



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

EVALUACIÓN DEL POTENCIAL DE
Mycobacterium microti COMO VACUNA
CONTRA LA TUBERCULOSIS

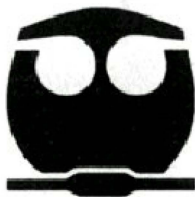
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A :

JACQUELINE LARRACILLA CAMACHO



MÉXICO, D. F.

2006



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.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE:	LUCIANO HERNÁNDEZ GÓMEZ
VOCAL:	MÓNICA BERENICE HERAS CHAVARRÍA
SECRETARIO:	YOLANDA LÓPEZ VIDAL
1er. SUPLENTE:	MARCO ANTONIO CERBÓN CERVANTES
2o. SUPLENTE:	GONZALO CASTILLO ROJAS

Sitio en donde se desarrolló el tema:

Programa de Inmunología Molecular Microbiana, Departamento de Microbiología
y Parasitología, Facultad de Medicina, UNAM.

Dra. Yolanda López Vidal
Asesor

Dr. Mauricio Castañón Arreola
Supervisor Técnico

Jacqueline Larracilla Camacho
Sustentante

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Yolanda López Vidal y al Dr. Mauricio Castañón Arreola por todo el apoyo brindado y por compartir conmigo sus conocimientos, su experiencia y su tiempo para la realización de este trabajo.

Al Dr. Rogelio Hernández Pando, del laboratorio de Patología Experimental, Instituto Nacional Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”, por proporcionar los recursos y la infraestructura necesarios para llevar a cabo este estudio.

A la Dra. Irasema Yela Miranda, a la M. en C. Xóchitl Vega Manriquez, al M. en C. Hugo Esquivel Solís y al Dr. Alejandro de la Peña Moctezuma, de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, por su valiosa colaboración y por las facilidades brindadas durante el desarrollo de esta tesis.

Finalmente, un reconocimiento especial para la Universidad Nacional Autónoma de México, por el apoyo económico otorgado al “Programa Transdisciplinario en Investigación y Desarrollo para Facultades y Escuelas” para el Megaproyecto “Nuevas Estrategias Epidemiológicas, Genómicas y Proteómicas en Salud Pública”; en la línea de investigación Tuberculosis (Proyecto No. SDEI. PDiT.05.4); con financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, proyecto G36923-M.

DEDICATORIAS

Para la UNAM y para las escuelas de Educación Pública de nivel básico.

¡Mil gracias!

Para mi mamá, Irene Teresa.

Quien no sólo me ha dado la vida y sus incansables horas de sacrificio y dedicación, sino que también me ha mostrado el mejor de todos los ejemplos de lucha y superación. ¡Tú hiciste esto posible!

Para mi hermana, Claudia Irene.

Por su cariño, su comprensión y su apoyo incondicional. Por creer en mí y motivarme para no rendirme. Por ser mucho más que mi hermana mayor.

Para mi papá, Ricardot.

Donde quiera que estés, espero ser un motivo de orgullo para tí.

Para mis tíos Jesús, Paz, Concepción, Martín, Manuel, Agustín, Alfonso, Guadalupe y Jorge; y para mis abuelitos Carmen y Alfonso.

Por brindarme su ayuda en los buenos y en los malos momentos. Por estar pendiente de mí todo el tiempo. Por alentarme a ser una persona mejor.

Para mis primos Noemí, Sagrario, Luis y Daniel.

Por ser como mis hermanos mayores. Por aportar una parte muy importante de mi formación y por apoyarme cada momento.

Para mis amigos de siempre Lupita, Gaby, Citlalli, Katy, Ale, Dianis, Angie, Andy, Alex, Martín y Jonathan; y para todos mis compañeros más cercanos de la Facultad de Química.

Por hacer más agradables los ratos difíciles. Por todas sus atenciones, su aprecio, sus consejos, sus enseñanzas y su solidaridad.

Para Adriana, Carol, Iliana, Ivonne, Karina, Liz, Martha, Neli, Paty, Rox, Tere, Xóchitl, Hugo, Mau, Gustavo y Fer.

Por amenizar mi estancia en el laboratorio, por su amistad y por su ayuda.

Para todos mis compañeros del Programa de Inmunología Molecular Microbiana:

Por brindarme su apoyo todo el tiempo.

Para Maribel, Dr. Mauricio Castañón, Dr. Gonzalo, Dra. Maritoña, Dra. Yolanda.

Por interesarse siempre en mí. Por contribuir a mi formación profesional y personal, por su apoyo, su paciencia y sus palabras de aliento.

INDICE

	Página
AGRADECIMIENTOS	iii
DEDICATORIAS	iv
ÍNDICE	vi
RESUMEN	viii
ABREVIATURAS	ix
1. ANTECEDENTES	1
1.1 Tuberculosis	1
1.2 <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	1
1.3 Epidemiología de la tuberculosis	4
1.3.1 En el mundo	4
1.3.2 En México	7
1.4 Patogénesis y respuesta inmune	9
1.4.1 Respuesta inmune innata	10
1.4.2 Respuesta inmune adquirida	11
1.4.2.1 El granuloma	12
1.5 Vacunación contra tuberculosis: el bacilo de Calmette y Guérin	14
1.6 Nuevas vacunas contra tuberculosis	17
1.6.1 Vacunas de subunidades	18
1.6.2 Vacunas de DNA	19
1.6.3 Vacunas recombinantes	20
1.6.4 Vacunas de micobacterias mutantes y auxótrofas	21
1.6.5 Vacunas no micobacterianas	21
1.6.6 Vacunas de otras micobacterias	22
1.7 <i>Mycobacterium microti</i>	22
1.8 Modelos animales en la evaluación de nuevas vacunas	24
1.8.1 El modelo murino	24
1.8.2 El modelo de cobayo	25
1.8.3 El modelo de conejo	25
2. JUSTIFICACIÓN	27
3. OBJETIVO	28
4. MATERIAL Y METODOLOGÍA	29
4.1 Cepas bacterianas	29
4.2 Preparación de inóculos	29
4.3 Animales de estudio	30

4.4 Vacunación de los ratones	30
4.5 Modelo de infección	30
4.6 Carga bacilar en pulmón	32
4.7 Análisis histopatológico	32
4.8 Análisis estadístico	33
5. RESULTADOS	34
5.1 UFC en pulmón	34
5.2 Análisis histopatológico	38
6. DISCUSIÓN	43
7. CONCLUSIONES	48
8. PERSPECTIVAS	49
9. REFERENCIAS	50

RESUMEN

La vacunación con BCG es hasta el momento la medida más importante para prevenir la tuberculosis. No obstante, dado que su eficacia varía entre 0 y 80%, es preciso desarrollar nuevas y mejores vacunas. Durante los últimos años, se ha evaluado una gran variedad de alternativas de vacunas contra tuberculosis. Una opción explorada en la segunda mitad del siglo XX fue el uso de *Mycobacterium microti*, ya que es filogenéticamente cercana a *M. tuberculosis* y no es patógena para el ser humano. Recientemente, la idea ha sido retomada para el desarrollo de nuevas vacunas. En este trabajo se evaluó el potencial de *M. microti* como vacuna contra tuberculosis; para ello se utilizó un modelo murino de tuberculosis pulmonar progresiva. En este modelo, los animales se vacunaron subcutáneamente con *M. microti* y posteriormente (2, 4 y 8 meses) se determinó su capacidad para disminuir la carga bacilar en pulmón y el daño histopatológico tras una infección con la cepa tipo *M. tuberculosis* H37Rv y el aislamiento 950 1000 perteneciente al genotipo Beijing. La vacunación con *M. microti* redujo significativamente las unidades formadoras de colonia en pulmón y el tejido pulmonar afectado con neumonía en una infección con *M. tuberculosis* H37Rv. Se encontró que *M. microti* proporcionó protección contra tuberculosis al segundo y cuarto mes post-infección con *M. tuberculosis* H37Rv comparable a la observada en los grupos vacunados con BCG.

1. ANTECEDENTES

1.1 Tuberculosis

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa ocasionada por un grupo de bacilos denominado complejo *Mycobacterium tuberculosis*, el cual incluye a las especies *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. canetti* y *M. caprae*. Dichas especies se agrupan en ese complejo dado que causan tuberculosis en humanos o mamíferos. Entre ellas existe más de un 99.9% de similitud en su secuencia de DNA y en la unidad 16S del rRNA ^{8, 12, 24, 57, 59, 62}.

1.2 *Mycobacterium tuberculosis*

La tuberculosis es una de las enfermedades más antiguas que se conocen a lo largo de la historia de la humanidad. En papiros egipcios se encuentran relatos de padecimientos cuyas características indican que se trata de tuberculosis no sólo pulmonar. Tanto los asirios como Hipócrates describen pacientes con hemoptisis (esputo sanguinolento). En el Antiguo Testamento, se narra que los israelitas padecían tuberculosis durante su cautiverio en Egipto. Por otro lado, el análisis molecular de muestras de huesos de momias egipcias con signos de espondilitis, encontrados en tumbas de la necrópolis de Tebas (1450-550 a. C.), ha confirmado la presencia de DNA de *M. tuberculosis*, lo que constituye una evidencia de que los individuos de las poblaciones antiguas experimentaron la diseminación sistémica de la enfermedad ^{57, 64}.

Pese a su existencia milenaria, se le dio importancia hasta 1882 cuando Robert Koch descubrió al agente etiológico de tuberculosis humana, al cual denominó *Mycobacterium tuberculosis*. Éste se clasifica en el orden de los actinomicetales, dentro de la familia *Mycobacteriaceae* ^{27, 43, 55}. Es un bacilo recto o ligeramente curvo.

Mide 0.2 a 0.6 μm de ancho por 1.0 a 10 μm de largo. Es aerobio, no esporulado, inmóvil y no capsulado (figura 1). Puede sobrevivir y multiplicarse dentro de los macrófagos y de otras células de mamíferos ^{27, 50}.

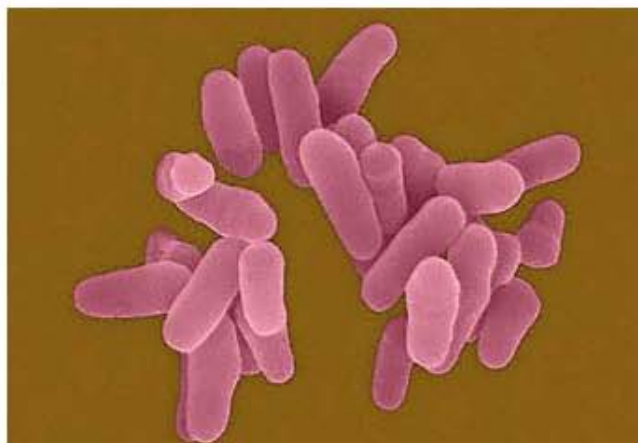


Figura 1. Micrografía de barrido electrónico de *M. tuberculosis*. Dennis Kunkel; Microscopy, 2004.

Mycobacterium tuberculosis comparte con la mayoría de las micobacterias una pared celular única en su composición, caracterizada por la presencia de un alto contenido de lípidos (50 al 60%), sobresaliendo las ceras D, los sulfolípidos, triglicéridos y ácidos micólicos (figura 2). Los ácidos micólicos son ácidos grasos complejos de gran importancia taxonómica para las micobacterias y las bacterias de géneros relacionados, como *Nocardia* y *Corynebacterium*. En el caso de las micobacterias, los ácidos micólicos tienen de 70 a 80 átomos de carbono. Éstos se encuentran formando un complejo macromolecular junto con el arabinogalactano-peptidoglicano. Es esta pared la que le confiere a *M. tuberculosis* la resistencia tanto a la desecación como a la decoloración con alcohol-ácido cuando se tiñe con colorante básico. Es una barrera efectiva frente a muchos de los agentes antifímicos convencionales, le proporciona el carácter hidrofóbico, la hace refractaria al ataque por hidrólisis enzimática y representa una adaptación para su vida intracelular ^{27, 55, 64}.

En las micobacterias los derivados de los fosfolípidos se caracterizan por estar altamente glicosilados, dando lugar a moléculas como la lipoarabinomanana (LAM), que tienen un papel fundamental en la patogénesis de la tuberculosis (figura 2) ^{27, 55}. Sobre la superficie del bacilo también existen otras sustancias lipídicas de importancia en el establecimiento de la infección, ya que interactúan con los componentes de la respuesta inmune y promueven la inhibición de sus funciones efectoras. De ellas, las más importantes son el factor cordón (trehalosa 6,6'-dimicolato), los sulfátidos y los micósidos, todos los cuales tienen una actividad biológica específica ⁶².

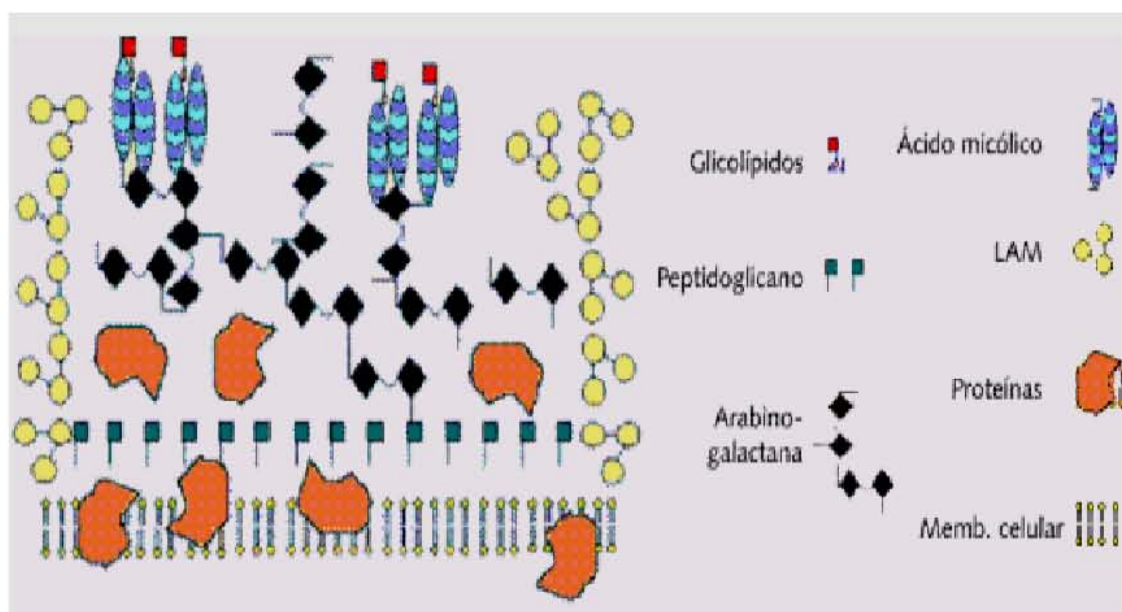


Figura 2. Representación esquemática de la pared celular de *M. tuberculosis*. La bacteria está envuelta dentro de una bicapa lipídica típica de membrana citoplasmática que permanece debajo del peptidoglicano. La pared de *M. tuberculosis* se caracteriza además por un complejo constituido por ácidos micólicos y arabinogalactano, el cual forma una barrera impermeable que impide el acceso de sustancias hidrofílicas y fármacos. La lipoarabinomanana es un componente estructural importante en la patogénesis de la tuberculosis ²⁷.

1.3 Epidemiología de la tuberculosis

1.3.1 En el mundo

En abril de 1993, la Organización Mundial de la Salud (OMS) declaró el estado de emergencia global de la tuberculosis. De acuerdo a sus estimaciones, cada año surgen de siete a ocho millones de casos nuevos y aproximadamente mueren tres millones de personas. El sureste asiático y el continente africano son las regiones con mayor incidencia y mortalidad (figura 3). Se ha estimado además, que entre el año 2000 y 2020, habrá un billón de casos nuevos, 200 millones de personas desarrollarán tuberculosis activa y 35 millones morirán si no se toman medidas urgentes para controlarla ^{26, 63}.

La situación se agrava debido al surgimiento de cepas multi-resistentes a fármacos y a la creciente coinfección con el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), misma que representa un riesgo anual de 7 al 10% para que la infección con *M. tuberculosis* progrese a enfermedad, y a la que se le asocia una mortalidad del 25% ^{1, 9, 19, 20, 26, 41, 63}.

La tuberculosis es una enfermedad relacionada con la pobreza: se acepta que las guerras, la desnutrición, la migración y el hacinamiento favorecen la diseminación de la tuberculosis entre los grupos donde los servicios de salud y las condiciones de higiene no son satisfactorias. La transmisión es común entre miembros de la familia, escuelas, hospitales, prisiones, hospicios y campamentos de refugiados. En la actualidad, la infección con VIH es el mayor factor de riesgo conocido que favorece la evolución a tuberculosis activa y diseminada, aunque existen otras causas que predisponen a los individuos para desarrollar la enfermedad: estados de inmunosupresión (tales como terapias con corticoesteroides y con antineoplásicos), enfermedades retículoendoteliales, silicosis, diabetes, alcoholismo, tabaquismo, drogadicción y estrés ^{26, 58, 62}.

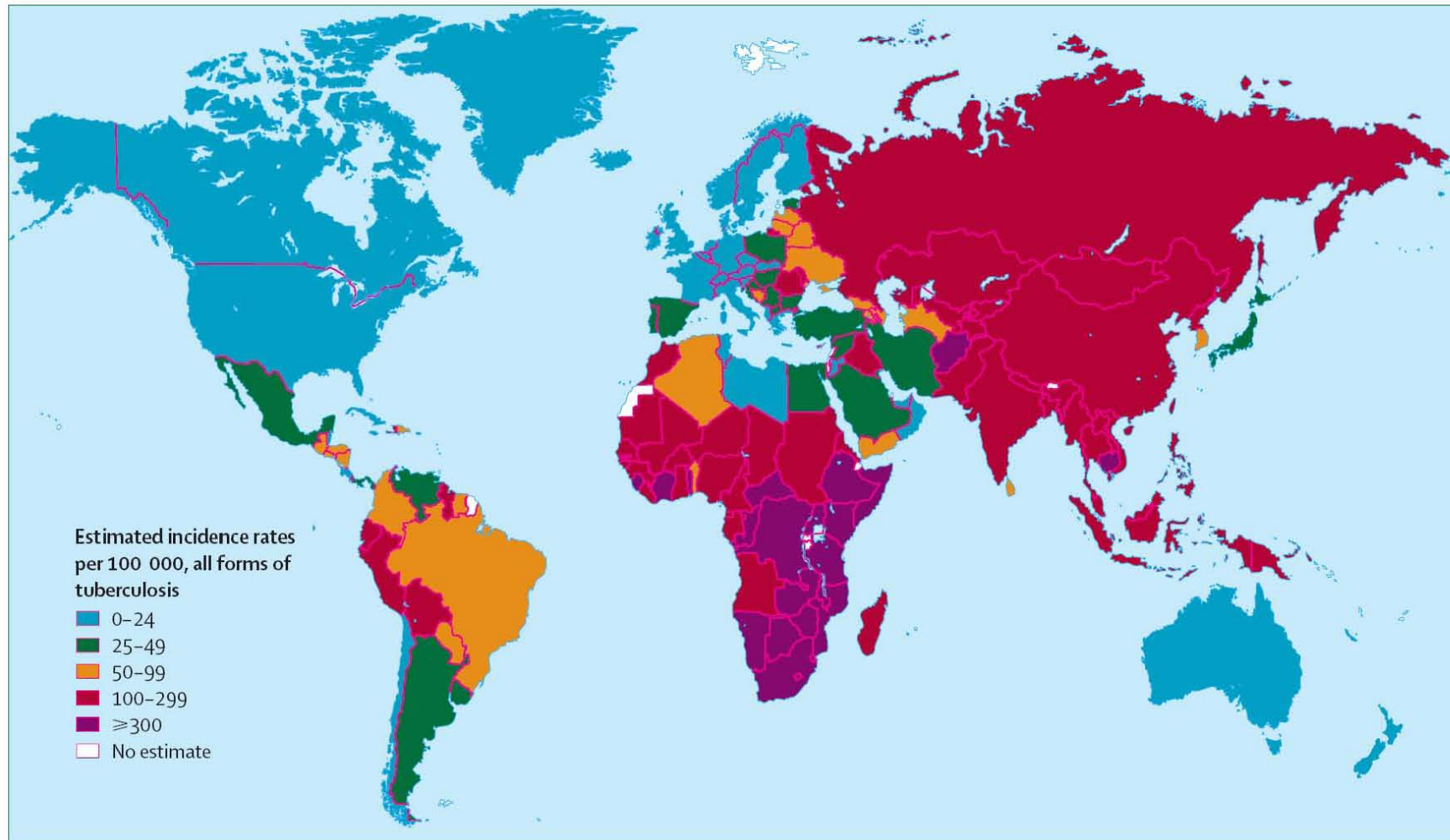


Figura 3. Incidencia mundial de la tuberculosis. En la figura se esquematizan los casos de tuberculosis por cada 100,000 habitantes estimada para el año 2003. The Lancet, 2006.

1.3.2 En México

En México, la tuberculosis afecta a todos los grupos de edad, particularmente a los adultos jóvenes. En la actualidad la OMS clasifica a México entre los países con tasas de morbilidad intermedia, es decir, mayor de 25 y menor de 49 casos por cada 100 000 habitantes. Sin embargo, en México sólo se diagnostican de 15,000 a 20,000 casos nuevos de tuberculosis al año ^{5, 25}. En la figura 4 se esquematiza la incidencia de tuberculosis pulmonar en la República Mexicana, por entidad federativa.

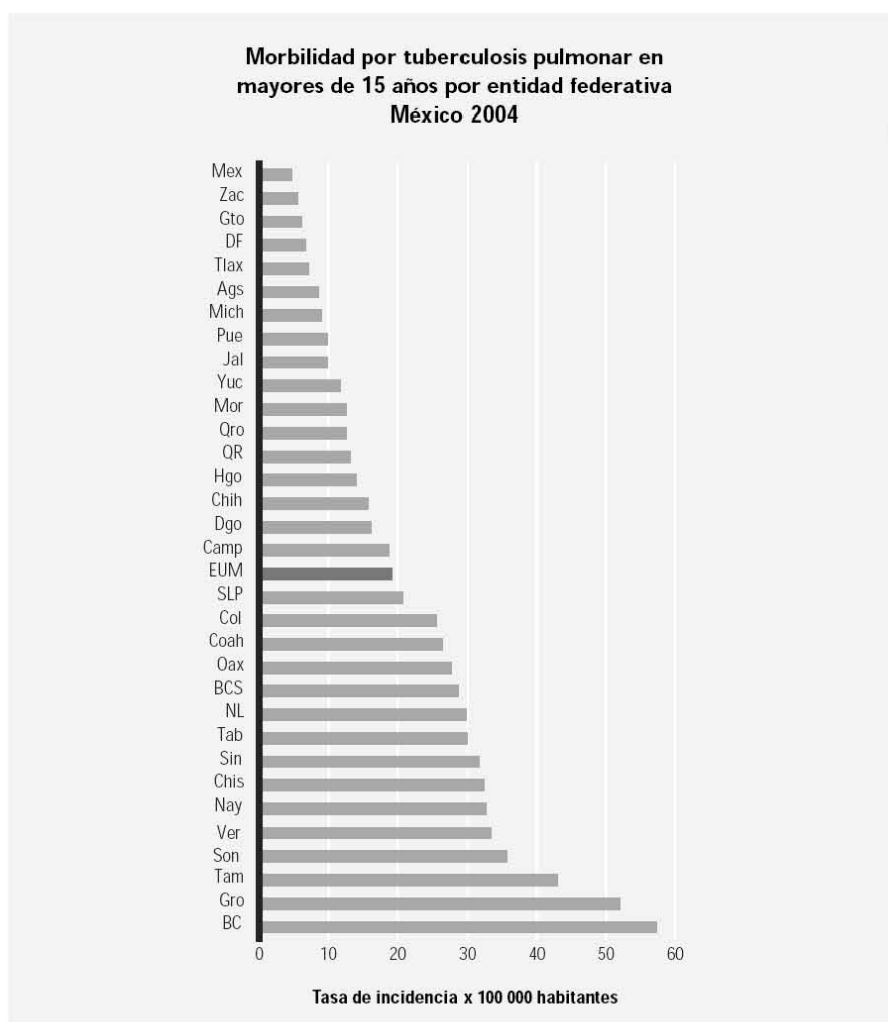


Figura 4. Morbilidad por tuberculosis pulmonar en México. Cada barra representa la tasa de incidencia de tuberculosis pulmonar por cada 100,000 habitantes. La barra marrón indica la tasa de incidencia por cada 100 000 habitantes registrada en los Estados Unidos Mexicanos en el año 2004. Salud: México 2004.

De acuerdo a los datos de morbilidad de los años 1990 a 2004 (figura 5), a partir de 1994 se incrementó la tasa de notificación de casos nuevos, en respuesta al informe de la Organización Panamericana de la Salud -publicado en ese mismo año y en el que se estimó que para ese año había un subregistro de casos nuevos en la República Mexicana y sólo se detectaban uno de cada 3 casos, lo que indica que dos terceras partes de los casos nuevos no recibieron tratamiento oportunamente

49.

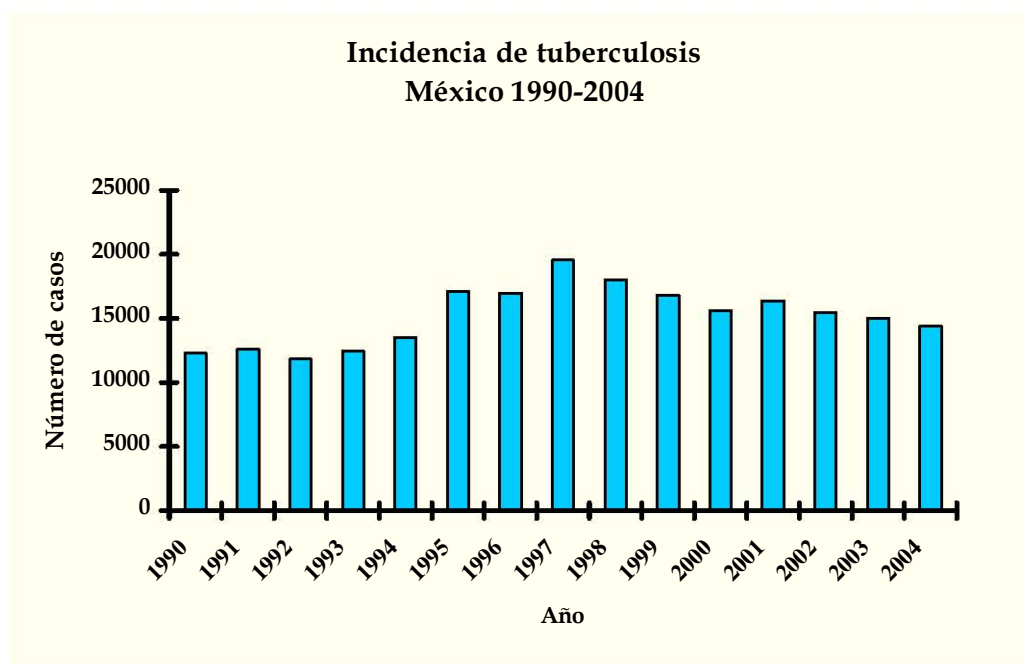


Figura 5. Incidencia de tuberculosis en México. Las barras esquematizan la morbilidad por tuberculosis pulmonar en México. A partir de 1995 aumentó la notificación de casos. Esto significa que durante los años anteriores hubo un subregistro de los casos nuevos, lo que implica que dos terceras partes de ellos no recibieron tratamiento oportunamente. Dirección General de Epidemiología, Secretaría de Salud.

1.4 Patogénesis y respuesta inmune

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa altamente contagiosa. La forma pulmonar es la más común, aunque puede manifestarse en otros órganos, tales como ganglios linfáticos, hueso, sistema urinario, genitales, meninges, peritoneo y piel ^{43, 53, 57}. La infección inicial por *M. tuberculosis* se denomina infección primaria. La enfermedad en una persona previamente expuesta al agente etiológico, ya sea por una fuente exógena o por reactivación de una infección primaria, se conoce como tuberculosis secundaria o por reinfección ⁶².

La mayoría de los pacientes con tuberculosis experimentan cansancio constante, pérdida de peso, febrícula, sudoración nocturna, tos persistente que no se quita en varias semanas y pérdida del apetito. En un estado avanzado, las flemas que el paciente expectora contienen restos de sangre, lo que se conoce como hemoptisis. El desarrollo de síntomas más específicos depende de los órganos afectados y de la extensión de la infección ^{8, 62}.

La ruta de entrada de *M. tuberculosis* al cuerpo es a través del tracto respiratorio, al inhalar microgotas de saliva de 1-2 μm de diámetro expelidas por una persona enferma. Una vez que los bacilos se han instalado en el pulmón, pueden interactuar de manera diferente con el hospedero (figura 6) ⁵⁶:

- 1) El hospedero monta una respuesta inmune eficaz, logrando clarificar la infección ⁵⁶.
- 2) El microorganismo se multiplica y disemina después de la infección, resultando en tuberculosis pulmonar activa ⁵⁶.
- 3) Los bacilos son contenidos por la respuesta inmune del hospedero pero se mantienen vivos en una fase latente y el hospedero casi nunca desarrolla la enfermedad (90% de los casos de infección) ⁵⁶.

1.4.1 Respuesta inmune innata

La principal línea de defensa que actúa cuando *M. tuberculosis* alcanza el tracto respiratorio inferior, corresponde a los macrófagos alveolares que fagocitan los bacilos. Una vez formado el fagosoma, éste puede fusionarse con el lisosoma, constituyendo al fagolisosoma, dentro del cual la activación secuencial de las hidrolasas intralisosomales conduce a la destrucción de los bacilos ^{47, 53, 56}.

Los macrófagos posteriormente secretan interleucinas proinflamatorias, como TNF- α , IL-1 e IL-6, IL-12 y algunas quimiocinas, lo que da como resultado el reclutamiento de neutrófilos, macrófagos, células NK y linfocitos T antígeno-específicos al sitio de infección. Al mismo tiempo, las células dendríticas infectadas migran a los nódulos linfáticos donde su maduración promueve el desarrollo de la respuesta inmune de tipo adquirida (figura 6) ³⁵.

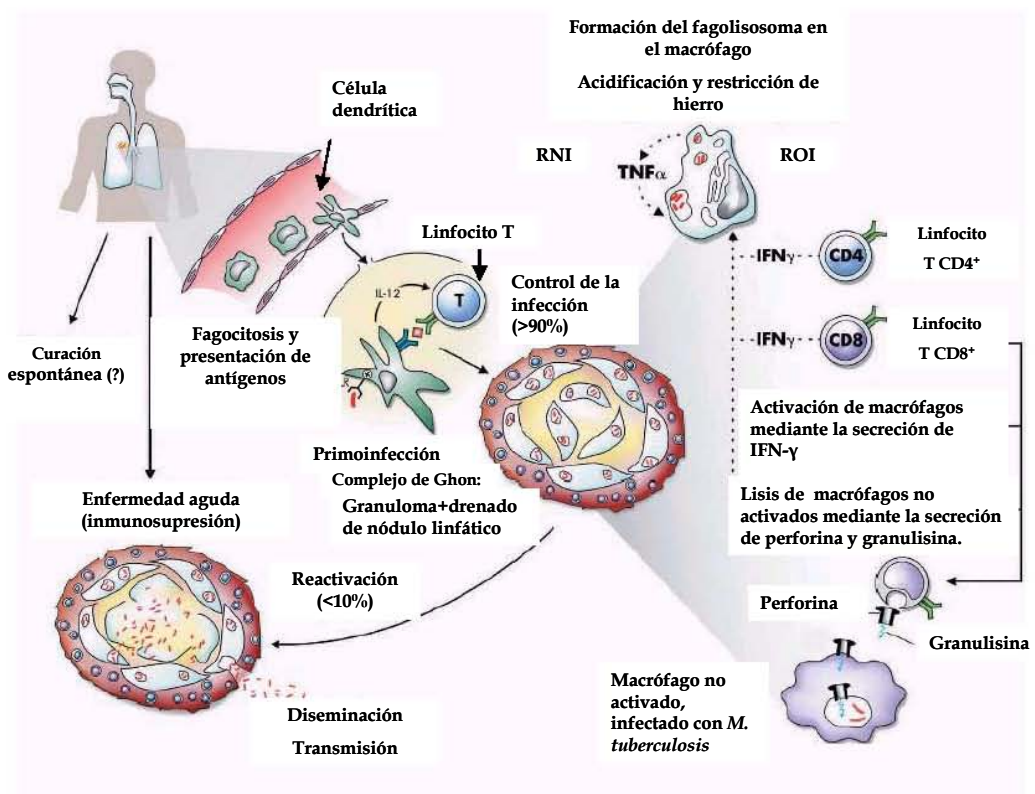


Figura 6. Patogénesis y respuesta inmune durante la tuberculosis. La figura esquematiza los eventos de primoinfección e infección secundaria, así como también se esquematizan las funciones de la respuesta inmune innata y adquirida en el control de la infección. Tomado de Nature Reviews Immunology ³⁵.

1.4.2 Respuesta inmune adquirida

La respuesta inmune protectora contra *M. tuberculosis* está mediada por linfocitos de tipo Th1. Los linfocitos T CD4⁺ son las células más importantes en la respuesta inmune contra *M. tuberculosis*, ya que algunos estudios en ratones sugieren que su ausencia ocasiona la rápida reactivación de la infección ⁵³. En el ser humano, la patogénesis del VIH ha demostrado que la pérdida de linfocitos T CD4⁺ aumenta la susceptibilidad y la reactivación de la tuberculosis. Dichas células están restringidas a las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) de clase II y llevan a cabo sus funciones efectoras a través de la producción de IFN- γ , IL-2 y TNF- α . Estas citocinas activan a los macrófagos, promoviendo su activación e incrementando así su acción bactericida por la producción de intermediarios reactivos de nitrógeno (RNI) y de oxígeno (ROI) y la presentación de antígenos en los sitios de infección ^{18, 43, 53}.

El óxido nítrico (ON) y sus metabolitos forman parte de los principales mecanismos bactericidas de los macrófagos. Se genera a partir de la L-arginina por acción de la isoforma de la óxido nítrico sintasa inducible 2 (iNOS2). El ON promueve la acidificación del fagosoma, favorece la fusión del fagosoma con el lisosoma y restringe el contenido de hierro que *M. tuberculosis* requiere para su desarrollo ^{35, 43, 55, 58}. Un aspecto relacionado con la producción ON involucra a una proteína conocida como Nrap (*natural resistance associated macrophage protein*). Esta proteína es crucial para el transporte del nitrito proveniente del citosol hacia ambientes más ácidos, como el fagolisosoma, donde se transforma en ON. Los defectos en esta proteína aumentan la susceptibilidad a *M. tuberculosis* y a otros patógenos intracelulares ^{43, 53, 56}.

Los linfocitos T CD8⁺, por otro lado, reconocen péptidos presentados por células que expresan moléculas del MHC de clase I. La función que desempeñan consiste en lisar directamente a los macrófagos infectados con *M. tuberculosis* mediante la secreción de granulicina y perforina ^{1, 18, 35, 43, 47, 56}.

Las micobacterias, sin embargo, han desarrollado mecanismos para evadir su destrucción. Son capaces de producir amoníaco, el cual alcaliniza el contenido intralisosomal y evita la activación de las proteasas lisosomales, además de impedir la maduración del fagosoma mediante la retención de rab5 (GTPasa que participa en la fusión del endosoma con el lisosoma). Los sulfátidos, la lipoarabinomana y el glicolípido fenólico I son capaces de formar complejos con las especies reactivas de oxígeno. Otro mecanismo antagonista corresponde a la producción de superóxido dismutasa y catalasa. Los sulfolípidos facilitan que la bacteria escape a la acción de los macrófagos inhibiendo la fusión del fagosoma con el lisosoma, lo cual puede contribuir al éxito que tienen como parásitos intracelulares. Por otra parte, el factor cordón (trehalosa 6,6-dimicolato) ataca las membranas de las mitocondrias de los linfocitos y estimula la actividad de la enzima que hidroliza al dinucleótido de nicotinamida y adenina (NADasa), interrumpiendo la cadena respiratoria. El factor cuerda recibe este nombre porque en los cultivos, los microorganismos forman agregados semejantes a cordones ^{27, 38, 53, 56}.

1.4.2.1 El granuloma

El 90% de las personas infectadas mantiene al bacilo tuberculoso en latencia dentro de una estructura denominada granuloma, la cual tiene como finalidad restringir el daño tisular y limitar la zona de la inflamación crónica (figura 7) ^{8, 18, 62}.

El granuloma se forma con la acumulación de macrófagos en el sitio donde la bacteria se establece y multiplica ⁴³. Los macrófagos pueden hallarse como células epitelioides, que son macrófagos activados con abundante citoplasma o bien, como células gigantes multinucleadas, que son una fusión de macrófagos infectados y no infectados. Posteriormente, bajo la influencia de las quimiocinas e interleucinas secretadas, ocurre el reclutamiento de linfocitos T CD4⁺ y T CD8⁺ antígeno específicos; macrófagos activados, células NK y fibroblastos. Los fibroblastos producen colágena, formando un tejido fibroso en la periferia para crear una barrera física contra la diseminación de los bacilos (fibrosis del granuloma) (figura 7). El sitio lesionado, posteriormente se calcifica, dando origen a nódulos macroscópicos, llamados complejos de Ghon o tubérculos, característicos de esta enfermedad y visibles a través de rayos-X ^{8, 18, 43, 59}.

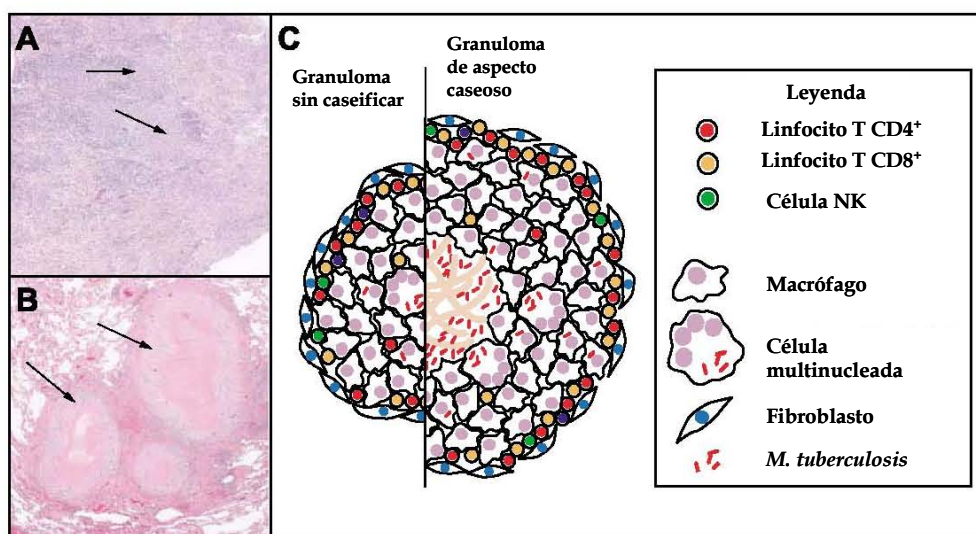


Figura 7. Estructura del granuloma. (A) Granuloma sin caseificar. (B) Granuloma de aspecto caseoso. (C) Representación esquemática de ambos granulomas. Cortesía del Dr. Keith Meyer, University of Wisconsin Medical School para Dominic O. Co, *et al.* ¹⁸

1.5 Vacunación contra tuberculosis: el bacilo de Calmette y Guérin

A principios de 1900, el médico Albert Calmette y el veterinario Camile Guérin iniciaron una investigación para comprobar la transmisión oral de la tuberculosis en el ganado, ocasionada por *M. bovis*. Para determinar la cantidad de bacilos necesaria para infectar a los animales, éstos se cultivaron en un medio de papa glicerizada, con bilis de buey para facilitar su homogenización. En 1908 descubrieron que el tratamiento de los cultivos con la bilis dio como resultado una disminución de la virulencia de las cepas. Durante los 13 años siguientes subcultivaron el bacilo modificado y después de 230 a 235 pases en el medio de bilis, observaron que el cultivo conservaba la apariencia morfológica de la cepa virulenta, pero que era incapaz de producir tubérculos. Una vez concluidos una serie de evaluaciones en bovinos, aves y mamíferos (roedores y primates), propusieron el empleo del bacilo como una vacuna para prevenir mortalidad a causa de la tuberculosis en el ganado y los humanos. Ambos investigadores llamaron a su vacuna *Bacille Bilié* (de bilis) *Calmette et Guérin*, nombre que fue abreviado a *Bacille Calmette Guérin*, al cual actualmente se le conoce como BCG^{7, 30, 41}.

En 1921 el Dr. Albert Calmette en conjunto con el Dr. Weill-Hallé y el Dr. Turpin comenzaron la vacunación de 120 recién nacidos, hijos de madres tuberculosas, a los que administraron tres dosis del bacilo modificado por vía oral. Los resultados de protección fueron tan contundentes que la vacunación prosiguió y para enero de 1926, ya habían sido vacunados 5,183 bebés en Francia. Con estos estudios Calmette demostró una disminución en la mortalidad (de 25 % a 2 %) de bebés cuyas madres padecían la enfermedad³⁰.

En los años siguientes, la vacuna fue distribuida a toda Europa, pero algunos países se mostraron escépticos a la seguridad y eficacia de la vacuna que en la

actualidad sigue inmersa en algunas controversias. Una de ellas ponía en duda su capacidad de reducir la mortalidad infantil debida a la tuberculosis. Otra se basaba en el temor de que recuperara su virulencia. Un desafortunado incidente en 1929-1930 detuvo la distribución de la vacuna, cuando en un hospital de Lübeck (Alemania) se confundió un cultivo de *M. tuberculosis* (cepa Kiel) con el de la BCG. Doscientos cincuenta y un bebés fueron vacunados con dicha cepa y trágicamente, 72 de ellos murieron. Los otros 179, en su mayoría, desarrollaron tuberculosis y los que se mantuvieron sanos desarrollaron sensibilidad a la prueba de la tuberculina^{30, 41}.

Durante la década de 1930, los países de la península escandinava fueron quienes proporcionaron las pruebas clínicas necesarias para aclarar que la vacunación masiva con BCG era segura, así como también se encargaron de establecer la vía intradérmica para la administración de la vacuna. Así, después de la Segunda Guerra Mundial, la vacunación fue distribuida por todo el continente Europeo y a principios de los años 50's la OMS recomendó se incluyera la vacuna BCG en las campañas de vacunación en las zonas endémicas del mundo^{3, 21}.

La vacuna BCG ha sido administrada a millones de personas desde que fue desarrollada. Las ventajas con las que cuenta son: seguridad, facilidad de administración, inmunidad a largo plazo; no muestra efectos secundarios severos y su precio de producción es bajo. La inmunización en la población infantil es útil, protegiéndolos contra formas severas de la enfermedad (particularmente la tuberculosis miliar y la meníngea). Sin embargo, la eficacia de la BCG contra la tuberculosis pulmonar en adultos es de 50% en promedio, partiendo de un intervalo de 0 a 80 %^{17, 20, 30}. Se han propuesto varias razones por las que la vacuna BCG muestra tal inconsistencia en su eficacia: (i) susceptibilidad genética del hospedero; (ii) variabilidad de la virulencia entre las cepas de *M. tuberculosis*; (iii) pérdida de la capacidad de BCG para estimular una respuesta inmune duradera;

(iv) prevalencia de otras infecciones micobacterianas en las poblaciones de estudio; (v) variación en la forma de protección contra las diferentes formas de tuberculosis; (vi) exposición a micobacterias ambientales; (vii) utilización de subcepas BCG distintas y cuya producción difiere; y (viii) diferencias genéticas entre BCG y *M. tuberculosis*, lo que implica que BCG no comparta antígenos inmunogénicos importantes para la protección ^{1, 17, 20}.

Después de la aceptación de la BCG por la Liga de Naciones en 1928, la vacuna se distribuyó a diferentes laboratorios en el mundo; en éstos, las condiciones de preservación no fueron las mismas, resultando el surgimiento de diferencias genotípicas y fenotípicas, entre las vacunas producidas en diferentes regiones a lo largo del tiempo, producto de mutaciones y pérdida de genes con relevancia inmunológica ^{1, 17}. En un estudio en el que se evaluó la eficacia proporcionada por 10 subcepas BCG en modelo murino, la subcepa Phipps mostró mayor protección que las otras, ya que en los animales de dicho grupo se observó el menor valor de UFC y el menor porcentaje de tejido pulmonar afectado con neumonía, tras el cuarto mes de infección con *M. tuberculosis* H37Rv ¹⁵. Durante el desarrollo de la vacuna, incluso, Calmette y Guérin informaron de una disminución de la virulencia en el décimo quinto pase. Sin embargo, al carecer de los aislamientos obtenidos por ellos, es imposible determinar con precisión en qué momento ocurrió la atenuación de la cepa ⁵².

El análisis comparativo de los genomas de *M. tuberculosis* y BCG ha identificado una serie de deleciones cromosómicas entre las que destaca la región RD1, común a todas las BCGs. Los datos de este análisis demostraron que la pérdida de RD1 contribuyó a la atenuación de BCG, puesto que al complementar esta región aumentó la virulencia de la cepa de estudio y se estimuló una respuesta Th1 importante ^{1, 10, 11, 24, 52}.

Otra de las hipótesis que es ampliamente aceptada es la que relaciona la eficacia de la BCG con la región geográfica. Los niveles de protección proporcionada por la BCG son bajos a no detectables en regiones cercanas al ecuador, donde la exposición a las micobacterias no tuberculosas es común. Una de las vertientes de esta hipótesis es la teoría del enmascaramiento que sugiere que el contacto con estas bacterias confiere inmunidad contra tuberculosis, en virtud de la presencia de antígenos compartidos con *M. tuberculosis* y *M. bovis*. Esta teoría está sustentada en los hallazgos de Palmer y Login, a mitad de la década de 1960, quienes demostraron niveles de inmunidad considerables contra tuberculosis en cobayos inmunizados con micobacterias ambientales. En estos animales la vacunación posterior con BCG no produjo ningún efecto adicional contra la tuberculosis ^{1,3}.

1.6 Nuevas vacunas contra tuberculosis

Debido a la variabilidad en la eficacia de la BCG y a que la tuberculosis se ha convertido en un problema serio de salud, es de suma importancia desarrollar una vacuna más eficaz ¹⁷. Las actividades más notables que han contribuido significativamente su búsqueda son: la secuenciación del genoma de *M. tuberculosis*, el descubrimiento y caracterización de antígenos inmunodominantes, así como el estudio de la respuesta inmune contra *M. tuberculosis* en animales y en seres humanos ⁵⁴. A la fecha, el resultado de esos esfuerzos está reflejado en la gran variedad de antígenos y cepas candidatas a vacuna que se han identificado y han sido evaluadas en diferentes presentaciones como vacunas de subunidades, de ácidos nucleicos, cepas recombinantes, auxotróficas, atenuadas y/o combinación de éstas (figura 8) ³⁹.

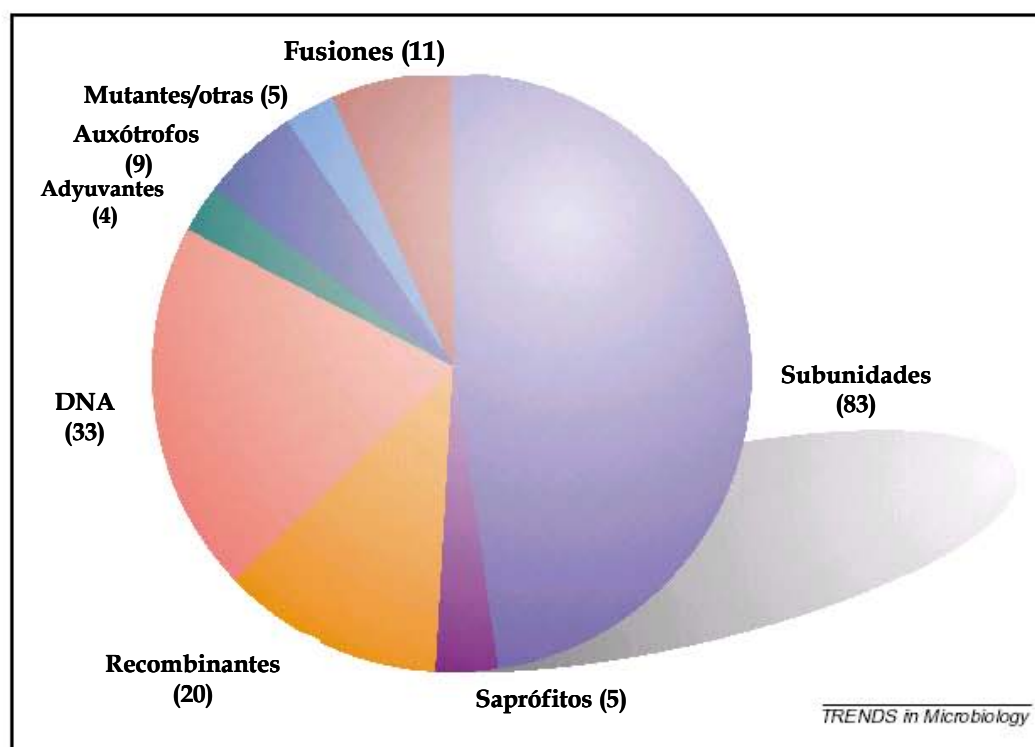


Figura 8. Candidatos desarrollados y evaluados dentro del programa de evaluación de vacunas contra la tuberculosis, del National Institutes of Health (NIH) hasta el año 2000. Trends in Microbiology, 2001

48

1.6.1 Vacunas de subunidades

La gran mayoría de proteínas que se han evaluado solas o en combinación, provienen del filtrado del cultivo de *M. tuberculosis*, en el cual se ha descrito más de 200 proteínas. Las más importantes son: Ag85B, MPT32, MPT51, MPT64, GroES, ESAT-6, DnaK y GlnA. La combinación de las proteínas antigénicas Ag85B y ESAT-6 ha dado buenos resultados. En un estudio, ésta se administró a ratones C57BL/6 y B6/CBA F1 en un adyuvante de bromuro de dimetil dioctadecil amonio. Posteriormente, los animales se infectaron con 100 UFC de *M. tuberculosis*

en aerosol, o con 10^4 UFC por vía intravenosa. Los resultados correspondientes a esta vacuna fueron semejantes a los observados con BCG, con una duración de la respuesta inmune protectora de aproximadamente 30 semanas. Incluso, los niveles de protección fueron superiores a los obtenidos con cada uno de los antígenos de forma individual ^{39, 46, 48}.

La vacuna Mtb72F es una proteína híbrida resultante de la inserción de la serín proteasa Mtb32 en la proteína Mtb39, de la cual no está definida su función pero se une a fibronectina y que es altamente reconocida por los pacientes tuberculosos. La fusión resultante fue eficaz en cobayos, al encontrarse que la supervivencia fue de un año, tal y como se observó con la vacunación con BCG. Una combinación de esta proteína de fusión con BCG fue capaz de promover el tiempo de supervivencia a dos años. En los animales sobrevivientes además, la carga bacilar fue menor a 1,000 UFC y las lesiones presentes en el pulmón y el bazo fueron mínimas comparadas con el grupo sin inmunizar y con el grupo vacunado con BCG ^{44,46}.

1.6.2 Vacunas de DNA

Estas vacunas consisten en vectores de DNA que incluyen genes que codifica para proteínas inmunodominantes que generalmente ya han sido caracterizados y evaluados como vacuna de subunidad. Se han evaluado candidatos que codifican para los antígenos Mtb 8.4, Mtb 41, Mtb 39, MPT64, MPT 83, Ag85B, las proteínas de choque térmico hsp60 de *M. leprae*, hsp65, hps70, las proteínas transportadoras de fosfatos PstS-1 y PstS-3, entre otros. La vacuna de la proteína hsp60 de *M. leprae* fue muy eficaz al prevenir la infección, y para promover la eliminación del bacilo en un modelo de ratón de tuberculosis latente ^{39, 48, 54}.

1.6.3 Vacunas recombinantes

La mayoría de las vacunas recombinantes probadas a la fecha se basan en el empleo de BCG como vector. Pese al hecho de que su capacidad para proteger contra la tuberculosis es variable, esta vacuna tiene varias ventajas sobre cualquier otra clase de vacuna. Es segura, eficaz en la población infantil, protege contra la lepra y es barata. De ahí que los investigadores consideran a la BCG como prototipo para desarrollar nuevas vacunas ³⁹.

Algunas de las nuevas vacunas de esta categoría han superado la protección que la BCG confiere. La vacuna rBCG30, por ejemplo, es una cepa que sobreexpresa el antígeno Ag85B. La vacunación de cobayos con rBCG30 resulta en la reducción significativa de la magnitud de las lesiones y en el número de bacilos encontrados en pulmón, hígado y bazo ^{21, 32}. La vacuna rBCG:: Δ *ureC*lo⁺ es una mutante deficiente de ureasa que expresa la Lysteriolysina O de *Lysteria monocytogenes*. Esta bacteria es incapaz de evitar que el fagosoma madure (a causa de la deficiencia de ureasa), es menos virulenta que la BCG silvestre cuando se administra a ratones SCID (ratones con síndrome de inmunodeficiencia severa combinada), además de que la disminución la listeriolisina facilita el paso de los antígenos micobacterianos al citosol, donde son procesados y presentados en moléculas MHC clase I ^{1, 21, 46}. Otra vacuna recombinante que mostró una mayor protección en un modelo de ratón con tuberculosis pulmonar progresiva fue construida con la proteína de 38 kDa de *M. tuberculosis*, utilizando la subcepa BCG Tice como vector (rBCG38). Dicha vacuna aumentó la supervivencia de ratones, redujo el número de unidades formadoras de colonias, e indujo una respuesta Th1 significativamente mayor a la encontrada en el grupo sin inmunizar y el inmunizado con BCG Tice, manifestada por un nivel alto de IL-2, IFN- γ y un aumento en la proporción de IgG2a e IgG1 ^{15, 16}.

1.6.4 Vacunas de micobacterias mutantes y auxótrofas

Estas vacunas se basan en cepas patógenas o estrechamente relacionadas a *M. tuberculosis* que son mutadas en genes de vías metabólicas. Como resultado, los mutantes no pueden multiplicarse de la misma manera que las cepas tipo, pero puede persistir para estimular una respuesta inmune. La vacuna de *M. tuberculosis* PanD-/Leu- demostró ser segura en ratones SCID y eficaz en el modelo de cobayo²¹. Otro estudio reciente examina el potencial de la mutante *M. tuberculosis fadD26* como vacuna. Esta cepa indujo un menor daño histopatológico y carga bacilar, una producción de IFN- γ progresiva, así como una mayor supervivencia en los animales, comparada con los vacunados con BCG. El producto del gen *fadD26* es similar a la acil-CoA sintasa, enzima requerida para la síntesis de ácidos grasos de la pared celular, mismos que son importantes para la patogenicidad de *M. tuberculosis*³³.

Las vacunas de micobacterias mutantes y auxótrofas tienen como ventaja que producen antígenos capaces de inducir una respuesta inmune potente, incluyendo aquellos que se encuentran ausentes en la BCG y, no pueden replicarse a menos que se les suplemente el metabolito que no pueden producir^{33, 46}.

1.6.5 Vacunas no micobacterianas

Estas vacunas generalmente consisten en vectores no micobacterianos (virus) que sobreexpresan antígenos micobacterianos. Un ejemplo de ellas es la vacuna MVA85A, la cual en modelos animales ha demostrado ser inocua y eficaz. La vacuna incluso ya fue evaluada en fase clínica I (estudio de su seguridad e inmunogenicidad en personas sanas) en el Reino Unido, sin encontrarse efectos adversos y actualmente está siendo estudiada en Gambia. Consiste en un vaccinia virus (virus del género ortopox, en el que se agrupan los virus causantes de

padecimientos caracterizados por la aparición de pústulas, tales como viruela, sarampión y varicela) incapaz de replicarse que expresa el antígeno 85A de *M. tuberculosis* ^{3, 21, 26}.

1.6.6 Vacunas de otras micobacterias

En este grupo han sido examinadas las vacunas elaboradas con *M. vaccae*, *M. smegmatis* y *M. microti*. Las dos primeras no mostraron actividad alguna cuando fueron evaluadas en el modelo murino, en tanto que la última ya ha sido evaluada en población humana entre 1950 y 1977 dada su similitud con *M. tuberculosis* y a que es una cepa atenuada, encontrándose una eficacia del 77%, comparable a la conferida por BCG ^{29, 39, 48}.

1.7 *Mycobacterium microti*

M. microti fue descrita por primera vez por Q. A. Wells en 1937, durante sus investigaciones sobre las especies de microorganismos que infectan al ratón de campo *Microtus agrestis* de la frontera británico-escocesa. Al principio lo nombró “vole bacillus” (bacilo de los ratones de campo); luego, *M. tuberculosis* subespecie *muris* porque no podía diferenciarse de *M. tuberculosis*. En ese entonces, el bacilo fue descrito como el agente etiológico de una infección diseminada y caseosa en el ratón de campo. Actualmente, se sabe que causa enfermedad en una gran variedad de mamíferos, sobre todo en especies de roedores silvestres ^{19, 24, 37}.

M. microti es filogenéticamente muy cercana a *M. tuberculosis* porque existe una gran semejanza (99.9%) en la secuencia del DNA del gen *16S RNAr* ¹¹. Dado que infecta específicamente a roedores, y no al humano, en la segunda mitad del siglo XX se decidió explorar su uso como vacuna contra tuberculosis. En un ensayo clínico en el que fueron vacunadas 10,000 personas entre 1946 y 1961, *M. microti*

demonstró ser una vacunación inmunogénica y segura. Otra investigación realizada por el British Medical Research Council entre 1951 y 1952, en la que participaron 54,239 adolescentes de 14 a 15 ½ años, se encontró la misma eficacia protectora que la observada en el grupo vacunado con BCG. Al mismo tiempo, en Checoslovaquia, entre 1950 y 1969 se administró la cepa a medio millón de personas, la mayoría recién nacidos. Ambas pruebas dieron resultados similares, los cuales revelaron una eficacia de protección de 70 a 75 % sin causar complicaciones. Aunque la vacuna resultó ser una buena opción, dejó de administrarse por causar una reacción lupoides severa en el 3 a 17% de los sujetos vacunados ^{10, 11, 19, 24, 29}.

Como consecuencia del estado de emergencia que la tuberculosis y la controvertida eficacia de la vacuna BCG, diversos laboratorios evalúan la utilidad de *M. microti* como vacuna, debido a que *M. microti* presenta ventajas sobre BCG. La virulencia residual de *M. microti* se recupera al infectar los ratones de campo, garantizando que se conserve la expresión de sus determinantes antigénicos que estimulan el desarrollo de una respuesta inmune protectora. Las subcepas de *M. microti* evaluadas hasta el momento son patógenas para los ratones de campo, pero no para el humano. La deleción cromosómica de la región RD1, tal y como sucedió con *M. bovis* BCG, sugiere su participación en la atenuación natural de *M. microti* ^{10, 11, 19, 52}.

En una evaluación realizada en conejos, se comparó la eficacia de esta vacuna con la de BCG (subcepa Pasteur). Ambas vacunas redujeron el número de tubérculos visibles hasta en un 75%. Otros ensayos recientes mostraron que el número de bacilos en bazo y pulmón de ratones BALB/c inmunizados con *M. microti* por vía oral e intranasal fue significativamente menor, al compararlo con el grupo control sin inmunizar ^{19, 37}.

1.8 Modelos animales en la evaluación de nuevas vacunas

Los modelos animales son muy útiles cuando se trata de caracterizar los mecanismos generales de la resistencia natural, de la patogénesis y respuesta inmune contra tuberculosis. Para la evaluación de las nuevas vacunas, son una herramienta indiscutiblemente valiosa porque presentan varias de las características observadas en la tuberculosis humana ⁴⁸.

Los modelos más útiles y mejor caracterizados a la fecha son el modelo de ratón, el modelo de cobayo y el modelo de conejo ⁴⁸.

1.8.1 El modelo murino

Sin lugar a dudas, el modelo más empleado y más popular de todos es el murino, debido a que no se requiere mucho espacio para mantener un número importante de ratones y los costos de compra y manutención son bajos. Existen varias cepas de laboratorio con intervalos diversos de resistencia o de susceptibilidad. Las cepas que sobreviven a una infección con *M. tuberculosis* mayor o igual a 300 días son resistentes, encontrándose entre ellas las cepas C57BL/6 y BALB/c ^{6, 35, 46, 47}.

El ratón ha proporcionado una gran cantidad de información dado que existe una gran similitud entre su respuesta inmune y la del ser humano. Por ejemplo, se sabe que los macrófagos de los ratones expresan receptores semejantes a los que se hallan en los macrófagos humanos. Tras la fagocitosis, hay expresión de IL-12, IFN- γ y TNF- α . El ratón carece de CD1b y CD1c, pero la molécula CD1d se une a lípidos, tal y como lo hace la molécula CD1 humana para dar lugar a la producción de citocinas y quimiocinas ^{6, 35, 40, 45, 47}.

Otra virtud de este modelo radica en el hecho de que su genoma está bien caracterizado, de manera que mediante ingeniería genética es posible producir una gran variedad de mutantes con inmunodeficiencias específicas, permitiendo a los investigadores el estudio de la función de las células y citocinas que intervienen en la resistencia a tuberculosis. Por último, hay un acervo amplio de reactivos que facilitan el estudio de la respuesta inmune producida tras la administración de algún candidato a vacuna ^{35, 45, 47}.

1.8.2. El modelo de cobayo

El cobayo, el modelo clásico de la tuberculosis, es un mamífero extremadamente susceptible a la infección (100%) con cepas virulentas de *M. tuberculosis*. La infección progresiva es resultado del establecimiento de unos cuantos bacilos en los pulmones y todos los animales infectados mueren a consecuencia de la tuberculosis. La diseminación temprana a otros sitios ha sido estudiada exhaustivamente en dicho animal ^{40, 47}.

Los granulomas desarrollados son semejantes a los manifiestan los seres humanos; sin embargo, estas estructuras no forman cavidades, sino que se mineralizan antes de erosionar las vías respiratorias o los vasos sanguíneos. La respuesta DTH es casi idéntica a la de los seres humanos, macro y microscópicamente. Los cobayos pueden vacunarse con BCG y otras vacunas experimentales. Además, responden satisfactoriamente a los fármacos más ampliamente utilizados para tratar este padecimiento ^{40,47}.

1.8.3 El modelo de conejo

El conejo ha sido empleado como un modelo de tuberculosis por décadas. Aunque son muy susceptibles a la infección con cepas de *M. bovis*, son más resistentes a la

infección con *M. tuberculosis*. Los granulomas generalmente sufren licuefacción y sólo en este animal puede estudiarse la formación de cavidades. La reacción de hipersensibilidad es muy semejante a la que los seres humanos infectados desarrollan ^{38, 40, 43}.

En la tabla 1 se comparan los modelos animales que han sido caracterizados a la fecha para el estudio de tuberculosis, señalando las ventajas y desventajas de cada uno.

Tabla 1. Comparación entre los modelos de ratón, cobayo y conejo ⁴⁰.

Característica	Modelo animal		
	Ratón	Conejo	Cobayo
Susceptibilidad a tuberculosis	+	+	+++
Diseminación extrapulmonar.	++	++	++
Desarrollo de granulomas	++	++	++
Necrosis caseosa	--	++	++
Licuefacción/formación de cavidades	--	++	-
Respuesta DTH	+/-	++	++
Protección con BCG contra tuberculosis	+	++	++
Requerimiento de espacio BL-3	+	++++	++
Costos de manutención	+	++++	++
Disponibilidad de reactivos para caracterizar respuesta inmune.	++++	++	+

+ = poco; ++ = moderado; +++ = abundante; ++++ = muy abundante ; - nulo; +/- poco a nulo.

2. JUSTIFICACIÓN

Dada la problemática que representa la reemergencia de la tuberculosis en materia de salud pública, y de la variabilidad de 0 a 80% de la actual vacuna BCG, es imperativo desarrollar vacunas más eficaces. Entre las opciones más viables se encuentra *M. microti* que comparte con *M. tuberculosis* un 99.9% de similitud en su secuencia de ácidos nucleicos, es filogenéticamente más cercana a *M. tuberculosis* que BCG y es naturalmente atenuada para el humano.

3. OBJETIVO

Evaluar el potencial de *M. microti* para el desarrollo de una vacuna contra la tuberculosis en el modelo murino de tuberculosis pulmonar progresiva.

4. MATERIAL Y METODOLOGÍA

4.1 Cepas bacterianas

Las cepas que se utilizaron para la vacunación de ratones fueron, la vacuna BCG Phipps, la vacuna recombinante BCG Tice (rBCG38)^{15, 16} y *M. microti* (ATCC 11156). Para la infección de los animales, se utilizaron las cepas de referencia *M. tuberculosis* H37Rv y el aislamiento *M. tuberculosis* 950 1000 perteneciente al genotipo Beijing.

Las bacterias se cultivaron hasta la fase media logarítmica en caldo Middlebrook 7H9 (Difco, Detroit, Michigan), suplementado con albúmina-dextrosa-catalasa [ADC, (BBL, Cockeysville, Md)] y 0.05% de Tween 80 (Sigma, St. Louis, USA). Los cultivos se mantuvieron en agitación constante, a 37° C y con 5% de CO₂. En cuanto se alcanzó la fase de crecimiento deseada, las bacterias se cosecharon por centrifugación a 5000 x g. Para eliminar los componentes del medio de cultivo, el precipitado se lavó tres veces con PBS y se distribuyó en alícuotas de 1 mL, a una concentración de 10⁷ bacterias/mL. Los paquetes bacterianos se almacenaron a -70° C hasta su uso.

4.2 Preparación de inóculos

Para los ensayos de infección y de vacunación, las bacterias se descongelaron rápidamente a 37° C. Después, se preparó una suspensión homogénea de bacilos, transfiriendo las bacterias a tubos Falcon estériles, que contenían perlas de vidrio y PBS-Tween 80 al 0.1%. Las muestras se agitaron en vórtex hasta obtener bacilos independientes en suspensión. La viabilidad y la cuenta de las bacterias se realizaron por microscopía de epifluorescencia para lo cual los bacilos se tiñeron con diacetato de fluoresceína (DAF), a una concentración de 5 µg/mL, y se

contaron con cámara de Neubauer. Cada cepa fue ajustada a una concentración de 10^6 UFC/mL y almacenada en congelación a -70°C .

4.3 Animales de estudio

Se utilizaron ratones machos BALB/c de 6-8 semanas de edad, proporcionados por el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán". Los animales se mantuvieron en cajas de asilamiento dentro del bioterio con nivel de bio-seguridad 3 durante todo el experimento. Su manejo en esta investigación fue aprobado por el Comité de Ética para la Experimentación en Animales del instituto, de la misma institución.

4.4 Vacunación de los ratones

Una alícuota de cada una de las vacunas se descongeló rápidamente a 37°C , se diluyó en PBS-Tween 80 al 0.05% y se ajustó a una concentración de 10^5 UFC/mL como se describió previamente. De forma aleatoria, se formaron grupos de 40 animales, que fueron inmunizados por vía subcutánea en la base de la cola con una dosis única de 10^4 UFC de BCG Phipps, rBCG38 o *M. microti*, según correspondiera. Un grupo de animales sin vacunar fue utilizado como control.

4.5 Modelo de infección

Ocho semanas después de la inmunización, los animales se anestesiaron vía intraperitoneal con Pentotal (56 mg/kg) para realizar una incisión media que permitió exponer la tráquea. Posteriormente, cada ratón fue inoculado intratraquealmente con 2.5×10^5 UFC de *M. tuberculosis* H37Rv o *M. tuberculosis* Beijing. La incisión se suturó y los ratones se mantuvieron en posición vertical hasta su recuperación. Ocho animales de cada grupo se sacrificaron a los dos,

cuatro y ocho meses posteriores a la inoculación. Durante el sacrificio, cada ratón se anestesió en cámara de éter; después de lo cual se extrajeron los pulmones: uno se congeló en nitrógeno líquido para la determinación de las UFC; el otro se perfundió en etanol absoluto para la preparación de cortes histológicos. El sacrificio de los animales se realizó dentro de un gabinete de seguridad nivel 2. Sin embargo, cabe señalar que del total de animales que sobrevivieron antes de concluir el experimento, es decir, al cuarto mes de infección, se tomó una muestra de 10 animales de cada grupo. En la tabla 2 se indica el número de animales sobrevivientes al octavo mes post-infección, así como también se muestra la forma en la que se seleccionaron las muestras para su análisis.

Tabla 2. Selección de muestras para carga bacilar y análisis histopatológico al octavo mes.

	Número de animales sobrevivientes (n = 10)	Número de pulmones para carga bacilar	Número de pulmones para análisis histopatológico
Grupo	Infección con <i>M. tuberculosis</i> H37Rv		
Control	8	3 ^a	1 ^a , 1 ⁱ
BCG	7	3 ^a	3 ^a
rBCG38	10	3 ^a	4 ^a
<i>M. microti</i>	9	3 ^a	3 ^a
Grupo	Infección con <i>M. tuberculosis</i> Beijing		
Control	1	0	1 ^a
BCG	5	2 ^a	2 ^d , 1 ⁱ
rBCG38	4	2 ^d , 1 ⁱ	2 ⁱ , 1 ^d
<i>M. microti</i>	10	3 ^a	3 ^a

d = Pulmón derecho

i = Pulmón izquierdo

a = Ambos pulmones

4.6 Carga bacilar en pulmón

El control de la infección por *M. tuberculosis* H37Rv o *M. tuberculosis* Beijing se determinó en los pulmones de los grupos estudiados a los dos, cuatro y ocho meses post-infección. Los pulmones se descongelaron a 37° C y se depositaron en tubos con 3 mL de PBS-Tween 80 0.05% para ser homogenizados mecánicamente con un Polytron (Brinkmann Instruments, Rexleid, Can). Los bacilos se cuantificaron por plaqueo de diluciones seriadas (1:10) de cada uno de los homogenizados resultantes en medio Middlebrook 7H10, suplementado con 10% de OADC. Las placas se incubaron durante 21 días a 37° C, realizando el conteo de colonias a los 10 y 21 días, con el auxilio de un microscopio estereoscópico (Carl Zeiss, Alemania). La cuenta se realizó por duplicado y fueron expresadas como el promedio de UFC obtenidas de 4-6 ratones por grupo.

4.7 Análisis histopatológico

Para la realización de cortes histopatológicos, los pulmones fueron insuflados con etanol absoluto, en el cual se fijaron por un mínimo de 24 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, se cortaron parasagitalmente a través del hilio y el tejido se preparó de forma rutinaria para su inclusión en parafina. De cada uno de los bloques se hicieron cortes de 5 µm de espesor que fueron teñidos con hematoxilina-eosina. Las determinaciones morfométricas de área total y área neumónica se realizaron con un microscopio Leica DMLS (Leica Microsystem Wetzlar GmbH, Germany) con el sistema de análisis digital Q-win (Leica microsystem Imaging solutions Ltd, Cambridge, UK).

4.8 Análisis estadístico

Para evaluar la existencia de diferencias significativas en la determinación de áreas de neumonía y de la carga bacilar en pulmón, se realizó el análisis de varianza de una vía (ANOVA) con una significancia del 95 %. Se utilizó el programa SPSS para Windows versión 12.0 (LEAD Technologies Inc., UK).

5. RESULTADOS

5.1 UFC en pulmón

Respecto a los animales infectados con la cepa tipo *M. tuberculosis* H37Rv, se observó que las micobacterias crecieron exponencialmente a lo largo del tiempo en el grupo sin vacunar (control) (gráfica 1A). Por el contrario, en el grupo inmunizado con BCG se encontró que las UFC fueron 0.3 log menor que la del grupo control al segundo mes post-infección (de 4.9 a 5.8 UFC, $p = 0.001$) (tabla 2). El grupo vacunado con rBCG38 no mostró diferencias con el control, mientras que en los animales inmunizados con *M. microti* se observó una disminución de la carga bacilar en comparación con el grupo control de 0.9 log (4.9 a 5.8 UFC, $p < 0.0001$) (tabla 3).

Cabe señalar que entre esta vacuna y las vacunas BCG y rBCG38 se notaron diferencias significativas: el número de UFC del grupo inmunizado con *M. microti* fue inferior (0.6 log, $p=0.041$) al del grupo vacunado con BCG, en tanto que con el grupo rBCG38 la diferencia fue de 0.8 log ($p<0.0001$) (tabla 3).

En el cuarto mes, hubo diferencias significativas en las UFC encontradas en cada uno de los grupos vacunados y el grupo control, siendo 0.6 log menos en los grupos inmunizados con BCG y rBCG38 (5.4 a 6.0 UFC, $p=0.015$ en ambos casos) y, 0.5 log menores en el grupo vacunado con *M. microti* ($p=0.023$). Sin embargo, en el octavo mes de infección, la vacuna BCG fue la única que mostró diferencias significativas con el grupo control puesto que el número de bacterias fue 1.3 menor que la de dicho grupo (intervalo de 5.6 a 8.7 UFC/pulmón, $p=0.011$) (tabla 3 y gráfica 1A). En los grupos de vacunación con rBCG38 y *M. microti*, el número de bacterias aumentó del cuarto al octavo mes 10 y 1000 veces, respectivamente (tabla 3).

Referente a los grupos de ratones infectados con *M. tuberculosis* Beijing, en el grupo control se observó una disminución de las UFC entre el segundo y cuarto mes post-infección. Por otra parte, en los tres grupos de vacunación se hallaron diferencias en comparación con el grupo control después de los dos meses de infección (6.1 - 7.9 UFC, $p < 0.0001$ en todos los casos) (tabla 3). Los animales vacunados con *M. microti* presentaron 1.3 log menos UFCs que el del grupo sin vacunar, a la vez que no presentó diferencias con los de los animales inmunizados ya sea con BCG o rBCG38 (tabla 2, gráfica 1B). Posteriormente, en el cuarto mes post-infección, las UFCs encontradas en el grupo de *M. microti* aumentaron 1.2 log respecto al segundo mes (6.0 - 7.4 UFC/pulmón). Por otro lado, las UFCs halladas en las otras vacunas incluidas en el estudio se mantuvieron en valores semejantes a los del segundo mes post-infección. En el grupo de *M. microti* se encontró un valor de UFC diez veces mayor al observado en los grupos BCG y rBCG38 (gráfica 1B). En el octavo mes, la carga bacilar disminuyó en todos los casos respecto al cuarto mes (tabla 3). Además, cabe señalar que no se presentan los resultados del grupo control tras este tiempo de infección debido a que sólo sobrevivió un animal y se requirió del órgano completo para realizar la determinación de área neumónica. Finalmente, la comparación entre cepas de *M. tuberculosis* reveló, de manera general, que los grupos infectados con *M. tuberculosis* Beijing presentaron una carga bacilar mayor que los grupos infectados con *M. tuberculosis* H37Rv entre el segundo y cuarto mes de infección: las cuentas fueron de 6.0 a 7.9 log UFC/pulmón y de 4.9 a 6.0 log UFC/pulmón, respectivamente; mientras que entre el cuarto y octavo mes, los valores correspondientes fueron de 5.2 a 6.0 log UFC/pulmón en la infección con *M. tuberculosis* Beijing y de 5.6 a 8.7 log UFC/pulmón en la infección con *M. tuberculosis* H37Rv.

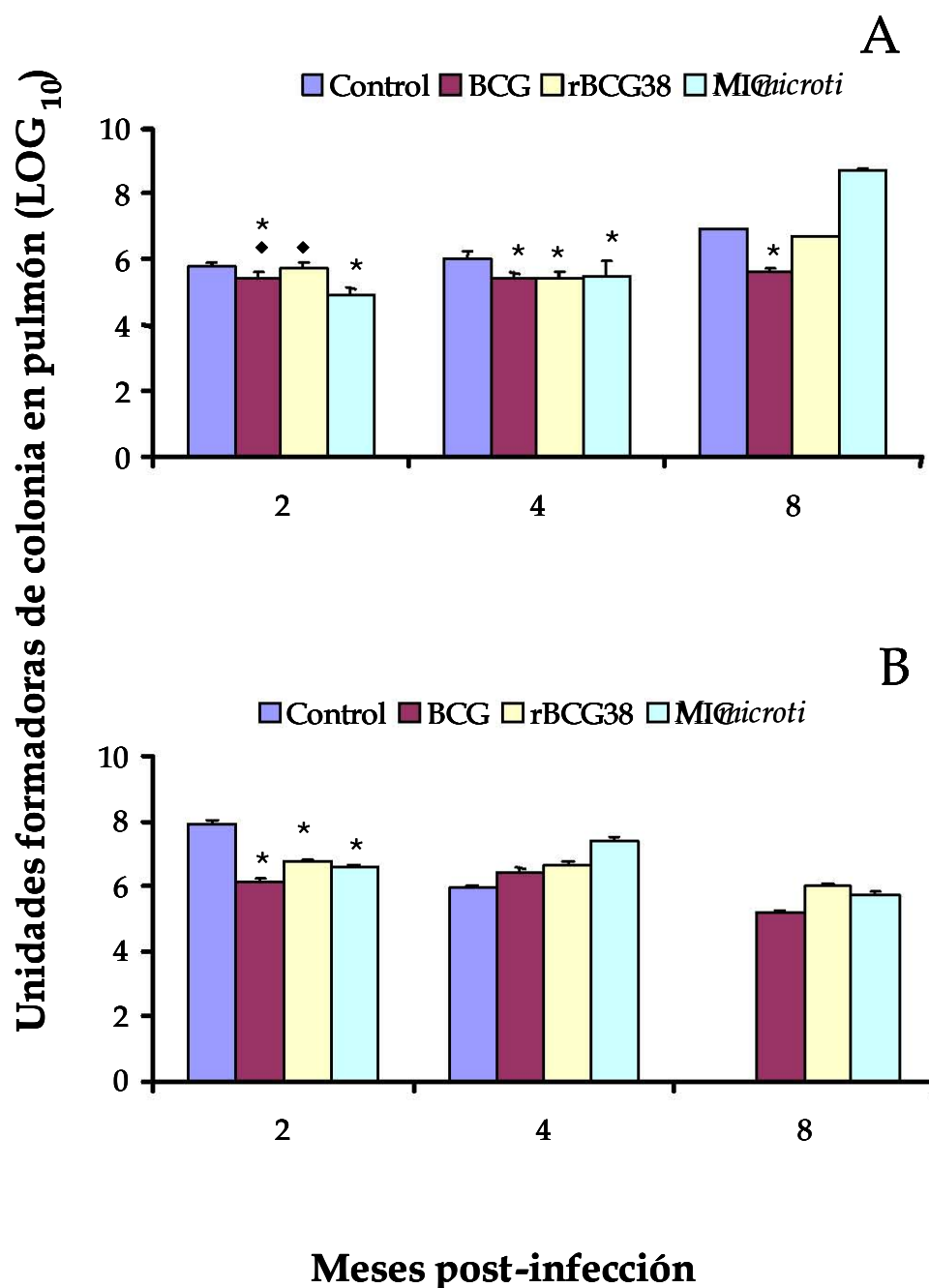
Tabla 3. Unidades formadoras de colonia/pulmón (\log_{10}) en ratones vacunados e infectados con *M. tuberculosis* H37Rv y *M. tuberculosis* Beijing.

Meses post-infección	UFC/pulmón (\log_{10}) de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv				UFC/pulmón (\log_{10}) de <i>M. tuberculosis</i> Beijing			
	Control Media \pm DE	BCG Phipps Media \pm DE	rBCG38 Media \pm DE	<i>M. microti.</i> Media \pm DE	Control Media \pm DE	BCG Phipps Media \pm DE	rBCG38 Media \pm DE	<i>M. microti</i> Media \pm DE
2	5.8 \pm 0.12	5.5 \pm 0.18* \blacklozenge	5.7 \pm 0.16 \blacklozenge	4.9 \pm 0.20*	7.9 \pm 0.12	6.1 \pm 0.13*	6.7 \pm 0.09*	6.6 \pm 0.04*
4	6.0 \pm 0.28	5.4 \pm 0.18*	5.4 \pm 0.21*	5.5 \pm 0.47*	6.0 \pm 0.06	6.4 \pm 0.14	6.6 \pm 0.15	7.4 \pm 0.14
8	6.9 \pm 0.07	5.6 \pm 0.14*	6.7 \pm 0.00	8.7 \pm 0.04	-	5.2 \pm 0.03	6.0 \pm 0.07	5.8 \pm 0.08

Valores obtenidos a partir de grupos de 2 a 6 pulmones.

* Valor estadísticamente significativo ($p < 0.05$) comparado con el grupo control; prueba ANOVA de 1 vía.

\blacklozenge Valor estadísticamente significativo ($p < 0.05$) comparado con el grupo *M. microti*; prueba ANOVA de 1 vía.



Gráfica 1. Unidades formadoras de colonia en pulmón de ratones vacunados e infectados con *M. tuberculosis* H37Rv (panel A) y *M. tuberculosis* Beijing (panel B). Cada barra representa el promedio de 2 a 6 pulmones con su respectiva desviación estándar. * Diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) comparado contra el grupo control; ♦ diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) comparado contra el grupo vacunado con *M. microti*. En la infección con *M. tuberculosis* Beijing, no se informan las UFC al octavo mes del grupo control debido a que sólo un animal del grupo sobrevivió y el pulmón completo se utilizó para el análisis histopatológico.

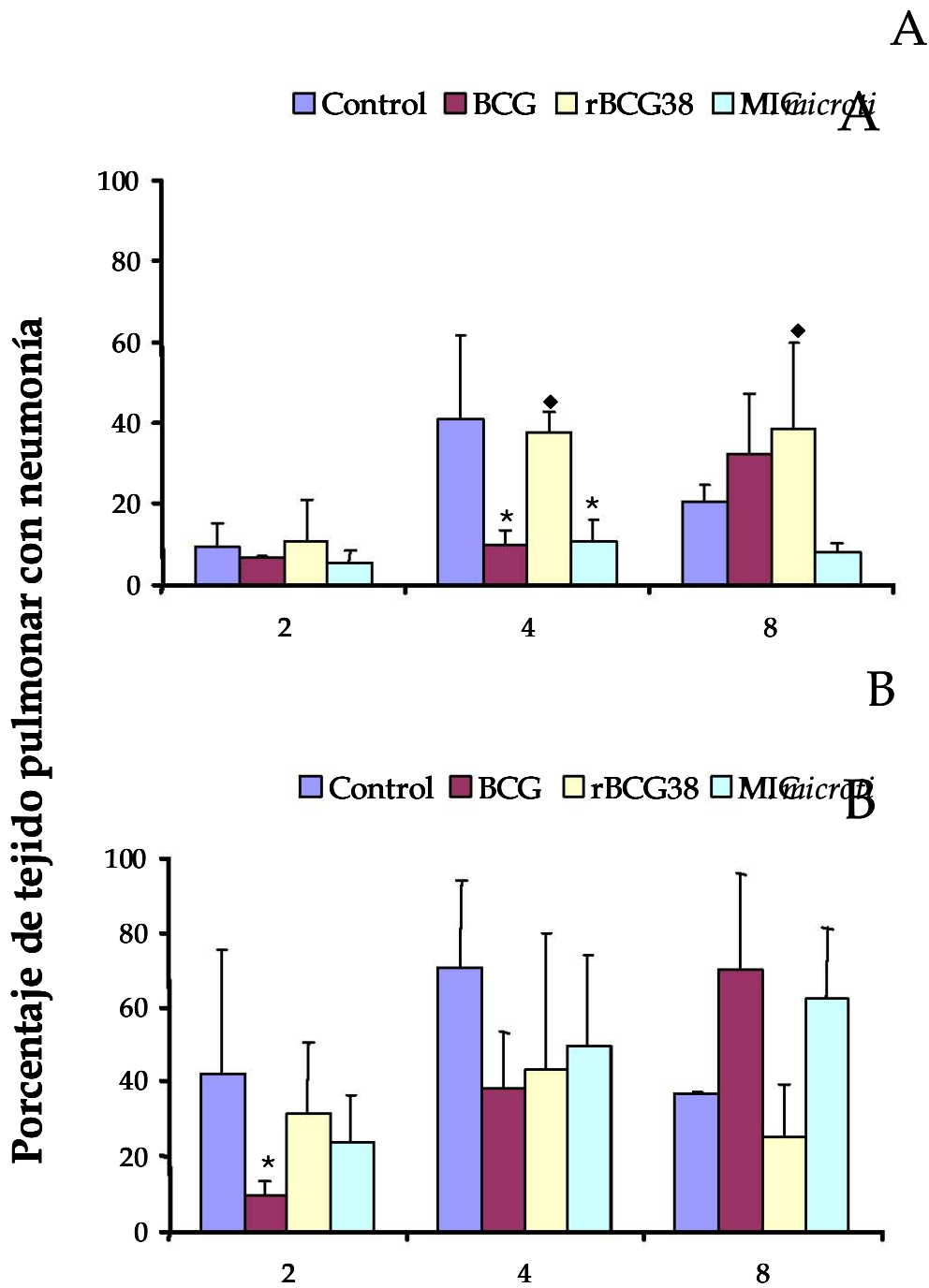
5.2 Análisis histopatológico

En los grupos infectados con *M. tuberculosis* Beijing, se observaron macrófagos espumosos y linfocitos, así como también un infiltrado inflamatorio, detectable desde el segundo mes post-infección, más intenso que el encontrado en los grupos infectados con *M. tuberculosis* H37Rv (figura 9). Los porcentajes de área de tejido pulmonar afectado con neumonía fueron dos veces mayores en los grupos infectados con *M. tuberculosis* Beijing que los observados en los grupos infectados con *M. tuberculosis* H37Rv.

En el grupo control, después de la infección con *M. tuberculosis* H37Rv se encontró un aumento en el porcentaje de área neumónica entre el segundo y cuarto mes post-infección: de $9.1 \pm 6.2\%$, éste se incrementó a $40.9 \pm 20.7\%$; en el octavo mes, no obstante, el porcentaje de tejido pulmonar con neumonía fue de 20.3 ± 4.3 . En el segundo mes post-infección no hubo diferencia significativa entre el grupo sin vacunar y los grupos inmunizados con rBCG38 y *M. microti*. Por otro lado, al cuarto mes de infección, el grupo vacunado con *M. microti* presentó un porcentaje de área neumónica de 10.8 ± 5.2 , el cual fue significativamente menor al obtenido en el grupo control (área de 40.9% , $p=0.009$) y a la del grupo vacunado con rBCG38 (área de $37.6 \pm 5.3\%$, partiendo de un intervalo de 9.7 a 40.9% ; $p=0.007$) (gráfica 2A). Dicho porcentaje fue muy semejante al obtenido en el grupo inmunizado con BCG (área de $9.7 \pm 3.7\%$). Al octavo mes, el porcentaje de neumonía en el grupo vacunado con BCG aumentó a $32.1 \pm 15.1\%$; en cuanto a los grupos rBCG38 y *M. microti*, si bien no hay una disminución del porcentaje de neumonía en cada uno, al menos éste se mantiene en el nivel detectado al del cuarto mes (gráfica 2A).

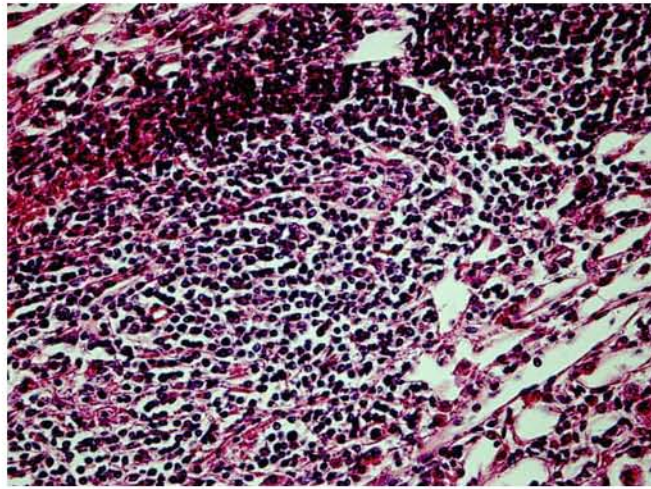
En el grupo control de animales infectados con *M. tuberculosis* Beijing se presentó un patrón de comportamiento semejante al observado en la infección con *M. tuberculosis* H37Rv: el porcentaje de área neumónica fue de $42.4 \pm 32.8\%$ al segundo

mes; $70.7 \pm 23.7\%$ al cuarto y $36.7 \pm 0.6\%$ al octavo (gráfica 2B). Durante el curso de la infección con este aislamiento, se observó un incremento progresivo en el porcentaje de tejido pulmonar afectado por neumonía en los grupos vacunados con BCG ($9.5 \pm 4.1\%$, $38.2 \pm 15\%$ y $69.8 \pm 26\%$) y con *M. microti* ($23.9 \pm 12.3\%$, $49.7 \pm 24.6\%$ y $62.3 \pm 18.7\%$). Por otro lado, en el grupo vacunado con rBCG38, los porcentajes encontrados en cada uno de los tiempos fueron de $31.6 \pm 19.1\%$, $43.4 \pm 36.6\%$ y $25.3 \pm 14.2\%$ (gráfica 2B). Al hacer la comparación entre grupos, sólo se encontró que la vacuna BCG mostró una disminución significativa del área neumónica ($p=0.024$) con respecto al grupo control en el segundo mes post-infección (gráfica 2B).

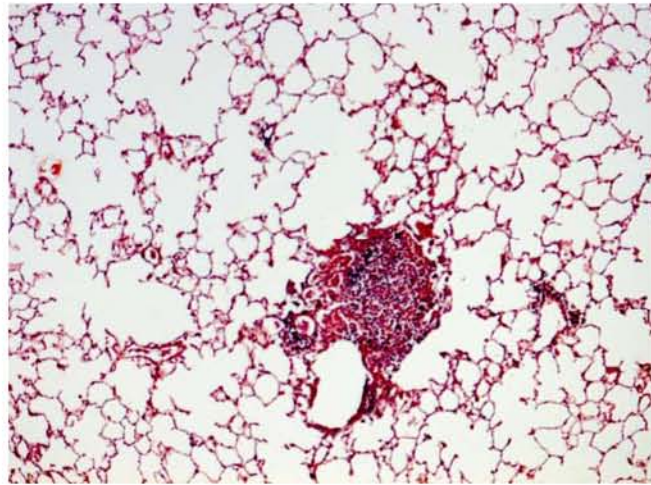


Meses post-infección

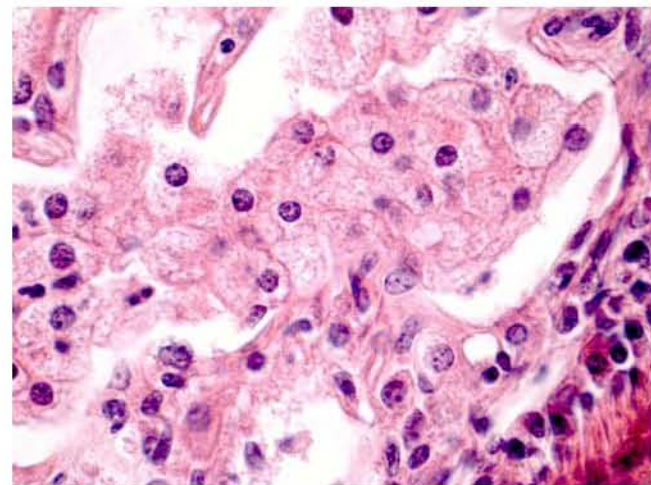
Gráfica 2. Porcentaje de tejido pulmonar con neumonía en ratones vacunados e infectados con *M. tuberculosis* H37Rv (panel A) y *M. tuberculosis* Beijing (panel B). Las barras representan el promedio + la desviación estándar de 2 a 6 pulmones. * Diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) comparado contra el grupo control; ♦ diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) comparado contra el grupo vacunado con *M. microti*.



a)



b)



c)

Figura 9. Histopatología observada en pulmón. a) Área neumónica detectada en los grupos infectados con *M. tuberculosis* Beijing. Tinción con hematoxilina-eosina, 40x. Ésta se caracterizó por un infiltrado leucocitario abundante, constituido principalmente por monocitos, macrófagos y linfocitos, fibrosis y destrucción del alveolo. b) Área neumónica observada en grupos infectados con *M. tuberculosis* H37Rv. A diferencia de los grupos infectados con la cepa del genotipo Beijing, aparecen granulomas pequeños y bien definidos. c) Macrófagos espumosos, encontrados en los pulmones de animales infectados con *M. tuberculosis* Beijing. Obsérvese que estas células tienen citoplasma abundante y vacuolizado.

6. DISCUSIÓN

La tuberculosis es un problema de salud serio en el mundo. La pandemia ocasionada por el virus de inmunodeficiencia humana y el surgimiento de cepas multi-fármaco resistentes representan un obstáculo para el control y erradicación de esta enfermedad, sobre todo en aquellas regiones del mundo donde ésta es endémica ²⁶.

Hasta ahora, la vacunación con BCG es la única medida preventiva contra la tuberculosis. No obstante, la eficacia protectora observada en ensayos clínicos es de 0 a 80%. Como consecuencia, se requiere una vacuna capaz de controlar la infección satisfactoriamente y que también sea eficaz al combatir la incidencia de cepas multi-fármaco resistentes ^{20, 34}.

Se han examinado un gran número de alternativas para producir una vacuna más eficaz que la BCG. Las vacunas vivas atenuadas son una opción viable y presentan ventajas sobre las vacunas de subunidades al ser fuente de una gran variedad de antígenos inmunodominantes, mismos que se expresan *in vivo*, además de que su producción es sencilla y económica ³⁴. Entre éstas, sobresalen algunas cepas recombinantes de BCG, como la rBCG38 desarrollada por Castañón-Arreola *et al.* ^{15, 16}. También se ha evaluado el uso de micobacterias estrechamente relacionadas a *M. tuberculosis* debido a que presentan una mayor homología a nivel antigénico. La especie *M. microti* es una cepa filogenéticamente cercana a *M. tuberculosis* ^{10, 11, 12, 19, 24, 37, 52}. Comparte antígenos inmunodominantes como el Ag85B. Esta es la razón por la que *M. microti* puede proporcionar una respuesta protectora contra *M. tuberculosis* y con ello, contener la infección y evitar la multiplicación del bacilo ³. Otra de las ventajas de *M. microti* sobre la vacuna actual consiste en que se puede mantener su inmunogenicidad (virulencia residual) mediante la infección en ratones de campo ¹⁹.

En un estudio realizado en humanos en los años 50's, *M. microti* demostró ser tan eficaz y segura como BCG en la prevención de la tuberculosis. Los resultados del mismo revelaron que la eficacia de la vacunación con *M. microti* fue del 77% y que la incidencia de la tuberculosis disminuyó substancialmente en los grupos vacunados durante la prueba, al menos durante los 20 años en los que se realizó esta evaluación ²⁹. Además, se encontró que no es patógena para el ser humano, salvo en casos extremadamente aislados de personas con inmunocompromiso ^{23, 42} por ciertas vías y a las dosis estudiadas. Lo que indica que es una cepa de inducción de respuesta inmune tipo Th1. *M. microti* tampoco es patógena para los animales de laboratorio, como los ratones BALB/c y los conejos ^{10, 11, 19, 37}.

Para evaluar el potencial de *M. microti* como vacuna contra la tuberculosis en el modelo murino de tuberculosis pulmonar, se decidió utilizar como grupos comparativos la BCG Phipps que es la cepa que en un estudio previo mostró conferir mayor protección contra la tuberculosis de entre 10 subcepas BCG evaluadas ¹⁵ y rBCG38 que es una vacuna desarrollada recientemente que demostró inducir una respuesta Th1 ^{15, 16}.

En este estudio los criterios de evaluación más importantes fueron las UFC de *M. tuberculosis* en pulmón y el porcentaje de tejido pulmonar con neumonía, ya que algunos estudios sugieren que la capacidad de una vacuna para disminuir el número de microorganismos en tejido y las lesiones ocasionadas es una medida de su eficacia ^{19, 34}.

Para la vacunación se utilizó una dosis única de 10^4 UFC porque en estudios previos se demostró que este número es suficiente para inducir una respuesta inmune celular de tipo Th1 ², mientras que la respuesta inmune de tipo Th2 depende de dosis altas ^{13, 28, 31, 37, 51}. Si bien la función de la respuesta humoral aún no está bien determinada en el control de la tuberculosis, se sabe que puede

regular negativamente a la respuesta Th1. Por consiguiente, es fundamental para una vacuna dirigida contra un patógeno intracelular asegurar que la inmunidad sea mayoritariamente de tipo Th1 ^{34, 51}.

Tomando en cuenta las observaciones anteriores, es preciso señalar que las vacunas, al ser clasificadas como fármacos, están sujetas a una evaluación de sus parámetros farmacocinéticos. Para el caso de *M. microti* se propone estudiar aspectos como la dosis, la multiplicación, la persistencia, el tipo de respuesta inmune inducida, el tiempo que ésta se mantiene y la eliminación por parte del hospedero ⁶⁰.

En este estudio, la vacunación con *M. microti* dio resultados comparables a los observados en los grupos inmunizados con BCG o con rBCG38, observándose una reducción significativa en el número de UFCs en pulmón en el segundo y cuarto mes tras un reto con *M. tuberculosis* H37Rv, y en el segundo mes posterior a la infección con *M. tuberculosis* Beijing (gráficas 1 y 2). Resultados similares se encontraron al cuantificar el porcentaje de tejido con neumonía, que no sólo fue menor respecto al grupo control al cuarto y octavo mes posterior a la infección con *M. tuberculosis* H37Rv, sino que el al cuarto mes fue semejante al observado en el grupo vacunado con BCG. Al octavo mes post-infección, se encontró un porcentaje de área de neumónica pequeño (7.9%) pero un número de UFCs muy alto (8.7 log₁₀ UFC/ pulmón), lo que pudiera estar reflejando una reactivación de la infección, o la evasión de la respuesta inmune por parte de *M. tuberculosis*, debido a que tanto *M. microti* como *M. tuberculosis*, además de compartir antígenos inmunogénicos pueden también presentar antígenos que favorecen su persistencia.

Utilizando el modelo de tuberculosis pulmonar progresiva, recientemente se han hecho evaluaciones acerca de la virulencia e inmunopatología inducida por diferentes cepas de *M. tuberculosis* ^{22, 36}. En nuestra evaluación, en los animales

vacunados con BCG e infectados con *M. tuberculosis* Beijing la protección fue diferente a la encontrada en los grupos infectados con *M. tuberculosis* H37Rv, dado que hubo reducción de UFC sólo al segundo mes post-infección y el porcentaje de tejido pulmonar afectado con neumonía fue mayor que el observado en los grupos de infección con *M. tuberculosis* H37Rv (figura 9). Esta situación se manifiesta también en la región asiática, en donde las cepas de *M. tuberculosis* Beijing son las más prevalentes y la vacunación con BCG da una menor protección. Es entonces que un entendimiento de las diferencias en la virulencia de las cepas puede ser importante para desarrollar vacunas que consigan ser aplicadas eficientemente en las regiones donde un fenotipo es prevalente, o donde la diversidad de aislamientos sea habitual, como lo es en los países latinoamericanos en los que la tuberculosis es endémica. Lo anterior demuestra que la protección que una vacuna proporciona depende también de la virulencia del microorganismo, hecho que se vio reflejado sobre todo en la histopatología observada ^{22, 36}.

Los hallazgos obtenidos con el presente estudio son útiles para justificar el uso de *M. microti* como una vacuna potencial contra la tuberculosis. A diferencia de los demás estudios ^{19, 37}, se comparó la eficacia de *M. microti* con la subcepa BCG que confiere una mayor protección que el resto de las subcepas en este modelo y además de utilizar la cepa de referencia *M. tuberculosis* H37Rv para infectar a los animales; se incluyó un aislamiento hipervirulento prevalente en las zonas endémicas.

El modelo murino de tuberculosis pulmonar progresiva empleado en este estudio consistió en una administración intratraqueal de 2.5×10^5 UFC de micobacterias viables ⁴, a diferencia de estudios previos en los que utilizaron vías de infección parenterales, como la intravenosa, que administran dosis altas de micobacterias directamente en el torrente sanguíneo, lo cual no se asemeja a la diseminación natural posterior a la infección respiratoria ^{44, 45, 46}.

Es necesario considerar la forma en que los bacilos son depositados en el pulmón. Ésta tiene que ser lo más cercana a la primoinfección en el humano y se debe lograr una distribución homogénea de los bacilos. Actualmente, se considera que la infección mediante aerosoles es el modelo más realista y permite una distribución uniforme de las bacterias ⁴⁴. No obstante, algunas investigaciones sugieren que con este modelo, los animales desarrollan patología rápidamente y mueren en poco tiempo ¹⁴, lo que dificulta los estudios de vacunación y protección a más largo plazo. Otros autores discrepan en el hecho de que un número reducido de bacterias se deposita en el pulmón, pero el resto del inóculo puede quedar en la nariz o ser tragado y transportado hasta el intestino. Es posible incluso que un número considerable de bacterias quede atrapado en el pelo, y que los animales al tragárselo se infecten con una dosis adicional a la necesaria para infectar el pulmón. En el modelo de infección intratraqueal no se presentan este tipo de problemas. No requiere equipo especial y los bacilos se depositan directamente en la tráquea, por lo que resulta ser un modelo de gran utilidad ⁴.

En un estudio realizado por Brodin *et al.* se evaluó la vacunación con una cepa de *M. microti*, a la que reintrodujeron la región RD1, en ratones SCID y BALB/c, encontrando una mejor protección contra tuberculosis comparado con la cepa sin recombinar. *M. microti*, al igual que BCG es un buen adyuvante, por lo que se considera un vehículo para el desarrollo de nuevas vacunas recombinantes ¹⁰.

Por último, con los resultados de este estudio se espera que *M. microti* sea considerado un candidato potencial para la vacunación contra la tuberculosis, ya sea sin recombinar o recombinante, considerando en los estudios futuros la vía de administración y dosis propuesta, incluyendo siempre un grupo control, un grupo vacunado con BCG Phipps, así como también los aislamientos de las zonas geográficas con mayor incidencia de tuberculosis, pues allí se requiere urgentemente una vacuna más eficaz que la BCG.

7. CONCLUSIONES

Al evaluar a *M. microti* como vacuna contra la tuberculosis, se encontró que:

- Confirió un grado de contención de la infección significativo contra una infección con *M. tuberculosis* H37Rv y comparable al conferido con la vacunación con BCG y rBCG38.
- Redujo significativamente la carga bacilar en los pulmones de los ratones al cuarto mes posterior a la infección con *M. tuberculosis* H37Rv.
- Disminuyó el porcentaje de tejido pulmonar con neumonía al octavo mes de infección con *M. tuberculosis* H37Rv.

8. PERSPECTIVAS

- Determinar aspectos cinéticos de *M. microti*: multiplicación y en el organismo y tiempo de eliminación.

- Evaluar el efecto de la dosis en la eficacia protectora.

- Caracterizar la respuesta inmune inducida por *M. microti*.

- Evaluar la eficacia de la vacuna con cepas representativas de las regiones endémicas, además de incluir el aislamiento hipervirulento del genotipo Beijing.

9. REFERENCIAS

1. **Agger EM, Andersen P.** A novel TB vaccine: towards a strategy based on our understanding of BCG failure. *Vaccine* 2002;21:7-14.
2. **American Thoracic Society.** Diagnostic Standard and Classification of Tuberculosis in Adults and Children. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2000;161:1376-1395.
3. **Andersen P, Doherty TM.** The success and failure of BCG – implications for a novel tuberculosis vaccine. *Nature Reviews Immunology* 2005;3 656-660.
4. **Arriaga AK, Orozco EH, Aguilar LC, Rook GAW, Hernandez-Pando R.** Immunological and pathological comparative analysis between experimental latent tuberculosis infection and progressive pulmonary tuberculosis. *Clinical and Experimental Immunology* 2002 128:229-237.
5. **Báez-Saldaña AR.** Epidemiología de la tuberculosis en México. *Salud Pública de México*; 2003;43:3-6.
6. **Beamer GL, Turner J.** Murine models of susceptibility to tuberculosis. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* 2005;53:469-483.
7. **Bonah C.** The 'experimental stable' of the BCG vaccine: safety, efficacy, proof and standards, 1921-1933. *Studies in History and Philosophy of Biological & Biomedical Sciences* 2005; 36:696-721.
8. **Books GF, Morse SA, Butel JS.** *Microbiología Médica de Jawetz, Melnik y Adelberg.* 16ª edición. México. Editorial El Manual Moderno. 1999. Pág. 343-352.
9. **Brandt L, Feino Cuhna J, Weinreich Olsen A, Chilima B, Hirsch P, Appelberg R, Andersen P.** Failure of the *Mycobacterium bovis* BCG Vaccine: Some species of Environmental Mycobacteria Block Multiplication of BCG and Induction of Protective Immunity to Tuberculosis. *Infection and Immunity* 2002;70:672-678.
10. **Brodin B, Majlessi L, Brosch R, Smith D, Bancroft G, Clark S, Williams A, Leclerc C, Cole ST.** Enhanced Protection against Tuberculosis by vaccination with Recombinant *Mycobacterium microti* Vaccine That Induces T Cell Immunity against Region of Difference 1 Antigens. *The Journal of Infectious Diseases* 2004;190:115-122.

11. **Brodin P, Eiglmeier K, Marmiesse M, Billault A, Garnier T, Niemann S, Cole ST, Brosch R.** Bacterial Artificial Chromosome-Based Comparative Genomic Analysis Identifies *Mycobacterium microti* as a Natural ESAT-6 Deletion Mutant. *Infection and Immunity* 2002;70:5568-5578.
12. **Brosch R, Gordon SV, Marmiesse M, Brodin P, Buchrieser C, Eiglmeier K, Garnier T, Gutiérrez C, Hewinson G, Kremer K, Parsons LM, Pym AS, Samper S, van Soolingen D, Cole ST.** A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America* 2002;99:3684-3689.
13. **Buddle BM, de Lisle GW, Pfeiffer A, Aldwell FE.** Immunological responses and protection against *Mycobacterium bovis* in calves vaccinated with a low dose of BCG. *Vaccine* 1995;13:1123-1230.
14. **Cardona PJ, Cooper A, Luquin M, Ariza A, Filipo F, Orme IM, Ausina V.** The Intravenous Model of Murine Tuberculosis is Less Pathogenic Than the Aerogenic Model Swing to a More Rapid Induction of Systemic Immunity. *Scandinavian Journal of Immunology* 1999;49:362-366.
15. **Castañón Arreola M.** Estudio de la respuesta Th 1 inducida por las proteínas ESAT-6 y 38-kDa de *M. tuberculosis* en la vacuna BCG (bacilo Calmette-Guérin). Tesis para obtener el título de Doctor en Ciencias Biomédicas. Facultad de Medicina, UNAM. 23 de junio de 2005.
16. **Castañón-Arreola M, López-Vidal Y, Espitia-Pinzón C, Hernández-Pando R.** A new vaccine against tuberculosis shows greater protection in a mouse model with progressive pulmonary tuberculosis. *Tuberculosis* 2005;85:115-126.
17. **Castañón-Arreola M, López-Vidal Y.** A second-generation anti TB vaccine is long overdue. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 2004; 3(1):10.
18. **Co DO, Hogan LH, Kim SI, Sandor M.** Mycobacterial granulomas: keys to a long-lasting host-pathogen relationship. *Clinical Immunology* 2004; 13:130-136.
19. **Dannenber AM, Bishai WR, Parrish N, Ruiz R, Johnson W, Zook BC, Boles JW, Pitt LM.** Efficacies of BCG and vole bacillus (*Mycobacterium microti*) vaccines in preventing clinically apparent pulmonary tuberculosis in rabbits: a preliminary report. *Vaccine* 2001;19:796-800.

20. **Dietrich G, Viret JF, Hess J.** *Mycobacterium bovis* BCG-based vaccines against tuberculosis: novel developments. *Vaccine* 2003;21:667-670.
21. **Doherty TM.** Real world TB vaccines: clinical trials in TB-endemic regions. *Vaccine* 2005;23:2109-2114.
22. **Dormans J, Burger M, Aguilar D, Hernandez-Pando R, Kremer K, Roholl P, Arend SM, van Soolingen D.** Correlation of virulence, lung pathology, bacterial load and delayed type hypersensitivity responses after infection with different *Mycobacterium tuberculosis* genotypes in a BALB/c mouse model. *Clinical and Experimental Immunology* 2004;137:460-468.
23. **Foudraine NA, van Soolingen D, Noordhoek GT, Reiss P.** Pulmonary tuberculosis due to *Mycobacterium microti* in a human immunodeficiency virus-infected patient. *Clinical Infectious Diseases* 1998;27:1543-1544.
24. **Frota CC, Hunt DM, Buxton RS, Rickman L, Hinds J, Kremer K, van Soolingen D, Colston JM.** Genome structure in the vole bacillus, *Mycobacterium microti*, a member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex with a low virulence for humans. *Microbiology* 2004;150:1519-1527.
25. **García-Sancho, Figueroa María CE.** Respuesta inmune a la infección por *Mycobacterium tuberculosis*. Una revisión de la literatura. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias* 2001;14:114-128.
26. **Girard MP, Fruth U, Kieny MP.** A review of vaccine research and development: Tuberculosis. *Vaccine* 2005;23:5725-5731.
27. **Gorocica P, Jiménez-Martínez MC, Sada I, Lascuráin R.** Componentes glicosilados de la envoltura de *Mycobacterium tuberculosis* que intervienen en la patogénesis de la tuberculosis. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias* 2005;18:142-153.
28. **Grupo V, Orme IM.** Dose of BCG does not influence the efficient generation of protective immunity in mice challenged with *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis* 2002;82:267-273
29. **Hart PDA, Sutherland I.** BCG and vole bacillus vaccines in the prevention of tuberculosis in adolescence and early adult life. *British Medical Journal* 1977;2:293-295.

30. **Hawgood BJ.** Doctor Albert Calmette: founder of antivenomous serotherapy and of tuberculosis BCG vaccination. *Review Toxicol* 1999; 37:1241-1258.
31. **Horwitz MA, Harth G, Dillon BJ, Maleša-Galić S.** Extraordinarily few organisms of a live recombinant BCG vaccine against tuberculosis induce maximal cell-mediated and protective immunity. *Vaccine* 2006;24:443-51.
32. **Horwitz MA, Harth G, Dillon BJ, Maleša-Galić S.** Recombinant bacillus Calmette-Guérin (BCG) vaccines expressing the *Mycobacterium tuberculosis* 30 k-Da major secretory protein induce greater protective immunity against tuberculosis than conventional BCG vaccines in a highly susceptible animal model. *Microbiology* 2000;97:13853-13858.
33. **Infante E, Aguilar LD, Gicquel B, Hernandez Pando R.** Immunogenicity and protective efficacy of the *Mycobacterium tuberculosis fadD26* mutant. *Clinical and Experimental Immunology* 2005;141:21-28.
34. **Jackson M, Phallen SW, Lagranderie M, Ensergueix D, Chavarot P, Marchal G, McMurray DN, Gicquel B, Guilhot C.** Persistence and Protective Efficacy of a *Mycobacterium tuberculosis* Auxotroph Vaccine. *Infection and Immunity* 1999;67:2867-2873.
35. **Kauffmann SHE.** Immune response to tuberculosis: experimental animal models. *Tuberculosis* 2003;83:107-111.
36. **López B, Aguilar D, Orozco H, Burger M, Espitia C, Rittaco V, Barrera L, Kremer K, Hernandez-Pando R, Huygen K, van Soolingen D.** A marked difference in pathogenesis and immune response induced by different *Mycobacterium tuberculosis* genotypes. *Clinical and Experimental Immunology* 2003;133:30-37.
37. **Manabe YC, Scott CP, Bishai WR.** Naturally Attenuated, Orally Administered *Mycobacterium microti* as a Tuberculosis Vaccine Is Better than Subcutaneous *Mycobacterium bovis* BCG. *Infection and Immunity* 2002;70:1566-1570.
38. **Manabe YC, Bishai WR.** Latent *Mycobacterium tuberculosis*-persistence, patience and winning by waiting. *Nature Medicine* 2000;6:1327-1329.

39. **Mc Murray DN.** Recent progress in the development and testing of vaccines against human tuberculosis. *International Journal for Parasitology* 2003; 3:547-554.
40. **McMurray DN.** Disease model: pulmonary tuberculosis. *TRENDS in Molecular Medicine* 2001;7:135-137.
41. **Murray JF.** A Century of Tuberculosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2004;169:1181-1186.
42. **Niemann S, Ritcher E, Dalugge-Tamm H, Schlesinger H, Graupner D, Konigstein B, Gurath G, Greinert U, Rusch-Gerdes S.** Two Cases of *Mycobacterium microti*-Derived Tuberculosis in HIV-Negative Immunocompetent Patients. *Emerging Infectious Diseases* 2000;6:539-542.
43. **North RJ, Jung YL.** Immunity to Tuberculosis. *Annual Review of Immunology* 2004;22:599-623.
44. **Orme IM.** Preclinical testing of new vaccines for tuberculosis: A comprehensive review. *Vaccine* 2006;24:2-19.
45. **Orme IM.** The use of animal models to guide rational vaccine design. *Microbes and Infection* 2005;7:905-910.
46. **Orme IM.** Current Progress in tuberculosis vaccine development. *Vaccine* 2005;23:2105-2108.
47. **Orme IM.** The mouse as a useful model of tuberculosis. *Tuberculosis* 2003; 83:112-115.
48. **Orme IM, McMurray DN, Belisle JT.** Tuberculosis vaccine development: recent progress. *TRENDS in Microbiology* 2001;9:115-118.
49. **Pacheco CR, Rinza VV, Badillo N.** Vacuna del Bacilo de Calmette y Guérin (BCG). *Vacuitas, Ciencia y Salud* 1998;187-201
50. **Pfyffer GE, Brown-Elliott BA, Wallace RJ Jr.** *Mycobacterium*: General Characteristics, Isolation, and Staining Procedures. In: Patrick R. Murray, E. Jo Barron, Michael A. Pfaller, Fred C. Tenover, Robert H. Tenover, Robert H. Yolken. *Manual of Clinical Microbiology*. 8th Edition. ASM PRESS. Washington, D.C. 2003. Volume 1. Pág. 532-535.

51. **Power CA, Wei G, Bretscher PA.** Mycobacterial dose defines the Th1/Th2 nature of the immune response independently of whether immunization is administered by the intravenous, subcutaneous, or intradermal route. *Infection and Immunity* 1998;66:5743-5750.
52. **Pym AS, Brodin P, Brosch R, Huerre M, Cole ST.** Loss of RD1 contributed to the attenuation of the live tuberculosis vaccines *Mycobacterium bovis* BCG and *Mycobacterium microti*. *Molecular Microbiology* 2002;46:709-717.
53. **Raja A.** Immunology of tuberculosis. *The Indian Journal of Medical Research* 2004;120:213-232.
54. **Reed SG, Alderson MR, Dalemans W, Lobert Y, Skeiky YAW.** Prospects for a better vaccine against tuberculosis. *Tuberculosis* 2003;83:213-219.
55. **Russell DG.** *Mycobacterium tuberculosis*: here today, and here tomorrow. *Nature Reviews Microbiology* 2001;2:10.
56. **Schluger NW, Rom WN.** The Host Immune Response to Tuberculosis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 1998;157:679-691.
57. **Smith I.** *Mycobacterium tuberculosis* Pathogenesis and Molecular Determinants of Virulence. *Clinical Microbiology Reviews* 2003;16:463-496.
58. **Stenger S, Modlin RL.** T cell mediated immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *Current Opinion in Microbiology* 1999;2:89-93.
59. **Tortora GJ, Funke BR, Case CL.** Microbiology, an introduction. 5th edition. United States of America. Benjamin Cummings Publishing Co., 1995. Pág. 594-596.
60. **Verdier F.** Non-clinical vaccine safety assessment. *Toxicology* 2002;174:37-43.
61. **Wells AQ, Wylie JAH.** Vaccination against tuberculosis with the vole bacillus. *British Medical Bulletin* 1954;10:96-100.
62. **Wolfgang KJ, Willet HP, Amos DB, Wilfiert AM.** Microbiología de Zinsser. 20^a edición. Argentina. Editorial Médica-Panamericana, 1994. Pág. 685-702.
63. **World Health Organization.** TB report 2005.

64. **Zink AR, Grabner W, Nerlich AG.** Molecular Identification of Human Tuberculosis in Recent and Historic Bone Tissue Samples: The Role of Molecular Techniques for the Study of Historic Tuberculosis. *American Journal of Physical Anthropology* 2005;126:32-47.

ABREVIATURAS

ANOVA	Análisis de varianza
ATCC	Colección Americana de Cultivos Tipos
BCG	Bacilo de Calmette-Guerin
CD4	Designación de Grupo 4
CD8	Designación de Grupo 8
CFP-10	Proteína de Filtrado de Cultivo de 10kDa
CO ₂	Dióxido de Carbono
DAF	Diacetato de Fluoresceína
DE	Desviación Estándar
DNA	Ácido Deoxiribonucleico
ESAT-6	Antígeno Blanco de Secreción Temprana de 6 kDa
g	Gravedad
hsp	Proteína de choque térmico
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleucina
INF- γ	Gamma-Interferón
iNOS2	Óxido Nítrico Sintasa Inducible tipo 2
kg	Kilogramo
Log ₁₀	Logaritmo base 10
MHC	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
mL	Mililitro
<i>M. bovis</i>	<i>Mycobacterium bovis</i>
<i>M. microti</i>	<i>Mycobacterium microti</i>
<i>M. tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
NK	Asesinas Naturales
<i>Nramp</i>	Proteína de Macrófago asociada a la Resistencia Natural
OADC	Ácido Oleico-Albúmina-Dextrosa-Catalasa
OMS	Organización Mundial de la Salud
ON	Óxido Nítrico
PBS	Amortiguador Salino de Fosfatos
PstS	Proteína Transportadora de Fosfatos
RD1	Región Deletada 1
<i>RNA_r</i>	Ácido Ribonucleico ribosomal
RNI	Intermediarios Reactivos de Nitrógeno
ROI	Intermediarios Reactivos de Oxígeno
SCID	Síndrome de Inmunodeficiencia Severa Combinada
Th1	Respuesta T Cooperadora tipo 1
Th2	Respuesta T Cooperadora tipo 2
TNF- α	Factor de Necrosis Tumoral alfa
UFC	Unidades Formadoras de Colonias

VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana
%	Por ciento
° C	Grados Celsius
µg	Microgramo
µm	Micrómetro