la región 5' no traducida. Sin embargo, bajo estimulación por LPS el sitio de inicio de la transcripción cambia para que esta región inhibitoria sea excluida, y la transcripción ocurra.



**Figura 7. Regulación transcripcional del gen que codifica para la subunidad p40 de la IL-12.** Como resultado de la señalización del TLR, el nucleosoma es selectivamente remodelado, lo que permite el acceso de esta región al C/EBP. Sin embargo, este remodelamiento no es suficiente para la transcripción del gen p40. El promotor de este gen contiene varios elementos que son funcionalmente importantes para su expresión. El NF-κB es importante para la activación del promotor en respuesta a LPS. El sitio C/EBP coopera con proteínas REL que se unen al sitio NF-κB; y la sobreexpresión del C/EBP es suficiente para la actividad del promotor. (Trinchieri, 2003).

Ahora bien, la producción del heterodímero IL-12 (p70) está *regulada positivamente* por el IFN $\gamma$ , el cual a su vez regula a la propia IL-12. Esta última citocina participa en un loop de retroalimentación positiva promoviendo la secreción de IFN $\gamma$ , que a su vez activa monocitos y polimorfonucleares para la producción adicional de IL-12 (Max, 1996; Yoshida, 1998; Kubin, 1994). De manera inversa, la producción de IL-12 es inhibida o *regulada negativamente* por IL-10, IL-11, IL-13 e interferones de tipo 1. Existe controversia sobre si la IL-4 inhibe la producción de IL-12, en algunos casos esto se ha observado claramente (D'Andrea, 1995; Takenaka, 1997; Hochrein, 2000; Marshall, 1997),

mientras que en otras circunstancias el pre-tratamiento con IL-4 incrementó la producción de IL-12 (Major, 2002; Koch, 1996; Schindler, 2001; Aliberti, 2002).

Finalmente, los receptores acoplados a proteína G (GPCR), incluyendo los receptores para MCP-1, prostaglandina E2, histamina y FcR también inhiben la producción de IL-12. Recientemente se ha observado que las toxinas del cólera y del sarampión regulan a la baja su producción, aunque algunos GPCR como CCR5 la regulan positivamente (**Figura 7**).

#### *1.4.2 Funciones Biológicas de la IL-12*

Las funciones de la IL-12 han sido estudiadas principalmente en los linfocitos, aunque también ejerce sus efectos sobre otros tipos celulares. El IFN $\gamma$  que es inducido por la IL-12 media muchas de las actividades pro-inflamatorias de ésta última, mientras que la capacidad de la IL-12 para favorecer la respuesta Th1, ejemplifica su función como una citocina inmunoreguladora que tiende un puente entre la inmunidad innata y la adaptativa (**Figura 4**). Se ha demostrado que la IL-12 tiene un papel importante en la respuesta Th1 que se desarrolla en la autoinmunidad órgano específica, observada en varios modelos experimentales de ratón. Así mismo, también participa en la resistencia a muchas infecciones, particularmente con bacterias y parásitos intracelulares (Trinchieri, 1998). En las siguientes secciones se describirá el papel que desempeña la IL-12 en la resistencia a la infección por Mtb, así como su papel preponderante en la generación de respuesta Th1.

##### *1.4.2.1 Efectos de la IL-12 sobre las subpoblaciones de linfocitos T*

La IL-12 no induce la proliferación de células T periféricas o células NK, aunque si lo hace inducida por lectinas mitógenas, aloantígenos, anticuerpos específicos para CD3 y diésteres de forbol (Kobayashi, 1989; Perussia, 1992); ejerce un efecto proliferativo directo sobre células T pre-activadas y células NK (Stern, 1990). En sinergia con la estimulación a través de CD28, la IL-12 induce la proliferación de células T, - proliferación que no está bloqueada por ciclosporina A y no requiere la presencia de antígenos específicos- por lo tanto tiene un papel en la activación no-antígeno específica de células T durante la respuesta inmune (Kubin, 1994). De manera adicional, debido a que los ligandos para CD28 son moléculas de superficie y debido a que la IL-12 es secretada por la APC's, su

sinergia también facilita la proliferación de células T y la producción de IFN $\gamma$  después de la presentación antigénica de las APC's a las células T (Murphy, 1994; Chan, 1991).

La IL-12 incrementa la generación de linfocitos T citotóxicos (CTL's) y células LAK, así como el incremento en la actividad citotóxica de los CTL's y las NK, induciendo la transcripción de genes que codifican moléculas asociadas a granulos citotóxicos, como perforina y granzimas, y también regulando a la alta la expresión de moléculas de adhesión (Ohteki, 1999; Trinchieri, 1998). Por otro lado, aunque la IL-12 puede afectar la proliferación de células B y la producción de IFN $\gamma$  directamente (Airoldi, 2000), algunos de sus efectos reportados sobre la activación éstas células, y la producción de determinados isotipos de inmunoglobulinas (incremento en IgG1 y disminución en IgE), son mediados indirectamente por las células Th1 inducidas por IL-12 o por sus productos (en particular, IFN $\gamma$ ).

#### *1.4.2.2 La IL-12 y la producción de IFN $\gamma$*

La IL-12 induce a los linfocitos T y a las células NK para que produzcan varias citocinas- por ejemplo el factor estimulador de colonias de granulocitos/macrófagos y TNF- siendo particularmente eficiente en inducir la producción de IFN $\gamma$  (Kobayashi, 1989; Kubin, 1994; Gerosa, 1996). La producción de IFN $\gamma$  por la IL-12 requiere la presencia de bajos niveles de TNF e IL-1, los cuales son normalmente producidos de manera autócrina por las células T y NK (Gazzinelli, 1994; D'Ándrea, 1993; Hunter, 1995). La importancia de la IL-12 como un inductor de IFN $\gamma$  radica no únicamente en su alta eficiencia a bajas concentraciones, sino también en su sinergia con muchos otros estímulos activadores (Chan, 1992), por ejemplo para las células T, la IL-12 hace sinergia con IL-2, con la estimulación del complejo TCR-CD3 y con la activación del receptor CD28, induciendo una producción rápida y eficiente de IFN $\gamma$  (Chan, 1991; Hunter, 1995; Chan, 1994).

Por su parte para las células NK, la IL-12 es sinérgica con la IL-2, con complejos inmunes y con células blanco (Chan, 1992). Aunque la inducción de la expresión de IFN $\gamma$  ocurre sobre todo a nivel de la transcripción, la sinergia con inductores tales como ligandos para CD28 e IL-2, es sobre todo a nivel post-transcripcional, incrementando la estabilidad del RNAm de IFN $\gamma$  y movilizándolo el RNAm nuclear ( Walker, 1999; Hodge, 2002).

Se ha demostrado que la IL-18 es un factor de inducción de IFN $\gamma$  (Okamura, 1998) sin embargo, sola es inefectiva para producirlo, requiere sinergia con la IL-12 para inducir la transcripción del gen y la unión a los sitios STAT4 y AP1. Un componente esencial de la sinergia entre la IL-12 y la IL-18, es la capacidad de la IL-12 dependiente de STAT4 para regular a la alta, la expresión de las dos cadenas del receptor de IL-18; de manera inversa IL-18 regula a la alta la expresión de la cadena  $\beta$ 2 del receptor para IL-12. El requerimiento de ambas citocinas es particularmente evidente en la inducción de IFN $\gamma$  por macrófagos, DC's o células B que no son consideradas orígenes convencionales de esta citocina (Ohketi, 1999; Airoidi, 2000). A pesar de esto, la IL-18 no induce respuesta Th1 y en la ausencia de IL-12 puede estimular incluso la respuesta Th2. Recientemente se ha demostrado que la IL-27 en sinergia con IL-12, o estimulación por CD28, induce la producción de IFN $\gamma$  por la células T vírgenes (Pflanz, 2002).

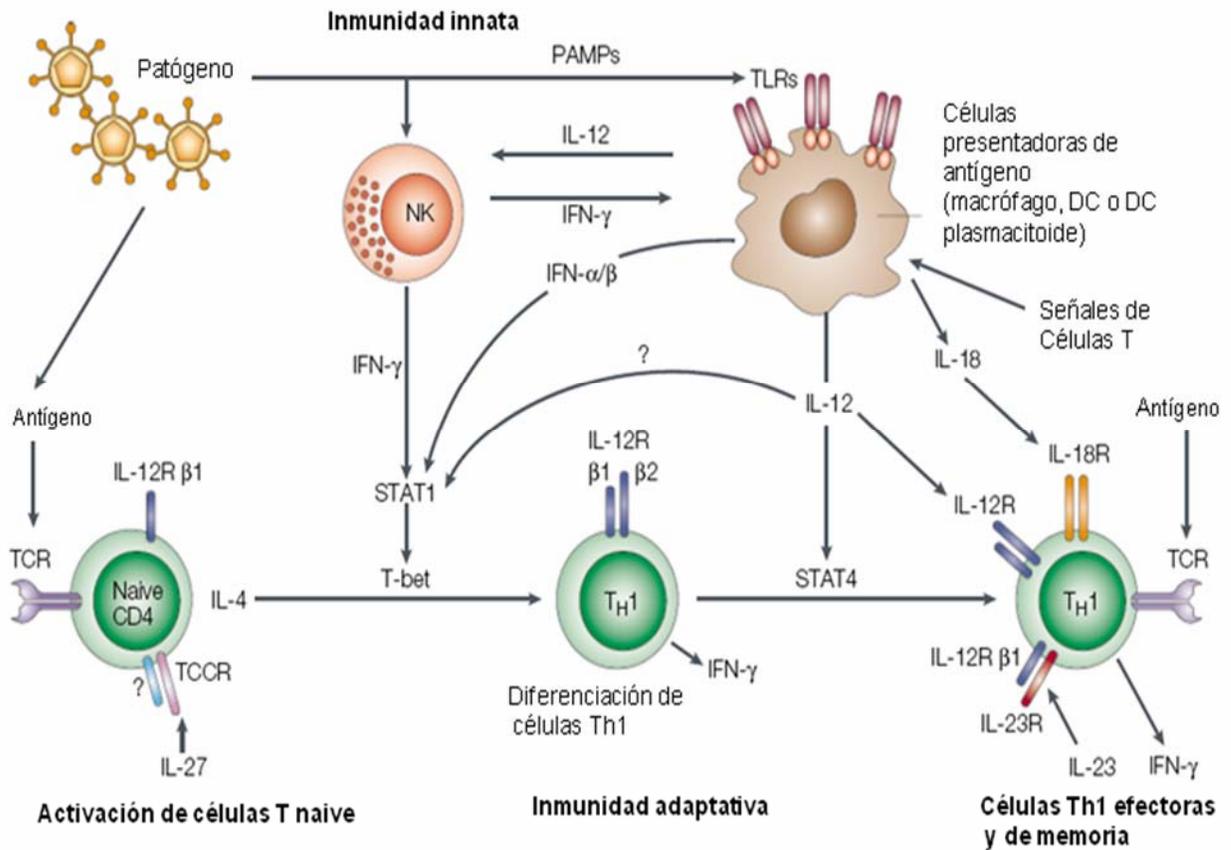
Es importante resaltar que aunque la producción de IFN $\gamma$  por las células T y NK y otros tipos celulares parece idéntica, existen diferencias importantes: En las células T y probablemente en la NK, existen dos rutas para su inducción: una de ellas es inducida por la estimulación a través de TCR's, CD3, receptores Fc, o diésteres de forbol e ionomicina, y es sensible a ciclosporina A; la otra ruta es inducida por estimulación con la IL-12 sola, o en sinergia con IL-18 o ligandos para CD28, y es resistente a ciclosporina A (Kubin, 1994; Yang, 1999).

#### 1.4.2.3 La IL-12 y la respuesta Th1

La IL-12 es un potente inductor de respuestas Th1 (Hsieh, 1993; Manetti, 1993), y es requerida para el óptimo desarrollo de las células Th1 durante la respuesta inmune a patógenos. La participación de la IL-12 en este tipo de respuesta se ha estudiado induciendo esta respuesta con IL-12 recombinante *in vitro* e *in vivo*, y por la inhibición de la respuesta Th1 en animales tratados con anticuerpos neutralizantes, específicos contra IL-12 o con animales genéticamente deficientes en IL-12p40, IL-12p35, IL-12R $\beta$ 1, IL-12R $\beta$ 2 o STAT4 (Trinchieri, 1998) (**Figura 8**).

La diferenciación de las células Th1 es determinada inmediatamente después de la infección - de manera temprana- por el balance entre la IL-12 y la IL-4, las cuales favorecen el desarrollo de células Th1 y Th2, respectivamente. Cuando la IL-12 está

presente durante la expansión clonal induce irreversiblemente a las células CD4+ y CD8+ para que produzcan altos niveles de IFN $\gamma$ . Es así que la IL-12 en cooperación con el IFN $\gamma$  induce a clonas de células T -que se están expandiendo en respuesta a antígenos específicos- para que se diferencien a células Th1 y para que produzcan citocinas como IFN $\gamma$ ; así como por otros mecanismos de selección positivos o negativos, incluyendo por ejemplo, la delección de células productoras de IL-4 o la expansión preferencial de poblaciones celulares con un fenotipo parecido al Th1.



**Figura 8. Modelo de la diferenciación de las células Th1.** In vivo e in vitro la IL-12 es requerida para la diferenciación óptima de las células T CD4+ a células Th1 altamente productoras de IFN $\gamma$ . En estudios recientes se ha postulado los efectos de otras citocinas, el papel de la señalización de los TCR y eventos estocásticos pueden estar participando también en la diferenciación al fenotipo Th1. (Trinchieri, 2003).

Por su parte, las células Th1 están caracterizadas por la expresión de T-bet, un miembro de la familia T-box de factores de transcripción que actúan en parte induciendo la expresión de IFN $\gamma$  (Szabo, 2000). La expresión de este factor transcripcional es inducida por la IL-12 aunque, recientemente se ha demostrado que puede ser inducido en células T aún cuando IL-12 esté bloqueada o en ratones deficientes de STAT4 (Mullen, 2001). Así mismo T-bet también es inducido por IFN $\gamma$  en células Th1, y de esta manera mantiene la expresión del IL-12R $\beta$ 2. Es importante mencionar que T-bet es capaz de repolarizar a las células Th2 para que produzcan IFN $\gamma$ , en contraste, la IL-12 no puede hacerlo, aún cuando el IL-12R $\beta$ 2 -el cual no se expresa en las células Th2- sea transducido (Heath, 2000). De manera que en las células T que se han polarizado, la expresión de T-bet es inducida de manera estocástica, o por estímulos diferentes de la IL-12 -incluyendo otras citocinas como IFN $\alpha$  y por la extensión y calidad de la señalización por el TCR. Debido a que la IL-12 no induce de manera eficiente la producción de T-bet, e IFN $\gamma$  lo puede hacer a través de STAT1, es por medio de este mecanismo que el eje IL12-IFN $\gamma$  puede inducir la diferenciación de células Th1, en paralelo con señales a través de TCR y otros receptores.

Finalmente es importante mencionar que aunque no existe ninguna duda de que en presencia de la IL-12 se producen respuestas Th1 eficientes, varias líneas de evidencia han sugerido que la IL-12 puede no ser absolutamente necesaria, y proponen que esta citocina puede estar involucrada en la expansión y fijación del fenotipo de las células T que se han diferenciado a Th1 por otros mecanismos tanto estocásticos como por la participación del TCR (Noble, 2001).

## 2.- ANTECEDENTES

Durante los últimos 20 años se han realizado numerosos estudios, en modelos animales y en humanos, encaminados a el desarrollo y aplicación de inmunoterapia (IT) basada en citocinas, con el propósito de mejorar el tratamiento no solo de la TB, si no también de otras enfermedades infecciosas. La IT ha sido empleada con éxito para el tratamiento de enfermedades reumatológicas, oncológicas y en diversas infecciones por microorganismos intracelulares; en este último caso se ha utilizado la IL-12 en modelos de infección que requieren un perfil Th1 para promover la eliminación del patógeno, como ha sido reportado para *Leishmania*, (Heinzl, 1993) *Toxoplasma gondii* (Gazzinelli, 1994) y *Mycobacterium tuberculosis* (Doherty, 1998).

Un claro ejemplo de esto ha sido el uso los IFNs de tipo 1, ya que cuando han sido administrados oralmente han demostrado ser eficaces para el tratamiento de algunas enfermedades infecciosas y en modelos animales de enfermedades autoinmunes (artritis inducida por colágeno, AIC). Las dosis aplicadas en algunos de estos estudios varían desde miles de unidades, hasta bajas dosis en otros. Se ha demostrado que los IFNs  $\alpha/\beta$  administrados por la ruta oral suprimen el desarrollo de AIC en ratas, con una reducción paralela de la hipersensibilidad de tipo retardada (DTH) específica de antígeno, el edema y el eritema. El efecto observado fue dosis-dependiente (Yoshino, 1995).

De la misma manera, se ha demostrado en modelos de infección así como en datos clínicos en humanos, el beneficio de emplear dosis altas y bajas de  $IFN\alpha$ . En un estudio realizado para tratar la infección causada por el virus de la estomatitis vesicular (VEV), se administraron 1500-4000 unidades de  $IFN\alpha/\beta$  murina (natural) , por la ruta oral, a ratones neonatales, lo que redujo la mortalidad en un 35%. (Schafer, 1972). No se observó algún tipo de protección cuando se les administró por vía subcutánea. Por otro lado, el uso benéfico de dosis bajas de esta citocina, (1-10 unidades) se ha demostrado en infecciones por *Theileria parva* (Young, 1990), estudio en el que se observó una reducción en la mortalidad de los animales.

En estudios en humanos, aunque controversial, se ha indicado que la administración oral de  $IFN\alpha$  puede ser benéfica para la inmunoprofilaxis del SIDA. En el reporte de un caso, se administraron de 2-4 unidades de  $IFN\alpha$  humana (natural) por el propio paciente (Hutchinson, 1987), observándose incremento en el número de células CD4+,

mejoramiento en el apetito, desaparición de lesiones por herpes y un incremento en la calidad de vida del paciente. En estudios adicionales, se ampliaron estos hallazgos, encontrándose que pacientes Kenianos (n=260) que recibieron dosis bajas de IFN $\alpha$  humano (natural) (1.5-2.5 unidades Kg<sup>-1</sup> d<sup>-1</sup>), permitiéndole a la citocina permanecer en contacto con la mucosa bucal (1-2 minutos) antes de tragarla (Koech, 1990a); experimentaron un incremento en el ratio de células CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> de 0.77 a 1.4 después de seis semanas de tratamiento. Además dichos pacientes ganaron peso, se redujo la severidad de la diarrea, de la fatiga, de la fiebre y otros síntomas (Koech, 1990b).

Ahora bien, en el caso específico de la TB, con el uso de la IT se han obtenido efectos terapéuticos importantes tanto en modelos animales como en humanos, ya sea administrando anticuerpos (Glatman-Freedman, 2006) o manipulando la respuesta inmune a través del uso de dichas moléculas. La intervención inmunoterapéutica se ha enfocado principalmente en la modulación de la respuesta inmune que se desarrolla durante la TB, regulando tanto a las citocinas que participan en la protección, como a las que favorecen su progresión. Dentro de los protocolos que se han desarrollado y empleado, los más exitosos han sido los basados en la administración de citocinas que favorecen la respuesta inmune protectora (intervención en la respuesta Th1) durante la enfermedad (Cooper, 1997; Flynn, 1995, Nolt, 2004; Greinert, 2000).

De esta manera, el papel de la IL-12 endógena en la resistencia a infecciones y la posibilidad de usarla como IT para estas, se ha estudiado ampliamente (Trinchieri, 1998). Como se mencionó anteriormente, las funciones pro-inflamatorias de la IL-12, así como su capacidad para estimular la respuesta inmune innata y para generar respuesta inmune Th1, son todas ellas esenciales para mejorar la resistencia a diferentes tipos de infección por microorganismos intracelulares. Es así como la IL-12 endógena parece ser importante para incrementar la resistencia a infecciones producidas tanto por bacterias intracelulares, como por parásitos y hongos, al generar una respuesta Th1. Sin embargo, es importante señalar que en muchos casos, el papel de esta citocina en la resistencia a dichos patógenos, se ha determinado usando anticuerpos específicos para IL-12p40, cuya desventaja radica en la alta probabilidad de neutralización incompleta (Murphy, 1994; Maruo, 1996).

Por otro lado, a diferencia de los estudios anteriores en los que se utilizaron anticuerpos contra IL-12, el uso de ratones deficientes en ésta citocina ha confirmado que

es requerida para mantener en curso la respuesta Th1 en enfermedades autoinmunes (Seder, 1996), y en infecciones por *Toxoplasma gondii* y *Leishmania major* (Yap, 2000; Park, 2000) y que tiene un papel menor durante la resistencia a infecciones con virus y con *Chlamydia pneumoniae*, en las cuales IL-12 no es requerida para producir IFN $\gamma$  o es requerida únicamente para su producción temprana por las células NK.

Es importante mencionar que durante el desarrollo de la respuesta inmune a la TB, varios miembros de la familia de la IL-12 participan activamente. Estos miembros incluyen a la IL-12p80, IL-12p70 e IL-23; los cuales participan también durante la respuesta inmune adaptativa (Dao, 2008). Todos estos miembros, son dímeros que comparten la subunidad p40 en asociación con otra diferente de esta, y se sabe que cada uno de ellos, tiene un papel inmunoregulador diferente durante varios estadios de la respuesta inmune a patógenos intracelulares como el Mtb (Beadling, 2006). Por ejemplo, durante el inicio de la respuesta innata los macrófagos liberan IL-12p80 (un homodímero de subunidades p40) para estimular el reclutamiento local de más macrófagos. Por su parte IL-12p70 induce actividad bactericida de macrófagos y las otras funciones anteriormente señaladas, y que además, junto con IL-12p80 también está involucrado en la iniciación de la respuesta inmune adaptativa (Khader, 2006). De la misma manera, las respuestas de memoria inmunológica así como su mantenimiento requieren a IL-12p70 y a IL-23 (Feng, 2006).

La IL-12 recombinante (IL-12p70) se ha utilizado con éxito en regímenes inmunoterapéuticos destinados a modular la respuesta Th1. La ruta de administración empleada ha sido principalmente intravenosa. Por ejemplo, en pacientes con defectos genéticos en la ruta de señalización de la IL-12 quienes desarrollan una susceptibilidad importante a la infección con micobacterias ambientales y al bacilo BCG (solo a unos pocos de éstos se les ha diagnosticado con tuberculosis *per se.*), el papel que desempeña la IL-12 en la resistencia al bacilo quedó demostrada cuando dichos pacientes fueron tratados con la citocina en combinación con terapia convencional (TC), mostrando una mejoría clínica importante (Holland, 2000). A sí mismo en humanos se ha usado con éxito para tratar la infección con cepas MDR (Greinert, 2000), observándose también mejoría clínica importante.

Por otro lado, en estudios en modelos animales, se ha probado que la administración temprana de la IL-12 a ratones Balb/c infectados con el bacilo de Mtb resultó en una

reducción significativa en la carga bacteriana, en las alteraciones histopatológicas y en un incremento de la supervivencia (Flynn, 1995). Por su parte, la neutralización de la IL-12 al inicio de la infección, dio como resultado incremento en la carga bacilar y redujo la integridad de los granulomas (Doherty, 1998; Cooper, 1997; Cooper, 2002). Además se ha observado que ratones IL-12p40<sup>-/-</sup> fueron altamente susceptibles a la infección tuberculosa, un defecto asociado con la reducción en la producción de IFN $\gamma$  por estos animales (Feng, 2005; Nolt, 2004). De manera interesante, recientemente se demostró que durante la TB crónica ratones IL-12p40<sup>-/-</sup> reconstituidos con IL-12 intravenosa tuvieron cargas bacilares menores y supervivencias mayores en comparación con los ratones control. Así mismo se observó protección a largo plazo a ratones RAG<sup>-/-</sup>, por transferencia adoptiva de células T CD4<sup>+</sup> aisladas de ratones tipo silvestre infectados (Feng, 2005).

Finalmente, en un estudio reciente se demostró que Mtb ha desarrollado mecanismos que bloquean la producción de IL-12 producida por los macrófagos, permitiendo que se establezca una infección crónica. En este estudio se reportó que mutantes del gen *mmaA4* de Mtb, el cual codifica para una metil transferasa que introduce oxígeno a los ácidos micólicos (modificaciones clave para la represión de la IL-12p40), le impide a la micobacteria bloquear la producción de IL-12 (Dao, 2008), lo que provocó atenuación de la virulencia de dichas mutantes.

En conjunto todos los trabajos mencionados subrayan la importancia de la IL-12 en la inmunidad contra el Mtb, por lo que protocolos que la involucren podrían contribuir al diseño de futuras vacunas e inmunoterapias para el tratamiento de esta importante enfermedad infecciosa.

### **3.- JUSTIFICACION Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

La razón principal por la que ha renacido el interés en el desarrollo de IT para la TB, es la emergencia de cepas resistentes a múltiples drogas (MDR) (CDC, 2000-2003) que no pueden ser tratadas con la quimioterapia convencional (TC) actualmente disponible. Por lo que se han desarrollado e introducido opciones terapéuticas nuevas y/o adicionales, como la IT, que han coadyuvado a su tratamiento. Es decir, si no es posible tratar la infección por cepas MDR con la TC, será necesario hacerlo modulando la respuesta inmune. A pesar de ser ésta una razón fundamental para el desarrollo de IT, existen otras razones importantes por las cuales es necesario desarrollarla.

La primera es que los actuales regímenes terapéuticos son muy prolongados (6 meses o más), ocasionado con ello baja adherencia de los pacientes al tratamiento. En este sentido podemos argumentar que si la IT puede modular el sistema inmune hacia una respuesta protectora óptima, puede ser posible también acortar el tratamiento con TC. La segunda razón es que los individuos con TB tratados y curados con TC pueden reinfectarse (Verver, 2005), por lo que la IT puede mejorar la eficacia protectora de la respuesta inmune que se ha producido una vez eliminada la infección, con dicho tratamiento. Otra razón es que al menos que las vacunas profilácticas actualmente disponibles, sean administradas al momento del nacimiento, estarán siendo aplicadas inevitablemente a individuos que ya hayan estado expuestos a Mtb o a micobacterias ambientales, o a ambas. Por lo que se ha sugerido que aún las nuevas vacunas profilácticas que se desarrollen, deberán tener algunas propiedades inmunoterapéuticas con el fin de que puedan modular y optimizar una probable respuesta cruzada preexistente a Mtb (Verver, 2005). Finalmente estudios en modelos animales sugieren que es posible hacer que el sistema inmune destruya a los organismos que persisten en los tejidos en forma de infección tuberculosa latente (Glatman-Freedman, 2006).

En los estudios descritos en el apartado anterior, se establece la importancia de la IL-12 exógena (IL-12e) en la inducción de respuesta Th1 protectora. Además, en dichos trabajos también se muestra que para el control del crecimiento de las micobacterias es conveniente su administración en intervalos (tres veces por semana). Sin embargo, estos trabajos no

establecen si la administración de la IL-12e, desde el inicio de la infección y de manera continua y a largo plazo, es requerida para sostener la producción de IFN $\gamma$  por la células Th1 (mantener la respuesta Th1) durante la fase temprana, y para el control de la infección avanzada una vez que la respuesta Th1 se ha iniciado y/o aún agotado, debido a la presencia de la respuesta Th2 (no protectora). Esto último es de gran interés en TB, ya que anteriormente, se había postulado que la acción de la IL-12e solo era importante para el inicio de la inmunidad antimicrobiana (Seder et al.; 1993 Scott, 2002). En reportes recientes se han demostrado un requerimiento mayor y quizá más prolongado de esta citocina en el mantenimiento de la respuesta Th1 efectora durante infecciones por parásitos (Park et al., 2000; Yap et al., 2000).

Es importante reiterar, que la piedra angular del tratamiento contra la TB continua siendo la TC con antitubercúlicos, y que como se señaló anteriormente, si son administrados de manera oportuna y adecuada los pacientes tiene grandes posibilidades de curarse. Sin embargo, la baja adherencia al tratamiento es un problema constante, lo cual genera recaídas y resistencia múltiple a los antibióticos (Verver, 2005). Es por ello necesario el desarrollo de opciones terapéuticas adicionales contra la TB (como la IT), que permitan regular la respuesta inmune a favor del huésped y con ello lograr un mejor control de la infección.

Otro aspecto fundamental en la TB, es la infección con bacterias resistentes a múltiples drogas (MDR). Este es un problema creciente y de gran importancia sanitaria y económica, pues el costo de los antibióticos de segunda línea es muy elevado y han surgido cepas que son también resistentes a estos (Matteelli, 2007); en estos casos el paciente está condenado a morir y se ha sugerido que la IT con citocinas como al IL-12 puede ser una alternativa viable.

La vía de administración de la IL-12 en los modelos murinos de infección ha sido principalmente intraperitoneal (Flynn, 1995; Cooper, 1997; Flynn, 2004; Feng, 2005), e intravenosa en humanos con TB refractaria al tratamiento con TC (Greinert, 2000). Sin embargo, se ha reportado que las citocinas administradas por vía oral son activas y ejercen sus efectos tanto de manera local como sistémica, en consecuencia, se ha sugerido su uso por esta vía, como ha sido reportado para los interferones (IFNs) de tipo 1 y la IL-6 (Cummins, 1988; Brod, 1994). Además la administración de citocinas por la vía oral ofrece

una alternativa excelente para facilitar su aplicación en el ámbito clínico y de uso común. Existen estrategias como los liposomas que han permitido la administración oral de citocinas, como ha sido reportado para la IL-12, la cual acoplada a liposomas y administrada por la ruta oral indujo una respuesta Th1 en ratones infectados con la toxina del cólera (Marinero, 1997).

Otra estrategia viable es el uso de plantas transgénicas que expresen a la IL-12, y que permitan y faciliten su administración oral, además de proporcionarle a la proteína una mayor protección y estabilidad. Es por ello que en los últimos años se ha establecido la producción en plantas transgénicas de una amplia variedad de proteínas de interés farmacéutico. Ellas ofrecen ventajas sobre otros sistemas de expresión, incluyendo su bajo costo, disponibilidad a gran escala, reducción de contaminación con patógenos humanos, entre otras. Dentro de las proteínas que se han producido se encuentran, anticuerpos, antígenos y biofarmacéuticos que retienen completamente su actividad (Gomez-Lim, 2007). Muchos de estos compuestos han sido expresados principalmente en plantas de tabaco, lo cual representa un obstáculo para su administración como extractos crudos a través de mucosas, debido a la presencia de alcaloides y otros compuestos tóxicos para los humanos. Por ello se ha pensado en el uso de plantas comestibles (jitomate, papa, plátano), que no presenten este problema. Hasta el momento hay tres proteínas que ya se encuentran en fase comercial ( $\beta$ -glucoronidasa, avidina y tripsina) pero hay varias más que pronto alcanzarán esta fase (Streatfield, 2006). La tecnología ha llegado a un punto en el que prácticamente cualquier proteína es susceptible de ser producida en plantas.

Es así, que debido a la naturaleza heterodimérica de la IL-12 (p35 y p40) y a la capacidad de los homodímeros de p40 para antagonizar sus efectos, hacen de importancia vital que esta citocina sea liberada en los sitios de acción como un heterodímero activo, es decir, asegurar que solo el heterodímero esté presente. Un método para lograrlo es expresar las dos subunidades como un solo polipéptido (Gutiérrez-Ortega, 2004; Gutiérrez-Ortega, 2006), esto es, la creación de una sola cadena polipeptídica por medio de la fusión de las dos cadenas de la IL-12, con un “linker”. Esto último ha permitido la síntesis y producción de la IL-12 activa. Con la construcción de la IL-12 murina de una sola cadena se ha realizado la transformación de un vegetal de amplio consumo en la población mexicana y disponible todo el año, el jitomate (*Lycopersicon esculentum*), con el fin de emplear el fruto

conteniendo la citocina directamente sin una purificación adicional para la administración oral de IL-12 a través de mucosas (Gutiérrez-Ortega, 2006).

Dada su importante participación dentro de la respuesta tipo Th1 así como dentro del balance entre las respuestas Th1 y Th2 , la administración oral de IL-12 murina de una sola cadena, expresada en el jitomate, desde el inicio de la infección tuberculosa y hasta dos meses post-infección, podrá proporcionarnos información sobre la importancia del mantenimiento de la producción de IFN $\gamma$  dependiente de IL-12 (respuesta Th1) sobre las alteraciones que se presentan durante el desarrollo de la tuberculosis pulmonar experimental, en sus fases temprana y avanzada. Es así como en este trabajo examinamos el uso de extractos crudos (en solución) del jitomate transgénico que expresa IL-12 murina, para evaluar su potencial como inductor de la respuesta inmune tipo Th1 y por ende su potencial terapéutico, en un modelo murino de tuberculosis pulmonar progresiva inducido con cepas drosensibles y drogorresistentes.

#### **4.- HIPÓTESIS**

**La administración oral de jitomate transgénico que expresa IL-12 (TT-IL12) ejerce un efecto terapéutico y un mejor control de la TB pulmonar experimental, promoviendo el incremento y prolongación de la respuesta inmune protectora Th1, paralelo al abatimiento de la respuesta Th2 no protectora.**

## 5.- OBJETIVO GENERAL

**Evaluar el efecto terapéutico de la administración oral del jitomate transgénico que expresa IL-12 (TTIL-12) sobre la respuesta inmuneTh1 protectora durante el desarrollo de la TB pulmonar progresiva.**

### 5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

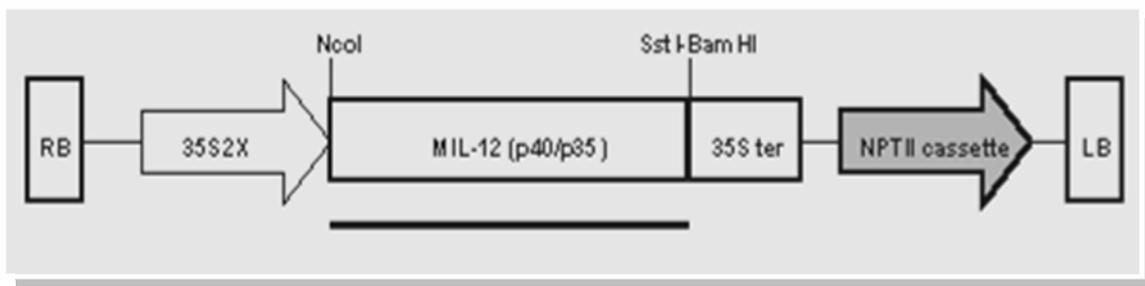
- 5.1.1 Evaluar el efecto de la administración oral de TTIL-12 sobre la carga bacteriana (unidades formadoras de colonias, UFC) en homogenizados de pulmones de ratones Balb/c infectados con *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (fases temprana y avanzada) y con un aislado clínico resistente a múltiples drogas (MDR) (fase avanzada).
- 5.1.2 Evaluar el efecto de la administración oral de TTIL-12 sobre las alteraciones histopatológicas (formación de granulomas y neumonías) que se presentan en el tejido pulmonar de ratones Balb/c infectados con *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (fases temprana y avanzada) y con un aislado clínico MDR (fase avanzada).
- 5.1.3 Evaluar el efecto de la administración oral de TTIL-12 sobre la expresión de los genes de citocinas y proteínas de la respuesta Th1 (IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ , e iNOS) y Th2 (IL-4) en homogenizados de pulmones de ratones Balb/c infectados con *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (fases temprana y avanzada) y con un aislado clínico MDR (fase avanzada).

## 6.- METODOLOGÍA

### 6.1 Construcción del vector IL-12 y transformación del jitomate (*Lycopersicon esculentum*)

Un fragmento NcoI/BglIII que corresponde a los genes de las dos cadenas de la IL-12 murina (IL-12m), unidas por un "linker", se clonó en el plásmido pMECA. De ahí se aisló como fragmento *KpnI/XbaI* y se insertó entre el promotor y la región 3' no traducida (3'UTR) del virus del mosaico de la coliflor (CaMV 35S), dando por resultado el plásmido p35SMIL12. El cassette de expresión fue cortado con la enzima *HindIII* y se insertó al plásmido Ti binario pCAMBIA 2300 para obtener el plásmido p35SMIL12-2300 (**Esquema 1**). Como marcador de selección se empleó al gen neomicina fosfotransferasa (NPTII). La construcción p35SMIL12-2300 se transfirió por electroporación a la cepa LBA4404 de *Agrobacterium tumefaciens*, la cual fue usada para la transformación del vegetal. Los transformantes que se seleccionaron por resistencia a kanamicina, se transfirieron a tierra y crecieron en invernadero. Posteriormente, estas plantas se seleccionaron por la presencia de NPTII con un kit de ELISA (Agdia), se colectaron las semillas y se esterilizó su superficie con esterilizante comercial al 20% y Tween-20 al 0.1%. Las semillas se germinaron en el medio MS suplementado con 100 mg l<sup>-1</sup> de kanamicina. Las plántulas transformadas (T1, 2, 3) se crecieron en invernadero y se utilizaron para realizar los experimentos. Se confirmó la integración del gen IL-12m en las tres líneas transformadas por Southern blot. Por Western blot se detectó la presencia de la proteína en los extractos crudos del fruto. La actividad biológica de la IL-12 expresada en el jitomate se evaluó detectando la producción de IFN $\gamma$  por los linfocitos T de bazo de ratones BALB/c (Gutiérrez-Ortega, 2006).

Se seleccionaron las líneas de jitomate que contenían los mayores niveles de IL-12, colectándose los frutos. Se hizo un extracto crudo moliendo a los frutos con PBS en proporción 2:1 y el extracto se centrifugó a 10,000 x g. Se conservó el sobrenadante y se liofilizó, conservándolo posteriormente a 4°C hasta su uso.



**Esquema 1. Mapa que muestra la región Ti del plásmido p35SMIL12-2300, empleado para transformar el vegetal** . La expresión de la IL-12 murina fue dirigida por el promotor doble CaMV 35S. La línea negra representa el fragmento empleado como sonda para análisis de Southern y western blot (*Gutiérrez-Ortega, 2005*).

## 6.2 Selección de la dosis apropiada y determinación de la actividad biológica del TT-IL12 in vivo después de su absorción.

### *6.2.1 Preparación del TT-IL12 y del nonTT para su administración oral.*

Se pesó 1 gr. de los liofilizados de ambos extractos, TT-IL12 y nonTT, y se diluyeron en 10 ml de PBS. La expresión de IL12 se determinó por western blot. Brevemente, se re-suspendieron 40µg de proteína soluble en un buffer a base de Tris 0.1M pH 8.0%, SDS al 2% y β-mercaptoetanol 0.75M, se llevó a ebullición por 5 min, se analizó en SDS-PAGE al 7.5% y se electrotransfirió a una membrana de polyvinylidene difloride, la cual se bloqueó con leche baja en grasa al 8%, Tween-20 0.1% en TBS. Se diluyó el anticuerpo monoclonal biotilado anti-IL-12 de ratón C17.8 (BD Pharmingen) 1:2500 para la detección de la IL-12, el cual se detectó por quimioluminiscencia (ECL Reagent, Amersham Pharmacia Biotech). La concentración de la citocina se determinó por ELISA. (BD OptEIA™ set for mouse interleukin-12p70, NJ, USA).

Brevemente, placas de 96 pozos se bloquearon con 0.5 µg/ml de anticuerpo monoclonal anti-IL12p70 de ratón disuelto en 100 µl de buffer de fosfatos 0.2M pH 6.5. Se incubó toda la noche a 4° C. Después de lavar la placa con PBS-Tween 20 al 0.05%, los pozos se bloquearon con albúmina bovina al 3% (Sigma, St. Louis, MO, USA) en PBS por 2 hr a 37° C. Los extractos de TT-IL12 diluidos y la curva standard de la IL-12p70 recombinante se incubaron por duplicado por 2 hr a 37° C. Después de lavar, el anticuerpo policlonal biotilado anti-IL12p70 se diluyó 1/250 en PBS 3% BSA y se incubó con streptavidina-peroxidasa diluida 1/250 en PBS 3% BSA por 1 hr a temperatura ambiente. Para revelar, se usó tetramethylbenzidine y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Pharmigen, San Diego, CA, USA). La densidad óptica se determinó a 450 nm.

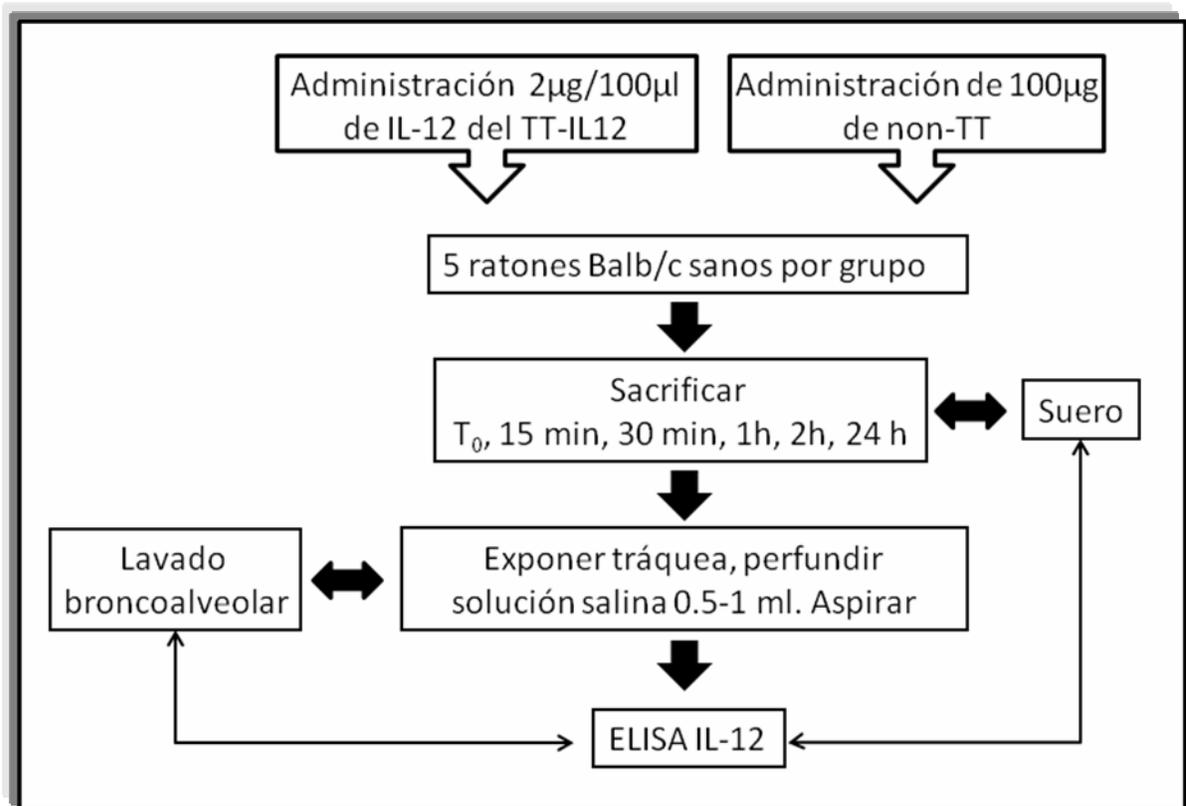
Se realizaron diluciones para obtener 1, 2 y 5 µg/100 µl de IL-12, así como también se les determinó el contenido de proteínas totales por el método de Bradford (Bio-Rad Protein assay kit CA, USA). Posteriormente, preparamos las soluciones con el nonTT, las cuales contenían la misma concentración de proteínas totales que las preparadas con el TT-IL12. Debido a que los extractos liofilizados del nonTT no expresan a la IL-12, utilizamos

el contenido en proteínas como referencia para obtener soluciones con concentraciones equivalentes, y así descartar por lo tanto que los efectos del TT-IL12 observados en los animales de experimentación, fueran debidos a otros componentes del vegetal.

### *6.2.2 Absorción del TT-IL12 por la vía oral.*

Se formaron dos grupos de ratones Balb/c sanos (3 por cada tiempo) y se les administró por vía oral (con la ayuda de una cánula rígida) 2 µg/100 µl de TT-IL12 o la dilución correspondiente basada en el contenido de proteína totales del nonTT. Los ratones fueron sacrificados (ver más adelante) a los 15', 30', 1h, 2 h y 24 h después de la administración de los tratamientos (**Esquema 2**). Se colectó la sangre en tubos eppendorf de 1.5 ml, y se obtuvo el suero el cual se conservó a 4<sup>0</sup> C hasta su uso. Se realizaron lavados broncoalveolares, administrando 0.5 ml de solución salina fisiológica, con la ayuda de una jeringa de 5 ml y aguja sujeta con hilo a la tráquea de cada uno de los ratones tratados en los diferentes tiempos mencionados. Se aspiró el líquido broncoalveolar (BAL) y se colectó en tubos eppendorf de 1.5 ml. Se conservaron a 4<sup>0</sup> C hasta su uso.

Se determinó el nivel de IL-12 en el suero como el BAL por ELISA por duplicado (BD OptEIA™ set for mouse interleukin-12p70, NJ, USA) en cada uno de los tiempos analizados.



**Esquema 2. Detección *in vivo* de la IL-12 presente en los extractos del TT-IL12.** Determinación de la concentración de la IL-12 expresada en los extractos del TT-IL12, después de su administración oral a ratones Balb/c sanos. La concentración de la IL-12 fué determinada por ELISA en suero y BAL.

### 6.2.3 Determinación de la dosis terapéutica de IL-12 expresada en el TT-IL12.

Para determinar la seguridad y la dosis más efectiva de la IL-12 expresada en el jitomate transgénico, se infectaron 5 ratones con la cepa de Mtb H37Rv (ver más adelante), y se les administró TT-IL12 por la vía oral con la ayuda de una cánula rígida. Los animales fueron tratados con 1, 2 y 5  $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$  de IL-12 del TT-IL12 durante un mes. Se incluyó el grupo control tratado con el nonTT con una concentración basada en el mismo contenido de proteínas totales que las soluciones preparadas a partir del TT-IL12. Durante este tiempo los ratones fueron monitoreados por medio de su índice de sobrevida y status bacteriológico por la determinación de las unidades formadoras de colonias (UFC) presentes en los homogenizados de los pulmones (ver más adelante).

## 6.3 Modelo murino de tuberculosis pulmonar progresiva

### 6.3.1 Descripción del Modelo

Nuestro modelo de tuberculosis pulmonar progresiva fue desarrollado por nuestro grupo de investigación y ha sido descrito en detalle previamente (Hernández-Pando, 1996). Brevemente, este modelo se caracteriza por el establecimiento de dos fases durante el desarrollo de la enfermedad. La primera, es la *fase temprana (primer mes de infección)*, la cual se caracteriza histológicamente por la presencia de infiltrado inflamatorio constituido por linfocitos y macrófagos en el intersticio alveolo-capilar, alrededor de vénulas y bronquios. Durante la segunda semana postinfección (p.i.) se forman los granulomas de fase temprana los cuales maduran completamente durante la tercera semana p.i. Estos granulomas están constituidos por la acumulación de linfocitos y macrófagos, organizados en estructuras redondas u ovoides de límites precisos, y se les considera fundamentales para contener a las bacterias.

Los granulomas de fase temprana y el infiltrado inflamatorio coexistente están constituidos principalmente por linfocitos T CD4<sup>+</sup> de tipo 1 (Th1) productores de las citocinas interferón gama (IFN $\gamma$ ) e interleucina 2 (IL-2) y macrófagos activados

productores de factor de necrosis tumoral (TNF $\alpha$ ) e interleucina 1 (IL-1). Es por medio de este tipo de respuesta, linfocitos Th1 y macrófagos activados, que puede controlarse al bacilo tuberculoso. La predominancia de células Th1 y la elevada producción de IFN $\gamma$  que activa a los macrófagos para producir niveles elevados de la enzima oxido nítrico sintetasa inducible (iNOS). Esta enzima, induce la producción de oxido nítrico (ON) el cual reacciona con radicales libres de oxígeno, que también son producidos en gran cantidad y al mismo tiempo generando así la producción de peroxinitrilos. Los peroxinitrilos son compuestos muy inestables que se asocian rápidamente a diferentes constituyentes bioquímicos celulares, uno de sus blancos principales son las proteínas (en particular el aminoácido tirosina). Las proteínas nitrosiladas experimentan cambios conformacionales con pérdida irreversible de sus funciones lo que contribuyen a la muerte celular.

Por otro lado, los macrófagos activados en estos granulomas también secretan gran cantidad de IL-1, citocina que al igual que el TNF $\alpha$  contribuye a activarlos y además estimula la producción de IL-2 y su receptor. La IL-2, que al igual que el IFN $\gamma$  es producida por linfocitos Th-1, induce la proliferación celular linfocitaria incrementando así el número de células inmunocompetentes que contribuyen a mantener bajo control a las micobacterias.

En nuestro modelo experimental el acmé de la respuesta protectora es en el día 21, cuando los granulomas alcanzan su plena maduración, lo cual se corrobora porque coexiste con la máxima respuesta de hipersensibilidad tardía cutánea (DTH) en contra de antígenos micobacterianos. De esta manera se concluye que durante la fase temprana de la infección existe predominio de la actividad de linfocitos Th-1 y macrófagos activados lo cual permite el control temporal de la infección (Hernández-Pando, 1996).

La *segunda etapa* o *fase avanzada* de la enfermedad en este modelo experimental se caracteriza por gran incremento en el número de bacterias vivas en los pulmones, así como áreas progresivas de consolidación neumónica con focos de necrosis y extensa fibrosis intersticial, que en conjunto conduce a la muerte. Desde el punto de vista inmunológico, durante esta fase se incrementa significativamente la presencia y actividad de los linfocitos T cooperadores de tipo 2 (Th-2), los cuales se caracterizan por producir las citocinas IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13. En particular, la IL-4 es una citocina fundamental en la inducción de la diferenciación de los linfocitos B productores de anticuerpos, que se consideran como no protectores en la tuberculosis. Además la IL-4 al igual que la IL-10 y la IL-13 son

eficientes antagonistas de las células Th-1. En consecuencia, consideramos que la emergencia de los linfocitos Th-2 durante la fase progresiva de la enfermedad puede contrarrestar la actividad protectora de las células Th-1 y desviar la inmunidad celular hacia la inmunidad humoral, contribuyendo así a favorecer la progresión de la enfermedad. De manera interesante, también los macrófagos experimentan modificaciones morfo-funcionales muy importantes, pues el citoplasma de estas células se llena de bacterias y de numerosas vacuolas que contienen lípidos bacterianos, en particular lipoarabinomano, un lípido de la pared bacteriana que es muy eficiente para desactivar a los macrófagos. Además, estos macrófagos vacuolados disminuyen significativamente su producción de TNF $\alpha$ , IL-1 e iNOS, e incrementan notablemente su capacidad productora de potentes citocinas anti-inflamatorias y supresoras de la inmunidad celular, como el factor de transformación tumoral (TGF $\beta$ ) y la IL-10. El TGF $\beta$  es también una eficiente citocina inductora de la proliferación fibroblástica y de la síntesis de colágena, contribuyendo así a generar fibrosis. En conclusión, nuestro modelo (Hernández-Pando, 1996) muestra que en la fase progresiva de la enfermedad existen importantes anormalidades inmunológicas que permiten la sobrevida y proliferación bacteriana, tales como mayor actividad de los linfocitos Th-2 (con menos actividad de los Th-1) y macrófagos desactivados que secretan citocinas supresoras de la inmunidad celular como el TGF $\beta$ ; estas alteraciones inmunológicas permiten que la enfermedad progrese generando extensa consolidación neumónica y muerte por insuficiencia respiratoria.

### *6.3.2 Infección de los ratones Balb/c con las cepas de M. tuberculosis H37Rv y un aislado clínico MDR*

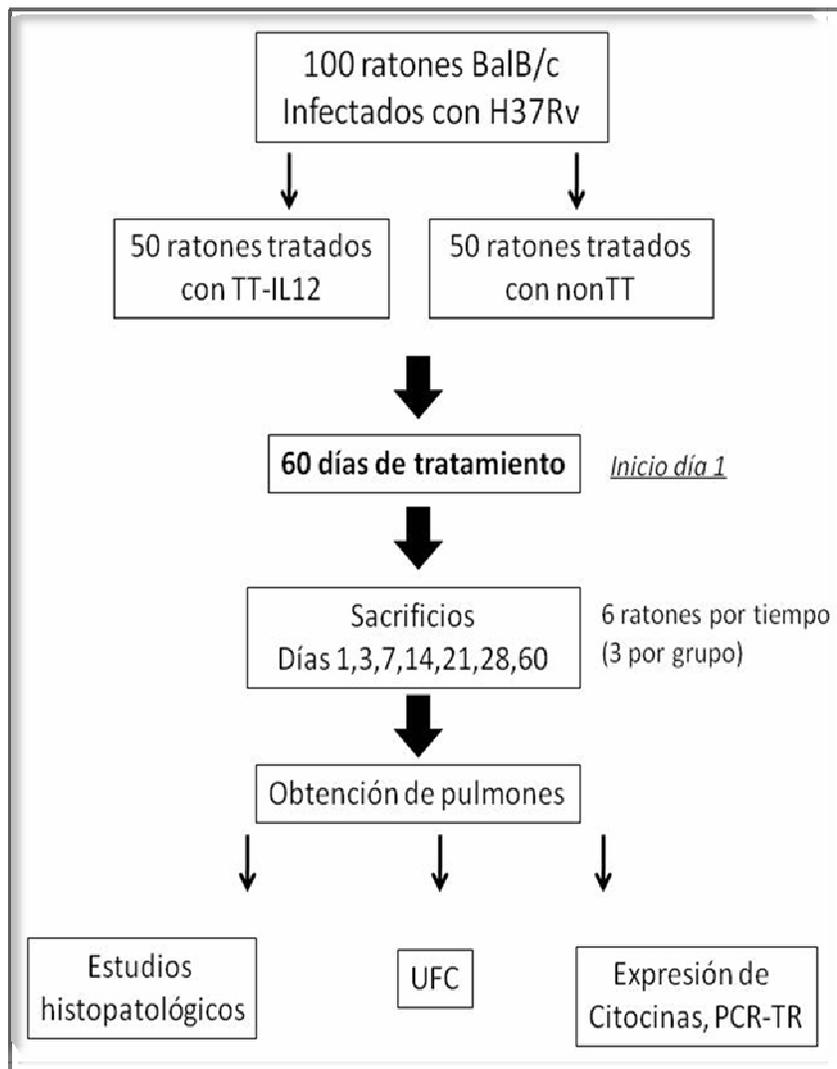
La cepa virulenta de Mtb H37Rv y el aislado clínico MDR (resistente a todos los antibióticos de primera línea) fueron cultivados en el medio Proskauer y Beck. Después de 1 mes de cultivo las micobacterias fueron cosechadas y ajustadas a  $2.5 \times 10^5$  células en 100  $\mu$ l de PBS, alicuotadas y mantenidas a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. Antes de la infección, se volvieron a contar las micobacterias y se determinó nuevamente su viabilidad como se ha descrito previamente (Hernández-Pando, 1996). Ratones Balb/c machos libres de patógenos y de 6-8 semanas de edad fueron anestesiados (sevofluorane, Abbott,

Laboratories, Illinois, USA) Por medio de una incisión en el cuello; la tráquea fue expuesta. y los animales fueron infectados con  $2.5 \times 10^5$  micobacterias viables resuspendidas en 100µl de PBS, utilizando una cánula rígida. Después de suturar la incisión los ratones se mantuvieron en posición vertical hasta que el efecto de la anestesia terminó. Se formaron grupos de 5 ratones y se les colocó en cajas cubiertas con microaisladores y conectadas a presión negativa. Todos los procedimientos fueron realizados en una campana de bioseguridad nivel III.

## 6.4. Diseño experimental

### 6.4.1 *Tratamientos*

Para evaluar el efecto del TT-IL12 sobre la *fase temprana de la infección* con la cepa H37Rv, los tratamientos se iniciaron un día antes de la infección y se continuaron durante 60 días (**Esquema 3**). Para evaluar el efecto del TT-IL12 sobre la *fase avanzada de la infección* con la cepa H37Rv (**Esquema 4**) y con el aislado clínico MDR (**Esquema 5**), los tratamientos se iniciaron hasta el día 60 postinfección (p.i.) y se continuaron por 2 meses. El TT-IL12 y el nonTT fueron administrados por la vía oral de la siguiente manera: Se tomó ratón por ratón sosteniendo la cabeza por la parte de atrás e inclinándola un poco hacia atrás con la ayuda de los dedos; se introdujo por la boca una cánula rígida acoplada a una jeringa de insulina. Se administraron 100 µl de solución TT-IL12 (2µg IL-12) y de nonTT. Cada uno de los experimentos descritos se realizaron por duplicado.



**Esquema 3. Diagrama de bloques que muestra el diseño experimental de la fase temprana.** En esta fase los ratones se infectaron con la cepa H37Rv de *M. tuberculosis*, y el inicio del tratamiento con el TT-IL12 fue realizado el día 1 antes de la infección, continuándose hasta el día 60 post-infección.

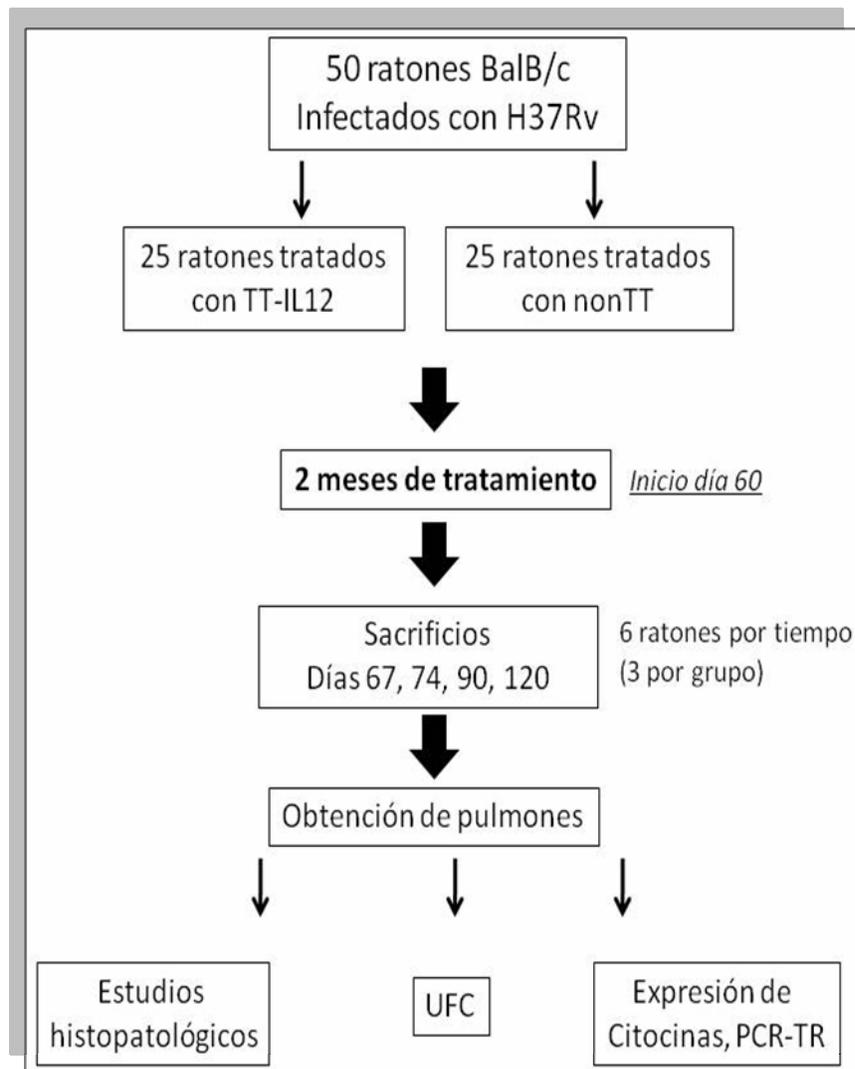
El efecto del tratamiento fue evaluado por medio de la cuantificación de UFC en homogenizados de pulmón. También se evaluó la extensión del daño al tejido pulmonar (análisis morfométrico de granulomas y áreas neumónicas), en preparaciones histológicas teñidas con eosina y hematoxilina.

Finalmente se analizó la expresión del RNAm de los genes de citocinas Th1 (IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ ) y de la enzima iNOS, así como de los genes de citocina Th2 (IL-4) en homogenizados de pulmón, por PCR en tiempo real. El protocolo fue aprobado por el Comité de Ética para la experimentación en animales del Instituto Nacional de Ciencias Médica y Nutrición “Salvador Zubirán”.

#### 6.4.2 *Sacrificios*

Grupos de tres o cuatro animales por grupo (experimental y control) se sacrificaron los días 1, 3, 7, 14, 21, 28 y 60 (fase temprana, H37Rv); y los días 67, 74, 90 y 120 (fase avanzada, H37Rv y aislado clínico MDR) después de la infección. Los animales fueron sacrificados de la siguiente manera: primero fueron anestesiados colocándolos en una cámara que contenía una gasa humedecida con éter. Una vez anestesiados se colocó el ratón en una cama de unicel y se le sujetó con agujas por las cuatro extremidades. Con ayuda de tijeras quirúrgicas se cortó la vena localizada en parte interna de la extremidad anterior. Se colectó la sangre en un tubo eppendorf de 1.5 ml. Posteriormente se limpió el área abdominal con alcohol al 70% y se procedió a abrirlo con la ayuda de equipo quirúrgico.

Se expuso la tráquea y se perfundió uno de los pulmones (izquierdo o derecho) con formaldehído al 10%. Cada uno de los pulmones perfundidos se colocaron en tubos falcon de 50 ml que contenía 5 ml de etanol absoluto, hasta su procesamiento. Los pulmones perfundidos se utilizaron para las preparaciones histológicas. Los pulmones restantes colocaron en viales de 2 ml y se preservaron en nitrógeno líquido. Se congelaron a -70 C hasta su procesamiento. Estos últimos sirvieron para la determinación de UFC y para PCR en tiempo real.



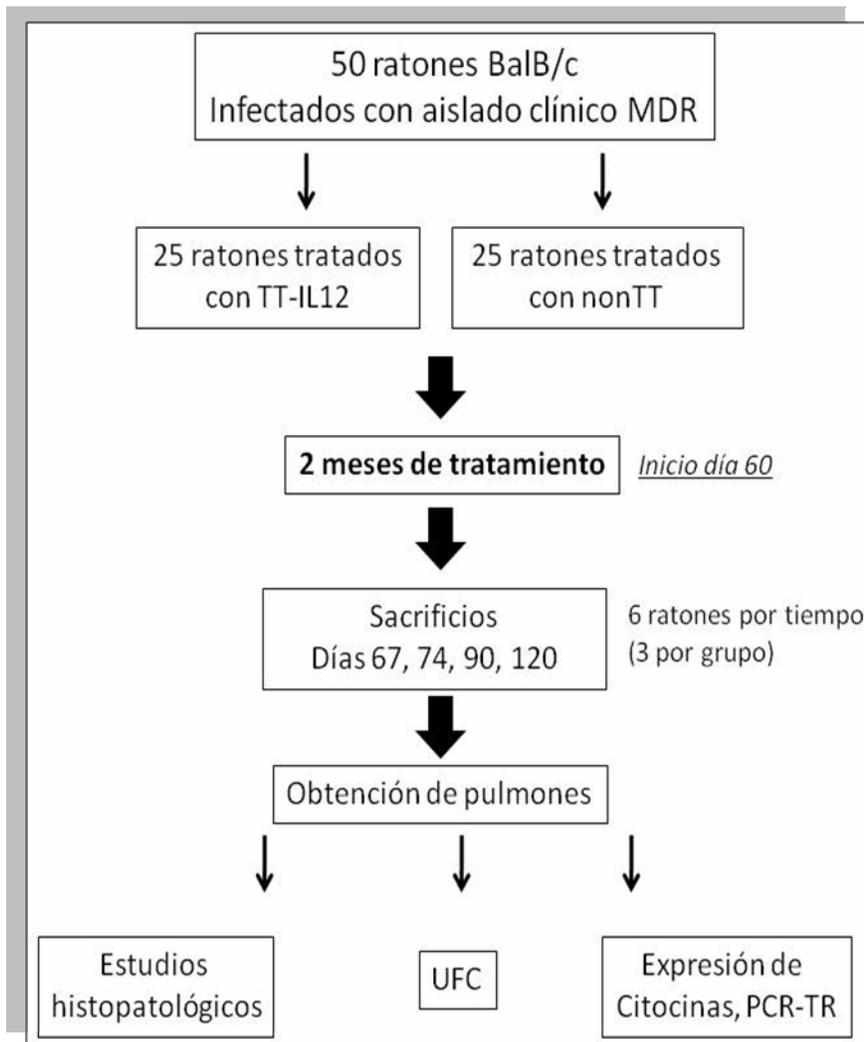
**Esquema 4. Diagrama de bloques que muestra el diseño experimental de la fase avanzada.** En esta fase los ratones se infectaron con la cepa H37Rv de *M. tuberculosis*, y el inicio del tratamiento con el TT-IL12 fue realizado el día 60 post-infección, continuándose por 60 días (día 120).

## 6.5 Evaluación del número de unidades formadoras de colonias en los pulmones infectados.

Se tomaron los pulmones (izquierdo o derecho) de tres o cuatro ratones de cada grupo y de cada tiempo de sacrificio. Se colocaron en tubos estériles que contenían 2 ml de PBS-Tween 80 al 0.05% y se homogenizaron con un politrón (Kinematica, Luzern, Switzerland). Cuatro o cinco diluciones de cada homogenado fueron sembrados por duplicado en agar Bacto Middlebrook 7H10 (Difco laboratories, Detroit, USA) enriquecido con medio ácido oléico, albúmina, catalasa y dextrosa (OADC). El número de colonias se contó a los 21 días.

## 6.6 Preparación del tejido pulmonar para estudios histológicos y morfométricos

Los pulmones (izquierdo o derecho) de tres ratones (de cada grupo) por cada tiempo de sacrificio fueron intratraquealmente perfundidos con formaldehído al 10% en PBS. Secciones parasagitales del tejido se deshidrataron y fijaron en parafina; se cortaron y se tiñeron con hematoxilina y eosina. El área de los granulomas se determinaron en micras cuadradas ( $\mu^2$ ), y el porcentaje de área pulmonar afectada por neumonía se determinó utilizando un analizador de imágenes automatizado (Q Win Leica, Milton Keynes, Cambridge, UK). Las mediciones fueron realizadas en estudio ciego y los datos reportados como la media de la  $\pm$ SD .



**Esquema 5. Diagrama de bloques que muestra el diseño experimental de la fase avanzada.** En esta fase los ratones se infectaron con la cepa MDR de *M. tuberculosis*, y el inicio del tratamiento con el TT-IL12 fue realizado el día 60 post-infección, continuándose por 60 días (día 120).

## 6.7 Análisis de la expresión de citocinas Th1, Th2 e iNOS por PCR en tiempo real (RT-PCR).

### 6.7.1 Aislamiento del RNAm

Por medio del kit RNeasy minikit (QIAGEN, CA, USA) se aisló el RNAm de los pulmones (izquierdo o derecho) de tres ratones sacrificados (por grupo) en cada uno de los tiempos mencionados (y de cada uno de los experimentos hechos por duplicado). Cada pulmón se colocó en 2 ml de medio RPMI que contenía 0.5 mg/ml de colagenasa tipo 2 (Worthington, NJ., USA), y fueron incubados por 1 hora a 37°C. Posteriormente se pasaron a través de un filtro de 70- $\mu$ m, para disgregar las células mediante pases en una jeringa y enjuagadas con el medio de cultivo. Las células fueron centrifugadas, se eliminó el sobrenadante y los eritrocitos fueron removidos con el buffer de lisis (RLT). Se contaron  $5 \times 10^6$  células y se les adicionó 350  $\mu$ l de buffer RLT (Qiagen, CA, USA). A partir de estas células se extrajo el RNA con ayuda del kit mini RNeasy (Qiagen, CA, USA). La calidad y la cantidad del RNA se evaluó con el espectrofotómetro (260/280 nm) y en geles de agarosa.

### 6.7.2 Obtención del cDNA y diseño de primers

La transcripción reversa del RNAm se hizo utilizando 5  $\mu$ g de RNA, oligo-dT, y el kit Omniscript (Qiagen, CA, USA). El PCR en tiempo real se hizo en un termociclador 7500 real time PCR system (Applied Biosystems, USA) y con el kit de detección Quantitect SYBR Green Master-mix (Qiagen, CA, USA). Las curvas estándar del producto de PCR cuantificado y diluido, así como los controles negativos, se incluyeron en cada corrida de PCR. Se diseñaron primers específicos con el programa Primer Express (Applied Biosystems, CA, USA) para los siguientes genes: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (G3PDH): 5'-CATTGTGGAAGGGCTCATGA-3', 5'-GGAAGGCCATGCCAGTGAGC-3', sintetasa de óxido nítrico, iNOS: 5'-AGCGAGGAGCAGGTGGAAG-3', 5'-CATTTGCTGTCTCCCAA-3', factor de necrosis tumoral, TNF $\alpha$ : 5'-TGTGGCTTCGACCTCTACCTC-3', 5'-GCCGAGAAAGGCTGCTTG-3', interleucina 4, IL-4: 5'-

CAGGAGAAGGGAACACCAC,-3' CGTGTTTAGGCTTCCAGGAAG, e interferón  $\gamma$  , IFN $\gamma$ :5'-GGTGACATGAAAATCCTGCAG3',5'CCTCAAACCTGGCAATACTCATGA-3'. Las condiciones para el termociclador fueron: Desnaturalización inicial a 95°C 15 min, seguida de 40 ciclos a 95°C 20 seg, 60°C 20 seg, 72°C 34 seg. Las concentraciones específicas del RNAm en cada muestra se determinaron de acuerdo al correspondiente gen estándar. El número de copias del RNAm de cada citocina (y de la enzima iNOS) fueron realcionadas a un millón de copias del RNAm del gen G3PDH.

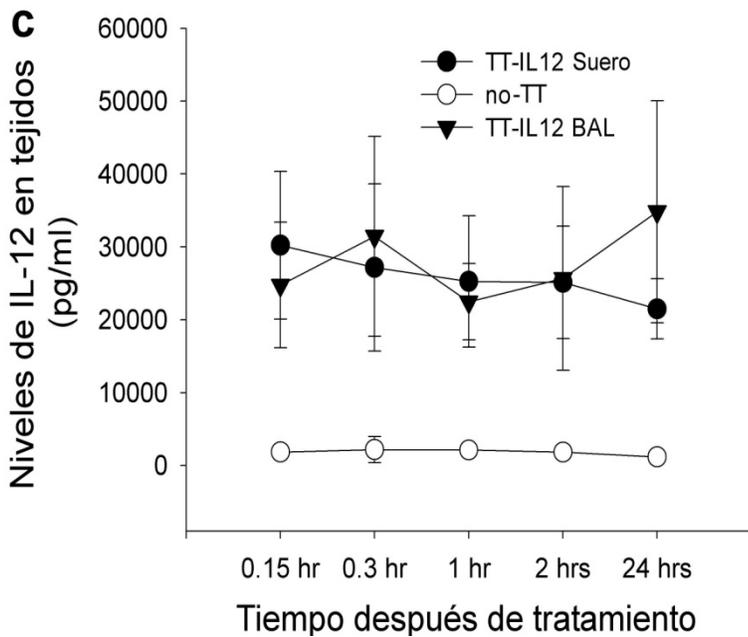
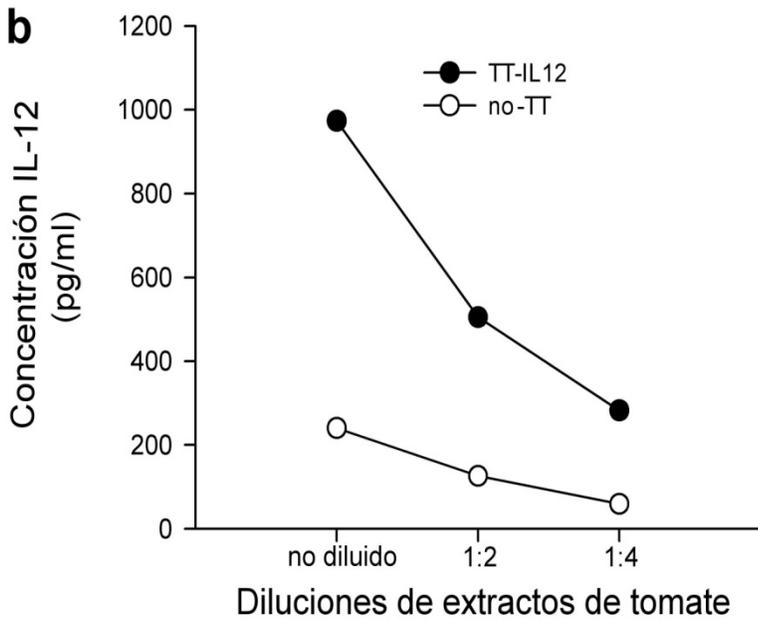
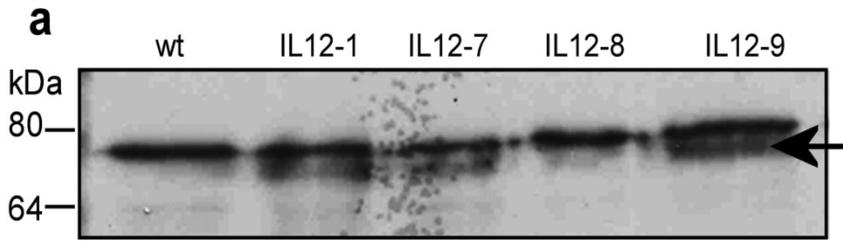
## 6.8 Estadística

Los resultados son reportados como las desviaciones estandar ( $\pm$ SD) de las medias. La significancia estadística entre los grupos tratados con el TT-IL12 y los controles fue calculada utilizando la prueba *t* de student en todos los experimentos. La significancia estadística se aceptó como  $p \leq 0.05$  o  $0.01$ , como se indica.

## 7.- RESULTADOS

### 7.1 Selección de la dosis apropiada, y análisis de la actividad biológica in vivo del TT-IL12 después de su absorción.

La expresión de la IL-12 en los extractos del TT-IL-12 la confirmamos por western blot (**Figura 9a**). Detectamos niveles significativos de IL-12 en los extractos del TT-IL12 analizados por ELISA (**Figura 9b**). Posteriormente, determinamos la absorción y la distribución sistémica de IL-12 en los ratones sanos tratados con TT-IL12, para lo cual detectamos por ELISA la presencia de la IL-12, en suero y lavados broncolaveolares (BAL) después de la administración oral de los extractos TT-IL12 y nonTT (cinco ratones por grupo). La detección la realizamos a diferentes tiempos después de la administración oral (2µg IL12/100µl PBS). No detectamos niveles de IL-12 en el suero y BAL de los ratones antes de la administración de los extractos. En contraste, en los ratones que recibieron TT-IL12 por la ruta oral encontramos aproximadamente 30 ng/ml de IL-12 en suero como en BAL a los 15 y 30 min, respectivamente (**Figura 9c**). Las concentraciones se mantuvieron por un intervalo de 2 hrs., después se redujeron gradualmente durante las siguientes 24 hrs. Realizamos entonces un experimento dosis /respuesta preliminar en el cual se tratamos a los animales un día antes de la infección con la cepa virulenta H37Rv. Grupos de 5 ratones infectados, recibieron diariamente, con ayuda de una cánula intragástrica 1, 2 ó 5 µg de IL-12 del extracto TT-IL12. El grupo control recibió la misma cantidad de nonTT a través de la misma ruta durante un mes. Encontramos que la dosis intermedia (2µg) fue la más eficiente para reducir significativamente la carga bacilar (datos no mostrados). En contraste, el grupo tratado con el nonTT mostró un incremento en el número de UFC, comparado con todas la dosis del TT-IL12 empleadas. Estos resultados indican que la IL-12 expresada en el jitomate transgénico puede ser absorbida desde la mucosa intestinal y puede ser distribuida sistémicamente manteniendo su actividad biológica. En consecuencia, utilizamos esta dosis (2µg/100µl) en todos los experimentos.



**Figura 9. Niveles de IL-12 en los extractos del TT-IL12 y nonTT y cinética de la concentración de la IL-12 en suero y BAL después de la administración oral de cada uno de los extractos.**

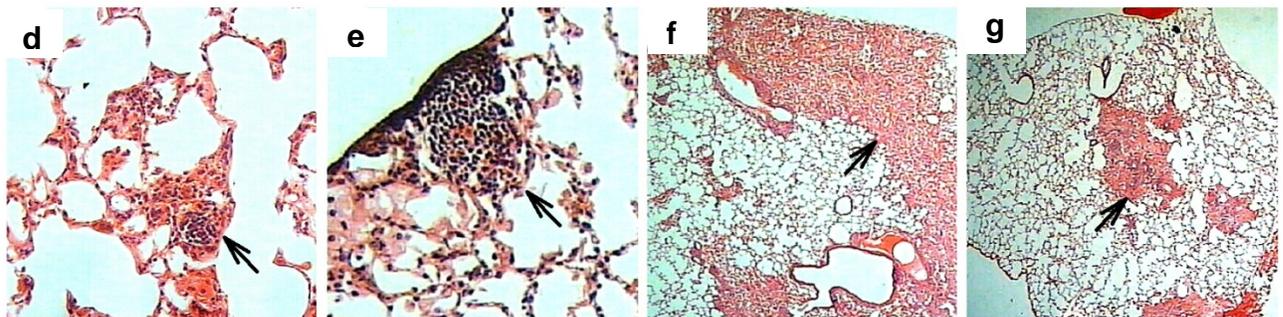
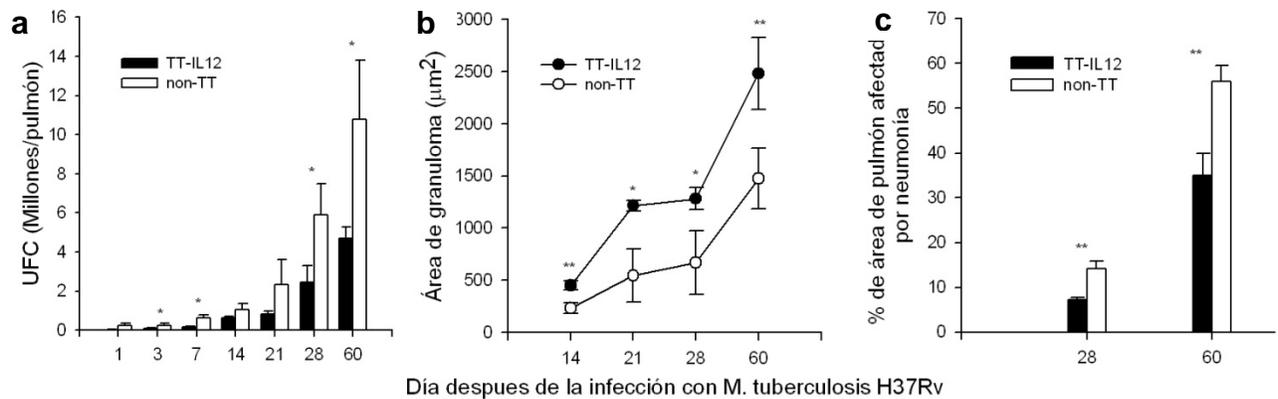
**a)** Expresión de la IL-12 en diferentes líneas de los extractos del TT-IL12, demostrado por western blot. **(b)** Concentración de IL-12 en los extractos TT-IL12 (símbolos negros) y nonTT (símbolos vacíos) determinada por ELISA. **(c)** Concentración de IL-12 en suero (círculos negros) y BAL (triángulos negros) cuantificada por ELISA después de la administración de los extractos TT-IL12 y nonTT (símbolos vacíos), a ratones BALB/c sanos en diferentes tiempos. Círculos y triángulos negros, concentración de IL-12 en suero y lavados brocoalveolares (BAL) con el TT-IL12; círculos blancos, concentración de IL-12 en suero con el nonTT. Los datos son la media de la  $\pm$  SD de dos experimentos diferentes. Cada punto representa tres o cuatro ratones y las barras representan la SD. Los asteriscos representan la significancia estadística con respecto al grupo control (\* $p \leq 0.05$ , \*\* $0.01$ ).

## 7.2 La administración temprana y continua del TT-IL12 controla eficazmente la infección micobacteriana.

### 7.2.1 Cepas H37Rv de *M. tuberculosis*. Fase Temprana de la infección

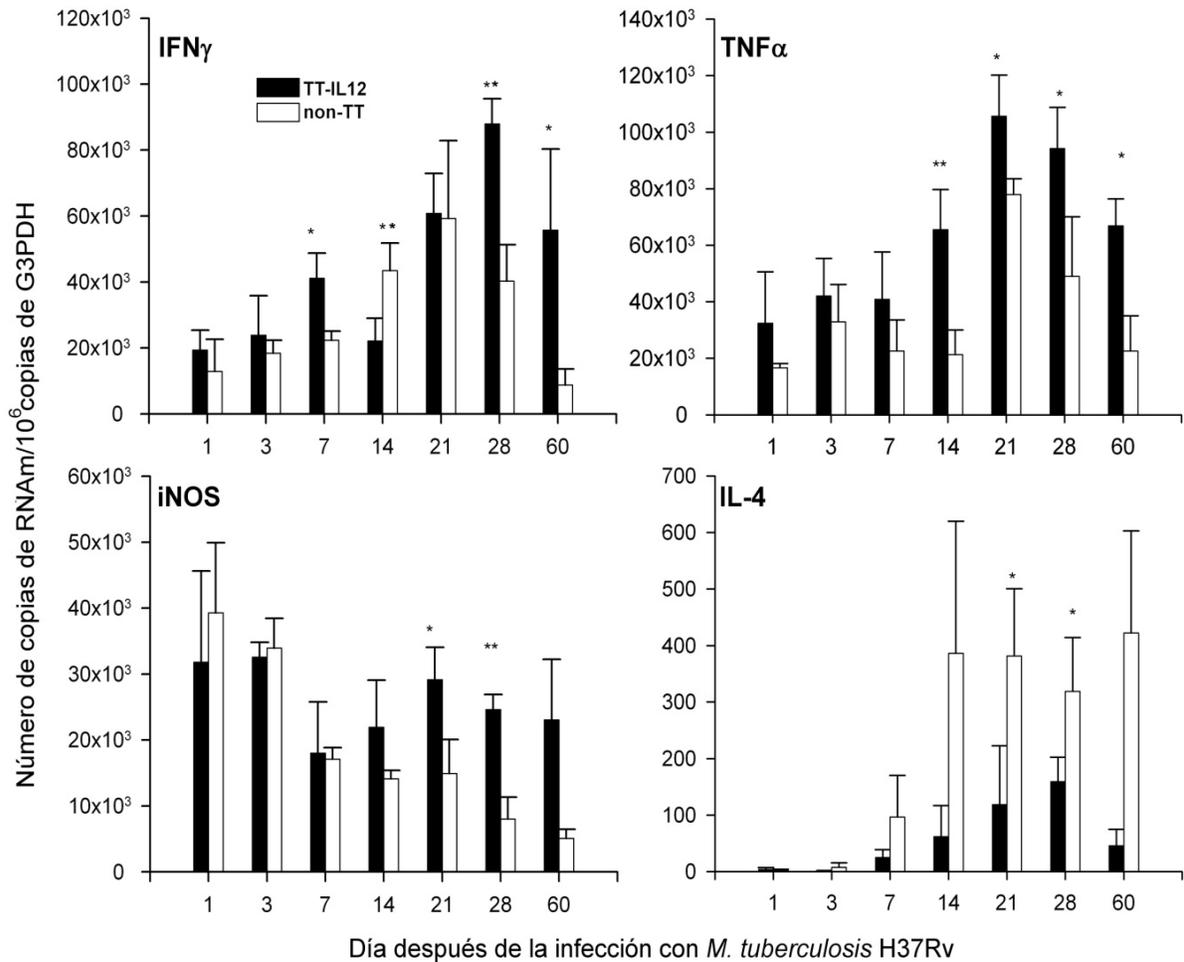
Nuestro modelo murino de tuberculosis está basado en la infección intratraqueal con *M. tuberculosis* H37Rv en una dosis alta. En este modelo (Hernández-Pando, 1996), una respuesta inmune inicial dominada por la alta producción de citocinas Th1, junto con altos niveles de TNF $\alpha$  y la isoforma inducible de iNOS, permiten el control temporal de la infección. Los granulomas se desarrollan en esta fase. Cuatro semanas después de la infección se presenta un decline en la expresión de IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  e iNOS paralelo a una elevada expresión de citocinas Th2. Gradualmente, las áreas neumónicas prevalecen sobre los granulomas. La neumonía en coexistencia con una elevada carga de micobacterias, causan la muerte.

Primero examinamos el efecto del TT-IL12 administrado a través de la ruta oral un día antes de la infección y durante dos meses. Comparado con el grupo control tratado con nonTT, los ratones infectados tratados con TT-IL12 mostraron una reducción significativa de la carga bacilar en los pulmones después de 3,7 y 28 días de infección (p.i.) ( $p \leq 0.05$ ) (**Fig. 10a**). La administración continua del TT-IL12 mantuvo la carga bacilar baja hasta el día 60 p.i., ( $p \leq 0.05$ ). Eventualmente, el número de bacilos en los pulmones de los ratones tratados con el TT-IL12 alcanzaron  $>4 \times 10^6$  el día 60, tiempo en el cual los ratones murieron. En contraste, la mitad de los ratones tratados con el nonTT ya habían muerto en este mismo día (datos no mostrados). De acuerdo con estos resultados, observamos diferencias significativas en el daño al tejido pulmonar entre los dos grupos durante los últimos días de tratamiento. Los pulmones de los ratones tratados con el TT-IL12 mostraron granulomas más grandes que los controles durante los días 14, 21, 28 y 60 p.i. ( $p \leq 0.05$  y  $0.01$ ) (**Fig. 10b**). Además estos granulomas eran más compactos, bien definidos y sin necrosis (**Figs. 10d y 10e**). De manera interesante, el porcentaje de área pulmonar afectada por neumonía en los ratones tratados con el TT-IL12 fue dos veces menor que en los animales control (**Figs. 10c, f, g**) durante los días 28 y 60 p.i. ( $p \leq 0.01$ ).



**Figura 10. Efecto de la administración temprana del TT-IL12 sobre la carga bacilar (UFC) y daño histológico en los pulmones de ratones infectados con la cepa *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv.** (a) El tratamiento con TT-IL12 iniciado un día antes de la infección y finalizado dos meses después, (barras negras) redujo significativamente las UFC comparado con el grupo control (barras blancas). (b) En el grupo tratado con el TT-IL12 (símbolos negros), los granulomas son más grandes que los del grupo control (símbolos vacíos). (c) El porcentaje de pulmón afectado por neumonía es menor en el grupo tratado con el TT-IL12 comparado con el control. Los datos son la media de  $\pm$  SD de dos experimentos diferentes. (d) Imágenes histológicas de pulmón representativas que muestran granulomas pequeños después de 2 meses de infección (flecha) en el grupo control. (e) En contraste, el grupo tratado con TT-IL12 muestra granulomas más grandes en el mismo tiempo (flecha). (f) Después de 2 meses de infección los animales control muestran extensa neumonía (flecha). (g) En comparación, los tratados con TT-IL12 presentan menor área afectada por neumonía (flecha). Cada punto representa tres o cuatro ratones y las barras representan la SD. Los asteriscos representan la significancia estadística con respecto al grupo control (\* $p \leq 0.05$ , \*\* $0.01$ ).

La carga bacilar en los pulmones de ratones tratados con el jitomate transgénico se incrementó conforme el tiempo de infección transcurrió, lo que indica que el efecto del TT-IL12 no fue esterilizante sino que solo incrementó la resistencia de los ratones a la progresión de la infección. El incremento en la resistencia de los ratones a la infección podría ser una consecuencia de la elevada producción de citocinas Th1 inducida por la administración oral de la IL-12 expresada en el jitomate transgénico. Para confirmar esta hipótesis, determinamos la expresión de genes de citocinas en homogenizados de pulmón por PCR en tiempo real. Los animales tratados con el TT-IL12 mostraron mayores niveles de expresión de IFN $\gamma$  que los controles, alcanzando significancia estadística durante la enfermedad avanzada los días 7, 14, 28 y 60 p.i. ( $p \leq 0.05$ ) (**Figura 11**). Resultados similares se observaron en la expresión de TNF $\alpha$  ( $p \leq 0.01$  y  $0.05$ ) e iNOS ( $p \leq 0.01$  y  $0.05$ ). En contraste, la expresión de IL-4 fue mínimamente detectable hasta el día 7 p.i. en ambos grupos de animales, posteriormente observamos un incremento en ambos grupos de ratones, siendo significativamente menor en el grupo tratado con el TT-IL12 comparado con el grupo tratado con el nonTT ( $p \leq 0.05$ ) (**Figura 11**). Estos resultados indican que la respuesta Th1 se mantiene en niveles altos con la administración oral del TT-IL12, paralelamente, reduce la respuesta Th2 durante la enfermedad avanzada (día 60). De esta manera, la administración temprana y continua del TT-IL12 incrementó y mantuvo la respuesta inmune protectora Th1, mejorando el control del crecimiento de las micobacterias.

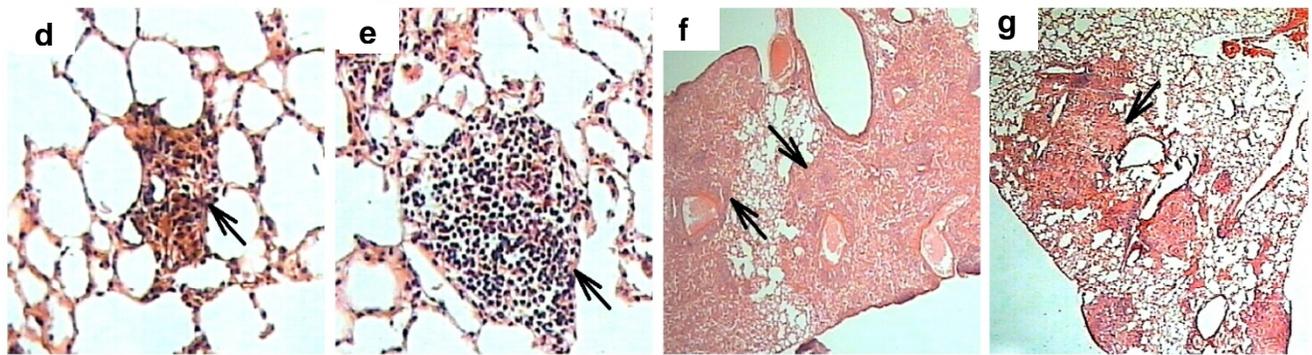
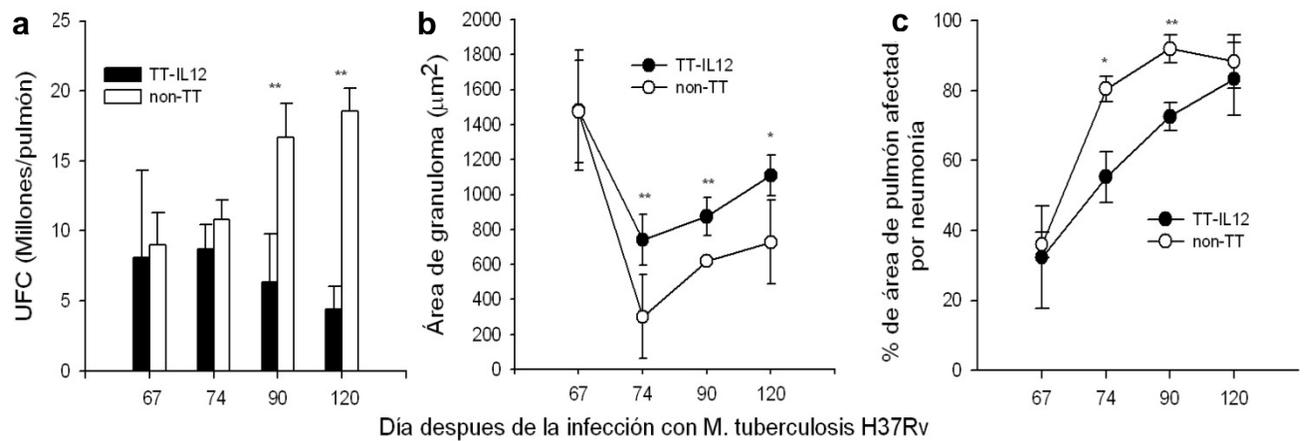


**Figura 11. Efecto de la administración temprana del TT-IL12 sobre la expresión de genes de citocinas y la enzima iNOS determinada por PCR en tiempo real en pulmones de ratones infectados con la cepa *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv.** Un día antes de la infección y durante 60 días los ratones fueron tratados con el TT-IL12 (barras negras) o con el nonTT (barras blancas). La expresión de los genes de las citocinas indicadas fue determinada por PCR-TR. Los resultados son expresados como la media de la  $\pm$  SD de 3-4 ratones por grupo de dos experimentos diferentes. Los asteriscos representan la significancia estadística con respecto al grupo control (\* $p \leq 0.05$ , \*\* $0.01$ ).

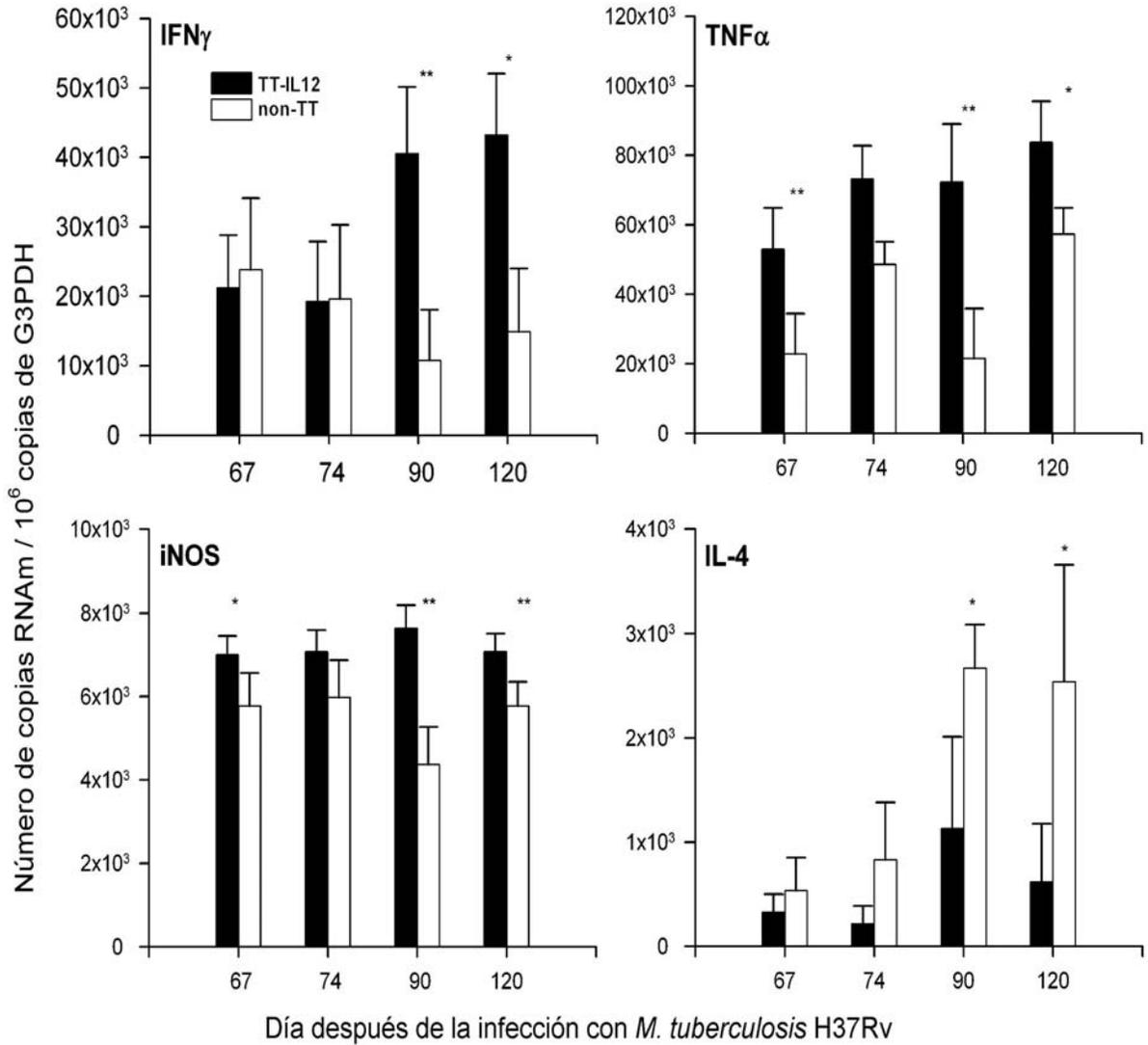
### 7.3 La administración tardía y continua del TT-IL12 induce la reactivación de la respuesta Th1 protectora.

#### 7.3.1 Cepa H37Rv de *M. tuberculosis*. Fase Avanzada de la infección

Para examinar si la administración del TT-IL12 podría reactivar la respuesta Th1 protectora durante la enfermedad progresiva, comparamos el efecto de la administración oral del TT-IL12 con el jitomate transgénico de tipo silvestre (nonTT) en ratones infectados con *M. tuberculosis* H37R, iniciando el tratamiento después de 60 días p.i., cuando la TB activa avanzada estaba bien establecida y la producción de citocinas Th1 se ha reducido. En comparación con los ratones control, los animales tratados con el TT-IL12 mostraron menor número de micobacterias en los pulmones (UFC), siendo significativamente diferente después de uno y 2 meses de tratamiento (p.t.) ( $p \leq 0.05$ ) (**Figura 12a**). De acuerdo con estos hallazgos, el análisis histológico reveló que los pulmones de los ratones durante los meses 1 y 2 p.t. desarrollaron granulomas más grandes y mejor formados (**Figuras 12d y e**), alcanzando significancia estadística los días 14, 30 ( $p \leq 0.01$ ), y 60 ( $p \leq 0.05$ ) p.t. (**Figura 12b**), así como áreas neumónicas más pequeñas (30-35% menores) (**Figura 12c**) comparadas con las del grupo control (**Figuras 12f y g**) ( $p \leq 0.05$  y 0.01). Estos resultados indican que durante la fase avanzada de la enfermedad, el tratamiento con el TT-IL12 mejoró la respuesta inmune protectora. Para confirmar este punto, determinamos la expresión de citocinas Th1 e iNOS en estos animales. Encontramos que durante el mes 1 y 2 p.t., la expresión de IFN $\gamma$  e iNOS se incrementó de 2 a 2.5 veces en el grupo tratado con TT-IL12 ( $p \leq 0.01$  y  $p \leq 0.05$ , respectivamente) (**Figura 13**), mientras que la expresión de TNF $\alpha$  se incrementó de 2 a 3 veces durante los mismos días ( $p \leq 0.01$  y 0.05). De manera interesante, la expresión de IL-4 en el grupo tratado con el TT-IL12 fue menor que en el grupo control durante el curso del tratamiento, alcanzando significancia estadística los días 90 y 120 p.t. ( $p \leq 0.05$ ) (**Figura 13**). Estos hallazgos muestran que la administración oral y continua del TT-IL12 durante la enfermedad avanzada puede reactivar la respuesta Th1, mejorando el control del crecimiento de los bacilos.



**Figura 12. Efecto de la administración del TT-IL12 sobre las UFC y el daño histopatológico en pulmones de ratones infectados con la cepa *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, durante la fase avanzada de la enfermedad. (a)** La administración del TT-IL12 (barras negras) después de 2 meses de infección redujo la carga bacilar comparado con el control (barras blancas). **(b)** Ratones tratados con TT-IL12 (símbolos negros) los días 74 y 90 p.i. mostraron granulomas más grandes comparados con los controles (símbolos vacíos). **(c)** Menor área afectada por neumonía en los ratones tratados con TT-IL12 (símbolos negros) **(d)** Imágenes histológicas representativas que muestran granulomas más pequeños en los pulmones de ratones control (flecha) comparados con los **(e)** tratados con el TT-IL12 (flecha). **(f)** Histología representativa del área pulmonar afectada por neumonía que muestra mayor área afectada en los controles (flecha) comparada con los que fueron **(g)** tratados con TT-IL12 (flecha). Los datos son la media de la  $\pm$  SD de dos experimentos diferentes. Cada punto representa tres o cuatro ratones y las barras representan las SD. Los asteriscos representan la significancia estadística con respecto al grupo control (\* $p < 0.05$ , \*\* $0.01$ ).



**Figura 13. Efecto de la administración del TT-IL12 durante la fase avanzada de la enfermedad sobre la expresión de genes de citocinas e iNOS en ratones infectados con *M. tuberculosis* H37Rv.** Ratones tratados con TT-IL12 (barras negras) y con el control (barras blancas) después de 60 días de infección y durante dos meses. La expresión de los genes de las citocinas indicadas se determinó por PCR en tiempo real. Los datos son la media de la  $\pm$  SD de dos experimentos diferentes. Cada punto representa tres o cuatro ratones y las barras representan los errores estándar. Los asteriscos indican significancia estadística con respecto al grupo control (\* $p \leq 0.05$ , \*\* $0.01$ ).

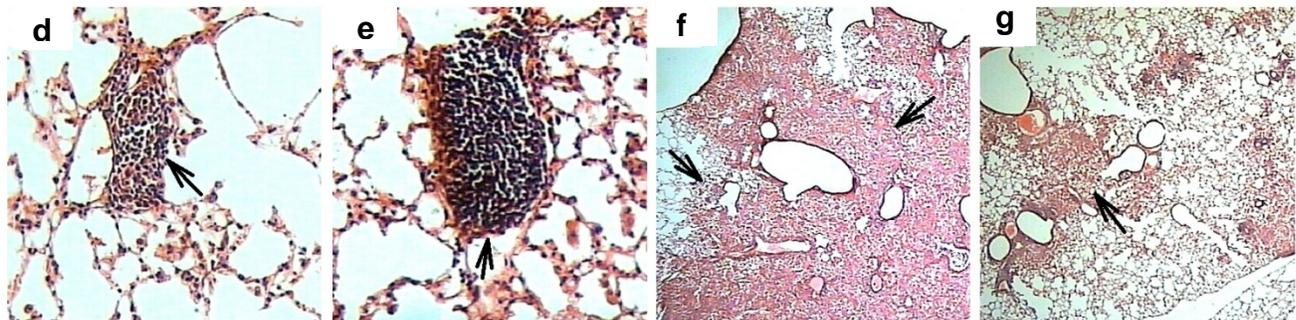
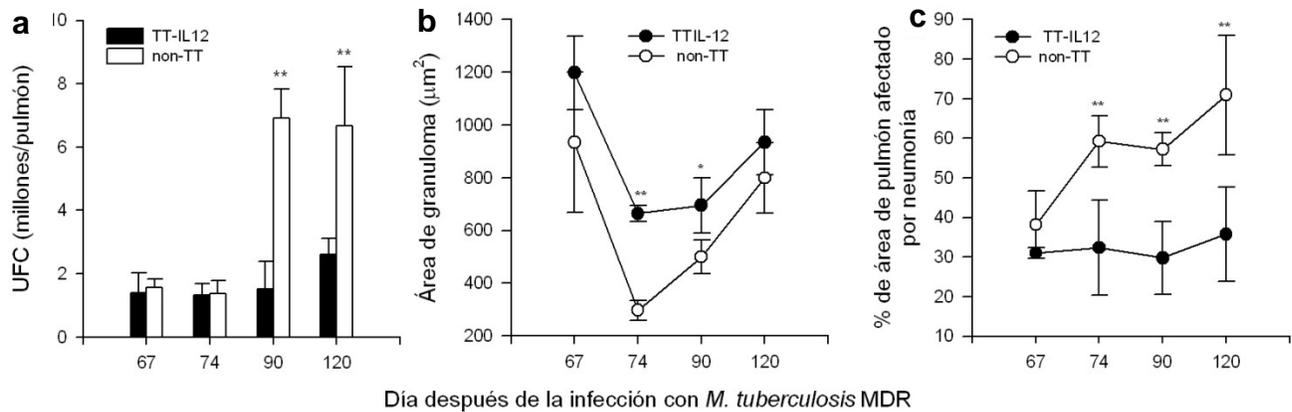
7.4 El régimen oral y persistente con el TT-IL12 induce y mantiene un efecto terapéutico en ratones infectados con un aislado clínico de *M. tuberculosis* resistente a múltiples drogas (MDR).

*7.4.1 Aislado clínico MDR. Fase Avanzada de la infección*

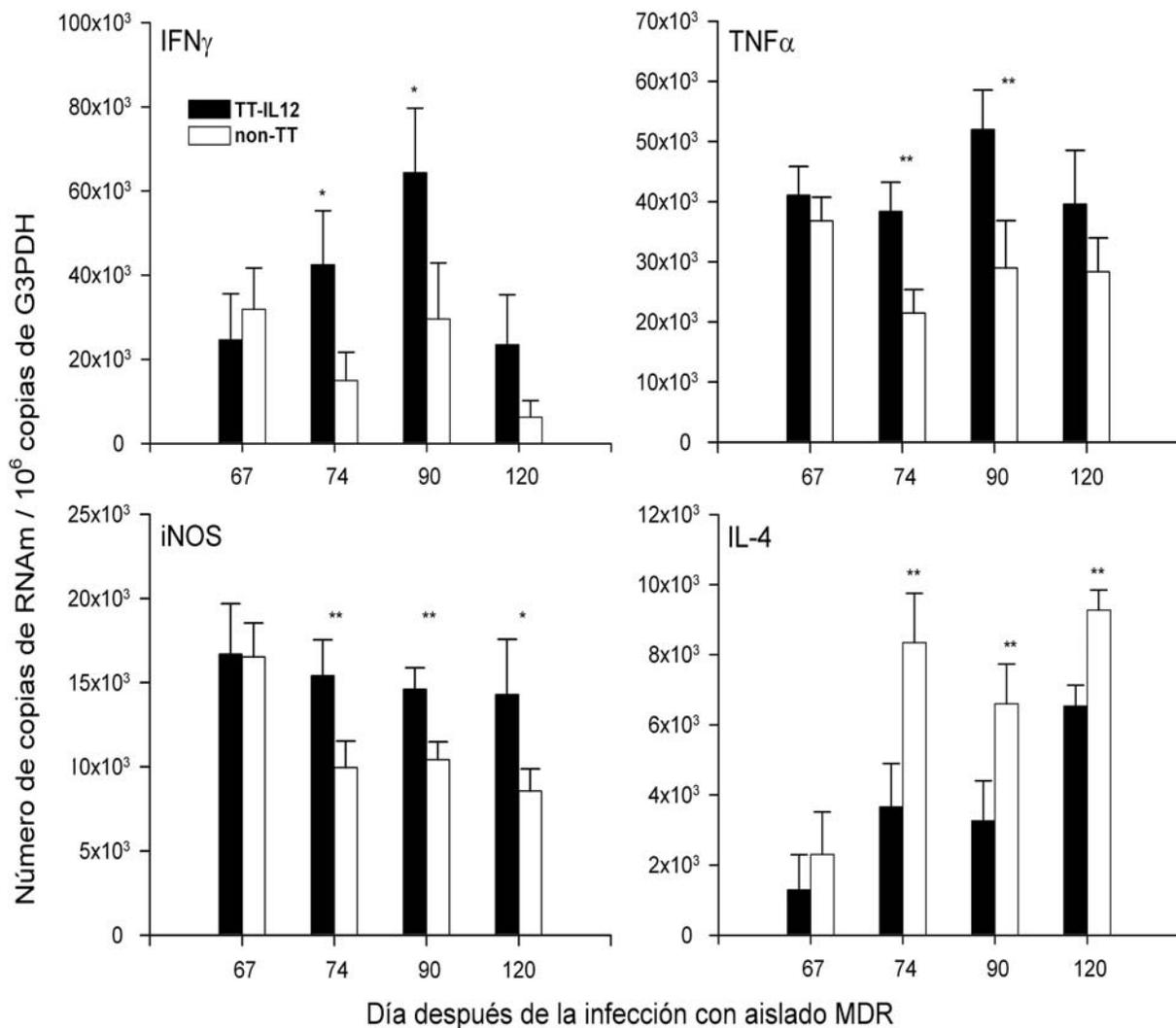
Debido a la emergencia de cepas MDR y dado que el tratamiento con TT-IL12 mejoró la resistencia a la infección en ratones infectados con la cepa drogosensible H37Rv, decidimos estudiar si esta terapia tiene la capacidad de producir efectos benéficos similares en ratones infectados con un aislado clínico resistente a todos los antibióticos de primera línea, durante la fase avanzada de la enfermedad.

En comparación con los animales control, los ratones infectados con aislado MDR y tratados diariamente (a partir del día 60 p.i.) con el TT-IL12 mostraron menor número de bacilos en los pulmones, estadísticamente significativo durante el mes 1(día 90) y 2 (día 120) p.t. ( $p \leq 0.01$ ), lo cual apoya el efecto benéfico de esta terapia (**Figura 14a**). De manera similar, se observó un mejoramiento en la histopatología, con granulomas más grandes los días 14 ( $p \leq 0.01$ ) y 30 ( $p \leq 0.05$ ) p.t. (**Figuras 14b, d y e**), así como una significativa reducción en el área afectada por neumonía (**Figuras 14c, f y g**) durante los días 14 y 30 p.t., comparadas con el grupo tratado con el nonTT ( $p \leq 0.01$ ).

La determinación de la expresión de genes de citocinas por PCR en tiempo real (**Figura 15**) mostró mayor expresión de  $IFN\gamma$  en los pulmones de los ratones tratados con el TT-IL12, alcanzando significancia estadística los días 14 y 30 p.t. ( $p \leq 0.05$ ). En contraste, la expresión de IL-4 fue significativamente menor los días 14, 30 y 60 p.t. ( $p \leq 0.01$ ), mientras que la expresión de  $TNF\alpha$  ( $p \leq 0.01$ ) e iNOS ( $p \leq 0.01$  y 0.05) fue más alta después de 2 semanas de administración del TT-IL12 (día 14 p.t.) (**Figura 15**). De manera similar a los ratones infectados con la cepa H37Rv, los animales infectados con el aislado MDR que recibieron el jitomate transgénico que expresa IL-12 por la ruta oral, mejoraron significativamente la respuesta inmune protectora, permitiendo un mejor control del crecimiento de los bacilos durante la enfermedad avanzada.



**Figura 14. Efecto del tratamiento con TT-IL12 sobre la carga bacilar y las alteraciones histopatológicas durante la fase avanzada de la enfermedad producida por un aislado clínico resistente a los antibióticos de primera línea (MDR).** (a) Tratamiento diario con el TT-IL12 (barras negras) a partir del día 60 p.i. con el aislado MDR, redujo la carga bacilar comparada con los animales control (barras blancas). (b) Estos ratones mostraron granulomas más grandes (símbolos negros) y (c) menor área neumónica que los animales control (símbolos vacíos). (d) Imágenes histológicas que muestran granulomas pulmonares más pequeños (flechas) después de 1 mes de tratamiento (día 90) con el nonTT comparado con granulomas más grandes y mejor formados (flechas) en los tratados con el TT-IL12 (e). Este mismo día de tratamiento los animales control (f) mayor menor consolidación neumónica (flechas), en contraste, los tratados con TT-IL12 presentaron menor área afectada por neumonía (flecha) (g). Los datos son la media de la  $\pm$  SD de dos experimentos diferentes. Cada punto representa tres o cuatro ratones y las barras representan los errores estándar. Los asteriscos representan la significancia estadística con respecto al grupo control (\* $p \leq 0.05$ , \*\* $0.01$ ).



**Figura 15. Efecto de la administración del TT-IL12 durante la enfermedad avanzada sobre la expresión de genes de citocinas y la enzima iNOS en ratones infectados con un aislado clínico resistente a la antibioticoterapia convencional (MDR).** Ratones Balb/c a los 60 días p.i. con el aislado MDR tratados con TT-IL12 (barras negras) o nonTT (barras blancas) diariamente durante dos meses. La expresión de los genes de las citocinas indicadas se determinó por PCR-TR. Los resultados están expresados como la media  $\pm$  SD, cada punto representa 3 o 4 ratones de dos experimentos diferentes. Los asteriscos indican significancia estadística con respecto al grupo control (\*p<0.05, \*\*p<0.01).

## 8.- DISCUSIÓN

En este trabajo estudiamos el uso del tomate transgénico que expresa la citocina\_IL-12 (TT-IL12) en forma de una sola cadena polipeptídica, (Gutiérrez-Ortega, 2005) como una posible estrategia para producir niveles constantes y terapéuticos de IL-12 cuando es administrada por vía oral a un modelo murino de tuberculosis pulmonar progresiva (Hernández-Pando, 1996). En este modelo, la respuesta inmune inicial dominada por una alta producción de citocinas Th1, junto con altos niveles de TNF $\alpha$  e iNOS controlan temporalmente la infección. Los granulomas se desarrollan en esta fase. Cuatro semanas después de la infección, hay una reducción significativa en la expresión de IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  e iNOS aunada a una alta expresión de citocinas Th2. Gradualmente, las áreas pneumónicas prevalecen sobre los granulomas. La neumonía en coexistencia con la alta carga bacilar causan la muerte [Hernández-Pando, 1996]. Nosotros proponemos que la administración oral y sostenida del TT-IL12 por un periodo de tiempo continuo puede mantener la inmunidad Th1 protectora durante las fases temprana y avanzada de la tuberculosis pulmonar.

Primero, examinamos el efecto terapéutico del TT-IL12 durante la fase temprana de la infección, iniciando su administración un día antes de la infección y durante los siguientes dos meses. Se ha demostrado que durante la infección temprana, la IL-12 dirige las células Th0 a fenotipo Th1 lo cual contribuye a la eliminación de *M. tuberculosis*. Este proceso fue demostrado primero en la infección por *Leishmania* (Heinzel, 1993), y se reportó después para las infecciones con *Toxoplasma gondii* (Gazzinelli, 1994) y *M. tuberculosis* (Doherty, 1998). Nuestros resultados confirman estos hallazgos, porque encontramos que la administración oral del TT-IL12 incrementó la resistencia de los ratones a la infección, reduciendo la carga bacilar en los pulmones y el daño a este mismo tejido, comparado con el grupo control. Estos resultados coinciden con otros reportes en los que se usó exitosamente la IL-12r administrada a través de la vía parenteral para el tratamiento de la TB (Feng, 2005); Nolt, 2004; Flynn, 1995), sin embargo, nuestros resultados amplían estas observaciones, demostrando que la administración de IL-12 a través de la ruta oral, empleando una planta comestible como vehículo, es una excelente alternativa para liberar IL-12 *in vivo*. De manera adicional, esta citocina retiene su actividad

biológica como es demostrado por el efecto que ejerce sobre los pulmones de los ratones infectados con Mtb.

Aunque no tenemos evidencia experimental que indique que la proteína (IL-12) no se degradó en el tracto gastrointestinal, experimentos previos con otras plantas han demostrado la resistencia de la proteínas heterólogas a la degradación peptídica en digestiones con fluidos gástricos simulados (Chikwamba, 2003; Thanavala, 2006). Todas las células vegetales están rodeadas por una pared celular, la cual no es completamente degradada por las enzimas digestivas, lo que muy probablemente protege a las proteínas citosólicas por “bioencapsulación”. Esta característica de las células vegetales podría ser la razón por la cual el TT-IL12 es efectivo para la absorción oral y liberación sistémica de la IL-12. En apoyo a esta observación, en previos reportes se ha demostrado que hormonas (Patel, 1976; Patel, 1997), e interferones ( $\alpha$  y  $\beta$ ) (Cummins, 1988; Brod, 1994) mantienen completamente su actividad biológica después de ser administradas por la vía oral, aún en la ausencia de niveles detectables de dichas moléculas en el suero.

Los animales tratados con el TT-IL12 un día antes de la infección también mostraron niveles elevados de expresión de citocinas Th1, confirmando la actividad biológica de la IL-12 absorbida por el intestino. De hecho, la expresión del IFN $\gamma$  se incrementó en los ratones tratados con TT-IL12 durante la fase temprana de la infección (y en los últimos días del tratamiento), así como su gen blanco iNOS. Estos resultados indican que la activación macrofágica así como sus mecanismos bactericidas, tales como la producción de NO y RNIs (Pieters, 2003) se incrementó, eliminando a los bacilos de los pulmones. Además, la expresión de TNF $\alpha$  también se incrementó, contribuyendo a un mejor control de la infección, lo cual coincide con el hecho de que TNF $\alpha$  contribuye a la formación de granulomas, permitiendo un completo desarrollo y mantenimiento de su estructura (Roach, 2002). En contraste, la expresión de IL-4 fue consistentemente menor durante todo el tratamiento, sugiriendo que el TT-IL12 contribuyó a la reducción de la respuesta Th2.

Otra pregunta importante de nuestro trabajo fue estudiar si el mismo régimen oral con el TT-IL12 podría prevenir la progresión de la enfermedad activa, en su fase avanzada. Con el fin de investigar este punto, los animales con la enfermedad progresiva avanzada fueron tratados durante dos meses, después de la infección. El análisis histológico y los

datos microbiológicos revelaron que durante esta fase de la infección, un régimen de tratamiento a largo plazo fue necesario (un mes) para disminuir el número de bacilos en los pulmones y el daño tisular. Durante este mismo tiempo después del tratamiento, las expresiones de  $IFN\gamma$ ,  $TNF\alpha$  e iNOS fueron significativamente superiores. En contraste, la expresión de la respuesta Th2 mediada por IL-4 fue menor que el control. Estos resultados corroboran un estudio previo que establece el efecto de la administración oral de esta citocina sobre el balance Th1/Th2 (Marinaro, 1997). La administración oral de la IL-12 murina puede redirigir la respuesta Th2 inducida por la toxina del cólera a una respuesta Th1 productora de  $IFN\gamma$ , la cual incrementó la respuesta de hipersensibilidad de tipo retardada (DTH) y la respuesta de IgG2a e IgE en suero. Por lo tanto, nuestros datos sugieren que la terapia a largo plazo con TT-IL12 durante la enfermedad avanzada fue capaz de restaurar la respuesta Th1 a pesar de la presencia de la respuesta Th2, reduciendo la carga bacilar y reduciendo el daño al tejido pulmonar.

Otro problema importante en el control de la TB es la emergencia de cepas MDR. Aproximadamente 400,000 nuevos casos de Mtb MDR son detectados en el mundo cada año, y esta forma de tuberculosis se ha identificado como un problema en cada región bajo la vigilancia de OMS (Matteelli, 2007). El tratamiento de cepas MDR es muy complejo, y usualmente requiere de la combinación de drogas de segunda línea que son más caras, más tóxicas y menos efectivas que las drogas utilizadas en la terapia estándar (Matteelli, 2007). Nuestros resultados mostraron que la administración oral del TT-IL12 en ratones infectados con el bacilo MDR, durante la fase avanzada de la infección, redujo significativamente la carga bacilar y daño al tejido pulmonar. Similar a los ratones infectados con la cepa H37Rv, un mes después del tratamiento, la expresión de  $IFN\gamma$ ,  $TNF\alpha$  e iNOS fue mayor que en los animales tratados con el control. De esta manera, la administración oral del TT-IL12 fue también capaz de redirigir (Marinaro, 1997) la respuesta inmune a el patrón Th1 durante la enfermedad avanzada, reduciendo la severidad de la enfermedad, como ocurrió durante la infección con la cepa drogosensible H37Rv.

Existen múltiples reportes sobre la toxicidad de los protocolos desarrollados para la administración de IL-12 (Car, 1995), normalmente como una consecuencia de los niveles tóxicos inducidos por el  $INF\gamma$  (Leonard, 1997). Nosotros administramos altas dosis de la citocina (2 $\mu$ g/ratón) basado en nuestro experimento previo dosis/respuesta, en el cual la

administración oral y repetitiva acentuó los efectos de la citocina, como ha sido mencionado anteriormente. Las dosis que nosotros empleamos fueron similares a las empleadas en otros estudios, en los cuales altas dosis parenterales de IL-12r fueron empleadas ( $\geq 500\text{ng/ratón}$ ) (Nolt, 2004; Flynn, 1995). De manera adicional, se han reportado altas dosis de IL12 murina para inducir potentes respuestas Th1 (Marinero, 1997), sin efectos adversos reportados. De hecho, nosotros observamos relativamente altos niveles de inflamación al final del tratamiento, lo cual correlacionó con altos niveles de expresión de  $\text{TNF}\alpha$ . De esta manera, la inflamación excesiva podría ser el efecto más importante de este tipo de tratamiento.

## **9.- CONCLUSIONES**

Nuestros resultados muestran que la administración oral y persistente de la IL-12 expresada en el jitomate transgénico:

### **1.- Mejoró la inmunidad protectora Th1 e indujo mayor resistencia a la infección por Mtb, cuando se administró**

- a) Un día antes de la infección inducida por micobacterias virulentas drogosensibles, diariamente y durante 2 meses (fase aguda de la infección), o
- b) Durante la fase avanzada de la enfermedad inducida por micobacterias virulentas drogosensibles (H37Rv) y drogorresistentes (aislado clínico MDR).

**2.- Aunque este tratamiento fue parcialmente curativo nuestros resultados experimentales sugieren que la administración oral, continua y controlada de IL-12 expresada en un vegetal transgénico puede ser una terapia potencial que puede ayudar en el control de esta significativa enfermedad infecciosa.**

## 10.- BIBLIOGRAFÍA

- "Tuberculosis: a global emergency. (1993)." World Health Forum **14**(4): 438.
- "Emergence of Mycobacterium tuberculosis with extensive resistance to second-line drugs-worldwide, 2000-2004." MMWR Morb Mortal Wkly Rep **55**(11): 301-5.
- Afkarian, M., J. R. Sedy, et al. (2002). "T-bet is a STAT1-induced regulator of IL-12R expression in naive CD4+ T cells." Nat Immunol **3**(6): 549-557.
- Airoldi, I., G. Gri, et al. (2000). "Expression and function of IL-12 and IL-18 receptors on human tonsillar B cells." J Immunol **165**(12): 6880-6888.
- Algood, H. M. S., J. Chan, et al. (2003). "Chemokines and tuberculosis." Cytokine Growth Factor Rev **14**(6): 467-477.
- Aliberti, J. and A. Sher (2002). "Positive and negative regulation of pathogen induced dendritic cell function by G-protein coupled receptors." Mol Immunol **38**(12-13): 891-893.
- Babik, J. M., E. Adams, et al. (1999). "Expression of murine IL-12 is regulated by translational control of the p35 subunit." J Immunol **162**(7): 4069-4078.
- Barnes, P. F., C. L. Grisso, et al. (1992). "Gamma delta T lymphocytes in human tuberculosis." J Infect Dis **165**(3): 506-512.
- Blanchard, D. K., M. B. Michelini-Norris, et al. (1989). "Lysis of mycobacteria-infected monocytes by IL-2-activated killer cells: role of LFA-1." Cell Immunol **119**(2): 402-411.
- Boom, W. H., D. H. Canaday, et al. (2003). "Human immunity to M. tuberculosis: T cell subsets and antigen processing." Tuberculosis (Edinb) **83**(1-3): 98-9106.
- Brod, S. A. and D. K. Burns (1994). "Suppression of relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis in the SJL/J mouse by oral administration of type I interferons." Neurology **44**(6): 1144-1148.
- Buccheri, S., R. Reljic, et al. (2007). "IL-4 depletion enhances host resistance and passive IgA protection against tuberculosis infection in BALB/c mice." Eur J Immunol **37**(3): 729-737.
- Canaday, D. H., R. J. Wilkinson, et al. (2001). "CD4(+) and CD8(+) T cells kill intracellular Mycobacterium tuberculosis by a perforin and Fas/Fas ligand-independent mechanism." J Immunol **167**(5): 2734-2742.
- Canaday, D. H., C. Ziebold, et al. (1999). "Activation of human CD8+ alpha beta TCR+ cells by Mycobacterium tuberculosis via an alternate class I MHC antigen-processing pathway." J Immunol **162**(1): 372-379.
- Car, B. D., V. M. Eng, et al. (1995). "Role of interferon-gamma in interleukin 12-induced pathology in mice." Am J Pathol **147**(6): 1693-1707.
- Caruso, A. M., N. Serbina, et al. (1999). "Mice deficient in CD4 T cells have only transiently diminished levels of IFN-gamma, yet succumb to tuberculosis." J Immunol **162**(9): 5407-5416.
- Chan, S. H., M. Kobayashi, et al. (1992). "Mechanisms of IFN-gamma induction by natural killer cell stimulatory factor (NKSF/IL-12). Role of transcription and mRNA stability in the synergistic interaction between NKSF and IL-2." J Immunol **148**(1): 92-98.
- Chan, S. H., B. Perussia, et al. (1991). "Induction of interferon gamma production by

- natural killer cell stimulatory factor: characterization of the responder cells and synergy with other inducers." J Exp Med **173**(4): 869-879.
- Chikwamba, R. K., M. P. Scott, et al. (2003). "Localization of a bacterial protein in starch granules of transgenic maize kernels." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(19): 11127-11132.
- Chua, A. O., R. Chizzonite, et al. (1994). "Expression cloning of a human IL-12 receptor component. A new member of the cytokine receptor superfamily with strong homology to gp130." J Immunol **153**(1): 128-136.
- Chua, A. O., V. L. Wilkinson, et al. (1995). "Cloning and characterization of a mouse IL-12 receptor-beta component." J Immunol **155**(9): 4286-4294.
- Condos, R., W. N. Rom, et al. (1998). "Local immune responses correlate with presentation and outcome in tuberculosis." Am J Respir Crit Care Med **157**(3 Pt 1): 729-35.
- Cooper, A. M., L. B. Adams, et al. (2002). "IFN-gamma and NO in mycobacterial disease: new jobs for old hands." Trends Microbiol **10**(5): 221-226.
- Cooper, A. M., A. Kipnis, et al. (2002). "Mice lacking bioactive IL-12 can generate protective, antigen-specific cellular responses to mycobacterial infection only if the IL-12 p40 subunit is present." J Immunol **168**(3): 1322-7.
- Cooper, A. M., J. Magram, et al. (1997). "Interleukin 12 (IL-12) is crucial to the development of protective immunity in mice intravenously infected with mycobacterium tuberculosis." J Exp Med **186**(1): 39-45.
- Cummins, J. M., M. B. Tompkins, et al. (1988). "Oral use of human alpha interferon in cats." J Biol Response Mod **7**(5): 513-23.
- D'Andrea, A., X. Ma, et al. (1995). "Stimulatory and inhibitory effects of interleukin (IL)-4 and IL-13 on the production of cytokines by human peripheral blood mononuclear cells: priming for IL-12 and tumor necrosis factor alpha production." J Exp Med **181**(2): 537-546.
- de Jong, R., F. Altare, et al. (1998). "Severe mycobacterial and Salmonella infections in interleukin-12 receptor-deficient patients." Science **280**(5368): 1435-8.
- Dieli, F., M. Troye-Blomberg, et al. (2001). "Granulysin-dependent killing of intracellular and extracellular Mycobacterium tuberculosis by Vgamma9/Vdelta2 T lymphocytes." J Infect Dis **184**(8): 1082-5.
- Doffinger, R., S. Patel, et al. (2005). "Human immunodeficiencies that predispose to intracellular bacterial infections." Curr Opin Rheumatol **17**(4): 440-6.
- Doherty, T. M. and A. Sher (1998). "IL-12 promotes drug-induced clearance of Mycobacterium avium infection in mice." J Immunol **160**(11): 5428-35.
- Erb, K. J., J. Kirman, et al. (1998). "IL-4, IL-5 and IL-10 are not required for the control of M. bovis-BCG infection in mice." Immunol Cell Biol **76**(1): 41-6.
- Feng, C. G., D. Jankovic, et al. (2005). "Maintenance of pulmonary Th1 effector function in chronic tuberculosis requires persistent IL-12 production." J Immunol **174**(7): 4185-92.
- Fenhalls, G., A. Wong, et al. (2000). "In situ production of gamma interferon, interleukin-4, and tumor necrosis factor alpha mRNA in human lung tuberculous granulomas." Infect Immun **68**(5): 2827-36.
- Flesch, I. and S. H. Kaufmann (1987). "Mycobacterial growth inhibition by interferon-gamma-activated bone marrow macrophages and differential susceptibility among strains of Mycobacterium tuberculosis." J Immunol **138**(12): 4408-13.
- Flesch, I. E. and S. H. Kaufmann (1991). "Mechanisms involved in mycobacterial growth

- inhibition by gamma interferon-activated bone marrow macrophages: role of reactive nitrogen intermediates." Infect Immun **59**(9): 3213-8.
- Flynn, J. L. (2004). "Immunology of tuberculosis and implications in vaccine development." Tuberculosis (Edinb) **84**(1-2): 93-9101.
- Flynn, J. L., J. Chan, et al. (1993). "An essential role for interferon gamma in resistance to Mycobacterium tuberculosis infection." J Exp Med **178**(6): 2249-54.
- Flynn, J. L., M. M. Goldstein, et al. (1995). "Tumor necrosis factor-alpha is required in the protective immune response against Mycobacterium tuberculosis in mice." Immunity **2**(6): 561-72.
- Flynn, J. L., M. M. Goldstein, et al. (1995). "IL-12 increases resistance of BALB/c mice to Mycobacterium tuberculosis infection." J Immunol **155**(5): 2515-24.
- Flynn, J. L., C. A. Scanga, et al. (1998). "Effects of aminoguanidine on latent murine tuberculosis." J Immunol **160**(4): 1796-803.
- Fremond, C. M., V. Yermeev, et al. (2004). "Fatal Mycobacterium tuberculosis infection despite adaptive immune response in the absence of MyD88." J Clin Invest **114**(12): 1790-1799.
- Garcia, I., Y. Miyazaki, et al. (1997). "High sensitivity of transgenic mice expressing soluble TNFR1 fusion protein to mycobacterial infections: synergistic action of TNF and IFN-gamma in the differentiation of protective granulomas." Eur J Immunol **27**(12): 3182-90.
- Gately, M. K., B. B. Desai, et al. (1991). "Regulation of human lymphocyte proliferation by a heterodimeric cytokine, IL-12 (cytotoxic lymphocyte maturation factor)." J Immunol **147**(3): 874-82.
- Gazzinelli, R. T., M. Wysocka, et al. (1994). "Parasite-induced IL-12 stimulates early IFN-gamma synthesis and resistance during acute infection with Toxoplasma gondii." J Immunol **153**(6): 2533-2543.
- Gerosa, F., C. Paganin, et al. (1996). "Interleukin-12 primes human CD4 and CD8 T cell clones for high production of both interferon-gamma and interleukin-10." J Exp Med **183**(6): 2559-69.
- Glatman-Freedman, A. (2006). "The role of antibody-mediated immunity in defense against Mycobacterium tuberculosis: advances toward a novel vaccine strategy." Tuberculosis (Edinb) **86**(3-4): 191-7.
- Greinert, U., M. Ernst, et al. (2001). "Interleukin-12 as successful adjuvant in tuberculosis treatment." Eur Respir J **17**(5): 1049-51.
- Gri, G., D. Savio, et al. (1998). "Synergistic regulation of the human interleukin-12 p40 promoter by NFkappaB and Ets transcription factors in Epstein-Barr virus-transformed B cells and macrophages." J Biol Chem **273**(11): 6431-6438.
- Gubler, U., A. O. Chua, et al. (1991). "Coexpression of two distinct genes is required to generate secreted bioactive cytotoxic lymphocyte maturation factor." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(10): 4143-7.
- Guerrero-Andrade, O., E. Loza-Rubio, et al. (2006). "Expression of the Newcastle disease virus fusion protein in transgenic maize and immunological studies." Transgenic Res **15**(4): 455-63.
- Gutierrez, M. G., S. S. Master, et al. (2004). "Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and Mycobacterium tuberculosis survival in infected macrophages." Cell **119**(6): 753-66.
- Gutierrez-Ortega, A., F. Avila-Moreno, et al. (2004). "Expression of a single-chain human

- interleukin-12 gene in transgenic tobacco plants and functional studies." Biotechnol Bioeng **85**(7): 734-40.
- Gutierrez-Ortega, A., C. Sandoval-Montes, et al. (2005). "Expression of functional interleukin-12 from mouse in transgenic tomato plants." Transgenic Res **14**(6): 877-85.
- Harper, C. (2007). "Tuberculosis, a neglected opportunity?" Nat Med **13**(3): 309-312.
- Heath, V. L., L. Showe, et al. (2000). "Cutting edge: ectopic expression of the IL-12 receptor-beta 2 in developing and committed Th2 cells does not affect the production of IL-4 or induce the production of IFN-gamma." J Immunol **164**(6): 2861-2865.
- Heinzel, F. P., D. S. Schoenhaut, et al. (1993). "Recombinant interleukin 12 cures mice infected with *Leishmania major*." J Exp Med **177**(5): 1505-9.
- Hernandez-Pando, R., D. Aguilar, et al. (2004). "Pulmonary tuberculosis in BALB/c mice with non-functional IL-4 genes: changes in the inflammatory effects of TNF-alpha and in the regulation of fibrosis." Eur J Immunol **34**(1): 174-83.
- Hernandez-Pando, R., M. De La Luz Streber, et al. (1998). "The effects of androstenediol and dehydroepiandrosterone on the course and cytokine profile of tuberculosis in BALB/c mice." Immunology **95**(2): 234-41.
- Hernandez-Pando, R., H. Orozco, et al. (1996). "Correlation between the kinetics of Th1, Th2 cells and pathology in a murine model of experimental pulmonary tuberculosis." Immunology **89**(1): 26-33.
- Hochrein, H., M. O'Keeffe, et al. (2000). "Interleukin (IL)-4 is a major regulatory cytokine governing bioactive IL-12 production by mouse and human dendritic cells." J Exp Med **192**(6): 823-833.
- Hodge, D. L., A. Martinez, et al. (2002). "Regulation of nuclear gamma interferon gene expression by interleukin 12 (IL-12) and IL-2 represents a novel form of posttranscriptional control." Mol Cell Biol **22**(6): 1742-1753.
- Holland, S. M. (2000). "Treatment of infections in the patient with Mendelian susceptibility to mycobacterial infection." Microbes Infect **2**(13): 1579-90.
- Hsieh, C. S., S. E. Macatonia, et al. (1993). "Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by *Listeria*-induced macrophages." Science **260**(5107): 547-549.
- Hunter, C. A., R. Chizzonite, et al. (1995). "IL-1 beta is required for IL-12 to induce production of IFN-gamma by NK cells. A role for IL-1 beta in the T cell-independent mechanism of resistance against intracellular pathogens." J Immunol **155**(9): 4347-4354.
- Hutchinson, V. and J. M. Cummins (1987). "Low-dose oral interferon in patient with AIDS." Lancet **2**(8574): 1530-1.
- Huygen, K., J. P. Van Vooren, et al. (1988). "Specific lymphoproliferation, gamma interferon production, and serum immunoglobulin G directed against a purified 32 kDa mycobacterial protein antigen (P32) in patients with active tuberculosis." Scand J Immunol **27**(2): 187-94.
- Jackett, P. S., V. R. Aber, et al. (1978). "Virulence and resistance to superoxide, low pH and hydrogen peroxide among strains of *Mycobacterium tuberculosis*." J Gen Microbiol **104**(1): 37-45.
- Jarnagin, J. L. and D. W. Luchsinger (1980). "The use of fluorescein diacetate and ethidium bromide as a stain for evaluating viability of mycobacteria." Stain Technol **55**(4): 253-8.

- Jung, Y. J., R. LaCourse, et al. (2002). "Evidence inconsistent with a negative influence of T helper 2 cells on protection afforded by a dominant T helper 1 response against Mycobacterium tuberculosis lung infection in mice." Infect Immun **70**(11): 6436-43.
- Kabelitz, D., A. Bender, et al. (1990). "A large fraction of human peripheral blood gamma/delta + T cells is activated by Mycobacterium tuberculosis but not by its 65-kD heat shock protein." J Exp Med **171**(3): 667-79.
- Kaufmann, S. H. (2002). "Protection against tuberculosis: cytokines, T cells, and macrophages." Ann Rheum Dis **61 Suppl 2**: ii54-8.
- Kaufmann, S. H. E. and S. K. Parida (2007). "Changing funding patterns in tuberculosis." Nat Med **13**(3): 299-303.
- Keane, J., S. Gershon, et al. (2001). "Tuberculosis associated with infliximab, a tumor necrosis factor alpha-neutralizing agent." N Engl J Med **345**(15): 1098-104.
- Kobayashi, M., L. Fitz, et al. (1989). "Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes." J Exp Med **170**(3): 827-45.
- Koch, F., U. Stanzl, et al. (1996). "High level IL-12 production by murine dendritic cells: upregulation via MHC class II and CD40 molecules and downregulation by IL-4 and IL-10." J Exp Med **184**(2): 741-746.
- Koech, D. K. and A. O. Obel (1990). "Efficacy of Kemron (low dose oral natural human interferon alpha) in the management of HIV-1 infection and acquired immune deficiency syndrome (AIDS)." East Afr Med J **67**(7 Suppl 2): SS64-70.
- Koech, D. K., A. O. Obel, et al. (1990). "Low dose oral alpha-interferon therapy for patients seropositive for human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1)." Mol Biother **2**(2): 91-5.
- Kubin, M., J. M. Chow, et al. (1994). "Differential regulation of interleukin-12 (IL-12), tumor necrosis factor alpha, and IL-1 beta production in human myeloid leukemia cell lines and peripheral blood mononuclear cells." Blood **83**(7): 1847-1855.
- Kubin, M., M. Kamoun, et al. (1994). "Interleukin 12 synergizes with B7/CD28 interaction in inducing efficient proliferation and cytokine production of human T cells." J Exp Med **180**(1): 211-222.
- Kuo, H. P., T. C. Ho, et al. (1996). "Increased production of hydrogen peroxide and expression of CD11b/CD18 on alveolar macrophages in patients with active pulmonary tuberculosis." Tuber Lung Dis **77**(5): 468-75.
- Lasco, T. M., L. Cassone, et al. (2005). "Evaluating the role of tumor necrosis factor-alpha in experimental pulmonary tuberculosis in the guinea pig." Tuberculosis (Edinb) **85**(4): 245-58.
- Leonard, J. P., M. L. Sherman, et al. (1997). "Effects of single-dose interleukin-12 exposure on interleukin-12-associated toxicity and interferon-gamma production." Blood **90**(7): 2541-8.
- Li, B., M. D. Rossman, et al. (1996). "Disease-specific changes in gammadelta T cell repertoire and function in patients with pulmonary tuberculosis." J Immunol **157**(9): 4222-9.
- Lienhardt, C., A. Azzurri, et al. (2002). "Active tuberculosis in Africa is associated with reduced Th1 and increased Th2 activity in vivo." Eur J Immunol **32**(6): 1605-13.
- Lighvani, A. A., D. M. Frucht, et al. (2001). "T-bet is rapidly induced by interferon-gamma in lymphoid and myeloid cells." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(26): 15137-15142.

- Lin, Y., M. Zhang, et al. (1996). "Absence of a prominent Th2 cytokine response in human tuberculosis." Infect Immun **64**(4): 1351-6.
- Ma, X., J. M. Chow, et al. (1996). "The interleukin 12 p40 gene promoter is primed by interferon gamma in monocytic cells." J Exp Med **183**(1): 147-157.
- MacMicking, J. D., R. J. North, et al. (1997). "Identification of nitric oxide synthase as a protective locus against tuberculosis." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(10): 5243-8.
- MacMicking, J. D., G. A. Taylor, et al. (2003). "Immune control of tuberculosis by IFN-gamma-inducible LRG-47." Science **302**(5645): 654-9.
- Major, J., J. E. Fletcher, et al. (2002). "IL-4 pretreatment selectively enhances cytokine and chemokine production in lipopolysaccharide-stimulated mouse peritoneal macrophages." J Immunol **168**(5): 2456-2463.
- Malik, S., L. Abel, et al. (2005). "Alleles of the NRAMP1 gene are risk factors for pediatric tuberculosis disease." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(34): 12183-8.
- Manetti, R., P. Parronchi, et al. (1993). "Natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12 [IL-12]) induces T helper type 1 (Th1)-specific immune responses and inhibits the development of IL-4-producing Th cells." J Exp Med **177**(4): 1199-1204.
- Marinaro, M., P. N. Boyaka, et al. (1997). "Oral but not parenteral interleukin (IL)-12 redirects T helper 2 (Th2)-type responses to an oral vaccine without altering mucosal IgA responses." J Exp Med **185**(3): 415-27.
- Marshall, J. D., S. E. Robertson, et al. (1997). "Priming with IL-4 and IL-13 during HIV-1 infection restores in vitro IL-12 production by mononuclear cells of HIV-infected patients." J Immunol **159**(11): 5705-5714.
- Maruo, S., K. Toyooka, et al. (1996). "IL-12 produced by antigen-presenting cells induces IL-2-independent proliferation of T helper cell clones." J Immunol **156**(5): 1748-1755.
- Matteelli, A., G. B. Migliori, et al. (2007). "Multidrug-resistant and extensively drug-resistant Mycobacterium tuberculosis: epidemiology and control." Expert Rev Anti Infect Ther **5**(5): 857-71.
- Merberg, D. M., S. F. Wolf, et al. (1992). "Sequence similarity between NKSF and the IL-6/G-CSF family." Immunol Today **13**(2): 77-8.
- Moreira, A. L., L. Tsenova-Berkova, et al. (1997). "Effect of cytokine modulation by thalidomide on the granulomatous response in murine tuberculosis." Tuber Lung Dis **78**(1): 47-55.
- Mullen, A. C., F. A. High, et al. (2001). "Role of T-bet in commitment of TH1 cells before IL-12-dependent selection." Science **292**(5523): 1907-1910.
- Muller, I., S. P. Cobbold, et al. (1987). "Impaired resistance to Mycobacterium tuberculosis infection after selective in vivo depletion of L3T4+ and Lyt-2+ T cells." Infect Immun **55**(9): 2037-41.
- Murphy, E. E., G. Terres, et al. (1994). "B7 and interleukin 12 cooperate for proliferation and interferon gamma production by mouse T helper clones that are unresponsive to B7 costimulation." J Exp Med **180**(1): 223-231.
- Murphy, T. L., M. G. Cleveland, et al. (1995). "Regulation of interleukin 12 p40 expression through an NF-kappa B half-site." Mol Cell Biol **15**(10): 5258-5267.
- Naeger, L. K., J. McKinney, et al. (1999). "Identification of a STAT4 binding site in the interleukin-12 receptor required for signaling." J Biol Chem **274**(4): 1875-1878.
- Nathan, C. (2002). "Inducible nitric oxide synthase in the tuberculous human lung." Am J Respir Crit Care Med **166**(2): 130-1.

- Nishikomori, R., T. Usui, et al. (2002). "Activated STAT4 has an essential role in Th1 differentiation and proliferation that is independent of its role in the maintenance of IL-12R beta 2 chain expression and signaling." *J Immunol* **169**(8): 4388-4398.
- Noble, A., M. J. Thomas, et al. (2001). "Early Th1/Th2 cell polarization in the absence of IL-4 and IL-12: T cell receptor signaling regulates the response to cytokines in CD4 and CD8 T cells." *Eur J Immunol* **31**(7): 2227-2235.
- Nolt, D. and J. L. Flynn (2004). "Interleukin-12 therapy reduces the number of immune cells and pathology in lungs of mice infected with *Mycobacterium tuberculosis*." *Infect Immun* **72**(5): 2976-88.
- North, R. J. (1998). "Mice incapable of making IL-4 or IL-10 display normal resistance to infection with *Mycobacterium tuberculosis*." *Clin Exp Immunol* **113**(1): 55-8.
- Ohno, H., G. Zhu, et al. (2003). "The effects of reactive nitrogen intermediates on gene expression in *Mycobacterium tuberculosis*." *Cell Microbiol* **5**(9): 637-648.
- Ohteki, T., T. Fukao, et al. (1999). "Interleukin 12-dependent interferon gamma production by CD8alpha+ lymphoid dendritic cells." *J Exp Med* **189**(12): 1981-1986.
- Okamura, H., H. Tsutsui, et al. (1998). "Interleukin-18: a novel cytokine that augments both innate and acquired immunity." *Adv Immunol* **70**: 281-312.
- Ordway, D. J., L. Costa, et al. (2004). "Increased Interleukin-4 production by CD8 and gammadelta T cells in health-care workers is associated with the subsequent development of active tuberculosis." *J Infect Dis* **190**(4): 756-66.
- Orme, I. M., A. D. Roberts, et al. (1993). "Cytokine secretion by CD4 T lymphocytes acquired in response to *Mycobacterium tuberculosis* infection." *J Immunol* **151**(1): 518-25.
- Ottenhoff, T. H. M., F. A. W. Verreck, et al. (2005). "Control of human host immunity to mycobacteria." *Tuberculosis (Edinb)* **85**(1-2): 53-64.
- Park, A. Y., B. D. Hondowicz, et al. (2000). "IL-12 is required to maintain a Th1 response during *Leishmania major* infection." *J Immunol* **165**(2): 896-902.
- Patel, H. M. and B. E. Ryman (1976). "Oral administration of insulin by encapsulation within liposomes." *FEBS Lett* **62**(1): 60-3.
- Patel, H. M. and B. E. Ryman (1977). "The gastrointestinal absorption of liposomally entrapped insulin in normal rats [proceedings]." *Biochem Soc Trans* **5**(4): 1054-5.
- Pedrazzini, T., K. Hug, et al. (1987). "Importance of L3T4+ and Lyt-2+ cells in the immunologic control of infection with *Mycobacterium bovis* strain bacillus Calmette-Guerin in mice. Assessment by elimination of T cell subsets in vivo." *J Immunol* **139**(6): 2032-7.
- Perussia, B., S. H. Chan, et al. (1992). "Natural killer (NK) cell stimulatory factor or IL-12 has differential effects on the proliferation of TCR-alpha beta+, TCR-gamma delta+ T lymphocytes, and NK cells." *J Immunol* **149**(11): 3495-3502.
- Pflanz, S., J. C. Timans, et al. (2002). "IL-27, a heterodimeric cytokine composed of EBI3 and p28 protein, induces proliferation of naive CD4(+) T cells." *Immunity* **16**(6): 779-790.
- Pieters, J. and H. Ploegh (2003). "Microbiology. Chemical warfare and mycobacterial defense." *Science* **302**(5652): 1900-2.
- Plevy, S. E., J. H. Gemberling, et al. (1997). "Multiple control elements mediate activation of the murine and human interleukin 12 p40 promoters: evidence of functional synergy between C/EBP and Rel proteins." *Mol Cell Biol* **17**(8): 4572-4588.
- Presky, D. H., H. Yang, et al. (1996). "A functional interleukin 12 receptor complex is

- composed of two beta-type cytokine receptor subunits." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(24): 14002-14007.
- Quesniaux, V., C. Fremont, et al. (2004). "Toll-like receptor pathways in the immune responses to mycobacteria." Microbes Infect **6**(10): 946-959.
- Raja, A. (2004). "Immunology of tuberculosis." Indian J Med Res **120**(4): 213-32.
- Rios-Barrera, V. A., V. Campos-Pena, et al. (2006). "Macrophage and T lymphocyte apoptosis during experimental pulmonary tuberculosis: their relationship to mycobacterial virulence." Eur J Immunol **36**(2): 345-53.
- Roach, D. R., A. G. Bean, et al. (2002). "TNF regulates chemokine induction essential for cell recruitment, granuloma formation, and clearance of mycobacterial infection." J Immunol **168**(9): 4620-7.
- Robinson, D. S., S. Ying, et al. (1994). "Evidence for a Th1-like bronchoalveolar T-cell subset and predominance of interferon-gamma gene activation in pulmonary tuberculosis." Am J Respir Crit Care Med **149**(4 Pt 1): 989-93.
- Rogge, L., L. Barberis-Maino, et al. (1997). "Selective expression of an interleukin-12 receptor component by human T helper 1 cells." J Exp Med **185**(5): 825-831.
- Rogge, L., A. Papi, et al. (1999). "Antibodies to the IL-12 receptor beta 2 chain mark human Th1 but not Th2 cells in vitro and in vivo." J Immunol **162**(7): 3926-3932.
- Rojas, M., M. Olivier, et al. (1999). "TNF-alpha and IL-10 modulate the induction of apoptosis by virulent Mycobacterium tuberculosis in murine macrophages." J Immunol **162**(10): 6122-31.
- Rook, G. A., R. Hernandez-Pando, et al. (2004). "IL-4 in tuberculosis: implications for vaccine design." Trends Immunol **25**(9): 483-8.
- Roy, E., J. Brennan, et al. (2008). "Beneficial effect of anti-interleukin-4 antibody when administered in a murine model of tuberculosis infection." Tuberculosis (Edinb) **88**(3): 197-202.
- Ruscetti, F., L. Varesio, et al. (1993). "Pleiotropic effects of transforming growth factor-beta on cells of the immune system." Ann N Y Acad Sci **685**: 488-500.
- Salgame, P. (2005). "Host innate and Th1 responses and the bacterial factors that control Mycobacterium tuberculosis infection." Curr Opin Immunol **17**(4): 374-380.
- Sanchez, F. O., J. I. Rodriguez, et al. (1994). "Immune responsiveness and lymphokine production in patients with tuberculosis and healthy controls." Infect Immun **62**(12): 5673-8.
- Saunders, B. M. and A. M. Cooper (2000). "Restraining mycobacteria: role of granulomas in mycobacterial infections." Immunol Cell Biol **78**(4): 334-341.
- Scanga, C. A., V. P. Mohan, et al. (2000). "Depletion of CD4(+) T cells causes reactivation of murine persistent tuberculosis despite continued expression of interferon gamma and nitric oxide synthase 2." J Exp Med **192**(3): 347-58.
- Schafer, T. W., M. Lieberman, et al. (1972). "Interferon administered orally: protection of neonatal mice from lethal virus challenge." Science **176**(41): 1326-7.
- Schindler, H., M. B. Lutz, et al. (2001). "The production of IFN-gamma by IL-12/IL-18-activated macrophages requires STAT4 signaling and is inhibited by IL-4." J Immunol **166**(5): 3075-3082.
- Schluger, N. W. and W. N. Rom (1998). "The host immune response to tuberculosis." Am J Respir Crit Care Med **157**(3 Pt 1): 679-691.
- Scott, H. M. and J. L. Flynn (2002). "Mycobacterium tuberculosis in chemokine receptor 2-deficient mice: influence of dose on disease progression." Infect Immun **70**(11):

- 5946-54.
- Seder, R. A., R. Gazzinelli, et al. (1993). "Interleukin 12 acts directly on CD4+ T cells to enhance priming for interferon gamma production and diminishes interleukin 4 inhibition of such priming." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(21): 10188-92.
- Seder, R. A., B. L. Kelsall, et al. (1996). "Differential roles for IL-12 in the maintenance of immune responses in infectious versus autoimmune disease." J Immunol **157**(7): 2745-2748.
- Shen, Y., D. Zhou, et al. (2002). "Adaptive immune response of Vgamma2Vdelta2+ T cells during mycobacterial infections." Science **295**(5563): 2255-8.
- Silver, R. F., Q. Li, et al. (1998). "Lymphocyte-dependent inhibition of growth of virulent Mycobacterium tuberculosis H37Rv within human monocytes: requirement for CD4+ T cells in purified protein derivative-positive, but not in purified protein derivative-negative subjects." J Immunol **160**(5): 2408-17.
- Sinigaglia, F., D. D'Ambrosio, et al. (1999). "Regulation of the IL-12/IL-12R axis: a critical step in T-helper cell differentiation and effector function." Immunol Rev **170**: 65-72.
- Small, P. M. and P. I. Fujiwara (2001). "Management of tuberculosis in the United States." N Engl J Med **345**(3): 189-200.
- Smith, S. M., M. R. Klein, et al. (2002). "Decreased IFN- gamma and increased IL-4 production by human CD8(+) T cells in response to Mycobacterium tuberculosis in tuberculosis patients." Tuberculosis (Edinb) **82**(1): 7-13.
- Sodhi, A., J. Gong, et al. (1997). "Clinical correlates of interferon gamma production in patients with tuberculosis." Clin Infect Dis **25**(3): 617-20.
- Stern, A. S., F. J. Podlaski, et al. (1990). "Purification to homogeneity and partial characterization of cytotoxic lymphocyte maturation factor from human B-lymphoblastoid cells." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(17): 6808-6812.
- Streatfield, S. J. (2006). "Mucosal immunization using recombinant plant-based oral vaccines." Methods **38**(2): 150-7.
- Surcel, H. M., M. Troye-Blomberg, et al. (1994). "Th1/Th2 profiles in tuberculosis, based on the proliferation and cytokine response of blood lymphocytes to mycobacterial antigens." Immunology **81**(2): 171-6.
- Szabo, S. J., A. S. Dighe, et al. (1997). "Regulation of the interleukin (IL)-12R beta 2 subunit expression in developing T helper 1 (Th1) and Th2 cells." J Exp Med **185**(5): 817-824.
- Szabo, S. J., S. T. Kim, et al. (2000). "A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment." Cell **100**(6): 655-669.
- Takenaka, H., S. Maruo, et al. (1997). "Regulation of T cell-dependent and -independent IL-12 production by the three Th2-type cytokines IL-10, IL-6, and IL-4." J Leukoc Biol **61**(1): 80-87.
- Tan, J. S., D. H. Canaday, et al. (1997). "Human alveolar T lymphocyte responses to Mycobacterium tuberculosis antigens: role for CD4+ and CD8+ cytotoxic T cells and relative resistance of alveolar macrophages to lysis." J Immunol **159**(1): 290-7.
- Thanavala, Y., Z. Huang, et al. (2006). "Plant-derived vaccines: a look back at the highlights and a view to the challenges on the road ahead." Expert Rev Vaccines **5**(2): 249-60.
- Trinchieri, G. (1998). "Interleukin-12: a cytokine at the interface of inflammation and immunity." Adv Immunol **70**: 83-8243.

- Trinchieri, G. and P. Scott (1995). "Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions." Res Immunol **146**(7-8): 423-31.
- Trinchieri, G. and P. Scott (1999). "Interleukin-12: basic principles and clinical applications." Curr Top Microbiol Immunol **238**: 57-78.
- Tsukaguchi, K., K. N. Balaji, et al. (1995). "CD4+ alpha beta T cell and gamma delta T cell responses to Mycobacterium tuberculosis. Similarities and differences in Ag recognition, cytotoxic effector function, and cytokine production." J Immunol **154**(4): 1786-96.
- Tsukaguchi, K., B. de Lange, et al. (1999). "Differential regulation of IFN-gamma, TNF-alpha, and IL-10 production by CD4(+) alphabetaTCR+ T cells and vdelta2(+) gammadelta T cells in response to monocytes infected with Mycobacterium tuberculosis-H37Ra." Cell Immunol **194**(1): 12-20.
- Ulrichs, T. and S. A. Porcelli (2000). "CD1 proteins: targets of T cell recognition in innate and adaptive immunity." Rev Immunogenet **2**(3): 416-32.
- Verver, S., R. M. Warren, et al. (2005). "Rate of reinfection tuberculosis after successful treatment is higher than rate of new tuberculosis." Am J Respir Crit Care Med **171**(12): 1430-5.
- Vilcek, J., A. Klion, et al. (1986). "Defective gamma-interferon production in peripheral blood leukocytes of patients with acute tuberculosis." J Clin Immunol **6**(2): 146-51.
- Walker, W., M. Aste-Amezaga, et al. (1999). "IL-18 and CD28 use distinct molecular mechanisms to enhance NK cell production of IL-12-induced IFN-gamma." J Immunol **162**(10): 5894-5901.
- Wallis, R. S., M. S. Broder, et al. (2004). "Granulomatous infectious diseases associated with tumor necrosis factor antagonists." Clin Infect Dis **38**(9): 1261-5.
- Wolf, S. F., P. A. Temple, et al. (1991). "Cloning of cDNA for natural killer cell stimulatory factor, a heterodimeric cytokine with multiple biologic effects on T and natural killer cells." J Immunol **146**(9): 3074-81.
- Wu, C., X. Wang, et al. (2000). "IL-12 receptor beta 2 (IL-12R beta 2)-deficient mice are defective in IL-12-mediated signaling despite the presence of high affinity IL-12 binding sites." J Immunol **165**(11): 6221-6228.
- Yang, J., T. L. Murphy, et al. (1999). "Induction of interferon-gamma production in Th1 CD4+ T cells: evidence for two distinct pathways for promoter activation." Eur J Immunol **29**(2): 548-55.
- Yap, G., M. Pesin, et al. (2000). "Cutting edge: IL-12 is required for the maintenance of IFN-gamma production in T cells mediating chronic resistance to the intracellular pathogen, Toxoplasma gondii." J Immunol **165**(2): 628-631.
- Yoshida, A., Y. Koide, et al. (1994). "IFN-gamma induces IL-12 mRNA expression by a murine macrophage cell line, J774." Biochem Biophys Res Commun **198**(3): 857-861.
- Yoshino, S. (1995). "The preventive effect of oral administration of type I interferon on collagen-induced arthritis in rats." Exp Mol Pathol **62**(2): 123-30.
- Young, A. S., A. C. Maritim, et al. (1990). "Low-dose oral administration of human interferon alpha can control the development of Theileria parva infection in cattle." Parasitology **101 Pt 2**: 201-9.
- Zhang, M., M. K. Gately, et al. (1994). "Interleukin 12 at the site of disease in tuberculosis." J Clin Invest **93**(4): 1733-9.

# Transgenic tomato expressing interleukin-12 has a therapeutic effect in a murine model of progressive pulmonary tuberculosis

A. L. Elías-López,\* B. Marquina,\*  
A. Gutiérrez-Ortega,† D. Aguilar,\*  
M. Gomez-Lim† and  
R. Hernández-Pando\*

\*Instituto Nacional de Ciencias Médicas y  
Nutrición 'Salvador Zubirán', Departamento de  
Patología, Patología Experimental, and

†Departamento de Ingeniería Genética de  
Plantas, Centro de Investigación y de Estudios  
Avanzados del IPN, Unidad Irapuato

Accepted for publication 10 June 2008

Correspondence: R. Hernández-Pando, Experimental Pathology, National Institute of Medical Sciences and Nutrition 'Salvador Zubirán', Calle Vasco de Quiroga 15, Tlalpan, CP 14000, México DF, México.

E-mail: rhpando@quetzal.innsz.mx

## Introduction

Tuberculosis (TB) is one of the most pervasive diseases nowadays, with over one-third of the world population infected with *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) and 2 million deaths every year [1]. After primary infection, only 5–10% of the infected hosts develop active disease, whereas a high percentage of the remainder experience latent infection [2]. Depending on the nature and extent of the host response to infection, there can be tissue damage and even death [3]. Anti-mycobacterial therapy remains the cornerstone in controlling TB. Given the increase in numbers of immunosuppressed individuals at risk for infection and the rising prevalence of multi-drug-resistant (MDR) isolates, other therapeutic options for TB, such as immunomodulators, are becoming attractive [4].

Host control of mycobacterial infection, in both human and mouse models, has been associated with the production of interferon (IFN)- $\gamma$  by CD4<sup>+</sup> T cells [3]. Interleukin (IL)-12 is known to be a crucial cytokine in the differentiation of

## Summary

Host control of mycobacterial infection, in both human and mouse models, has been shown to be associated with the production of interferon (IFN)- $\gamma$  by CD4<sup>+</sup> T cells. Interleukin (IL)-12 is known to be a crucial cytokine in the differentiation of IFN- $\gamma$ -producing T helper 1 (Th1) cells. To determine whether continuous administration of IL-12 expressed in transgenic tomato (TT-IL-12) has therapeutic efficacy in a murine model of pulmonary tuberculosis, BALB/c mice were infected with either *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv strain or a multi-drug-resistant clinical isolate (MDR) and treated with a daily oral dose of TT-IL12 crude fruit extracts. For the early H37Rv infection, TT-IL-12 administration was started 1 day before infection and continued for 60 days. In the H37Rv or MDR late infection, treatment was started 60 days after infection and continued for another 60 days. In both phases of infection, TT-IL-12 administration resulted in a reduction of bacterial loads and tissue damage compared with wild-type tomato (non-TT). The Th1 response was increased and the Th2 response was reduced. In the late infection, a long-term treatment with TT-IL-12 was necessary. We demonstrate that TT-IL-12 increases resistance to infection and reduces lung tissue damage during early and late drug-sensitive and drug-resistant mycobacterial infection.

**Keywords:** IL-12, multi-drug-resistant tuberculosis, oral therapy, pulmonary tuberculosis, transgenic tomato

IFN- $\gamma$ -producing T helper 1 (Th1) cells [5]. This cytokine has two subunits, p35 and p40, and is produced by dendritic cells and phagocytes after microbial or cytokine stimulation. After its production, IL-12 can direct the proliferation and activation of T lymphocytes, natural killer (NK) cells and NK T cells and can induce both IFN- $\gamma$  and increased cytotoxic activity. The IL-12 receptor has two chains, beta 1 and beta 2, the latter being expressed mainly by Th1 cells [5]. Multiple reports have shown that the administration of a neutralizing antibody against IL-12 [6] or using IL-12 knock-out mice (p35<sup>-/-</sup>, p40<sup>-/-</sup> or p35<sup>-/-</sup>-p40<sup>-/-</sup>) decreases the IFN- $\gamma$  response and increases susceptibility to Mtb infection [7,8]. Furthermore, early administration of recombinant IL-12 (rIL-12) to Mtb-infected mice reduced bacterial burdens and improved survival rate [9]. In addition, chronic TB IL-12-reconstituted IL-12p40<sup>-/-</sup> mice showed restricted mycobacterial growth and prolonged survival, as well as long-term protection to Mtb-challenged RAG<sup>-/-</sup> mice by adoptive transference of CD4<sup>+</sup> T cells isolated from wild-type infected mice [2]. Although the aforementioned experiments established an essential role for

IL-12 in the induction of Th1 response, and parenteral and intermittent administration of the rIL-12 can control mycobacterial growth efficaciously, they did not address whether continuous administration of IL-12 through the oral route is also able to maintain the Th1 response during early TB or to control advanced disease once the Th1 protective immune response has declined. Although the currently used licensed protocols of rIL-12 administration have been designed for parenteral administration, there is no a priori reason to exclude oral delivery. Parenteral delivery causes some discomfort and is not accepted widely, especially in children. For that reason, the availability of a suitable vehicle for oral delivery of pharmaceuticals would be highly beneficial; in this sense, plants represent a very attractive alternative. Plants provide a number of advantages for production of recombinant proteins over conventional systems, including low cost, increased safety and scalable production [10–12]. They are a potential source of a wide range of biopharmaceuticals that is not dependent upon downstream processing technology to ensure protein folding, particle assembly and stability; in consequence, a plant-based biopharmaceutical expression system makes possible the testing of an oral therapy strategy by simply feeding with edible plant tissues [13–16]. However, with few exceptions, most biopharmaceuticals have been expressed in tobacco, which represents an obstacle when they are administered by mucosal routes [17]. In this study we report the use of an edible crop, the tomato, with a construct bearing a single chain murine IL-12 [transgenic tomato (TT)–IL-12] gene [18]. We employed crude fruit extracts for oral delivery of IL-12 in a murine model of pulmonary TB, aimed at studying its therapeutic efficacy in animals infected with drug-sensitive (laboratory strain H37Rv) or drug-resistant bacilli (clinical isolate code 900).

## Materials and methods

### Construction of TT expressing IL-12

Tomato plants transformation has been described in detail previously [18]. Briefly, *NcoI/Bg/II* fragment corresponding to the murine IL-12 fusion gene was cloned into pMECA. A *KpnI/XbaI* fragment containing the IL-12 fusion gene was inserted between the CaMV 35S promoter and 3'UTR of CaMV 35S. The expression cassette was excised with *HindIII* and inserted into the binary Ti plasmid pCAMBIA 2300 to obtain the p35SMIL12-2300 plasmid. The p25SMIL12-2300 construct was transferred by electroporation into *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA4404, which was used subsequently for transformation of tomato cotyledons (*Lycopersicon esculentum*). Putative transformants selected by kanamycin resistance were transferred to soil and grown in the greenhouse. Subsequently, these plants were screened for their NTPII content with the NTPII enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit. Seeds from selected plants were collected, the surface was sterilized with 20%

commercial bleach and 0.1% Tween 20 for 15 min and germinated on Murashige and Skoog medium supplemented with 100 mg l<sup>-1</sup> kanamycin. Transformed plantlets (T1) were grown in the greenhouse and utilized for further experiments. Integration of mIL-12 fusion gene and IL-12 protein in tomato plants was confirmed by Southern blot hybridization and Western blot analysis. The plants' mIL-12 production was confirmed and quantified by Western blot and ELISA respectively, and biological activity was assessed by the induction of IFN- $\gamma$  secretion by T cells, as described previously [18].

### Preparation of (TT–IL-12) and control non-TT extracts for oral administration

One gram of lyophilized TT–IL-12 extract was diluted in 10 ml of phosphate-buffered saline (PBS), and the expression of IL12 was confirmed by Western blot. Briefly, 40  $\mu$ g of soluble protein was resuspended in loading buffer (0.1 M Tris pH 8.0, 2% sodium dodecyl sulphate and 0.75 M  $\beta$ -mercaptoethanol), boiled for 5 min, resolved by 7.5% sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis and electrotransferred onto polyvinylidene difluoride membrane, which was blocked with 8% non-fat milk, 0.1% Tween-20 in Tris-buffered saline. Biotinylated rat anti-mouse IL-12 monoclonal antibody C17-8 (BD Pharmingen, Franklin Lakes, NJ, USA) diluted 1:2500 was used for IL-12 detection, which was carried out by chemiluminescence (ECL Reagent, Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA). Cytokine concentrations were determined by an ELISA kit following the manufacturer's instructions (BD OptEIA™ set for mouse IL-12p70; Franklin Lakes, NJ, USA). Briefly, 96-well plates were precoated with 0.5  $\mu$ g/ml of monoclonal anti-mouse IL-12p70 dissolved in 100  $\mu$ l of 0.2 M phosphate buffer pH 6.5, and incubated overnight at 4°C. After washing with PBS-Tween 20 0.05%, wells were blocked with 3% bovine serum albumin (BSA) (Sigma, St Louis, MO, USA) in PBS for 2 h at 37°C. Diluted TT–IL-12 extracts and the standard curve of rIL-12p70 were incubated per duplicate for 2 h at 37°C. After washing, biotinylated polyclonal rabbit anti-mouse IL-12p70 diluted 1/250 in PBS-3% BSA were incubated with streptavidin peroxidase diluted 1/250 in PBS-3% BSA for 1 h at room temperature. To reveal, tetramethylbenzidine and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Pharmingen, San Diego, CA, USA) were used, and the optical density measured at 450 nm.

Dilutions were prepared to obtain different concentrations (1, 2 and 5  $\mu$ g/100  $\mu$ l of IL-12) for animal administration. To prepare the solution from non-TT extracts, we first determined the content of proteins in TT–IL-12 lyophilized preparations using the Bradford method following the manufacturer's instructions (protein assay kit; Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Then, dilutions were prepared with the same protein concentration as used for TT–IL-12 extracts.

### Determining IL-12 absorption after oral TT-IL-12 administration in non-infected mice

Dilutions containing 1, 2 or 5 µg/100 µl of IL-12 from TT extracts, or corresponding dilutions based on protein content of non-TT, were administered at various time-points to non-infected BALB/c mice through the oral route (see above). Three mice per group were killed after 15 min, 30 min, 1 h, 2 h and 24 h after treatment. The whole experiment was repeated three times. Sera and bronchoalveolar lavage (BAL) were collected and the IL-12 concentrations were determined by ELISA in duplicate following the manufacturer's instructions (BD OptEIA™ set for mouse IL-12p70).

### Determining the biological effect and therapeutic doses of IL-12 from TT-IL-12 extracts

To determine the safest and most effective dose of IL-12 from TT-IL-12 extract, groups of five mice were infected with Mtb H37Rv and treated through the oral route using a rigid steel cannula (Thomas Scientific, Swedesboro, NJ, USA) with different doses of IL-12 contained in TT-IL-12 extracts, daily for 1 month. The control group was treated with non-TT extract. Mice were monitored for survival and bacilli load was determined by colony-forming units (CFU) as described previously [19].

### Murine model of progressive pulmonary TB

The experimental model of progressive pulmonary TB has been described in detail [20]. Briefly, virulent strains of Mtb H37Rv and MDR (clinical isolate, resistant to all first-line antibiotics) were cultured in Proskauer and Beck medium. After 1 month of culture, mycobacteria were harvested and adjusted to  $2.5 \times 10^5$  cells in 100 µl of PBS, aliquoted and maintained at  $-70^\circ\text{C}$  until used. Before use, bacteria were recounted and viability checked as described previously [21]. Pathogen-free male BALB/c mice, 6–8 weeks old, were anaesthetized (sevoflurane; Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, USA) and the trachea was exposed via midline incision. The animals were infected using an insulin syringe administering  $2.5 \times 10^5$  viable bacteria suspended in 100 µl of PBS. After suturing the incision, mice were maintained in a vertical position until the effect of anaesthesia waned. Infected mice were kept in groups of five in cages fitted with micro-isolators connected to negative pressure. All procedures were performed in a biological security cabinet in a biosafety level III facility.

To evaluate the effect of TT-IL-12 administration on the course of infection, two different experiments were performed. In the first experiment, TT-IL-12 oral administration was started 1 day before infection and continued for 60 days in animals infected with H37Rv strain; mice were killed

in groups of six at days 1, 3, 7, 14, 21, 28 and 60 after infection. In the second experiment type, animals surviving 60 days after H37Rv or MDR strain infection were allocated randomly into two treatment groups: mice treated daily through the oral route, with TT-IL-12 and infected mice that received non-TT extracts. Thus, treatment was started 60 days after infection (and continued for 60 days). TT-IL-12 and non-TT extracts were administered daily dissolved in 100 µl of PBS through an intragastric cannula. Groups of six animals were killed at days 7, 14, 30 and 60 after treatment. The protocol was approved by the Ethics Committee for Experimentation in Animals of the Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición 'Salvador Zubirán' (permission number: NOM 062-200-1999). All data points are means  $\pm$  standard deviation (s.d.) of four animals of a representative experiment. Experiments were performed in duplicate. To determine the effect of treatments, we quantified lung bacillary loads by CFU, as described previously [19], and the extension of tissue damage by histopathology/automated morphometry as reported previously [20].

### Real-time reverse transcription–polymerase chain reaction analysis of cytokines and inducible nitric oxide synthase expression in lung homogenates

To determine the effect of treatments on immune response, we determined cytokines and inducible nitric oxide synthase (iNOS) gene expression by quantitative reverse transcription–polymerase chain reaction (PCR). Four lungs, right or left, from the same number of animals in two different experiments were used to isolate RNA at each time of killing using the RNeasy minikit (Qiagen, Valencia, CA, USA). Each lung was placed in 2 ml of RPMI-1640 medium containing 0.5 mg/ml of collagenase type 2 and incubated for 1 h at  $37^\circ\text{C}$ , then passed through a 70-µm cell sieve, crushed with a syringe plunger and rinsed with the medium. Cells were centrifuged, the supernatant was removed and red cells were eliminated with lysis buffer. After counting, 350 µl of RNA Lysis Tissue buffer was added to  $5 \times 10^6$  cells and RNA was extracted using the RNeasy mini kit (Qiagen, Valencia, CA, USA), according to the manufacturer's instructions. Quality and quantity of RNA were evaluated through spectrophotometry (260/280 nm) and on agarose gels. Reverse transcription of the mRNA was performed using 5 µg RNA, oligo-dT and the Omniscript kit (Qiagen). Real-time PCR was performed using the 7500 real-time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and Quantitect SYBR Green Master-mix kit (Qiagen). Standard curves of quantified and diluted PCR product, as well as negative controls, were included in each PCR run. Specific primers were designed using the program Primer Express (Applied Biosystems) for the following targets: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (G3PDH): 5'-CATTGTGGAAGGGCTCATGA-3', 5'-GGAAGGCCATGCCAGTGAGC-3'; iNOS: 5'-AGCGA

GGAGCAGGTGGAAG-3', 5'-CATTTCGCTGTCTCCCC AA-3'; tumour necrosis factor (TNF)- $\alpha$ : 5'-TGTTGGCTTC GACCTCTACCTC-3', 5'-GCCGAGAAAGGCTGCTTG-3'; IFN- $\gamma$ : 5'-GGTGACATGAAAATCCTGCAG-3', 5'-CCTCAA ACTTGGCAATACTCATGA-3'; and IL-4: 5'-CGTCCTCACA GCAACGGAGA-3', 5'-GCAGCTTATCGATGAATCCAGG-3'. Cycling conditions used were: initial denaturation at 95°C for 15 min, followed by 40 cycles at 95°C for 20 s, 60°C for 20 s, 72°C for 34 s. Quantities of the specific mRNA in the sample were measured according to the corresponding gene-specific standard. The mRNA copy number of each cytokine was related to 1 million copies of mRNA encoding the G3PDH gene.

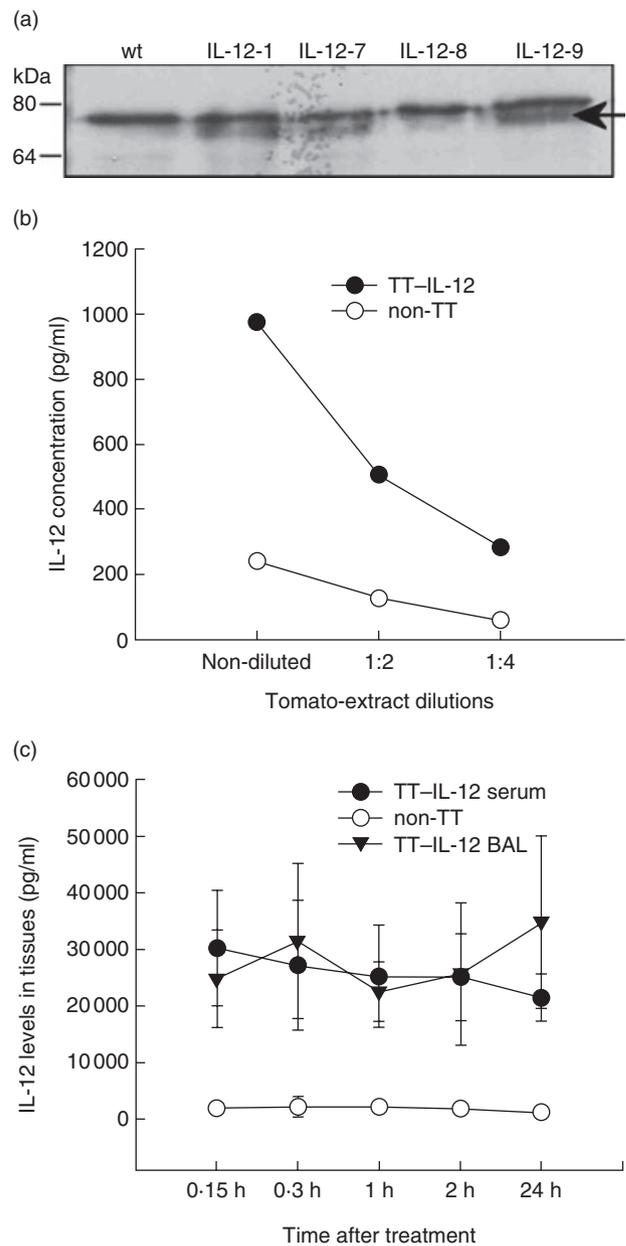
### Statistical analysis

The results are given as mean  $\pm$  s.d. of the means. Statistical significance between TT-IL-12-treated groups and controls was calculated by using Student's *t*-test in all experiments. Significance was set at *P*-value  $\leq$  0.05 or 0.01, as indicated.

## Results

### Selection of the appropriate dose regimen and *in vivo* biological activity analysis of TT-IL-12 absorption

Expression of IL-12 by TT-IL-12 was confirmed by Western blot (Fig. 1a). Significant levels of IL-12 were found by ELISA in serial dilutions from the TT-IL-12 extracts (Fig. 1b). We then determined the absorption and systemic distribution of IL-12 after treating normal non-infected BALB/c mice with TT-IL-12. We measured IL-12 by ELISA in serum and BAL after oral administration of TT-IL-12 or non-TT extracts (three animals per group) at different time-points. No detectable levels of IL-12 were found in sera and BAL before treatment with TT-IL-12 or non-TT extracts. In contrast, mice that received TT-IL-12 through the oral route exhibited approximately 30 ng/ml of IL-12 in both serum and BAL after 15 and 30 min respectively. Concentrations were maintained over 2 h, followed by a gradual decrease over the next 24 h (Fig. 1c). A preliminary dose-response experiment was then performed, treating mice 1 day before infection with the laboratory virulent strain H37Rv. Groups of five infected mice received daily through an intragastric cannula, 1, 2 or 5  $\mu$ g of IL-12 in TT-IL-12 extracts. The control group corresponded to animals that received the same amount of non-TT through the same route for 1 month. We found that the intermediate dose (2  $\mu$ g) was the most efficacious, reducing significantly the lung bacillary burden (data not shown). These results indicate that TT-IL-12 can actually be absorbed from the intestinal mucosa and can be distributed systemically, maintaining its biological activity. We used this dose for the following experiments.

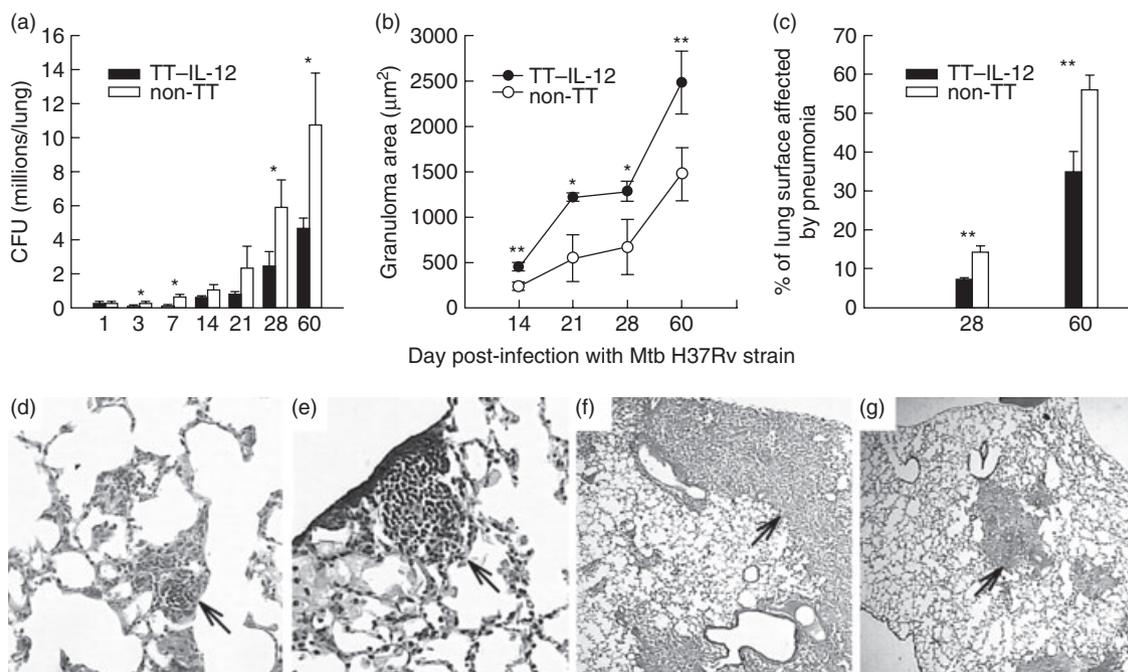


**Fig. 1.** Expression and concentrations of interleukin (IL)-12 in transgenic tomato (TT-IL-12) and non-TT extracts and kinetics of IL-12 concentration in serum and bronchoalveolar lavage (BAL) after oral administration of TT-IL-12 and non-TT extracts. (a) Expression of IL-12 in different TT-IL-12 extracts demonstrated by Western blot. (b) IL-12 levels in different concentrations of TT-IL-12 (black symbols) and non-TT extracts (empty symbols) determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). (c) Concentration of IL-12 in serum (black circles) and BAL (black triangles) determined by ELISA after oral administration of TT-IL-12 and non-TT extracts (empty symbols) to healthy BALB/c mice at different time-points. Each data point corresponds to the mean  $\pm$  standard deviation of three mice group. Asterisks represent statistical significance between groups (\**P*  $\leq$  0.05, \*\**P*  $\leq$  0.01).

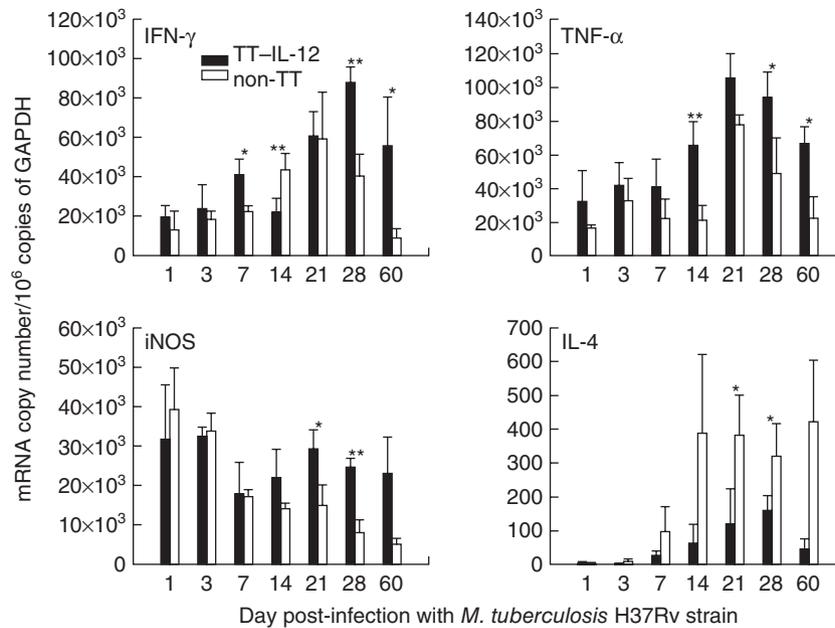
### Early and continuous TT-IL-12 administration controls mycobacterial infection efficaciously

We first examined the effect of TT-IL-12 administered through the oral route 1 day before infection and for 2 months. Compared with the control group treated with non-TT, infected mice treated with TT-IL-12 showed a significant reduction of lung bacilli CFU after 3, 7 and 28 days post-infection (p.i.) ( $P \leq 0.05$ ) (Fig. 2a). A continuous TT-IL-12 administration maintained lower bacillary burdens until day 60 p.i. ( $P \leq 0.05$ ). Eventually, the number of bacilli in the lungs of TT-IL-12 treated mice reached  $> 4 \times 10^6$  by day 60, at which time mice started to die. In contrast, half the mice treated with non-TT had already died at the same time-point (data not shown). In accordance with these results, striking differences in the pathology of the pulmonary tissue between both groups were observed at later time-points. Lungs from TT-IL-12-treated mice showed larger granulomas than controls at 14, 21, 28 and 60 days p.i. ( $P \leq 0.05$  and  $P \leq 0.01$ ) (Fig. 2b). Moreover, TT-IL-12 granulomas were more compact, well-defined and without necrosis (Fig. 2d and e).

Interestingly, the percentage of lung surface affected by pneumonia in mice treated with TT-IL-12 was twofold lower than in control mice (Fig. 2c, f and g) at days 28 and 60 p.i. ( $P \leq 0.01$ ). Bacterial burdens in the lungs and tissue damage of mice treated with TT-IL-12 increased steadily over the course of the experiment, indicating that the effect of the TT-IL-12 treatment was not sterilizing, but only increased the resistance to disease progression. This higher resistance could be a consequence of high expression of Th1 cytokines induced by TT-IL-12 from the oral administration of TT. To confirm this hypothesis, we determined cytokine gene expression in lung homogenates by real-time PCR. Animals treated with TT-IL-12 showed higher IFN- $\gamma$  expression (Fig. 3) than control mice, being significant during late disease at days 7, 14, 28 and 60 p.i. ( $P \leq 0.05$ ). Similar results were seen in TNF- $\alpha$  ( $P \leq 0.01$  and  $P \leq 0.05$ ) and iNOS ( $P \leq 0.05$  and  $P \leq 0.1$ ) expression (Fig. 3). In contrast, IL-4 expression was barely detectable until day 7 p.i. in both groups of animals, followed by an increment in both groups thereafter, but still being significantly lower in TT-IL-12-treated mice than in control animals (Fig. 3).



**Fig. 2.** Effect of early administration of transgenic tomato-interleukin-12 (TT-IL-12) on the bacillary loads CFU and histological damage in the lungs of mice infected with *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) H37Rv strain. (a) Treatment with TT-IL-12 (black bars) 1 day before infection and finished 2 months later reduced bacterial loads significantly when compared with control group (white bars). (b) In these TT-IL-12-treated animals (black symbols), granulomas are bigger than those exhibited by control mice (empty symbols). (c) Percentage of the lung surface affected by pneumonia is smaller in the TT-IL-12-treated group than in control animals. Each point corresponds to the mean  $\pm$  standard deviation of five mice group. Asterisks represent statistical significance between groups ( $*P \leq 0.05$ ,  $**P \leq 0.01$ ). (d) Representative micrograph showing small granuloma (arrow) after 4 months of infection in control non-TT-treated mouse. (e) In contrast, the lung of TT-IL-12-treated mouse shows bigger granuloma (arrow) at the same time-point. (f) After 4 months of infection, control animal shows extensive pneumonia (arrow). (g) In comparison, TT-IL-12-treated mouse shows lesser lung surface area affected by pneumonia (arrow). All micrographs haematoxylin/eosin staining. CFU, colony-forming units.



**Fig. 3.** Effect of early transgenic tomato–interleukin-12 (TT–IL-12) administration on cytokines and inducible nitric oxide synthase (iNOS) gene expression determined by real-time polymerase chain reaction (PCR) in mice infected with *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv strain. One day before infection and for 60 days, mice were treated daily with TT–IL-12 (black bars) or non-TT (white bars), and gene expression of iNOS and of the indicated cytokines was determined by real-time PCR. Results are expressed as mean  $\pm$  standard deviation from five mice group. Asterisks represent statistical significance between groups (\* $P \leq 0.05$ , \*\* $P \leq 0.01$ ). IFN, interferon; TNF, tumour necrosis factor.

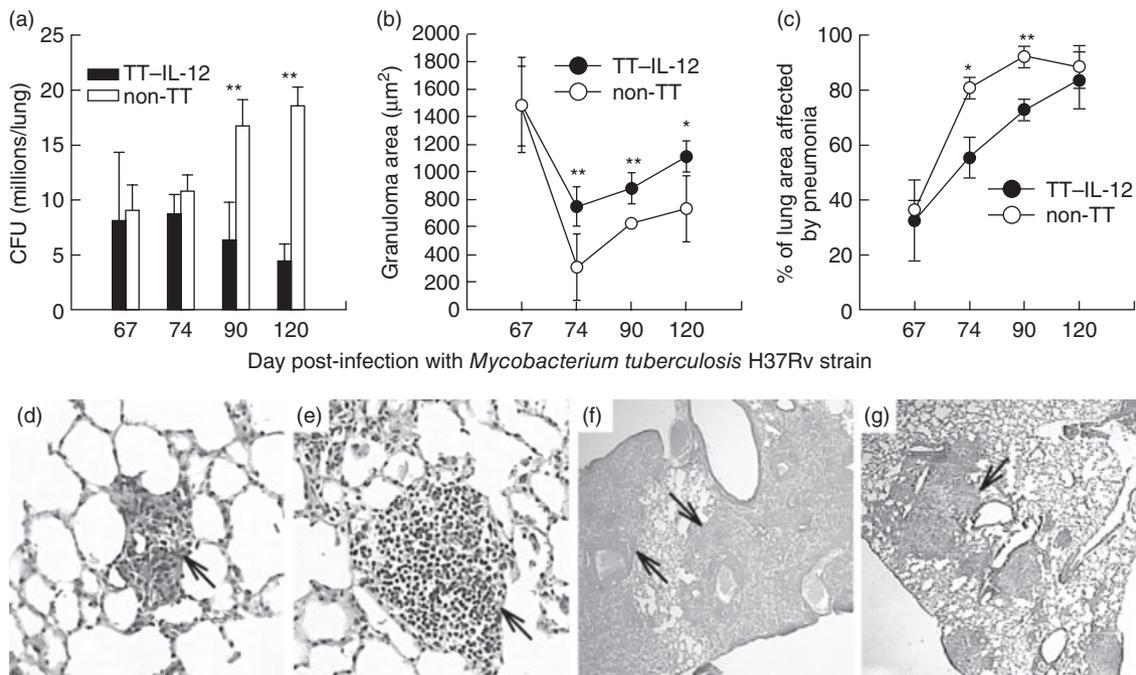
### Late and continuous oral administration of TT–IL-12 induced reactivation of the protective immune response

To examine whether TT–IL-12 administration could reactivate the protective Th1 response during late progressive disease, we compared the effect of the administration of TT–IL-12 with non-TT in H37Rv-infected mice starting the treatment after 60 days p.i., when advanced active TB was well established and production of Th1 cytokines decreased. In comparison with control mice, animals treated with TT–IL-12 showed lower lung bacillary loads, being significantly different ( $P \leq 0.01$ ) after 1 (day 90) and 2 months (day 120) post-treatment (p.t.) (Fig. 4a). Consistent with these findings, histological examination revealed that lungs of mice at 1 and 2 months p.t. depicted larger (Fig. 4b) and well-formed granulomas (Fig. 4d and e), reaching statistical significance at 14, 30 ( $P \leq 0.01$ ) and 60 ( $P \leq 0.05$ ) days p.t., as well as smaller lung areas (30–35%) affected by pneumonia than control mice ( $P \leq 0.05$  and  $P \leq 0.01$ ) (Fig. 4c, f and g). These results indicate that during late disease, the treatment with TT–IL-12 improved the protective immune response. To address this point, we determined the expression of Th1 cytokine and iNOS in these animals. At 1 and 2 months of treatment we observed a significant two- to 2.5-fold increment of IFN- $\gamma$  and iNOS expression in the TT–IL-12-treated group ( $P \leq 0.01$  and  $P \leq 0.05$  respectively) (Fig. 5), whereas TNF- $\alpha$  expression was increased two to

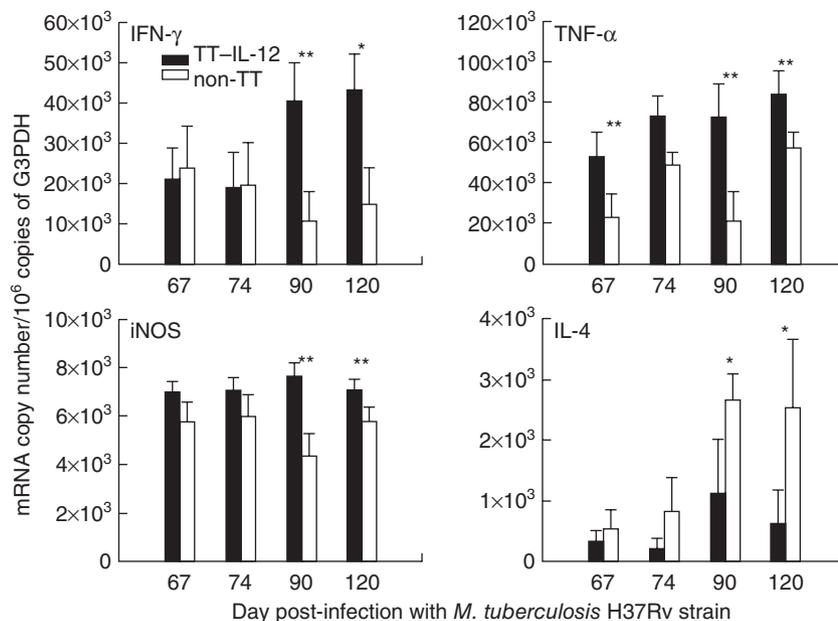
threefold at the same time-points ( $P \leq 0.1$  and  $P \leq 0.05$ ) (Fig. 5). Interestingly, IL-4 expression in the TT–IL-12-treated group was lower than in the non-TT-treated group at all time-points (Fig. 5).

### Therapeutic effect of continuous oral regimen with TT–IL-12 in mice infected with MDR mycobacteria

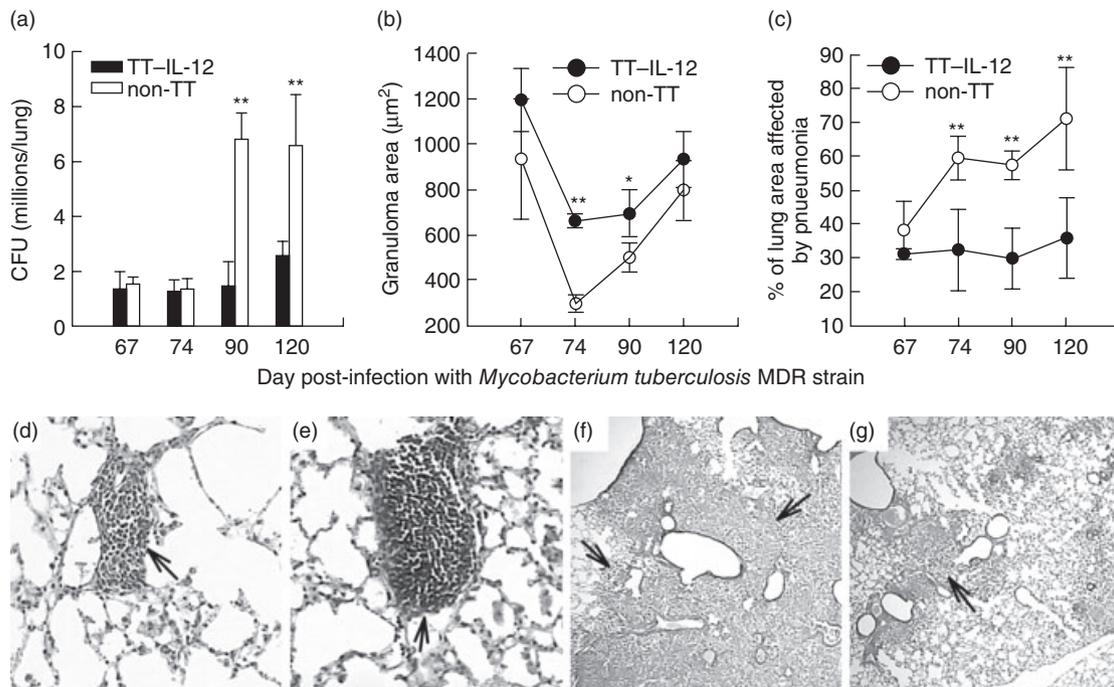
Due to the emergence of MDR strains, and given the improved course in TT–IL-12-treated mice infected with the drug-sensible H37Rv strain, we decided to study whether this therapy has the ability to produce similar beneficial effects on mice infected with a clinical isolate resistant to all first-line antibiotics during late active disease. In comparison with control animals, MDR clinical isolate-infected mice treated daily (starting day 60 p.i.) with TT–IL-12 showed significant lower lung bacillary loads at 1 (day 90) and 2 months (day 120) p.t. ( $P \leq 0.01$ ), supporting a beneficial effect of this therapy (Fig. 6a). Similarly, improved lung histopathology was seen, with bigger granulomas at days 14 ( $P \leq 0.01$ ) and 30 ( $P \leq 0.05$ ) p.t. (Fig. 6b, d and e) and a significant decrease of pneumonia (Fig. 6c, f and g) at 14, 30 and 60 days p.t., compared with the non-TT-treated mice group ( $P \leq 0.01$ ). Determination of cytokine gene expression by real-time PCR showed higher IFN- $\gamma$  expression in the lungs of TT–IL-12-treated animals (Fig. 7), with statistical significance at 14 and 30 days p.t. ( $P \leq 0.05$ ). In contrast, IL-4 expression was decreased significantly, whereas



**Fig. 4.** Effect of transgenic tomato–interleukin-12 (TT-IL-12) administration on the pathology and bacterial loads during advanced disease in the lungs from mice infected with *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv strain. (a) TT-IL-12 administration (black bars) starting 60 days after infection decreased pulmonary bacterial loads when compared with control mice (white bars). (b) TT-IL-12-treated mice (solid symbols) at days 74 and 90 post-treatment (p.t.) showed bigger granulomas and (c) less pneumonic area than the control group (empty symbols). Each point corresponds to the mean  $\pm$  standard deviation of five mice group. Asterisks represent statistical significance between groups (\* $P \leq 0.05$ , \*\* $P \leq 0.01$ ). (d) Representative lung micrograph showing granuloma (arrow) in control mouse after 1 month of treatment, and in mouse treated with TT-IL-12 (e). Control animal shows extensive pneumonia (arrow) after 4 months of infection (f). In comparison, TT-IL-12-treated mouse shows lesser lung surface area affected by pneumonia (arrow) (g). All micrographs haematoxylin/eosin staining. CFU, colony-forming units.



**Fig. 5.** Effect of transgenic tomato–interleukin-12 (TT-IL-12) administration during late disease on cytokines and inducible nitric oxide synthase gene expression in mice infected with *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv strain. Mice were treated daily with TT-IL-12 (black bars) or non-TT (white bars) after 60 days of infection and for 2 months, and the gene expression of the indicated cytokines was determined by real-time reverse transcription–polymerase chain reaction. Each point corresponded to mean  $\pm$  standard deviation of four or five mice group. Asterisks represent statistical significance between groups (\* $P \leq 0.05$ , \*\* $P \leq 0.01$ ). IFN, interferon; TNF, tumour necrosis factor.



**Fig. 6.** Effect of transgenic tomato–interleukin-12 (TT–IL-12) treatment on the lung bacillary loads and pathology during late disease produced by multi-drug-resistant (MDR) mycobacterial isolate. (a) Daily TT–IL-12-treated mice for 2 months (black bars), starting at day 60 after infection with the MDR clinical isolate, decreased bacterial loads, when compared with the control animals that received non-TT extracts (white bars). (b) These TT–IL-12-treated mice (solid symbols) displayed bigger granulomas and (c) lesser pneumonia area than control animals (empty symbols). Each point corresponds to the mean  $\pm$  standard deviation of five mice group. Asterisks represent statistical significance between groups ( $*P \leq 0.05$ ,  $**P \leq 0.01$ ). (d) Representative micrograph showing granuloma (arrow) after 1 month of treatment (day 90) in control non-TT-treated mouse, and in the lung of TT–IL-12-treated mouse (e). At the same time-point, control animal shows extensive pneumonia (arrow) (f), while TT–IL-12-treated mouse shows lesser lung consolidation (arrow) (g). All micrographs haematoxylin/eosin staining. CFU, colony-forming units.

TNF- $\alpha$  ( $P \leq 0.01$ ) and iNOS ( $P \leq 0.01$  and  $P \leq 0.05$ ) expression was higher after 2 weeks of TT–IL-12 administration (day 14 p.t.) (Fig. 7).

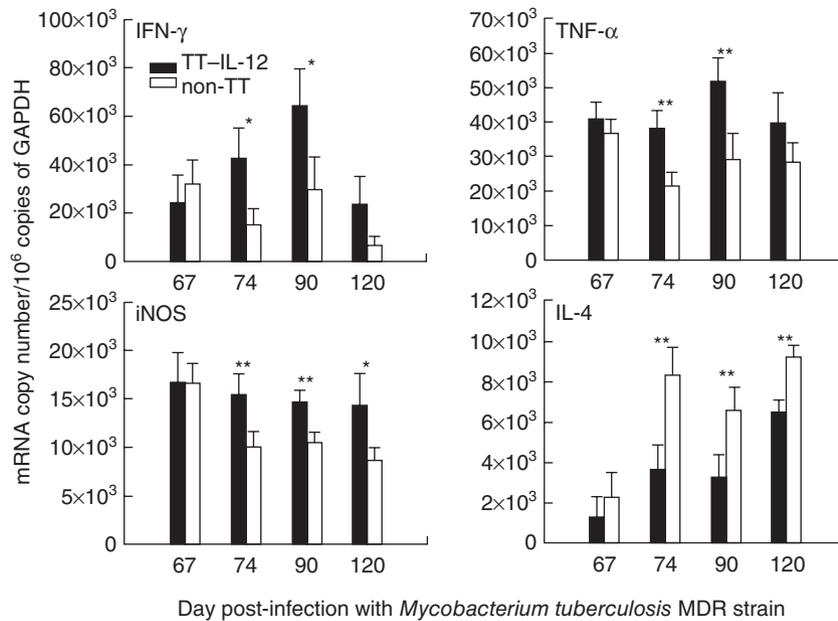
## Discussion

In this study, we explored the use of TT expressing IL-12 (TT–IL-12) as a single polypeptide [18] as a possible strategy to produce constant and therapeutic IL-12 levels when administered through the oral route in a well-characterized murine model of progressive pulmonary TB [20]. In this model, an initial immune response dominated by high production of Th1 cytokines, together with high levels of TNF- $\alpha$  and iNOS, controls the infection temporarily. Granulomas develop during this phase. Four weeks after infection, there is a drop in IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  and iNOS expression with high expression of Th2 cytokines. Gradually, pneumonic areas prevail over granulomas. Pneumonia, in co-existence with a high burden of bacteria, causes death [20]. We hypothesized that sustained oral administration of TT–IL-12 for a continuous period of time could maintain the protective Th1 response during early or advanced pulmonary TB.

We first examined the therapeutic effect of TT–IL-12 during the early phase of infection, starting its administra-

tion 1 day before infection and during the next 2 months. It has been shown that during early mycobacterial infection, IL-12 drives Th0 cells to Th1 phenotype contributing to Mtb clearance. This was first demonstrated in the infection with *Leishmania* [22], and was reported subsequently in *Toxoplasma gondii* [23] and Mtb infection [24]. Our results confirm these findings, showing that oral TT–IL-12 administration resulted in increased resistance to infection, reducing lung bacillary loads and tissue damage compared with the control group. These results agree with other reports that used rIL-12 successfully administered through the parental route to treat TB [2,4,9], but our results extend these observations by demonstrating that IL-12 administration through the oral route, using an edible plant as vehicle, is an excellent alternative to deliver IL-12 *in vivo*. In addition, the cytokine retains its biological activity as denoted by its therapeutic effect on lungs of mice infected with Mtb.

Although we do not have direct evidence showing that the cytokine was not degraded in the gastrointestinal tract, previous experiments with other plants have demonstrated resistance of the heterologous protein to peptic degradation in simulated gastric fluid digests [25,26]. All plant cells are surrounded by a cell wall, which is not degraded completely by digestive enzymes, presumably protecting



**Fig. 7.** Effect of transgenic tomato–interleukin-12 (TT–IL-12) administration during advanced disease on pulmonary cytokines and inducible nitric oxide synthase expression in mice infected with multi-drug-resistant (MDR) mycobacterial isolate. BALB/c mice at 60 days post-infection with MDR clinical isolate were treated with TT–IL-12 (black bars) or non-TT (white bars) daily for 2 months, and the gene expression of the indicated cytokines was determined by real-time reverse transcription–polymerase chain reaction. Results are expressed as mean  $\pm$  standard deviation from four mice group. Asterisks represent statistical significance between both groups (\* $P \leq 0.05$ , \*\* $P \leq 0.01$ ). IFN, interferon; TNF, tumour necrosis factor.

cytosolic proteins by ‘bioencapsulation’. This unique feature of plant cells could be the reason why TT–IL-12 is effective for cytokine oral absorption and systemic release. Previous reports have shown that hormones [27,28] and IFN ( $\alpha$  and  $\beta$ ) [29,30] retain biological activity after oral administration even in the absence of detectable levels of these molecules in serum.

Animals treated with TT–IL-12 1 day before infection also showed higher expression of Th1 cytokine, confirming the biological activity of the intestinal-absorbed IL-12. In fact, IFN- $\gamma$  expression was increased in TT–IL-12-treated mice during the early phase of infection (and at a later time-point), as well as its target gene iNOS. This result indicates that macrophage activation as well as its bactericidal mechanism, such as NO and reactive nitrogen intermediates production [31], was increased, killing bacilli in lungs. Furthermore, TNF- $\alpha$  expression was also increased, contributing to better control of infection, which is in agreement with the fact that TNF- $\alpha$  contributes to granuloma formation, permitting full development and maintaining its structure [32]. In contrast, IL-4 expression was consistently lower during the whole treatment, suggesting that TT–IL-12 contributed to maintain the reduced Th2 response.

Another important question of our work was whether the same oral regimen of TT–IL-12 could be able to prevent the progression of active late disease. In order to investigate this point, animals with advanced progressive disease were treated (starting day 60) for 2 months. Histological examination and microbiological data revealed that during this

phase of infection a long-term regimen of treatment (1 month p.t.) was necessary to decrease the number of bacilli in lungs, as well as to reduce tissue damage. At this same time after treatment, expression of IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  and iNOS was significantly higher. In contrast, expression of the Th2 response mediated by IL-4 was lower. These results corroborate a previous study that addressed the effect of oral delivery of this cytokine on the Th1/Th2 balance [33]. Oral delivery of murine IL-12 can redirect the Th2 response induced by cholera toxin to IFN- $\gamma$  Th1 responses, which enhanced delayed-type hypersensitivity and serum immunoglobulin (Ig)G2a and reduced IgE responses. Therefore, our data suggest that long-term therapy with TT–IL-12 during progressive disease was able to restore Th1 response in spite of the presence of Th2 response, decreasing bacillary loads and reducing tissue damage.

Another important problem in the control of TB is the emergence of MDR strains. Approximately 400 000 new cases of MDR Mtb emerge worldwide each year, and this form of TB has been identified as a significant problem in every region under World Health Organization surveillance [34]. Treatment of MDR strain is resource-intensive, and usually requires combination of second-line drugs that are more expensive, more toxic and less effective than drugs used in standard therapy. Our results showed that oral administration of TT–IL-12 in mice infected with MDR bacilli during the advanced phase of infection reduced lung bacillary loads and tissue damage significantly. Similarly to H37Rv strain-infected mice, 1 month p.t. the expression of

IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  and iNOS was higher than in control mice. Thus, oral TT-IL-12 administration was also able to redirect the immune response to the Th1 pattern during progressive disease [33], reducing disease severity as occurred with the drug-sensitive H37Rv strain infection.

There are multiple reports on the toxicity of IL-12 therapeutic protocols [35], usually as a consequence of toxic levels of induced IFN- $\gamma$  [36]. We administered high doses of the cytokine (2  $\mu$ g/mouse) based on our previous dose/response experiment in which oral repetitive administration accentuated the effects of the cytokine, as outlined above. Our doses were similar to those employed in other studies, in which high parenteral doses of rIL-12 were used ( $\geq$  500 ng/mouse) [4,9]. Furthermore, high oral doses of murine IL-12 have been reported to induce strong Th1 responses without adverse effects [33]. In fact, we observed relatively high levels of inflammation at the end of the treatment, which correlated with high TNF- $\alpha$  expression. Thus, excessive inflammation could be the most important secondary effect of this type of treatment.

In conclusion, our results show that persistent oral administration of IL-12 expressed in TT improved protective immunity and induced higher resistance to mycobacterial infection, when administered the day before infection or even during late progressive disease induced by drug-sensitive or drug-resistant virulent mycobacteria. Although this treatment was not completely curative, these experimental results suggest that continuous and controlled oral administration of IL-12 expressed in a transgenic plant might be a potential therapy that can aid in the control of this significant infectious disease.

## Acknowledgments

A. E. was supported by the National University of Mexico (UNAM) and a scholarship of the National Council for Science and Technology (CONACyT) Mexico. This study was supported by CONACyT and the European Community.

## References

- 1 Comstock GW. Epidemiology of tuberculosis. *Am Rev Respir Dis* 1982; **125**:8–15.
- 2 Feng CG, Jankovic D, Kullberg M, Cheever A, Scanga CA, Hieny S. Maintenance of pulmonary Th1 effector function in chronic tuberculosis requires persistent IL-12 production. *J Immunol* 2005; **174**:4185.
- 3 Flynn JL, Chan J. Immunology of tuberculosis. *Annu Rev Immunol* 2001; **19**:93.
- 4 Nolt D, Flynn JL. Interleukin 12 therapy reduces the number of immune cells and pathology in lungs of mice infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 2004; **72**:2976–88.
- 5 Trinchieri G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 2003; **3**:133.
- 6 Cooper AM, Flynn JL. The protective immune response to *Mycobacterium tuberculosis*. *Curr Opin Immunol* 1995; **7**:512.

- 7 Cooper AM, Kipnis A, Turner J, Magram J, Ferrante J, Orme IM. Mice lacking bioactive IL-12 can generate protective, antigen-specific cellular responses to mycobacterial infection only if the IL-12 p40 subunit is present. *J Immunol* 2002; **168**:1322.
- 8 Cooper AM, Magram J, Ferrante J, Orme IM. Interleukin 12 (IL-12) is crucial to the development of protective immunity in mice intravenously infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Exp Med* 1997; **186**:39–45.
- 9 Flynn JA, Goldstein MM, Triebold KJ, Sypek J, Wolf S, Bloom BR. IL-12 increases resistance of BALB/c mice to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Immunol* 1995; **155**:2515–24.
- 10 Gomez Lim MA. Transgenic plants in therapeutically valuable protein production. *Transgenic Plant J* 2007; **1**:256.
- 11 Streatfield SJ. Mucosal immunization using recombinant plant-based oral vaccines. *Methods* 2006; **38**:150.
- 12 Boehm R. Bioproduction of therapeutic proteins in the 21st century and the role of plants and plant cells as production platforms. *Ann NY Acad Sci* 2007; **1102**:121.
- 13 Jani D, Meena LS, Rizwan-ul-Haq QM, Singh Y, Sharma AK, Tyagi AK. Expression of cholera toxin B subunit in transgenic tomato plants. *Transgenic Res* 2002; **11**:447.
- 14 Bouche FB, Marquet-Blouin E, Yanagi Y, Steinmetz A, Muller CP. Neutralising immunogenicity of a polypeptide antigen expressed in a transgenic food plant: a novel antigen to protect against measles. *Vaccine* 2003; **21**:2065.
- 15 Magnuson NS, Linzmaier PM, Reeves R, An G, HayGlass K, Lee JM. Secretion of biologically active human interleukin-2 and interleukin-4 from genetically modified tobacco cells in suspension culture. *Protein Expr Purif* 1998; **13**:45.
- 16 Mor TS, Sternfeld M, Soreq H, Arntzen CJ, Mason HS. Expression of recombinant human acetylcholinesterase in transgenic tomato plants. *Biotechnol Bioeng* 2001; **75**:259.
- 17 Gutierrez-Ortega AF, Avila-Moreno LJ, Saucedo-Arias C, Sanchez-Torres C, Gomez-Lim MA. Expression of a single-chain human interleukin-12 gene in transgenic tobacco plants and functional studies. *Biotechnol Bioeng* 2004; **85**:734.
- 18 Gutierrez-Ortega AC, Sandoval-Montes TJ, de Olivera-Flores L, Santos-Argumedo L, Gomez-Lim MA. Expression of functional interleukin-12 from mouse in transgenic tomato plants. *Transgenic Res* 2005; **14**:877.
- 19 Hernández-Pando R, Streber M, Horozco H *et al.* The effects of androstenediol and dehydroepiandrosterone on the course and cytokine profile of tuberculosis in BALB/c mice. *Immunology* 1998; **95**:234–41.
- 20 Hernández-Pando R, Horozco H, Sampieri A, Pavón L, Velascoquillo C, Larriva-Sahd J. Correlation between the kinetics of Th1/Th2 cells and pathology in a murine model of experimental pulmonary tuberculosis. *Immunology* 1996; **89**:26–33.
- 21 Jarnagin JL, Luschinger DW. The use of fluorescein diacetate and ethidium bromide as a stain for evaluating viability of mycobacteria. *Stain Technol* 1980; **55**:253–8.
- 22 Heinzl FP, Schoenhaut DS. Recombinant interleukin 12 cures mice infected with *Leishmania major*. *J Exp Med* 1993; **177**:1505–9.
- 23 Gazzinelli RT, Wysocka M, Hayashi S, Denkers EY, Hieny S, Caspar P. Parasite-induced IL-12 stimulates early IFN- $\gamma$  synthesis and resistance during acute infection with *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* 1994; **153**:2533–43.
- 24 Doherty TM, Sher A. IL-12 promotes drug-induced clearance of *Mycobacterium avium* infection in mice. *J Immunol* 1998; **160**:5428.

- 25 Chikwamba RK, Scott MP, Mejia LB, Mason HS, Wang K. Localization of a bacterial protein in starch granules of transgenic maize kernels. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; **100**:11127.
- 26 Thanavala Y, Huang Z, Mason H. Plant-derived vaccines: a look back at the highlights and a view to the challenges on the road ahead. *Expert Rev Vaccines* 2006; **5**:249.
- 27 Patel HM, Ryman BR. Oral administration of insulin by encapsulation within liposomes. *FEBS Lett* 1976; **62**:60–3.
- 28 Patel HM, Ryman BE. The gastrointestinal absorption of liposomally entrapped insulin in normal rats [proceedings]. *Biochem Soc Trans* 1977; **5**:1054–5.
- 29 Cummins JM, Topkins MB. Oral use of human alpha interferon in cats. *J Biol Response Modif* 1988; **7**:513–23.
- 30 Brod SA, Burns DK. Suppression of relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis in the SJL/J mouse by oral administration of type I interferons. *Neurology* 1994; **4**:1144–8.
- 31 Pieters J, Ploegh H. Chemical warfare and Mycobacterial defense. *Science* 2003; **203**:1900–19002.
- 32 Roach DR, Bean AGD, Demangel C, France MP, Briscoe H, Britton WJ. TNF regulates chemokine induction essential for cell recruitment, granuloma formation and clearance of Mycobacterial infection. *J Immunol* 2002; **168**:4620–7.
- 33 Marinaro M, Boyaka PN, Finkelman FD, Kiyono H, Jackson RJ, Jirillo E. Oral but not parenteral interleukin (IL)-12 redirects T helper 2 (Th2)-type responses to an oral vaccine without altering mucosal IgA responses. *J Exp Med* 1997; **185**:415–27.
- 34 Matteelli A, Migliori GB, Cirillo D, Centis R, Girard E, Raviglion M. Multidrug-resistant and extensively drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*: epidemiology and control. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2007; **5**:857–71.
- 35 Car BD, Eng VM, Schnyder B, LeHir M, Shakhov AN, Woerly G. Role of interferon-gamma in interleukin 12-induced pathology in mice. *Am J Pathol* 1995; **147**:1693–707.
- 36 Leonard JP, Sherman ML, Fisher GL, Buchanan LJ, Larsen G, Atkins MB. Effects of single-dose interleukin-12 exposure on interleukin-12-associated toxicity and interferon-gamma production. *Blood* 1997; **90**:2541–8.