



---

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD  
ANIMAL**

**INFLUENCIA DE VARIABILIDAD GENÉTICA DE  
*Mycobacterium bovis* EN LA VIRULENCIA Y  
RESPUESTA INMUNE EXPERIMENTAL**

**T E S I S**

**PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS**

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

**Raymundo Oropeza Jiménez**

**TUTOR: Dr. Rogelio Hernández Pando**

**COMITÉ TUTORAL: Dra. Clara Inés Espitia Pinzón  
Dr. José Ángel Gutiérrez Pabello**

**México, D. F.**

**2009**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

## **DEDICATORIA**

### ***A mis padres***

Por todo el amor, comprensión, dedicación, apoyo y paciencia que me han brindado a lo largo de mi vida.

### ***A mis hermanos***

Por estar siempre a mi lado, ayudarme a ser mejor persona, para así lograr mis metas.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi tutor el Dr. Rogelio Hernández Pando, por su apoyo, paciencia y dirección durante todo este tiempo.

A la Dra. Diana Aguilar León, por su apoyo y enseñanzas en el laboratorio, sin su ayuda este trabajo no habría podido realizarse.

A los miembros de mi Comité Tutorial: la Dra Clara Inés Espitia Pinzón y el Dr. José Ángel Gutiérrez Pabello, por compartir sus conocimientos en el desarrollo de esta tesis.

A los integrantes de mi jurado: Dra. Iris Estrada García, Dra Laura Cobos Marín, Dr. Fernando Díaz Otero y Dr. Alejandro de la Peña Moctezuma, sin su dedicación no se habría concretado este trabajo.

A mis amigos: Manuel, Ismael, Marco Antonio, Víctor, Juan Luís, Gonzalo y Adriana, por compartir esos buenos y malos momentos.

A los miembros del Departamento de Producción Animal: Cerdos de la FMVZ, por el apoyo brindado todos estos años.

Y muy especialmente a la Dra. Alejandra Mercadillo Sierra y al Dr. Jaime Campuzano Granados, por su ayuda en esos momentos donde más los necesitaba.

# ÍNDICE

| <b>CONTENIDO</b>                                                                                                                             | <b>PÁGINA</b> |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------|
| <b>RESUMEN</b>                                                                                                                               | <b>3</b>      |
| <b>INTRODUCCIÓN</b>                                                                                                                          | <b>4</b>      |
| Taxonomía y epidemiología                                                                                                                    | 4             |
| Características del agente                                                                                                                   | 5             |
| Adaptación de <i>Mycobacterium bovis</i> a otras especies animales                                                                           | 7             |
| Impacto en salud pública                                                                                                                     | 9             |
| Impacto económico                                                                                                                            | 10            |
| Situación de la tuberculosis bovina en México                                                                                                | 10            |
| Situación internacional                                                                                                                      | 12            |
| Respuesta inmune del hospedero ante tuberculosis                                                                                             | 13            |
| Identificación de especies dentro del complejo <i>M. tuberculosis</i>                                                                        | 24            |
| <b>JUSTIFICACIÓN</b>                                                                                                                         | <b>26</b>     |
| <b>HIPÓTESIS</b>                                                                                                                             | <b>27</b>     |
| <b>OBJETIVO GENERAL</b>                                                                                                                      | <b>28</b>     |
| <b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>                                                                                                                    | <b>29</b>     |
| Características epidemiológicas y genéticas de las cepas de <i>M. bovis</i>                                                                  | 29            |
| Modelo murino de tuberculosis pulmonar progresiva                                                                                            | 29            |
| Conteo de Unidades Formadoras de Colonia (UFC)                                                                                               | 31            |
| Histología y morfometría                                                                                                                     | 31            |
| Análisis de citocinas por PCR en tiempo real en homogenizados de pulmón                                                                      | 31            |
| Estadística                                                                                                                                  | 33            |
| <b>RESULTADOS</b>                                                                                                                            | <b>34</b>     |
| Cepas y genotipificación                                                                                                                     | 34            |
| Diferencias en supervivencia, patología del pulmón y cargas bacilares en los ratones BALB/c infectados con diversas cepas de <i>M. bovis</i> | 35            |
| Diferentes respuestas inmunes evocadas por diversas cepas de <i>M. bovis</i>                                                                 | 39            |
| <b>DISCUSIÓN</b>                                                                                                                             | <b>43</b>     |
| <b>CONCLUSIONES</b>                                                                                                                          | <b>48</b>     |
| <b>BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA</b>                                                                                                               | <b>49</b>     |

## Abstract

With the hypotheses that *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*) genetic variability could influence on the level of virulence and immunopathology, five *M. bovis* strains were selected from an epidemiological study in Argentina, on the basis of their prevalence in cattle and occurrence in other species.

We then determined the virulence and the immunopathology evoked by these strains in a well characterized mouse model of progressive pulmonary tuberculosis. The reference strain AN5 was used as a control.

BALB/c mice infected with the *M. bovis* reference strain AN5 showed 50% survival after four months of infection, with moderate bacillary counts in the lung. Two weeks after inoculation it induced strong inflammatory response with numerous granulomas and progressive pneumonia. In contrast, strain 04-303, isolated from a wild boar, was the most lethal and its most striking feature was sudden pneumonia with extensive necrosis. Strain 04-302, also isolated from wild boar but with a different spoligotype, induced a similar pathology, but to a lesser extent. In contrast, strains 534, V2 (both from cattle) and 02-2B (from human) were less virulent, permitting higher survival after four months of infection and limited tissue damage.

Concerning cytokines production, strain AN5 and the cattle and human strains induced rapid, high and stable expression of IFN $\gamma$  and iNOS. In contrast, the more virulent strains induced lower expression of IFN $\gamma$ , TNF, and iNOS. Interestingly, the infection with the more virulent strains induced very low expression of murine beta defensin 4 (mBD-4), whereas the control strain AN5 induced progressively increasing expression of this anti-microbial peptide, peaking at day 120. The less virulent strains induced high expression during early infection. Thus, as reported with clinical isolates of *M. tuberculosis*, *M. bovis* also showed variable virulence. This variability can be attributed to the induction of a different pattern of immune response.

Keywords: Tuberculosis, *Mycobacterium bovis*, genotypes, mouse model, lung, immune response, pathological injuries.

## Resumen

Bajo la hipótesis de que la variabilidad genética de *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*) puede influenciar el nivel de virulencia e inmunopatología, cinco cepas de *M. bovis* fueron seleccionadas de un estudio epidemiológico en Argentina, con base en su predominio en ganado bovino y ocurrencia en otras especies. Determinamos la virulencia e inmunopatología evocadas por estas cepas en un modelo bien caracterizado de tuberculosis pulmonar progresiva en ratón. La cepa de referencia AN5 de *M bovis* fue utilizada como control.

Ratones BALB/c infectados con la cepa de referencia AN5 mostraron una supervivencia del 50% después de cuatro meses de infección, con un número moderado de cuentas bacilares en pulmón. Dos semanas después de la inoculación, se indujo una fuerte respuesta inflamatoria con numerosos granulomas y neumonía progresiva. En contraste, la cepa 04-303 aislada de un cerdo salvaje fue la más letal y su característica más significativa fue el desarrollo repentino de neumonía con necrosis extensa. La cepa 04-302 aislada de un cerdo salvaje pero con diferente spoligotipo, indujo una patología similar, aunque en menor grado. En cambio las cepas 534 y V2 (ambas aisladas de bovino) y 02-2B (de humano), resultaron ser menos virulentas permitiendo una mayor sobrevivencia después de cuatro meses de infección, estas cepas solo indujeron pequeños parches de neumonía y el daño a los tejidos fue limitado.

Con respecto a la producción de citocinas la cepa AN5, las cepas aisladas de humano y de ganado bovino indujeron una expresión rápida, alta y estable de IFN $\gamma$  e iNOS. En cambio las cepas más virulentas indujeron una baja expresión de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e iNOS. La infección con las cepas más virulentas indujo una expresión muy baja de beta defensina 4 murina (mBD-4), mientras que la cepa control AN5 indujo una expresión progresiva cada vez mayor de este péptido antimicrobiano, alcanzando su máxima expresión al día 120. En relación con la expresión mBD-4, todas las cepas menos virulentas indujeron una alta expresión durante la infección temprana. Según lo reportado con aislamientos clínicos de *M. tuberculosis*, *M. bovis* también demostró variabilidad en su virulencia. La inducción de diversos patrones en la respuesta inmune puede atribuirse a ésta variabilidad.

# INTRODUCCIÓN

Las micobacterias en general están ampliamente difundidas en la naturaleza y bajo determinadas circunstancias, se comportan como agentes patógenos para el hombre y los animales.<sup>1</sup> La tuberculosis bovina (TB) es una enfermedad zoonótica infecciosa, extendida mundialmente, causada por *Mycobacterium bovis*.

Comúnmente se define como una enfermedad crónica, debilitante que puede ser de forma aguda y de curso rápidamente progresivo.<sup>2</sup>

Se ha determinado la existencia de infecciones por micobacterias desde hace miles de años, encontrándose el agente incluso en momias egipcias. Se estima que el bacilo de la tuberculosis se estableció con el desarrollo urbano en la Edad Media en Europa, para luego diseminarse al Nuevo Mundo con los viajes de los descubridores, aunque la enfermedad ya existía en personas en América por lo menos 700 años antes de nuestra era.<sup>3</sup>

## Taxonomía y epidemiología

El complejo *Mycobacterium tuberculosis* (MTBC), está constituido por *M. tuberculosis* y tradicionalmente se considera como agente etiológico en la tuberculosis humana; *M. bovis* como el causante de la TB, *M. africanum* (subtipos I y II) provocando también tuberculosis en humanos, prevalente en el continente Africano y *M. microti* que causa tuberculosis en roedores. Recientemente se han descrito tres nuevos miembros del complejo: *M. canetti*,<sup>4, 5</sup> una variante que primero fue aislada de un paciente somalí; *M. bovis* subsp *caprae*, estrechamente relacionado a los *M. bovis* “clásicos”, que infecta sobre todo a cabras en España, seres humanos y bovinos en Europa Central, causando una tercera parte de los casos de tuberculosis humana en Alemania; finalmente, *M. pinnipedii* que causa tuberculosis en mamíferos marinos.<sup>6,7</sup>

Sin embargo, cualquier miembro del MTBC puede producir infección en el hombre.<sup>8, 9</sup> La enfermedad producida por *M. bovis* en humanos es virtualmente



indistinguible de la causada por *M. tuberculosis*, tanto clínica como histológicamente.<sup>10</sup>

Los microorganismos pertenecientes al género *Mycobacterium* están altamente relacionados y exhiben gran homogeneidad en la secuencia de nucleótidos, a pesar de sus variaciones en cuanto a poder patógeno, distribución geográfica, epidemiología, hospedador preferente y algunas características fisiológicas, tales como la morfología colonial, patrones de resistencia y susceptibilidad a agentes antimicrobianos.<sup>11</sup> La secuencia genómica de *M. bovis* tiene más de un 99.95% de identidad con la de *M. tuberculosis*. La supresión de información genética ha dado lugar a un tamaño genómico más reducido en *M. bovis*, careciendo de varias regiones llamadas RD (regiones de diferencia): RD4, RD5, RD6, RD7, RD8, RD9, RD10, RD12 y RD13.<sup>12</sup>

### **Características del agente.**

Los miembros del género *Mycobacterium* se caracterizan por tener una pared celular completamente diferente a las restantes eubacterias. La pared de las micobacterias posee un alto contenido de lípidos que la hace impermeable a los agentes hidrofílicos, por lo tanto estos microorganismos no se tiñen adecuadamente con los reactivos utilizados en la coloración de Gram y usualmente no son referidos como Gram positivos o negativos.

Las micobacterias son teñidas adecuadamente por el método de Ziehl-Neelsen (Tinción Acido-Rápida o Acid-Fast Stain), que utiliza como solución decolorante una mezcla de etanol y ácido clorhídrico. Estos microorganismos una vez teñidos son resistentes a la decoloración ácido-alcohólica y por eso se denominan Bacilos Acido Alcohol Resistentes (BAAR).<sup>13</sup>

Los microorganismos del género *Mycobacterium* contienen una membrana citoplasmática formada por una bicapa lipídica similar a las restantes eubacterias. Por encima de esta membrana se encuentra el rígido peptidoglicano que contiene N-glucolilmurámico en lugar de N-acetilglucosamina. Por medio de una unión fosfodiéster, el peptidoglicano se encuentra unido covalentemente al

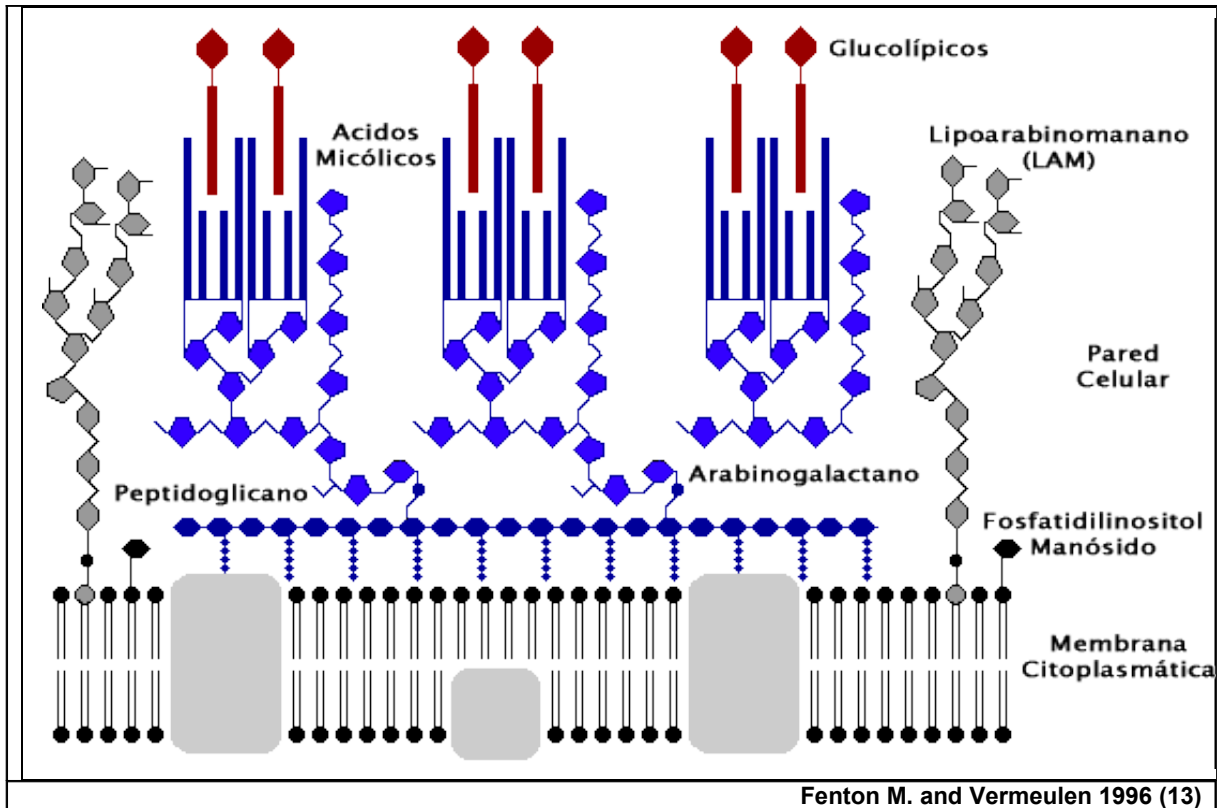
arabinogalactano, un polímero de arabinosa y galactosa. En la porción más distal y externa de los arabinogalactanos están fijados los ácidos micólicos que tienen cadenas carbonadas largas (C60 a C90).

Los glucolípidos son un grupo de compuestos (micolatos de trealosa, sulfolípidos y micósidos) que se encuentran asociados no covalentemente a los ácidos micólicos y se ubican periféricamente en la pared.

Los micolatos de trealosa (trealosa 6-6-dimicolato, llamado “factor cordón” o serpienteante), son antiquimiotácticos y altamente tóxicos para los leucocitos: inhiben la acción de la succinato deshidrogenasa, provocando el hinchamiento de sus mitocondrias y separando a los ribosomas del retículo endoplásmico rugoso. Los sulfolípidos actúan como fagolisosomasa (impidiendo la fusión lisosoma-fagosoma en los fagocitos) y potencian la capacidad del “factor de cordón”.

Otro factor de virulencia importante es el complejo superóxido dismutasa (SOD)/catalasa, que neutraliza el poder oxidante de los iones superóxido ( $O_2^-$ ) y del peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), presentes en los lisosomas de los fagocitos.<sup>14</sup>

El lipoarabinomano (LAM) es un compuesto que se halla anclado en la membrana citoplasmática. El LAM es considerado como el equivalente micobacteriano del lipopolisacárido de las Gram negativas, debido a que provoca una importante respuesta antimicrobiana en macrófagos. En las cepas de micobacterias más virulentas la arabinosa terminal del LAM está recubierta con residuos de manosa (manLAM) a diferencia de las cepas no virulentas que no están recubiertas (AraLAM). Además, el LAM puede servir como poro para el paso de los nutrientes a través de la pared celular. En la pared celular también se encuentran proteínas inmunoreactivas que son utilizadas con fines diagnósticos (como los derivados proteicos purificados o PPD).<sup>13</sup>



### Adaptación de *Mycobacterium bovis* a otras especies animales.

Se considera a los bovinos como los huéspedes específicos de *M. bovis*, pero ya que la bacteria no presenta especificidad por algún hospedero en particular, la enfermedad se puede presentar en el hombre y en una gran variedad de animales domésticos y no domésticos.<sup>14</sup>

Entre los animales domesticados que pueden ser infectados se incluyen los miembros de la familia *Bovidae*, como ejemplos las vacas, búfalos de granja, cabras, varias especies de ciervos, ovejas, cerdos y una gran variedad de especies salvajes y en cautiverio; constituyendo un importante reservorio de la infección,<sup>15, 16</sup> esta amplia distribución tiene como consecuencias un gran impacto negativo en la salud humana e importantes pérdidas económicas en la industria pecuaria.<sup>17, 18</sup>

En el medio natural los cérvidos, con mayor frecuencia el ciervo (*Cervus elaphus*), el alce (*Alces alces*) y la gacela (*Capreolus capreolus*) son reservorios principales (especies que se infectan con frecuencia) de *M. bovis*. Un mustélido, el tejón

(*Meles meles*) y el jabalí (*Sus scrofa*) que también actúan como reservorios, son especies no susceptibles, pero pueden eliminar altas concentraciones de micobacterias, ya que habitualmente las bacterias quedan contenidas en nódulos linfáticos retrofaríngeos y pulmones.<sup>19</sup>

Como reservorios secundarios y accidentales intervienen especies que no suelen ser portadores habituales de estas micobacterias (como las cabras) y en tal caso, la eliminan en escasa intensidad. Al igual que los carnívoros (como perros y gatos) y los équidos. Todos ellos pueden transmitir la infección únicamente a especies altamente susceptibles (rumiantes y el hombre), bajo la condición de contactos muy reiterados.<sup>20</sup> Sin embargo, en España se han identificado cepas de *M. bovis* aisladas de caprinos que tienen características genotípicas particulares y que predominan en pequeños rumiantes. Esto ha llevado a colocar a los aislados caprinos, como pertenecientes a una nueva especie del MTBC denominada recientemente *M. bovis* subsp. *caprae*.<sup>17, 18</sup> Esta especie se ha encontrado en un tigre siberiano (*Panthera tigris altaica*) cautivo en Hungría que presentaba un cuadro respiratorio de tuberculosis.<sup>19</sup>

La infección en cerdos ocurre principalmente por vía digestiva al consumir productos lácteos o desechos de matadero contaminados con *M. bovis*, pero su importancia epidemiológica es limitada pues la transmisión entre cerdos es insignificante, sus lesiones son localizadas y sus sistemas productivos hacen que sean sacrificados a edad temprana. El caballo también puede infectarse, pero ello tiene escasa significancia epidemiológica.<sup>20</sup>

Los perros y gatos como hospederos potenciales de *M. bovis*, deben ser vigilados, especialmente cuando viven en la proximidad de rebaños bovinos.<sup>20</sup> Se ha demostrado que el gato puede infectarse por consumo de leche bovina contaminada con el bacilo y recientemente se ha descrito la infección en un grupo de gatos, asociada a la de tejones muertos por tuberculosis.<sup>21</sup>

Del total de especies susceptibles a *M. bovis*, unas pocas corresponden a hospederos de manutención y la gran mayoría se clasifican mejor como hospederos incidentales.<sup>22</sup>

## **Impacto en salud pública.**

*M. bovis* se transmite a los seres humanos a través de leche o carne contaminada y es una enfermedad que afecta al estómago y zona intestinal (encontrada con mayor frecuencia en niños), aunque también puede causar enfermedad respiratoria.<sup>23</sup> La primoinfección puede evolucionar a tuberculosis pulmonar o diseminarse vía linfohematógena, causando tuberculosis miliar, genitourinaria, osteoarticular, pleuresía, adenitis tuberculosa y otras formas extrapulmonares, de las cuales la meníngea es una de las más importantes. Muchas de estas variedades pueden provocar invalidez o la muerte.<sup>24</sup> También se ha reportado un pequeño porcentaje de casos de tuberculosis que afectan al esqueleto, dando lugar a lesiones líticas características, con poca formación de hueso (sobre todo en las regiones dorsal baja o lumbar de la columna vertebral).<sup>25</sup>

Se calcula que *M. bovis* es responsable de aproximadamente un 3% de los casos de tuberculosis humana en el mundo. La afección es la quinceava causa de muerte (con más de 5,300 decesos al año); por otra parte, los individuos menos afectados son los menores de 15 años de edad y la incidencia en el sexo masculino es mayor en proporción de 1.3 a 1. Además, una persona con tuberculosis activa no tratada puede infectar a un promedio de 10 a 15 personas al año.<sup>26</sup>

## **Impacto económico.**

La TB se caracteriza por el desarrollo de granulomas o tubérculos en los pulmones, nódulos linfáticos y algunos otros órganos como hígado, riñón o bazo; estas lesiones con frecuencia son la causa del desecho de las canales. La principal forma de diseminación entre hatos es por la introducción de animales enfermos, los factores más importantes en la diseminación son el tamaño del hato, la edad y las medidas de control y prevención en las explotaciones. Esta enfermedad es causante de cuantiosas pérdidas económicas. En México se han

estimado pérdidas por 40 millones de dólares anuales, tan sólo por el desecho de ganado enfermo. Se estima además que la TB disminuye en un 17% la producción de leche, reduce la ganancia de peso, la tasa de conversión alimenticia hasta en 15% y la fertilidad en un 6%. Por otra parte, la exportación de ganado bovino en pie a los Estados Unidos puede verse afectada por la presencia de esta enfermedad, representando una pérdida de divisas por 450 millones de dólares anuales.<sup>27</sup>

### **Situación de la tuberculosis bovina en México.**

El inventario nacional bovino es de alrededor de 30 millones de cabezas, de las cuales poco más del 93% se dedica a la producción de carne (y doble propósito) y casi el 7% restante es ganado especializado en la producción de leche.

Antes de 1992, la prevalencia de la TB era prácticamente desconocida en nuestro país, aunque se sospechaba que ésta era alta en ciertas zonas lecheras, ya que era frecuente el hallazgo de lesiones generalizadas de tuberculosis en vacas lecheras de desecho enviadas a rastro, se asumía entonces que era baja o nula en la ganadería de carne.<sup>28</sup>

A partir del reconocimiento de regiones en Fase de Erradicación en 1994 por la SAGARPA, se establecieron regiones o estados con una prevalencia menor al 2 %.

Las exigencias cada vez en aumento para la exportación de becerros, motivó la creación de regiones de “Baja Prevalencia”, las cuales han ido paulatinamente disminuyendo desde 0.5 % hasta niveles de 0.01%.

Actualmente se encuentran en fase de erradicación 10 estados y parte de otros 15.

- Zonas en erradicación, con prevalencia menor a 2 %: Colima, Chihuahua, Coahuila, Nuevo León, Quintana Roo, Sinaloa, Sonora,

Tabasco, Tamaulipas, Yucatán, parte de Aguascalientes, Baja California, Campeche, Chiapas, Guanajuato, Guerrero, Durango, Jalisco, Michoacán, Nayarit, Oaxaca, Puebla, Veracruz, Hidalgo y Zacatecas.

- En Control, con prevalencia mayor al 2 % o desconocida: el resto del país.

Sin embargo, la prevalencia real de tuberculosis en ganado de carne es menor al 2 % en muchas regiones del país y esto es más palpable cuando vemos la clasificación que para efectos de la exportación de ganado en pie a los Estados Unidos de Norte América otorga el Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA) a estas regiones:

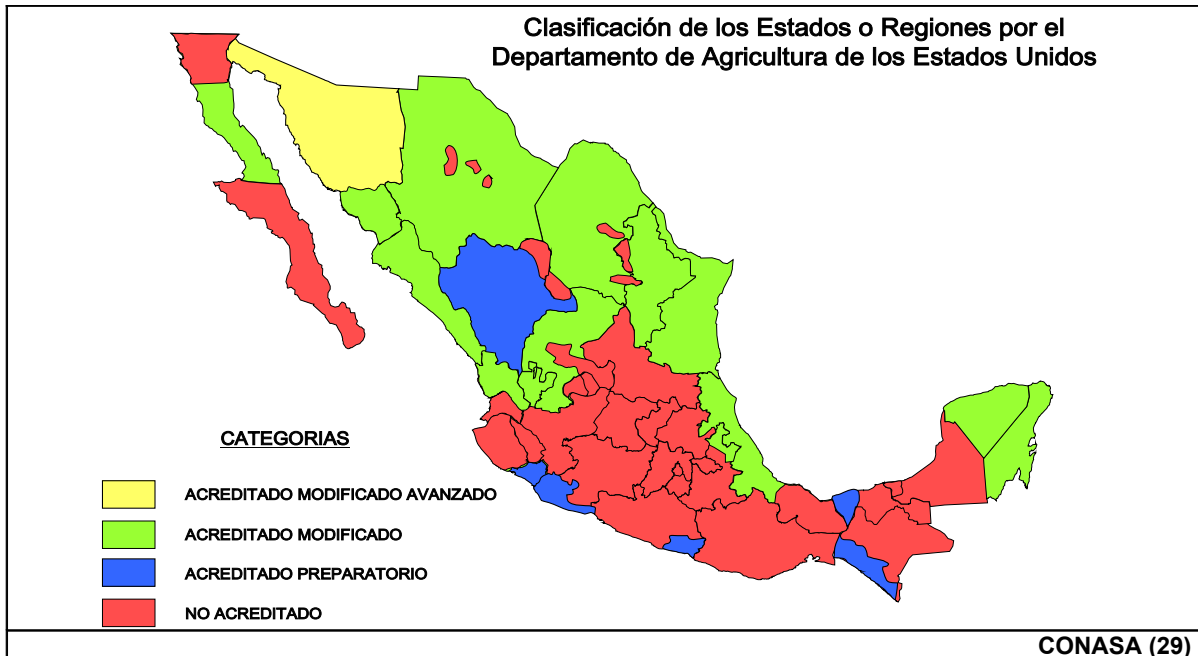
- Acreditado modificado avanzado, con prevalencia menor al 0.01%: Norte de Sonora.
- Acreditado modificado, con prevalencia menor a 0.1 %: Sur de Sonora y las regiones clasificadas en la categoría "A" de los estados de Baja California, Coahuila, Chihuahua, Jalisco, Zacatecas, Nayarit, Nuevo León, Puebla y Veracruz. Adicionalmente todo el territorio de los estados de Quintana Roo, Sinaloa, Tamaulipas y Yucatán.
- Acreditado preparatorio, con prevalencia menor a 0.5 %: las regiones clasificadas en la categoría "A" de los estados de Chiapas, Durango, Guerrero, Michoacán y Tabasco. Adicionalmente todo el territorio del estado de Colima.
- No acreditado, con prevalencia mayor a 0.5 % o desconocida: Resto del país.



### Situación internacional.

El Departamento de Agricultura de los Estados Unidos de América, ha reconocido 21 regiones de baja prevalencia en TB, de las cuales 11 pueden exportar con una sola prueba de tuberculina del lote, 9 regiones con prueba de hato y de lote y una región no requiere pruebas.





Es sin embargo necesario continuar las acciones de disminución de prevalencia, control y erradicación de la tuberculosis bovina en todo el territorio nacional.<sup>28, 29</sup>

**Respuesta inmune del hospedero ante tuberculosis  
Infección inicial con micobacterias tuberculosas.**

La ruta de la entrada del bacilo de tuberculoso es principalmente por vía respiratoria, con la inhalación de aerosoles (1 a 2  $\mu\text{m}$  o menos) permitiendo el paso hacia las vías respiratorias bajas.<sup>30, 31</sup>

Las partículas de un tamaño más grande son excluidas eficientemente por las barreras físicas de la nasofaringe y las vías respiratorias altas. El epitelio respiratorio bronquial es notable en cuanto a resistencia a la infección por estos bacilos, pero las micobacterias virulentas son citotóxicas para las células alveolares tipo II.<sup>32</sup>

Aunque el epitelio bronquial carece de acción directa antimicobacteriana, puede producir péptidos con una amplia gama de actividad.<sup>33</sup> Algunos componentes propios de la respuesta inmune pueden servir de ligandos para los receptores

Toll-Like (TLR) de las células epiteliales del tracto respiratorio, tal es el caso de la proteína surfactante tipo A (SPA), la cual también es capaz de activar macrófagos alveolares vía TLR4 e inducir la producción de IL-8 en las células epiteliales.<sup>34, 35</sup> Los péptidos antimicrobianos como la  $\beta$ -defensina-2 murina (mBD-2) y la catelisinidina LL-37 actúan sobre la membrana de los patógenos formando poros que llevan a la lisis del microorganismo y actúan directamente sobre el DNA, al unirse a los grupos fosfato del DNA por uniones electrostáticas para después insertarse en la cadena de nucleótidos, son otro ejemplo claro de activación vía TLR. Este tipo de péptidos activan células dendríticas inmaduras vía TLR4, dando como resultado un aumento de moléculas coestimuladoras y la maduración de estas células.<sup>36, 37</sup>

Una vez que los microorganismos han ingresado en el pulmón, tienen cuatro destinos potenciales.<sup>38, 39</sup>

- La respuesta inicial (inmunidad innata) del hospedero puede ser totalmente eficaz y matar todos los bacilos, de tal manera que el individuo no presenta la tuberculosis.
- Las bacterias pueden comenzar a multiplicarse inmediatamente después de la infección, causando la enfermedad clínica conocida como tuberculosis primaria.
- Los bacilos pueden llegar a estar inactivos y nunca causar enfermedad en absoluto, de manera que el individuo presenta un estado conocido como infección latente, detectándose solamente por una prueba de piel positiva de tuberculina.
- O bien los organismos latentes pueden comenzar eventualmente a multiplicarse, dando como resultado manifestaciones clínicas, estado conocido como reactivación de la tuberculosis.

En un 7% de los pacientes con VIH que presentan infección con tuberculosis, esta se convierte en infección latente después de un año.<sup>40</sup>

## Unión de los bacilos tuberculosos a monocitos y macrófagos

La defensa inicial contra la infección, una vez que los bacilos alcanzan las vías respiratorias bajas es el macrófago alveolar.

Las interacciones entre los macrófagos y las micobacterias son las siguientes:<sup>41</sup>

- Unión superficial del bacilo al macrófago mediante.

Receptores de complemento CR1, CR3, CR4.

Receptores de manosa.

Receptores de proteína surfactante.

CD14 (receptor de alta afinidad a los lipopolisacáridos [LPS]).

Receptores basurero (“scavenger”).

- Fusión fagosoma – lisosoma.

Degradación enzimática mediante lipasas, glucosidasas, proteasas y nucleasas.

- Inhibición del desarrollo y/o destrucción de las micobacterias.

Producción de especies reactivas de nitrógeno.

Producción de especie reactivas de oxígeno.

Apoptosis (muerte celular programada).

- Reclutamiento de células inmunes accesorias y desarrollo de una respuesta inflamatoria local.

Elaboración de citocinas, ej. Factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ).

Elaboración de quimiocinas, ej. Interleucina 8 (IL-8).

Presentación de antígeno (linfocitos T, células dendríticas).

Los macrófagos son capaces de inhibir el desarrollo del bacilo mediante la fagocitosis y participan ampliamente en la inmunidad celular, en el proceso de presentación de antígeno y el reclutamiento de linfocitos T.<sup>42</sup>

Los procesos implicados en la fagocitosis incluyen la unión de la bacteria a las células del hospedero, la internalización y finalmente la inhibición del desarrollo o destrucción.

La fagocitosis comienza generalmente con la célula fagocitaria que engulle el microorganismo invasor mediante una membrana que delimita una vacuola.<sup>43</sup> Mediante la interacción del fagocito y los bacilos tuberculosos se crea una vacuola o fagosoma, acompañada por la unión a través de receptores de complemento CR1, CR3, y CR4, así como receptores de manosa (MR) y otras moléculas receptoras de superficie celular.<sup>44</sup>

La unión entre las células fagocitarias y las micobacterias mediante receptores de manosa es mediada a través de la glicoproteína superficial micobacteriana LAM, la arabinosa terminal recubierta con residuos de manosa en micobacterias virulentas es muy eficiente para desactivar a los macrófagos.<sup>45, 46</sup>

Los receptores Fc y el receptor  $\beta$ -glucano no parecen tener mayor importancia en la unión de micobacterias tuberculosas a los fagocitos.<sup>47</sup>

La expresión de receptores de complemento y de manosa por los macrófagos está bajo la influencia de una variedad de mediadores, incluyendo la prostaglandina E2 (PGE<sub>2</sub>) y las citocinas interferon gama (IFN- $\gamma$ ) e IL-4. Se ha demostrado que PGE<sub>2</sub> e IL-4 (una citocina tipo Th2) tienen una regulación positiva en la expresión de los receptores CR y MR, por otro lado se ha observado que el IFN- $\gamma$  disminuye la expresión y función del receptor, dando como resultado la disminución de las micobacterias para adherirse a los macrófagos.<sup>48, 49</sup>

Este efecto al parecer negativo de IFN- $\gamma$  contrasta con la capacidad demostrada de esta citocina para activar macrófagos y aumentar la inhibición intracelular del desarrollo (o destrucción) de las micobacterias.

Además de los receptores de complemento y manosa, existe evidencia de un papel importante de los receptores de proteína surfactante en la mediación de la unión bacteriana.<sup>50, 51</sup>

La acción del ligando CD14 es importante para las micobacterias y la microglia (células fagocitarias residentes en cerebro), así como para la unión de las micobacterias con los macrófagos alveolares.<sup>52</sup>

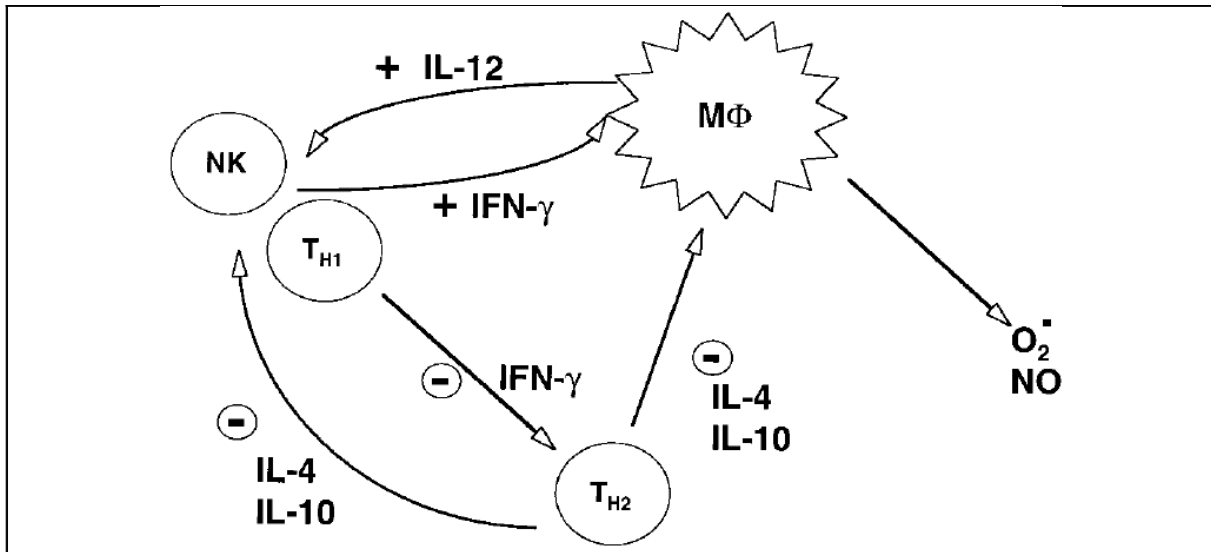
Finalmente, los receptores “scavenger” desempeñan un papel en la unión de micobacterias a las células fagocitarias. Estos receptores están situados en la superficie del macrófago y tienen afinidad para una gran variedad de ligandos, incluyendo lipoproteínas de la baja densidad, poliribonucleotidos, polisacáridos (como el dextran sulfato), fosfolípidos aniónicos y otras moléculas que incluyen a partículas del asbesto y endotoxinas bacterianas.<sup>53</sup>

### **Destino de los bacilos tuberculosos después de la fagocitosis.**

Después de que las bacterias patógenas son engullidas en los fagosomas, el modo de su destrucción tiene una variedad de mecanismos, incluyendo la fusión del fagosoma-lisosoma, la generación de intermediarios reactivos de oxígeno, intermediarios reactivos de nitrógeno, particularmente óxido nítrico.<sup>54</sup>

La comprensión de estas defensas iniciales por parte del macrófago puede llevar a darnos una idea del desarrollo de la infección clínico latente, pues la evasión de estas mecanismos es un paso importante en el establecimiento del foco de infección que pueda causar la enfermedad activa más adelante.

Los estudios por Gordon y D'Arcy Hart, 1980<sup>55</sup> demostraron que las micobacterias son capaces de producir amoníaco, que podría inhibir la fusión fagosoma-lisosoma y alcalinizar el contenido intralisosomal, disminuyendo la potencia del complejo de la fusión. Del mismo modo, los sulfátidos (derivados de trealosa 2-sulfato, un glicolípido producido por *M. tuberculosis*) demostrados por Goren y cols. 1974,<sup>56</sup> 1976<sup>57</sup> también inhiben la fusión fagosoma-lisosoma. Los sulfátidos son producidos por muchas especies micobacterianas, incluyendo algunas no patógenas. Se ha observado que excluyendo la protón-ATPasa del fagosoma, las micobacterias pueden prevenir la acidificación del fagolisosoma, en un trabajo de multiplicación *in vitro* de *M. tuberculosis* y que en un pH ácido de 4.5 hay poco desarrollo, mientras que en un pH de 7.0 hay desarrollo absoluto.<sup>58, 59</sup>



Interacción macrófago-linfocito en respuesta a tuberculosis (41).

Los linfocitos T CD4+ Th1 y las células NK (asesinas naturales) secretan IFN- $\gamma$ , que activa macrófagos alveolares para producir especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, implicadas en la inhibición del desarrollo y destrucción de las micobacterias. Los macrófagos pueden también secretar IL-12 para amplificar esta vía. La IL-4 y e IL-10 inhiben la función del macrófago, debido a la supresión de IFN- $\gamma$ , mediada linfocitos T CD4+ Th2.

Otras células del sistema inmune ofrecen ayuda substancial al macrófago en el control del desarrollo de micobacterias. Los linfocitos T pueden ser reclutados y estimular al macrófago para inhibir su multiplicación o destruirlas.<sup>60</sup> Los linfocitos T citotóxicos pueden influir en los macrófagos que han engullido las micobacterias.<sup>61</sup> Pueden también secretar proteínas pequeñas tales como TIA-1, una molécula citoplásmica que se ha demostrado estar asociada con apoptosis.<sup>62</sup> Se conoce ampliamente que esta vía no provoca una respuesta inflamatoria con la presencia de necrosis, en las células en proceso de apoptosis sus núcleos se encogen y se fragmentan. De esta manera pueden ser eficientemente fagocitadas y sus componentes son reutilizados por macrófagos o por células del tejido adyacente.<sup>63</sup>

La interacción de los macrófagos con otras células efectoras ocurre en un medio ambiente con citocinas y quimiocinas. Estas moléculas sirven para atraer otras células efectoras de tipo inflamatorio tal como los linfocitos, así como su activación.

Una importante quimiocina involucrada en la interacción del hospedero con las micobacterias es la IL-8, un miembro de la familia CXC (familia que incluye a

varias proteínas estimuladas por IFN- $\gamma$  (como IP-10 y MIG un factor quimiotáctico de monocitos). Las quimiocinas CXC incluyen proteínas para el reclutamiento de granulocitos y linfocitos hacia las áreas de infección e inflamación. La IL-8 entre otras funciones tiene la habilidad para reclutar neutrófilos, linfocitos T y basófilos en respuesta a una gran variedad de estímulos.<sup>64</sup> Se libera principalmente por monocitos/macrófagos, pero puede expresarse en fibroblastos, queratinocitos y linfocitos.<sup>65</sup> Otra molécula que participa con un rol bastante complejo es el TNF- $\alpha$ , la liberación de TNF- $\alpha$  debida a la presencia de micobacterias puede estimular monocitos y macrófagos.<sup>66</sup> Kindler y cols. 1989<sup>67</sup> estudiaron el rol de TNF- $\alpha$  en la inducción para la formación del granuloma en un modelo murino con infección con BCG. Observaron que con la supresión de TNF- $\alpha$ , existe una falla en la formación del granuloma, causando la muerte de los animales debida a una diseminación de la infección.

Otras quimiocinas implicadas en la respuesta inmune ante tuberculosis incluyen a la proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1) y el regulador de la activación normal de células T expresado y secretado (RANTES); se ha encontrado que éstas disminuyen en la fase de convalecencia después de aplicar tratamiento, al contrario de la IL-8.<sup>68</sup>

Con respecto a tuberculosis, se ha centrado la atención en el papel las citocinas como IFN- $\gamma$  y el factor de transformación tumoral beta (TGF- $\beta$ ), en términos de activar y desactivar la capacidad del macrófago de inhibir el desarrollo micobacteriano.<sup>69</sup> También se ha encontrado que IFN- $\gamma$  actúa como activador de macrófagos ante las micobacterias, puede mejorar o aumentar la presentación de antígeno, llevando al reclutamiento de linfocitos T CD4+ y/o linfocitos T citotóxicos, participando en la destrucción de las micobacterias.<sup>70, 71</sup>

Un inactivador importante de macrófagos en la respuesta inmune es el TGF- $\beta$ . Esta citocina es distribuida y producida principalmente por monocitos y macrófagos.<sup>72</sup> Aunque tiene algunos efectos proinflamatorios tales como la quimiotaxis de monocitos y el aumento de la expresión de receptores Fc, TGF- $\beta$  también tiene efectos antiinflamatorios importantes, incluyendo la disminución en la producción de intermediarios reactivos de oxígeno y del nitrógeno del

macrófago, la inhibición en la proliferación de células T, interferencia con las células NK y la función citotóxica de linfocitos T. Además de una regulación negativa en la secreción de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-1.<sup>46,73</sup>

Otro candidato para inactivar macrófagos en tuberculosis es la citocina IL-10.<sup>71, 74</sup> Los anticuerpos anti-IL-10 realzan respuestas proliferativas de células T *in vitro*. Resulta interesante que en pacientes coinfectados con tuberculosis y VIH, la expresión de IFN- $\gamma$ , IL-2 e IL-4 se suprime, solamente IL-10 no es diferente en pacientes con infección VIH. Una vez que un macrófago se ha activado para inhibir el desarrollo micobacteriano, una variedad de mecanismos celulares están disponibles para lograr esta función determinante.<sup>54</sup> Se sabe que las especies reactivas de oxígeno (ROI) tales como anión superóxido y el peróxido de hidrógeno son componentes importantes de la defensa del hospedero contra una variedad de microorganismos. Experimentos de Walker y Lowrie<sup>75</sup> en macrófagos murinos demostraron el papel de éstos (usando *M. microti*), sugiriendo por lo tanto que los ROI tienen un papel limitado y eventual en defensa del huésped. Flesch y Kaufmann,<sup>76</sup> infectaron macrófagos derivados de médula ósea murina con *M. bovis*, determinaron la capacidad de estos macrófagos de inhibir desarrollo micobacteriano en presencia y ausencia de “scavengers” de las especies tóxicas de oxígeno. En condiciones libres de células, el peróxido de hidrógeno inhibió el desarrollo de las micobacterias, mientras que el anión superóxido y el radical hidróxido no cumplieron esta función.

Se ha demostrado también que la actividad anti-micobacteriana de los macrófagos está correlacionada con la inducción en la producción de variedades tóxicas de nitrógeno L-arginina-dependientes, incluyendo NO (óxido nítrico), el NO<sub>2</sub>, y HNO<sub>2</sub>. Nicholson y cols.<sup>77</sup> examinaron (por lavado bronco-alveolar) macrófagos humanos obtenidos de pacientes con tuberculosis y demostraron que un 65% de macrófagos de cada paciente estudiado reaccionó con un anticuerpo humano específico contra óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS o NOS2). Además, en un modelo con ratones “knockout” (con delección del factor regulador de interferón), los animales no pueden combatir con una infección con BCG y sucumben de



manera dramática. Los macrófagos de estos ratones son incapaces de liberar óxido nítrico.<sup>78</sup>

Un aspecto fascinante de la respuesta inmune relacionado con la producción de intermediarios reactivos de nitrógeno implica una proteína conocida como Nramp (proteína asociada a resistencia natural del macrófago).<sup>79</sup> Esta proteína es crucial al transportar el nitrito de los compartimientos intracelulares como el citosol a ambientes más ácidos como el fagolisosoma, donde puede ser convertida al NO. Además, los elementos reguladores importantes conocidos para la activación del macrófago como IFN- $\gamma$  pueden trabajar con Nramp, pues el gen *Nramp1* contiene elementos que responden a la exposición con IFN- $\gamma$ , teniendo como resultado la producción de NO.<sup>80</sup>

### **Formación del granuloma.**

Los granulomas son las estructuras histopatológicamente distintivas de la tuberculosis y corresponden a un tipo de inflamación crónica producida por la presencia de material poco o no biodegradable.<sup>81</sup> Los granulomas están constituidos por el acumulamiento de linfocitos y macrófagos organizados en estructuras redondas u ovoides de límites precisos y se les considera como las estructuras fundamentales para contener a las micobacterias. Si los mecanismos de defensa del individuo se encuentran en condiciones adecuadas, limitan al mínimo el desarrollo de las bacterias, pero éstas permanecen viables durante toda la vida del individuo.<sup>14</sup>

La adhesión celular en el granuloma es mediada en parte por la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1 o CD54).<sup>82</sup> Esta regulación se amplifica por las citocinas TNF- $\alpha$ , IL-6, e IFN- $\gamma$ . Estas últimas trabajan recíprocamente activando el gen promotor de ICAM-1.<sup>83</sup>

Los macrófagos diferenciados de células epitelioides producen proteínas matriz extracelular (ej. osteopontina, fibronectina), que proporcionan un ancla celular a través de las moléculas de integrina.<sup>84</sup>

Durante la fase temprana de la infección en el modelo experimental, específicamente en la segunda semana postinfección, los granulomas empiezan a formarse y una semana después alcanzan su máxima madurez.<sup>70</sup> Estos granulomas de fase temprana y el infiltrado inflamatorio intersticial y perivenular coexistente están constituidos principalmente por linfocitos T CD-4 de tipo 1 productores de las citocinas IFN- $\gamma$  e IL-2 y macrófagos activados productores de TNF- $\alpha$  e IL-1.<sup>46, 71</sup> Los granulomas producidos en la segunda y tercera semana postinfección están constituidos predominantemente por células Th-1, hay elevada producción de IFN- $\gamma$  que activa a los macrófagos, estimulándolos a producir gran cantidad de la enzima oxido nítrico sintetasa inducible (iNOS).<sup>51</sup>

Se ha demostrado que la protección en tuberculosis depende de la inmunidad celular constituida por linfocitos T y macrófagos.<sup>85</sup> Los macrófagos activados y los linfocitos Th1 son los principales elementos inmunológicos que protegen en contra del bacilo tuberculoso.<sup>71</sup>

### **Papel de los linfocitos T en respuesta contra micobacterias.**

Aunque participan muchos tipos de linfocitos T (incluyendo CD4+, CD8+ y linfocitos T $\gamma/\delta$ ) en la respuesta inmune contra tuberculosis, indudablemente la célula determinante en la inmunidad celular es el linfocito T CD4+.<sup>86</sup> Las CD4+ expresan el receptor de células T  $\alpha/\beta$ , y están implicados en el reconocimiento de antígenos que se han procesado en los fagosomas y se presentan como pequeños fragmentos péptidicos en el contexto de moléculas del MHC clase II en la superficie de células presentadoras de antígeno tales como monocitos, macrófagos, o células dendríticas. Las CD8+ por una parte, reconocen los antígenos que se han procesado en el citosol y en el contexto de moléculas del MHC clase I en la superficie de la célula. Las células CD4+ ayudan generalmente a amplificar la inmunorespuesta activando las células efectoras y reclutando las

células inmunes adicionales al sitio de la infección, mientras que las células CD8+ son directamente citotóxicas a las células blanco. Los productos micobacterianos de pared celular, especialmente LAM, son quimiotácticos para las células T a los sitios de la infección.<sup>87</sup>

Se sabe también que las células CD4+ se pueden separar en por lo menos dos clases, fenotipos Th1 y Th2. Estas células derivan de un supuesto Th0 o células nulas, y su diferenciación del precursor está bajo control de citocinas tales como: IL-12. Fenotípicamente, las células Th1 se caracterizan principalmente por su capacidad de producir citocinas IFN- $\gamma$  e IL-2, mientras que las células Th2 producen citocinas tales como IL-4, IL-5, e IL-10.<sup>88-90</sup>

Las citocinas tipo Th1 son las que activan otras células inflamatorias y fagocitarias capaces de inhibir la multiplicación de bacterias patógenas; mientras que las Th2 están implicadas en la producción de IgE y el reclutamiento de eosinófilos. Citocinas como IL-3, la linfoxina y el factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) son secretados por ambas clases fenotípicas de las células CD4+.<sup>41</sup>

El papel de las células T $\gamma\delta$  en la respuesta inmune contra tuberculosis no está completamente definido. Estas células son grandes linfocitos granulares que pueden desarrollar una morfología dendrítica en tejidos linfoides; pero abarcan menos del 10% de los linfocitos T en circulación en humanos, no así en ratones, donde son muy abundantes en mucosas. Exhiben el receptor TCR-1, en contraste con las células T  $\alpha/\beta$  (CD4+ y CD8+), que exhiben el receptor TCR-2. Aunque algunas células  $\gamma\delta$  pueden ser CD8+, en general son MHC no-restringidos y funcionan en gran parte como las células T citotóxicas<sup>91</sup> y mediante la molécula CD1 presentan antígenos de tipo lipídico de *M. tuberculosis*.<sup>92</sup> Estudios previos, indican que las células  $\gamma\delta$  pueden desempeñar un papel en inmunorespuestas tempranas contra la tuberculosis y pueden ser parte importante del establecimiento de inmunidad protectora en individuos con infección latente.<sup>93</sup> En un estudio con ratones con depleción de CD4+ y CD8+, estos no murieron

rápidamente después de la infección con BCG, pudieron sobrevivir probablemente gracias a las células  $\gamma\delta$ .<sup>94, 95</sup>

### **Identificación de especies dentro del MTBC.**

Las micobacterias agrupadas en el MTBC son caracterizadas por su semejanza en un 99.9% a nivel del nucleótidos y secuencias idénticas del RNA ribosomal 16S,<sup>96, 97</sup> pero difieren extensamente en términos de sus tropismos, fenotipos, y patogenicidad del anfitrión. Si se asume que todas están derivadas de un antepasado común, es intrigante que *M. tuberculosis*, *M. africanum* y *M. canettii* son exclusivamente patógenos para el humano, *M. microti* lo es para roedores, mientras que otros como *M. bovis* tienen un espectro amplio de hospederos.<sup>12</sup>

Distribución diferencial de algunos *loci* de regiones de diferencia (RD) entre miembros del MTBC.

|                                            | TbD1 | RD1    | RD7 | RD12<br>and<br>RD13 | RD4 | RD2     | PiD1 |
|--------------------------------------------|------|--------|-----|---------------------|-----|---------|------|
| <i>M. tuberculosis</i><br><i>ancestral</i> | +    | +      | +   | +                   | +   | +       | +    |
| <i>M. tuberculosis</i><br><i>modern</i>    | -    | +      | +   | +                   | +   | +       | +    |
| <i>M. africanum</i>                        | +/-  | +      | +/- | +                   | +   | +       | +    |
| <i>M. microti</i>                          | +    | RD1mic | -   | +                   | +   | RD2 mic | +    |
| <i>M. pinnipedii</i>                       | +    | +      | -   | +                   | +   | RD2seal | -    |
| <i>M. caprae</i>                           | +    | +      | -   | -                   | +   | +       | +    |
| <i>M. bovis</i>                            | +    | +      | -   | -                   | -   | +       | +    |

La delección del *loci* RD12 y RD13 distingue al grupo formado por *M. bovis* y *M. caprae* de otras especies del complejo. Por otra parte, se sabe que los *M. caprae* se pueden distinguir genéticamente de *M. bovis* con base en la amplificación positiva del *locus* RD4.  
Las cepas de *M. bovis* BCG poseen un polimorfismo específico: la delección de RD1. (12)

## JUSTIFICACIÓN

Hasta antes de la década de los años 90 se consideraba que el genoma de *M. tuberculosis* era muy estable. Sin embargo, el estudio sistemático del DNA purificado de aislados clínicos obtenidos en diversas partes del mundo y analizado con la técnica de RFLP (polimorfismo variable de segmentos de restricción) en el transposón IS6110 específico de *M. tuberculosis*, ha demostrado una inmensa variabilidad genética en el MTBC. Este tipo de estudios también ha contribuido enormemente en el conocimiento de la epidemiología de la enfermedad y usando otros transposones se ha podido también estudiar la variabilidad genética y distribución de *M. bovis*. |

El modelo experimental con ratones BALB/c ha mostrado que cuando la cepa de laboratorio de *M. tuberculosis* H37Rv es inoculada por vía intratraqueal en una dosis alta (250,000 bacterias), se produce una fase temprana de la infección dominada por linfocitos Th1 productores de IFN- $\gamma$  y macrófagos activados productores de TNF- $\alpha$ , las cuales controlan la proliferación bacteriana. Después del mes de infección inicia la fase progresiva, en la cual surge una gran cantidad de linfocitos Th2 y disminuye la producción de TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , permitiendo la proliferación bacilar, con extensa neumonía y muerte de los animales de experimentación. Cuando se infectaron ratones con aislados clínicos con genotipos diferentes se observó que las cepas prevalentes en Asia (genotipo Beijing) produjeron muerte acelerada en los ratones con extenso daño neumónico y una respuesta inmune no protectora con menor producción de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ , en comparación las 3 cepas de la familia Canetti permitieron una larga sobrevida con poca neumonía y una producción constante de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ .

Una pregunta crucial surgida como consecuencia estos estudios, es si la variabilidad genética de *M. tuberculosis* se asocia a diversidad en el nivel de virulencia y en el tipo de respuesta inmune inducida. En relación con *M. bovis*, se

sabe que también hay heterogeneidad genética pero no se ha estudiado si esta está relacionada con los diferentes grados de virulencia.

## **HIPÓTESIS.**

A pesar de que las cepas de *M. bovis* muestran una identidad superior al 99.9% entre ellas, su variabilidad genética pudiera influenciar el grado de virulencia y el tipo de respuesta inmune inducida.

## **OBJETIVO GENERAL**

Estudiar el grado de virulencia y el tipo de respuesta inmune producida por aislados de *M. bovis* genéticamente diferentes, prevalentes en el ganado vacuno de Argentina.



## MATERIAL Y MÉTODOS

### Características epidemiológicas y genéticas de las cepas de *M. bovis*

El cuadro 1 muestra a las cepas utilizadas en el estudio actual (proporcionadas amablemente por el Dr. Angel Cataldi, Instituto de Biotecnología, CICVyA-INTA, Los Reseros y Las Cabañas, 1712 Castelar, Argentina). Todas las cepas seleccionadas provienen de casos argentinos de tuberculosis causados por *M. bovis*, excepto la cepa de referencia AN5 utilizada como control.

Las cepas fueron caracterizadas por pruebas bioquímicas y dieron el perfil típico de *M. bovis* por espigotipificación <sup>98</sup> y VNTR <sup>99</sup> (trabajo realizado por Martín Zumárraga, Instituto de Biotecnología, CICVyA-INTA).

| Cepa   | Fuente             | Año de aislamiento | Origen       |
|--------|--------------------|--------------------|--------------|
| 02-2B  | Humano             | 2002               | Buenos Aires |
| 04-302 | Cerdo salvaje      | 2004               | La Pampa     |
| 04-303 | Cerdo salvaje      | 2004               | La Pampa     |
| 534    | Bovino             | 1997               | Santa Fe     |
| V2     | Bovino             | 2003               | Buenos Aires |
| AN5    | Cepa de referencia | 1948               | Inglaterra   |

Cuadro 1. Fuente y el origen geográfico de los aislamientos de *M. bovis* utilizados en este estudio.

### Modelo murino de tuberculosis pulmonar progresiva

Las cepas de *M. bovis* fueron cultivadas en caldo Middlebrook 7H9 (Difco, Detroit, MI) suplementado con complejo ácido oleico-albumina-dextrosa (OADC) (Becton Dickinson, Cockysville, MD) bajo agitación durante su desarrollo a 37°C y medidos por densitometría hasta el día 18. Las suspensiones de bacterias fueron

distribuidas en volúmenes de 200  $\mu$ l y congeladas a -70°C tan pronto alcanzaron la fase estacionaria.

El modelo experimental de BALB/c en la tuberculosis pulmonar progresiva se ha descrito previamente.<sup>100, 101</sup> Brevemente: las suspensiones fueron ajustadas a  $2.5 \times 10^5$  bacterias viables en 100  $\mu$ l de PBS. Se utilizaron ratones libres de patógenos BALB/c de 6-8 semanas de edad. Cada animal fue anestesiado vía intraperitoneal con 56 mg/kg de tio-pental (Anestesal, Smith Kline, Mex). La tráquea fue expuesta por una pequeña incisión de la línea media y los 100  $\mu$ l de las suspensiones bacterianas fueron inyectados. La incisión fue suturada y los ratones fueron mantenidos en una posición vertical hasta que el efecto de la anestesia pasara. Los ratones infectados fueron mantenidos en jaulas contenidas en microaisladores conectados con presión negativa.

Se infectaron ocho grupos de 84 ratones, cada uno con una cepa distinta de *M. bovis*. El experimento completo fue repetido un vez más y reunieron los datos obtenidos. Ocho ratones de cada grupo se sacrificaron por exsanguinación a los 1, 3, 7, 14, 21, 28, 60 y 120 días después de la infección. Veinte ratones en cada grupo fueron dejados imperturbados y la supervivencia fue registrada hasta el día 120.

Los pulmones de cuatro ratones fueron preparados para estudios histopatológicos. Después de eliminar nódulos linfáticos y tejido tímico, los pulmones de los cuatro animales fueron congelados en nitrógeno líquido y guardados a -70°C para los estudios microbiológicos e inmunológicos.

Todos los procedimientos fueron realizados en campana de flujo laminar, en instalaciones de seguridad biológica nivel III.

Los experimentos para comparar patogenicidad e inmunogenicidad de los diversos genotipos de *M. bovis* fueron realizados en el Instituto Nacional de Ciencias

Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”, después de que el protocolo fuera aprobado por el Comité de Ética Institucional para la Experimentación en Animales.

### **Conteo de Unidades Formadoras de Colonia (UFC).**

Los pulmones derechos o izquierdos de cuatro ratones por cada día de sacrificio fueron utilizados en dos experimentos. Los pulmones fueron macerados en un homogeneizador Polytron (Kinematica, Luzern, Suiza), en tubos estériles que contenían 3 ml de solución salina isotónica, cuatro diluciones de cada homogeneizado fueron colocadas por duplicado sobre placas de agar Bacto Middlebrook 7H11 (Difco Labs, Detroit, MI) enriquecido con OADC, el número de colonias fue contado 21 días post-inoculación.

### **Histología y morfometría.**

Para el análisis histológico, los pulmones fueron perfundidos en etanol al 100%, sumergidos por 24 horas y embebidos en parafina. Secciones transversales de 5 micrómetros fueron teñidas con hematoxilina-eosina.

El porcentaje de la superficie del pulmón afectado por neumonía y el tamaño de los granulomas en  $\mu\text{m}^2$ , fue determinado utilizando un analizador de imagen automatizado (Q Win Leica. Milton Keynes. UK).<sup>100</sup>.

### **Análisis de citocinas por PCR en tiempo real en homogenizados de pulmón.**

Los lóbulos izquierdos o derechos de pulmón a partir de tres diferentes ratones por grupo fueron utilizados para aislar el RNA mensajero (RNAm) usando el mini kit de RNeasy (Qiagen), según las recomendaciones del fabricante. La calidad y la

cantidad de RNA fueron evaluadas con espectrofotometría (260/280 nm) en geles de agarosa.

La transcripción reversa del RNAm fue realizada usando 5 µg de RNA, oligo-dT y el kit Omniscript (Qiagen, inc.).

La PCR en tiempo real fue realizada usando el sistema 7500 real time PCR (Biosystems, USA) y el kit Quantitect SYBR Green Mastermix (Qiagen).

Las curvas estándar de los productos de PCR cuantificados y diluidos, así como controles negativos, fueron incluidas en cada corrida de PCR. Los iniciadores específicos fueron diseñados usando el programa Primer Express (Applied Biosystems, USA) para las siguientes regiones:

- Gliceraldeido-3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH):  
5'-cattgtggaagggtcatga-3', 5'-ggaaggccatgccagtgagc-3'
- Factor de necrosis tumoral alpha (TNF-α):  
5'-tgtggcttcgacctctacctc-3', 5'-gccgagaaaggctgcttg-3'
- Gama linterferon (IFN-γ):  
5'-ggtgacatgaaaatcctgcag-3', 5'-cctcaaacttgcaatactcatga-3'
- Interleucina 4 (IL-4): 5'-cgtcctcacagcaacggaga-3',  
5'-gcagcttatcgatgaatccagg-3'
- Oxido nítrico sintasa inducible (iNOS):  
5'-agcgaggagcaggtggaag-3', 5'-catttcgctgtctcccaa-3',
- Beta defensina-4 murina (mBD4):  
5'-tctgtttgcatttctcctggtg-3', 5'-tttgctaaaagctgcaggtgg-3'.

Las condiciones de ciclo usadas fueron: desnaturalización inicial a 95°C por 15 minutos, seguido por 40 ciclos a 95°C por 20 segundos, 60°C por 20 segundos, 72°C por 34 segundos.

La cantidad de RNAm específico en las muestras se midió según el estándar gen-específico correspondiente. El número de copias del RNAm de cada citocina fue relacionado con un millón copias del RNAm que codificaban el gen de G3PDH (gen constitutivo no implicado en respuestas de defensa y por tanto su nivel de expresión se mantiene constante).<sup>102</sup>

### **Estadística.**

Un análisis de varianza unidireccional y la prueba t- de Student fueron utilizados para comparar morfometría y cuentas de UFC. Las curvas de la supervivencia fueron comparadas con la prueba de Kaplan Meier. Las diferencias se consideraron significativas cuando  $p < 0.05$ .

## RESULTADOS.

### Cepas y genotipificación.

Quinientos cuarenta y dos aislados de *M. bovis* fueron colectados y genotipificados de diversas fuentes en Argentina. De ellos, cinco cepas fueron seleccionadas para los experimentos con el modelo en ratón según su predominio en ganado y ocurrencia en otras especies. El cuadro 2 muestra que tres aislados poseyeron el espoligotipo Sp34 prevalente en la Argentina y que representa el 45% de todos los aislados.<sup>103</sup> Dos cepas con este espoligotipo fueron aisladas de bovinos (V2 y 534), provenientes de granjas lecheras en la región húmeda de La Pampa y la tercera cepa (04-303) fue aislada de un cerdo salvaje. A pesar del espoligotipo idéntico de estas cepas, el patrón de Unidades Intercaladas Repetitivas de *Mycobacterium* (MIRU) era diferente, indicando la diferencia genética reciente de estos aislamientos.

La cepa 04-302 aislada de otro cerdo salvaje tenía distinto espoligotipo (Sp10) y fue incluida para ser comparada con la cepa 04-303. Ambos cerdos salvajes fueron capturados en campos de tiro durante una prueba de la peste porcina clásica. Tras la necropsia, los veterinarios observaron las lesiones compatibles con TB.

La cepa 02-2B que tenía el espoligotipo SP60, fue aislada de una mujer con artritis glenohumeral crónica después de una historia de seis semanas con dolor e hinchazón del hombro derecho. Un año antes, la paciente había sufrido fiebre con la efusión pleural izquierda que resolvió espontáneamente. Esta paciente vivió con muchos gatos, que ella alimentó diariamente con “pulmón crudo de vaca”.<sup>104</sup>

La cepa AN5 de referencia fue utilizada como control.

| Cepa   | Patrón                                       | Spoligotipo | Patrón MIRU  |
|--------|----------------------------------------------|-------------|--------------|
| 02-2B  | 01011010000011101111111111011111111111100000 | 60          | 232224253122 |
| 04-302 | 11000111011111101111111111111111111110100000 | 10          | 232224263222 |
| 04-303 | 110110100000111011111111111111111111100000   | 34          | 232224263322 |
| 534    | 110110100000111011111111111111111111100000   | 34          | 232224163322 |
| V2     | 110110100000111011111111111111111111100000   | 34          | 232224253322 |
| AN5    | 110101110100111011111011111111111111100000   | 55          | 232224243322 |

**Cuadro 2. Patrón de spoligotipos y MIRUs de los aislamientos de *M. bovis* seleccionados (103)**

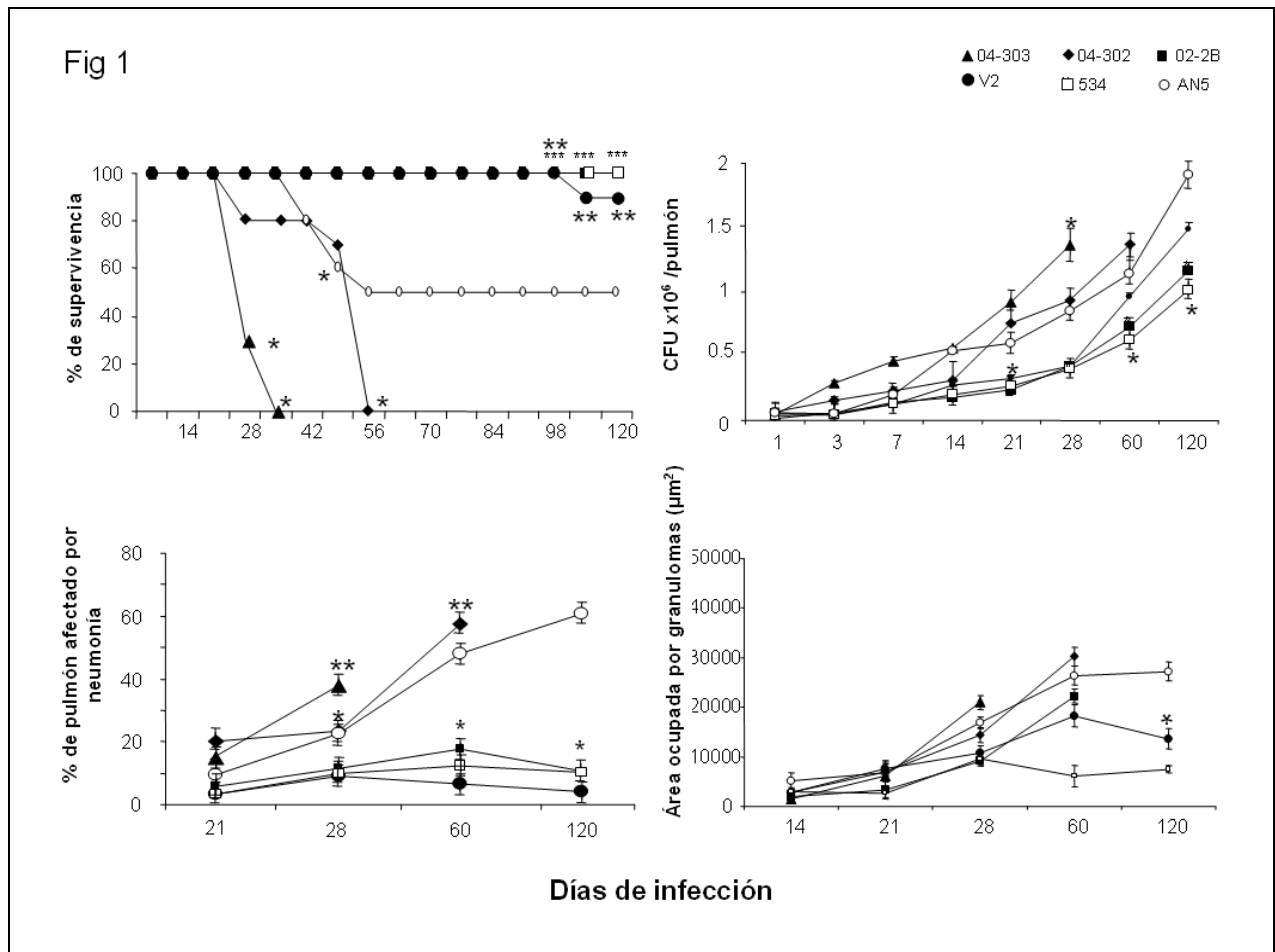
**Diferencias en supervivencia, patología del pulmón y cargas bacilares en los ratones BALB/c infectados con diversas cepas de *M. bovis*.**

Los ratones de BALB/c infectados con la cepa AN5 de *M. bovis* fueron utilizados como control. Esta cepa demostró virulencia media, produciendo supervivencia del 50% de los ratones después de cuatro meses de infección, con un número moderado de las cuentas bacilares en pulmón (figura 1). La cepa AN5 indujo una fuerte respuesta inflamatoria con numerosos granulomas bien formados, después de 2 semanas de infección y neumonía progresiva que afectó al 60% de la superficie del pulmón después de 4 meses de infección, en coexistencia con granulomas grandes (figuras 1 y 2). En cambio, los ratones infectados con la cepa 04-303 mostraron una mortalidad más alta, comenzando a morir tres semanas postinfección y tres semanas después todos los ratones habían muerto, mostrando más del doble de UFC comparando con la cepa control. Es interesante resaltar que esta cepa indujo una ligera respuesta inflamatoria durante la primera y segunda semana postinfección, seguido por extensa consolidación repentina del pulmón con áreas masivas de la necrosis (figuras 1 y 2). Así, esta cepa fue la más virulenta y su característica más significativa era el desarrollo repentino de la neumonía con la necrosis extensa (figura 2).

También se encontró una mortalidad alta inducida por la cepa 04-302, matando todos los animales después de dos meses de infección. La histopatología del pulmón demostró una fuerte respuesta inflamatoria desde el día 3 post infección con neumonía progresiva después del día 21 y granulomas grandes. Las áreas neumónicas en los días 28 y 60 post infección mostraron necrosis leve, produciendo un 10% más de consolidación pulmonar que los ratones infectados con la cepa control AN5 al día 60 de infección (figuras 1 y 2).

En cambio, las cepas 534, V2, y 02-2B fueron menos virulentas, permitiendo un 100% y un 80% de supervivencia después de cuatro meses de infección, con cargas bacilares más bajas. Estas cepas indujeron pequeños parches de neumonía que afectaron menos el de 20% de la superficie del pulmón con granulomas más pequeños, comparados con los animales infectados con *M. bovis* AN5 (figuras 1 y 2).





**Figura 1. Supervivencia, cargas y morfometría bacilares (% del pulmón afectada por neumonía y tamaño de granulomas) en los ratones de BALB/c infectados por inyección intratraqueal ( $2.5 \times 10^5$  bacilos) de *M. bovis* con diversos genotipos y aislados de diversos hospederos. La cepa AN5 fue utilizada como control.**

Las curvas de la supervivencia fueron construidas con 20 ratones infectados. Las cargas, curvas bacilares y morfometría fueron hechas con cuatro animales por sacrificio en dos diferentes experimentos. Los asteriscos representan diferencia estadística significativa ( $p < 0.05$ ) comparado con la infección con AN5.

Fig 2

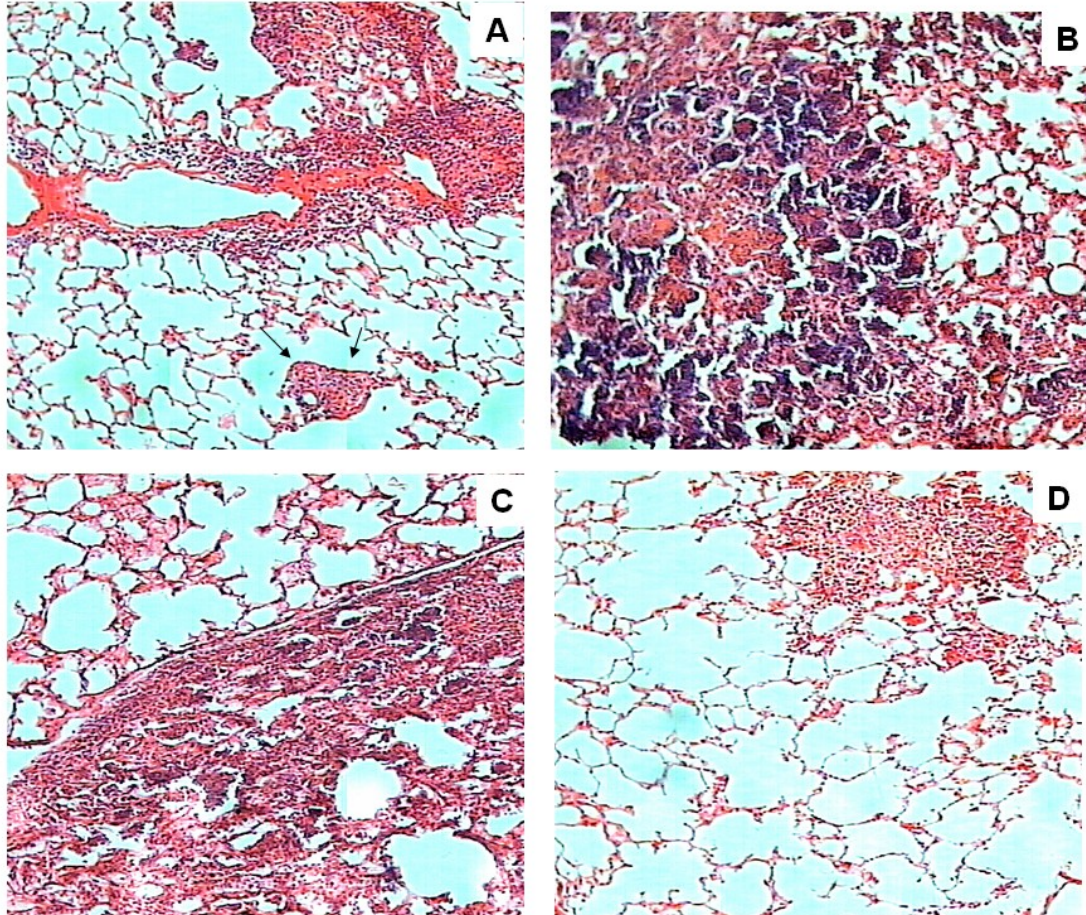


Figura 2. Histopatología representativa del pulmón en los ratones infectados con *M. bovis* seleccionados con diversos genotipos y aislados de los hospederos diversos.

(a) Después de un mes de infección con la cepa de referencia AN5, se producen los granulomas grandes (flechas), parches neumónicos moderados e inflamación perivascular abundante.

(b) En cambio, los animales infectados con la cepa altamente virulenta 04-303 mostraron neumonía masiva con necrosis extensa en el mismo día de infección.

(c) Ratones infectados con la cepa 04-302 también mostraron neumonía extensa pero necrosis leve después de 30 días de infección.

(d) En comparación, los pulmones de ratones infectados con la cepa atenuada 02-2B después de 4 meses mostraron pequeños parches de neumonía (micrografías a 100x, tinción hematoxilina-eosina).

### **Diferentes respuestas inmunes evocadas por diversas cepas de *M. bovis*.**

Para entender mejor la base molecular y celular de la virulencia bacteriana observada, se midió la expresión de citocinas y otras moléculas relevantes por RT-PCR en tiempo real. La cepa AN5 indujo la expresión rápida, alta y estable de IFN- $\gamma$ . Una expresión más baja pero con cinética similar fue observada para IL-4 (Fig. 3). Esta cepa también indujo alta expresión de TNF- $\alpha$ , subiendo en los días 3 y 28 post-infección, mientras que la expresión del iNOS aumentó progresivamente, alcanzando un pico al día 14, seguido por una disminución leve hasta concluir el experimento después de cuatro meses de infección (Fig. 3). En cambio, la cepa virulenta 04-303 indujo expresiones perceptiblemente más bajas y estables de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , iNOS y de IL-4 a partir del día 1 al 28 postinfección (Fig. 3).

Una expresión semejante de IFN- $\gamma$  e iNOS fue inducida por la otra cepa de virulencia alta 04-302, comparada con la cepa 04-303. La cepa 04-302 mostró una expresión más alta de TNF- $\alpha$  e IL-4 y niveles 4 veces más altos de IFN- $\gamma$  (Fig. 3).

También se estudió la expresión de beta-defensina 4 (mBD-4), como factor significativo de inmunidad innata, en este modelo animal la infección con la cepa *M. tuberculosis* H37Rv tiene una participación significativa en el control de la proliferación de los bacilos.<sup>105</sup> La infección con 04-303 y 04-302 indujo la expresión muy baja mBD-4, mientras que la cepa control AN5 indujo una expresión progresivamente mayor de este péptido antimicrobiano, manteniéndose hasta el día 120 (fig. 3).

Fig 3

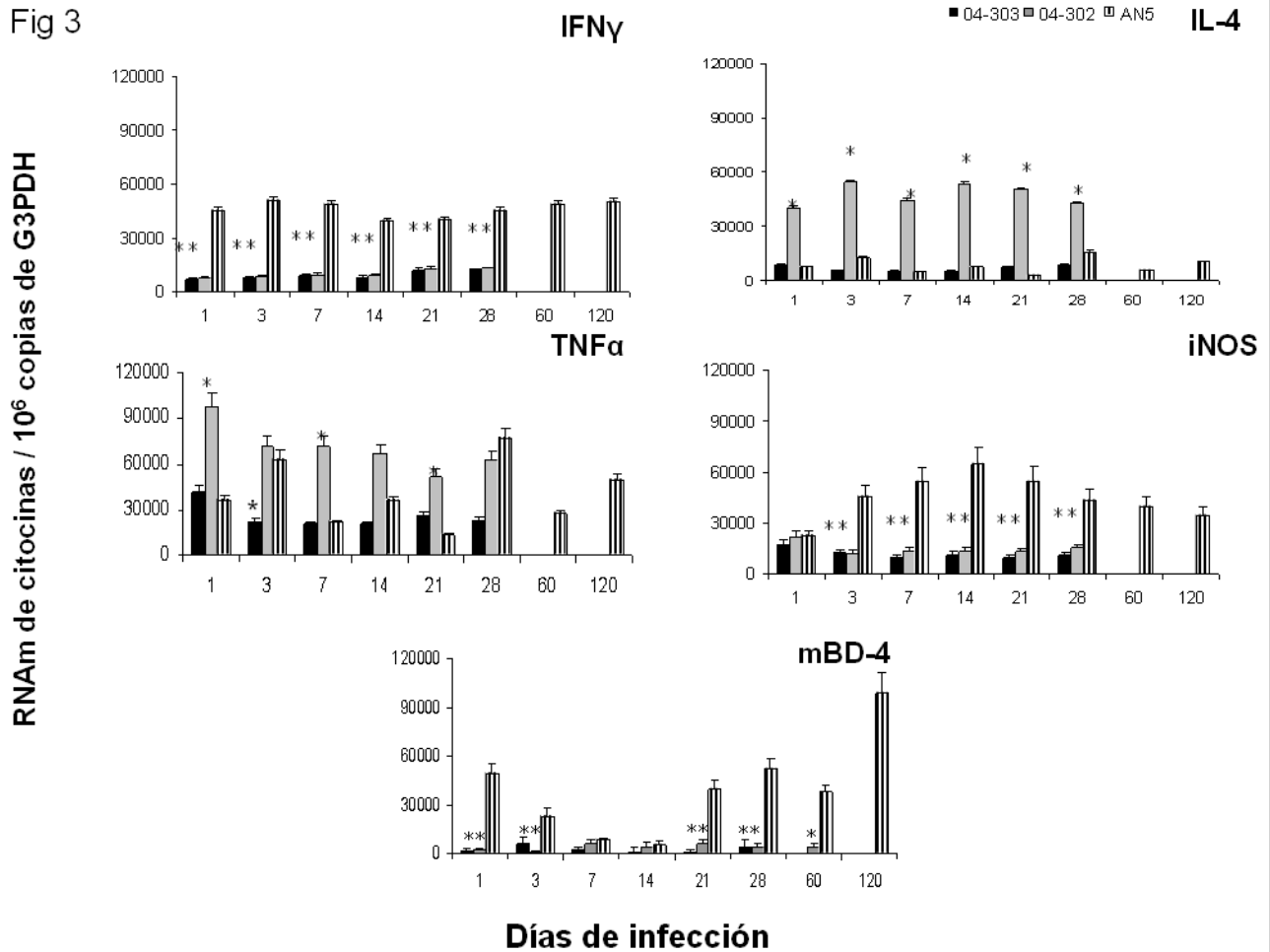


Figura 3. Expresión de IFN- $\gamma$ , IL-4, TNF- $\alpha$ , iNOS y mBD4 determinada por PCR en tiempo real en los ratones infectados con *M. bovis* seleccionados con diversos genotipos de alta virulencia. Los ratones BALB/c fueron infectados con las cepas de *M. bovis* que demostraron que una virulencia más alta (04-303, 04-302) y cuatro animales por grupo fueron sacrificados en diversos tiempos. La expresión de gen de iNOS, mBD4 y las citocinas fue determinada por la PCR tiempo real. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  desviación estándar de cuatro ratones por grupo. Los asteriscos representan diferencia estadística significativa comparada con la cepa control AN5 ( $p < 0.05$ ).

La cepa de baja virulencia 02-2B indujo la expresión progresiva de IFN- $\gamma$ , siendo la más alta y manteniéndose hasta el día 120 (Fig. 4). Esta cepa indujo una rápida y alta expresión de IL-4 durante el primer mes post infección, seguida por una disminución progresiva, alcanzando su expresión más baja el día 120. Esta cepa indujo una expresión relativamente baja de TNF- $\alpha$  pero aumentó progresivamente, manteniéndose hasta el día 120, mientras que la expresión del iNOS era la más alta, también manteniéndose al día 120.

La otra cepa de baja virulencia V2 indujo el aumento progresivo de IFN- $\gamma$  y la expresión significativa de iNOS durante última fase de la enfermedad, en los días 60 y 120 (Fig. 4). Esta cepa indujo una expresión más alta de TNF- $\alpha$  que la cepa control AN5 durante el primer mes post infección, seguida por cantidades similares al control durante última fase de la enfermedad.

De forma similar a la cepa 02-2B, el aislamiento V2 también indujo la alta expresión de IL-4 seguida por una disminución aguda durante última etapa de la enfermedad en los días 60 y 120 post infección.

La cepa 534, que también permitió una supervivencia prolongada de los ratones, expresión progresiva de IFN- $\gamma$  que se mantuvo para el día 120, además de una alta expresión IL-4 durante el primer mes, seguido por una disminución marcada, mientras que la expresión de TNF- $\alpha$  e iNOS era más alta que la inducida por la cepa control AN5 durante la fase avanzada de la enfermedad (Fig. 4).

En relación con la expresión mBD-4, todas estas cepas menos virulentas indujeron la alta expresión durante la infección temprana, seguida por una disminución progresiva en la última parte del experimento (Fig. 4).

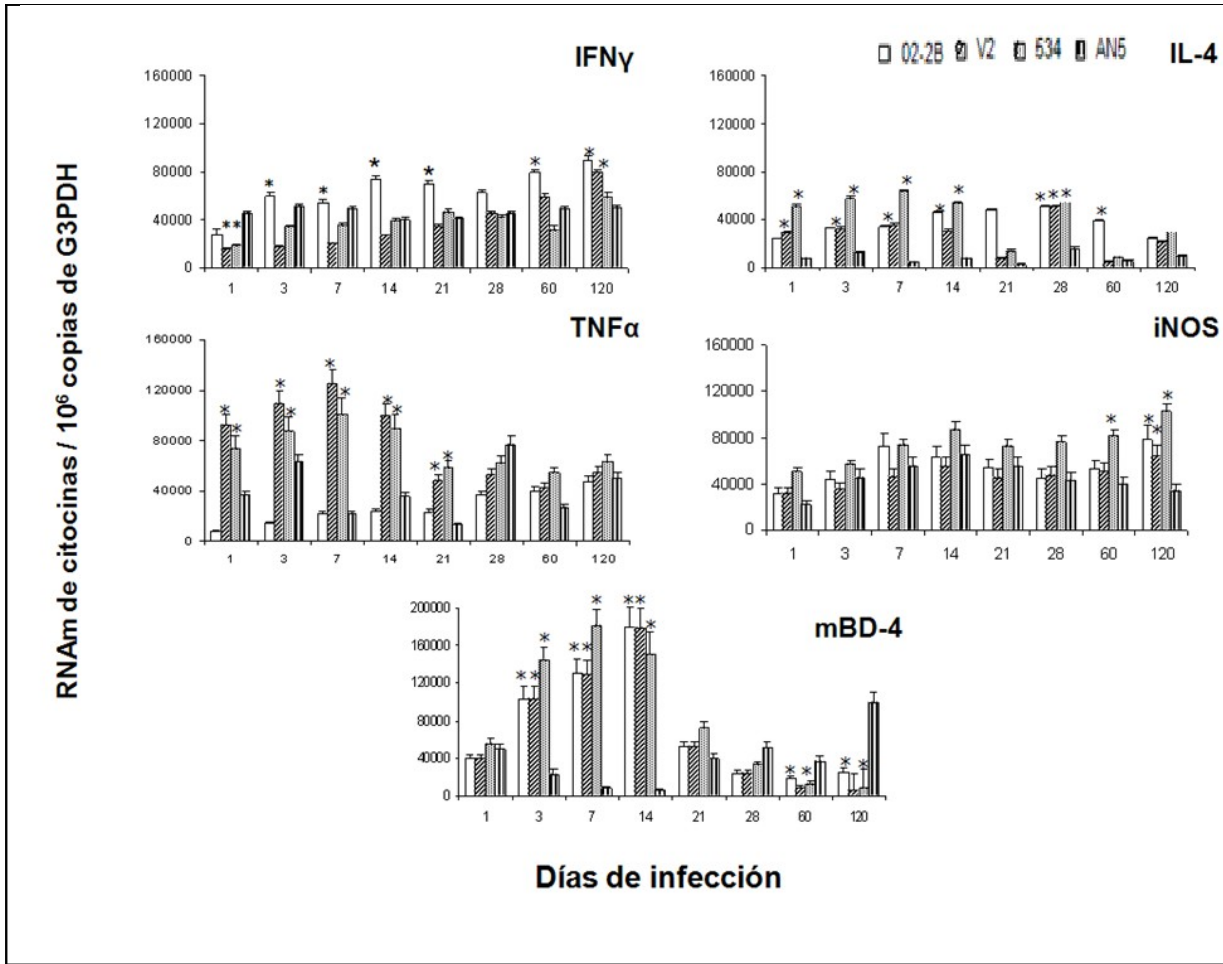


Figura 4. Expresión de IFN- $\gamma$ , IL-4, TNF- $\alpha$ , iNOS y mBD4 determinada por PCR en tiempo real en los ratones infectados con *M. bovis* seleccionados con diversos genotipos de virulencia baja. Los ratones de BALB/c fueron infectados con las cepas de *M. bovis* que exhibieron virulencia baja (02 2B, V2, 534), grupos de cuatro animales fueron sacrificados en diversos tiempos. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  desviación estándar de cuatro ratones por grupo. Los asteriscos representan diferencia estadística significativa comparada con la cepa control AN5 ( $p < 0.05$ ).

## DISCUSIÓN.

Varios modelos experimentales en los que se usaron diversos animales incluyendo ratones se han establecido <sup>106</sup> y el del ratón se ha aprobado totalmente. Aprovechamos de un modelo bien caracterizado de la tuberculosis pulmonar progresiva en ratones BALB/c, inducidos por una alta dosis intratraqueal bacteriana, para estudiar la virulencia y la respuesta inmune inducida por cepas seleccionadas de *M. bovis* de un amplio estudio epidemiológico/molecular en Argentina.

Solamente una cepa no fue obtenida de este estudio epidemiológico, la cepa AN5, que fue aislada en Inglaterra y se utiliza en todo el mundo para la producción de PPD bovino debido a su alta producción bacteriana en medios glicerizados. Este fenotipo fue seleccionado por los subcultivos repetidos en medio de cultivo en laboratorio después de un procedimiento similar usado para generar BCGs.<sup>107</sup>

De manera interesante, nuestros resultados demuestran que incluso después de muchos pases de subcultivo, la cepa AN5 no está atenuada, ya que exhibió un nivel intermedio de virulencia, produciendo la mortalidad del 50% en animales infectados después de 2 meses.

Utilizamos AN5 como control porque estudios recientes de microarreglos no han demostrado ninguna deleción significativa en AN5 en comparación con el genoma de *M.tuberculosis* H37Rv o *M bovis* cepa AF2122/97.<sup>107</sup>

La homología en la secuencia genómica entre los *M. bovis* AF2122/97 y H37Rv (cepa de referencia de *M. tuberculosis*) es 99.95% a nivel de nucleótidos, esto contrasta con las diferencias fisiológicas reportadas entre estos patógenos, sugiriendo que pueden estar implicadas variaciones en la expresión de genes.<sup>108</sup>

Las diversas expresiones y regulaciones de genes durante la infección se pueden relacionar con estas diferencias entre los bacilos bovinos y humanos. Reportes de estudios con microarreglos (Rehren y cols. 2007; <sup>109</sup> Golby y cols. 2007 <sup>110</sup>) encontraron variaciones importantes en genes entre *M. bovis* y *M. tuberculosis* que codifican proteínas implicadas en metabolismo y respiración intermediaria, en procesos de pared celular y proteínas hipotéticas. Comparado con *M. tuberculosis*, se encontró una expresión más elevada de reguladores transcripcionales en *M. bovis*. Asimismo, en *M. tuberculosis* observaron una expresión más alta de los genes PE/PPE, algunos cuyo código se relacionó a proteínas de la pared celular. Adicionalmente estos estudios no revelaron ningún gen único en el patógeno bovino.

En comparación con *M. tuberculosis*, la cepa bovina tiene un genoma más pequeño, careciendo de varias regiones llamadas RD (regiones de diferencia): RD4, RD5, RD6, RD7, RD8, RD9, RD10, RD12 y RD13. Asimismo el bacilo Calmette-Guérin carece de las mismas regiones RD que las cepas “clásicas” de *M. bovis*, pero además presenta deleciones de RD1, RD2 y RD14, las cuales ocurrieron al parecer durante el proceso de atenuación de esta cepa.<sup>12</sup> De hecho, los *M. bovis* carecen del fragmento RD4 que contiene dos genes Rv1511 y Rv1512, que codifican para las enzimas implicadas en la biosíntesis del residuo del fucosil glicolípido fenólico.<sup>111</sup> La supresión de RD4, así como una mutación en el gen Rv2958c, hace que *M. bovis* produzca un distinto glicolípido fenólico. Otra diferencia interesante con la cepa humana es la deleción en RD7 que codifica para el operon *mce3*, que se relaciona con la virulencia y su deleción en *M. tuberculosis* causa su atenuación.<sup>112</sup>

Cuando los ratones BALB/c se infectan vía intratraqueal con una dosis alta de H37Rv, hay una respuesta predominante tipo Th1, manteniéndose después de 3 semanas, esto controla temporalmente la proliferación bacteriana.<sup>105</sup> Posteriormente, aumenta la proliferación bacteriana y se acompaña por un



incremento en las citocinas tipo Th2 y un decremento de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e iNOS, concomitante con una neumonía progresiva y pequeños granulomas.<sup>54, 113, 114</sup>

Nuestro estudio demuestra que a pesar de su alta homología, AN5 indujo una inmunopatología diferente de la de H37Rv. La cepa bovina indujo un mayor número y granulomas más grandes durante la fase avanzada de la enfermedad, con IFN- $\gamma$  más alto que la expresión IL-4 a lo largo de toda la infección, así como expresión estable de TNF- $\alpha$ .

Este perfil de citocinas podría explicar la producción de granulomas grandes durante la fase avanzada, pero esta respuesta no es totalmente eficiente para controlar el desarrollo de los bacilos y el daño al tejido y los animales infectados mueren eventualmente.

La expresión en el perfil de citocinas por *M. bovis* 04-303 (la cepa más virulenta), indujo niveles más bajos de expresión de IFN- $\gamma$  y de IL-4 pero con número de copias similares de RNAm. Así, esta cepa indujo un balance rápido y estable de Th1/Th2 mezclado con una expresión más alta de TNF- $\alpha$  lo largo de la infección. Un perfil similar a Th0 se ha observado en los modelos experimentales de tuberculosis bovina asociados a una inmunidad celular protectora reducida y enfermedad extensa.<sup>115-117</sup>

La necrosis extensa es la característica histopatológica más distintiva observada en el pulmón de los ratones infectados con esta cepa, se ha considerado un acontecimiento activo mediado por la inmunidad celular.<sup>118</sup> Sin embargo, otros mecanismos podrían también participar en la inducción de necrosis, como la falta de la activación del macrófago (expresión baja de TNF- $\alpha$  e iNOS) y de las combinaciones particulares de citocinas (perfil mixto Th1/T2 con la alta expresión de TNF- $\alpha$ ). Ambas características fueron observadas en el pulmón de los ratones infectados con esta cepa y podrían contribuir al desarrollo de necrosis extensa.<sup>119</sup>

Otra observación interesante es la baja expresión de mBD-4 en los pulmones de los ratones infectados con las cepas altamente virulentas 04-303 y 04-302. Estas moléculas son péptidos antimicrobianos naturales catiónicos que pueden matar los microbios y algunos de ellos tienen actividades quimiotácticas en las células inmunes.<sup>113, 120</sup>

Se ha demostrado en este modelo animal una expresión rápida y estable de mBD-4 por el epitelio bronquial durante la fase temprana de la infección, cuando se establece un eficiente control del crecimiento de los bacilos después de la infección con H37Rv. Posteriormente, hay una disminución pronunciada en la producción mBD-4 durante la fase progresiva de la enfermedad cuando existe proliferación incontrolada de bacilos.<sup>121</sup> Así, la expresión baja de mBD-4 en los ratones infectados con cepas altamente virulentas de *M. bovis* podría contribuir a la proliferación de bacilos y daño extenso de tejido.<sup>105, 121</sup>

La cepa 04-302 fue también considerada altamente virulenta, porque causó muerte en todos los animales después de dos meses de infección con neumonía extensa y necrosis leve. Esta cepa, indujo bajos niveles de IFN- $\gamma$  e iNOS, similares a la cepa 04-303, pero la cepa 04-302 generó una expresión más alta de IL-4 y 3 veces más IFN- $\gamma$ . Así, esta cepa virulenta indujo una inmunorespuesta no-protectora Th-2 y una expresión muy baja mBD-4. Ambas cepas virulentas tenían espigotipos diferentes, pero compartieron el perfil de MIRU y fueron aislados de cerdos salvajes. Varias especies silvestres se infectan naturalmente con *M. bovis* y el cerdo es un reservorio importante en algunas regiones en Europa, como el área central del sur de España, en donde el predominio de las lesiones tuberculosas macroscópicas observadas en estos animales alcanza el 100%.<sup>122</sup> Aunque exista variabilidad genética del hospedero,<sup>123</sup> los cerdos salvajes parecen ser infectados fácilmente por *M. bovis*, pero son al parecer resistentes a desarrollar la enfermedad clínica.<sup>124</sup> El cerdo salvaje europeo (*Sus scrofa ferus*) se adapta a las condiciones naturales de una región en Argentina, su producción ha sido recientemente desarrollada en un sistema al aire libre y alimentados a base de maíz y soya.<sup>125</sup>

A pesar de que estudiamos solamente dos aislamientos provenientes de cerdos salvajes, es interesante pensar que la resistencia natural de este anfitrión podría ser una fuerza selectiva para los organismos con una virulencia más alta, semejante a la vacunación masiva a largo plazo con BCG.<sup>126</sup>

La cepa 02-2B fue aislada de otro hospedero infrecuente y demostró un espoligotipo no frecuente. Esta cepa fue aislada de la señora antes mencionada, que fue infectada al parecer después de manejar tejido pulmonar crudo de las vacas infectadas, que usaba para alimentar sus gatos. Alternativamente, ella habría podido ser infectada por los gatos vía aerógena.<sup>104</sup>

La cepa 02-2B fue claramente atenuada, pues hubo supervivencia total de los ratones después de 4 meses de infección con las cargas bacilares bajas y escaso daño de tejido. Este aislamiento indujo la expresión más alta de IFN- $\gamma$ , mantenido después de 4 meses de infección. La cepa 02-2B también indujo una alta expresión de IL-4 con respecto a AN5 durante el primer mes de infección, seguido por una disminución acentuada durante la última fase de la infección en los días 60 y 120, indicando que durante la infección crónica una respuesta predominante Th1 fue establecida, que se correlacionó con el control eficiente de los bacilos y limitó el daño de tejidos.

Un patrón similar de citocinas pero con expresión más alta de iNOS fue inducido por la otra cepa de baja virulencia 534, que exhibió el espoligotipo más frecuente 34 y fue aislada de ganado al igual que la otra cepa atenuada V2. Este último aislamiento también indujo expresión progresiva de IFN- $\gamma$ , alcanzando su pico en el día 120 y una alta expresión de IL-4 durante la infección temprana seguida por una disminución marcada durante la última fase de la enfermedad.

La infección natural y experimental del ganado con *M. bovis* también induce una producción eficiente IL-4 que disminuye generalmente después de las 16 semanas.<sup>127</sup>

## CONCLUSIONES.

Este estudio integra la cinética de los cambios patológicos con la respuesta inmune del hospedero, inducida por los *M. bovis* seleccionados con diversos genotipos y aislados de diferentes especies. Los resultados demuestran que los *M. bovis* exhiben diversos patrones de virulencia y respuesta inmune. Las cepas aisladas de animales salvajes mostraron una virulencia más alta e indujeron respuestas no protectoras, mientras que las cepas aisladas de seres humanos o de ganado exhibieron una virulencia más baja e indujeron un perfil rápido Th1/Th2, que fue cambiado predominante a un perfil Th1 durante la última fase de la infección. Así, según lo reportado con los aislamientos clínicos de *M. tuberculosis*, los *M. bovis* también demuestran variabilidad de la virulencia.

## BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA

1. WHO. Tuberculosis. Boston: Little, Brown and Company, 1996; 3-19. 8. World Health Organization. Global tuberculosis control. WHO Report 1999. Ginebra: World Health Organization, 1999.
2. Neill S, Bryson D, Pollock J. Pathogenesis of tuberculosis in cattle. *Tuberculosis* 2001; 81:79-86.
3. Ospina S. La tuberculosis, una perspectiva histórico-epidemiológica. *Infectio*. 2001; 5:241-249.
4. van Soolingen D, Hoogenboezem T, de Haas P, Hermans P, Koedam M, Teppema K, Brennan P, Besra G, Portaels F, Top J, Schouls L, van Embden J. A novel pathogenic taxon of the *Mycobacterium tuberculosis* complex, Canetti: characterization of an exceptional isolate from Africa. *Int J Syst Bacteriol* 1997; 47:1236-1245.
5. O'Reilly L, Daborn C. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man: a review. *Tubercle Lung Dis* 1995; 76:1-46.
6. De Lisle G, Mackintosh C, Bengis R. *Mycobacterium bovis* in free-living and captive wildlife, including farmed deer. *Rev Sci Tech off int Epiz* 2001; 20: 86-111.
7. Cousins D, Bastida R, Cataldi A, Quse V, Redrobe S, Dow S, Duignan P, Murray A, Dupont C, Ahmed N, Collins D, Butler W, Dawson D, Rodriguez D, Loureiro J, Romano M, Alito A, Zumarraga M, Bernardelli A. Tuberculosis in seals caused by a novel member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: *Mycobacterium pinnipedii* sp. nov. *Int. J Syst Evol Microbiol* 2003; 53:1305-1314.
8. Cousins D. *Mycobacterium bovis* an extraordinary pathogen. *Microbiol* 2004; 25:15-17.
9. Thoen C, Lobue P, de Kantor I. The importance of *Mycobacterium bovis* as a zoonosis. *Vet Microbiol* 2006; 112:339-445.
10. Sauret J, Jolis R, Ausina V, Castro E, Cornudella R. Human tuberculosis due to *Mycobacterium bovis*: report of 10 cases. *Tuber Lung Dis* 1992; 73: 388-391.
11. Cataldi A, Romano M. Tuberculosis caused by other members of the *M. tuberculosis* Complex. *Tuberculosis* 2007. From basic science to patient care. Chapter 8. [www.tuberculosis textbook.com](http://www.tuberculosis textbook.com). 2007; 283-314

12. Brosch R, Gordon, SV, Marmiesse M, Brodin, P, Buchrieser, C, Eiglmeier, K, Garnier, T. A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. PNAS 2002; 99:3684–3689.
13. Fenton M, Vermeulen M. Minireview: Immunopathology of Tuberculosis: Roles of macrophages and monocytes. Infect Immun 1996; 64: 683-690.
14. Fanning E. *Mycobacterium bovis* infection in animals and humans. Clinical tuberculosis. Davies PDO. London: Chapman and Hall Medical, 1998; 535-550.
15. Stuart F, Manser P, McIntosh F. Tuberculosis in imported red deer (*Cervus elaphus*). Vet Rec 1988; 122:508-511.
16. Cousins D, Florisson N. A review of tests available for use in the diagnosis of tuberculosis in non-bovine species. Rev Sci Tech Off int Epiz 2005; 24: 1039-1059
17. Aranaz A, Liébana E, Gómez-Mampaso E, Galán JC, Cousins D, Ortega A, Blázquez J, Baquero F, Mateos A, Suárez G, Domínguez L. *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* subsp. *nov.* A taxonomic study of a new member of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolated from goats in Spain. Int J System Bacteriol 1999; 49:1263-1273.
18. Niemann S, Richter E, Rüscher-Gerdes S. Biochemical and genetic evidence for transfer of *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* Aranaz et al. 1999 to the species *Mycobacterium bovis* Karlson and Lessel 1970 (approved lists 1980) as *Mycobacterium bovis* subsp. *caprae* comb. *nov.* Int syst evolut Microbiol 2002; 52:433-436.
19. Lantos A, Niemann S, Mezosi L, Sós E, Erdélyi K, David S, Parsons L, Kubica T, Rüscher-Gerdes S, Somoskövi A. Pulmonary tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* subsp. *caprae* in captive Siberian tiger. Emerg infect Dis 2003; 9:1462-1464.
20. Morris R, Pfeiffer D, Jackson R. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections. Vet. Microbiol. 1994; 40:153-177.
21. Huitema H. Tuberculosis in animal and man with attention to reciprocal transmission of mycobacterial infections and the successful eradication of bovine tuberculosis in cattle in the Netherlands. Royal Netherlands Tuberculosis Association (KNCV), La Haya, Netherlands 1992; p.185.
22. Whipple D, Palmer M. Reemergence of tuberculosis in animals in the United States. In Emerging diseases of animals (C. Brown & C. Bolin, edit.). ASM Press, Washington, DC. 2000; p281-299.
23. Cotter T, O'Shaughnessy E, Sheehan S, Cryan B, Bredin C. Human *Mycobacterium bovis* infection in the southwest of Ireland 1983–1992: a comparison with *M. tuberculosis*. Ir Med J 1996; 89:62–63.

24. LoBue P, Betancourt W, Cowan L, Seli L, Peter C, Moser K. Identification of a familial cluster of pulmonary *Mycobacterium bovis* disease. *Int. J. Tuberc Lung Dis* 2004; 8:1142–1146.
25. Ortner D, Putschar W. *The Identification of Pathological Conditions in Human Skeletal Remains*. Washington: Smithsonian Institution Press. 1985.
26. Organización Mundial de la Salud 2007. Tuberculosis. Nota descriptiva OMS. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/es/> N°104. Marzo de 2007.
27. INIFAP. Situación de la Tuberculosis Bovina en México, 1990–2004. [www.inifap.gob.mx/quienes\\_somos/noticias/situacion\\_tuberculosis.pdf](http://www.inifap.gob.mx/quienes_somos/noticias/situacion_tuberculosis.pdf)
28. SENASICA. NOM-031-ZOO-1995 Campaña Nacional contra la Tuberculosis bovina. Diario Oficial de la Federación el 8 de marzo de 1996 y Modificada el 27 de agosto de 1998.
29. CONASA. Plan Estratégico de la Campaña Nacional contra la Tuberculosis en México 2008-2012. Abril de 2008. [www.conasamexico.org/conasaplanestrategicotuber.doc](http://www.conasamexico.org/conasaplanestrategicotuber.doc)
30. Riley R, Mills C, Nyka W, Weinstock N, Storey P, Sultan L, Riley M, Wells W. Aerial dissemination of pulmonary tuberculosis: a two-year study of contagion in a tuberculosis ward, 1959. *Am J Epidemiol* 1995; 142:3-14.
31. Wells W. Airborne Contagion and Air Hygiene. *Am J Public Health Nations Health*. 1955; 45:1495–1496.
32. McDonough K, Kress Y. Cytotoxicity for lung epithelial cells is a virulence-associated phenotype of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 1995; 63:4802–4811.
33. Diamond G, Zasloff M, Eck H, Bresseur M, Maloy W, Bevins C. Tracheal antimicrobial peptide, a cysteine-rich peptide from mammalian tracheal mucosa: peptide isolation and cloning of a cDNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88:3952-3956.
34. Alcorn J, Wright J. Surfactant protein A inhibits alveolar macrophage cytokine production by CD14-independent pathway. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004; 286:129-136.
35. Schutte B, McCray P. Beta-defensins in lung host defense. *Annu Rev Physiol* 2002; 64:709-748.
36. Biragyn A, Ruffini P, Leifer C, Klyushnenkova E, [Shakhov A](#), [Chertov O](#), [Shirakawa A](#), [Farber J.](#), [Segal D](#), [Oppenheim J.](#) [Kwak L.](#) Toll-like receptor 4-dependent activation of dendritic cells by beta-defensin 2. *Science* 2002; 298:1025-1029.

37. Davidson D, Currie A, Reid G, Bowdish D, MacDonald K, Ma R, Hancock R, Speert D. The cationic antimicrobial peptide LL-37 modulates dendritic cell differentiation and dendritic cell-induced T cell polarization. *J Immunol* 2004; 172:1146-1156.
38. Dannenberg A. Roles of cytotoxic delayed-type hypersensitivity and macrophage-activating cell-mediated immunity in the pathogenesis of tuberculosis. *Immunobiology* 1994; 191:461-473.
39. Parrish N, Dick J, Bishai W. Mechanisms of latency in *Mycobacterium tuberculosis*. *Trends Microbiol* 1998; 6:107-12.
40. Selwyn P, Hartel D, Lewis V, Schoenbaum E, Vermund S, Klein R, Walker A, Friedland G. A prospective study of the risk of tuberculosis among intravenous drug users with human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med* 1989; 320:545-550.
41. Schluger N. and Rom W. State of the Art. The Host Immune Response to Tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998; 157:679-691.
42. Riley L. Phagocytosis of *M. tuberculosis*. In W. Rom and S. Garay, editors. *Tuberculosis*. Little, Brown, Boston, MA. 1996; p281-289.
43. Schlesinger L. Entry of *Mycobacterium tuberculosis* into mononuclear phagocytes. *Curr Top Microbiol Immunol* 1996; 215:71-96.
44. Schlesinger L. Role of mononuclear phagocytes in *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis. *J Investig Med* 1996; 44:312-323.
45. Schlesinger L, Hull S, Kaufman T. Binding of the terminal mannosyl units of lipoarabinomannan from a virulent strain of *Mycobacterium tuberculosis* to human macrophages. *J Immunol* 1994; 152:4070-4079.
46. Hernández-Pando R, Orozco E, Arriaga A, Sampieri A, Larriva-Sahd J, Madrid Marina V. Analysis of the local kinetics and localization of interleukin 1 $\alpha$ , tumor necrosis factor  $\alpha$  and transforming growth factor  $\beta$  during the course of experimental pulmonary tuberculosis. *Immunology* 1997; 90: 607-617.
47. Czop, J, Kay J. Isolation and characterization of  $\beta$ -glucan receptors on human mononuclear phagocytes. *J Exp Med* 1991; 173:1511-1520.
48. Goto T, Herberman R, Maluish A, Strong D. Cyclic AMP as a mediator of prostaglandin E induced suppression of human natural killer cell activity. *J Immunol* 1983; 130:1350-1355.
49. Snyder D, Beller D, Unanue E. Prostaglandins modulate macrophage expression. *Nature* 1982; 299:163-165.



50. Downing J, Pasula R, Wright J, Twigg H, Martin W. Surfactant protein A promotes attachment of *Mycobacterium tuberculosis* to alveolar macrophages during infection with human immunodeficiency virus. Proc Natl Acad Sci USA 1995; 92:4848–4852.
51. Gaynor C, McCormack F, Voelker D, McGowan S, Schlesinger L. Pulmonary surfactant protein A mediates enhanced phagocytosis of *Mycobacterium tuberculosis* by a direct interaction with human macrophages. J Immunol 1995; 155:5343–5351.
52. Hoheisel G, Zheng L, Teschler H, Striz I, Costabel U. Increased soluble CD14 levels in BAL fluid in pulmonary tuberculosis. Chest 1995; 108: 1614–1616.
53. Zimmerli S, Edwards S, Ernst J. Selective receptor blockade during phagocytosis does not alter the survival and growth of *Mycobacterium tuberculosis* in human macrophages. Am J Respir Cell Mol Biol 1996; 15:760–770.
54. Hernández-Pando R, Schön T, Orozco E, Serafín J, Estrada-García I. Expression of nitric oxide synthase and nitrotyrosine during the evolution of experimental pulmonary tuberculosis. Exp Toxicol Pathol 2001; 53:257-265.
55. Gordon A, D'Arcy Hart P, Young M. Ammonia inhibits phagosome-lysosome fusion in macrophages. Nature 1980; 286:79–80.
56. Goren M, Brokl O, Schaefer W. Lipids of putative relevance to virulence in *Mycobacterium tuberculosis*: phthiocerol dimycocerosate and the attenuation indicator lipid. Infect Immun 1974; 9:150–158.
57. Goren M, D'Arcy Hart P, Young M, Armstrong J. Prevention of phagosome-lysosome fusion in cultured macrophages by sulfatides of *Mycobacterium tuberculosis*. Proc Natl Acad Sci USA 1976; 73:2510–2514.
58. Jackett P, Aber V, Lowrie D. Virulence and resistance to superoxide, low pH and hydrogen peroxide among strains of *Mycobacterium tuberculosis*. J Gen Microbiol 1978; 104:37–45.
59. Sturgill-Koszycki S, Schlesinger P, Chakraborty P, Haddix P, Collins H, Fok A, Allen R, Gluck S, Heuser J, Russell D. Lack of acidification in *Mycobacterium* phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton-ATPase. Science 1994; 263:678–681. (Erratum appears in Science 1994; 263:1359).
60. Rom W, Schluger N, Law K, Condos R, Zhang Y, Weiden M, Harkin T, Tchou-Wong K.. Human host response to *Mycobacterium tuberculosis*. Schweiz Med Wochenschr 1995; 125:2178–2185.

61. Stenger S, Mazzaccaro R, Uyemura K, Cho S, Barnes P, Rosat J, Sette A, Brenner M, Porcelli S, Bloom B, Modlin R. Differential effects of cytolytic T cell subsets on intracellular infection. *Science* 1997; 276:1684–1687.
62. Law K, Jagirdar J, Weiden M, Bodkin M, Rom W. Tuberculosis in HIV-positive patients: cellular response and immune activation in the lung. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 153:1377–1384.
63. Kerr J, Wyllie A, Currie A. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26:239–57.
64. Friedland J. Chemotactic cytokines and tuberculosis. *Biochem Soc Trans* 1994; 22:310–312.
65. Munk M, Emoto M. Functions of T-cell subsets and cytokines in mycobacterial infections. *Eur Respir J Suppl* 1995; 20:668–675.
66. Byrd T. Tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) promotes growth of virulent *Mycobacterium tuberculosis* in human monocytes: iron-mediated growth suppression is correlated with decreased release of TNF- $\alpha$  from iron-treated infected monocytes. *J Clin Invest* 1997; 99:2518–2529.
67. Kindler V, Sappino A, Grau G, Piguet P, Vassalli P. The inducing role of tumor necrosis factor in the development of bactericidal granulomas during BCG infection. *Cell* 1989; 56:731–740.
68. Kurashima K, Mukaida N, Fujimura M, Yasui M, Nakazumi Y, Matsuda T, Matsushima K. Elevated chemokine levels in bronchoalveolar lavage fluid of tuberculosis patients. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 155:1474–1477.
69. O'Brien L, Roberts B, Andrew P. *In vitro* interaction of *Mycobacterium tuberculosis* and macrophages: activation of antimycobacterial activity of macrophages and mechanisms of antimycobacterial activity. *Curr Top Microbiol Immunol* 1996; 215:97–130.
70. Nagasawa H, Miyaura C, Abe E, Suda T, Horiguchi M, Suda T. Fusion and activation of human alveolar macrophages induced by recombinant interferon-gamma and their suppression by dexamethasone. *Am Rev Respir Dis* 1987; 136:916–921.
71. Hernández-Pando R, Orozco E, Sampieri A, Pavón L, Velasquillo C, Larriva-Sahd L, Madrid M. Correlation between kinetics of Th1/Th2 cells and pathology in a murine model of experimental pulmonary tuberculosis. *Immunology* 1996; 89:26-33.
72. Belardelli F. Role of interferons and other cytokines in the regulation of the immune response. *APMIS* 1995; 103:161–179.

73. Ruscetti F, Varesio L, Ochoa A, Ortaldo J. Pleiotropic effects of transforming growth factor-beta on cells of the immune system. *Ann NY Acad Sci* 1993; 685:488–500.
74. Zhang M, Gong J, Iyer D, Jones B, Modlin R, Barnes P. T cell cytokine responses in persons with tuberculosis and human immunodeficiency virus infection. *J Clin Invest* 1994; 94:2435–2442.
75. Walker L, Lowrie D. Killing of *Mycobacterium microti* by immunologically activated macrophages. *Nature* 1981; 293:69–71.
76. Flesch I, Kaufmann S. Attempts to characterize the mechanisms involved in mycobacterial growth inhibition by gamma-interferon- activated bone marrow macrophages. *Infect Immun* 1988; 56: 1464–1469.
77. Nicholson S, Bonecini-Almeida M, Lapa e Silva J, Nathan C, Xie Q, Mumford R, Weidner J, Calaycay J, Geng J, Boechat N, Linares C, Rom W, Ho J. Inducible nitric oxide synthase in pulmonary alveolar macrophages from patients with tuberculosis. *J Exp Med* 1996; 183:2293–2302.
78. Kamijo R, Shapiro D, Gerecitano J, Le J, Bosland M, Vilcek J. *Mycobacterium bovis* infection of mice lacking receptors for interferon-gamma or for transcription factor IRF-1. *J Interferon Res* 1994; 14:281–282.
79. Blackwell J. Structure and function of the natural-resistance associated macrophage protein (Nramp1), a candidate protein for infectious and autoimmune disease susceptibility. *Mol Med Today* 1996; 2:205–211.
80. Blackwell J, Barton C, White J, Searle S, Baker A, Williams H, Shaw M. Genomic organization and sequence of the human NRAMP gene: identification and mapping of a promoter region polymorphism. *Mol Med* 1995; 1:194–205.
81. Hernández Pando R, Bornstein Q, Aguilar D, Orozco E, Martínez Cordero E. Inflammatory cytokine production by immunologic and foreign body multinucleated giant cells. *Immunology* 2000; 100: 352-358.
82. Lopez Ramirez G, Rom W, Ciotoli C, Talbot A, Martiniuk F, Cronstein B, Reibman J. *Mycobacterium tuberculosis* alters expression of adhesion molecules on monocytic cells. *Infect Immun* 1994; 62:2515–2520.
83. Caldenhoven E, Coffey P, Yuan J, Van de Stolpe A, Horn F, Kruijer W, Van der Saag P. Stimulation of the human intercellular adhesion molecule-1 promoter by interleukin-6 and interferon-gamma involves binding of distinct factors to a palindromic response element. *J Biol Chem* 1994; 269:21146–21154.
84. Nau G, Guilfoile P, Chupp G, Berman J, Kim S, Kornfeld H, Young R. A chemoattractant cytokine associated with granulomas in tuberculosis and silicosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94:6414–6419.

85. Rook G, Hernández Pando R. The pathogenesis of tuberculosis. *Annual Rev Microbiol* 1996; 50:259-284.
86. Boom W. The role of T-cell subsets in *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Infect AgentsDis* 1996; 5:73–81.
87. Berman J, Blumenthal R, Kornfeld H, Cook J, Cruikshank W, Vermeulen M, Chatterjee D, Belisle J, Fenton M. Chemotactic activity of mycobacterial lipoarabinomannans for human blood T lymphocytes *in vitro*. *J Immunol* 1996; 156:3828–3835.
88. Delespesse G, Demeure C, Yang L, Ohshima Y, Byun D, Shu U. *In vitro* maturation of naive human CD41 T lymphocytes into Th1, Th2 effectors. *Int Arch Allergy Immunol* 1997; 113:157–159.
89. Romagnani S. The Th1/Th2 paradigm. *Immunol. Today* 1997; 18:263–266.
90. Romagnani S. Understanding the role of Th1/Th2 cells in infection. *Trends Microbiol* 1996; 4:470–473.
91. Kaufmann S. Gamma/delta and other unconventional T lymphocytes: what do they see and what do they do? *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 2272–2279.
92. Porcelli S, Morita C, Brenner M. CD1b restricts the response of human CD4-8- T lymphocytes to a microbial antigen. *Nature* 1992; 360:593–597.
93. Ladel C, Hess J, Daugelat S, Mombaerts P, Tonegawa S, Kaufmann S. Contribution of alpha/beta and gamma/delta T lymphocytes to immunity against *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette Guerin: studies with T cell receptor-deficient mutant mice. *Eur J Immunol* 1995; 25:838–846.
94. North R, Izzo A. Granuloma formation in severe combined immunodeficient (SCID) mice in response to progressive BCG infection: tendency not to form granulomas in the lung is associated with faster bacterial growth in this organ. *Am J Pathol* 1993; 142:1959–1966.
95. Izzo A, North R. Evidence for an alpha/beta T cell independent mechanism of resistance to mycobacteria: Bacillus-Calmette-Guerin causes progressive infection in severe combined immunodeficient mice, but not in nude mice or in mice depleted of CD41 and CD81 T cells. *J Exp Med* 1992; 176:581–586.
96. Böddinghaus B, Rogall T, Flohr T, Blöcker H, Böttger E. Detection and identification of Mycobacteria by Amplification of rRNA. *J Clin Microbiol* 1990; 28: 1751-1759.
97. Sreevatsan S, Pan X, Stockbauer K, Connell N, Kreiswirth B, Whittam T, Musser J. Restricted structural gene polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis* complex indicates evolutionarily recent global dissemination. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94:9869-9874.

98. Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, van Agterveld M, van Soolingen D, Kuijper S, Bunschoten A, Molhuizen H, Shaw R, Goyal M, van Embden J. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol* 1997; 35, 907-914.
99. Supply P, Mazars E, Lasjean S, Vincent V, Gicquel B, Locht C. Variable human minisatellite-like regions in the *Mycobacterium tuberculosis* genome. *Mol Microbiol* 2000; 26:762-771.
100. Lopez B, Aguilar D, Orozco H, Burger M, Espitia C. A marked difference in pathogenesis and immune response induced by different *Mycobacterium tuberculosis* genotypes. *Clin Exp Immunol* 2003; 133:30-37.
101. Hernández Pando R, Orozco E, Arriaga C, Sampieri A, Larriva S. Analysis of the local kinetics and localization of interleukin 1 alpha, tumor necrosis factor alpha and transforming growth factor beta, during the course of experimental pulmonary tuberculosis. *Immunology* 1997; 90:507-516.
102. Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R: Kinetic PCR analysis-real time monitoring of DNA amplification. *Bio/Technology* 1993, 11:1026-1030
103. Zumárraga M, Martin C, Samper S, Alito A, Latini O. Usefulness of spoligotyping in molecular epidemiology of *Mycobacterium bovis*-related infections in South America. *J Clin Microbiol* 1999; 37:296-303.
104. Colmegna I, Ricci B, Zumarraga M, Cataldi A, Di Lonardo M. *Mycobacterium bovis* and septic glenohumeral arthritis. *Clin Rheumatol* 2004; 23:379-80.
105. Rivas Santiago B, Sada E, Tsutsumi V, Aguilar D, Leon Contreras J, Hernández Pando R. Expression of  $\beta$ -defensins during the course of experimental tuberculosis infection. *J Infect Dis* 2006; 194:697-701.
106. Clarke K, Fitzgerald S, Zwick L, Church S, Kaneene J. Experimental inoculation of meadow voles (*Microtus pennsylvanicus*), house mice (*Mus musculus*), and Norway rats (*Rattus norvegicus*) with *Mycobacterium bovis*. *Wildl Dis* 2007; 43:353-365.
107. Hewison G, Vordermeier M, Smith N, Gordon S. Recent advances in our knowledge of *Mycobacterium bovis*: a feeling for the organism. *Vet Microbiol* 2006; 112: 127-139.
108. [Garnier T](#), [Eiglmeier K](#), [Camus J.](#), [Medina N](#), [Mansoor H](#), [Pryor M](#), [Duthoy S](#), [Grondin S](#), [Lacroix C](#), [Monsempe C](#), [Simon S](#), [Harris B](#), [Atkin R](#), [Doggett J](#), [Mayes R](#), [Keating L](#), [Wheeler P](#), [Parkhill J](#), [Barrell B.](#), [Cole ST](#), [Gordon S](#), [Hewinson R](#). The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100:7877-7882.

109. Rehren G, Walters S, Fontan P, Smith I, Zárraga A. Differential gene expression between *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis* 2007; 87:347-359.
110. Golby P, Hatch K, Bacon J, Cooney R, Riley P, Allnut J, Hinds J, Nuñez J, Marsh P, Hewinson R, Gordon S. Comparative transcriptomics reveals key gene expression differences between the human and bovine pathogens of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Microbiology* 2007; 153: 3323–3336
111. Malaga W, Constant P, Euphrasie D, Cataldi A, Daffé M, Reyrat J, Guilhot C. Deciphering the genetic bases of the structural diversity of phenolic glycolipids in strains of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J Biol Chem* 2008; 283:15177-15184.
112. Gioffré A, Infante E, Aguilar D, Santangelo M, Klepp L, Ariel N, Meikle V, Romano M. Mutation in *mce* genes attenuates *M. tuberculosis* virulence. *Microb Infect* 2005; 7:325-334.
113. Hernández Pando R, Orozco E, Sampieri A, Pavón L, Velasquillo C, Larriva-Sahd J, Alcocer J, Madrid M. Correlation between the kinetics of Th1/Th2 cells and pathology in a murine model of experimental pulmonary pathology. *Immunology* 1996; 89:26-33.
114. Hernández Pando R, Orozco E, Arriaga C, Sampieri A, Larriva S, Madrid M. Analysis of the local kinetics and localization of interleukin 1 alpha, tumor necrosis factor alpha and transforming growth factor beta, during the course of experimental pulmonary tuberculosis. *Immunology* 1997; 90:507-516.
115. Palmer M, Whipple D, Olsen S, Jacobson R. Cell mediated and humoral immune responses of white-tailed deer experimentally infected with *Mycobacterium bovis*. *Res Vet Sci* 2000; 68:95-98.
116. Ritacco V, Lopez B, DeKantor I, Barrera L, Errico F, Nader A. Reciprocal cellular and humoral immune-responses in bovine tuberculosis, *Res Vet Sci* 1991; 50:365–367.
117. Welsh M, Cunningham R, Corbett D, Girvin R, McNair J, Skuce R, Bryson D, Pollock J. Influence of pathological progression on the balance between cellular and humoral immune responses in bovine tuberculosis. *Immunology* 2005; 114:101–111.
118. Dannenberg A. Pathophysiology: basic aspects. In: D. Schlossberg, Editor, *Tuberculosis and Nontuberculous Mycobacterial Infections*. 1999 Fourth Edition, WB Saunders, Philadelphia, p17–47.
119. Orme I. The immunopathogenesis of tuberculosis: a new working hypothesis, *Trend Microbiol* 1998; 6:94–97.

120. Durr M, Peschel A. Chemokines meet defensins: the merging concepts of chemoattractants and antimicrobial peptides in host defense. *Infect Immun* 2002; 70:6515-6517.
121. Rivas Santiago B, Leon J, Sada E, Hernandez Pando R. The potential role of lung epithelial cells and beta defensins in experimental latent tuberculosis. *Scand J Immunol* 2008; 67:448-452.
122. Gortazar C, Vicente J, Gavier-Widén D. Pathology of bovine tuberculosis in the European wild boar (*Sus scrofa*). *Vet Rec* 2003; 152:779–790.
123. Acevedo-Whitehouse K, Vicente J, Gortazar C, Höfle U, Fernández-de-Mera I, Amos W. Genetic resistance to bovine tuberculosis in the Iberian wild boar. *Mol Ecol* 2005; 14:3209-3217.
124. Vicente J, Höfle U, Garrido J, Fernández-De-Mera I, Juste R, Barral M, Gortazar C. Wild boar and red deer display high prevalences of tuberculosis-like lesions in Spain. *Vet Res* 2006; 37:107-119.
125. Vieites C, Basso C, Bartolini N. Wild boar (*Sus scrofa ferus*): productivity index in an experimental outdoor farm. *InVet, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires*. 2003; 5:91-95.
126. Van Soolingen D, Qian L, de Hass P. Predominance of a single genotype of *Mycobacterium tuberculosis* in countries of East Asia. *J. Clin. Microbiol.* 1995; 33:3234-3238.
127. Rhodes S, Palmer N, Graham S, Bianco A, Hewinson R, Vordermeier M. Distinct response kinetics of gamma interferon and interleukin 4 in bovine tuberculosis. *Infect Immun* 2000; 68:5393-5400.