



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**GENERACIÓN DE CÉLULAS GIGANTES  
MULTINUCLEADAS EN UN MODELO MURINO A  
PARTIR DE MUTANTES DE MICOBACTERIA**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**BIÓLOGA**

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

**MARÍA TERESA LEGUIZAMO GÓMEZ**



**DIRECTOR DE TESIS:  
M. en C. ERASMO MARTÍNEZ CORDERO  
(2012)**



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.

## Hoja de Datos del Jurado

1. Datos de la alumna  
Leguizamo  
Gómez  
María Teresa  
80027804  
Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Ciencias  
Biología  
30315038-5
2. Datos del tutor  
M. en C.  
Erasmus  
Martínez  
Cordero
3. Datos del sinodal 1  
Dr.  
Enrique  
Ortega  
Soto
4. Datos del sinodal 2  
Dr.  
José Luis  
Arreola  
Ramírez
5. Datos del sinodal 3  
Dr.  
Alejandro  
Marche  
Cova
6. Datos del sinodal 4  
Dra.  
Blanca  
Bazán  
Perkins
7. Datos del trabajo escrito  
Generación de células gigantes multinucleadas en un modelo murino a partir de  
mutantes de micobacteria  
48 p.  
2012

Sitio donde se desarrollo el tema:

DEPARTAMENTO DE AUTOINMUNIDAD, INSTITUTO NACIONAL DE  
ENFERMEDADES RESPIRATORIAS “ISMAEL COSIO VILLEGAS”

ASESOR

-----  
M. en C. Erasmo Martínez Cordero

SUSTENTANTE

-----  
María Teresa Leguizamo Gómez



Este trabajo se realizó en el Departamento de Autoinmunidad del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosio Villegas” (INER), bajo la asesoría del M. en C. Erasmo Martínez Cordero.

## **Agradecimientos**

Agradezco a Dios por darme la fuerza de terminar esta tesis.

A mi tutor el Dr. Erasmo Martínez por sus enseñanzas, paciencia y tiempo.

Al Dr. José Luis Arreola por su gran apoyo y ayuda para salvar esta tesis.

A la Dra. Norma Uribe por su valiosa ayuda y enseñanzas de histología.

A mi mamá y a mi hermana Gaby por su apoyo.

A mi familia y amigos por su amor y ánimos.

A mis compañeros del laboratorio por sus enseñanzas.

# Índice

1. Abreviaturas .....	7
2. Resumen.....	8
3. Introducción .....	9
3.1 Granulomas inmunes .....	10
3.2 Granulomas no inmunes.....	11
3.3 Células gigantes multinucleadas .....	12
3.4 Genero <i>Mycobacterium</i> .....	14
4. Objetivos .....	16
5. Hipótesis .....	17
6. Justificación .....	17
7. Material y métodos.....	18
7.1 Diseño experimental.....	18
7.1.1 Grupos control.....	20
7.1.2 Grupos experimentales.....	20
7.2 Características de los organismos utilizados .....	21
7.2.1 Animales.....	21
7.2.2 Bacterias .....	22
7.3 Cultivo y obtención de las cepas H37Rv, BCG, mutantes 1, 2 y 3 de <i>M. tuberculosis</i> y mutante 4 de <i>M. smegmatis</i> .....	24
7.4 Obtención de las proteínas filtradas del cultivo.....	26
7.5 Inactivación de micobacterias .....	26
7.6 Adsorción de micobacterias en membrana de nitrocelulosa y obtención de micropartículas .....	26
7.7 Modelo experimental de generación de células gigantes multinucleadas en ratones .....	27
7.7.1 Sensibilización de los animales del grupo control 3 y de los grupos experimentales .....	27
7.7.2 Inoculación de las micobacterias .....	27
7.8 Eutanasia.....	28
7.9 Histología.....	28
7.10 Histopatología y evaluación de las células gigantes multinucleadas .....	29
7.10.1 Microscopía .....	29
8. Resultados.....	30
9. Discusión .....	37

10. Conclusiones .....	42
11. Perspectivas.....	42
12. Bibliografía .....	43

## 1. Abreviaturas

**Ag:** Antígeno

**Ag85:** Complejo antigénico 85

**BCG:** Bacilo de Calmette-Guérin

**CFP:** Proteínas filtradas del cultivo

**CGMs:** Células gigantes multinucleadas

**HE:** Hematoxilina-Eosina

**IFN- $\gamma$ :** Interferon gamma

**IL:** Interleucina

**K.O:** knock out

**LAM:** Lipoarabinomanana

**ManLAM:** Lipoarabinomanana con residuos de manosa

**GM-CSF:** Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos

**NK:** Natural killer

**NOS:** Oxido nítrico sintasa

**PBS:** Solución amortiguadora de fosfatos

**PBMC:** Células mononucleares de sangre periférica

**PI:** Fosfatidil inositol

**RM:** Receptor de manosa

**SDS:** Dodecil sulfato de sodio

**Sig E:** Factor de transcripción sigma E

**TB:** Tuberculosis

**TGF- $\beta$ :** Factor de crecimiento transformante beta

**TNF- $\alpha$ :** Factor de necrosis tumoral alfa

## 2. Resumen

El genero *Mycobacterium* engloba a un grupo muy diverso de bacterias que van desde especies no patógenas, hasta los agentes causales de distintas enfermedades de importancia médica, como lo son la lepra, la ulcera buruli y la tuberculosis (TB).

La TB es una enfermedad causada por el bacilo de *Mycobacterium tuberculosis*, se estima que aproximadamente un tercio de la población mundial está infectada, por lo que diversos estudios se han enfocado en la búsqueda de una vacuna que provea de una protección mayor que la actual vacuna BCG de *Mycobacterium bovis*. En este respecto se han diseñado vacunas de, ADN, de subunidades, y de cepas atenuadas en las que se han evaluado diversas cepas mutantes de micobacterias como posibles vacunas contra la TB. Un rasgo distintivo de la TB es una inflamación crónica con presencia de granulomas y células gigantes multinucleadas (CGMs) en los tejidos infectados del hospedero. En el presente trabajo se evaluó la capacidad de generación de granulomas y de CGMs en un modelo murino, a causa de 2 cepas de referencia y 4 cepas mutantes de micobacteria muertas, las cuales fueron inoculadas en los cojinetes plantares de ratones BALB/c.

Se analizó la inflamación y la histopatología en el sitio de inoculación a los veintiún días postinoculación. Los resultados mostraron tres cepas capaces de generar una respuesta granulomatosa con CGMs. La cepa H37Rv de *M. tuberculosis*, BCG de *M. bovis* y la mutante 4 que pertenece a *M. smegmatis* generaron una respuesta inflamatoria granulomatosa con CGMs. La diferencia en las áreas de los granulomas entre las cepas no alcanzó una significancia estadística. En el caso de las mutantes que no generaron granulomas ni CGMs, se sabe que carecen de ciertas moléculas de la envoltura celular que se relacionan con la modulación del sistema inmune del hospedero.

Palabras clave: Células gigantes multinucleadas, Granulomas, *Mycobacterium tuberculosis*, micobacterias mutantes.

### 3. Introducción

Las enfermedades ocasionadas por micobacterias son de gran relevancia en la patología infecciosa humana, incluyendo la lepra y la TB (Schlossberg, 1999, OMS 2012).

En el caso de la TB, es una enfermedad infecciosa crónica, causada por *M. tuberculosis*, la cual produce en el hospedero una respuesta inflamatoria característica de tipo granulomatosa con presencia de CGMs (Flynn, y, Chan, 2001, Hernández *et al.*, 2004).

El granuloma se define como una reacción inflamatoria local, crónica predominantemente mononuclear, provocada por irritantes poco biodegradables (Hernández *et al.*, 2000). En el caso de la TB el granuloma se forma en respuesta a los antígenos micobacterianos, que activan linfocitos T, induciendo su división y maduración para producir células T colaboradoras que secretan citocinas, como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) y el interferon gamma (IFN- $\gamma$ ), que son responsables del reclutamiento de células inflamatorias como macrófagos, neutrófilos, células asesinas naturales (NK) y más linfocitos T al sitio de infección. De esta forma se activa la respuesta celular, llevando a la formación del granuloma. (González *et al.*, 2002).

Existen otros procesos de generación de granulomas que frecuentemente implican una reacción frente a algunos tipos de materiales persistentes, como material de sutura, talco y sílice entre otros, o bien frente a infecciones las cuales involucran a algunos hongos. Además de que se ha reportado la participación de micobacterias en la formación este tipo de inflamación. (Stevens *et al.*, 2003, Aguilar *et al.*, 2006). De este modo y de acuerdo con la naturaleza de los agentes causales, los granulomas se dividen en dos tipos: granulomas inmunes y granulomas no inmunes (Hernández *et al.*, 2000, Lattante 2012).

### 3.1 Granulomas inmunes

Se desarrollan en respuesta a agentes infecciosos de vida intracelular, y en algunas respuestas autoinmunes. Se producen como consecuencia del desarrollo de una respuesta inmune adaptativa, en la que participa la inmunidad celular con activación de linfocitos TCD4<sup>+</sup> Th1 (hipersensibilidad retardada o tipo IV).

Algunos agentes etiológicos que pueden producir granulomas inmunes son: las micobacterias, clamidias, *Salmonella typhi*, *Yersinia enterocolítica*, *Pasteurella tularensis*, *Bartonella*, brucelosis, micosis profundas (histoplasmosis, paracoccidioidomicosis), algunos parásitos tales como esquistosoma, toxoplasma y toxocara, así como también frente a algunas respuestas autoinmunes (Lattante 2012).

La reacción granulomatosa en la TB es uno de los ejemplos más representativos de este tipo de trastornos inmunes (Hernández *et al.*, 2004). Así mismo se sabe que dentro de estos granulomas diversas citocinas son expresadas, y su expresión está relacionada con el tiempo transcurrido postinfección. Por ejemplo, el IFN- $\gamma$  y el TNF- $\alpha$  son expresados en los primeros días posteriores a la infección, y están implicados en la migración celular, y en la formación de granulomas (Mustafa *et al.*, 2007, Hernández *et al.*, 2000). Por su lado la IL-10 y el factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) son expresados en estadios tardíos (del día 45 al 65), y están asociados con la supresión de la respuesta inflamatoria antimicobacteriana, por lo que evitan una respuesta inmune excesiva limitando la destrucción del tejido (Mustafa *et al.*, 2007).

A pesar de que la función de los granulomas no está totalmente aclarada, se considera que son un intento de contención en un área localizada, y de esta manera evitar que los bacilos se diseminen a los tejidos que los rodean y a otros órganos (Hernández *et al.*, 2004). No obstante en algunos modelos animales se ha observado que los granulomas contribuyen al crecimiento temprano de las bacterias (Davis, Ramakrishnan, 2009).

Finalmente, de acuerdo a la organización de los granulomas, se han identificado dos tipos. El granuloma tipo tuberculoide, el cual está organizado en lesiones nodulares de células epitelioides y CGMs en el centro de la lesión, rodeadas por

tejido conectivo fibroso. Los agregados de linfocitos están presentes alrededor de la vasculatura y a lo largo de la periferia del granuloma. En estos casos generalmente el número de bacilos es bajo. En contraste el granuloma tipo lepromatoso tiene una organización laxa con un gran número de macrófagos rodeados de bacilos entremezclados con infiltraciones desorganizadas de linfocitos (Lei *et al.*, 2008). De este modo la morfología de los granulomas es importante ya que, el tipo tuberculoide puede estar asociado con el control de la replicación del patógeno, mientras que el tipo lepromatoso está asociado con una extensiva proliferación del patógeno y una progresión de la enfermedad (Lei *et al.*, 2008).

### **3.2 Granulomas no inmunes**

Los granulomas no inmunes o por cuerpo extraño, son provocados en respuesta a algún material poco o no biodegradable (Hernández *et al.*, 2000), en donde se tiende a delimitar el cuerpo extraño y, si es posible, eliminarlo. Particularmente en este caso los mecanismos de la inflamación son menos claros que en los granulomas inmunes, sin embargo ciertos materiales, como la sílice pueden activar indirectamente a los macrófagos para liberar mediadores capaces de inducir una reacción inflamatoria y fibrosis (Stevens *et al.*, 2003). Un ejemplo de inflamación granulomatosa no inmune o de reacción a cuerpo extraño, es la respuesta al material de sutura, en donde se observa un acumulo más o menos denso de histiocitos y de CGMs que se disponen en la periferia del cuerpo extraño y éste o parte del mismo puede observarse como restos fagocitados en el interior de los citoplasmas de las células (Fig. 2) (Stevens *et al.*, 2003).

En algunas enfermedades como la enfermedad de Crohn y la sarcoidosis, aparecen lesiones granulomatosas de etiología desconocida, por lo que no puede diferenciarse si el mecanismo es de tipo inmune o no inmune (Stevens *et al.*, 2003). Se ha reportado que las poblaciones celulares de los granulomas difieren con respecto a varios parámetros, como el agente causal, el material, y más recientemente es de tomar en consideración el tiempo de la lesión granulomatosa y algunos factores metabólicos (Hernández *et al.*, 2000, Lezama, 2006).

### 3.3 Células gigantes multinucleadas

En la dinámica de la inflamación granulomatosa los macrófagos pueden diferenciarse a células epitelioides o a CGMs de Langhans, estas últimas se definen morfológicamente como células que contienen varios núcleos, y abundante citoplasma, y que parecen ser el resultado de la fusión y división de componentes del linaje mielomonocítico, lo que puede iniciar cuando estas células son sobre estimuladas, o bien cuando ocurre un proceso de diferenciación terminal (Hernández *et al.*, 2000). Existen dos teorías que tratan de explicar su origen. La primera establece que son producto de la fusión celular de monocitos y/o macrófagos, lo cual representa un sincicio. Dicha fusión puede ser mediada por diferentes mecanismos, particularmente citocinas como el interferón gamma (IFN- $\gamma$ ), interleucinas (IL) 1, 3, 4, 6 y 13; el factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), y tocoferol- $\alpha$ . Asimismo en este proceso, participan otros factores como calcio, integrinas y, factores de señalización (Hernández *et al.*, 2000, McNally, Anderson, 2011). A través de la fusión los macrófagos parecen potenciar su capacidad fagocítica y de producción de citocinas que mantienen respuestas inflamatorias por periodos prolongados (Abbas *et al.*, 2008).

La segunda teoría de formación de CGMs, establece que resultan de la división sucesiva de núcleos sin división del citoplasma. Si bien aún no está completamente aclarada la formación de estas células, se supone que son producto de la fusión de muchas células de tipo histiocitaria, más que la división de núcleos sin la separación de citoplasma.

La identificación histológica de las CGMs se realiza en base a las características físicas, y usualmente no es necesario utilizar marcadores de superficie, no obstante algunos autores reportan una tinción positiva con anticuerpos anti-CD68. CD68 es una glucoproteína que en realidad se encuentra presente en el linaje mielomonocítico, especialmente en macrófagos (Dittmar, Zanker., 2011), y desde luego si las CGMs derivan de esta población celular no es raro encontrar dichos resultados.

En relación a los granulomas, los dos tipos de CGMs más frecuentemente encontradas dentro de los granulomas inmunes y no inmunes son las CGMs de Langhans y las CGMs de reacción a cuerpo extraño respectivamente (Stevens *et al.*, 2003).

Las GCMs de Langhans son encontradas en los granulomas inmunes, y en ellas los núcleos se disponen en la periferia de un polo y en forma de herradura (Fig. 1 izquierda y Fig. 2A), los núcleos son pequeños, de cromatina homogénea, citoplasma homogéneo, eosinófilo y pálido (Stevens *et al.*, 2003).

En las CGMs de reacción a cuerpo extraño los núcleos se disponen irregularmente, suelen ser vesiculosos y presentar un nucléolo notorio, el citoplasma con frecuencia es ligeramente basófilo. Estas células suelen verse en relación con partículas extrañas y signos evidentes de fagocitosis (Fig. 1 derecha y Fig. 2B). (Inflamación granulomatosa, PUC, 2011).

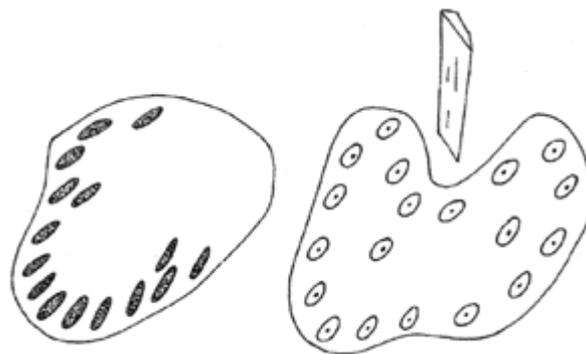


Fig. 1 Célula gigante multinucleada de Langhans (izquierda). Célula gigante multinucleada de reacción a cuerpo extraño (derecha). (Tomada de: Inflamación granulomatosa, PUC, 2011).

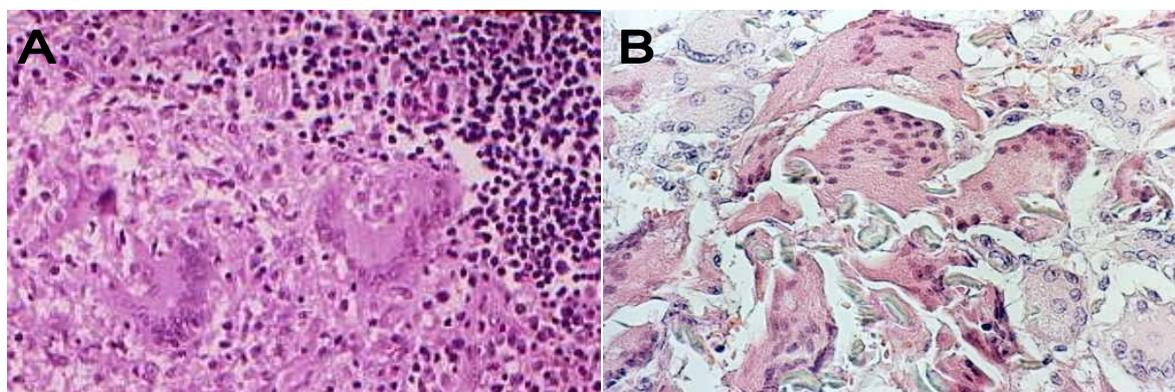


Fig. 2 Células gigantes multinucleadas de Langhans en tuberculosis renal humana (A). Células gigantes multinucleadas de reacción a cuerpo extraño por material de sutura (B). (Tomada de: Departamento de medicina familiar UNAM, y Departamento de Patología UFRO respectivamente sf.).

Se ha sugerido que en la TB, las células epitelioides y las CGMs de Langhans tienen funciones diferentes, de esta forma las células epitelioides parecen tener funciones microbicidas más eficaces, por presentar menor carga antigénica cuando están infectados, sin embargo cuando maduran a CGMs la expresión de TGF- $\beta$  aumenta lo cual puede llevar a una capacidad antimicrobiana reducida, lo anterior

se atribuye a la interacción entre el hospedero y *M. tuberculosis* el cual evade la muerte por apoptosis de las células del hospedero con el fin de conservar su nicho de vida (Mustafa *et al.*, 2007 y 2008, García, 2012).

### 3.4 Genero *Mycobacterium*

El género *Mycobacterium* comprende un grupo de microorganismos muy diverso, de amplia distribución en la naturaleza. Poseen una envoltura celular muy gruesa, e hidrofóbica, constituida por cápsula, pared celular y membrana plasmática, que expresan diversas moléculas, y, especialmente su membrana es muy rica en ácidos micólicos. Además las características estructurales de su envoltura les proporcionan resistencia a agentes microbicidas, fármacos y a la destrucción por calor (Gorocica *et al.*, 2005).

Las micobacterias tienen forma de bacilos o cocos, son aerobias, algunas son Gram-positivas mientras que otras son Gram-negativas (García 2012). Algunas formas de vida son patógenos intracelulares obligados tales como las causantes de tuberculosis y lepra, o de vida libre como las micobacterias no tuberculosas (MNT) o atípicas (Schlossberg 1999).

La clasificación de las micobacterias es:

Dominio: Bacteria  
Filo: Actinobacteria  
Orden: Actinomycetales  
Suborden: Corynebacterineae  
Familia: Mycobacteriaceae  
Género: ***Mycobacterium***

Debido a su diversidad las micobacterias han sido incluidas en varios complejos, los más importantes son el complejo de *M. tuberculosis* que consiste en cuatro especies, las cuales son capaces de causar tuberculosis en el hombre estas son: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum* y *M. necrotii* y, el complejo *M. leprae*. Las micobacterias distintas al complejo de *M. tuberculosis* y al complejo *M. leprae* no provocan infecciones contagiosas en el hombre, por lo cual se denominan

usualmente MNT, también llamadas atípicas, anónimas, no clasificadas, oportunistas o micobacterias distintas al complejo *M. tuberculosis*. Algunas de estas especies son potencialmente patógenas para el hombre, otras son saprofitas y en otras su papel patógeno en humanos no es muy claro (Schlossberg, 1999, González *et al.*, 2002).

Las MNT se encuentran ampliamente distribuidas en el suelo, agua, polvo, leche, excrementos de aves, animales domésticos, plantas, etc. Algunas especies pueden tener alta posibilidad de ser patógenas para el hombre (González *et al.*, 2002).

En este contexto cabe señalar que si bien hay diferencias entre especies y cepas, las micobacterias comparten algunos componentes estructurales. La mayor parte de estos componentes son de naturaleza sacarídica y son reconocidos por diversos receptores de macrófagos y otros tipos celulares, como los linfocitos T. Ciertos componentes estructurales de las micobacterias también son responsables de los mecanismos de evasión de la respuesta inmune del hospedero, pues son capaces de inhibir o interferir con los mecanismos microbicidas del macrófago infectado (Gorocica *et al.*, 2005).

Algunos de los componentes de virulencia en las micobacterias encontrados en su membrana, son las moléculas de lipoarabinomanana (LAM) que tienen un papel fundamental en la patogénesis de la tuberculosis. Así por ejemplo, la LAM con residuos de manosa (Man-LAM), está asociada a especies y cepas patógenas y a su sobrevida (Molina, 2010). Por otro lado, la LAM con una molécula de fosfatidil inositol (PI) y una arabinosa, (AraLAM o PIMLAM), está asociada principalmente a especies y cepas no patógenas, con crecimiento rápido en cultivo. Compuestos glicosilados que tienen un alto contenido de manosa, glucosa y galactosa, permiten una interacción con diversos receptores fagocíticos tipo lectina en el macrófago (Gorocica *et al.*, 2005, García., 2012).

El factor cuerda (trehalosa 6,6-dimicolato) se encuentra en la capa periférica de la envoltura. Es abundante en todas las micobacterias patógenas. Se le ha considerado inmunogénico. Además su naturaleza química favorece la inflamación crónica y ocasiona la formación de granulomas en el pulmón, asimismo se ha asociado a la inhibición de la fusión de los lisosomas con los fagosomas en los

macrófagos infectados, fenómeno que se considera clave para la supervivencia de *M. tuberculosis* en estas células (Gorocica *et al.*,2005).

El Ftiocerol dimicocerato (DIM). Es una molécula característica de las cepas patógenas y forma una barrera que impide la permeabilidad de la envoltura de las micobacterias (Gorocica *et al.*,2005).

En el marco de la protección frente a la TB y debido a la ineficacia de una protección completa por parte de la vacuna de bacilo Calmette-Guérin (BCG), diversas cepas mutantes de micobacterias, se han evaluado como candidatas a cepas vacunales que brinden una mayor protección frente a esta enfermedad, la mayoría de estas son micobacterias mutantes que carecen de genes relacionados con su virulencia y patogenicidad (Asociación Española de Vacunología 2007, Mendoza 2009). Además de los cambios en la virulencia de las micobacterias, las mutaciones en las cepas estudiadas dan lugar a una expresión diferente en sus componentes de superficie, modificando la activación celular al interactuar de manera distinta con monocitos y macrófagos.

## 4. Objetivos

4.1.1 Estudiar si distintas cepas de micobacteria muertas, de las especies *M. tuberculosis*, y *M. smegmatis* con diferentes mutaciones en componentes de virulencia y la cepa vacunal de *M. bovis*, BCG, inducen la formación de granulomas y de CGMs en los cojinetes plantares de ratones BALB/c.

4.1.2 Evaluar si existen diferencias morfológicas (tamaño) en los granulomas que se produzcan, al inocular vía subcutánea diferentes tipos de micobacterias en los cojinetes plantares de ratones BALB/c.

## 5. Hipótesis

Las micobacterias patógenas y no patógenas, así como algunas cepas que presentan una mutación en los genes relacionados con la virulencia tienen capacidad diferente para inducir la formación de granulomas y CGMs, ya que exponen diferentes componentes de superficie, por lo que su interacción con células inflamatorias es distinta. Por tanto, la reacción inflamatoria granulomatosa al usar un modelo experimental usando micobacterias mutantes estará relacionada directamente con la expresión de los genes mutados.

## 6. Justificación

Una vez que ocurre el contacto del hospedero con *M. tuberculosis* se establece una compleja interacción entre el hospedero y este microorganismo. La respuesta inmune y el desarrollo de un proceso inflamatorio una de cuyas características más relevantes es la formación de granulomas y CGMs, tienen como meta la compartimentalización del agente infeccioso. El avance en la caracterización de la habilidad de *M. tuberculosis* para causar enfermedad, y la posibilidad de generar distintas cepas mutantes que tienen diferente grado de patogenicidad, ha permitido conocer que su inmunogenicidad, y virulencia entre otros factores, tienen un papel relevante en el desarrollo de la infección.

Por otra parte, recientemente se han establecido modelos experimentales en murinos, que permiten evaluar los mecanismos de generación de la reacción granulomatosa, incluyendo las reacciones secundarias a *M. tuberculosis*.

Debido a que hay muy pocos estudios en los que se evalúen si distintas micobacterias tienen la capacidad de inducir el proceso inflamatorio como una reacción local, se decidió determinar si algunas cepas mutantes de micobacterias muertas, en las que disminuye la expresión de factores de virulencia favorecen la generación de granulomas y de CGMs en el cojinete plantar de ratones.

## 7. Material y métodos

### 7.1 Diseño experimental

Se tuvieron dos grupos de ratones BALB/c, uno control y el otro experimental. Dichos grupos fueron sacrificados a los 21 días posteriores a la inoculación. En la figura 3 se muestra el esquema del diseño experimental que constó de tres fases.

**A**



Fig. 3 Primera fase del diseño experimental (A). Obtención y tratamiento de las micobacterias.

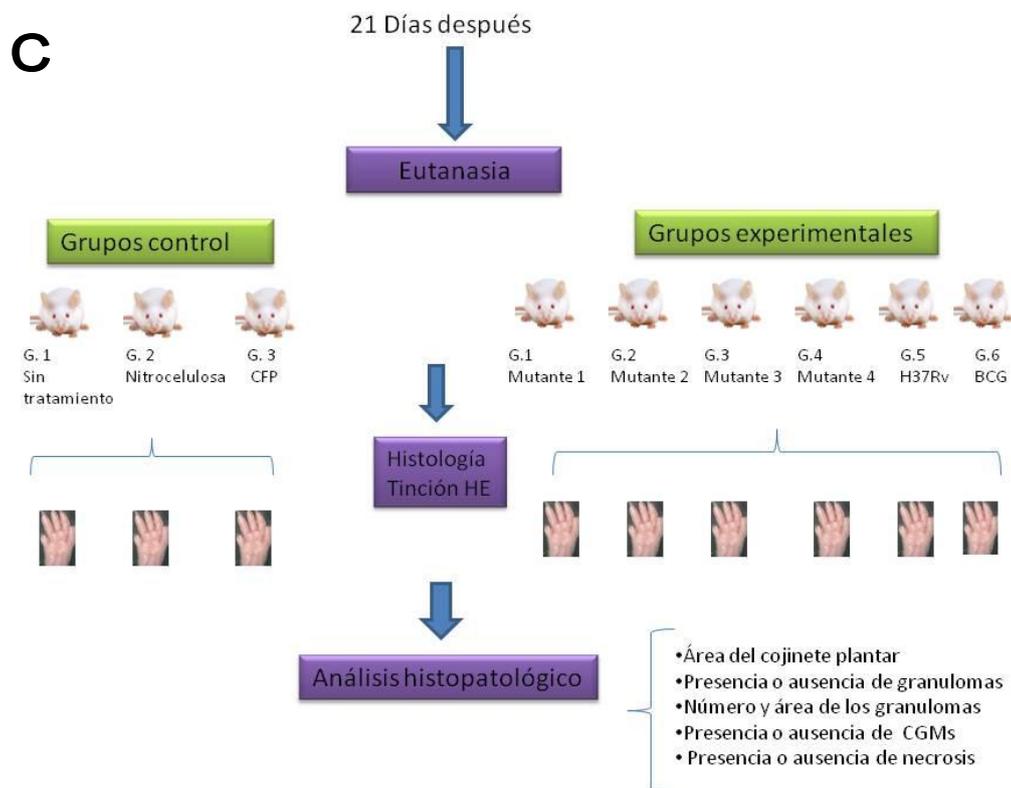
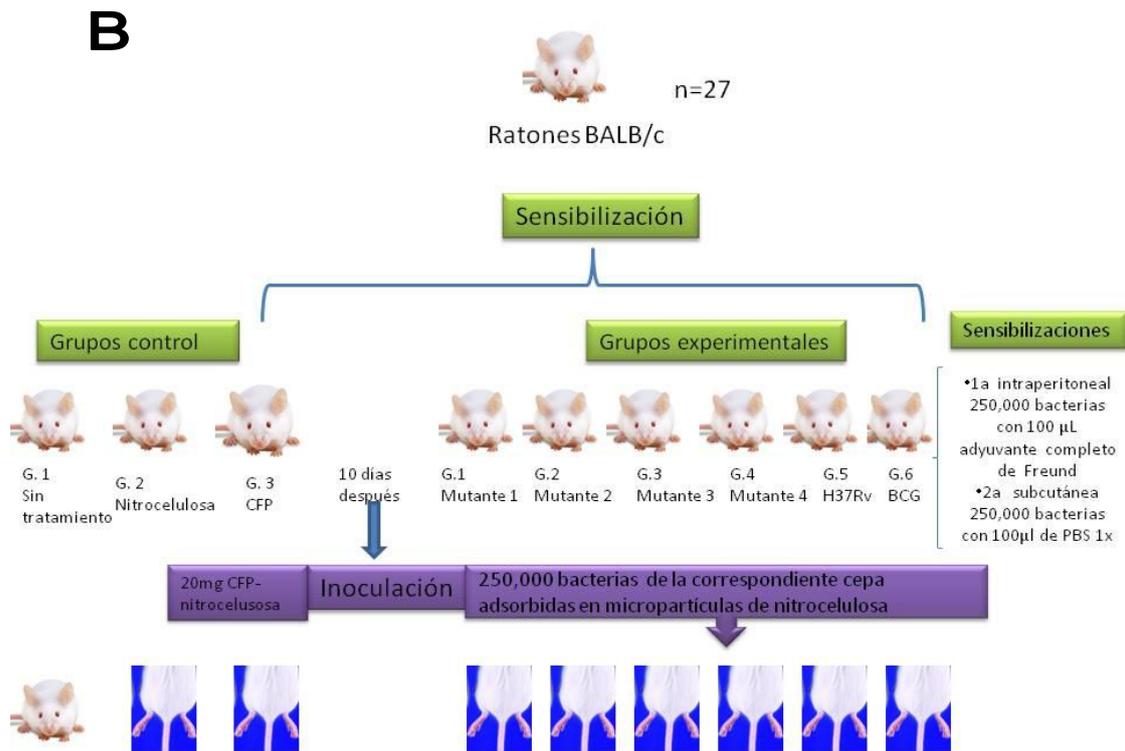


Fig. 3 Segunda fase sensibilizaciones, e inoculación de las micobacterias en los cojinetes plantares (B), y tercera fase del diseño experimental, obtención de los tejidos y análisis (C).

### 7.1.1 Grupos control

Se ocuparon tres grupos control de tres ratones cada uno, esto con el objeto de tener parámetros de referencia y comparación con los grupos experimentales de ratones.

- Al grupo control 1, no se le aplicó tratamiento alguno, se le tomó muestras de tejido del cojinete plantar para comparar las reacciones provocadas con los otros tratamientos, y fue sacrificado al mismo tiempo que todos los grupos de ratones.
- Al grupo control 2. Se le inoculó micropartículas de nitrocelulosa en los cojinetes plantares para evaluar la reacción inflamatoria.
- Al grupo control 3. Se le inoculó 20mg del filtrado de proteínas del cultivo (CFP) de la cepa H37Rv de *M. tuberculosis* adsorbido en partículas de nitrocelulosa. Este grupo sirvió como control positivo, pues se tiene reportado que genera granulomas y CGMs en el modelo murino (Hernández et al., 2000).

### 7.1.2 Grupos experimentales

Se trabajaron seis grupos experimentales de tres ratones cada uno. A cada grupo se le inoculó en el cojinete plantar de ambas patas traseras 250,000 micobacterias adsorbidas en partículas de nitrocelulosa.

- Grupo experimental 1. Se inocularon micobacterias de la cepa 1 de *M. tuberculosis*, la cual es mutante para el gen *pho*. Lo anterior para inducir la formación de granulomas y de CGMs y posteriormente se evaluó la histopatología de la inflamación.

- Grupo experimental 2. Se inocularon micobacterias de la cepa 2 de *M. tuberculosis*, la cual es mutante para el gen fadD26. Lo anterior para inducir la formación de granulomas y de CGMs y posteriormente se evaluó la histopatología de la inflamación.
- Grupo experimental 3. Se inocularon bacterias de la cepa 3 de *M. tuberculosis*, que carece de la expresión del factor de transcripción sigma E (sig E). Lo anterior para inducir la formación de granulomas y de CGMs y posteriormente se evaluó la histopatología de la inflamación.
- Grupo experimental 4. Se inocularon bacterias de la cepa mutante 4 de *M. smegmatis*. Esto para inducir la formación de granulomas y de CGMs, y posteriormente se evaluó la histopatología de la inflamación.
- Grupo experimental 5. Se inocularon bacterias de la cepa H37Rv de *M. tuberculosis*. Lo anterior para inducir la formación de granulomas y de CGMs, y posteriormente se evaluó la histopatología de la inflamación.
- Grupo experimental 6. Se inocularon bacterias de la cepa BCG de *M. bovis*. Lo anterior para inducir la formación de granulomas y de CGMs y posteriormente se evaluó la histopatología de la inflamación.

## **7.2 Características de los organismos utilizados**

### **7.2.1 Animales**

Se utilizaron 27 ratones *Mus. musculus* cepa BALB/c de seis semanas de edad con peso aproximado de 20g, divididos en nueve grupos que se mantuvieron en condiciones convencionales de bioterio y alimentación *ad libitum* del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas (INER), de acuerdo a los lineamientos para el uso de animales de laboratorio de la Ley general de Salud de México y la Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio para el Distrito Federal.

### **7.2.2 Bacterias**

En este estudio se trabajó con cepas de micobacterias de *M.tuberculosis*, *M. smegmatis* y de *M. bovis*, las cuales fueron cultivadas, cosechadas y muertas bajo condiciones de bioseguridad IIb en el laboratorio de patología experimental del Instituto Nacional de Nutrición y Ciencias Medicas Salvador Zubirán (INNSZ). Una vez muertas las micobacterias fueron congeladas y llevadas al laboratorio de autoinmunidad del INER, lugar donde se trabajaron.

A continuación se describen las principales características de las cepas de las micobacterias utilizadas en este trabajo:

#### **Mutante 1**

Es una cepa mutante de *M. tuberculosis* la cual se construyó por una disrupción en el gen RvO757 (phoP), gen que está involucrado en la regulación de un complejo de lípidos micobacterianos implicados en la virulencia de *M. tuberculosis*, entre ellos lípidos complejos, que serían la base de su gran atenuación. Además la alteración del gen phoP acarrea una disminución de lipoarabinomananas manosiladas que juegan un papel clave en la sobrevivencia de las micobacterias dentro de los macrófagos (Molina, 2010).

Recientemente se ha mostrado que esta cepa esta mas atenuada que *M. bovis* BCG y que confiere una inmunidad de protección equivalente frente a *M. tuberculosis* (Aguilar *et al.*, 2007, Hernández *et al.*, 2010).

#### **Mutante 2**

La cepa mutante 2 proviene de la cepa parental MT103, el cual es un aislamiento clínico de *M. tuberculosis*, sin embargo esta cepa tiene inactivado el gen Rv2930 (fadD26) (Martín *et al.*, 2007, Molina 2010). El gen Rv2930 está involucrado en la biosíntesis de DIM, molécula característica de las cepas patógenas y forma una barrera que impide la permeabilidad de la envoltura de las micobacterias (Gorocica *et al.*, 2005). De este modo en esta cepa se manifiestan anomalías en la síntesis de la acil-CoA sintetasa, ftiocerol y fenol-ftiocerol, moléculas importantes para la sobrevivencia de la micobacteria dentro del macrófago (Molina, 2010).

### **Mutante 3**

Es una cepa mutante de la especie *M. tuberculosis*, que carece de la expresión del factor de transcripción sigma E (sigE) el cual está involucrado en inducir la expresión de varios genes en condiciones de estrés ambiental en procariontes, por ejemplo, frente a dodecil sulfato de sodio (SDS), polimixina, vancomicina, y choque térmico, así como en la biosíntesis de ácido micólico y en la degradación de ácidos grasos, por lo que es responsable del control de la estabilidad de la superficie y su composición seguida de condiciones ambientales desfavorables (Hernández *et al.*, 2010). Así mismo se ha mostrado que sigE está profundamente involucrado en la virulencia, y que los genes que regula tienen que ver con la modulación de la respuesta inmune del hospedero (Hernández *et al.*, 2010).

### **Mutante 4**

Es una cepa mutante de la especie no patógena *M. smegmatis*. No se le ha relacionado con alguna infección en particular pero es capaz causar ligeras lesiones en tejido, así como enfermedad en animales inmunosuprimidos (González *et al.*, 2002). Las mutaciones de esta cepa le confieren un fenotipo eficiente a la transformación por plásmidos (Ept) (Snapper *et al.*, 1990), y se ha reportado que carece de glucolípidos polares especialmente lipooligosacaridos. Además de que difiere de su cepa parental en la distribución de varios tipos de glucolípidos y fosfolípidos entre las capas externas y internas de su envoltura celular (Etienne *et al.*, 2005).

### **H37Rv**

Es una cepa virulenta de la especie *M. tuberculosis*, que presenta en su membrana celular ManLAM, utiliza el receptor de manosa (RM) junto con los receptores de complemento CR1, CR3 y CR4 para internalizarse en el macrófago a diferencia de las cepas no virulentas como la H37Ra que presentan AraLAM, y usan solamente el RM. El uso simultáneo de ambos receptores confiere ventajas a la bacteria, pues no se activa la enzima NADPH oxidasa por lo que no se produce el estallido respiratorio. Además, la entrada de la micobacteria evita que se activen las señales que dan origen a la maduración fagosoma. Esto es una estrategia que permite al microorganismo vivir en el interior del macrófago (Gorocica *et al.*, 2005).

Presenta diversas moléculas que le confieren virulencia e inmunogenicidad, como las proteínas OmpA, HBHA, MTP40, el complejo antigénico 85 (Ag85), el factor cuerda y compuestos de ácido micólico, estos últimos se han relacionado con la presencia de macrófagos espumosos durante la infección con TB (Gorocica *et al.*, 2005).

## **BCG**

Es una cepa atenuada derivada de *M. bovis*, denominada bacilo de Calmette-Guérin (BCG). Es la actual vacuna en uso contra la TB, que tras subcultivarse en el laboratorio perdió su virulencia y hoy se sabe que tiene más de cien genes deletados. Uno de ellos es el gen estructural ESAT-6, por lo que los animales vacunados con esta cepa secretan una cantidad insignificante de IFN- $\gamma$  después de la estimulación con este antígeno (Hernández *et al.*, 2010).

### **7.3 Cultivo y obtención de las cepas H37Rv, BCG, mutantes 1, 2 y 3 de *M. tuberculosis* y mutante 4 de *M. smegmatis***

Las cepas de micobacterias fueron cultivadas en medio Middlebrook 7h9 Broth (BD USA, DIFCO), el cual fue preparado usando 4.7g de polvo del preparado comercial en 900mL de agua destilada, adicionando a continuación 5mL de glicerol. En seguida, se esterilizó en la autoclave a 121°C por 15 minutos, y se dejó enfriar en baño maría a 40°C.

En una campana de bioseguridad nivel IIb limpia y esterilizada mediante radiación de luz U.V, por diez minutos; se procedió a adicionar 100mL del medio de enriquecimiento ADC (glucosa, albúmina, y catalasa, Middelbrook, BD), por cada 900mL de medio. Se homogenizó y vertió en botellas de cultivo 75 cm<sup>2</sup> de poliestireno con cuello angulado y tapa con filtro (T275, Corning, 75cm<sup>2</sup>). Estas botellas se colocaron en la incubadora con 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C por tres días para realizar la prueba de esterilidad. Después de que se constató lo anterior, y bajo condiciones de bioseguridad, se tomaron con un asa bacteriológica 20 $\mu$ L del crecimiento micobacteriano a partir de su fuente original (medio Lowestein-Jensen) y se colocaron en botellas con el medio Middlebrook 7h9 Broth. Posteriormente estas botellas se trasladaron a una incubadora de CO<sub>2</sub>.

Transcurridos 2 meses cada una de las cepas de micobacterias fue cosechada, y colectada en un tubo cónico de 50 mL (Falcon, BD) estéril. A continuación, cada preparado fue centrifugado a 2000 rpm por 10 minutos, y después de desechar el sobrenadante se resuspendió el botón bacteriano en 5mL de PBS (solución amortiguadora de fosfatos) conteniendo Tween 80 al 0.05%. Se le adicionaron 5mL de perlas de vidrio estériles de 3mm de diámetro y se agitó en el vortex de la siguiente manera: un minuto de agitación y un minuto de descanso (diez veces), posteriormente se centrifugo a 2500 rpm y después se agitó de la manera antes descrita pero esta vez quince veces, centrifugando finalmente a 1500 rpm por 10 minutos. Se recuperó el sobrenadante en un tubo nuevo y se lavo tres veces con PBS 1X.

La cuenta bacteriana se realizó utilizando diacetato de floresceina (DAF, Sigma Co. USA). Para esto, se preparó una solución concentrada, disolviendo 5mg de DAF en 1mL de acetona fría a -20°C. De esta manera se preparó la solución de trabajo tomando 12.5µL de la solución concentrada y diluyendo en 1mL de PBS. Con esta solución se realizó una dilución 1:100 con la bacteria (1µL de muestra H37Rv, 49µL de la solución de trabajo y 50µL de PBS) y éste preparado se incubó durante 20 min. protegido de la luz. Pasado este tiempo, se colocó la muestra en una cámara de Newbauer, y se realizó la cuenta en un microscopio de fluorescencia. Se consideraron bacterias vivas a aquellas que presentaron fluorescencia positiva. Para obtener el número total de bacterias se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Número de bacterias/mL} = (\text{Número de bacterias contadas} / \text{Número de cuadrantes contados}) \times \text{dilución} \times 10^4$$

Las bacterias se ajustaron a una concentración de 1,000,000 micobacterias en 1000 µL de PBS 1x en criotubos, y con este volumen se prepararon los stocks correspondientes.

## **7.4 Obtención de las proteínas filtradas del cultivo**

Para el tratamiento del grupo control 3 se utilizaron las proteínas filtradas del cultivo (CFP). Las CFP se obtuvieron de la siguiente manera. Después de 5-6 semanas de cultivo de la cepa H37Rv, el medio de cultivo fue filtrado para eliminar a los bacilos, y las proteínas filtradas del cultivo fueron precipitadas con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Posteriormente se agregó fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) (Sigma Chemical Co) como inhibidor enzimático, antes de dializar este filtrado.

## **7.5 Inactivación de micobacterias**

Las micobacterias fueron inactivadas usando el método de choque térmico, el cual consistió en sumergir un vial con 1,000,000 de micobacterias, 5 minutos en nitrógeno líquido y posteriormente 5 minutos en baño maría (37°C), proceso que se realizó 10 veces durante cuatro días, al término del proceso de inactivación se hizo una prueba de viabilidad cultivando una alícuota de cada cepa para asegurarse de que ya no se contaba con bacterias vivas. En cada cultivo no hubo crecimiento.

## **7.6 Adsorción de micobacterias en membrana de nitrocelulosa y obtención de micropartículas**

Se ocuparon macropartículas de nitrocelulosa como un vehículo de las micobacterias. De esta forma las micobacterias fueron adsorbidas de la siguiente manera. En un vial de 1000 $\mu\text{L}$  se introdujo un fragmento de 5 mm de membrana de nitrocelulosa y se le adicionaron 250,000 micobacterias totales suspendidas en PBS 1x, lo cual fue incubado con agitación constante por 24 h. Posteriormente se sustrajeron los fragmentos de nitrocelulosa del vial y se dejaron secar por dos días. Este proceso que se realizó con cada cepa incluida en este trabajo.

Una vez que se obtuvo la micobacteria adsorbida, la nitrocelulosa fue convertida a micropartículas usando un mortero de porcelana en el cual se colocó cada uno de los fragmentos de 5 mm de la membrana y fue cubierto con nitrógeno líquido, una vez que el nitrógeno líquido se evaporó, se procedió a macerar el preparado hasta triturarlo en micropartículas. Este procedimiento también se aplicó con el CFP.

## **7.7 Modelo experimental de generación de células gigantes multinucleadas en ratones**

Se siguió el método con algunas modificaciones, originalmente descrito por Hernández-Pando y colaboradores (2000), para la inducción de granulomas y de CGMs en un modelo experimental murino. El modelo consiste en inocular micobacterias adsorbidas en micropartículas de nitrocelulosa en los cojinetes plantares de ratones previamente sensibilizados con la micobacteria.

### **7.7.1 Sensibilización de los animales del grupo control 3 y de los grupos experimentales**

Se obtuvieron ratones machos BALB/c de 6 semanas de edad, y se formaron grupos de 3 animales, los cuales fueron sensibilizados con las cepas de micobacteria correspondientes. Todos los experimentos en esta fase se realizaron con material, reactivos, y condiciones libre de pirógenos endógenos.

En la primera sensibilización se usaron 250,000 micobacterias muertas y 100µl de adyuvante completo de Freund, y se inocularon vía intraperitoneal. Siete días después, se aplicó la segunda sensibilización vía subcutánea (en el lomo) con 125,000 micobacterias muertas suspendidas 100µl de PBS 1x.

### **7.7.2 Inoculación de las micobacterias**

#### Grupos control

Como controles se inocularon a tres grupos de tres de ratones no sensibilizados con la misma cantidad de nitrocelulosa sin ningún tipo de componente inmovilizado.

- Grupo control 1, grupo sin tratamiento
- Al grupo control 2 se le inoculó micropartículas de nitrocelulosa.
- Al grupo control 3 se le inoculó 20mg CFP adsorbido en micropartículas de nitrocelulosa.

## Grupos experimentales

Diez días después de la segunda sensibilización, se inocularon en los cojinetes plantares posteriores de los ratones de cada grupo experimental 250,000 micobacterias adsorbidas en las micropartículas de nitrocelulosa y suspendidas en 40µL de PBS 1x libre de pirógenos.

- Al grupo 1 de ratones se le inoculó la cepa mutante 1 de *M. tuberculosis*
- Al grupo 2 de ratones se le inoculó la cepa mutante 2 de *M. tuberculosis*
- Al grupo 3 de ratones se le inoculó la cepa mutante 3 de *M. tuberculosis*
- Al grupo 4 de ratones se le inoculó la cepa mutante 4 de *M. smegmatis*
- Al grupo 5 de ratones se le inoculó la cepa H37Rv de *M. tuberculosis*
- Al grupo 6 de ratones se le inoculó la cepa BCG de *M. bovis*

## **7.8 Eutanasia**

Veintiún días después de la inoculación de las micropartículas en los cojinetes plantares posteriores, los ratones fueron eutanasiados por una sobredosis de pentobarbital sodico. Se conservaron las patas posteriores, con el fin de facilitar el manejo de los cojinetes plantares en la técnica histológica.

## **7.9 Histología**

Para fijar el tejido se sumergió en etanol absoluto durante un día y, posteriormente se descalcificaron los huesos para facilitar el proceso de cortes histológicos. Las patas fueron sumergidas en una dilución de ácido nítrico (HNO<sub>3</sub>) al 10% durante tres horas, y a continuación se enjuagaron con abundante agua durante 15 minutos por cuatro veces.

La deshidratación de los tejidos, consistió en sumergir el tejido durante una hora en etanol al 70% y una hora en etanol al 90%. Para aclarar el tejido se sumergió en xileno por dos horas. Para la inclusión se colocaron los tejidos en parafina líquida a 60°C durante dos horas. Finalmente se obtuvo el bloque de la siguiente manera, se

incluyeron los tejidos incluidos en parafina y una vez solidificada se retiró de los moldes de inclusión obteniéndose de este modo el tejido en el bloque. A los cojinetes plantares se les realizaron cortes dobles de 3µm con un microtomo, los cuales fueron montados en laminillas para procesarlos y, teñirlos con la técnica de hematoxilina-eosina (HE).

## **7.10 Histopatología y evaluación de las células gigantes multinucleadas**

### **7.10.1 Microscopía**

Los cortes histológicos de los cojinetes plantares teñidos con HE se observaron en un microscopio óptico BX41 Olympus®, y se determinó la presencia de granulomas y CGMs en los cojinetes plantares correspondientes a cada cepa de micobacteria. Para obtener resultados que permitieran realizar una comparación apropiada entre los grupos de estudio, se siguió la siguiente estrategia:

Se identificó la presencia de granulomas en al menos 4 laminillas de cortes con el mismo tratamiento obtenidos asegurándose de tener porciones del tejido representativo (i.e del tamaño del cojinete plantar). Esto se realizó en toda la extensión de cada laminilla por dos observadores independientes con un aumento de 4X.

Para estudiar el granuloma se usó, el analizador de imágenes Image Pro Express 6.3 (Media Cybernetics, USA) acoplado a un microscopio BX41 Olympus® a un aumento de 4X.

Una vez encontrado un granuloma definido como un proceso inflamatorio crónico constituido por células epitelioides, y que puede acompañarse por CGMs. Se midieron tanto el tamaño del tejido (área del cojinete plantar), como el número de granulomas y el tamaño de estos, lo anterior se realizó a un aumento de 4X, y mayor (20X) para registrar si se observaron CGMs, las cuales fueron definidas como células constituidas por histiocitos que por fusión o división, contienen varios núcleos, y que tienen abundante citoplasma. Esto en base a que la literatura internacional acepta que su identificación histológica se realiza en base a las características morfológicas descritas: abundante citoplasma, y varios núcleos dispuestos en forma de herradura. Además de que el trabajo original del modelo de

generación de CGMs no fue necesario utilizar marcadores de superficie para tener la certeza de que se trataba de esta población celular (Hernández *et. al* 2000). Algunos reportes señalan que los anticuerpos anti-CD68 pueden ser útiles para identificar a las CGMs, en realidad este marcador se encuentra presente las estirpes mielomonocíticas, particularmente en macrófagos (Dittmar, Zenker 2011), y no se consideró de mayor relevancia realizar esta tinción.

Lo anterior permitió analizar las siguientes variables: área del cojinete plantar, número de granulomas en cada tejido, tamaño de los granulomas ( $\mu\text{m}^2$ ), y presencia o ausencia de CGMs así como de necrosis.

## 8. Resultados

Los animales utilizados en este trabajo sobrevivieron a los 21 días posteriores a la inoculación, día en el cual fueron eutanasiados.

Se hizo el análisis histopatológico a los cojinetes plantares de los grupos, y al obtener los datos microscópicos se evaluaron las alteraciones cualitativas (si generaron o no granulomas), así como los cambios cuantitativos (número y tamaño de los granulomas) que permitieron discriminar si cada tipo de micobacteria tuvo una influencia directa en la formación de granulomas y CGMs. Además, debido que en el grupo control 3 y en los grupos experimentales, se trabajó con micobacterias adsorbidas en micropartículas de nitrocelulosa, se comparó el efecto en términos de la posible reactividad inflamatoria que generara la aplicación de los fragmentos de este componente inerte en el tejido estudiado. A continuación se muestran los resultados que distinguieron a cada cepa de micobacteria.

Al día 21 las cepas BCG, H37Rv y la mutante 4 de *M. smegmatis* mostraron la capacidad para inducir una inflamación granulomatosa con CGMs, mientras que las mutantes 1, 2 y 3 no fueron capaces de provocar este tipo de inflamación. Sin embargo cada una de ellas cuales mostró una histopatología distinta.

La cepa 1 de *M. tuberculosis* no mostró capacidad de inducir un proceso inflamatorio con presencia de granulomas y CGMs. A pesar de realizar cortes seriados de 3  $\mu\text{m}$  y usar prácticamente todos los bloques de tejido en el que se inoculó esta

micobacteria, no se observó alguna infiltración celular ni se apreció proceso inflamatorio alguno alrededor de las partículas de nitrocelulosa en las cuales se inmovilizó esta cepa mutante (Fig. 7). Cabe señalar que dicha mutante carece del gen RvO757 (phoP) el cual está involucrado en la regulación de lípidos micobacterianos implicados en la virulencia, y que son reconocidos en la generación de daño tisular en infecciones por *M. tuberculosis*.

En contraste las mutantes 2 y 3 de *M. tuberculosis*, indujeron un infiltrado inflamatorio pero no formaron granulomas ni CGMs (Figs. 8 y 9). En estos casos se nota que el proceso inflamatorio es mayor en la cepa 3 que en la cepa 2 (Fig. 8)

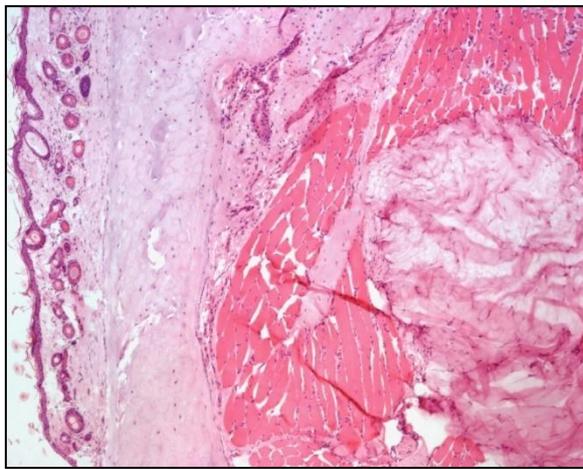


Fig. 4. Control 1. Cojinete plantar. 8X

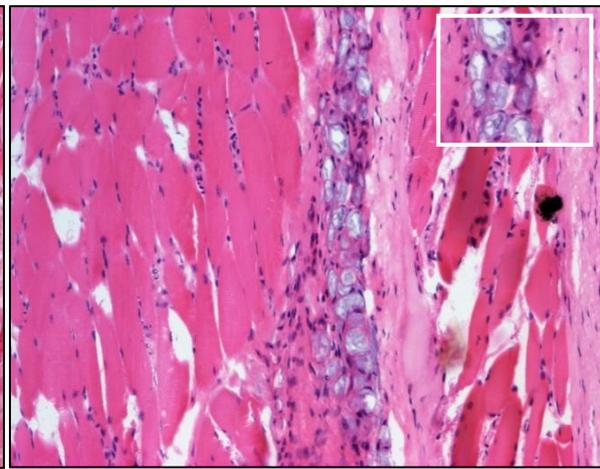


Fig. 5. Control 2. Cojinete plantar 20X. Se observan las partículas de nitrocelulosa (acercamiento).

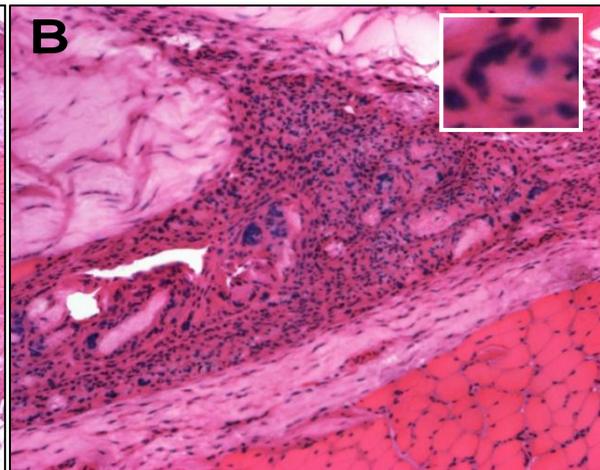
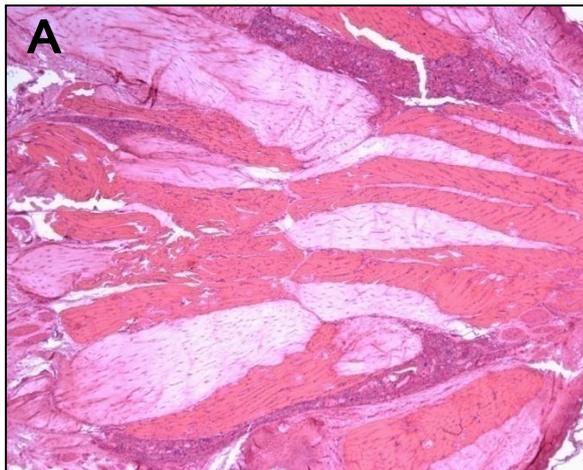


Fig. 6. Control 3. Cojinete plantar. Granulomas inducidos por el CFP de *M.tuberculosis* 4X (A). Granuloma por CFP y CGMs (acercamiento) 20X (B).

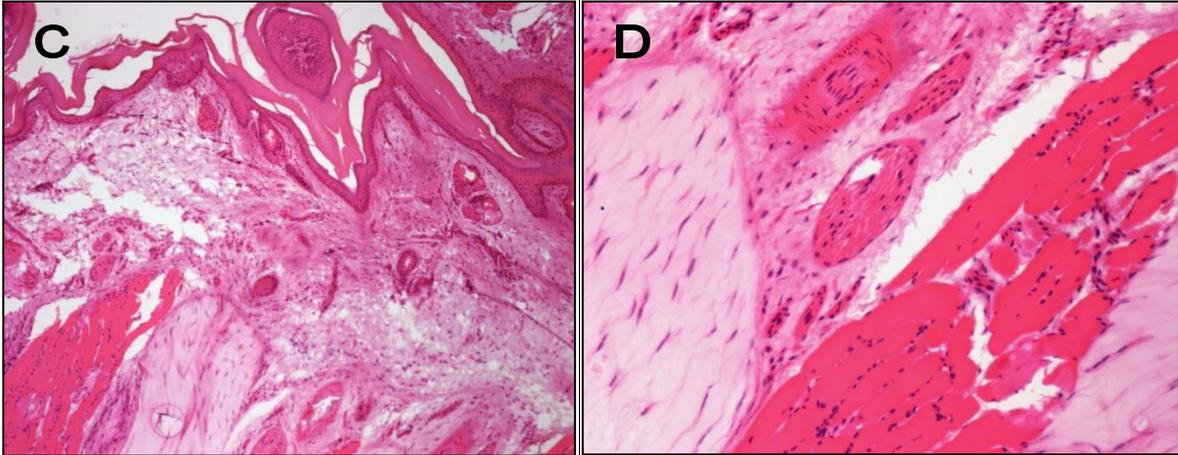


Fig. 6. Cojinete plantar control 3 CFP. Áreas del cojinete plantar sin granulomas, 8X (C) y 20X (D).

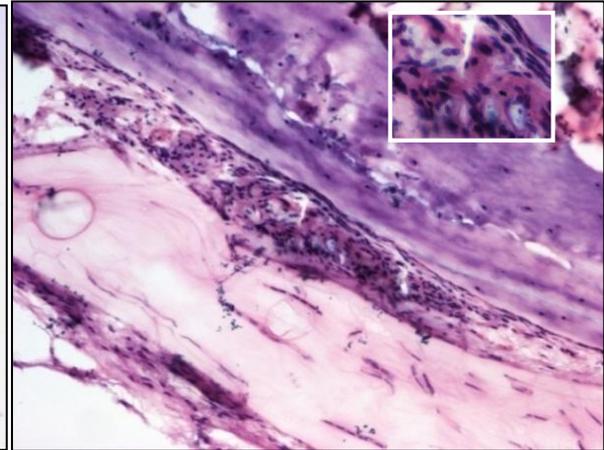
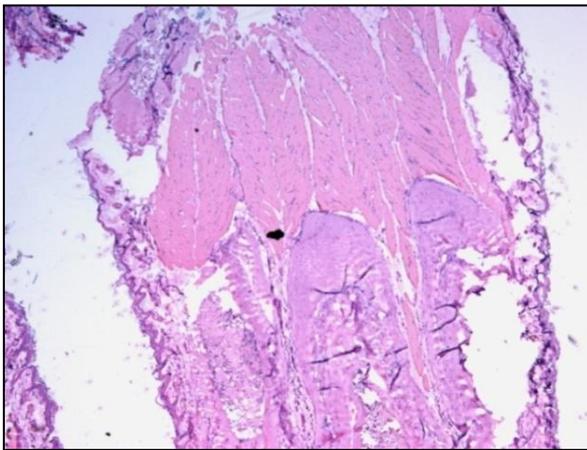


Fig.7 Mutante 1. Cojinete plantar. 4X. Fig.8. Mutante 2. Cojinete plantar. Infiltrado inflamatorio rodeando partículas de nitrocelulosa 20X

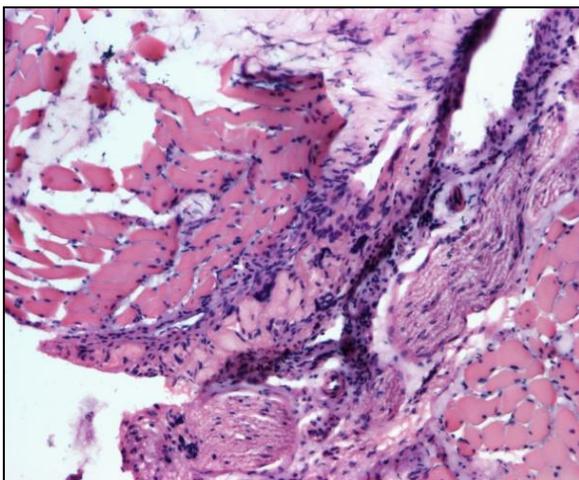


Fig. 9 Mutante 3. Infiltrado inflamatorio. 20X

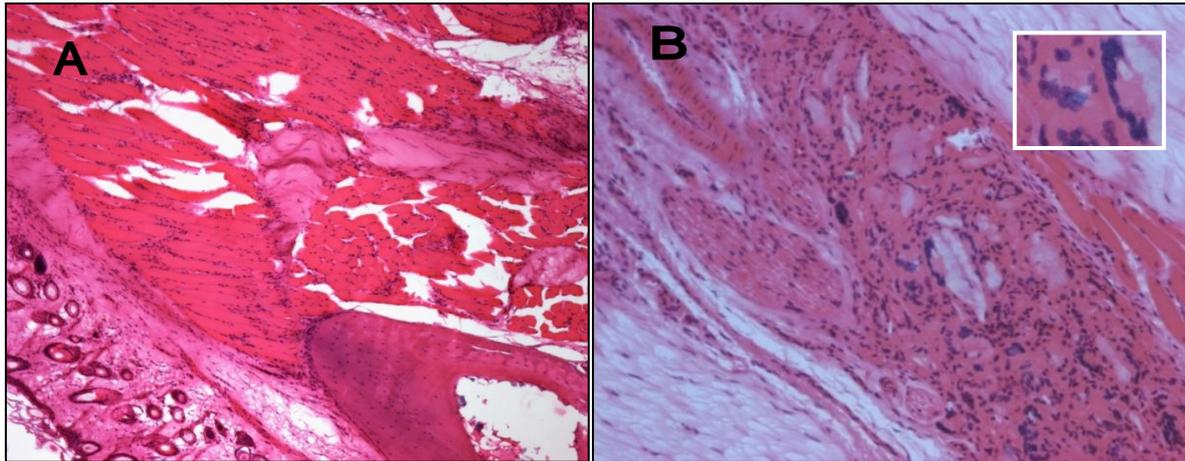


Fig.10 Tratamiento con la cepa BCG . Tejido sin granulomas 8X (A).Granuloma con CGMs 20X. CGM (acercamiento) (B).

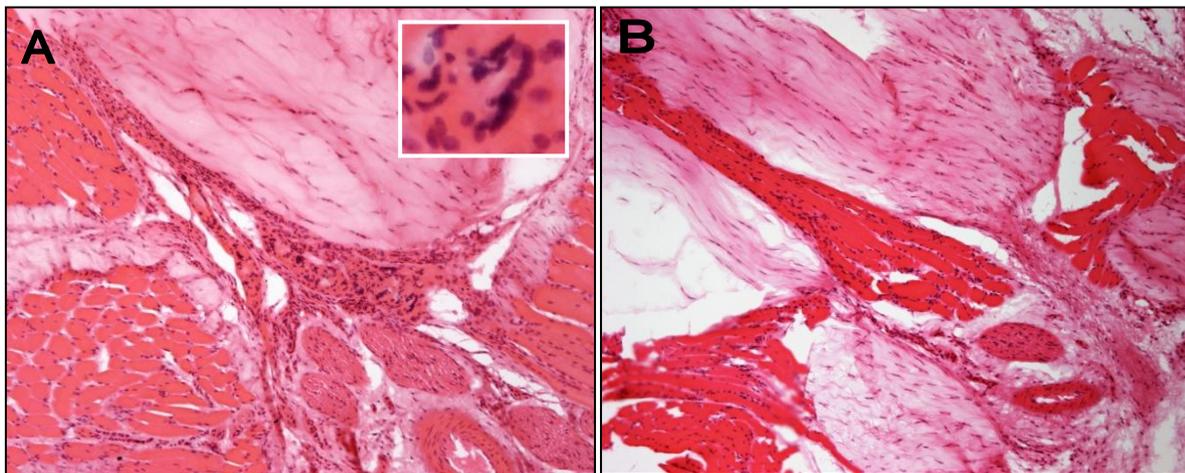


Fig.11. Mutante 4. Granuloma con CGMs 20X (A). Área del cojinete plantar sin granulomas (B) .

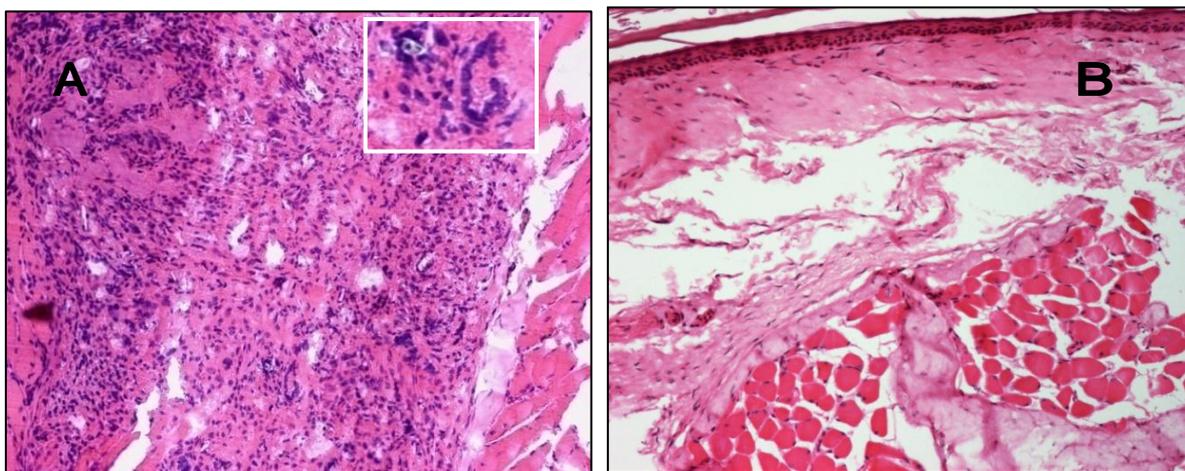


Fig.12. Cepa H37Rv. Granuloma con CGMs (Acercamiento) 20X (A). Area sin granulomas (B).

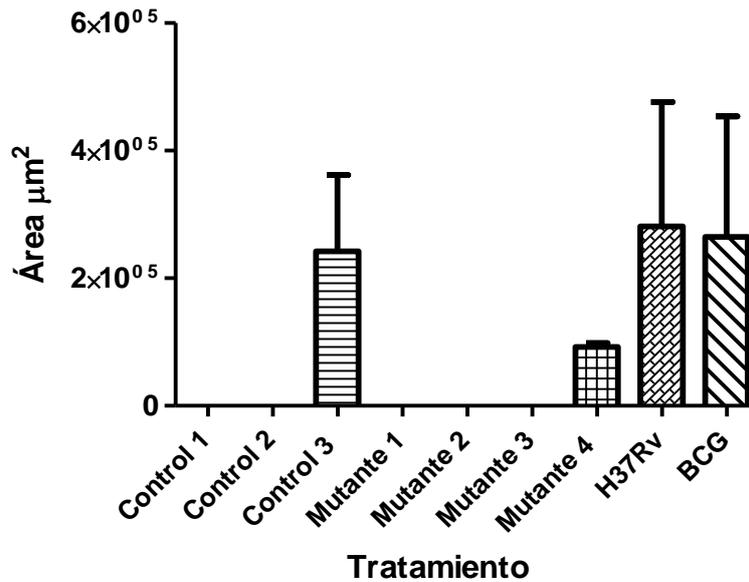


Fig. 13 Área de inflamación provocada por los distintos tratamientos y en los controles. Los grupos control 1 y 2, no generaron inflamación granulomatosa ni CGMs, como tampoco las cepas mutantes 1, 2 y 3.

En la reacción frente a la mutante 2 de *M. tuberculosis* no se encontraron granulomas ni CGMs, sin embargo en el sitio donde se encontraron los fragmentos de nitrocelulosa se produjo una pequeña reacción inflamatoria y se observó tejido de granulación específicamente entre el hueso y el tendón. La histología no mostró necrosis (Fig.8).

La inoculación de la mutante 3 no indujo una formación de granulomas ni de CGMs, sino que la reacción a esta mutante de *M. tuberculosis*, fue una ligera reacción inflamatoria con tejido de granulación. Se observan las partículas de nitrocelulosa rodeadas de células inflamatorias como linfocitos (Fig. 9). No se observó rastro de necrosis.

El análisis histopatológico del cojinete plantar inoculado con la mutante 4 de *M. smegmatis*, mostró granulomas pequeños con CGMs en comparación de los granulomas generados por otras cepas BCG, y H37Rv, (Tabla 1, Fig. 11). No se observaron rastros de necrosis.

En los cojinetes plantares con cepa de *M. tuberculosis* H37Rv, apareció una reacción inflamatoria granulomatosa, que se caracterizó por la presencia de granulomas de distinto tamaño conteniendo CGMs de tipo Langhans, así como la presencia de abundantes linfocitos, no se observa rastro de necrosis (Fig. 12B y acercamiento). Este tipo de reacción ocurrió en las áreas donde se aplicaron los fragmentos de nitrocelulosa al igual que se describe en el reporte original de este modelo experimental (Hernández *et al.*, 2000)

Por su parte la reacción frente a la cepa de *M. bovis* BCG fue una inflamación granulomatosa con CGMs. Los granulomas son de distintos tamaños y se encuentran entre los tejidos blandos.

El área promedio de los cojinetes plantares y de los granulomas se muestran la tabla 1.

Tabla 1. Áreas promedio de los cojinetes plantares y áreas totales de los granulomas.

Cepa	Área total del cojinete ( $\mu\text{m}^2$ )	Área total de los granulomas ( $\mu\text{m}^2$ )
<b>BCG</b>	17,147,938.4	793,990.75
<b>Mutante 4</b>	21,216025.5	98,384.835
<b>H37Rv</b>	24,830,826.60	562,117.18
<b>CFP</b>	15,410,615.	726,777.83

En esta inflamación por BCG las partículas más grandes de nitrocelulosa se observan rodeadas por CGMs de Langhans, así como por macrófagos activados (Fig. 10 y acercamiento). Estos resultados son interesantes considerando el contexto de un modelo *in vivo*, pues en reportes previos, en un modelo *in vitro* con células humanas de sangre periférica (PBMCs) la cepa BCG forma granulomas bien formados a los 9 días de cultivo con bacterias vivas BCG. Sin embargo cuando se usa un modelo *in vivo* animal se requiere de varias semanas de infección para formar granulomas que sean lo suficientemente grandes para permitir su localización en los tejidos (Puissegeur *et al.*, 2004).

Respecto a la inoculación del control 3 CFP, tratamiento que fue usado como control positivo, se generó una inflamación granulomatosa con CGMs, respuesta observada también en la reacción con H37Rv. Sin embargo en este caso la reacción granulomatosa pareciera ser más marcada con respecto al uso de la bacteria entera, pues el número, tamaño y área de los granulomas fue mayor (Fig. 6A). Sin embargo la diferencia de área entre dichas inflamaciones granulomatosas no alcanzó significancia estadística (Fig.13).

En los granulomas de provocados por CFP se observa la presencia de CGMs (Fig. 6). En este respecto cabe señalar que este CFP se obtuvo del sobrenadante del cultivo de *M. tuberculosis* H37Rv, lo que podría sugerir que las proteínas solubles de *M. tuberculosis* desempeñan un papel relevante en la inmunogenicidad frente a esta micobacteria, pudiendo tener un papel de antígenos.

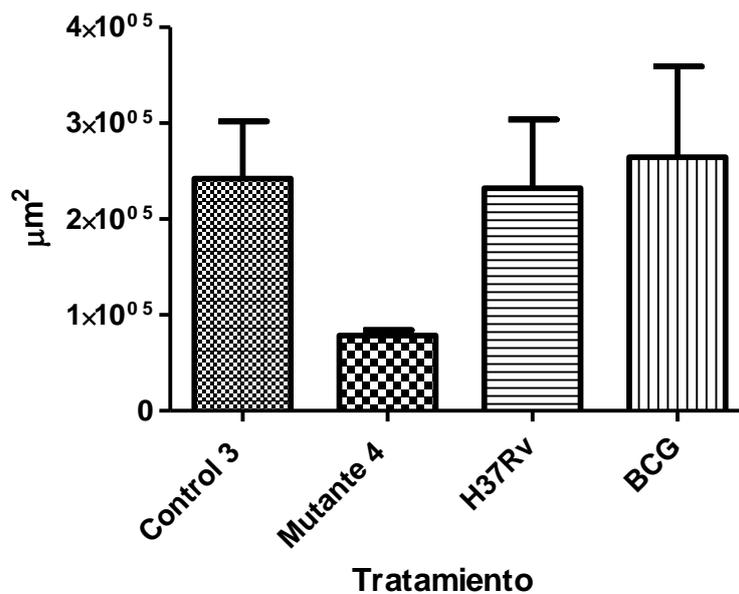


Figura 14. Áreas totales promedio de los granulomas.

Las áreas de inflamación granulomatosa de las cepas que indujeron respuesta fueron comparadas estadísticamente, sin embargo no se halló una diferencia significativa sino solo con respecto a la mutante 4 (Fig. 14).

En resumen, el análisis histopatológico del día veintiuno postinoculación, que se estableció como el tiempo óptimo para evaluar la presencia de granulomas y CGMs

(Hernández et al., 2000) permitió observar la capacidad y diferencias en la inducción del proceso inflamatorio experimental que se evaluó en los cojinetes plantares de ratones sensibilizados e inoculados con una cepa de referencia H37Rv y tres cepas mutantes para factores de virulencia de *M. tuberculosis* (mutante 1, mutante 2 y mutante 3), una cepa mutante de *M. smegmatis* (cepa 4) y la cepa vacunal de *M. bovis* (BCG).

Los resultados muestran a tres cepas capaces de generar una respuesta granulomatosa con CGMs en los cojinetes plantares de ratón. Dos de esas cepas pertenecen dos especies del complejo de *M. tuberculosis*: H37Rv y BCG y una a al complejo de las MNT, la mutante 4.

## 9. Discusión

La TB es una enfermedad infecciosa crónica provocada por *M. tuberculosis* que afecta principalmente a los pulmones, sin embargo puede afectar también a otros órganos y tejidos (OMS, 2012). Una característica patológica de la infección es la generación de granulomas con presencia de CGMs. En este estudio se trabajó con algunas cepas mutantes de micobacteria que se están evaluando como candidatas a vacunas, esto para valorar su capacidad de generar la respuesta granulomatosa con CGMs.

Los resultados sugieren diferencias en la capacidad de inducción de una reacción inflamatoria con granulomas y CGMs por parte de las cepas mutantes utilizadas en el presente estudio, debiendo enfatizar que en ambos casos, y particularmente en las CGMs utilizamos una base morfológica para su identificación, puesto que otros marcadores como el CD68 que se ha utilizado en algunos estudios y es positivo en macrófagos en particular, no aportaban información valiosa adicional. Por lo anterior, podemos considerar lo siguiente:

En el caso del primer grupo experimental la respuesta a la mutante 1 de *M. tuberculosis*, la ausencia de inflamación granulomatosa con CGMs, o infiltración de algún tipo de poblaciones celulares como linfocitos, macrófagos, o células dendríticas, podría estar relacionada a la disminución de lipoarabinomananas manosiladas, y a su carencia de lípidos implicados en la virulencia y en el desarrollo

de una respuesta inflamatoria (Martín *et al.*, 2007), además es sabido, ya que la mutación del gen *phoP* conduce a una gran atenuación tanto en el modelo celular como en el modelo ratón (Aguilar *et al.*, 2007, Martín *et al.*, 2007). Sin embargo es importante señalar que en un modelo murino de tuberculosis progresiva en pulmón, en los ratones infectados con esta cepa viva aparecieron pocos granulomas hasta el día 60 postinfección (Aguilar *et al.*, 2007) por lo cual no se descarta que al día 60 se generaran granulomas en este modelo.

Respecto a la ausencia de granulomas y de CGMs al inocular la mutante 2, pudiera estar en relación a que esta cepa mutante carece de DIM, molécula característica de las cepas patógenas y está involucrada en la virulencia y patogenicidad de la micobacteria (Infante *et al.*, 2004). Así la falta de granulomas puede deberse entre otras cosas, a que esta cepa no cuenta con las moléculas necesarias que estimularían una respuesta de tipo granulomatosa. La presencia de tejido de granulación observado en el tejido, implica un proceso de reparación frente a una inflamación que probablemente tuvo lugar en los primeros días posteriores a la inoculación.

De acuerdo con el análisis histopatológico 21 días posteriores a la inoculación de mutante 3 en los cojinetes plantares, no se observaron granulomas ni CGMs, se cree que la poca o nula expresión genes relacionados con la virulencia de esta mutante, y cuyos productos son capaces de modular el sistema inmune del hospedero, (Fernandes *et al.*, 1999, Fontán *et al.*, 2008) estarían relacionados directamente con la falta de granulomas y CGMs en el grupo experimental 3, esto aunado la severa atenuación de la mutante 3 en ratones (Hernández *et al.*, 2010). El análisis histopatológico, mostró una ligera infiltración de células inflamatorias, probablemente en respuesta a algunos componentes de la envoltura celular tales como glucolípidos (Gorocica *et al.*, 2005), y no frente a la nitrocelulosa, pues comparando este caso con el control 2 el cual no generó alguna reacción frente a la nitrocelulosa. No obstante Hernández Pando (2010) mostró que en un modelo de tuberculosis pulmonar progresiva en ratón con bacterias vivas, se forman granulomas en pulmón 7 días posteriores a la infección con esta cepa. Lo anterior sugiere que la condición vida o muerte de la micobacteria, el tiempo, y el tejido de

inoculación juegan un papel importante en la estimulación de las respuestas inmunes.

Por otra parte la inflamación y reacción granulomatosa con la cepa mutante 4 de *M. smegmatis*, fue un resultado inesperado, pues se trata de una mutante no patógena, que pertenece al grupo de MNT, además de que a esta especie no se le ha relacionado con alguna infección (González *et al.*, 2002) a menos de que el hospedero esté en contacto frecuente con este tipo de microorganismos, o bien que curse con una inmunodeficiencia (Mendoza 2009), condición que no se presentó en este caso. La inflamación granulomatosa con CGMs sugiere que esta mutante posee moléculas necesarias para generar granulomas y a su vez CGMs, a pesar carecer de algunos oligosacáridos, y de tener una distribución diferente de varios glucolípidos y fosfolípidos de envoltura celular. Es de señalarse que en este caso el área de la inflamación granulomatosa parece menor (Tabla 1), sin embargo no alcanzó una diferencia significativa estadística con respecto al área de inflamación granulomatosa que generaron otras cepas (Fig. 14).

El análisis histopatológico de los cojinetes inoculados con la cepa virulenta H37Rv, mostró granulomas con CGMs, resultado que podría estar relacionado con las moléculas involucradas en la virulencia e inmunogenicidad, como el factor cuerda, compuestos de ácido micólico y DIM, molécula que aumenta la producción de TNF- $\alpha$  e IL-6 que aumentan la activación de células inmunes en un estadio temprano de la infección, y por lo tanto favoreciendo una respuesta inflamatoria. El análisis estadístico no mostró diferencia estadística significativa entre el área de granulomas de esta y las demás cepas que generaron granulomas. La ausencia de necrosis puede involucrar el tiempo de madurez del granuloma (días posteriores a la inoculación de la bacteria), pues en algunos estudios con H37Rv, se ha encontrado necrosis en los granulomas en etapas tardías (Aguilar *et al.*, 2007).

Los resultados experimentales usando *M. bovis* BCG, mostraron que BCG fue capaz de generar granulomas con CGMs en tejidos blandos, el análisis histopatológico también mostró la presencia de macrófagos activados, esto coincide con los resultados de Puissegur y colaboradores (2004), quienes encontraron una reacción granulomatosa en respuesta a la cepa BCG al usar micobacterias vivas en un

modelo *in vitro* con células humanas mononucleares de sangre periférica (PBMCs). Así que este resultado la inflamación granulomatosa con CGMs, sugiere que esta cepa también cuenta con moléculas que inducen una inflamación granulomatosa. Lo anterior es interesante, ya que a pesar de que se considera a esta cepa no patógena y tener más de 100 genes deletados (Martín *et al.*, 2007) fue capaz de generar una respuesta inflamatoria granulomatosa con CGMs.

A través de este modelo experimental en el cojinete plantar de ratón se evaluó la capacidad de generar una respuesta inflamatoria granulomatosa con CGMs, por parte de las cepas usadas del género *Mycobacterium* a un tiempo en el que en una inflamación de este tipo la mayoría de las células son CGMs, lo cual se constató comparando con el control, pues en el caso del control la inoculación fue solo partículas de nitrocelulosa sin algún componente infeccioso y no se observó una reacción granulomatosa ni CGMs (Fig. 5).

Es importante señalar que a pesar de haber sido usadas micobacterias muertas, la inoculación de algunas micobacterias enteras adsorbidas en partículas de nitrocelulosa, produjeron una reacción local inmune granulomatosa con CGMs de Langhans, representativa de infecciones causadas por *M. tuberculosis*, lo cual es el principal resultado y la aportación original de este trabajo. Este hecho podría deberse entre otras posibilidades, a la naturaleza de las moléculas y componentes de la envoltura de las micobacterias, que están relacionados con su virulencia y que la hacen persistente haciéndola un microorganismo difícil de erradicar en el interior de la célula incluso estando muerta (Mustafa *et al.*, 2005).

En el estudio histopatológico, la inducción de la respuesta inflamatoria granulomatosa es un resultado indirecto que apoya la capacidad de los componentes solubles y de la bacteria entera muerta para inducir una respuesta celular en un modelo experimental murino en el que se usó micobacterias muertas como reto antigénico. Tomando en cuenta lo anterior podría sugerirse como en el caso del control 3 (CFP) de H37Rv, pudiera suceder lo mismo con las proteínas solubles de las otras micobacterias usadas en el presente estudio; por lo tanto sería relevante obtener antígenos solubles de las cepas que presenten diferentes grados de infectividad así como caracterizar la participación de factores de virulencia solubles de manera individual en estudios a futuro.

A pesar de la comparación entre la inducción de la respuesta granulomatosa entre micobacterias, en este modelo no fue posible llevar a cabo el conteo de CGMs debido a que los cortes histológicos resultaron no ser lo suficientemente adecuados para llevar a cabo un conteo fidedigno.

## 10. Conclusiones

La inoculación experimental de cepas mutantes de diferentes micobacterias en los cojinetes plantares de ratones BALB/c, permitió observar la capacidad de dichas micobacterias de inducir granulomas con CGMs.

Las cepas H37Rv, BCG y la mutante 4 de *M. smegmatis*, generaron CGMs dentro de granulomas. Sin embargo respecto a la intensidad de la inflamación medida por el área no alcanzó significancia estadística.

Por otra parte las mutantes 1,2 y 3 de *M. tuberculosis* no fueron capaces de inducir la inflamación ni de generar CGMs, por lo que se concluye que carecen de los componentes responsables de este tipo de inflamación granulomatosa.

## 11. Perspectivas

Se sugiere aumentar el número de animales, para verificar si la tendencia de generación de granulomas y de CGMs hallada en este trabajo, se conserva al aumentar el tamaño de la muestra.

Se sugiere la identificación de los efectores moleculares clave involucrados en la inducción de la inflamación granulomatosa y CGMs en respuesta a las micobacterias usadas en el presente trabajo.

## 12. Bibliografía

Schlossberg David. Tuberculosis e infecciones por micobacterias no tuberculosas. Mc Graw-Hill Interamericana. Cuarta edición. México 1999. P. 385-388, 452, 472.

Organización Mundial de la Salud (OMS) [página de internet] [Consultado en 18 Abril 2012] Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/es/index.html>

Flynn J., y, Chan J. 2001. Immunology of Tuberculosis. Annu. Rev immunol. **19**:93-129.

Hernández-Pando R, Orozco H, Aguilar León D, López Casillas F, Rook G. 2004. Inmunopatología de la tuberculosis pulmonar experimental. Mensaje Bioquímico, **35**, 129-153. Facultad de Medicina. Universidad Nacional Autónoma de México.

Hernández-Pando R, Borstein Q. L, Aguilar L,D. 2000. Inflammatory cytokine production by immunological and foreign body multinucleated giant cells. Immunol. **100**:352-358.

González Alí, García José, Lobo Oscar. 2002. Tuberculosis. Edit MMII DISINLIMED, C.A. segunda edición. Venezuela. P. 191-209

Lattante, Roxana 2012. Cátedra de Anatomía y Fisiología Patológicas: Anatomía Patológica de la Inflamación Crónica Granulomatosa. Facultad de Ciencias Médicas. UNR. Consultado el 5 Mayo. 2012 disponible en: [www.patologiafcm.com.ar/%2Fwp-content/%2Fplugins%2](http://www.patologiafcm.com.ar/%2Fwp-content/%2Fplugins%2)

Mustafa T, Harald G. Wiker H, Mørkve O & Sviland L. 2007. Reduced apoptosis and increased inflammatory cytokines in granulomas caused by tuberculous compared to non-tuberculous mycobacteria: role of MPT64 antigen in apoptosis and immune response. *Clinical and Experimental Immunology*, **150**: 105–113.

Davis JM, Ramakrishnan L. 2009. The Role of the Granuloma in Expansion and Dissemination of Early Tuberculous Infection. *Cell*; **136**(1):37-49.

Lei Liying. Live *Mycobacterium avium* subsp. Paratuberculosis and a killed-Bacterium Vaccine Induce Distinct subcutaneous Granulomas, with Unique Cellular and Cytokine Profiles. *Clinical and vaccine immunology CVI*, **15**(5), p.783-793.

Stevens A. Lowe J. Young B. Histopatología básica. Atlas y texto. Elsevier. España 2003 Cuarta edición. P. 25-34

Lezama A, Pedro. 2006. Rol de quimiocinas y sus receptores en la inflamación. *Rev. Med. Vallejana*, **3** (2), p.133-139.

McNally A, Anderson J. 2011. Cell Fusion in Health and Disease. Macrophage Fusion and Multinucleated Giant Cells of Inflammation. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. **713**, 97-111

Abbas K.A, Lichtman H.A, Pillai S. Inmunología celular y molecular. 6ª Edición Elsevier 2008.

Dittmar Thomas, Zanker Kurt S. Cell Fusion in Health and Disease: II: Cell Fusion in Disease. Ediciones springer Pag. 143.

Pontificia Universidad Católica de Chile. Patología general. Inflamación granulomatosa. [página de internet] Consultada 10.9. 2011. Disponible en: [http://escuela.med.puc.cl/publ/patologiageneral/patol\\_064.html](http://escuela.med.puc.cl/publ/patologiageneral/patol_064.html)

García Aguilar, Teresa Concepción. 2012. Fagocitosis de macrófagos muertos en apoptosis inducida por la glicoproteína de 19 kDa de *M. tuberculosis*. Tesis, Facultad de Ciencias, UNAM.

Gorocica, P, Jiménez Martínez i, M.D.C., Garfias, Y., Sada, I. Lascurain, R. 2005. Componentes glicosilados de la envoltura de *Mycobacterium tuberculosis* que intervienen en la patogénesis de la tuberculosis. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex***18**, 142-153

Molina Romero, C. 2010. Evaluación de mutantes en los genes de virulencia de H37Rv en un modelo murino de tuberculosis progresiva. Tesis, Facultad de Ciencias, UNAM.

Asociación Española de Vacunología [página de internet] España. [Actualizado en 3 de mayo 2007. Consultado en Abril 2012] Disponible en: [http://www.vacunas.org/index.php?option=com\\_content&task=view&id=6353&Itemid=370](http://www.vacunas.org/index.php?option=com_content&task=view&id=6353&Itemid=370)

Mendoza López, Pablo. 2009. Caracterización de un regulador transcripcional del complejo *Mycobacterium tuberculosis* mutado en la cepa vacunal *Mycobacterim bovis* BCG. Tesis, Facultad de farmacia, Universidad de Granada.

Institute of Laboratory Animal Resources: Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio. Edición Mexicana. Academia Nacional de Medicina. México, 1999.

Aguilar D, Infante E, Martin C, Gormley E, Gicquel B, Hernandez-Pando R. 2007. Immunological responses and protective immunity against tuberculosis conferred by vaccination of Balb/C mice with the attenuated *Mycobacterium tuberculosis* (*phoP*) SO2 strain. *Clinical and Experimental Immunology*, **147**: 330–338.

Hernandez-Pando R, Aguilar, L. D., Smith, I., and Manganelli, R. 2010. Immunogenicity and Protection Induced by a Mycobacterium tuberculosis sigE Mutant in a BALB/c Mouse Model of Progressive Pulmonary Tuberculosis. *Infection and Immunity* **78**, 3168-3176

Martín C, Gicquel B, Pérez E, Gonzalo J, Arbués A. 2007. Vacuna contra la tuberculosis. Patente WO/2007/110462. Patentes [página de internet] Consultada 10 septiembre 2011. Disponible en: <http://www.freepatentsonline.com/WO2007110462.pdf>

Snapper, S. B., Melton, R. E., Mustafa, S., Kieser, T. & Jacobs, W. R., Jr 1990. Isolation and characterization of efficient plasmid transformation mutants of Mycobacterium smegmatis. *Mol Microbiol* **4**, 1911–1919.

Etienne G, Laval F, Villeneuve C, Dinadayala P, Abouwarda A, Zerbib D, Galamba A, Daffe M. 2005. The cell envelope structure and properties of Mycobacterium smegmatis mc2155: is there a clue for the unique transformability of the strain?. *Microbiology*. **151**, 2075–2086

Puissegeur M.P, Botanch C, Duteyrat J.L, Delsol G, Caratero C, Altare F. 2004. An in vitro dual model of mycobacterial granulomas to investigate the molecular interactions between mycobacteria and human host cells. *Cellular microbiology*. **6**(5), 423-433.

Infante E, Aguilar L. D, Gicquel B, and Hernandez-Pando R. 2005. Immunogenicity and protective efficacy of the Mycobacterium tuberculosis fadD 26 mutant. *British Society for Immunology, Clinical and Experimental Immunology* , **141**:21–28

Fernandes, N. D. , Wu, Q.-L. , Kong, D. , Puyang, X. , Garg, S. , y Husson, R. N. 1999. A Mycobacterial Extracytoplasmic Sigma Factor Involved in Survival following Heat Shock and Oxidative Stress. *Journal of Bacteriology* **181**, 2922-2929.

Fontán, P., A. Aris, V., Álvarez, M. E., Ghanny, S. , Cheng, J., Soteropoulos, P., Trevani, A. , Pine, R. , and Smith, I. 2008. Mycobacterium tuberculosis sigma factor-E regulon modulates the host inflammatory response. *The Journal of Infectious Diseases* **198**, 877-885.

Mustafa T, J. Mogga S, Mfinanga S, Mørkve O, and Sviland L. 2005. Immunohistochemical analysis of cytokines and apoptosis in tuberculous lymphadenitis. *Immunol.* **117**: 454–462

Abou-Zeid C., Filley E., Steele J. Rook G.A.W. 1987 A simple new method for using antigens separated by polyacrylamide gel electrophoresis to stimulate lymphocytes in vitro after converting bands into antigen-bearing particles. *J. Immunol Methods* **98**,5.

Borrero, R. Álvarez, N, Reyes, F, Sarmiento, M. E, Acosta, A., Finlay, I, 2011. *Mycobacterium tuberculosis*: factores de virulencia. *VacciMonitor*. **20**,34-38.

Cadiz Belon Vanessa . 2008. A *Mycobacterium smegmatis* Mc2 155 Mutant Disrupted in Universal Stress Protein is Sensitive to a Variety of Stresses. California State University, Fresno. libro

Camacho L.R, Ensergueix D, Pérez E, Gicquel B, Guilhot C. 1999. Identification of a virulence gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* by signature-tagged transposon mutagenesis. *Molecular Microbiology* **34**(2), 257-267

Castañeda L. V, Sánchez-C. J, Morán-Moguel M.C. 2003.El papel de las técnicas de biología molecular en el diagnóstico y control de tuberculosis. *Gac Méd Méx*. **139** (3) 288-290.

Departamento de medicina familiar. Facultad de medicina. Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). [página de internet]. Consultada el 15.03.2011. Disponible en: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/familiar/atfm93/microscopio.html>

Departamento de Patología de la Universidad de la Frontera (UFRO). Chile. [página de internet]. Consultada el 15.03.2011. Disponible en: <http://www.med.ufro.cl/Recursos/Patologia/CursoPatologiaGeneral/Patologia2001/Cd/cd12j.htm>

Espinoza González N. 2011. Actividad in vitro, ex vivo, e in vivo de una nueva oxazolidinona, DA-7157, sobre *Nocardia brasiliensis*. Tesis, UANL.

Fernández S.s, Becerril-Montes P, Molina-Salinas G, Barrios-García H, Vargas-Villarreal J. 2005. Tuberculosis causada por cepas de *Mycobacterium tuberculosis* drogorresistentes. *Enf Emerg* **7**(1):13-19.

Gasser A, y Möst J. 1999.Generation of Multinucleated Giant Cells In Vitro by culture of human monocytes with *Mycobacterium bovis* BCG in combination with cytokine-containing supernatants. *Infection and Immunity*. **67**,395-402.

Giacomini, E., Sotolongo, A., Iona, E., Severa, M., Remoli, M. E., Gafa, V., Lande, R., Fattorini, L. , Smith, I. , Manganelli, R. , et al. 2006. Infection of human dendritic cells with a *Mycobacterium tuberculosis* sigE mutant stimulates production of high levels of interleukin-10 but low levels of CXCL10: impact on the T-cell response. *Infection and Immunity* **74**, 3296-3304.

Hiroyuki H, Mizuno K, and Horio, T. 2003. Langhans-type and Foreign-body-type Multinucleated Giant Cells in Cutaneous Lesions of Sarcoidosis. *Acta Derm Venereol*. **83**: 171–174

Hurtado Ortíz, Raquel. 2008. Análisis inmunopatológico de la infección con *Mycobacterium ulcerans* en un modelo murino. Tesis. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. IPN.

Mustafa T, Harald G. Wiker H, Mørkve O & Sviland L. 2008. Differential expression of mycobacterial antigen MPT64, apoptosis and inflammatory markers in multinucleated giant cells and epithelioid cells in granulomas caused by *Mycobacterium tuberculosis*. *Virchows Arch* **452**:449–456.

North R.J, y, Jung Y.J. 2004. Immunity to Tuberculosis. *Annu Rev immunol.* **22**: 599-623.

Orduña P, Cevallos M, Ponce de León S, Arvizu A, Hernández-González I.L, Mendoza.H G, and López-Vidal Y. 2011. Genomic and proteomic analyses of *Mycobacterium bovis* BCG México 1931 reveal a diverse immunogenic repertoire against tuberculosis infection. *BMC Genomics*, **12**:493

Rousseau C, Winter N, Pivert E, Bordat Y, Neyrolles O, Avé P, Huerre M, Gicquel B and Jackson M. 2004. Production of phthiocerol dimycocerosates protects *Mycobacterium tuberculosis* from the cidal activity of reactive nitrogen intermediates produced by macrophages and modulates the early immune response to infection. *Cellular Microbiology* **6**(3), 277–287

Russell-Goldman, E., Xu, J., Wang, X., Chan, J. Tufariello, J.M. A. 2008. *Mycobacterium tuberculosis* Rpf Double-Knockout Strain Exhibits Profound Defects in Reactivation from Chronic Tuberculosis and Innate Immunity Phenotypes. *Infection and Immunity*.**76**, 4269-4281.

Saunders M.B, Tran S, Ruuls S, Sedgwick J, Briscoe H. Britton W. 2005. Transmembrane TNF Is Sufficient to Initiate Cell Migration and Granuloma Formation and Provide Acute, but not long-term Control of *Mycobacterium tuberculosis* Infection. *J. Immunol.* **174**:4852-4859.

Shabaana A. K, Rangel-Moreno J, Jeffrey J. Fountain, C A. Martino. 2009. In a Murine Tuberculosis Model, the Absence of Homeostatic Chemokines Delays Granuloma Formation and Protective Immunity. *J. Immunol.* **183**;8004-8014.

Salam N, Gupta S, Sharma S, Pahujani S, Sinha A, et al. 2008 Protective Immunity to *Mycobacterium tuberculosis* Infection by Chemokine and Cytokine Conditioned CFP-10 Differentiated Dendritic Cells. *PLoS ONE* **3**(8): e2869. doi:10.1371/journal.pone.0002869

Takahiko H, Hiroki Mitoma, Shin-ichi Harashima. 2010. Transmembrane TNF- $\alpha$ : structure, function and interaction with anti-TNF agents. *Rheumatology*. **49**,1215-1228.

Takimoto H, Maruyama H, Shimada KI, Yakabe R, Yano I, Kumazawa Y. 2006. Interferon- $\gamma$  independent formation of pulmonary granuloma in mice by injections with trehalose dimycolate (cord factor), lipoarabinomannan and phosphatidylinositol mannosides isolated from *Mycobacterium tuberculosis*. *Clinical and experimental immunology*; **144**(1):134-41.