



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**Utilización de péptidos inmunoterapéuticos como  
herramienta preventiva ante la infección con  
*Mycobacterium tuberculosis* MDR y Beijing en el modelo  
murino**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**BIÓLOGO**

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

**EDUARDO GÓMEZ SEGOVIANO**



**DIRECTOR DE TESIS:**

**DR. ROGELIO HERNÁNDEZ PANDO**

México, D. F.

**(2014)**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

- 1. Datos del Alumno**

<b>Apellido paterno</b>	Gómez
<b>Apellido materno</b>	Segoviano
<b>Nombre(s)</b>	Eduardo
<b>Teléfono</b>	59321893
<b>Universidad</b>	Universidad Nacional Autónoma de México
<b>Facultad</b>	Facultad de Ciencias
<b>Carrera</b>	Biología
<b>Número de cuenta</b>	304106237
  
- 2. Datos del Tutor**

<b>Grado</b>	Dr.
<b>Nombre(s)</b>	Rogelio
<b>Apellido paterno</b>	Hernández
<b>Apellido materno</b>	Pando
  
- 3. Datos del sinodal 1**

<b>Grado</b>	M. en C.
<b>Nombre(s)</b>	José Luis
<b>Apellido paterno</b>	Silencio
<b>Apellido materno</b>	Barrita
  
- 4. Datos del sinodal 2**

<b>Grado</b>	Dra.
<b>Nombre(s)</b>	Yolanda
<b>Apellido paterno</b>	López
<b>Apellido materno</b>	Vidal
  
- 5. Datos del sinodal 3**

<b>Grado</b>	Dr.
<b>Nombre(s)</b>	Rodolfo
<b>Apellido paterno</b>	Pastelín
<b>Apellido materno</b>	Palacios
  
- 6. Datos del sinodal 4**

<b>Grado</b>	Quím.
<b>Nombre(s)</b>	Viviana
<b>Apellido paterno</b>	Escobar
<b>Apellido materno</b>	Sánchez

## **Agradecimientos**

Quiero agradecer al grupo de trabajo del Dr. Rogelio Hernández Pando del Instituto Nacional de Ciencias Médicas de Nutrición Salvador Zubirán por sus enseñanzas y consejos sobre las técnicas y procedimientos empleados en este trabajo.

Agradezco al Dr. Benito Antón Palma del Instituto Nacional de Psiquiatría y a su equipo de trabajo por el diseño, construcción y preparación de los péptidos utilizados.

Por su apoyo en la realización de los experimentos realizados en esta tesis, agradezco a la Dra. Diana E. Aguilar León. También agradezco a los estudiantes de Maestría y Doctorado (Jorge, Camilo, Cesar, Edgar, Lucía, Nadin, Reinier, Gabriel y Yadira) del laboratorio de patología experimental del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán; así como a Ere y Don Facu por su ayuda, compañía y consejos.

Por último agradezco a todas las personas que me apoyaron incondicionalmente durante toda la carrera y en mi posterior periodo de letargo y elaboración de la tesis, quienes me apoyaron en todo momento; mis padres Gilberto y Gloria; mi hermano Roberto; mi cuñada Gabriela; a quienes me soportaron durante cuatro años; mis abuelos Lucila y Gabriel; mis tíos Maricela, Lucila, Alejandro, Gabriel, Miguel, Yolanda, Lupe y Cony por su compañía y apoyo; Mis mejores amigos de la carrera Paula, Karen, Efraín, Benja, Toño, Chuy y Roxana; y por último agradezco a mis amigos de la vida Pepe y Tania por todo su apoyo.

## Lista de abreviaturas

BCG	Bacilo de Clemette-Guérin
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
DAF	Diacetato de fluoresceína
IFN- $\gamma$	Interferon gamma
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleucina
NOS	Especies reactivas de nitrógeno
MDR	Multidrogo resistete
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
NO	Óxido nítrico
PBS	Sal amortiguadora de fosfatos
SSF	Solución salina fisiológica
TNF $\alpha$	Factor de necrosis tumoral alfa
UFC	Unidades formadoras de colonia

I. INTRODUCCIÓN-----	7
1.1. Historia de la tuberculosis-----	7
1.2. Epidemiología-----	8
1.2.1. Tuberculosis en el mundo-----	8
1.2.2. Tuberculosis en México-----	9
1.3. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> -----	10
1.4. Tuberculosis: la enfermedad-----	11
1.5. Patogenia-----	12
1.6. Virulencia-----	14
1.7. Respuesta inmune-----	14
1.7.1. Macrófagos, células NK y neutrófilos y su papel ante <i>M. tuberculosis</i> ----	14
1.7.2. Linfocitos T CD4+-----	16
1.7.3. Tuberculosis y la respuesta Th1 y Th2-----	18
1.7.4. Células T CD8+ y su papel ante <i>M. tuberculosis</i> -----	21
1.8. Modelos animales para el estudio de <i>M. tuberculosis</i> -----	21
1.9. Modelo murino de tuberculosis pulmonar experimental-----	23
1.10. Vacuna BCG-----	24
1.11. Utilización de péptidos sintéticos como inmunógenos -----	25
1.12. Péptidos inmunoterapéuticos: p4, p12 y p36-----	26
II. JUSTIFICACIÓN-----	28
III. OBJETIVOS-----	29
3.1. General-----	29
3.2. Particulares-----	29
IV. HIPÓTESIS-----	30
V. MATERIALES Y MÉTODOS-----	31

5.1. Animales de experimentación-----	31
5.2. Inmunización de animales con los péptidos (p4, p12, p36) -----	31
5.3. Crecimiento y preparación de las micobacterias para el reto-----	32
5.4. Determinación de la viabilidad de las micobacterias-----	33
5.5. Reto de animales con <i>Mycobacterium Tuberculosis</i> cepas MDR y Beijing-----	33
5.6. Determinación de la carga bacteriana (UFC) -----	34
5.7. Análisis estadístico-----	35
VI. RESULTADOS-----	36
6.1. Sobrevidas-----	36
6.2. Carga bacilar-----	38
VII. DISCUSIÓN-----	42
VIII. CONCLUSIONES-----	46
IX. PERSPECTIVAS-----	47
X. BIBLIOGRAFÍA-----	48

## I. INTRODUCCION

### 1.1. Historia de la tuberculosis

La tuberculosis (TB) es una enfermedad que ha afectado a la humanidad desde hace muchos siglos, las primeras referencias documentadas sobre ésta se encuentran en los jeroglíficos hallados en Egipto, Babilonia y China. También, existen evidencias morfológicas de lesiones de tipo tuberculoso en fragmentos de la columna vertebral en momias egipcias que vivieron entre 1550 y 1080 A. C. Las primeras descripciones anatómo-patológicas de la enfermedad comenzaron a realizarse en el siglo XVII. En 1679, Franciscus de la Boe fue el primero en identificar y caracterizar las lesiones macroscópicas asociadas con la enfermedad, denominándolas tubérculos. Posteriormente, Manget en 1702, describió las lesiones anatómo-patológicas de la Tuberculosis miliar [1].

En 1720, Marten fue el primero en afirmar que la tuberculosis podría ser causada por criaturas diminutas, que serían las responsables de generar las lesiones y síntomas de la enfermedad. El término tuberculosis, derivado del latín *tubercula* (Protuberancia o nódulo pequeño), fue utilizado desde 1839 [2]. En 1882 Robert Koch demostró que el agente causal de la enfermedad era un bacilo, en ese tiempo se le denominó “bacilo de Koch”, y posteriormente se le denominó *Mycobacterium tuberculosis*. Koch identificó al bacilo en lesiones tuberculosas mediante la tinción de Ziehl-Neelsen. Los primeros registros sobre las epidemias causadas por esta bacteria aparecen en Europa y en los Estados Unidos en el siglo XIX, Bayle y Laënc establecieron las formas y estadios de la tuberculosis como enfermedad [2].

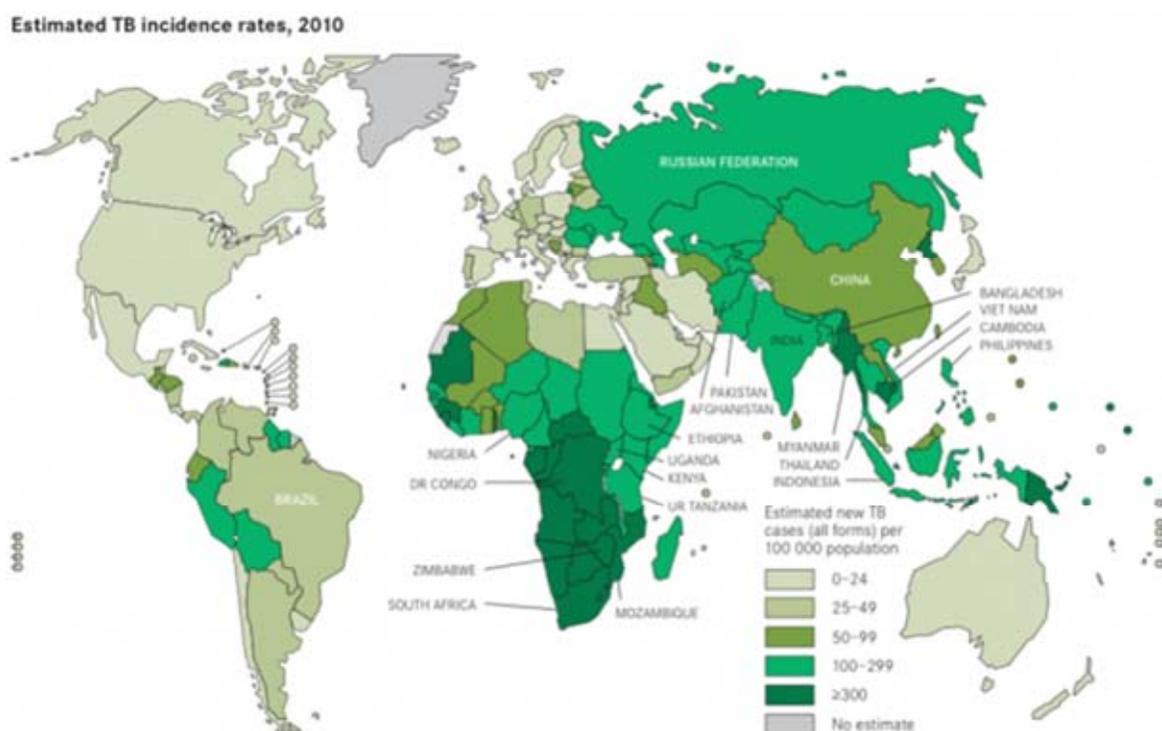
En 1924, Albert Calmette y Alphonse Guérin desarrollaron una vacuna denominada BCG (bacilo de Clemette-Guérin), que es una cepa atenuada de *Mycobacterium bovis*. Más tarde se descubrieron los primeros antibióticos contra esta enfermedad, siendo la estreptomicina, descubierta por Selman Waksman en 1944, el primer agente quimioterapéutico específico contra la tuberculosis. Posteriormente se descubrieron otros agentes antifímicos como el ácido pámico salicílico, la isoniacida, el etambutol y la rifampicina [3].

## **1.2. Epidemiología**

### **1.2.1. Tuberculosis en el mundo**

La tuberculosis sigue siendo un grave problema de salud pública en el mundo, a pesar de los avances para su diagnóstico, tratamiento y prevención. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que durante el periodo comprendido entre el 2000 al 2020 habrán 1000 millones de individuos infectados con *M. tuberculosis*, de los cuales 200 millones enfermarán y 35 millones morirán si no se mejora el control y el tratamiento de la enfermedad. Las incidencias más altas de la enfermedad se presentan en países subdesarrollados del continente Africano, Asiático y América Latina (Figura 1) [4]. Actualmente la OMS estima que cada año, 1.4 millones de personas mueren por tuberculosis y nueve millones presentan tuberculosis activa; de estos el 95% vive en países en vías de desarrollo. Así mismo, la OMS estimó que un tercio de la población mundial está infectada por *M. tuberculosis* y únicamente del 5 al 10% desarrollan la enfermedad [5]. Las

condiciones que favorecen la tuberculosis en países en vías de desarrollo son: la pobreza, la coinfección con VIH, la falta de control y de diagnóstico temprano y preciso [6]. Además, se ha estimado que la incidencia mundial de tuberculosis aumenta aproximadamente 0.4% al año [7,8].



**Figura 1.** Tasas de incidencia de tuberculosis en el mundo en el año 2010. Estimadas por la OMS. (Tomado del informe 2010 de la OMS).

### 1.2.2. Tuberculosis en México

La incidencia de tuberculosis en México es de 18 por cada cien mil habitantes siendo inferior al promedio latinoamericano, que a mediados de los años noventa se ubicaba en

32 nuevos casos por cada cien mil habitantes [17]. Valdespino y García analizaron las tendencias de la morbilidad por tuberculosis las cuales mostraron un descenso desde 1941 hasta 1976, año en que se estabilizan [18]. Sin embargo, para 1993 la tasa de morbilidad fue de 17.1 casos por cada cien mil habitantes y de haberse conservado la tendencia descendente, la tasa para 1993 debería haber sido de 12.5 casos por cada cien mil habitantes [19].

La infección por tuberculosis en México se observa principalmente en jóvenes y adultos de edad media que pertenecen a la población económicamente activa [16].

### **1.3. *Mycobacterium tuberculosis***

*Mycobacterium tuberculosis* pertenece al complejo homónimo, *M. tuberculosis*, en el que también se encuentran: *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium bovis BCG* y *Mycobacterium canettii* [9]. La tuberculosis humana es causada principalmente por tres distintas micobacterias: *M. tuberculosis*, *M. africanum* y *M. bovis*, siendo *M. tuberculosis* la más común [1].

*M. tuberculosis* es un bacilo aerobio estricto, no esporulado, no encapsulado, con un tiempo de generación de 15 a 20 horas, que requiere de 2 a 6 semanas de cultivo, para observar colonias en medios sólidos. Su desarrollo puede favorecerse con una temperatura entre 35 y 37° C en una atmósfera enriquecida con O<sub>2</sub>. Microscópicamente es un bacilo alargado curvo de aproximadamente 0.4 x 3 µm. De acuerdo a su clasificación taxonómica, *M. tuberculosis* pertenece a la clase Actinobacteridae; orden Actinomycetales; familia Mycobacteriaceae y al género *Mycobacterium* [1].

Las micobacterias se caracterizan por tener una gruesa capa de lípidos y ácidos micólicos que al ser tratadas con alcohol - ácido y teñidas con colorantes derivados de las anilinas como la fucsina fenicada, retienen esta coloración, por lo que se les ha denominado bacilos ácido-alcohol-resistentes. El alto contenido lipídico de la pared celular de la micobacteria favorece la resistencia a las defensas del hospedero y posiblemente contribuyan a la patología de la enfermedad. Asimismo el bacilo está cubierto por una capa de lípidos que le confiere la capacidad de sobrevivir en un ambiente seco durante largos periodos aunque pueden ser eliminadas, por ejemplo, mediante rayos del sol directos o por la radiación ultravioleta [2].

#### **1.4. Tuberculosis: la enfermedad**

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa crónica y debilitante en la que predominan con frecuencia los síntomas generales como fiebre, debilidad, pérdida de peso y disnea. Cada persona enferma infectará en promedio entre 10 y 15 personas cada año. La tuberculosis se transmite fundamentalmente por vía respiratoria, a través de pequeñas partículas de menos de 10  $\mu\text{m}$  emitidas al estornudar, hablar o toser que contienen al bacilo. Con la tos pueden emitirse unas 3 000 partículas potencialmente infecciosas e igual número puede eliminarse al hablar 5 minutos y muchas más al estornudar. La mayoría de los pacientes tuberculosos eliminan pocos bacilos, por lo que generalmente se requiere un contacto continuo para infectarse, como sucede con la convivencia intrafamiliar. Sin embargo, una sola bacteria es teóricamente capaz de producir la enfermedad en un individuo inmunosuprimido [11].

## 1.5. Patogenia

*M. tuberculosis* origina lesiones características denominadas tubérculos. La infección inicial se produce cuando los bacilos alcanzan los alvéolos pulmonares. Una vez establecida la infección se afectarán los segmentos posteriores de los lóbulos superiores por su preferencia en las áreas pulmonares mejor ventiladas [12].

La principal vía de entrada de *M. tuberculosis* es la respiratoria. La ventilación bronquial favorece la deposición de los bacilos inhalados en los segmentos basales del lóbulo inferior, medio, de la llingula, o bien el segmento anterior del lóbulo superior, llamado “segmento de infección primario” [13]. Los bacilos tuberculosos inhalados son fagocitados por los macrófagos alveolares y transportados a los linfocitos locales. Los macrófagos infectados y los monocitos circulantes, una vez presentes en el sitio de infección comienzan a secretar enzimas proteolíticas, generando una lesión exudativa. Los fagocitos mononucleares activados inician la formación del granuloma con activación eventual de células T. El granuloma está formado por macrófagos infectados rodeados por células no infectadas como macrófagos y linfocitos. Solamente las partículas inhaladas más pequeñas, que contienen entre uno y tres bacilos, llegan al alveolo y son fagocitados por los macrófagos alveolares. Unos bacilos son destruidos y otros pueden resistir los mecanismos defensivos celulares [14]. La repercusión sobre el pulmón se traduce en dos situaciones patológicas distintas como se aprecia en la figura 2.

- Primoinfección tuberculosa subclínica: ocurre por el contacto con el bacilo tuberculoso. Se caracteriza por la ausencia de síntomas y signos clínicos, radiológicos y bacteriológicos. Sin embargo, la prueba de tuberculina es positiva.
- Enfermedad tuberculosa: manifestaciones clínicas, radiológicas, bacteriológicas e inmunológicas [15].

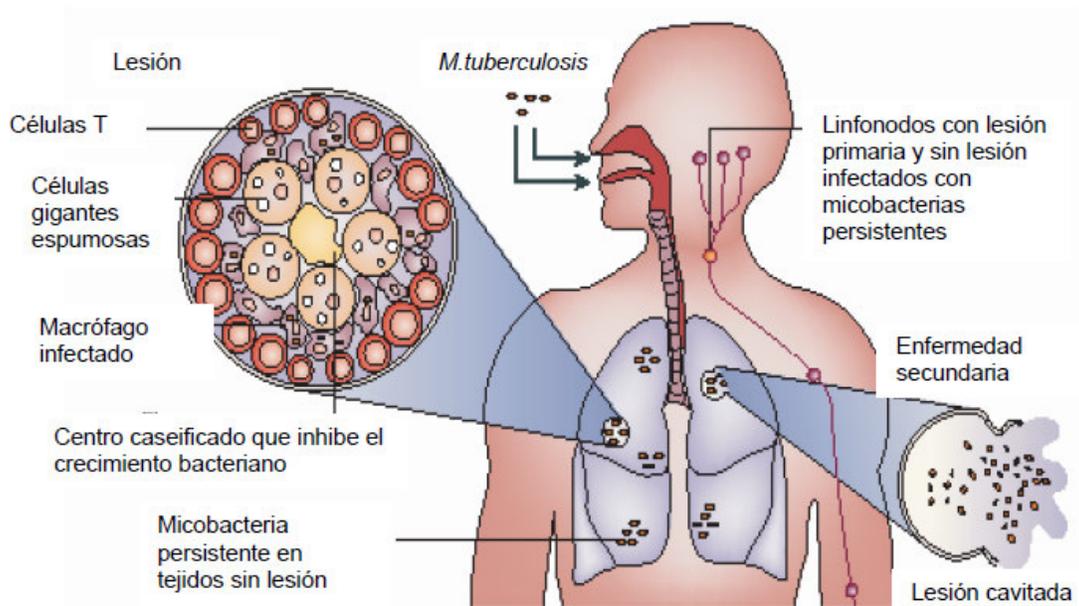


Figura 2. Persistencia de micobacterias. Tomado de *Stewart G. et al. 2003. Tuberculosis: a problema with persistence. Nature Rev Microb. 1(2): 97-105.*

## **1.6. Virulencia**

*M. tuberculosis* no posee factores de virulencia clásicos como otras bacterias patógenas (toxinas, etc). Experimentalmente la virulencia se mide en términos de sobrevivencia y se refiere al porcentaje de animales infectados que mueren debido a la infección. Otro parámetro importante asociado con virulencia es la carga bacteriana, es decir, el número de micobacterias encontradas en un hospedero infectado después de la infección inicial. La morbilidad es medida por análisis histopatológicos ya que el daño al pulmón causado por la bacteria produce anoxia debido a la obliteración de las células del parénquima pulmonar involucradas en la captura de oxígeno, así como la obstrucción de bronquiolos por los granulomas y liberación de sangre durante la ruptura de granulomas con licuefacción en el tejido adyacente. Esta anoxia lleva a la muerte [10].

## **1.7. Respuesta inmune**

### **1.7.1. Macrófagos, células NK y neutrófilos; su papel ante *M. tuberculosis***

Aunque *M. tuberculosis* puede estar presente fuera de la célula, es primordialmente un microorganismo intracelular cuyo hábitat preferido es el macrófago. La fase inicial de la respuesta ante el bacilo corresponde a la inmunidad innata y en ella participan macrófagos, células NK y neutrófilos [20, 21].

La internalización de la micobacteria al macrófago se da a través de la interacción de diversas moléculas de superficie con la micobacteria. Algunas de estas interacciones

estimulan vías de activación, mientras que otras favorecen la supervivencia intracelular de la micobacteria al inhibir la maduración del fagosoma [22]. Existe heterogeneidad en los eventos iniciales de la infección por la micobacteria, aquellas interacciones que medien la activación de los macrófagos permitirán a este fagocito la destrucción del bacilo [20, 22].

El macrófago activado tras la fagocitosis del bacilo produce IL -12, citocina importante de la respuesta inmune innata y fundamental en la inducción de la respuesta inmune celular adaptativa frente a micobacterias [23]. IL -12 induce en células NK la producción de IFN- $\gamma$ . El IFN- $\gamma$  es la principal citocina activadora de macrófagos, y una citocina crítica para el control de la infección como parte de la respuesta inmune innata inicial y más tarde de la respuesta celular adaptativa [22]. La estimulación del macrófago con IFN- $\gamma$  promueve la maduración del fagosoma; a la par de la producción de especies reactivas del oxígeno y nitrógeno [24].

Entre las citocinas secretadas por el macrófago activado también se encuentran IL-1 y TNF $\alpha$ . Ambas son mediadores de la respuesta inflamatoria aguda que favorecen el reclutamiento celular al sitio de la infección por la micobacteria. Los macrófagos circulantes reclutados en pulmón mediante el efecto de estas citocinas, así como de otros factores aún no bien conocidos, se activan y forman agregados que posteriormente se rodearán de linfocitos T CD4 + y T CD8 + constituyendo lo que se conoce como granulomas. Este patrón de respuesta inflamatoria es distintivo de la tuberculosis y en él son además importantes IFN- $\gamma$  y linfotoxina- $\alpha$  [25].

### **1.7.2 Linfocitos T CD4+**

El arribo al pulmón de las células T CD4+ y su presencia en los granulomas marca el inicio de la participación de la siguiente fase de la respuesta inmune ante la micobacteria. La respuesta inmune adaptativa.

Además de los macrófagos las células dendríticas residentes en el pulmón tienen también contacto inicial con la micobacteria. Estos dos elementos celulares, y en particular, de forma predominante la célula dendrítica, mediante la presentación de antígeno a células T, y mediante la producción de ciertas citocinas, proveen los elementos necesarios para el establecimiento de la respuesta inmune adaptativa. Las células dendríticas han demostrado ante estímulos inflamatorios inducidos por la inhalación bacteriana, incrementar su migración a los ganglios linfáticos regionales, a la vez que son reclutados a la vía respiratoria nuevas representantes de esta población también con mayor celeridad [24, 26, 27]. Una vez en el ganglio serán importantes en la presentación antigénica a células T y por ende en la inducción de la respuesta inmune adquirida. Estos fenómenos ocurren en los primeros días de la infección [24, 27].

Los linfocitos T, una vez activados tras la presentación antigénica en los ganglios hiliares, migran hacia el pulmón para participar en el control de la infección micobacteriana [27]. De este modo, durante los primeros días de la infección, mientras la única que opera en el sitio de la infección es la inmunidad innata, la mayoría de las células obtenidas por lavado bronquial en ratones infectados, son macrófagos, mientras que al final de la segunda semana y hasta el final del cuarto mes de infección predominan los linfocitos T [28]. La

proporción de linfocitos T CD4+ es semejante a la de linfocitos T CD8+ [28, 27]. En periodos avanzados de la enfermedad murina se ha informado también predominio de linfocitos CD8 [28].

La participación de los linfocitos CD4 en el control de la infección es de primordial importancia. Ratones C57BL/6 infectados por vía intravenosa con *M. tuberculosis*, muestran una fase inicial de la infección con incremento de la carga bacteriana e inician el control de la infección a las tres semanas, no sucumben ante la infección y muestran cargas bacilares relativamente bajas [29]. Por el contrario ratones “Knock out” para CD4, son incapaces de controlar la infección con TB y mueren con grandes cargas bacterianas (aproximadamente 100 veces superiores a las de animales control). La importancia de los linfocitos T CD4+ es también evidente en el humano, en la cual pacientes infectados con el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) son mucho más susceptibles a la infección por el bacilo o su reactivación, debido a su déficit de linfocitos T CD4+ [29].

Se considera a los linfocitos T CD4+ como la principal fuente de producción de INF- $\gamma$  durante la infección por TB [29]. El IFN- $\gamma$  como ya se ha mencionado es un mediador central en la protección frente al bacilo tuberculoso ya que activa los mecanismos microbicidas de los macrófagos reclutados al pulmón, en particular la producción de intermediarios reactivos del nitrógeno. Entre los intermediarios reactivos del nitrógeno se encuentra el óxido nítrico (NO), que al menos en el ratón, juega un papel central. En el contexto de la respuesta inmune frente a microorganismos la enzima responsable de la producción de óxido nítrico, es la sintetasa inducible de óxido nítrico (iNOS). En ratones “Knock out” para CD4 se ha observado que iNOS, detectada por inmunohistoquímica, se expresa inicialmente en menor

cantidad de granulomas que en ratones control [29]. Esta diferencia desaparece sin embargo, hacia el fin de la tercera semana de infección. La formación de granulomas muestra un efecto semejante. Los granulomas en los ratones “Knock out” para CD4 se hallan menos organizados y son menos que en los ratones control en los estadios iniciales. Esta diferencia muestra una cinética semejante a la de la expresión de iNOS [29]. Así pues el principal papel de los linfocitos T CD4+ en el control de la infección parece ser la producción temprana y en cantidades suficientes de IFN- $\gamma$  que permita la adecuada activación macrofágica, la promoción de los mecanismos microbicidas y el control temporal de la infección [29].

### **1.7.3. Tuberculosis y la respuesta Th1 y Th2**

Se ha hablado mucho al respecto de la participación de dos poblaciones de células T CD4+ con diferente patrón de secreción de citocinas en relación a la respuesta inmune protectora ante la tuberculosis, a saber, los linfocitos T CD4+ Th1 y Th2.

La producción de IFN- $\gamma$  e IL-2 caracteriza los linfocitos Th1, mientras que la producción de IL-4 e IL-13 caracteriza a los linfocitos Th2 [30]. Ambas subpoblaciones se desarrollan a partir de los mismos precursores, linfocitos T CD4+ vírgenes sin polarización en su producción de citocinas, denominados Th0. El desarrollo de las subpoblaciones Th1 y Th2 depende de la forma y el microambiente en los que se lleva a cabo la presentación antigénica y la activación. La principal citocina inductora en la diferenciación hacia células Th1 es la IL-12 [30]. El desarrollo de las células Th2 parece ser inducido por IL-4. Una vez que las células T estimuladas han comenzado a diferenciarse hacia una de las dos

subpoblaciones, las citocinas que estas producen amplifican su propio crecimiento y suprimen el de la otra subpoblación Th1 o Th2 según sea el caso [30].

Como ya se ha comentado ampliamente el IFN- $\gamma$ , es una citocina esencial para el control de la infección por el bacilo y su principal fuente de producción al inicio de la infección por *M. tuberculosis* son precisamente las células T CD4+ y específicamente la subpoblación Th1. Las células Th1 favorecen además otras ramas de la inmunidad protectora ante la micobacteria al promover la diferenciación y activación de linfocitos citotóxicos T CD8+, y la producción de anticuerpos de isotipo IgG2a e IgG3 en el ratón que activan complemento, se unen con gran afinidad a receptores RFc $\gamma$ , y permiten de esta manera la opsonización bacteriana y la lisis mediada por complemento [30]. Entre los diferentes grupos de investigación en tuberculosis se está de acuerdo en el hecho de que la subpoblación de células T CD4+ Th1 constituye el elemento central indispensable en la inmunidad protectora ante *M. tuberculosis*.

Los linfocitos CD4+ de tipo Th2, por su parte, constituyen una población inadecuada para contener a la micobacteria. Estas células producen principalmente IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, y promueven principalmente una respuesta de tipo humoral, en la que predominan además anticuerpos de isotipo IgG1 e IgE. Estas células no promueven de modo efectivo la inmunidad celular requerida para el control de la micobacteria e incluso algunas de las citocinas que producen tienen efectos antagónicos sobre las producidas por células de tipo Th1 [31].

No obstante lo anterior, la participación de los linfocitos T CD4+ de tipo Th2 en la patogenia de la tuberculosis ha sido motivo de debate. Diversos grupos de investigación han encontrado evidencias de la asociación entre la presencia de tuberculosis y una respuesta de linfocitos Th2. En ratones de la cepa Balb/c se ha visto un incremento de la población de linfocitos Th2 tras la aparición inicial de linfocitos Th1 y en fases tardías en la infección. Este incremento además se halla asociado a la reactivación de la enfermedad en infecciones latentes experimentales [32], a una mayor extensión de ésta [28, 33] y a datos de progresión [28, 33, 34]. En estudios en humanos se ha asociado este patrón de respuesta en células de sangre periférica con la extensión o presencia de lesiones pulmonares en sujetos enfermos de tuberculosis [35,36]. En contraposición, otros autores no corroboran estos hallazgos, y así empleando otras cepas de ratones, aun cuando también encuentran presente esta población de linfocitos Th2 en fases tardías, no es de igual magnitud, ni guarda correlación con la progresión microbiológica de la enfermedad [37, 38, 39]. En el humano algunos grupos también han informado ausencia de un patrón de respuesta con linfocitos Th2 [40].

Pese a la controversia en torno a la participación de un patrón de respuesta de tipo Th2 en la patogenia de la tuberculosis, datos recientes han permitido fundamentar de manera contundente su participación en el daño tisular en la tuberculosis, en específico en la presencia de necrosis y fibrosis [33, 34].

Así pues la participación de los linfocitos T CD4+ tipo Th1 constituye el elemento central indispensable en la inmunidad protectora ante *M. tuberculosis*.

#### **1.7.4. Células T CD8+ y su papel ante *M. tuberculosis***

Aunque lejos de tener el papel central de los linfocitos T CD4+, los linfocitos T CD8+ participan también en el control de la infección. La depleción de linfocitos T CD8+ mediante el empleo de anticuerpos selectivos afecta el control de la infección [24]. La transferencia de células T CD8+ en ratones inmunodeficientes confieren protección contra la diseminación de micobacterias como el bacilo de Calmette-Guerin [41]. Aunado a lo anterior, las células T CD8+ son responsables de la protección transitoria observada en fases tempranas de la infección en ratones viejos [42]. Y parecen ser más importantes que las células T CD4+ en el control de la infección en la tuberculosis en estado latente [43]. Los linfocitos T CD8+ pueden producir IFN- $\gamma$  de manera semejante a los linfocitos T CD4+. Sin embargo, la principal función que se les atribuye es citotóxica. Mediante la lisis de células infectadas del hospedero, las células T CD8+ pueden exponer bacilos que se hallen dentro de células ineficientes para eliminarlos, como por ejemplo macrófagos inactivados. Recientemente se ha observado que células T CD8+ que expresan granulicina y perforina pueden lisar también directamente a la micobacteria [44].

#### **1.8. Modelos animales para el estudio de *M. tuberculosis***

El uso de animales de experimentación para el ensayo preclínico de la eficiencia de nuevos productos antimicrobianos es de gran importancia, pues en ellos se puede evaluar la actividad esterilizante de los nuevos antibióticos con capacidad antituberculosa, estos idealmente, deberían eliminar la carga bacteriana mejorando el estado histofuncional de

los tejidos afectados o deberán reducir la duración de la terapia sin sacrificar su eficacia, lo cual incrementara la culminación exitosa del tratamiento ahorrando recursos, previniendo recaídas y la emergencia de cepas multifármaco-resistentes [45].

Debido a que la vía de infección aérea es la más importante en la enfermedad humana, se considera que esta es la idónea en los modelos animales de tuberculosis. Ésta es más específica para evaluar la enfermedad pulmonar y hay una mejor correlación entre la dosis empleada del medicamento y la eliminación de la carga bacteriana evaluada por la determinación de unidades formadoras de colonia (UFC) [45].

Los tres mejores modelos animales para el estudio de la enfermedad son: el ratón, los cobayos y los conejos, cada uno tiene sus ventajas y desventajas. El ratón es el más frecuentemente usado debido a que su genoma se encuentra bien estudiado, existe gran disponibilidad de reactivos para medir niveles de citocinas, y su bajo costo de mantenimiento relativo a otros animales. Otra gran ventaja para los experimentos en ratón es que hay cepas híbridas que muestran diferentes niveles de resistencia a *M. tuberculosis*, también, cuando es empleada una dosis adecuada, la micobacteria crece sin ningún impedimento en los pulmones del ratón en un lapso de 2 a 4 semanas [46]. Una desventaja es que la progresión de tuberculosis en ratón es diferente a la del humano, debido a que el ratón, en general, no es tan sensible a la enfermedad como otros modelos animales en los que se pueden estudiar infecciones crónicas más parecidas a las humanas. Los cobayos son muy sensibles a *M. tuberculosis*, y las fases de la enfermedad, incluyendo los estadios tempranos como formación de granulomas, en este animal, son similares a los humanos,

las desventajas son la carencia de cepas y reactivos así como el alto costo de mantenimiento [47].

El modelo de conejo tiene una gran ventaja sobre los otros modelos animales, los granulomas pulmonares formados durante la enfermedad muestran la misma progresión observada en casos avanzados de tuberculosis humana, las desventajas del conejo son similares a las de los cobayos [47].

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

Diferentes estudios realizados en humanos y modelos animales han mostrado que en tuberculosis el balance de citocinas Th1 y Th2 está relacionado con la inmunopatogénesis de la enfermedad. Así, las células Th1 protegen contra la infección mediante la secreción de IFN- $\gamma$ , el cual activa macrófagos para contener y aniquilar la mycobacteria intracelular con mayor eficiencia. El IFN- $\gamma$  también induce la presentación antigénica mediante la regulación de la expresión de proteínas del Complejo Mayor de Hsitocompatibilidad (MHC). Por el contrario las células Th2 están asociadas con la fase crónica y progresiva de la enfermedad al secretar IL-4, IL-5 e IL-10 las cuales polarizan la respuesta hacia una respuesta humoral, suprimiendo así la inmunidad mediada por células [49,50].

Considerando que la tuberculosis es principalmente una enfermedad pulmonar, el grupo de trabajo del Dr. Rogelio Hernández Pando del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán" designó un modelo murino experimental de tuberculosis pulmonar, inducida por la inoculación intratraqueal de bacterias vivas y virulentas de *M. tuberculosis*. Ellos demostraron que cuando la tuberculosis pulmonar es inducida en el ratón

inoculando con bacterias vivas y virulentas de *M. tuberculosis* por la vía natural de infección, dos diferentes fases inmunológicas y anatómicas toman lugar. La primera, o fase aguda se caracteriza por un infiltrado inflamatorio intersticial, perivascular y peribronquial y la formación de granulomas, con un predominante patrón de citocinas Th1. La segunda o fase crónica, está representada por neumonía, fibrosis, necrosis y un balance de citocinas Th2 [51].

#### **1.10. Vacuna BCG.**

La vacuna BCG (bacilo de Calmette-Guérin), desarrollada por los científicos franceses que le dan el nombre en la última década del siglo XIX, es la única vacuna disponible actualmente contra TB. Los efectos secundarios de esta vacuna resultan tolerables y confiere una buena protección contra las formas diseminadas y meníngeas de la tuberculosis, sin embargo, la protección que confiere contra la forma pulmonar prevalente de la enfermedad, dista de ser la ideal. Diversos estudios han mostrado que la protección conferida por esta vacuna resulta en una eficacia de alrededor del 50%, lo cual hace de la BCG una vacuna poco satisfactoria.

El desarrollo de una nueva vacuna no constituye un reto trivial pues, tomando en cuenta que ratones que han sido sanados con antifímicos, no se encuentran protegidos de una segunda infección y el hecho de que, incluso en aquellos casos donde el individuo presenta una infección latente, este puede ser re infectado. Se puede decir pues, que una vacuna contra TB debe provocar una respuesta inmune superior a la que la misma *M. tuberculosis* es capaz de inducir [52].

### **1.11. Utilización de péptidos sintéticos como inmunógenos.**

El desarrollo de vacunas sintéticas contra enfermedades infecciosas ha alcanzado un notable éxito en las ciencias médicas. Durante la década pasada, se desarrollaron nuevas estrategias de vacunación, lo que devolvió el optimismo de que un control efectivo de los agentes patógenos mediante la vacunación podría ser posible. Sin embargo, las vacunas para muchos patógenos extendidos por todo el mundo, incluyendo el VIH, el virus de la hepatitis, la malaria y la tuberculosis, son a día de hoy todavía inefectivas.

El arsenal de inmunización tradicional incluye vacunas que utilizan virus nuevos atenuados, organismos inactivados, como es el caso de la vacuna BCG, proteínas enteras de los agentes infecciosos y más recientemente, ADN. Las vacunas basadas en péptidos sintéticos ofrecen varias ventajas respecto al uso de proteínas enteras en términos de pureza, consistencia entre distintos lotes, coste de la producción y una alta especificidad en la respuesta inmune inducida. Otro beneficio de este tipo de vacunas es que al enfocarse en el uso de epítomos definidos se eliminan las porciones antigénicas que pueden llegar a ser perjudiciales en el desarrollo de la respuesta inmune, como es el caso de la secuencia oncogénica de la proteína del Antígeno Nuclear del virus de Epstein- Barr (EBNA) [54].

El uso de péptidos sintéticos para vacunación representa una atractiva alternativa dada su simplicidad y seguridad.

La mayoría de los estudios con vacunas peptídicas se han realizado en enfermedades virales, sin embargo el uso estas vacunas en patógenos más complejos como *M.*

*tuberculosis* ha sido difícil ya que este tipo de organismos presentan numerosos epítomos y el establecimiento de la respuesta de células T es un proceso complejo.

La utilización de vacunas sintéticas formadas de péptidos fue descrita a principios de los años 80, Thomas P. Hopp y su grupo de investigación encontraron que se podía obtener una mejora significativa en la respuesta antígeno-anticuerpo cuando se utilizaban péptidos sintetizados químicamente conteniendo epítomos del virus de la hepatitis B conjugados a dos cadenas de ácido palmítico [53].

#### **1.12. Péptidos inmunoterapéuticos: p4, p12 y p36.**

El grupo de investigación del Dr. Benito Antón Palma del Instituto Nacional de Psiquiatría caracterizó más de 500 secuencias peptídicas procedentes de leucocitos humanos obtenidos de donadores sanos. Muchas de estas secuencias presentan características estructurales muy similares a regiones de proteínas presentes en microorganismos patógenos incluyendo a *M. tuberculosis*. En base a esto se desarrollaron péptidos sintéticos para probar su capacidad inmunogénica contra diversas enfermedades. Uno de los primeros experimentos realizados con estos péptidos se llevó a cabo en el laboratorio de Patología Experimental del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán donde péptidos homólogos a secuencias de proteínas presentes en *M. tuberculosis* indujeron una alta producción de IFN- $\gamma$  en cultivos in vitro de células pulmonares de ratón. Los péptidos denominados p4, p12 y p36 mostraron tener una mayor capacidad de inducir la producción de esta citocina en los cultivos. (Publicación en proceso).

Es importante mencionar que la estructura química de los péptidos p4, p12, y p36 y su homología con moléculas de la bacteria se conocen en detalle pero por cuestión del proceso de obtención de una patente no son expuestas en este trabajo.

## II. JUSTIFICACIÓN

La tuberculosis es una enfermedad reemergente a nivel mundial; aun cuando existe tratamiento, este es abandonado en la mayoría de los casos, lo que favorece la aparición de cepas MDR.

Múltiples esfuerzos para frenar el creciente número de nuevos casos de tuberculosis se concentran especialmente en la búsqueda exhaustiva de métodos diagnósticos tempranos, procedimientos terapéuticos, y diseño de nuevas vacunas que logren superar la efectividad de la actual vacuna BCG. Por esta razón es necesario poner énfasis en el desarrollo de nuevas estrategias de prevención para erradicar la enfermedad.

La administración en ratones con los péptidos inmunoterapéuticos: p4, p12 y p36 promete ser una herramienta importante en la prevención de la tuberculosis pulmonar progresiva en el modelo murino, dada su eficacia para inducir la producción de IFN- $\gamma$  en pruebas in vitro, creemos que puede tener un papel importante en la protección contra la infección ya que el IFN- $\gamma$  es clave en el establecimiento de una respuesta protectora ante *M. tuberculosis*.

### III. OBJETIVOS

#### 3.1. General

- Evaluar si la administración de los péptidos inmunoterapéuticos p4, p12 y p36 tiene un efecto protector contra *Mycobacterium tuberculosis* cepas MDR y Beijing en un modelo murino de tuberculosis pulmonar experimental.

#### 3.2. Particulares

- Evaluar la sobrevida y carga bacilar en los ratones inmunizados después del reto con las cepas de *M. tuberculosis* MDR y Beijing.
- Comparar el efecto protector de los péptidos p4, p12 y p36 contra la vacuna BCG.

#### IV. HIPÓTESIS

- La inmunización de ratones con los péptidos p4, p12 y p36 conferirá una mayor protección ante la infección con *M. tuberculosis* MDR y Beijing, prolongando la supervivencia de los ratones y disminuyendo la carga bacilar en pulmón.

## **V. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **5.1. Animales de experimentación.**

Para la realización de este experimento se utilizaron ratones singénicos Balb/c machos del bioterio del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubiránentre. Se mantuvieron en un ambiente controlado con aire filtrado, con agua, alimento (Harlan, Taklad lab) y ciclos de luz de 12 x 12 horas. La edad de los ratones fue de 6 y 8 semanas al inicio del experimento. El protocolo de este estudio fue aprobado por el comité de ética para la experimentación en animales del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”.

### **5.3. Inmunización de animales con los péptidos (p4, p12, p36)**

Los animales fueron distribuidos en 12 grupos de 10 ratones para ser inmunizados con los péptidos vía subcutánea una vez por semana durante un mes. La dosis administrada semanalmente fue de 100 µl del péptido por ratón a una concentración de 50µg utilizando solución salina como vehículo.

Los grupos experimentales fueron:

1 y 2.- Grupos control que sólo recibieron el vehículo, solución salina fisiológica.

3 y 4.- Grupos vacunados con BCG.

5 y 6.- Grupos inmunizados con el péptido (p4).

7 y 8.- Grupos inmunizados con el péptido (p12).

9 y 10.- Grupos inmunizados con el péptido (p36).

11 y 12.- Grupos inmunizados con un “pool” que incluye los tres péptidos (p4, p12 y p36).

#### **5.4. Crecimiento y preparación de las micobacterias para el reto**

Las cepas de *mycobacterium tuberculosis* Beijing y MDR fueron crecidas en medio líquido 7H9 midlebrook con ADC, a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>, durante 28 días. El cultivo se mantuvo hasta una densidad óptica de 0.6 a 600nm. La biomasa bacteriana fue recolectada por centrifugación (2500rpm, por 20 minutos). Las micobacterias fueron resuspendidas en 10 ml de solución salina fisiológica con 0.05% Tween 80 (SIGMA) y 5 ml de perlas de vidrio estériles (0.5mm). Los agregados micobacterianos se disgregaron con agitación vigorosa durante 1 minuto con la ayuda de un aislador vortex, posteriormente se dejaron reposar por otro minuto, este procedimiento se repitió 10 veces. Después, la suspensión bacteriana se centrifugó a 2500 rpm durante 10 minutos.

El proceso de disgregación se repitió nuevamente bajo las condiciones previamente mencionadas, pero esta vez las micobacterias fueron centrifugadas a 1500 rpm por 10 minutos, para coleccionar una suspensión con bacterias totalmente separadas, presentes en el sobrenadante. El sobrenadante fue coleccionado y centrifugado a 3000 rpm por 20 minutos. El paquete celular fue lavado dos veces con solución salina fisiológica estéril (SSF) y centrifugado a 3000rpm. Finalmente, después del segundo lavado, las micobacterias fueron

resuspendidas en un volumen de 5 ml de SSF estéril. Esta suspensión se destinó para determinar el número de bacterias viables.

#### **5.5. Determinación de la viabilidad de las micobacterias**

A partir de la suspensión micobacteriana, se realizó una dilución con PBS estéril, pH 7.4 (1:100). Se tomó 1µl de suspensión, se adicionaron 49µl de PBS y 50µl de DAF solución de trabajo. El DAF (5 mg de diacetato de fluoresceína (SIGMA) disueltos en 1 mL de acetona fría, solución stock, la solución de trabajo, se toman 12.5 µl de solución concentrada de diacetato de fluoresceína y se colocan en 1ml de PBS libre de Ca y Mg). Esta dilución fué incubada por 20 minutos en obscuridad y después con la ayuda de una Cámara de Neubauer se realizó el conteo de las bacterias vivas, aquellas que procesaron metabólicamente el colorante y tomando en cuenta la dilución correspondiente. La suspensión de micobacterias se ajustó a una concentración de 250 000 bacterias/ 100µl.

#### **5.6. Reto de animales con *Mycobacterium Tuberculosis* cepas MDR y Beijing**

Dos meses después de concluida la inmunización con los péptidos y los grupos vacunados con BCG, los animales fueron anestesiados por inhalación con éter y posteriormente infectados por vía intratraqueal utilizando una cánula ajustada a una jeringa de insulina (1ml). Para inducir una tuberculosis pulmonar progresiva, los ratones fueron infectados con  $2.5 \times 10^5$  UFCs suspendidas con PBS ajustado a un volumen de 100 µl para cada ratón. Los grupos 1, 3, 5, 7, 9 y 11 fueron infectados con la cepa MDR y los grupos 2, 4, 6, 8, 10 y 12

con la cepa Beijing. Todo el experimento, así como el sacrificio de los animales se realizó en campanas de bioseguridad nivel III.

### **5.7. Determinación de la carga bacteriana (UFC)**

Se realizaron dos tiempos de sacrificio de los animales, a los dos y cuatro meses después del reto. Para determinar la carga bacteriana se tomaron los pulmones por cada tiempo de sacrificio. Después del sacrificio, por exsanguinación, el pulmón se colocó en un criotubo y se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido. Posteriormente fueron almacenados a -70°C hasta su uso.

Para la realización de las UFC los pulmones fueron descongelados y homogeneizados en 3 ml de solución salina isotónica, empleando un homogeneizador de tejidos ( Polytron, Kinematika, Lucerna, Suiza). A partir del homogenizado inicial se hicieron cuatro diluciones seriadas 1:10. Se sembraron por duplicado 20 µl del homogenizado inicial y de cada dilución en medio Middlebrook 7H10 (Difco, Difco Labs, Detroit, MI, USA) al que se agregó un aditivo rico en ácido oléico, albúmina, catalasa y dextrosa (OADC) (Difco, Difco Labs, Detroit, MI, USA). Los medios se prepararon en el laboratorio y se sometieron a prueba de esterilidad antes de su uso. Los cultivos se incubaron a 37° C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% por 21 días. A partir del día 14 de incubación y hasta que transcurrieron los 21 días, se revisaron periódicamente las placas y se contó en un microscopio estereoscópico el número de unidades formadoras de colonias (UFC) para cada muestra, se tomó en cuenta en cada

muestra solo la dilución que mostrara entre 30 y 300 UFC, y en cada caso se calculó el promedio de las cuentas obtenidas para las dos siembras de esa dilución.

Durante todo el tiempo del experimento, a partir del reto, hasta el segundo tiempo de sacrificio se cuantifico diariamente la sobrevida de los animales en todos los grupos.

### **5.8. Análisis estadístico**

Se utilizó la prueba  $t$  de Student para determinar la significancia estadística de las UFCs; un valor de  $P=0.05$  se consideró significativo.

## VI. RESULTADOS

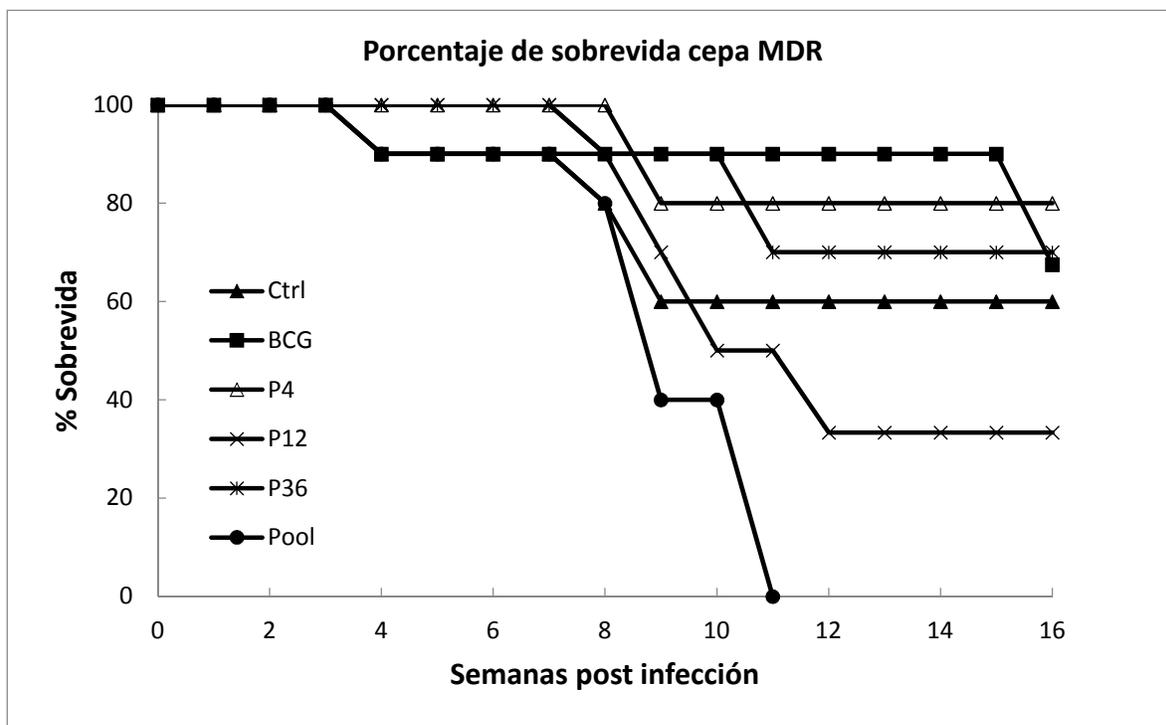
### 6.1. Sobrevidas

Debido a que *M. tuberculosis* no posee factores de virulencia clásicos como otras bacterias patógenas (toxinas, etc), Uno de los parámetros utilizados para la realización de este experimento fue medir la virulencia en términos de sobrevida y esta se refiere al porcentaje de animales infectados que mueren debido a la infección. Los ratones fueron monitoreados diariamente durante todo el experimento, contando el número de ratones que murieron a lo largo de los cuatro meses, esto en el caso de los animales retados con la cepa MDR ya que los infectados con Beijing enfermaron en un periodo de tiempo más corto, por esta razón el conteo se realizó durante 10 semanas .

En el reto con MDR, como se aprecia en la figura 3, los ratones inmunizados con los péptidos p4 y p36 alcanzaron un 80 y 70 por ciento de sobrevida respectivamente, teniendo un desempeño importante en cuanto a sobrevida se refiere, esto considerando que el grupo de animales vacunado con BCG se comportó de forma similar.

Se propuso la idea de introducir al experimento un coctel peptídico (pool) que englobara al p4, p12 y p36 a manera de ser más inmunogénico que los péptidos por separado, sin embargo, este presentó un pobre desempeño al acelerar la progresión de la enfermedad ya que para el segundo mes la caída poblacional fue superior al 50% llegando a cero tres semanas después.

El grupo control alcanzo un 60% de sobrevida para el segundo mes, manteniéndose así hasta el final del experimento, sin embargo los ratones presentaban una pérdida de peso importante y dificultad para respirar.



**Figura 3.** Porcentaje de sobrevida para animales infectados con *M. tuberculosis* MDR.

En el reto con Beijing (figura 4), los péptidos no presentaron resultados sobresalientes en cuanto a sobrevida se refiere, ya que todos los ratones murieron al segundo mes, siendo el grupo p4 el más sobresaliente teniendo un 30% de sobrevida, manteniéndose así hasta el final del experimento.

El grupo inmunizado con la vacuna BCG fue muy superior a los péptidos manteniendo el 100% de sobrevida para el final del experimento, sin embargo, los animales presentaban

síntomas severos de la progresión de la enfermedad como pérdida de peso y dificultad al respirar.

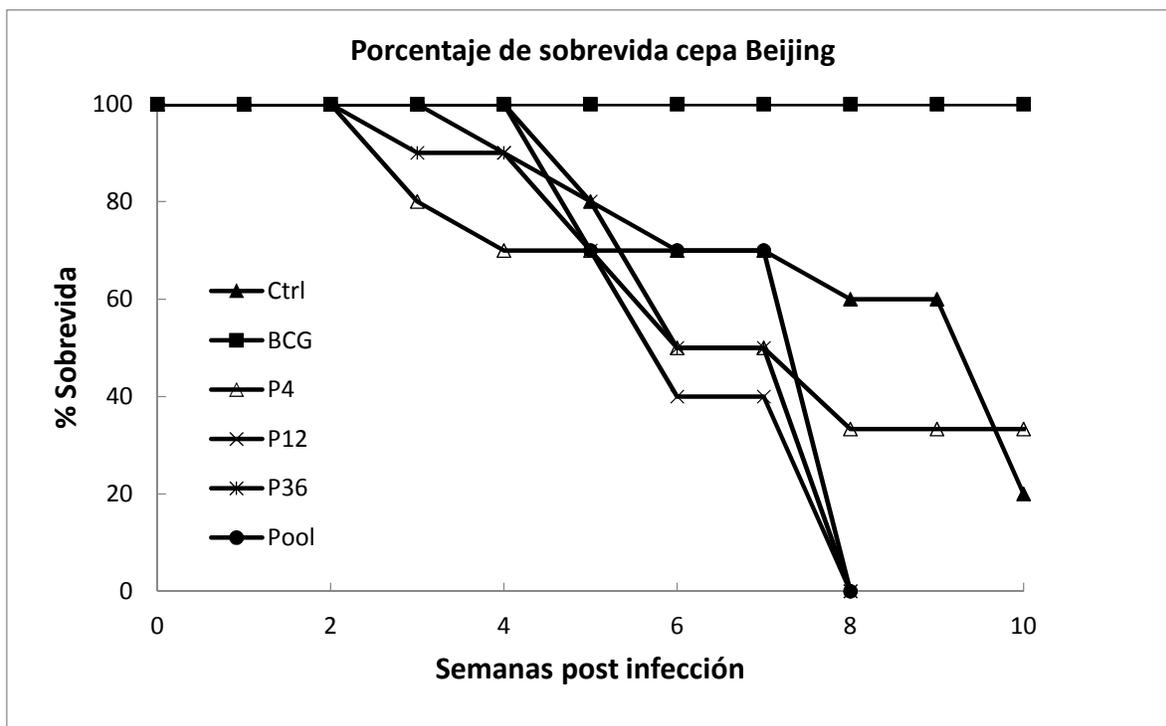


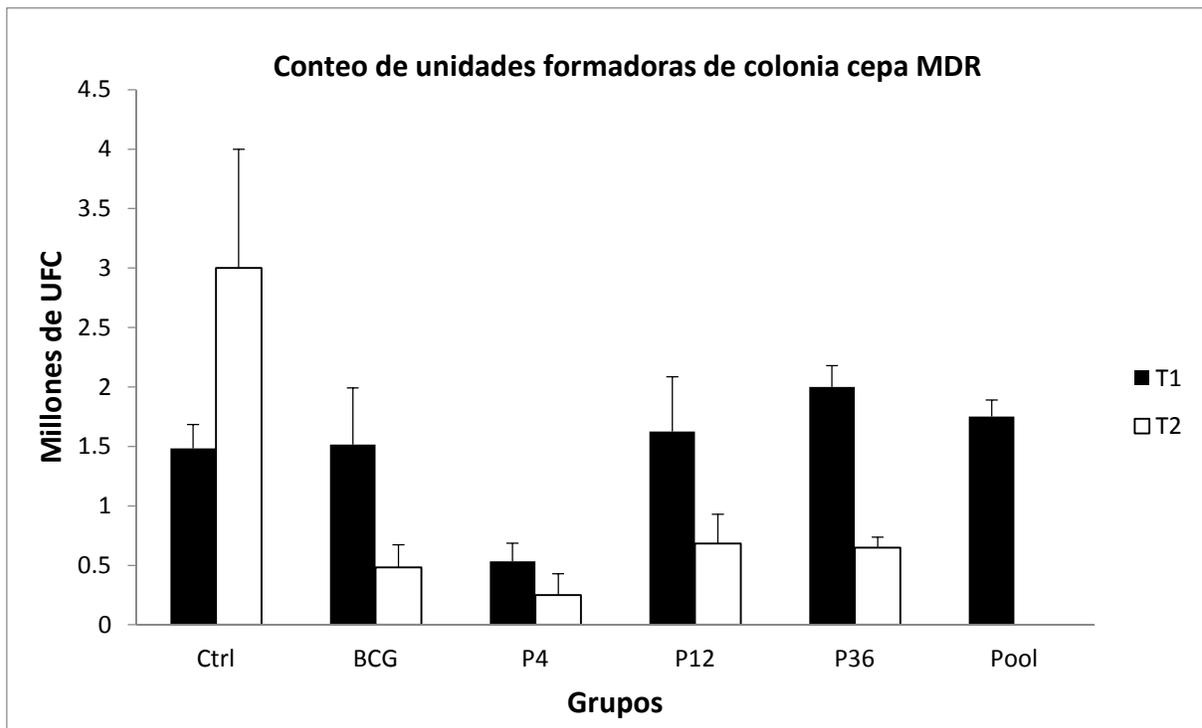
Figura 4. Porcentaje de sobrevivencia para animales infectados con *M. tuberculosis* Beijing.

## 6.2. Carga bacilar

Otro parámetro utilizado para evaluar la efectividad de los péptidos utilizados en la inmunización fue el conteo de unidades formadoras de colonias (UFC's) ya que el crecimiento bacteriano está relacionado con la progresión de la enfermedad.

Los grupos de animales retados con *M. tuberculosis* cepa MDR presentan un comportamiento similar en cuanto a la carga bacilar en pulmón para el primer tiempo de

sacrificio (mes dos después del reto), sin embargo, como se aprecia en la figura 5, el grupo p4 presenta un conteo muy inferior al resto manteniéndose por debajo del millón de UFC's.

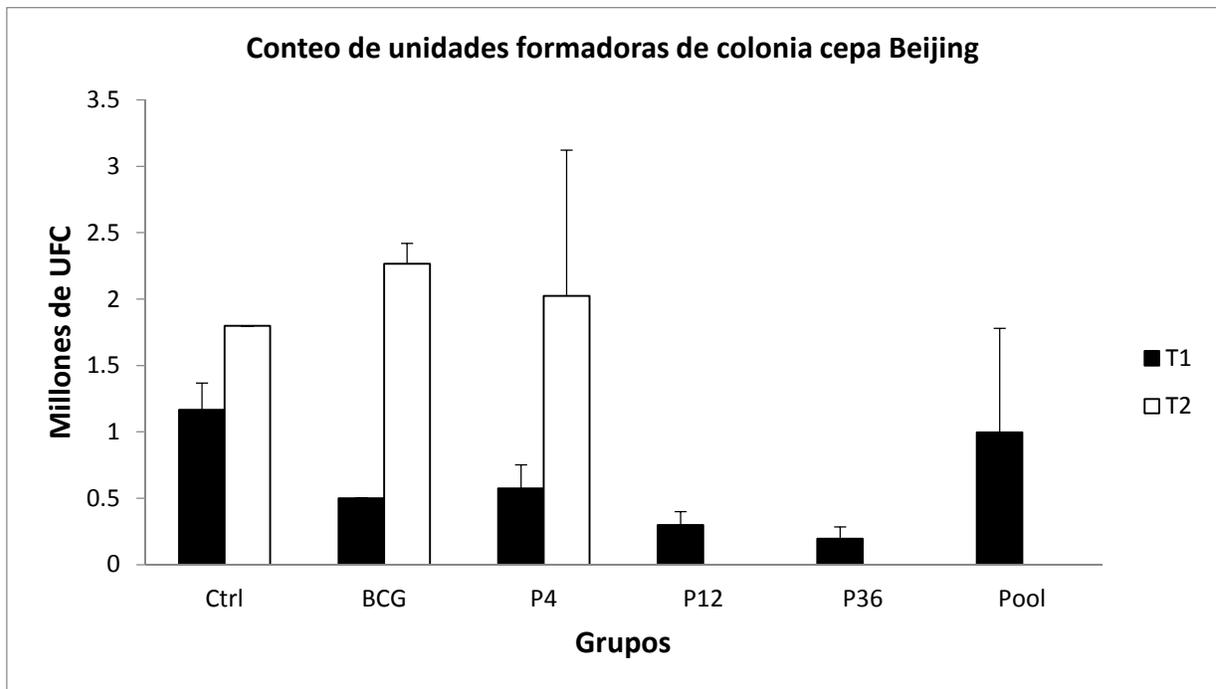


**Figura 5.** Carga bacilar para los distintos grupos de animales infectados con *M. tuberculosis* MDR, donde se muestran los dos tiempos de sacrificio. Tiempo 1, dos meses post-infección (T1) y tiempo 2, cuatro meses post-infección (T2).

Para el cuarto mes la carga bacilar en pulmón desciende de manera significativa en todos los grupos con excepción del grupo control donde el conteo de UFC's alcanzó los 3 millones. El único grupo donde no fue posible realizar el conteo al tiempo dos fue el coctel peptídico (pool), ya que en este grupo todos los ratones habían muerto para la semana 11

post infección. Una vez más el grupo p4 se mantuvo por debajo del resto al tener una carga bacilar de 250, 000 UFC al segundo tiempo de sacrificio.

En el caso de los animales retados con *M. tuberculosis* cepa de Beijing (figura 6) los tiempos de sacrificio se realizaron en un periodo de tiempo menor a diferencia de los retados con *M. tuberculosis* MDR debido a que la progresión de la enfermedad y manifestaciones clínicas se presentaron rápidamente, acelerando la muerte de los ratones. Los tiempos de sacrificio se realizaron a las 5 y 10 semanas post reto. Al tiempo uno de sacrificio la carga bacilar no es tan elevada como como en los animales retados con MDR, sin embargo, las manifestaciones clínicas de la enfermedad se presentaron de manera más acelerada, por este motivo en los grupos inmunizados con: p12, p36 y el pool no fue posible realizar el conteo bacteriano al segundo tiempo de sacrificio ya que todos los ratones habían muerto para la semana 8. En los grupos restantes la carga bacilar aumentó de manera considerable para el final del experimento.



**Figura 6.** Carga bacilar para los distintos grupos de animales infectados con *M. tuberculosis* Beijing, donde se muestran los dos tiempos de sacrificio. Tiempo 1, 5 semanas post-infección (T1) y tiempo 2, 10 semanas post-infección (T2).

## VII. DISCUSIÓN

En base a la controversia causada por la actual vacuna BCG es de vital importancia el desarrollo de nuevos agentes preventivos eficaces para el control de la tuberculosis en el mundo. El uso de péptidos sintéticos para vacunación parece una tarea difícil debido al grado de complejidad de la respuesta inmune inducida por la *M. tuberculosis*, sin embargo, es una propuesta atractiva dada su simplicidad y seguridad para el desarrollo de una futura vacuna anti TB [54].

La óptima evaluación de la eficacia de nuevas terapias contra la tuberculosis, incluyendo nuevas vacunas, fármacos y terapias dirigidas al hospedero, requieren un modelo animal apropiado. En vista de la importancia de la formación del granuloma y el mantenimiento de la patogénesis de la TB, es claro que los modelos animales deben mostrar propiedades que representen en gran medida las características observadas en humanos, a pesar de que los modelos animales actuales no son réplicas exactas de la patogénesis de la enfermedad en humanos, cada modelo ofrece ciertos atributos.

Una de las razones para utilizar el modelo murino es el bajo costo de los animales y sus gastos de manutención con respecto a otras especies.

Por otro lado hay que mencionar las desventajas del modelo murino de tuberculosis, como son la reducción de variabilidad genética, que pueda representar a la población humana. La falta de correlación en ciertos aspectos con la patogenia en humanos como la falta de necrosis central en los granulomas de ratones infectados por el tracto respiratorio. La localización de los macrófagos y células T en humano y ratón no son idénticas [55].

En este trabajo se puso a prueba la capacidad protectora de tres péptidos desarrollados a partir de secuencias proteicas presentes en *M. tuberculosis* utilizando un modelo murino.

En cuanto al diseño experimental es importante señalar que para los retos se utilizaron dos cepas de *M. tuberculosis* con diferentes características a nivel de virulencia, drogorresistencia, prevalencia y distribución en el mundo. Esto con el fin de abarcar un amplio espectro antigénico ya que en los últimos años la aparición de nuevas cepas más virulentas y drogorresistentes va en aumento.

El efecto protector de los péptidos se evaluó mediante porcentajes de sobrevida y carga bacilar en pulmón. La inmunización con la vacuna BCG se utilizó a modo de comparar si la protección conferida por los péptidos, si es que la hubiese, se desempeña de manera similar, superándola o si está por debajo a la protección conferida por BCG.

En el grupo de animales retados con la cepa Beijing, El desempeño de los péptidos fue pobre, los ratones inmunizados con el p4, p12 y p36 no fueron capaces de mantener el porcentaje de sobrevida de los animales ni de contener o disminuir la carga bacilar en pulmón. Si bien la vacuna BCG tampoco fue capaz de contener el crecimiento bacteriano, prolongo la vida de los animales hasta el final del experimento. A pesar de mantenerse el 100% de sobrevida para el final del experimento, la progresión de la enfermedad fue notable, los ratones presentaron manifestaciones clínicas importantes como pérdida de peso y dificultad para respirar. Por otro lado no podemos considerar significativo que la inmunización con BCG mantuviera el 100% de sobrevida ya que los tiempos de sacrificio fueron muy cortos debido a la hipervirulencia de la cepa utilizada.

En el grupo de animales retados con *M. tuberculosis* MDR los ratones inmunizados con p4, p12 y p36 mostraron un buen desempeño en cuanto a protección se refiere. Si bien los porcentajes de supervivencia oscilan entre el 35 y 80 por ciento para el final del experimento, la carga bacilar en pulmón disminuyó de manera considerable para el segundo tiempo de sacrificio. Este decremento en la carga bacteriana en pulmón nos indica que la administración de los péptidos p4, p12 y p36 confiere inmunidad protectora contra *M. tuberculosis* MDR en el modelo murino. En el caso de los ratones vacunados con BCG, la supervivencia y carga bacilar tuvo un comportamiento similar al de los animales inmunizados con los péptidos. Si bien el desempeño de los péptidos p4, p12 y p36 estuvo a la altura de la vacuna BCG en cuanto a porcentajes de supervivencia y carga bacilar al segundo tiempo de sacrificio, el grupo inmunizado con p4 es sobresaliente al retrasar el crecimiento bacteriano manteniéndose muy por debajo del resto de los grupos en el conteo de UFCs al primer y segundo tiempo de sacrificio.

Dada la capacidad de los péptidos p4, p12 y p36 para inducir altos niveles de IFN- $\gamma$  en cultivos de células pulmonares de ratón (publicación en proceso), pensamos que el efecto protector de los péptidos contra *M. tuberculosis* MDR en este modelo está relacionado con una prolongación de la fase aguda de la infección al mantener un patrón de citosinas Th1, la infección con tuberculosis es principalmente controlada por la inmunidad mediada por células. Citocinas de tipo Th1 como el IFN- $\gamma$  y citocinas proinflamatorias como TNF $\alpha$  juegan un papel central en este proceso, mediante la activación de macrófagos y la expresión de (iNOS). El Oxido nítrico producido es esencial, al menos en el ratón, para eliminar a la micobacteria intracelular. Esta actividad protectora disminuye si hay un marcado

incremento de citocinas th2. Este balance de citocinas ante la infección con TB se ve claramente representado en el modelo murino [51].

En ambos grupos de infección también se utilizó un coctel o pool, que incluye a los tres péptidos en conjunto, esto con el fin de potenciar la inmunidad protectora, sin embargo los resultados no fueron los esperados. En el caso de los animales retados con MDR este grupo tuvo el desempeño más pobre ya que aceleró la progresión de la enfermedad en los ratones, en cuanto a la carga bacilar no fue posible evaluarla al final del experimento ya que todos los animales murieron antes del tercer mes. Es posible que el uso de este coctel promoviera una respuesta inflamatoria aguda que en este caso fue perjudicial comprometiendo la salud de los ratones.

## VIII. CONCLUSIONES

- La inmunización de ratones con los péptidos p4, p12 y p36 confiere protección contra *M. tuberculosis* MDR disminuyendo la carga bacilar en pulmón y prolongando la vida de los animales.
- El péptido p4 presenta un desempeño sobresaliente disminuyendo la carga bacilar en pulmón en ratones retados con *M. tuberculosis* MDR.
- La actividad protectora de los péptidos p4, p12 y p36 no presenta diferencias significativas a nivel de carga bacilar en pulmón con respecto a BCG en ratones retados con *M. tuberculosis* MDR
- No existe actividad protectora por parte de los péptidos p4, p12 y p36 ante la infección con *M. tuberculosis* Beijing.
- El pool de péptidos tuvo efectos adversos a nivel de sobrevida y carga bacilar en pulmón, acelerando la muerte de los animales.

## IX. PERSPECTIVAS

El efecto protector de los péptidos p4, p12 y p36 promete ser una herramienta importante en el desarrollo de futuras vacunas anti TB dada su capacidad de proveer inmunidad protectora en el modelo murino.

Es posible aumentar la protección conferida de estos péptidos al ser conjugados con moléculas acarreadoras como algunas toxinas a manera de tener una mayor presencia antigénica.

Si bien los péptidos p4, p12 y p36 tuvieron un desempeño similar a la vacuna BCG contra *M. tuberculosis* MDR en el modelo murino, es posible potenciar el desempeño de BCG al actuar en conjunto con alguno de estos péptidos.

En base a los resultados obtenidos en este trabajo, es importante profundizar en el conocimiento de la actividad protectora de los péptidos probados a nivel de expresión de citocinas, pruebas histopatológicas y otros parámetros que nos permitan caracterizar su actividad a nivel inmunológico para comprenderlo mejor y desarrollar nuevos diseños experimentales que nos permitan mejorar su capacidad inmunogénica.

## X. BIBLIOGRAFÍA

1. **Bloom B.R., 1994.** Tuberculosis: Pathogenesis, Protection, and Control. *American Society for Microbiology Press, USA.*
2. **Schlossberg, D. 2000.** Tuberculosis e infecciones por micobacterias no tuberculosas. Mc Graw Hill. Cuarta edición. USA.
3. **Sudre P, Ten Dam G, Kochi A. 1992.** Tuberculosis in the present time: A global overview of the tuberculosis situation. *Bull World Health Organ.* 70(2): 149-59.
4. **Cauten GM, Pio A, tem Dam HG. 2002.** Annual Risk of Tuberculosis Infection. *Bull World Health Organ.* 80(6): 503-11
5. **Davey S. 2001.** New global plan to halt TB. *Bull World Health Organ.* 79(12):1172-3.
6. **Gazzard B. 2001.** Tuberculosis, HIV and the developing world. *Clin Med* 1(1): 62-8.
7. **Rajagopalan S. 2001.** Tuberculosis and Aging: A Global Health Problem. Aging and infectious diseases. *Clin infect Dis.* 1; 33(7): 1034-9.
8. **WHO Report 2003.** Global Tuberculosis Control. Surveillance, Planning, Financing. *Bull World Health Organ.* <http://www.who.int/gtb>
9. **Cole S. T. 2002.** Comparative and functional genomics of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Microbiology.* 85: 2919-28.
10. **Zugar, A., and F. D. Lowy. 1996.** Tuberculosis of the, meninges, and the spinal cord, *In* Tuberculosis. Little, W. N. Room and S. Gary (ed.), Brown and Col., Boston, Mass. p. 541 – 556.
11. **Leung AN. 1999.** Tuberculosis: the essentials. *Radiology.* 210(2): 307-22.
12. **Cardona P, Auxina V. 2000.** Histopathology of tuberculosis. Approaching the development of pulmonary lesions through an aerosol-induced experimental model in animals. *Arch Bronconeumol;* 36(11): 645-50.

13. **Clark-Curtiss JE, Haydel SE. 2003.** Molecular genetics of *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis. *Annu Rev Microbiol.* 57: 517-49.
14. **Falkow S. 2004.** Molecular Koch's postulates applied to bacterial pathogenicity a personal recollection 15 year later. *Nature Rev Microbiol.* 2(1): 67-72.
15. **Milburn HJ. 2001.** Primary tuberculosis. *Curr Opin Pulm Med.* 7(3): 133-41.
16. **Báez-Saldaña R, Pérez-Padilla R, Salazar-Lezama M. 2003.** Discrepancias entre los datos ofrecidos por la secretaría de salud y la Organización Mundial de la Salud sobre la tuberculosis en México, 1981-1998. *Salud Pública Mex.* 45(2): 78-83.
17. **Pérez-Padilla R. 2001.** La tuberculosis en México, deuda añeja de salud pública. *Gac Med Mex.* 137(1): 93-4.
18. **García ML, Valdespino JL. 1994.** Tuberculosis. En: Valdespino et al, ed. *Enfermedad Tropicales en México*, México, D.F: Secretaría de Salud: 215-228.
19. **Valdespino JL, Izazola JA, Rico B. 1989.** AIDS in Mexico: Trends and projections. *Bull Pan Am Health Organ.* 23(1,2): 20-3.
20. **Kaufmann S. 2001.** How can immunology contribute to the control of tuberculosis? *Nature Reviews Immunology.* 1: 20-30.
21. **Barrios J,** Participación de los neutrófilos en la tuberculosis pulmonar experimental murina. Tesis de maestría; Facultad de Ciencias, UNAM; División de Patología Experimental, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubiran".
22. **Collins H., Kaufmann S. 2001.** The many faces of host responses to tuberculosis. *Immunology.* 103: 1-9.
23. **Abbas AK., Lichtman AH et Pober JS. 2002.** *Inmunidad frente a los microorganismos* en *Inmunología Celular y Molecular*, 4ª edición, España, McGraw-Hill – Interamericana de España, pag 360-364.

24. **Flynn JL., Chan J. 2001.** Immunology of tuberculosis. *Annu Rev Immunol.* 19: 93-129.
25. **Roach DR., Briscoe H, Britton WJ. 2001.** Secreted lymphotoxin- $\alpha$  is essential for the control of an intracellular bacterial infection. *J. Exp. Med.* 193 (2): 239-46.
26. **Holt P. 2000.** Antigen Presentation in the lung. *Am J Respir Crit Care Med.* 162: 151-56.
27. **Feng CG., Bean AGD., Britton WJ. 1999.** Increase in gamma interferon-secreting CD8+, as well as CD4+, T cells in lungs following aerosol infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect immun.* 67(7): 3242-47.
28. **Hernandez-Pando R., Orozco H., Sampieri A. 1996.** Correlation between kinetics of Th1/Th2 cells and pathology in a murine model of experimental pulmonary tuberculosis. *Immunology.* 89: 26-33.
29. **Caruso AM., Serbina N., Flynn JL. 1999.** Mice deficient in CD4 T cells have only transiently diminished levels of INF- $\gamma$ , yet succumb to tuberculosis. *J immunol.* 162: 5407-16.
30. **Abbas AK., Murphy KM., Sher A. 1996.** Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature.* 383: 787-93.
31. **Rojas-Espinoza O. 2001.** Inducción de las respuestas inmunitarias en inmunología (de memoria), 2ª edición, México, Ed Médica Panamericana, pag 88-91.
32. **Howard AD. and Zwillig BS. 1999.** Reactivation of tuberculosis is associated with a shift from type 1 to type 2 cytokines. *Clin Exp Immunol*, 115: 428-34.
33. **Wangoo A., Sparer T., Young DB. 2001.** Contribution of Th1 and Th2 cells to protection and pathology in experimental models of granulomatous lung disease. *J. Immunol.* 166: 3432-39.

34. **Hernandez-Pando R., Aguilar D., Graham R. 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.
35. **Seah GT., Scott GM and Rook GAW. 2000.** Type 2 cytokine gene activation and its relationship to extent of disease in patients with tuberculosis. *J Infect Dis.* 181: 385-89.
36. **Van Crevel R., Karyadi E., van der Meer JWM. 2000.** Increased production of interleukin 4 by CD4+ and CD8+ T cells from patients with tuberculosis is related to the presence of pulmonary cavities. *J Infect Dis.* 181: 1194-97.
37. **Orme IM., Roberts AD., Abrams JS. 1993.** Cytokine secretion by CD4 T lymphocytes acquired in response to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Immunol.* 151: 518-25.
38. **North RJ.** Mice incapable of making IL-4 or IL-10 display normal resistance to infection with *Mycobacterium tuberculosis*.
39. **Jung YJ., LaCourse R., North RJ. 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 infections in mice. *Infect immune.* 70(11): 6436-43.
40. **Lin Y., Zhang M., Barnes P. 1996.** Absence of a prominent Th2 cytokine response in human tuberculosis. *Infect immune.* 64(4): 1351-56.
41. **Feng CG., Britton WJ. 2000.** CD4+ y CD8+ T cells mediate adoptive immunity to aerosol infection of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin. *J Infect Dis.* 181(5): 1846-49.
42. **Turner J., Frank AA., Orme IM. 2002.** Old mice express a transient early resistance to pulmonary tuberculosis that is mediated by CD8 T cells. *Infect immune.* 70(8): 4628-37.

43. **Urdahl KB., Liggitt D., Bevan MJ. 2003.** CD8+ T cells accumulate in the lungs of Mycobacterium tuberculosis-infected Kb-/-Db-/-mice, but provide minimal protection. *J Immunol.* 170(4): 1987-94.
44. **Stenger S., Hanson DA., Modlin RL. 1998.** An antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin. *Science.* 282: 121-25.
45. **Staed W. 1997.** The origin and erratic global spread of tuberculosis, How the past explains the present and is the key to the future. *Clin Chest Med.* 18: 65-77.
46. **Flynn A. 2001.** Tuberculosis: latency and reactivation. *Infect and immune.* 69: 4195-4201.
47. **Orme LM. 1996.** The immune response to tuberculosis in animal models. In W. N. Rom. And S. Garay, tuberculosis. Little, Brown and Co., Boston Mass. Pp: 269-280.
48. **Flynn J.L. 2004.** Immunology of tuberculosis and implications in vaccine development., *tuberculosis* 84, 93-101.
49. **Surcel H.M., Trye-Blomberg M., Paulie S. 1994.** Th1/Th2 profiles in tuberculosis, based on the proliferation and cytokine response of blood lymphocytes to mycobacterial antigens. *Immunology* 81, 171.
50. **Orme I.M., Roberts A.D., Griffin J.P. & Abrams J.S. 1993.** Cytokine secretion by CD4 T lymphocytes acquired in response to Mycobacterium tuberculosis infection. *J Immunol* 151, 518.
51. **R. Hernández- Pando., H. Orozco E., A. Sampieri., L. Pavón., C. Velasquillo., J. Larriva- Sahd., J.M. Alcocer., M.V. Madrid. 1996.** Correlation between the kinetics of Th1/Th2 cells and pathology in a murine model of experimental pulmonary tuberculosis. *Immunology* 89 26-33.
52. **Kaufmann S. H.E., 2000.** Is the development of a new tuberculosis vaccine possible? *Nature Medicine*, 6(9): p. 955-960.

53. **Thomas P . Hopp, 1984.** Immunogenicity of a synthetic HBsAg peptide: Enhancement by conjugation to a fatty acid carrier. *Molecular immunology* 21: 13 - 16
54. **Upadhyay Abhishek., Sivapurapu Neela., Rath Archana., Gupta Satish. 2002.** Rationale of Synthetic Peptides as Immunogens for Vaccine Development. *Indian natn Sci Acad.* 1 pp 97-114.
55. **Apt, A., and Kramnik, I. 2009.** Man and Mouse TB: contradictions and solutions. *Tuberculosis (Edinb)* 89, 195-198