



**UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**UNAM  
POSGRADO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**INSTITUTO DE FISIOLÓGIA CELULAR  
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS**

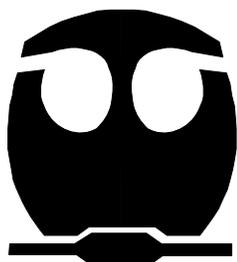
**EFFECTO TERAPÉUTICO DE UN ADENOVIRUS RECOMBINANTE QUE  
CODIFICA A INTERFERÓN GAMMA EN UN MODELO MURINO DE  
TUBERCULOSIS PULMONAR PROGRESIVA**

**TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTORA EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS  
PRESENTA**

**M. en C. DULCE ADRIANA MATA ESPINOSA**

**DIRECTOR DE TESIS: DR. FERNANDO LÓPEZ CASILLAS**

**El presente trabajo se realizó con el financiamiento a proyectos auspiciados por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, la Universidad Nacional Autónoma de México, PAPIIT IN-239602 y el Centro Internacional para Ingeniería Genética y Biotecnología. Durante los estudios de doctorado goce de una beca otorgada por CONACYT y DGEP-UNAM.**



**MÉXICO**

**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.

**“Muchas veces, a lo largo de un mismo día, me doy cuenta que mi propia vida y sus logros se han construido gracias al trabajo de las personas que me rodean.**

**También comprendo con cuánta seriedad debo esforzarme para darles, en correspondencia, tanto como he recibido”**

**Albert Einstein**

## **DEDICATORIAS**

**A MI PEQUEÑA ANDY, POR TU ALEGRIA Y PORQUE LE HAZ DADO A MI VIDA**

**UNA NUEVA FORMA DE VERLA, VIVIRLA Y SENTIRLA**

**A ANDREI, POR TU AMOR Y APOYO INCONDICIONAL**

**A MIS PADRES, POR SU EJEMPLO Y ENSEÑANZAS**

**A MIS HERMANAS PEPIN, COSI Y LIZ, PORQUE SIEMPRE CREYERON EN MI**

**A MIS SOBRINOS MARIANA, TOÑO Y MAJO, CON MUCHO CARIÑO**

**A MIS CUÑADOS MANU, HUGO Y TOÑO**

**A MI CUÑADA NANESH**

**A MI SUEGRA, POR SU GRAN AYUDA**

## **AGRADECIMIENTOS**

**Agradezco en especial al Dr. Rogelio Hernández-Pando por su asesoría y apoyo durante todo mi doctorado .**

**Agradezco en al Dr. Fernando López Casillas por su asesoría en el desarrollo de este trabajo, por su apoyo y consejos.**

**Gracias al Dr. Ricardo Rosales por su asesoría en la selección, amplificación, purificación y titulación de los adenovirus, fue pieza clave en la realización de este proyecto.**

**Gracias a Valentín Mendoza Rodríguez, por su ayuda en la producción de los adenovirus y por su amistad incondicional.**

**Agradezco a todos los integrantes y ex integrantes del laboratorio-202 ote del IFC y del laboratorio de Patología Experimental del INCMN. Por su apoyo, consejos y por compartir conmigo muchos días de trabajo. En especial agradezco a Alejandro Francisco, por su gran apoyo incondicional.**

**Gracias a los Doctores Clara Espitia Pinzón, José Luis Puente García, Fernando Esquivel Guadarrama, Maria Elena Ibarra Rubio y Gloria Soldevila Melgarejo, por sus valiosas sugerencias que definitivamente mejoraron la versión final de la tesis.**

**Agradezco a los miembros de mi comité tutorial, por asesorar el desarrollo de  
esta tesis, por su apoyo y valiosos comentarios**

**DR. FERNANDO LÓPEZ CASILLAS**

**DR. ROGELIO HERNÁNDEZ PANDO**

**DRA. MARIA ELENA IBARRA RUBIO**

**DR. FERNANDO ESQUIVEL GUADARRAMA**



ÍNDICE.....	i
ÍNDICE DE TABLA Y FIGURAS.....	vi
ABREVIATURAS.....	viii
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
<b>I. TUBERCULOSIS.....</b>	<b>3</b>
<b>1 ASPECTOS GENERALES DE LA TUBERCULOSIS.....</b>	<b>3</b>
<b>2. CARACTERÍSTICAS DE LAS MICOBACTERIAS.....</b>	<b>4</b>
<b>2.1. Clasificación.....</b>	<b>4</b>
<b>2.2. Morfología.....</b>	<b>5</b>
<b>2.3. Crecimiento.....</b>	<b>5</b>
<b>2.4. Cultivo.....</b>	<b>6</b>
<b>2.5. Reacción a los agentes físicos y químicos.....</b>	<b>6</b>
<b>2.6. Constituyentes del bacilo tuberculoso.....</b>	<b>6</b>
2.6.1. Membrana.....	7
2.6.2. Pared celular.....	7
2.6.3. Cápsula.....	8
<b>3. RESPUESTA INMUNE CONTRA <i>M. tuberculosis</i>.....</b>	<b>9</b>
<b>3.1. Respuesta inmune innata.....</b>	<b>9</b>
3.1.1. Neutrófilos.....	9
3.1.2. Mastocitos.....	10
3.1.3. Macrófagos.....	10
3.1.4. Células dendríticas.....	13

## ÍNDICE

---

---

3.1.5. Células “natural killer”.....	14
3.1.6. Células T NK restringidas a CD1d.....	14
3.1.7. Células epiteliales.....	15
3.1.8. Defensinas.....	15
<b>3.2. Respuesta inmune adquirida.....</b>	<b>16</b>
3.2.1. Respuesta inmune celular.....	16
3.2.2. Células T $\gamma/\delta$ .....	17
3.2.3. Respuesta inmune humoral.....	17
<b>4. INFECCIÓN PRIMARIA.....</b>	<b>17</b>
<b>5. REACTIVACIÓN DE LA TUBERCULOSIS.....</b>	<b>18</b>
<b>6. TRATAMIENTO.....</b>	<b>19</b>
<b>II. TERAPIA GÉNICA.....</b>	<b>19</b>
1. ASPECTOS GENERALES.....	19
2. CASOS DE TERAPIA GÉNICA EN HUMANOS.....	21
<b>III. ADENOVIRUS.....</b>	<b>23</b>
1. CLASIFICACIÓN.....	23
2. CARACTERÍSTICAS.....	24
3. ADHESIÓN, PENETRACIÓN Y PÉRDIDA DE LA CÁPSIDE.....	27
4. REPLICACIÓN.....	29
5. MECANISMOS DE EVASIÓN DE LOS ADENOVIRUS.....	30
6. ADENOVIRUS, COMO VECTORES PARA TERAPIA GÉNICA.....	30
7. RESPUESTA INMUNE EN CONTRA DE LOS VECTORES ADENOVIRALES.....	33

<b>IV. EL INTERFERÓN GAMMA.....</b>	<b>34</b>
<b>1. ASPECTOS GENERALES DE LOS INTERFERONES.....</b>	<b>34</b>
<b>2. ESTRUCTURA BIOQUÍMICA Y SÍNTESIS DEL IFN<math>\gamma</math>.....</b>	<b>35</b>
<b>3. CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS Y GENÉTICAS DEL RECEPTOR DE IFN<math>\gamma</math>.....</b>	<b>37</b>
<b>4. TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES .....</b>	<b>40</b>
<b>5. ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DEL IFN<math>\gamma</math> Y SU PAPEL PATOFISIOLÓGICO.....</b>	<b>42</b>
<b>6. INACTIVACIÓN GENÉTICA Y MUTACIONES EN IFN<math>\gamma</math>, IFN<math>\gamma</math>R1 E IFN<math>\gamma</math>R2 EN LOS RATONES Y EN LOS HUMANOS.....</b>	<b>44</b>
<b>7. TERAPIA CON IFN<math>\gamma</math> O ANTI-IFN<math>\gamma</math> EN MODELOS ANIMALES.....</b>	<b>46</b>
<b>8. TERAPIA CON IFN<math>\gamma</math> EN LOS HUMANOS.....</b>	<b>48</b>
<b>ANTECEDENTES.....</b>	<b>50</b>
<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....</b>	<b>53</b>
<b>HIPÓTESIS.....</b>	<b>54</b>
<b>OBJETIVO GENERAL .....</b>	<b>54</b>
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....</b>	<b>54</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>55</b>
<b>I. GENERACIÓN DE ADENOVIRUS RECOMBINANTES QUE CODIFICAN A IFN<math>\gamma</math> MURINO.....</b>	<b>55</b>
<b>1. EXPANSIÓN DE LA CLONA SELECCIONADA PARA UTILIZAR COMO SEMILLA EN LA PRODUCCIÓN DE “STOCKS” ADENOVIRALES DE TÍTULO ALTO .....</b>	<b>56</b>
<b>2. PRODUCCIÓN DE TÍTULOS ALTOS DE AdIFN<math>\gamma</math> Y AdGFP.....</b>	<b>57</b>

3. TITULACIÓN POR INMUNOCITOQUÍMICA DE ADENOVIRUS RECOMBINANTES DE TÍTULO ALTO .....	58
II. DETERMINACIÓN DE LA SECRECIÓN $IFN\gamma$ Y BIOACTIVIDAD EN LOS SOBRENADANTES DE CÉLULAS Mv1Lu INFECTADAS CON EL ADENOVIRUS RECOMBINANTE.....	59
1. ELISA PARA DETERMINAR LA CONCENTRACIÓN DE $IFN\gamma$ .....	59
2. WESTERN BLOT.....	60
3. DETERMINACIÓN DE NITRITOS POR EL MÉTODO DE GRIESS.....	60
III. DETERMINACIÓN DE LA INFECCIÓN CON DIFERENTES DOSIS DE Ad $IFN\gamma$ Y LA EXPRESIÓN GENÉTICA DEL $IFN\gamma$ EN LOS PULMONES DE RATONES POR PCR CONVENCIONAL.....	61
IV. MODELO EXPERIMENTAL DE LA TUBERCULOSIS PULMONAR PROGRESIVA EN RATONES BALB/C.....	62
V. DETERMINACIÓN DE LAS UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS EN PULMONES INFECTADOS.....	64
VI. PREPARACIÓN DE TEJIDO PARA EL ESTUDIO HISTOLÓGICO/MORFOMÉTRICO E INMUNOHISTOQUÍMICA.....	65
1. INMUNOHISTOQUÍMICA.....	65
VII. RT-PCR Y ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE CITOCINAS, CCL-2 E INOS POR PCR EN TIEMPO-REAL EN HOMOGÉNADOS DE PULMÓN.....	66

## ÍNDICE

---

---

1. <b>EXTRACCIÓN DE RNA DE HOMOGENÁDOS DEL PULMÓN</b> .....	66
2. <b>PCR EN TIEMPO REAL</b> .....	67
<b>VIII. ANÁLISIS DE CITOMETRÍA DE FLUJO</b> .....	69
<b>ESTADÍSTICA</b> .....	69
<b>RESULTADOS</b> .....	70
<b>I. CINÉTICA DE LA PRODUCCIÓN ADENOVIRAL</b> .....	70
<b>II. ANÁLISIS IN VITRO E IN VIVO DE LA CAPACIDAD DE AdIFN<math>\gamma</math> PARA INFECTAR CÉLULAS Y PARA SECRETAR IFN<math>\gamma</math> CON ACTIVIDAD BIOLÓGICA EFICIENTE</b> .....	70
<b>III. ACTIVIDAD TERAPÉUTICA DE AdIFN<math>\gamma</math> EN RATONES BALB/C INFECTADOS CON LA CEPA H37Rv DE <i>M. tuberculosis</i> Y SU EFECTO CUANDO SE ADMINISTRA EN COMBINACIÓN CON LA QUIMIOTERAPIA CONVENCIONAL</b> .....	80
<b>IV. EFECTO TERAPÉUTICO DE AdIFN<math>\gamma</math> EN RATONES BALB/C INFECTADOS CON UN AISLADO CLÍNICO MULTIDROGORESISTENTE DE <i>M. tuberculosis</i></b> .....	91
<b>DISCUSIÓN</b> .....	97
<b>CONCLUSIONES</b> .....	106
<b>PERSPECTIVAS</b> .....	106
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	107
<b>ARTÍCULO</b> .....	115

## ÍNDICE DE TABLA Y FIGURAS

---

---

Tabla 1. Efectos de la terapia con el IFN $\gamma$ en modelos experimentales y en humanos.....	47
Figura 1. Estructura del adenovirus.....	25
Figura 2. Infección viral.....	28
Figura 3. Cinética de la producción adenoviral.....	71
Figura 4. Los adenovirus recombinantes que codifican al IFN $\gamma$ inducen la secreción de la citocina con actividad biológica eficiente.....	72
Figura 5. Cinética de la expresión de IFN $\gamma$ en ratones sanos infectados con diferentes dosis de adenovirus recombinantes.....	74
Figura 6. Los adenovirus recombinantes, AdIFN $\gamma$ , inducen la expresión de RNAm de IFN $\gamma$ y TNF $\alpha$ <i>in vivo</i> en ratones sanos.....	76
Figura 7. Los adenovirus recombinantes causan inflamación pulmonar y hepática moderada.....	77
Figura 8. Los adenovirus recombinantes inducen una infección eficiente en las células del epitelio bronquial y algunos macrófagos .....	79
Figura 9. Efecto terapéutico de una sola administración de AdIFN $\gamma$ , sobre el número de UFC en los pulmones de ratones infectados con <i>M. tuberculosis</i> de la cepa H37Rv.....	81
Figura 10. Histopatología representativa del pulmón de ratones tratados con adenovirus recombinantes, después de dos meses de la infección con <i>M. tuberculosis</i> de la cepa H37Rv.....	82

## ÍNDICE DE TABLA Y FIGURAS

---

---

Figura 11. Morfometría de pulmones de ratones infectados con <i>M. tuberculosis</i> de la cepa H37Rv, tratados con una sola dosis de AdIFN $\gamma$ , AdGFP, tratamiento combinado y sólo con quimioterapia.....	83
Figura 12. Inmunohistoquímica para la detección de adenovirus en los granulomas.....	85
Figura 13. Inmunohistoquímica para la detección de IFN $\gamma$ en pulmones de ratones tuberculosos tratados con adenovirus recombinantes.....	86
Figura 14. Efecto de una sola administración de AdIFN $\gamma$ sobre la expresión de citocinas y CCL2, en pulmones de ratones infectados con la cepa H37Rv de <i>M. tuberculosis</i> .....	88
Figura 15. Determinación de los subtipos de células T CD4 <sup>+</sup> y CD8 <sup>+</sup> en los homogenados de pulmón de ratones infectados con H37Rv, tratados con adenovirus recombinantes.....	85
Figura 16. Efecto terapéutico de una sólo administración de AdIFN $\gamma$ , sobre el número de UFC, en los pulmones de ratones infectados con un aislado multi-drogoresistente de <i>M. tuberculosis</i> .....	92
Figura 17. Morfometría de pulmones de ratones infectados con un aislado clínico MDR de <i>M. tuberculosis</i> .....	93
Figura 18. Histopatología representativa del pulmón de ratones tuberculosos, tratados con adenovirus recombinantes, después de dos meses de la infección con un aislado clínico MDR.....	94
Figura 19. Efecto de una sola administración de AdIFN $\gamma$ sobre la expresión de citocinas y CCL2, en los pulmones de ratones infectados con un aislado clínico MDR de <i>M. tuberculosis</i> .....	95

**a.a.**, aminoácidos

**AdEasy-1**, plásmido con el genoma adenoviral

**AdGFP**, adenovirus recombinante que codifica a GFP

**AdIFN $\gamma$** , adenovirus recombinante que codifica a IFN $\gamma$

**AdIFN $\gamma$ R**, adenovirus que codifica al receptor de IFN $\gamma$

**Adtrack-CMV**, plásmido de transporte

**APC**, célula presentadora de antígeno

**BSA**, "bovine serum albumin"

**CAR**, "coxsackie- adenovirus receptor"

**CD4+**, marcador de linfocitos T CD4+

**CD8+**, marcador de linfocitos T CD8+

**cDNA**, DNA complementario

**CTL's**, linfocitos T citolíticos

**DAB**, diaminobencidina

**DMEM**, "Dulbecco's modified Eagle's medium"

**FBN III**, fibronectina tipo III

**ELISA**, ensayo inmunoabsorbente unido a enzimas

**GAS**, secuencia activada por interferon  $\gamma$

**GFP**, "Green fluorescent protein"

**G3PDH**, gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa

**HBSS**, "Hank Buffer Salt Solution"

**IFN $\gamma$** , interferón gamma

**IFN $\gamma$ R**, receptor de interferón gamma

**IgG**, inmunoglobulinas

**IL**, interleucina

**iNOS**, óxido nítrico sintasa inducible

**IP-10**, proteína-10 kda inducida por IFN $\gamma$

**IRF-1**, factor regulatorio de interferón -1

**ISRE**, elemento de respuesta estimulado por el IFN $\gamma$

**ITR**, repeticiones terminales invertidas

## ABREVIATURAS

---

**Jak** , tirosina cinasa janus  
**LAM**, lipoarabinomanana  
***M. tuberculosis***, *Mycobacterium tuberculosis*  
**MDR**, multidrogoresistente  
**MHC I ó II**, Complejo principal de histocompatibilidad clase I o II  
**MOI**, índice de multiplicidad de infección  
**Mv1Lu**, células epiteliales de pulmón  
**NFκB**, factor nuclear-κB  
**NK**, “natural killer”  
**NO**, óxido nítrico  
**OTC**, ornitina transcarbamilasa  
**PBS**, “phosphate buffered saline”  
**PFU**, unidades formadores de placas  
**pTP**, precursor de la proteína terminal  
**RNA m**, RNA mensajero  
**RNI**, intermediarios reactivos del nitrógeno  
**RPMI**, “Roswell Park Memorial Institute Medium”  
**RT-PCR**, transcripción reversa-reacción en cadena de la polimerasa  
**SFB**, “Serum fetal bovine”  
**SOCS**, “suppressor of cytokine signaling”  
**Stat**, transductores de señales y activadores de la transcripción  
**tb**, tuberculosis  
**TGFβ**, factor de crecimiento transformante beta  
**Th1**, linfocitos T cooperadores 1  
**Th2**, linfocitos T cooperadores 2  
**TLR**, “Toll like receptor”  
**TNFα**, factor de necrosis tumoral alfa  
**TP**, proteína terminal  
**UFC**, unidades formadores de colonias  
**VIH**, virus de la inmunodeficiencia humana

El interferón gamma es una citocina clave en la defensa contra la tuberculosis. Para este estudio, construimos un adenovirus recombinante que codifica a IFN $\gamma$  murino (AdIFN $\gamma$ ) y se evaluó su eficiencia terapéutica en un modelo de tuberculosis pulmonar progresiva. Para ello, se infectaron ratones BALB/c por vía intratraqueal, con altas dosis de *Mycobacterium tuberculosis* de la cepa H37Rv o con un aislado clínico correspondiente a una cepa multidrogoresistente. Cuando la enfermedad estaba en la fase progresiva, dos meses después de la infección, se inoculó por vía intratraqueal una dosis de  $1.7 \times 10^9$  unidades formadoras de placas de AdIFN $\gamma$  o el adenovirus control. Posteriormente, los grupos de ratones se sacrificaron a diferentes tiempos y en los pulmones se determinaron: las unidades formadoras de colonias, la histo-morfometría automatizada, la expresión génica de citocinas, así como de iNOS y CCL2 por PCR en tiempo-real y la determinación de subpoblaciones de T CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>. En comparación con los ratones control, después de dos semanas de tratamiento y durante los siguientes 6 meses, los ratones tratados con AdIFN $\gamma$  e infectados con la cepa H37Rv o con la cepa MDR presentaron significativamente menor carga bacilar y menos tejido dañado, con mayor expresión de IFN $\gamma$ , factor de necrosis tumoral alfa y la óxido nítrico sintasa inducible, en coexistencia con granulomas más grandes. Cuando se administraron AdIFN $\gamma$  más antibióticos convencionales, la carga bacilar fue menor que en los ratones tratados con antibióticos convencionales o sólo con AdIFN $\gamma$ . Por lo tanto, la terapia génica con AdIFN $\gamma$  reconstituye eficientemente la respuesta inmune protectora y controla la tuberculosis pulmonar progresiva producida por cepas MDR y no MDR de *M. tuberculosis*.

## ABSTRACT

---

---

We constructed recombinant adenoviruses encoding murine interferon- $\gamma$  (AdIFN $\gamma$ ) and tested its therapeutic efficiency in a well characterized model of progressive pulmonary tuberculosis in BALB/c mice, infected through the trachea with the laboratory drug-susceptible H37Rv strain or multidrug-resistant clinical isolate. When the disease was in late phase, two months after infection, we administered by intratracheal cannulation a single dose ( $1.7 \times 10^9$  pfu) of AdIFN $\gamma$  or the control adenovirus (AdGFP). Then, groups of mice were killed at different times and the lungs were used to determine bacilli colony forming units, automated histo-morphometry, cytokine/iNOS/CCL-2 gene expression and CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> subpopulations. In comparison with the control group, after 2 weeks of treatment and during six months, AdIFN $\gamma$  treated animals infected with either the H37Rv strain or the MDR strain showed significantly lower bacilli loads and tissue damage (pneumonia), higher expressions of interferon- $\gamma$ , tumor necrosis factor, and inducible nitric oxide synthase, in coexistence with bigger granulomas. When compared with conventional chemotherapy or AdIFN $\gamma$  treatment alone, combined treatment with AdIFN $\gamma$  plus conventional chemotherapy reduced the bacillary loads. Thus, gene-therapy with AdIFN $\gamma$  efficiently reconstituted the protective immune response and controlled progressive pulmonary tuberculosis produced by MDR or non-MDR strains.

## INTRODUCCIÓN

### ***I. TUBERCULOSIS***

#### ***1. ASPECTOS GENERALES DE LA TUBERCULOSIS***

En 1882, Roberto Koch descubrió el bacilo tuberculoso, cumpliendo por completo los criterios que él había desarrollado (los postulados de Koch) para identificar el agente etiológico de cualquier enfermedad infecciosa. Esta enfermedad se presenta en países en vías de desarrollo en donde los componentes sociológicos como la pobreza, el hacinamiento y la desnutrición juegan un papel importante.

La mayoría de las infecciones por el bacilo tuberculoso se contraen por vía pulmonar a través de la inhalación de gotitas con bacilos, aunque la micobacteria puede causar enfermedad en la mayoría de los órganos, la tuberculosis (tb) pulmonar es la más común (Flynn, 2001). El ser humano puede también infectarse por el tubo digestivo al ingerir la leche de vacas tuberculosas, o por la piel erosionada. Los datos epidemiológicos indican que se requieren de grandes dosis o exposición prolongada de pequeñas dosis para que se inicie la infección en humanos. En algunos ambientes cerrados como asilos o cárceles, con gran hacinamiento, un solo caso de tb pulmonar puede infectar a la mayoría de las personas, la enfermedad puede mantenerse latente en aquellas personas inmunocompetentes y desarrollarse en individuos inmunocomprometidos (Sherris, 2005).

La tb es uno de los principales problemas de salud pública, con casi 1.5 millones de muertes anuales y una tercera parte de la población mundial infectada pero

asintomática (infección latente). En países desarrollados, la tb es una enfermedad infecciosa re-emergente, mientras que en naciones en desarrollo la tb es un problema devastador de salud (North, 2004). La incidencia de tb varía de 7/100,000 en el norte de Europa a 300/100,000 en varias partes de África. En el este de Europa, la incidencia de tb ahora excede de 100/100,000, con una alta proporción de cepas multidrogoresistentes (MDR).

## **2. CARACTERÍSTICAS DE LAS MICOBACTERIAS**

Las micobacterias del género *Mycobacterium* son bacilos aerobios obligados, inmóviles, no esporulados y de crecimiento lento. Para teñirlos se utiliza la técnica de Ziehl-Neelsen y aunque se tiñen con dificultad, una vez teñidos resisten a la decoloración con alcohol-ácido (95%-3%) por lo que se les denomina bacilos “ácido-alcohol resistentes”. Ésto se debe a que poseen una pared celular abundante en lípidos, por ésta característica, también son resistentes a la destrucción con ácidos y bases, así como al daño por antibióticos (Barrera, 2007).

### **2.1. Clasificación**

Las micobacterias se han clasificado dentro del reino de las bacterias (monera), del filo de las actinobacterias, de la clase actinobacterias, de la subclase actinobacteridae, del orden de los actinomycetales, del suborden corynebacterineae, de la familia Mycobacteriaceae, del género *Mycobacterium*, conteniendo diferentes especies como *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. canettii*, *M. caprae* y *M. pinnipedii* (Barrera, 2007).

Las bacterias que producen la tb tienen distintos hospederos. Por ejemplo, *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum* y *M. canettii* son patogénicos en humanos, así mismo *M. bovis* y *M. microti* causan tb en bovinos y pueden transmitir la enfermedad a los humanos (Brooks, 2002).

### **2.2. Morfología**

Las micobacterias son bacilos ligeramente curvos, de 2-10  $\mu\text{m}$  de longitud y 0.2-0.6  $\mu\text{m}$  de ancho. Su longitud es comparable al diámetro del núcleo de un linfocito (Barrera, 2007).

### **2.3. Crecimiento**

Las micobacterias son aerobias estrictas y su energía la obtienen de la oxidación de compuestos simples de carbono. La característica lipídica de su pared celular, contribuye al crecimiento lento, debido a la restricción en la captación de nutrientes. El tiempo de duplicación del bacilo es de 18 horas, sin embargo el aumento en la tensión del  $\text{CO}_2$  y el pH de 6.5-6.8, aumenta su crecimiento (Barrera, 2007).

Las especies del género *Mycobacterium* presentan una gran diversidad, desde las no patógenas que viven y se replican libremente en ecosistemas naturales hasta las estrictamente intracelulares como *M. leprae* y *M. lepraemurium*, que no crecen ni en medio artificial ni en cultivo celular, requieren de un medio intracelular para su sobrevivencia y propagación. En contraste, las bacterias que conforman el complejo de *M. tuberculosis* sí se pueden reproducir *in vitro* (Barrera, 2007).

### **2.4. Cultivo**

Se utiliza un agar semisintético (middlebrook 7H10 y 7H11), que contiene sales de amonio, ácido oleico, albúmina, catalasa, biotina, glicerol, glucosa y verde de malaquita. Cada componente tiene una función especial, por ejemplo, la biotina y la catalasa estimulan el crecimiento de los bacilos que provienen de aislados clínicos. Las sales de amonio, el glicerol y la glucosa funcionan como fuentes de nitrógeno y carbono, respectivamente. Cuando las micobacterias se cultivan, se utiliza el tween 80, un detergente que permite que las micobacterias crezcan de forma más rápida y dispersa, al humedecer la superficie de los bacilos (Sherris, 2005). La albúmina, une el exceso de oleato que es tóxico para el crecimiento de la micobacteria y es un derivado del tween (Barrera, 2007).

### **2.5. Reacción a los agentes físicos y químicos**

Las micobacterias son resistentes a agentes químicos como los ácidos, los álcalis y al cetil-piridinio de sodio (reactivo que se utiliza para preservar muestras de esputo). Esta resistencia se debe a su pared celular abundante en lípidos y su crecimiento en grumos (Barrera, 2007). Los bacilos de la tuberculosis sobreviven por períodos prolongados en esputo seco y *M. tuberculosis* tolera baja tensión de oxígeno. Son sensibles al calor, rayos ultravioleta y fenol (Sherris, 2005).

### **2.6. Constituyentes del bacilo tuberculoso**

Las micobacterias se caracterizan por tener un alto contenido (61-71%) de guanina más citosina en su DNA, y un alto contenido de lípidos que constituyen más de

la mitad del peso seco de la micobacteria (de hasta el 60%). La composición de lípidos en el bacilo puede variar durante el ciclo de vida, dependiendo de la disponibilidad de los nutrientes (Barrera, 2007). Las micobacterias poseen membrana, pared celular y cápsula, a continuación se describen cada una de ellas:

### **2.6.1. Membrana**

La membrana celular tiene las características biológicas y bioquímicas de cualquier membrana, aunque en las micobacterias los fosfolípidos se caracterizan por ser altamente glicosilados, como las lipoarabinomananas (LAM), además tiene, proteínas y enzimas. Por ejemplo, posee proteínas acarreadoras que permiten el transporte selectivo de nutrientes e iones y tiene enzimas involucradas en la generación de energía y en el metabolismo.

### **2.6.2. Pared celular**

La membrana está rodeada por la pared celular, que es la responsable de la integridad estructural y de dar forma a las bacterias. La pared celular de las micobacterias es única entre los procariotes, por su alto entrecruzamiento entre el péptidoglicano. Se localiza por debajo de la cápsula separada por un espacio periplásmico, posee una capa interna y una capa externa (Gorocica, 2005). La capa interna está formada por peptidoglicano, cuyo porcentaje de entrecruzamiento para *M. tuberculosis* es de 70-80% comparado con *Escherichia coli* que presenta un 20-30% de entrecruzamiento. El peptidoglicano se une covalentemente a polisacáridos de cadenas ramificadas, principalmente al arabinogalactano, que está esterificado por ácidos grasos

de cadena larga llamados ácidos micólicos (ácidos grasos que tienen entre 60 y 90 átomos de carbono), en conjunto forman el micolil-arabinogalactano-peptidoglicano que es esencial para *M.tuberculosis* y otras micobacterias. Los ácidos micólicos, de cuyo nombre se deriva el de las micobacterias, tienen un papel importante en la estructura de la pared celular, ya que le confieren un papel hidrofóbico a la pared celular y la hace refractaria al ataque por hidrólisis enzimática (Gorocica, 2005). Los ácidos micólicos específicos de *M. tuberculosis* son alfa, ceto y metoximicolatos que contienen 76 a 82, 84 a 89 y 83 a 90 carbonos respectivamente.

La capa externa de la pared celular está constituida por lípidos como dimicoserosato, glicolípidos fenólicos, trehalosa y sulfolípidos, la composición de los lípidos varía dependiendo de la especie. La pared celular también posee proteínas, entre ellas, están las porinas que forman canales hidrofílicos a través de la capa constituida por ácidos micólicos (Barrera, 2007).

Algunos glicolípidos, como el fosfatidil-mio-inositol manosido, la lipomanana y la LAM, están anclados desde la membrana plasmática y se extienden hacia el exterior de la pared celular.

### **2.6.3. Cápsula**

La cápsula es la capa externa de la envoltura de las micobacterias y protege contra factores externos, tiene una interacción directa con los elementos de la respuesta inmune. Sus características y composición varían entre especies de micobacterias, esta constituida por proteínas, polisacáridos, ácidos micólicos y glicolípidos (Gorocica, 2005). En cultivos líquidos estáticos, *M. tuberculosis* parece

acumular una pseudo-cápsula y cuando el medio se mueve, ésta se separa, dejando la superficie lipofílica expuesta (Sherris, 2005).

### **3. RESPUESTA INMUNE CONTRA *M. tuberculosis***

La respuesta inmune innata y celular es importante en el control de la infección por *M. tuberculosis*. A continuación se describen los mecanismos particulares de las células involucradas. Como se verá, algunas células participan en el control de la infección desde el inicio y hasta que ésta se limita.

#### **3.1. Respuesta inmune innata**

##### **3.1.1. Neutrófilos**

Las principales células que infecta *M. tuberculosis* son los macrófagos, aunque también infecta neutrófilos. Éstas, son células que se reclutan al principio de la infección en los sitios donde el patógeno entra al organismo o en donde hay señales de inflamación. Poseen mecanismos microbicidas dependientes de oxígeno; también contribuyen al control de la infección al secretar quimiocinas, lo que ayuda a la formación de los granulomas (Hernández-Pando, 2007). En el modelo murino de tb pulmonar, los neutrófilos se detectaron al principio y varios días después de la infección. Se cree que tienen un papel importante en el control del crecimiento micobacteriano, ya que cuando los neutrófilos se eliminan antes de la infección, el crecimiento micobacteriano aumenta en los pulmones. Así mismo, en ratones tratados con un agente que aumenta el número de neutrófilos, la carga bacilar disminuye (Hernández-Pando, 2007).

### **3.1.2. Mastocitos**

La activación de los mastocitos en la tb, (células efectoras relevantes en las reacciones alérgicas y críticas para el desarrollo de respuestas Th2) es por la interacción entre las IgE y el antígeno, así como por productos microbianos que estimulan a los mastocitos a través de los “Toll like receptors” (TLR’s), TLR-2 y TLR-4 (Hernández-Pando, 2007). Los mastocitos, tienen un papel fundamental en la defensa del hospedero contra la micobacteria y son mediadores de la respuesta inflamatoria. Los primeros reportes de mastocitos e infección con *M. tuberculosis* mostraron un incremento en el número de mastocitos y su degranulación en pulmones de ratones infectados. La interacción entre mastocitos y *M. tuberculosis* es a través de la molécula CD48, potenciando la liberación de mediadores preformados, tal como la histamina, la  $\beta$ -hexosamidasa y la liberación de citocinas sintetizadas *de novo*, tal como (interleucina-6) IL-6 y factor de necrosis tumoral alfa ( $TNF\alpha$ ), las cuales están involucradas en la activación de neutrófilos y el mantenimiento de la integridad del granuloma, respectivamente (Hernández-Pando, 2007). Las proteínas secretadas por *M. tuberculosis* MTSA-10 y ESAT-6, contribuyen a la activación de macrófagos, de células dendríticas y de los mastocitos para la liberación de mediadores pro inflamatorios (Hernández-Pando, 2007).

### **3.1.3. Macrófagos**

Los macrófagos alveolares, juegan un papel clave en la eliminación de partículas que entran al organismo a través de las vías aéreas y es la primera población celular con la cual la micobacteria interacciona.

## INTRODUCCIÓN

---

Las micobacterias pueden ser opsonizadas con moléculas del complemento C3b, inmunoglobulinas (IgG), proteínas de unión a manosa, así como por el factor surfactante A. Las bacterias opsonizadas son fagocitadas por macrófagos de forma eficiente (Gorocica, 2005).

Los resultados *in vitro* sugieren que la respuesta del macrófago depende del tipo de receptor con el cual la bacteria interactúa; por ejemplo, la fagocitosis de la micobacteria opsonizada con IgG es a través de los receptores del FcR $\gamma$  del macrófago, esta vía de entrada, aumenta la producción de los intermediarios reactivos de oxígeno y permite la fusión de los fagosomas que contienen a las bacterias con los lisosomas. De forma contraria, la interacción de la bacteria con el receptor 3 del complemento (CR3) previene el estallido respiratorio y bloquea la maduración de los fagosomas previniendo la fusión con los lisosomas. La familia de los TLR, que forma parte de la respuesta inmune innata interacciona directamente con la micobacteria. TLR-2 y TLR-4 son activados por varios componentes de *M. tuberculosis*. Por ejemplo, la lipoproteína de 19-kDa y la LAM activan a los macrófagos a través de TLR-2, promoviendo la producción de IL-12 y la iNOS (Flynn, 2001; Hernández-Pando, 2007). El TLR-4 reconoce a la glicolipoproteína de 38 KDa, induciéndose un perfil protector de citocinas y óxido nítrico que ayudan a la eliminación de las micobacterias.

Se ha observado que el colesterol presente en la membrana de los macrófagos es una molécula esencial para la internalización de la bacteria, ya que actúa como un sitio de anclaje y de ésta forma la bacteria es eficientemente internalizada. Una vez que las bacterias entran al macrófago, se localizan en los fagosomas micobacterianos, estructuras que derivan de la membrana plasmática y presentan receptores celulares de

## INTRODUCCIÓN

---

---

superficie (Hernández-Pando, 2007). En contraste a la fagocitosis normal, en la cual el contenido es degradado a través de la fusión con los lisosomas, la micobacteria bloquea este proceso. Las vacuolas en donde la bacteria reside hay endosomas tempranos en vez de los tardíos, estos fagosomas micobacterianos mantienen marcadores tempranos como Rab5 y las GTPasa Rab14, esto evita la maduración del endosoma temprano hacia el tardío (Hernández-Pando, 2007). La micobacteria inhibe la maduración del fagosoma a través de la retención de la proteína TACO (tryptophan aspartate-containing coat) presente en los fagosomas. Los fagosomas micobacterianos tienen limitada acidificación, evitan la asociación física con iNOS y de esta manera la micobacteria evita ser eliminada. La inhibición de la maduración del fagosoma por la micobacteria puede ser revertida por citocinas, como el IFN $\gamma$  y el TNF- $\alpha$ , las cuales actúan en sinergia estimulando los mecanismos microbicidas, que incluyen la producción de intermediarios reactivos de oxígeno y del nitrógeno (Hernández-Pando, 2007).

El papel protector de los intermediarios del nitrógeno, ha sido demostrado en distintos modelos murinos y parece tener una función similar en los humanos. El peróxido de hidrógeno, producido por macrófagos activados tiene actividad micobactericida. La micobacteria, tiene moléculas como el LAM y glicolípido fenólico I, los cuales actúan como moléculas atrapadoras o “scavenger” de radicales de oxígeno (Flynn, 2001; Hernández-Pando, 2007).

### **3.1.4. Células dendríticas**

Están involucradas en la respuesta inmune protectora hacia la infección por *M. tuberculosis*. Las células dendríticas son reclutadas de la circulación sanguínea y también del tejido pulmonar, juegan un papel importante en la inmunidad protectora al estimular la presentación de antígeno (Hernández-Pando, 2007).

Las células dendríticas reconocen, capturan, procesan antígenos y los presentan en el contexto de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad, así como a través de CD1. Las células dendríticas unen antígeno vía los receptores de lectina tipo C y los receptores  $Fc\gamma/Fc\epsilon$ , los cuales son internalizados por endocitosis.

La endocitosis de *M. tuberculosis* se lleva a cabo a través de receptores de lectina tipo C, específicamente por el DC-SIGN. Ésta molécula interacciona con un componente de la pared celular de la micobacteria (LAM). Las células dendríticas inmaduras y las de sangre periférica expresan TLR-2 y TLR-4, receptores que reconocen a la micobacteria. Por lo tanto, la respuesta protectora puede estar dada por esos receptores. Las señales generadas por LAM de la micobacteria y DC-SIGN inducen la producción de IL-10, en las células dendríticas, mientras que la unión de la lipoproteína de 19 kDa de *M. tuberculosis* con el TLR-2 induce la producción de IL-12, TNF- $\alpha$  e IL-6 (Hernández-Pando, 2007). Una vez que los antígenos micobacterianos ya han sido capturados e internalizados, las células dendríticas se convierten en maduras y migran hacia los ganglios linfáticos, donde se lleva a cabo la presentación de antígeno a los linfocitos T. La maduración de las células dendríticas está acompañada por el incremento en la síntesis de moléculas de MHC clase I y II, de moléculas co-estimuladoras como CD80, CD86 y de la producción de IL-12, lo que las hace mejor

presentadoras de antígeno. Además, las células dendríticas inducen la maduración de las células T hacia el perfil Th1 a través de la secreción de citocinas como IL-12, IL-18, IL-23 e IFN- $\gamma$  (Hernández-Pando, 2007).

Cuando las células dendríticas derivadas de monocitos son infectadas con *M. tuberculosis* de la cepa Beijing, la capacidad de presentación de antígenos lipídicos se afecta y la expresión de CD1 disminuye, debido a que componentes de la pared celular de la micobacteria inhiben la maduración de células dendríticas (Hernández-Pando, 2007).

### **3.1.5. Células "natural killer"**

Las células "natural killer" (NK), se caracterizan por tener un papel relevante en el desarrollo de la respuesta inmune innata, son citotóxicas hacia las células blanco y son de las primeras poblaciones de la respuesta inmune que producen IFN- $\gamma$ . Sin embargo, en los ratones infectados con *M. tuberculosis*, la depleción de las células NK, no influye en la disminución de la carga bacteriana. En cambio en la tb humana, las NK parecen tener un papel importante, ya que potencian su citotoxicidad hacia los macrófagos infectados con *M. tuberculosis*; también optimizan la capacidad de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> para producir IFN- $\gamma$  (Hernández-Pando, 2007).

### **3.1.6. Células T NK restringidas a CD1d**

Son el único subtipo de células T NK humanas caracterizadas por la expresión de un receptor que reconoce moléculas no clásicas CD1d. Los macrófagos derivados de monocitos humanos que expresan CD1d, pueden inducir funciones efectoras de

células T NK contra células infectadas con *M. tuberculosis*, cuando se activan con alfa-galactosilceramida. Dentro de esas funciones están la secreción de IFN- $\gamma$ , la proliferación, la actividad lítica y la actividad anti-micobacteriana (vía el péptido granulicina que daña la superficie micobacteriana). En los granulomas de pacientes con tb se han detectado células que expresan CD1d (Hernández-Pando, 2007).

### **3.1.7. Células epiteliales**

El número de células epiteliales en los alvéolos es 30 veces mayor que el número de macrófagos, también están en contacto directo con los bacilos y tienen un papel relevante en el control de la tb, ya que son capaces de producir péptidos antimicrobianos y más tardíamente establecen ambientes proinflamatorios secretando IL-8 e induciendo óxido nítrico (Hernández-Pando, 2007).

### **3.1.8. Defensinas**

Son péptidos catiónicos antimicrobianos (30-50 aminoácidos) que están presentes en las células epiteliales, macrófagos y neutrófilos del reino animal. Las defensinas presentan actividades antibacterianas, antifúngicas y antivirales. Estas moléculas se han clasificado como defensinas alfa, beta y teta, esta clasificación se basa en la posición de los residuos de cisteína y el número de puentes disulfuro. En las células fagocíticas, las defensinas representan la principal forma de destrucción del microorganismo independiente del metabolismo de oxígeno (Hernández-Pando, 2007).

### **3.2. Respuesta inmune adquirida**

La respuesta inmune adquirida requiere del reconocimiento específico de los antígenos foráneos. La respuesta inmune adquirida puede ser dividida en mecanismos mediados por células T ó células B. Ambas células se complementan entre sí, pues las células T cooperadoras se requieren para la maduración de los linfocitos B y para el cambio de isotipo y memoria; de igual forma, las células B actúan como células presentadoras de antígeno para los linfocitos T (Hernández-Pando, 2007).

#### **3.2.1. Respuesta inmune celular**

En la respuesta inmune celular, los macrófagos presentan los antígenos micobacterianos en el contexto del MHC clase II a linfocitos T CD4<sup>+</sup> y los linfocitos son esenciales para el control de la tb, ya que en su ausencia el crecimiento bacilar no se controla; esto también se observa en pacientes infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). La principal función de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> es la producción de citocinas como IFN $\gamma$  que activa a macrófagos promoviendo la destrucción bacilar, también los linfocitos T CD4<sup>+</sup> ayudan al desarrollo de la respuesta mediada por linfocitos T CD8<sup>+</sup>. Además, los linfocitos T CD4<sup>+</sup> participan en la inducción de la apoptosis de células infectadas a través del sistema CD95 ligando de Fas. Los linfocitos T CD8<sup>+</sup> lisan a la bacteria utilizando perforina, granulicina, granzimas y también producen IFN $\gamma$  (Hernández-Pando, 2007).

### **3.2.2. Células T $\gamma/\delta$**

Existe una población de células T que expresan el receptor  $V\gamma 2V\delta 2+$  (denominadas  $V\delta 2+$  T) tienen características de células presentadoras de antígeno para los linfocitos T  $\alpha/\beta$ , secretan IL-17 e  $IFN\gamma$ . La IL-17 promueve el flujo de células hacia los sitios de infección, probablemente en respuesta a IL-23 secretado por células dendríticas infectadas con *M. tuberculosis*. Las células T  $\gamma/\delta$  forman parte de la inmunidad protectora, reconocen pequeños antígenos no peptídicos y son exclusivas de los primates superiores (Brandes, 2005; Lockhart, 2006).

### **3.2.3. Respuesta inmune humoral**

En la respuesta inmune humoral, los anticuerpos solos, o en conjunto con las citocinas, tienen funciones importantes en la prevención de la entrada de las bacterias en la superficie de las mucosas. Los anticuerpos son importantes en la protección a través del proceso de opsonización y en la activación del complemento, promoviendo la liberación de citocinas y por el mecanismo de citotoxicidad dependiente del anticuerpo (Hernández-Pando, 2007).

## **4. INFECCIÓN PRIMARIA**

La tb primaria, es la reacción a la infección inicial en una persona no infectada con anterioridad. Las gotitas inhaladas que contienen un número pequeño de bacilos, se depositan en los alveólos respiratorios periféricos. En este sitio, los macrófagos alveolares activados fagocitan de manera inespecífica; si los macrófagos no son capaces de destruir a las micobacterias ingeridas, éstas siguen replicándose. Los

macrófagos infectados se transportan por los vasos linfáticos hacia los ganglios linfáticos hiliares, de donde se diseminan por la sangre y linfa hacia el hígado, bazo, riñón, hueso, cerebro y meninges. Por medios radiológicos se puede detectar el sitio de la primoinfección. El huésped suele hacer frente de manera adecuada a las infecciones primarias, deteniéndose la replicación bacteriana pero permaneciendo viables durante períodos prolongados, representando fuentes potenciales de reactivación, si se deterioran las defensas del huésped (Sherris, 2005).

### **5. REACTIVACIÓN DE LA TUBERCULOSIS**

La mayoría de las personas infectadas por el bacilo tuberculoso (~90%) no desarrollan la enfermedad a través del tiempo, sin embargo, el riesgo de desarrollar la enfermedad aumenta considerablemente cuando la infección con tb coexiste con una deficiencia del sistema inmune. En el estado de latencia, la bacteria permanece en los macrófagos dentro de los granulomas, en los órganos del huésped infectado. Se cree que la micobacteria se mantiene en fase estacionaria con un metabolismo bajo, en un estado no replicativo, escondida del sistema inmunológico. (Hernández-Pando, 2007) Cuando hay un desequilibrio en el sistema inmunológico del huésped, la infección resurge, por ejemplo, en pacientes infectados con el VIH, bajo tratamiento con corticoesteroides, en personas con edad avanzada, por abuso de alcohol y drogas (Sherris, 2005; Flynn, 2001). Sólo el 10% de las personas infectadas con tb desarrollan la enfermedad clínica en algún momento de su vida. La reactivación ocurre en sitios del cuerpo con tensión de oxígeno elevada, de ahí que se manifiesta como una neumonía crónica con fiebre, tos, esputo sanguinolento y pérdida de peso (Sherris, 2005).

### **6. TRATAMIENTO**

*M. tuberculosis* es susceptible a diversos antimicrobianos eficaces. Los fármacos de primera línea son isoniacida, etambutol, rifampicina, piracinamida y estreptomicina en diversas combinaciones, todos ellos son bactericidas. Para los casos de multidrogoresistencia, se utilizan los fármacos de segunda línea como las fluoroquinolonas que actúan contra el bacilo y penetran en las células infectadas. La mayoría de estos fármacos son hepatotóxicos.

El tratamiento con dos o tres fármacos antituberculosos con diferentes modos de acción reduce la probabilidad de que se seleccione una cepa mutante. Los tratamientos actuales, se han reducido de 18 a 24 meses con isoniacida y etambutol a tratamientos de 9 meses cuando se sustituyen por isoniacida y rifampicina; se reducen a seis meses cuando se añade piracinamida como tercer fármaco. A los pacientes infectados con micobacterias resistentes a uno o más fármacos, o que experimentan infección con VIH, se tratan con fármacos de segunda línea con tiempos más prolongados.

La proporción de infecciones por cepas resistentes a los fármacos de primera línea varía de 5-15%, pero va en aumento sobre todo en aquellos pacientes que ya han sido tratados. El fracaso de la quimioterapia se relaciona con la falta de obediencia del paciente al régimen o a bacterias resistentes o a ambas cosas (Sherris, 2005).

## **II. TERAPIA GÉNICA**

### **1. ASPECTOS GENERALES**

La terapia génica consiste en la transferencia de material genético a las células de un individuo con el objetivo de obtener un beneficio terapéutico (Günzburg, 1995).

La terapia génica busca la efectividad y la especificidad del material genético que se transfiere. A pesar de los avances tecnológicos, se siguen buscando métodos de administración seguros y eficaces de la secuencia nucleotídica terapéutica.

Fillat (2004) ha clasificado en tres grupos las estrategias de manipulación genética con finalidad terapéutica:

1) *Adición génica*. Se introduce una copia correcta del gen funcional en el tejido, con niveles de expresión suficientes para que funcione adecuadamente. Esta estrategia es la más ampliamente utilizada y puede aplicarse a la mayoría de las enfermedades humanas.

2) *Supresión génica*. Anula o reduce la expresión de un gen específico; ha sido útil en enfermedades infecciosas bloqueando la acción del agente patógeno, y en cáncer al reducir la expresión de algunas proteínas.

3) *Corrección génica*. Corrige el gen alterado por el gen correcto. En teoría, se podría utilizar la recombinación homóloga para intercambiar el gen mutado por el gen correcto; sin embargo, este proceso es poco eficiente e inviable para su aplicación en terapia génica. La estrategia que ha tenido más éxito es la que permite el intercambio del nucleótido específico mutado (unidad defectuosa de la secuencia génica) por el nucleótido apropiado, dando lugar a una copia correcta del gen. Puede ser de gran utilidad en la corrección de enfermedades monogénicas, donde mutaciones puntuales en un único gen son las responsables de la enfermedad (Fillat, 2004).

Cuando el DNA/RNA es administrado *in vivo* tienen una biodisponibilidad limitada por barreras de tejido conectivo, epitelio vascular, barrera hemato-encefálica, proteínas inactivadoras (proteasas-nucleasas, proteínas con carga positiva que adsorben el DNA)

y el sistema inmunológico (sistema del complemento, respuesta inmune innata, celular y anticuerpos neutralizantes). Para optimizar la introducción del DNA en las células se requieren vehículos de transferencia o vectores que son los transportadores de las secuencias nucleotídicas terapéuticas.

Existen dos grupos de vectores que introducen el material genético a los tejidos blanco, ya sea para adicionar, suprimir o corregir secuencias: los vectores víricos y los no víricos. Entre los vectores víricos cabe destacar especialmente los derivados de retrovirus, lentivirus, adenovirus y virus adenoasociados. Los métodos no víricos son los liposomas de diversas composiciones, los conjugados moleculares y la transferencia directa de DNA purificado. Los vectores virales poseen la ventaja de transferir el DNA/RNA de forma más eficaz, sin embargo poseen mayor toxicidad. Los vectores no víricos son seguros y resulta más sencillo su elaboración, caracterización, manipulación y escalado, frente a los vectores víricos, sin embargo su eficacia es menor (Fillat, 2004; Alba, 2005). En el siguiente capítulo se describirá específicamente a los adenovirus por ser el vector que utilizamos en este proyecto.

## ***2. CASOS DE TERAPIA GÉNICA EN HUMANOS***

El objetivo final de la investigación en terapia génica consiste en trasladar a la clínica las estrategias que han dado buenos resultados en los ensayos en modelos preclínicos. Con base en ello, se inician los ensayos clínicos en Fase I, Fase II, Fase III y con el fin de conseguir comercializar el producto, entrar en fase IV. Según datos del 2004 existen más de 900 ensayos clínicos distribuidos a lo largo de todo el planeta, un 68% de ellos se desarrollan en Estados Unidos y sólo un 27% en Europa. Un 64% de

## INTRODUCCIÓN

---

---

estos ensayos se encuentran en Fase I y sólo entre un 1 y 2 % en Fase III. Recientemente se ha comercializado el primer producto de terapia génica, *Gendicine*, este producto basado en el adenovirus serotipo 5 diseñado para expresar p53 (Adp53), fue aprobado por la “State Food and Drug Administration” de China, para el tratamiento de tumores de nasofaringe, cancer de cabeza, cuello, pulmón, pecho e hígado (Fillat, 2004; Pengi, 2005; Wilson, 2005).

El número de ensayos clínicos ha ido variando a lo largo de los años. Empezó en 1989 con el primer ensayo, y alcanzó su máximo en 1999 con 113 ensayos aprobados. Este mismo año sucedió la primera muerte en un paciente como consecuencia directa de un tratamiento de terapia génica. Fué el caso de Jesse Gelsinger que sufría una enfermedad genética hereditaria llamada deficiencia de ornitina transcarbamilasa (OTC). El paciente formaba parte de un grupo de 18 individuos que estaban siendo sometidos a diferentes dosis de un vector adenovírico dirigido al hígado, que contenía una copia correcta del gen de la OTC. Gelsinger y otro de los pacientes, que no se vió afectado por el tratamiento, recibieron las dosis más elevadas previstas en el ensayo clínico, con lo que otros órganos además del hígado fueron modificados con el vector. Este podría haber sido el factor determinante que le provocó una respuesta inmune exacerbada causándole un colapso agudo del sistema respiratorio y una falla multisistémica inflamatoria que le provocó la muerte. Además, en el análisis de la autopsia se encontró que la médula ósea de Gelsinger estaba dañada probablemente debido a una infección mediada por otro virus, que se pudo adquirir durante o incluso antes del tratamiento experimental, y pudo desencadenar la extraordinaria respuesta inmune que acabó con su vida. En consecuencia a este fatal acontecimiento, las

agencias reguladoras aumentaron el control sobre los ensayos clínicos y eso se tradujo en una reducción en el número de ensayos desarrollados en los años posteriores (Raty, 2008).

En el año 2000 tuvo lugar el primer éxito claro en el tratamiento de una enfermedad mediante terapia génica. La enfermedad que se trató fue la inmunodeficiencia severa combinada ligada al cromosoma X. Desafortunadamente, a los 30 meses de la administración de la terapia, en dos de los 16 pacientes tratados, apareció una leucemia que requirió tratamiento con quimioterapia. Esto generó cierta desmoralización, lo que ha hecho reorientar la investigación usando vectores retrovirales; sin embargo, es importante destacar que los demás niños tratados permanecen libres de la enfermedad que padecían gracias al tratamiento recibido, y sin el cual algunos de ellos, con toda probabilidad, habrían fallecido (Fillat, 2004).

### ***III. ADENOVIRUS***

Fueron aislados en 1953 por investigadores que trataban de establecer líneas celulares a partir de adenoides (amígdalas) de donde deriva su nombre. Son virus que infectan a humanos y animales, en humanos causan enfermedades leves en los ojos y en los aparatos respiratorio, gastrointestinal y urinario (Russell, 2009).

#### ***1. CLASIFICACIÓN***

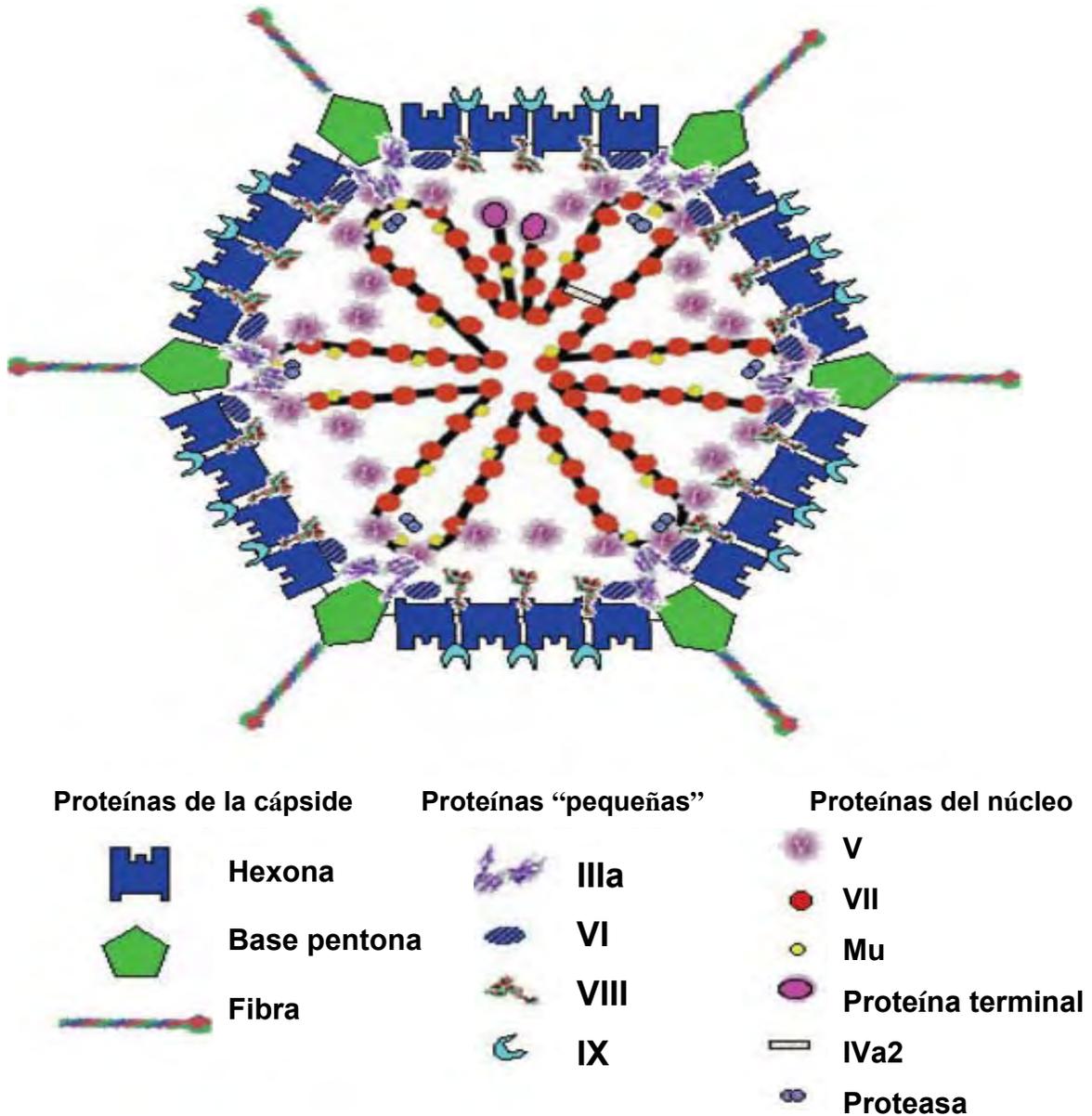
Los adenovirus pertenecen a la familia de los adenoviridae y se clasifican en 4 géneros de acuerdo al huésped que infectan: los aviadenovirus que infectan aves, los mastadenovirus que infectan mamíferos, los atadenovirus que infectan ovinos y los siadenovirus que infectan ranas. Los adenovirus humanos se dividen en 6 grupos del A

al F, de acuerdo a sus propiedades físicas, químicas y biológicas. Se han descrito un total de 51 serotipos humanos, entre éstos los serotipos 2 y 5, pertenecientes al grupo C, son los más utilizados como vectores en la terapia génica y no son oncogénicos.

### **2. CARACTERÍSTICAS**

Los adenovirus miden de 80 a 110 nm de diámetro, no son virus envueltos, son virus de DNA de doble cadena lineal (30-38kpb) con 2 rasgos característicos: i) las secuencias terminales de nucleótidos de cada cadena son repeticiones terminales invertidas (ITR), de tal modo que si el DNA es desnaturalizado, ambas cadenas forman círculos monocatenarios a través de asas producidas entre los extremos complementarios y ii) una pequeña proteína terminal (TP) de 55 da, que está unida covalentemente en cada extremo 5', ambas estructuras terminales del genoma vírico son importantes para la replicación viral (Russell, 2000).

Los adenovirus tienen una compleja cápside icosaédrica esta constituida por 252 capsómeros, de los cuales 240 capsómeros tienen forma hexagonal por lo que se les denomina hexonas, los 12 capsómeros restantes tienen forma pentagonal por lo que se les denomina bases pentonas, de ellas emergen 12 fibras constituidas a su vez por 3 polipéptidos en un extremo poseen una protuberancia, importante en la unión con el receptor celular CAR (coxsackie-adenovirus receptor), la fibra es flexible lo que le ayuda en el proceso de infección. La cápside también posee otras proteínas "pequeñas": IIIa, VI, VIII y IX que le confieren estabilidad. Hay otros seis componentes



**Figura 1. Estructura del adenovirus:** La cápside tiene forma icosaédrica, esta constituida por 240 hexonas y 12 bases pentonas de las cuales se proyectan 12 fibras con una protuberancia en el extremo final. Las proteínas pequeñas están asociadas a la cápside le ayudan a desensablar la cápside dentro del endosoma y las proteínas asociadas al núcleo interaccionan con el DNA viral , median la entrada por los poros nucleares e dan estabilidad. (Tomada y modificada de Russell, 2009)

estructurales situados en el núcleo del virus, cinco están asociados con la doble cadena de DNA (V, VII, Mu, IVa2 y la proteína terminal), el sexto componente es la proteasa de 23 kDa, la cual tiene un papel importante en el ensamblaje del virión (Russell, 2009).

La hexona es un pseudo-trímero hexagonal situado en las 20 caras de la cápside icosaédrica, constituido por la repetición de 3 veces de dos dominios en posición  $\beta$ . La pentona es un complejo de 2 proteínas unidas por enlaces covalentes, la pentona homopentamérica y la fibra homotrimérica que se proyecta de los 12 vértices del icosaédro (Ver **Figura 1**). La base pentona tiene un dominio RGD (Arg-Gly-Asp) que es vital en la unión con las integrinas de la célula huésped. Además, la base pentona tiene actividad similar a una toxina causante de la rápida aparición de efectos citopáticos (redondeamiento y agregación de las células cultivadas) y del desprendimiento de las células de superficie de cultivo en crecimiento (Brooks, 2002), por lo cual se le conoce como factor de desprendimiento celular. La proteína IIIa es susceptible a fosforilarse, tiene un papel importante en los estadios iniciales del desensamblado de los viriones. El polipéptido VI es liberado del virión cuando el medio es ácido en el endosoma, el polipéptido se une a la membrana del endosoma mediando su rompimiento y permite el transporte del virus hacia el núcleo (Ver **Figura 2**). El polipéptido VIII y el polipéptido IX estabilizan la cápside (Russell, 2009).

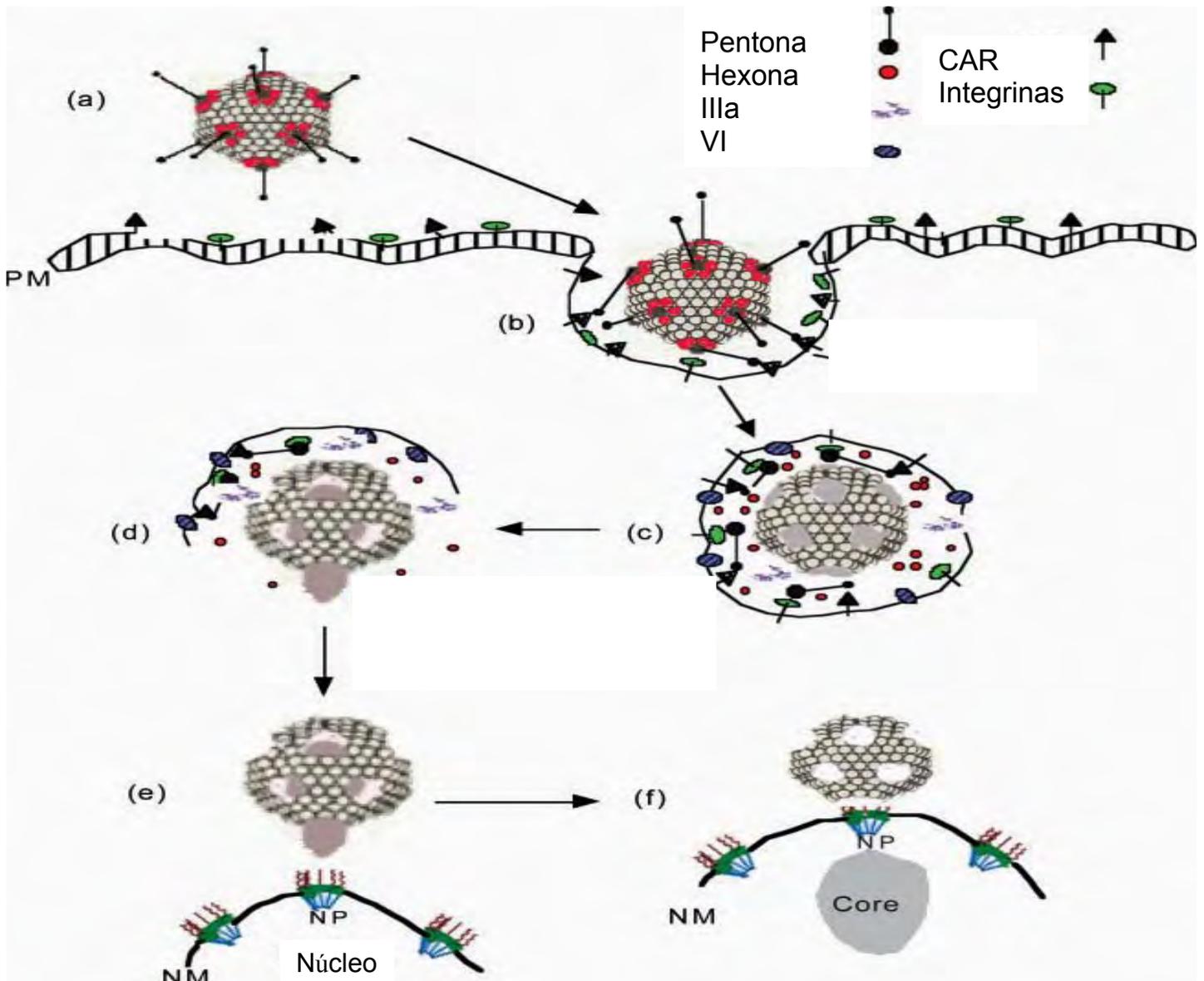
Las proteínas V y VII interactúan con el DNA del virus, ayudan a que el templado esté disponible para la replicación y transcripción. La proteína VII es parecida a las histonas y es rica en arginina (Davis, 1994). Además, la proteína VII es el principal mediador del transporte de DNA del virus al núcleo, el cual parece ser vía la red de

microtúbulos, también se cree que están involucradas las importina, la histona H1, hsp 70 y el factor exportador nuclear CRM1 (Russell, 2009).

El polipéptido IVa2, se une al DNA viral y es crítico para el proceso de empaquetamiento, la proteína Mu es otra componente del núcleo viral. La proteína terminal (TP), está unida covalentemente al genoma viral en la posición 5' terminal. Se sintetiza como un precursor pTP, con el corte por la proteasa viral es esencial para la replicación viral. La proteasa viral es necesaria para producir partículas virales infecciosas, por el corte que hace a las proteínas precursoras para obtener proteínas estructurales como las proteínas IIIa, VI, VII, pTP y el precursor de Mu (polipéptido X). La estructura en cristal indica que la proteasa tiene 2 dominios similares a la proteasa cisteína papaína. Es activada por la unión (no específica) al DNA viral y la unión con el C-terminal del péptido VI, para una actividad óptima (Russell, 2009).

### ***3. ADHESIÓN, PENETRACIÓN Y PÉRDIDA DE LA CÁPSIDE.***

La primera interacción en la infección viral es el reconocimiento entre la fibra del adenovirus y el receptor celular altamente conservado CAR, el cual es un miembro de la superfamilia de las IgG, está involucrado en la formación de las uniones intercelulares. La segunda interacción es entre el motivo RGD de la base pentona y las integrinas  $\alpha\beta3$  y  $\alpha\beta5$ , esta unión facilita la internalización del virus vía la formación de vesículas cubiertas con clatrina (Ver **Figura 2**). La interacción con las integrinas induce la activación de la PI3 kinasa y las GTPasas Rho, ambas alteran el citoesqueleto (Russell, 2009). A continuación, el virus se introduce por endocitosis a la célula



**Figura 2. Infección viral.** (a) Adenovirus en la membrana plasmática, en rojo las hexonas que rodean a la base pentona. (b) Unión de las protuberancias de las fibras del virus con el receptor celular "CAR" y la unión de la base pentona (motivo RGD) con las integrinas celulares, internalización del virus vía clatrina. (c) Cambio en el pH del endosoma, hay desestabilización de los capsómeros, de las proteínas IIIa y VI. (d) La proteína VI se une a la membrana del endosoma permitiendo su rompimiento. (e) El genoma viral es liberado en el citosol y es transportado a la membrana nuclear (NM). (f) El núcleo viral entra por los poros nucleares (NP). (Mecanismo propuesto por Russell ,2009)

huésped y los endosomas se desplazan rápido por el citosol, la pentona base reduce el pH por debajo de 6, se reduce la estabilidad de la cápside y se liberan las proteínas IIIa y VI. La proteína VI se une a la membrana del endosoma permitiendo su rompimiento (**Figura 2**). En el transporte de las partículas virales a través del citoplasma y hacia el núcleo celular, participan los microtúbulos. El DNA vírico penetra en el núcleo celular por los poros nucleares, ya en el núcleo se expresan los genes virales, se sintetiza el DNA vírico, se generan los viriones y se liberan por lisis celular; el DNA viral no se integra en los cromosomas (Davis, 1996 ; Russell, 2000; Russell, 2009).

#### **4. REPLICACIÓN**

El genoma adenoviral se divide en genes tempranos, los cuales favorecen la replicación del DNA viral y en genes tardíos que codifican a proteínas estructurales necesarias para construir las partículas virales. Los adenovirus, inducen a las células huésped a entrar a la fase S del ciclo celular para generar las condiciones que conduzcan a la replicación del virus, a la síntesis de proteínas virales para su replicación y a la producción de proteínas virales para evadir la respuesta inmune (Brooks, 2002; Russell, 2000).

El proceso de ensamblado de los viriones se origina en el citoplasma, los polipéptidos recién sintetizados se ensamblan en capsómeros. Una proteína codificada por L4, ayuda a la agregación de las hexonas. Los capsómeros se autoensamblan en el núcleo y forman cápsides vacías. El DNA desnudo penetra en la cápside preformada mediante un mecanismo desconocido. Un elemento cis del DNA viral sirve como señal de empaquetamiento, necesario para el reconocimiento entre la cápside y el DNA.

Finalmente la partícula madura es estable, infectante y resistente a las nucleasas. El ciclo infectante de los adenovirus es de 24 horas (Davis, 1996 ; Brooks, 2004, Russell, 2000).

### **5. MECANISMOS DE EVASIÓN DE LOS ADENOVIRUS**

Los adenovirus codifican al RNA AV pequeño, que protege al adenovirus del efecto del interferón, impidiendo la activación de la proteína cinasa R latente (una cinasa inducible por interferón que fosforila e inactiva el factor 2 de iniciación eucariota por lo que reduce la síntesis de la proteína). La proteína E1A impide la activación de los genes de respuesta al interferón, la proteína E3 inhibe la respuesta citolítica del huésped contra las células infectadas, también la proteína gp19-kDa bloquea el movimiento de las moléculas del MHC I hacia la superficie celular, y así protege a las células infectadas de la lisis mediada por los linfocitos T; por último, una proteína codificada por E3 bloquea la inducción de la citólisis por la citocina TNF $\alpha$  (Brooks, 2002).

### **6. ADENOVIRUS, COMO VECTORES PARA TERAPIA GÉNICA**

Los adenovirus han sido utilizados como vectores de transferencia que contienen y expresan genes con propósitos terapéuticos (Graham, 2000). Los adenovirus de primera generación se han manipulado genéticamente, quitándoles las regiones tempranas E1 y E3, la cuales son esenciales para la replicación y codifican a proteínas que evaden la respuesta inmune (He, 1998). En el espacio liberado puede acomodarse el transgen que se introduce mediante ligación enzimática o por recombinación

## INTRODUCCIÓN

---

---

homóloga. La generación y propagación de partículas víricas con genomas E1 y E3 deficientes se lleva a cabo mediante transfección en líneas celulares que han incorporado establemente las regiones virales indispensables deletadas (células 293 o células 911). En estas células se completa el ciclo lítico y en el medio de cultivo se recogen los adenovirus recombinantes. Los adenovirus presentan varias ventajas como vectores: son muy eficientes en transducir células *in vitro e in vivo*, transducen con igual eficiencia células quiescentes o replicativas, tienen un amplio tropismo y capacidad para infectar un extenso espectro de células eucariotas procedentes de distinto tejido o especie, la expresión del transgen es transitoria y son incapaces de replicarse por lo que son seguros, no se integran, por lo que se evita el riesgo de mutagénesis por inserción, por lo cual son inocuos y seguros. Además, los adenovirus son producidos eficientemente en grandes cantidades en altos títulos (mayor a  $10^{11}$ pfu), (Graham, 1977; Günzburg, 1995; He, 1998; Graham, 2000; Tatsis, 2004).

Las desventajas del uso de los adenovirus recombinantes son la inducción de la respuesta inmune después de la liberación *in vivo*, manifestada como una respuesta inflamatoria por la activación de linfocitos T citotóxicos y producción de anticuerpos neutralizantes, así como la posible replicación en presencia de una proteína endógena parecida a E1a o por recombinación con algún adenovirus silvestre (Graham 1977; Günzburg, 1995). Los vectores adenovirales de segunda generación utilizan una mutante de E2a sensibles a la temperatura o una delección en E4 (Russell, 2000; Alba 2005).

Los adenovirus gutless o de última generación no poseen ninguna secuencia adenoviral, contienen los ITRs, una secuencia empaquetadora alrededor del transgen,

así como la secuencia señal que actúa en cis la cual dirige el empaquetamiento del DNA adenoviral en las partículas virales. Los vectores “gutless” requieren de todos los genes adenovirales para la propagación de los vectores, así que ellos no utilizan células empaquetadoras como los adenovirus de primera y segunda generación, requieren de virus ayudadores (Ad-helper) que provean las proteínas virales necesarias y una línea celular permisiva para la producción de adenovirus. La ventaja de éstos vectores es que pueden permanecer episomales en las células, su genoma, al no expresar proteínas víricas, permanece en el citoplasma sin ser atacado por las defensas celulares. Esto permite que el gen terapéutico se exprese durante largos períodos de tiempo (Alba, 2005). Aunque estos vectores son una herramienta muy útil, y se han administrado *in vivo* en diferentes tejidos y en diferentes modelos animales con gran éxito, no han sido utilizados en ensayos clínicos, debido a que ninguno de los sistemas actuales de producción permite disminuir los niveles de contaminación de los Ad helper por debajo del 1%, dado que estos virus despiertan la respuesta inmune, una contaminación por encima de este nivel es intolerable en un ensayo o tratamiento en humanos (Alba, 2005). El grupo del Dr. Miguel Chillón, ha desarrollado una nueva estrategia, en la cual ha modificado las secuencias de DNA en los Ad-helper, que causan un retraso significativo del empaquetamiento del genoma de Ad-helper, pero sin disminuir los niveles de expresión proteica para la producción de las proteínas víricas. Los niveles de amplificación de estos son del 0.001-0.01% respecto a los controles, es decir, se producen más vectores terapéuticos que vectores contaminantes; esto ayudará con el proceso de producción a gran escala en biorreactores que permitirá la utilización de adenovirus gutless en ensayos clínicos humanos (Alba, 2007; Segura, 2008).

### **7. RESPUESTA INMUNE EN CONTRA DE LOS VECTORES ADENOVIRALES**

La respuesta inmune innata se desarrolla rápidamente después de que el virus entra, se induce la expresión de genes inflamatorios y además hay reclutamiento de macrófagos, neutrófilos y células NK.

La respuesta inmune adaptativa celular y humoral se desencadena en 4-7 días después de la infección. En este tiempo hay un pico de citocinas, quimiocinas e inducción de linfocitos T citolíticos (CTL's) específicos para el adenovirus.

La liberación sistémica de los adenovirus induce la producción de anticuerpos neutralizantes contra las proteínas de la cápside, el desarrollo de anticuerpos específicos contra los adenovirus no contribuye a la eliminación de las células transducidas por el adenovirus y tampoco afecta la expresión del transgen; sin embargo si se readministra el vector, los anticuerpos pueden unir al vector prevenir la entrada a la célula y promover la opsonización por los macrófagos.

Algunas estrategias para minimizar la inmunidad pre-existente es el uso de otros serotipos de adenovirus que notengan reacción cruzada, uso de adenovirus de otra especie. También se ha intentado disminuir el número de macrófagos con agentes inmunosupresores (ciclosporina A, ciclofosfamida, dexametasona, etc), el uso de anticuerpos para disminuir los CTL's, el bloqueo de interacciones coestimuladoras entre las células presentadoras de antígenos (APC) y los linfocitos T y B, tolerancia oral, etc (Alba, 2005).

### **III. EL INTERFERÓN GAMMA**

#### **1. ASPECTOS GENERALES DE LOS INTERFERONES**

En 1957, Isaacs y Lindenmann descubrieron una sustancia que protegía a las células *in vitro* de la infección viral, ellos la denominaron interferón (Issacs, 1957). Hoy se sabe que esta es una familia de proteínas con actividad antiviral secretadas en respuesta a diferentes estímulos, constituyéndose en las primeras citocinas descritas y utilizadas terapéuticamente.

Hay tres tipos de interferones. Los interferones del tipo I o clásicos se dividen en 4 clases (IFN $\alpha$ , IFN $\beta$ , IFN $\omega$  e IFN $\tau$ ). Se relacionan en la estructura y se unen a un mismo receptor (heterodímero IFNAR1 e IFNAR2) (Schroeder, 2006). Los interferones  $\alpha$  son una familia de proteínas relacionadas, codificadas por distintos genes y son sintetizadas por leucocitos. El IFN $\beta$  es una sola proteína codificada por un gen distinto y es producida por fibroblastos. Los interferones de tipo I son proteínas importantes de la inmunidad innata, son producidas en respuesta a la infección viral, tienen capacidad antiproliferativa, efectos inmunomoduladores y actividad antitumoral; el IFN $\tau$  solo se secreta en rumiantes (Ramos-Bello, 2008; Mather, 2007; Schroeder, 2006). Los del tipo III fueron recientemente descritos y se conocen como los IFN- $\lambda$ s. En humano se han descrito el IFN $\lambda$ 1, - $\lambda$ 2, - $\lambda$ 3 (Uzé, 2007).

Los interferones de tipo III, son estructural y genéticamente distintos a los interferones tipo I, aunque comparten propiedades biológicas y vías de señalización con los interferones tipo I; la diferencia radica en que los tipo III se unen a distintos receptores de membrana IFNLR e IL10R2 (Mather S, 2007, Uzé G, 2007).

El IFN $\gamma$  o interferón inmune tipo II es producido por linfocitos Th1 CD4<sup>+</sup>, linfocitos T citotóxicos CD8<sup>+</sup>, células T $\gamma/\delta$ , células NK así como por células B y APC (como monocitos/macrófagos y células dendríticas) en respuesta a algún estímulo inmune ó inflamatorio (Schroeder, 2006). El IFN $\gamma$  no comparte receptores con los interferones de tipo I y su estructura proteica es distinta (Pestka, 2004, Dorman, 2000; Boehm, 1997). La producción de IFN $\gamma$  es controlada por citocinas secretadas por APC específicamente por IL-12 e IL-18, estas citocinas sirven como un puente de unión entre la infección con la producción de IFN $\gamma$  y la respuesta inmune innata (Barbulescu, 1998; Bogdan, 2006). El reconocimiento de los macrófagos hacia los patógenos induce la secreción de IL-12 y quimiocinas como CCL3. Las quimiocinas atraen células NK y células mononucleares hacia el sitio de inflamación y como resultado se produce IFN $\gamma$  (Schroeder, 2006).

La producción de IFN $\gamma$  es inducida por patógenos, por el entrecruzamiento de moléculas de superficie, por antígenos específicos, por la activación del receptor de células T o por estimuladores de células T no específicos como la fitohemaglutinina, la concanavalina-A, ésteres de forbol e ionóforos; también se estimula por citocinas (IL-1, IL-2, IL-12, IL-18), factores de crecimiento y estrógenos (Pestka, 2004; Sen 2001). La expresión del gen de IFN $\gamma$  se inhibe por glucocorticoides, TGF $\beta$ , IL-4 e IL-10, así como por el inmunosupresor ciclosporina-A a través del factor de transcripción NF-ATp (Sen 2001, Rao 1994).

## **2. ESTRUCTURA BIOQUÍMICA Y SÍNTESIS DEL IFN $\gamma$**

El gen que codifica al IFN $\gamma$  humano y murino está constituido por 4 exones y 3 intrones, se localiza en el cromosoma 12 humano y 10 murino. La homología a nivel de

## INTRODUCCIÓN

---

---

nucleótidos del IFN $\gamma$  murino y humano es del 64% y en la región 3' no traducida es del 68%. Sin embargo, a nivel de secuencia de proteína la homología es del 40%, lo que explica la estricta especie-especificidad del IFN $\gamma$  murino comparado con el IFN $\gamma$  humano, ya que este último tiene actividad viral sobre células de ratón, conejos, bovinos y monos, mientras que el IFN $\gamma$  murino sólo actúa sobre células murinas (Gray, 1983). La forma biológicamente activa del IFN $\gamma$  es como homodímero estabilizado por fuerzas no covalentes, con subunidades de 143 aminoácidos (a.a.) en el humano (17.1kDa) y 133 a.a. en el ratón (15.9kDa) (Gray, 1983). El IFN $\gamma$  es sintetizado como una proteína precursora de 166 a.a. (humano) y 155 a.a. (ratón), e incluye una secuencia señal de 23 y 22 a.a. respectivamente. El IFN $\gamma$  murino y humano contienen 2 secuencias potenciales de N-glicosilación en diferentes posiciones (Gray, 1983).

Durante la biosíntesis del IFN $\gamma$  humano los péptidos son N-glicosilados, por análisis electroforético en SDS-PAGE se observaron tres formas de IFN $\gamma$  que difieren en el grado de glicosilación. El IFN $\gamma$  I de 25 kDa que contiene más carbohidratos que el IFN $\gamma$  II de 20 kDa y el IFN $\gamma$  III de 15.5 kDa que no contiene carbohidratos, cuando se trataron con una mezcla de glicosidasas se redujo su tamaño, el IFN $\gamma$  I se redujo a  $18.5\pm 0.5$  kDa, el IFN $\gamma$  II a  $15.5\pm 0.5$  kDa y el IFN $\gamma$  III no se alteró, aun sin la presencia de carbohidratos la actividad antiviral se conservó (Kelker, 1984).

El punto isoeléctrico del IFN $\gamma$  murino es entre pH 5.5 y 6, la discrepancia entre este valor y el predicho por su naturaleza excesivamente básica puede ser debido a que puede glicosilarse con el ácido siálico. El IFN $\gamma$  murino al igual que el IFN $\gamma$  humano tienen actividad antiviral, son sensibles a pH 2 y a la temperatura (65°C por 1h) (Kelker, 1984).

La estructura cristalográfica del IFN $\gamma$  humano confirma su naturaleza homodimérica y revela que las subunidades se sostienen en configuración antiparalela, cada monómero posee 6  $\alpha$ -hélices que comprenden aproximadamente 62% de la estructura, no contiene hojas  $\beta$ -plegadas. La estructura dimérica está estabilizada por el entrecruzamiento de las hélices, a través de interacciones entre las subunidades, el N-terminal de cada cadena está juxtapuesto al C-terminal de la cadena opuesta por intervención de los dominios helicoidales (Ealick, 1991). El interferón puede existir asociado a la matriz extracelular donde ejerce un control yuxtacrino. Los neutrófilos almacenan IFN $\gamma$  que liberan en respuesta a agentes degranulantes y algunas poblaciones de macrófagos inducen la expresión constitutiva de IFN $\gamma$  reclutada en sitios de almacenaje intracelular (Bogdan, 2006).

### **3. CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS Y GENÉTICAS DEL RECEPTOR DE IFN $\gamma$**

La actividad biológica del IFN $\gamma$  es mediada por un receptor específico, este receptor de IFN $\gamma$  o de tipo II (Novick, 1987; Aguet, 1987) se expresa en todas las células con excepción de los eritrocitos maduros y es especie-específico en la capacidad de unión a su ligando.

El receptor funcional de IFN $\gamma$  está constituido por dos cadenas IFNGR1 asociadas con dos cadenas de IFNGR2 (Schroeder, 2004) y unidas a la maquinaria de señalización. Las cadenas IFNGR1 e IFNGR2 pertenecen a la familia de los receptores de citocinas clase II, receptores que unen el ligando en el ángulo pequeño de una V, formada por dos dominios parecidos a IgG que constituyen el dominio extracelular (Schroeder, 2004).

## INTRODUCCIÓN

---

Los genes que codifican a los receptores IFNGR1 e IFNGR2 contienen 7 exones y están localizados en los cromosomas 6 del humano y 10 de murinos para el receptor IFNGR1 y los cromosomas 21 del humano y 16 de los murinos para el receptor IFNGR2 (Pestka, 2004).

La cadena IFNGR2 es el factor limitante en respuesta a IFN $\gamma$ , esta cadena se expresa constitutivamente pero sus niveles de expresión pueden ser regulados de acuerdo al estado de diferenciación celular o de activación. Por ejemplo, algunas poblaciones Th1 CD4<sup>+</sup> tienen bajos niveles de expresión en superficie de IFNGR2 y por lo tanto hay baja expresión del activo IFNGR2, dando lugar a un bloqueo funcional de algunos pasos de la señalización de IFN $\gamma$ , como resultado de este bloqueo, no se ejercen los efectos de crecimiento e inhibición por lo tanto, las células continúan proliferando durante el tratamiento con IFN $\gamma$  porque expresan bajos niveles de IFNGR2. De manera contraria, la exposición de IFN $\gamma$  a la población Th2 CD4<sup>+</sup> que presentan altos niveles de IFNGR2 inhiben su proliferación y puede que se induzca el programa de apoptosis (Schroeder, 2004). Este mecanismo puede ayudar en el cambio del fenotipo Th2 a Th1, ya que la población de Th2 disminuye como el resultado de la inhibición del crecimiento y efectos proapoptóticos de IFN $\gamma$  y la población Th1 continúa proliferando como el resultado del bloqueo de la función de IFN $\gamma$  sobre las Th2.

La estructura cristalográfica del receptor revela que el dominio extracelular de unión al ligando de la cadena IFNGR1 está constituido por dos dominios tipo III de fibronectina (FBN III). Estos dominios FBN III están constituidos por una estructura en sándwich formada por dos estructuras en hoja- $\beta$  plegada, la estructura de IFNGR2 es similar a la cadena IFNGR1 (Pestka, 2004, Bach, 1997). La estructura del complejo

## INTRODUCCIÓN

---

IFN $\gamma$ /IFNGR1 presenta la simetría de unión de dos IFNGR1 a un dímero de IFN $\gamma$ , esto ha sido demostrado por análisis de la estructura cristalográfica (Walter, 1995).

Ambas cadenas IFNGR carecen de actividad fosfatasa cinasa intrínseca y se asocian con una maquinaria de señalización para la transducción de señales. El dominio intracelular de IFNGR1 contiene dominios de unión para la janus tirosina cinasa (JAK)-1, el factor citosólico latente y para los transductores de señales y activadores de la transcripción (Stat)-1. En los humanos, el motivo de unión a las Jak-1 es LPKS, una secuencia membrana proximal localizada en los residuos 266-269. El sitio de unión a las Stat-1 YDKPH, está posicionado en los residuos 440-444, la tirosina Y440 es un sitio esencial que es fosforilado durante las señales de transducción que permite el reclutamiento de Stat-1 al receptor. Los residuos <sup>441</sup>DKPH<sup>444</sup> son los sitios de unión de IFNGR1 y Stat-1. Los motivos de unión de las Jak y Stat-1 son importantes para la fosforilación del receptor, señales de transducción e inducción de la respuesta inmunológica. La región intracelular de IFNGR2 posee sitios de unión específicos para la Jak2 cinasa, en los humanos, los sitios son <sup>263</sup>PPSIP<sup>267</sup> y <sup>270</sup>IEEYL<sup>274</sup> esenciales en las señales de transducción, cabe mencionar que la cadena IFNGR2 no se fosforila en tirosina durante las señales de transducción (Schroeder, 2004). Por ensayos de entrecruzamiento con IFN $\gamma$  humano marcado, se ha demostrado que IFN $\gamma$  solo se asocia con IFNGR2 cuando la cadena IFNGR1 está presente. La primera interacción se da entre IFN $\gamma$  y las 2 cadenas IFNGR1, se forma el complejo IFN $\gamma$ :IFNGR1, a su vez IFNGR2 interacciona con IFNGR1, aunque también interacciona débilmente con el ligando. Las interacciones IFN $\gamma$ :IFNGR1 y IFNGR1:IFNGR2 son específicas (Schroeder, 2004).

### 4. TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES

El complejo receptor se forma antes de su unión al ligando, cuando se une el ligando, los dominios intracelulares del receptor, cambian su conformación permitiendo la asociación río debajo de los componentes de señalización.

El IFN $\gamma$  biológicamente activo es un homodímero formado por la autoasociación de dos polipéptidos maduros en una orientación antiparalela y que se unen a IFNGR1 en una estequiometría de 2:2. La unión del ligando induce la autofosforilación y la activación de Jak1 por la Jak2. La Jak1 activada fosforila las tirosinas sobre los residuos 440 de cada cadena IFNGR1 para formar dos sitios de anclaje para los dominios SH2 del Stat-1 latente. El receptor recluta a un par de Stat-1 que son fosforiladas cerca del C terminal en Y<sup>701</sup>, probablemente por Jak2. La vía Jak-Stat involucra el reclutamiento del receptor y la activación de las cinasas janus (Jaks 1-3 y TyK2) y las Stats (Stats 1-6, incluyendo Stat 5a y 5b) para controlar la transcripción de los genes blanco vía elementos de respuesta específicos. La fosforilación induce la disociación del homodímero de Stat-1 (conocido como factor de activación IFN $\gamma$ ) del receptor. El homodímero de Stat-1 disociado entra al núcleo y se une a los elementos del promotor para iniciar o suprimir la transcripción de los genes regulados por IFN $\gamma$ . Los homodímeros de Stat se unen al DNA a secuencias de activación de IFN $\gamma$  o GAS (secuencia activada por interferon  $\gamma$ ) o a otros motivos específicos en la región promotora que contienen la secuencia consenso TTCN (2-4)GAA (Mather,2007). La transcripción de muchos genes de respuesta a IFN $\gamma$  es controlada por un elemento GAS o uno ISRE (elemento de respuesta estimulado por el IFN $\gamma$ ) (Schroeder, 2004).

## INTRODUCCIÓN

---

---

Una gran variedad de citocinas y factores de crecimiento pueden activar a Stat1 pero ¿cuál es entonces la especificidad de la vía de señalización Jak-Stat?, para contestar esta pregunta los animales deficientes del gen Stat1 han ayudado mucho (Meraz, 1996; Durban, 1996), ya que éstos animales tienen una deficiencia en la capacidad de responder a IFN $\gamma$  ó IFN $\alpha$ . Las células derivadas de estos animales no iniciaron la transcripción de genes inducibles por interferón tales como el factor regulatorio de interferón -1 (IRF-1), la proteína de unión a guanilato-1, el transactivador de la molécula del MHC clase II y la proteína del complemento C3. Además estos animales son sensibles a la infección por *Listeria monocitogenes* y el virus de la estomatitis vesicular. En contraste, los animales deficientes del gen Stat1 presentan respuestas normales a la IL-6, IL-10, factor de crecimiento epidérmico y hormona de crecimiento. Estos estudios revelan la importancia de la proteína Stat1 en los efectos biológicos mediados por IFN $\gamma$ , su especificidad es dependiente de dos procesos temporal y espacialmente distintos: el reclutamiento específico de Stat1 al receptor de IFN $\gamma$  activado en la membrana plasmática y la inducción específica en el núcleo de la transcripción de los genes activados por IFN $\gamma$  por los dímeros de Stat1 (Bach, 1997).

Además del mecanismo descrito previamente, IFN $\gamma$  induce la transcripción a través de otras vías, algunas de las cuales requieren de la expresión de nuevas proteínas celulares. Por ejemplo, los heterodímeros Stat1:Stat2 se asocian con la proteína de unión al DNA factor 9 regulatorio de IFN (IRF-9) también conocido como P48 o ISGF3 $\gamma$  para formar el complejo heterotrimérico ISGF3. Éste último se une al ISRE presente en los promotores de diferentes genes estimulados por interferón. La entrada al núcleo de las Stats a través de los poros nucleares esta mediado por la

importina- $\alpha/\beta$ , una vez adentro del núcleo las proteínas Stat se disocian de la importina y se unen a las secuencias GAS, ISRE o vía Crk. Los interferones tipo I y II inducen la fosforilación de las proteínas Crk, la relevancia biológica de la activación de ésta vía radica en que la expresión de CrkL y CrkII es necesaria para los efectos supresores de IFN $\alpha$  e IFN $\gamma$  (Mather, 2007; Xu, 2008).

Los genes que codifican para las Jaks, Stats, IRFs, SOCS (suppressor of cytokine signaling), así como las fosfatasas de las Stats son reguladas transcripcionalmente por el IFN $\gamma$ , las vías de señalización pueden sobrelaparse lo cual puede tener un efecto sinérgico o antagónico (Sen, 2001).

El factor SOCS-1 inhibe el efecto biológico de IFN $\gamma$ , actúa a través de la vía Jak/Stat. SOCS-1 une a los cuatro miembros de la familia de las Jak inhibiendo su actividad catalítica. La importancia de la acción reguladora de SOCS-1 fue evidente en los ratones *knock-out* para SOCS-1. Estos animales mueren entre la segunda y tercera semana de edad, por causa de necrosis del hígado, infiltración de macrófagos en varios órganos y múltiples anormalidades hematopoyéticas incluyendo linfopenia. La muerte prematura de los animales se previno utilizando anticuerpos neutralizantes anti-IFN $\gamma$  o al cruzar animales *knock-out* para IFN $\gamma$  y SOCS-1 (Warren, 1999).

### **5. ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DEL IFN $\gamma$ Y SU PAPEL PATOFISIOLÓGICO**

El IFN $\gamma$  potencia la transcripción de varios genes involucrados en actividades inmunomoduladoras, antivirales y antiproliferativas (apoptosis) (Pestka, 2004). El IFN $\gamma$  como molécula inmunomoduladora es muy pleiotrópica, tiene la capacidad de aumentar la actividad citotóxica y fagocítica de los macrófagos, también induce la expresión de

## INTRODUCCIÓN

---

---

moléculas del MHC clase I y II en las células dendríticas y otras células presentadoras de antígeno, incrementa el desarrollo y diferenciación de las células T cooperadoras 1 (Th1), regula la respuesta humoral induciendo la producción de IgG2a e IgG3 por las células B murinas, promueve la actividad citotóxica de los linfocitos T (CTLs), de las células naturalmente citolíticas (NK) y las células activadas por linfocinas, además regula la producción de citocinas pro-inflamatorias (Boehm, 1997 ; Bach,1997 ; Farrar, 1993).

La protección inmunológica contra bacterias y parásitos intracelulares depende de la inmunidad mediada por células. El IFN $\gamma$  se encarga de estimular a las células inmunes efectoras, principalmente activa a los macrófagos que a su vez lisan o restringen el crecimiento de las células infectadas. Esta función es importante en la respuesta inmune contra micobacterias. De hecho un mecanismo en los ratones para eliminar a *Mycobacterium tuberculosis* es la producción de los intermediarios reactivos del nitrógeno (RNI) inducida por IFN $\gamma$ , aunque al parecer en los humanos los RNI no tienen un papel tan importante (Boehm, 1997).

El IFN $\gamma$  tiene un papel dual, por sus propiedades pro- y anti-inflamatorias. Es una citocina que se produce en respuesta a la infección y forma parte importante de la inmunidad innata y adaptativa. El IFN $\gamma$  induce la sobreexpresión de citocinas pro-inflamatorias como IL-12, IL-15, factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ), proteína-10 inducida por IFN $\gamma$  (IP-10), óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), caspasa-1, y además induce la activación de factores de transcripción pro-inflamatorios como el NF $\kappa$ B (Neumann,1998 ; Muhl, 2003).

El IFN $\gamma$  induce la expresión de genes dependiendo del tipo celular y de la presencia de otras citocinas que sinergizan (ej. TNF $\alpha$ , IL-2 e IL-1 $\alpha$ ) o antagonizan (ej. IL-4) sus efectos (Pestka, 2004). La IL-1 $\alpha$  e IL-18 son citocinas involucradas en enfermedades inflamatorias. El IFN $\gamma$  inhibe la producción de IL-1 $\alpha$  al reducir los niveles de RNA mensajero, e induce la producción de antagonistas de IL-18 y de los receptores que para IL-1 $\alpha$  (Muhl, 2003). El IFN $\gamma$  también ejerce una actividad anti-inflamatoria a través de la participación de las células T reguladoras. Una expresión temprana y transitoria del IFN $\gamma$  inducida por las células T reguladoras evita la iniciación de una respuesta inmune agresiva a través de la inhibición de la activación y proliferación de las células T al modular la función de las células presentadoras de antígeno, incluso hay evidencia en pacientes que esto puede estar ocurriendo (Schroecksadel, 2006). Se sugiere que a través de las células T reguladoras, el IFN $\gamma$  puede jugar un papel en la inducción o mantenimiento de la no respuesta a antígenos propios y no propios (Wood, 2006). Finalmente, otro mecanismo regulador de la respuesta inmunológica mediado por el IFN $\gamma$  es la inducción de la apoptosis. Las células Th2 y las células T “naive” son sensibles al IFN $\gamma$  porque expresan ambas cadenas del receptor de IFN $\gamma$  y al unirse éste se induce apoptosis. En cambio, la pérdida de la cadena IFNGR2 en las células Th1 hace a éstas células resistentes al IFN $\gamma$  induciendo su proliferación (Kamijo, 1993).

### **6. INACTIVACIÓN GENÉTICA Y MUTACIONES EN IFN $\gamma$ , IFNGR1 E IFNGR2 EN LOS RATONES Y EN LOS HUMANOS**

La importancia del IFN $\gamma$  y su receptor en la defensa contra bacterias extracelulares, intracelulares, parásitos y virus fue demostrada en ratones con

## INTRODUCCIÓN

---

---

inactivación genética inducida (*knock-out*) (Dorman, 2000 ; Bach, 1997). Los ratones que carecen de IFN $\gamma$  e IFNGR1 no desarrollan granulomas maduros ni tienen inmunidad protectora cuando se infectan con *M. bovis* (Kamijo,1993) ó *M. tuberculosis* cepa Erdman (Flynn, 1993; Cooper, 1993). Cuando se infectan con *M. avium* los ratones IFN $\gamma$ R<sup>-/-</sup> tienen carga bacteriana alta con respecto a los animales control.

También se sabe que los ratones deficientes en IFN $\gamma$  o en su receptor no inducen IP-10, lo que sugiere que esta citocina es clave en la inducción de quimiocinas necesarias para inducir inflamación aguda del pulmón (Neumann, 1998). En los últimos años, se han identificado y caracterizado mutaciones en los receptores de IFN $\gamma$  en humanos, lo cual ha permitido confirmar la importancia de esta citocina en la defensa contra diferentes microorganismos (Dorman, 2000). Personas con mutaciones en los receptores IFNGR1 (Jouanguy, 1999) y IFNGR2 (Dorman, 1998) son más susceptibles a contraer enfermedades por patógenos como micobacterias no tuberculosas, tales como *M. bovis*, *M. fortuitum*, *M. avium*, *M. chelonae* y bacterias como *S. typhimurium*, pero rara vez se infectan con parásitos como *Toxoplasma gondii*, *Legionella*, *Listeria* ó por agentes virales. Se sugiere que en estos pacientes el TNF $\alpha$  actúa como una citocina compensatoria, ya que no se afectan sus niveles de expresión en presencia de la mutación del receptor (Bach,1997 ; Janssen, 2002). Al igual que los pacientes con mutaciones en el receptor, los pacientes con auto-anticuerpos vs IFN $\gamma$  también son susceptibles a infecciones micobacterianas de baja virulencia. Los niños deficientes en la producción de IFN $\gamma$  presentan disminuida la movilidad de neutrófilos y disminuía la actividad de las células NK (Schroeder, 2004).

### 7. TERAPIA CON IFN $\gamma$ O ANTI-IFN $\gamma$ EN MODELOS ANIMALES.

El uso del IFN $\gamma$  como agente inmunomodulador y como agente apoptótico ha sido exitoso en modelos experimentales y en pacientes con diferentes enfermedades. (Tabla 1). Nishida y cols., reportaron el uso de adenovirus que expresan el receptor de IFN $\gamma$  (AdIFN $\gamma$ R) incrementaron la actividad biológica de esta citocina y volvieron más sensibles a las células tratadas con los AdIFN $\gamma$ R *in vitro*. Cuando los AdIFN $\gamma$ R fueron inyectados directamente en el tumor se redujo su tamaño y se indujo apoptosis en los animales tratados con el AdIFN $\gamma$ R e IFN $\gamma$  recombinante. Se sugiere que esos resultados fueron debidos a la inducción de la IP-10, la cual es muy importante como un factor anti-angiogénico para la progresión del tumor (Nishida,2002). Una nueva estrategia terapéutica para el tratamiento del cáncer *in vivo* es el uso de adenovirus replicativos condicionalmente. Estos adenovirus (CNH30mIFN $\gamma$ ) selectivamente expresan el transgen terapéutico de IFN $\gamma$  en células cancerosas, es decir, solo se replican en la masa celular tumoral sin replicarse en las células normales, esta especificidad es debida al promotor que contienen. Este nuevo sistema presenta tres propiedades antitumorales: oncólisis, anti-angiogénesis y la inducción de la respuesta inmune (Su, 2006). Así mismo, el tratamiento con IFN $\gamma$  tiene efectos supresores sobre las células Th2, se disminuye la producción de IL-4 e IL-5 y se inhibe la síntesis de IgE, logrando la disminución del infiltrado de eosinófilos en encefalomiелitis alérgica experimental y en un modelo murino de asma alérgica (Gao, 2002 ; Tang, 2001). También se ha demostrado la capacidad del IFN $\gamma$  de suprimir el infiltrado pulmonar de eosinófilos a través de bloqueo de la producción de IL-4 y de la disminución en la producción de leucotrienos (Krasnowska, 2000).

## INTRODUCCIÓN

Animal	Enfermedad	Efecto	Referencia
<i>In vitro</i>	Diabetes mellitus tipo I	Contribuye a la destrucción de las células beta por la producción de óxido nítrico. IFN $\gamma$ solo no daña pero junto con otras citocinas como IL1 $\alpha$ y TNF $\alpha$ se induce apoptosis de las células beta.	(Hahm, 2008; Gysemans, 2008)
<i>In vitro</i>	Infecciones virales Hepatitis B y C.	Eficiente para suprimir la replicación viral	(Parvez, 2006; Cheney, 2002)
Ratones	Glomerulonefritis autoinmune	Exacerbación de la enfermedad	(Nicoletti, 2000;
MRL	Parecido al lupus eritematoso sistémico en humanos.	Funciona como profiláctico pero no como terapéutico.	Haas, 1997)
Lpr/lpr			
Ratones	Tumores inducidos con células tumorales CT26 y Hepa1-6.	Regresión tumoral	(Su, 2006)
Rata	Infecciones bacterianas	Aumenta la activación de los macrófagos alveolares y las defensas contra <i>P.aeruginosa</i> .	(Lei, 1997; Beck, 1991)
Ratones con Células T CD4 <sup>+</sup>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Pneumocystis carinii</i> , <i>Legionella pneumophila</i>	Reduce la intensidad de la infección por <i>P.carinii</i> . Mejora la resistencia a la infección por <i>L. pneumophila</i> , en ratones <i>knock-out</i> tratados con IFN $\gamma$ . Disminuye la carga bacteriana.	
Disminuidas.			
Ratones <i>knock-out</i> para IFN $\gamma$ .			
Ratones desnudos	Infecciones parasitarias <i>Mycoplasma pulmonis</i> , <i>Toxoplasma gondii</i> ,	Confiere resistencia a la infección aguda con <i>T.gondii</i> , previene su proliferación en muchos órganos.	(Lai 1990; Susuki 1991)
Ratones	Tuberculosis pulmonar progresiva por cepas sensibles y resistentes a fármacos	Utilizando una sola dosis de adenovirus recombinante que expresa AdIFN $\gamma$ hay disminución en la carga bacteriana y daño tisular	(Mata-Espinosa, 2008)
Humanos	Enfermedad Granulomatosa Crónica Osteopetrosis Congénita Fibrosis pulmonar Idiopática Cáncer de ovario y vejiga (como adyuvante) Esclerosis escleroderma sistémico	Diferentes grados de éxito	(Mather, 2007)
Humanos	Tuberculosis por cepas sensibles y resistentes a fármacos.	Mejoría de signos y síntomas Cuando se trata a los pacientes con fármacos e IFN $\gamma$ r por aerosol.	(Koh, 2004; Condos, 1997, Suarez, 2004)
Humanos	Enfermedad pulmonar por micobacterias no tuberculosas	Cura microbiológica y resolución clínica de la enfermedad.	(Hallstrand, 2004)

**Tabla 1. Efectos de la terapia con el IFN $\gamma$  en modelos experimentales y en humanos.**

Se han utilizado con éxito proteínas de fusión para neutralizar al IFN $\gamma$ ; constituidas por el receptor de IFN $\gamma$  y segmentos del Fc (IFN $\gamma$ -R-IgG1Fc) que tienen una vida media prolongada y mayor avidéz por el ligando.

La administración de IFN $\gamma$  también aumentó la resistencia del huésped a varios agentes bacterianos y parasitarios como *Pseudomonas aeruginosa* (Lei, 1997), *Pneumocystis carinii* (Beck, 1991), *Mycoplasma pulmonis* (Lai, 1990), *Toxoplasma gondii* (Susuki, 1991), *Legionella pneumophila* (Steinmüller, 2000).

### **8. TERAPIA CON IFN $\gamma$ EN LOS HUMANOS**

El IFN $\gamma$  en humanos ha presentado gran eficacia en el tratamiento de la enfermedad granulomatosa crónica, así como en la osteopetrosis congénita, enfermedades en las cuales la utilización de IFN $\gamma$ -1b (ACTIIMUNE) se implementó por la FDA desde 1991 y 2000 respectivamente. El uso de IFN $\gamma$ -1b, como un agente anti-fibrótico ha sido utilizado en el tratamiento de la fibrosis pulmonar idiopática, y como adyuvante a un tratamiento primario en cáncer de ovario, cáncer de vejiga, esclerodema/esclerosis sistémica y tuberculosis principalmente por sus propiedades inmunomoduladoras, con diferentes grados de éxito. Junto con los efectos benéficos del interferón, vienen los efectos colaterales como fiebre, cefalea, mialgia, fatiga, que han logrado reducirse conforme el tratamiento progresa y con la administración de acetaminofén (Mather, 2007).

El IFN $\gamma$  como tratamiento adyuvante a la quimioterapia de pacientes con tuberculosis sensible y resistente a fármacos ha tenido mucho éxito (Smith, 1997), ya que los signos y síntomas mejoran a partir del primer mes de administración, los

## INTRODUCCIÓN

---

---

cultivos y los frotis se vuelven negativos a la presencia de bacilos y hay una notable mejoría en las lesiones observadas en las radiografías (Koh, 2004 ; Condos,1997). En general el tratamiento con IFN $\gamma$  recombinante es seguro y bien tolerado pero costoso. Después de un año de concluir el tratamiento con IFN $\gamma$ , la mayoría de las personas permanecen negativas en los estudios bacteriológicos, clínicos y radiológicos (Suárez, 2004). Ha sido reportado el caso de una paciente con una infección pulmonar progresiva por micobacterias no-tuberculosas, cuya producción *in vitro* de IFN $\gamma$  en células de sangre total con o sin estímulo indicó deficiencia funcional del IFN $\gamma$ . No hubo ninguna evidencia de mutación en los receptores de IL-12, ni de las citocinas IL-12 e IL-18. Los autores sugieren que la paciente tiene una anomalía en el mecanismo de secreción o transporte del IFN $\gamma$ , ya que se detectaron niveles intracelulares normales o altos en células estimuladas con PMA e ionomicina. El tratamiento con IFN $\gamma$  recombinante inhalado, 3 veces a la semana (500 $\mu$ g) por 3 meses, fue bien tolerado y con excelentes resultados clínicos (Hallstrand, 2004).

## ANTECEDENTES

En los ratones y en los humanos, la inmunidad contra *M. tuberculosis* depende fuertemente de la producción de las citocinas Th1 y de TNF- $\alpha$  (Flynn, 2001 ; Young, 2002 ; Boehm, 1997). El IFN $\gamma$  es una citocina que promueve y es clave en la respuesta inmune tipo Th1. Por ejemplo, los niños con mutaciones genéticas en los receptores de IFN $\gamma$  son muy susceptibles a la enfermedad micobacteriana (Dorman, 2000). Además, los ratones inactivados genéticamente en IFN $\gamma$  o en su receptor (ratones *knockout*) presentan muchos defectos en la función inmune (Dalton, 1993, Huang, 1993) y presentan mayor susceptibilidad a muchos patógenos intracelulares tales como *Leishmania major*, *Listeria monocytogenes*, *M. tuberculosis* y algunos virus (Boehm, 1997; Bogdan, 2001). Debido a esto, los ratones deficientes para el IFN $\gamma$  (IFN $\gamma$  KO) son incapaces de contener y controlar la infección con las cepas virulentas de *M. tuberculosis*, porque no producen intermediarios reactivos de nitrógeno y por lo tanto el crecimiento bacilar está exarcebado. Esos estudios también demuestran que el IFN $\gamma$  es esencial para la integridad de los granulomas (Bogdan, 2001 ; Cooper, 1993).

Las células productoras de IFN $\gamma$  son las células Th-1 activadas, las células NK y las células T CD8<sup>+</sup> citotóxicas (Flynn, 2001 ; Boehm, 1997). El IFN $\gamma$  induce la expresión de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad clase I y II, del TNF $\alpha$  y de su receptor, así como de la enzima iNOS (Boehm, 1997 ; Flynn, 1993).

Existen efectos sinérgicos entre el IFN $\gamma$  y TNF $\alpha$  principalmente en la activación del factor nuclear- $\kappa$ B que induce la transcripción de genes blanco (Baldwin,1996). Así mismo, la administración de IFN $\gamma$  en animales aumenta la resistencia a varios patógenos intracelulares facultativos, como *Pseudomonas aeruginosa*, *Legionella*

## ANTECEDENTES

---

*pneumophila*, *Listeria monocytogenes*, *Pneumocystis carinii*, *Mycoplasma pulmonie* y *Toxoplasma gondii* (Boehm, 1997 ; Lei, 1997; Skerrett, 1994 ; Steinmüller, 2000). Debido a esto, el IFN $\gamma$  recombinante ha sido utilizado como inmunoadyuvante en pacientes con tuberculosis resistente y sensible a fármacos con resultados exitosos (Smith-Jones, 1997 ; Koh, 2004). En estos estudios, los cultivos de esputo y frotis fueron negativos para la presencia de micobacterias y se observó una mejoría clínica y radiográfica después de los tres meses de administración del IFN $\gamma$  (Koh, 2004, Condos 1997) y un año después del tratamiento, la mayoría de los pacientes fueron negativos en ambos estudios (Suarez-Mendez, 2004). Por lo tanto, el tratamiento adyuvante con IFN $\gamma$  recombinante en humanos es bien tolerado (Hallstrand, 2004).

Una forma novedosa de administración del IFN $\gamma$  es a través de vectores virales, en este proyecto se utilizaron los adenovirus recombinantes deficientes en la replicación. Estos presentan varias ventajas como son un gran tropismo hacia el epitelio bronquial, además su eficiente capacidad adyuvante hacia las células Th-1, así como una alta expresión génica *in vivo* y su bajo costo de producción (Graham, 2000; Tatsis, 2004).

Nuestro grupo ha demostrado que cuando los ratones BALB/c son infectados por la vía intratraqueal con dosis altas de *M. tuberculosis* de la cepa H37Rv, se presenta una respuesta Th1 que alcanza su máxima expresión a las 3 semanas, la cual controla temporalmente el crecimiento bacteriano (Hernández-Pando, 1996). Posteriormente, la proliferación bacteriana resurge, acompañada por el aumento de las citocinas Th2 y la disminución de IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  e iNOS (Hernández-Pando, 1996, 1997 y 2001). El cambio en la producción de citocinas Th2 que se observa en BALB/c no se observa en los

## ANTECEDENTES

---

---

modelos de tb experimental desarrollados en ratones C57BL/6, los cuales se caracterizan por presentar granulomas pulmonares, extensa consolidación pulmonar y respuesta Th1 sostenida con alta producción de IFN $\gamma$  (Schroder,2004).

### PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la fase crónica de la tuberculosis pulmonar humana y en el modelo murino a estudiar, coexiste un patrón de citocinas de tipo Th1 y Th2, con un predominio de las citocinas de Th2 que llevan a la progresión de la enfermedad y a la muerte causada por neumonía. Es posible que la eficiencia funcional de las citocinas de tipo Th1 se reduzca por los altos niveles de citocinas de tipo Th2 y el TGF $\beta$  que es una potente citocina inmunosupresora de Th1. Por lo anterior proponemos reestablecer la respuesta inmune celular protectora, induciendo la expresión de IFN $\gamma$ , citocina que activa a los macrófagos que son las principales células fagocíticas que a través de diferentes mecanismos destruyen a la micobacteria.

Actualmente, se utilizan antibióticos para tratar la tuberculosis pero son largos y causan efectos secundarios, por lo que muchos pacientes abandonan el tratamiento, lo que da lugar a recaídas y la aparición de cepas MDR, complicando el control de la enfermedad. Por este motivo, es necesario buscar nuevas terapias que sean cortas, inocuas y efectivas, por ello proponemos el uso de adenovirus recombinantes como terapia sola o adyuvante, ya que se utiliza una sola dosis, reduciendo los largos tiempos de tratamiento. Los adenovirus recombinantes tienen un gran tropismo hacia el epitelio respiratorio por lo que permite la especificidad de acción en el lugar donde se requiere, y como han sido manipulados genéticamente no se replican y por lo tanto son seguros. De hecho, los adenovirus son eliminados del organismo después de algunos días, por lo que la expresión de la citocina es transitoria, evitando el daño colateral por exceso de la misma (Alba, 2005). El IFN $\gamma$ , por sus múltiples blancos celulares es muy efectivo para el control de la tuberculosis pulmonar experimenta

### **HIPÓTESIS**

Si el tratamiento con adenovirus recombinantes que expresen IFN $\gamma$ , se les administra a ratones infectados con *M. tuberculosis* revertirá el patrón de citocinas Th2 a Th1, controlando la infección.

### **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el efecto terapéutico de adenovirus recombinantes que codifican a IFN $\gamma$ , administrados durante la fase progresiva de la enfermedad en un modelo experimental de tuberculosis pulmonar en ratones BALB/c infectados con las cepas de laboratorio H37Rv y un aislado clínico MDR.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1.-Generar adenovirus recombinantes que codifican IFN $\gamma$  murino en título alto.
- 2.-Determinar la capacidad de AdIFN $\gamma$ , para infectar células y para secretar IFN $\gamma$  con actividad biológica eficiente en ensayos *in vitro* e *in vivo*
- 3.-Determinar el tipo de células que se infectan *in vivo* con los adenovirus recombinantes por inmunohistoquímica.
- 4- Determinar el efecto terapéutico de AdIFN $\gamma$  y del tratamiento combinado en los ratones infectados con la cepa de H37Rv *M. tuberculosis* a través de ensayos microbiológicos, de biología molecular e histología.
- 5.-Determinar las subpoblaciones de linfocitos T por citometría de flujo que tienen mayor relevancia en el control de la infección.
- 6.- Determinar el efecto terapéutico de AdIFN $\gamma$  en ratones infectados con un aislado clínico MDR de *M. tuberculosis*, utilizando técnicas microbiológicas, de biología molecular e histología.

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### ***I. GENERACIÓN DE ADENOVIRUS RECOMBINANTES QUE CODIFICAN A IFN $\gamma$ MURINO***

El cDNA de IFN $\gamma$  murino se obtuvo del plásmido pcDNA3-IFN $\gamma$ m (proporcionado por el Dr. J. Berumen de la Unidad de Medicina Experimental del Hospital General de México). El cDNA de IFN $\gamma$  se secuenció en su totalidad para verificar que correspondía a la secuencia publicada en el banco de genes con el número de acceso NM\_008337 (Gray, 1983). Posteriormente, el cDNA de IFN $\gamma$ m se subclonó específicamente en los sitios de restricción *Xba*I y *Bam*HI en el sitio de multiclonación del vector pCMV5. Para verificar la actividad biológica de IFN $\gamma$ m, las células COS-1 (American Type Culture Collection, ATCC # CRL-1650) se transfectaron transitoriamente por el método dietilamino-etil-dextran (Seed, 1987) utilizando la construcción pCMV5-IFN $\gamma$ m y el vector vacío pCMV5 (Mata-Espinosa, 2001). Los sobrenadantes se recuperaron a las 24h postransfección y se usaron para determinar la concentración y la actividad biológica de IFN $\gamma$  a través del ensayo inmunoabsorbente unido a enzimas (ELISA) y el ensayo de producción de nitritos, respectivamente.

Para construir el AdIFN $\gamma$  y su control AdGFP se siguió el procedimiento descrito por He, *et al* (1998). Brevemente, el cDNA de IFN $\gamma$  se subclonó dentro del sitio de multiclonación de un vector de transporte, AdTrack-CMV, que contiene la proteína verde fluorescente (GFP) como gen reportero. La subclonación del cDNA de IFN $\gamma$  fue entre el promotor de citomegalovirus murino y el sitio de poliadenilación, específicamente entre los sitios de restricción *Xho*I y *Hind* III. El plásmido resultante se linearizó por digestión

con la enzima de restricción *PmeI* y se cotransformó en *E. coli* cepa BJ5183 con un plásmido que contenía el genoma adenoviral, AdEasy-1, el cual contiene todas las secuencia del adenovirus serotipo 5 excepto los nucleótidos que abarcan los genes E1 y E3. Las bacterias recombinantes se seleccionaron por su resistencia a kanamicina y la recombinación se confirmó por el corte de la enzima de restricción *PacI*. Finalmente el plásmido recombinante linearizado se transfectó en células 293 (ATCC # CRL-1573) empaquetadoras de adenovirus que proporcionaron las proteínas E1 necesarias para generar adenovirus. Para la transfección se utilizó lipofectAMINA (Invitrogen) siguiendo las recomendaciones del fabricante. El adenovirus recombinante que expresa la proteína verde fluorescente, AdGFP, se construyó de manera similar, el procedimiento se facilitó debido a que el gen de la GFP estaba integrado al AdTrack-CMV (Mata-Espinosa, 2001)). Los adenovirus recombinantes se seleccionaron tres veces en células 293 y en cada selección se confirmó la expresión de IFN $\gamma$  por western blot, esta técnica se describe más adelante.

### **1. EXPANSIÓN DE LA CLONA SELECCIONADA PARA UTILIZAR COMO SEMILLA EN LA PRODUCCIÓN DE “CONCENTRADOS” ADENOVIRALES DE TÍTULO ALTO**

Para expandir la clona seleccionada, se infectaron 10 cajas de 6 pozos con la cantidad de virus que infectan el 80% en 2 días. Se extrae el virus, se recuperan las células con gendarme y después se centrifugan a 1500 rpm por 10 min, se recuperan en 3.6ml de HBSS. Para obtener el virus se congela en hielo seco-etanol y se descongela en un baño a 37°C, por tres veces, después se centrifuga 10 min a 14000 rpm, se recupera el sobrenadante y se le agrega 400 $\mu$ l de buffer de almacenamiento

10X (Tris 10M pH 8.0, cloruro de magnesio 10 M, 50% sacarosa). Se titula como se describe más adelante y se guarda a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

Los adenovirus recombinantes que exclusivamente expresan GFP se utilizaron para monitorear la eficiencia de infección celular *in vitro* por microscopía de fluorescencia y también se utilizaron como control negativo de los experimentos *in vivo*.

### **2. PRODUCCIÓN DE TÍTULOS ALTOS DE AdIFN $\gamma$ Y AdGFP**

Una producción alta y eficiente de AdIFN $\gamma$  y AdGFP fue obtenida utilizando discos fibra-cel® (New Brunswick Scientific, Edison, NJ.USA) y “spinner baskets”® (NBS, Edison NJ.USA). Los discos de fibra-cel son matrices electrostáticamente cargadas (<http://www.nbsc.com/products/spinner.htm>), constituidos de poliéster y polipropileno conformando una red tridimensional que permite que la unión de las células productoras de virus sea muy eficiente y además favorece el crecimiento celular activo.

Aproximadamente  $150 \times 10^6$  de células 293 se sembraron dentro de un “spinner basket” conteniendo 5g de discos fibra-cel, medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) con 4.5g/L de glucosa y con 10% suero fetal bovino (SFB) (Gibco/BRL. Gran Island, NY, USA). Los “spinner basket” se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$  en agitación continua durante 7 días. El pH del cultivo fue neutro y monitoreado constantemente durante el tiempo de incubación. Para generar concentrados virales de alto título, las células 293 se infectaron a un índice de multiplicidad de infección (MOI) de 0.1 por 5 días, por estudios cinéticos preliminares, se determinó que esas son las condiciones (MOI y tiempo) bajo las cuales se obtiene una máxima producción viral. La eficiencia de la infección se monitoreó con GFP por microscopía de fluorescencia. Una de las ventajas

de usar la fibra-cel es que los adenovirus producidos son secretados al medio de cultivo. Después de 5 días, se recupera el sobrenadante e inmediatamente se procesa para purificar los adenovirus por precipitación con polietilenglicol al 10% (Sigma) y con NaCl 0.5M (Sigma), además de una diálisis exhaustiva con buffer de almacenamiento 1x. Por este método usualmente se produce entre  $1-3 \times 10^{11}$  adenovirus recombinantes purificados de 500 ml de sobrenadante.

### ***3. TITULACIÓN POR INMUNOCITOQUÍMICA DE ADENOVIRUS RECOMBINANTES DE TÍTULO ALTO***

Los concentrados de adenovirus purificados fueron titulados por duplicado a través del conteo de unidades formadoras de placas (PFU). Brevemente, las monocapas de células 293 se infectan con diluciones seriadas del virus, se incuban por 40 h a 37°C y se fijan con metanol:acetona (1:1), se lavan 2 veces con buffer de salina y fosfatos (PBS). La detección de placas virales fue desarrollada con un anticuerpo policlonal anti-adenovirus hecho en conejo (1/2000) e incubada toda la noche a 4°C. Los anticuerpos fueron hechos en conejos utilizando un sonicado de adenovirus tipo 5, los sueros fueron específicos para reconocer proteínas virales. Después de lavar, las células fueron incubadas con proteína A marcada con peroxidasa diluidas 1/1000 (Sigma) en PBS, durante 1h a temperatura ambiente. La peroxidasa se reveló con 3,3' dimetoxibenzidina (Sigma) y peróxido de hidrógeno. Las placas virales (PFU) fueron contadas utilizando un microscopio invertido.

## ***II. DETERMINACIÓN DE LA SECRECIÓN $IFN\gamma$ Y BIOACTIVIDAD EN LOS SOBRENADANTES DE CÉLULAS Mv1Lu INFECTADAS CON EL ADENOVIRUS RECOMBINANTE***

La capacidad del adenovirus recombinantes para infectar células eucariotas y transducir el gen de  $IFN\gamma$  fue confirmado a través de 3 diferentes métodos: ELISA, western blot y producción de nitritos.

Las células epiteliales de pulmón, Mv1Lu, (ATCC # CCL-64) provenientes de la American Type Culture Collection (Rockville, MD) se recuperaron en DMEM con 10% SFB se sembraron en placas de 6 pozos ( $7 \times 10^5$  células por pozo). Al día siguiente, las células Mv1Lu se infectaron con (MOI=250) Ad $IFN\gamma$  o AdGFP por 1 hr en medio sin SFB. Después de 72 hrs de incubación, se checó la eficiencia de la infección a través de la detección de GFP por microscopía de fluorescencia. Los sobrenadantes se recuperaron y se guardaron a  $-70^{\circ}C$  hasta su uso.

### ***1. ELISA PARA DETERMINAR LA CONCENTRACIÓN DE $IFN\gamma$***

Los sobrenadantes se utilizaron para cuantificar los niveles de  $IFN\gamma$  secretados con un kit de ELISA (Pharmigen, San Jose CA, USA), brevemente, se sensibilizaron placas de 96 pozos con  $0.5\mu g/ml$  de anticuerpo monoclonal anti- $IFN\gamma$  disuelto en  $100\mu l$  de buffer de carbonatos  $0.05 M$ , pH 9.5, se incubaron toda la noche a  $4^{\circ}C$ . Después los pozos se lavaron con PBS-Tween 20 0.05% y se bloquearon con albúmina sérica bovina (BSA) al 3% (Sigma) en PBS por 2 hrs a  $37^{\circ}C$ . Los sobrenadantes diluidos y la curva estándar de  $IFN\gamma$  recombinante fueron incubados por duplicado por 2 hrs a  $37^{\circ}C$ .

Después se lavaron los pozos, se incubaron con un anticuerpo policlonal anti-IFN $\gamma$  biotinilado diluido 1/250 en PBS-3% BSA y un conjugado de peroxidasa estreptavidina diluida 1/250 en PBS-3%BSA por 1 hr a temperatura ambiente. Para revelar se usaron tetrametilbenzidina y peróxido de hidrógeno (Pharmigen, San Diego CA.US), la densidad óptica se midió a 450 nm.

### **2. WESTERN BLOT**

Para el western blot, se utilizaron cantidades iguales de proteína de los sobrenadantes, fueron analizados por electroforesis en geles de poliacrilamida (8%) y transferidos a membranas de polivinilideno difluoruro (Millipore). Las membranas se bloquearon con leche (Difco<sup>TM</sup>, BD) al 5% por 2 hrs a temperatura ambiente, se incubaron con anticuerpo anti-IFN $\gamma$  de ratón (R&D systems) a una dilución 1/500 por 1 hr en agitación. Las membranas se lavaron y se les agregó el segundo anticuerpo anti-IgG peroxidado a una dilución 1/10000 (R&D systems). Los immunoblots se revelaron utilizando un kit de quimioluminiscencia (Amersham Biosciences, New Jersey, USA).

### **3. DETERMINACIÓN DE NITRITOS POR EL MÉTODO DE GRIESS**

Para verificar la actividad biológica del IFN $\gamma$  secretado, determinamos la producción de nitritos, a través de la estimulación de macrófagos de ratón durante 18 hrs con los sobrenadantes provenientes de las células Mv1Lu infectadas con AdIFN $\gamma$  o AdGFP. Para obtener macrófagos peritoneales, los ratones BALB/c fueron inyectados por vía intraperitoneal con 1 ml de aceite mineral ligero estéril (Sigma), y después de 5 días los macrófagos peritoneales fueron colectados de 10 animales en condiciones de esterilidad. Las células colectadas fueron lavadas 2 veces con solución Alsever

(glucosa 0.1M, citrato de sodio 27mM, ácido cítrico 2mM, cloruro de sodio 71mM, pH 6.1) para remover el exceso de aceite. Después, las células se centrifugaron y los glóbulos rojos se eliminaron con un buffer de lisis (cloruro de sodio 0.2%, agitación, cloruro de sodio 1.6%). Después de lavar con la solución de Alsever, los macrófagos se resuspendieron en DMEM con 10% SFB y se sembraron en placas de 96 pozos ( $1 \times 10^6$  de células por pozo). Después de 3 hrs, los macrófagos ya se habían adherido a los pozos, así que se sustituyó el medio de cultivo por diferentes diluciones de los sobrenadantes de las células Mv1Lu infectadas con AdIFN $\gamma$  o AdGFP, se incubaron a 37°C con 5% CO $_2$  por 18 hrs. Para determinar la producción de nitritos, 50  $\mu$ l del sobrenadante de cada pozo se transfirieron a otra placa y se incubaron con 150  $\mu$ l de una solución 1:1 de 0.1% sulfanilamida disuelta en agua y 0.1% N-(1-naftil) etilendiamina dihidroclorada en 2.5% de ácido fosfórico (reactivo de Griess). Después de 10 min, la concentración de nitritos fue determinada por espectrofotometría a 540 nm utilizando una curva estándar de nitrito de sodio.

### ***III. DETERMINACIÓN DE LA INFECCIÓN CON DIFERENTES DOSIS DE AdIFN $\gamma$ Y LA EXPRESIÓN GENÉTICA DEL IFN $\gamma$ EN LOS PULMONES DE RATONES POR PCR CONVENCIONAL***

La capacidad de AdIFN $\gamma$  de infectar pulmones de ratones sanos y la dosis apropiada de adenovirus recombinante requerida para tratar ratones tuberculosos fue determinada infectando ratones BALB/c sanos con 3 diferentes dosis ( $3.4 \times 10^8$ ,  $1.7 \times 10^9$ ,  $3.4 \times 10^9$  pfu) por la vía intratraqueal, y checando los niveles y duración de la expresión de IFN $\gamma$  por PCR convencional, descrito previamente en Hernández-Pando, 1996.

Los ratones BALB/c se anestesiaron con vapores de sevoflurano (Laboratorios Abbott, México) y se colocaron en una caja de acrílico sellada, hasta que se observó que la respiración era lenta. Los ratones se inmovilizaron en una placa de unisel y se infectaron, utilizando un cánula rígida con punta esférica (Thomas Scientific, Swedesboro, N.J.) unida a una jeringa de insulina. La cánula fue introducida dentro de la boca del ratón, la cual entró directamente en la traquea. La dosis de adenovirus recombinante se resuspendió en 100  $\mu$ l de volumen final con el buffer de almacenamiento. Los ratones se mantuvieron en posición vertical hasta que el efecto de la anestesia pasó. Después, grupos de 3 ratones fueron sacrificados por exsanguinación bajo anestesia terminal después de 6 hr, 1, 2, 7, 14 y 21 días, los pulmones fueron inmediatamente colectados y procesados para la extracción de RNA total utilizando el mini kit RNeasy (Qiagen, Hilden, Alemania) y utilizados para el análisis por PCR en tiempo real, como se describe más adelante.

#### ***IV. MODELO EXPERIMENTAL DE LA TUBERCULOSIS PULMONAR PROGRESIVA EN RATONES BALB/C***

El modelo experimental de tuberculosis pulmonar progresiva ha sido descrito previamente (Hernández-Pando, 1996; Hernández-Pando, 1997). Brevemente, las cepas virulentas de *M. tuberculosis* H37Rv y MDR (aislado clínico, resistente a todos los antibióticos de primera línea), fueron cultivadas en medio Proskauer y Beck (Laboratorios Difco. Detroit, MI). Después de un mes de cultivo, las micobacterias fueron cosechadas y mantenidas a -70°C hasta que fueron usadas. Antes de su uso, las

## MATERIALES Y MÉTODOS

---

bacterias fueron contadas y su viabilidad fue revisada utilizando diacetato de fluoresceína (Jarnagin, 1980).

Los ratones BALB/c machos de 6-8 semanas de edad fueron anestesiados con sevoflurano e infectados por vía intratraqueal como se describió anteriormente, con  $2.5 \times 10^5$  bacterias viables resuspendidas en 100  $\mu$ l de PBS. Los ratones infectados fueron mantenidos en grupos de 5 en cajas con microaisladores conectados a presión negativa. Todos los procedimientos fueron desarrollados en una campana de flujo laminar de bioseguridad de clase III. El protocolo fue aprobado por el Comité de ética para animales de experimentación del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición.

Los ratones sobrevivientes después de 60 días de infección con las cepas H37Rv y MDR fueron distribuidos al azar en seis grupos. El tratamiento comenzó a los 60 días después de la infección, y grupos de 5 ratones fueron sacrificados por exsanguinación bajo anestesia a los 7, 14, 30, 60, 90, 120, 150, 180 días después del comienzo del tratamiento, para poder estudiar los efectos de cada tratamiento. Todos los datos representan la media  $\pm$  desviación estándar ( $\pm$ DE) de 5 ratones por cada experimento y se realizaron dos experimentos diferentes.

El primer grupo de 40 ratones tuberculosos fueron tratados con una sola dosis de AdIFN $\gamma$   $1.7 \times 10^9$  PFU. El segundo grupo recibió una terapia combinada que incluye la quimioterapia convencional que es rifampicina (10mg/kg), isoniazida (10mg/kg), y pirazinamida (30mg/kg), administrados diariamente con una cánula intragástrica más AdIFN $\gamma$  también administrado con una cánula por vía intratraqueal en una sola dosis después de 60 días de infección. El tercer grupo de 40 ratones tuberculosos recibieron

solamente la quimioterapia convencional. El cuarto grupo correspondió a los ratones infectados con la cepa MDR tratados con una sola dosis de AdIFN $\gamma$   $1.7 \times 10^9$  PFU. Los grupos control infectados con las cepas H37Rv o MDR que recibieron el adenovirus control AdGFP usando la misma dosis de  $1.7 \times 10^9$  PFU.

El efecto de los tratamientos fue determinado por la cuantificación de la carga bacteriana de los pulmones (unidades formadoras de colonias, UFC), extensión del tejido dañado (neumonía) por histopatología/morfometría automatizada y la determinación de los niveles de expresión de citocinas/CCL-2 e iNOS por RT-PCR en tiempo real.

### ***V. DETERMINACIÓN DE LAS UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS EN PULMONES INFECTADOS***

Los pulmones derecho o izquierdo de cuatro ratones por cada tiempo de sacrificio fueron usados en dos diferentes experimentos. Los pulmones fueron homogenizados con un politrón (Kinematica, Luzern, Suiza) en tubos estériles conteniendo 1ml de PBS- tween 80 al 0.05%. Cuatro o cinco diluciones de cada homogenado fueron sembradas por duplicado en placas conteniendo agar Bacto Mediabrook 7H10 (laboratorios difco, Detroit MI) enriquecido con ácido oleico, albúmina, catalasa y dextrosa (Becton, Dickinson y Compañía, Sparks, MD). El número de colonias fue contado después de 14 días de inoculación.

**VI. PREPARACIÓN DE TEJIDO PARA EL ESTUDIO HISTOLÓGICO/MORFOMÉTRICO E INMUNOHISTOQUÍMICA**

Para el estudio histológico, tres pulmones derecho o izquierdo fueron intratraquealmente perfundidos con etanol absoluto. En el caso del análisis de los ratones sanos infectados con los adenovirus recombinantes, se obtuvieron hígado, riñones y pulmones, se siguió el mismo procedimiento. Las secciones parasagitales de los órganos fueron deshidratadas y embebidas en parafina, cortadas y teñidas con hematoxilina y eosina. El área de los granulomas fue medido en micras cuadradas y el porcentaje del pulmón afectado por neumonía fue determinado utilizando un analizador de imágenes (Q Win Leica, Milton Keynes, UK). Las mediciones fueron tomadas a ciego y los datos fueron reportados como la media  $\pm$ DE de 3 ratones diferentes en cada tiempo de dos diferentes experimentos.

**1. INMUNOHISTOQUÍMICA**

Los mismos tejidos embebidos en parafina se utilizaron para este método, los cortes de pulmón se obtuvieron en laminillas silanizadas (silano al 2% en acetona). Para fijar y desparafinar, las laminillas se colocaron a 60-70°C por 20 min, después se incubaron 5 min en xileno, en vasos coplin se les dieron 5 baños en xileno-alcohol (1:1), 5 baños en alcohol absoluto, 5 baños en alcohol al 96% y 5 baños en agua. Para bloquear la peroxidasa endógena se incubaron en una solución de peróxido de hidrógeno al 10% en metanol (solución de bloqueo) por 10 min, y tres incubaciones más de 15 min en solución de bloqueo nueva. Se lavaron las laminillas con HCN1X-tween 20 (buffer de lavado). Para preparar el HCN 5X, se pesaron 11.915 g de HEPES, 43.83g de

NaCl y 1.468g de cloruro de calcio. Se marcaron las zonas de tejido con crayola y se le agrega al tejido 100 $\mu$ l de HCN1X-suero universal al 2%. Las laminillas se incubaron 30 min en cámara húmeda. Se lavaron 5 veces con el buffer de lavado. Las laminillas se incubaron con 100  $\mu$ l de anticuerpo primario (anticuerpo policlonal de conejo anti-IFN $\gamma$  (Santa Cruz) o anticuerpo policlonal de conejo anti- antígenos de adenovirus) durante toda la noche. Se lavaron 5 veces con el buffer de lavado. Las laminillas se incubaron con 100  $\mu$ l de anticuerpo secundario por 1h, se lavaron, se agregaron 100  $\mu$ l por tejido del complejo AB/HRP (Vectasin), se incubaron 30 min, se lavaron, se revelaron con 100  $\mu$ l por tejido con diaminobencidina/peróxido de hidrógeno (se pesó 0.004g de diaminobencidina se disolvió en 10 ml HCN1X y se le agregó 4  $\mu$ l de peróxido de hidrógeno), se lavaron y se contrastaron con hematoxilina, a cada laminilla se les agregó una gota de resina y se colocaron los cubreobjetos.

### ***VII. RT-PCR Y ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE CITOCINAS, CCL-2 E INOS POR PCR EN TIEMPO-REAL EN HOMOGENÁDOS DE PULMÓN***

#### ***1. EXTRACCIÓN DE RNA DE HOMOGENÁDOS DEL PULMÓN***

Tres pulmones, derecho o izquierdo, fueron usados para aislar RNA de los diferentes grupos de ratones en cada tiempo de sacrificio usando el minikit RNeasy (Qiagen, Hilden Alemania). Inmediatamente después del sacrificio cada pulmón fue colocado en 2 ml de medio RPMI (Invitrogen life Technologies, Carisbad, CA) conteniendo 0.5 mg/ml de colagenasa tipo 2 (Worthington, Lakewood NJ), e incubado por 1 hr a 37°C, después el pulmón fue macerado utilizando un émbolo de jeringa y se hizo pasar a través de un colador estéril de 70  $\mu$ m (BD Biosciences, Bedford, MA).

Entonces las células fueron centrifugadas a 1500 rpm por 1min a 4°C y lavadas con medio RPMI. Después el sobrenadante fue removido y las células rojas fueron lisadas con 1 ml de buffer de lisis (cloruro de amonio 0.34M, EDTA 0.12mM y carbonato de potasio 1mM), finalmente las células fueron lavadas y centrifugadas bajo las mismas condiciones mencionadas. Después se contaron  $5 \times 10^6$  células y se les agregó 350  $\mu$ l del buffer RLT (Qiagen, Hilden Alemania) con  $\beta$ -mercaptoetanol. El RNA se precipitó con etanol al 70% en agua libre de RNAsas, y se hizo pasar a través de una columna, se centrifugó a 14000 rpm por 1min a 4°C. El RNA unido a la columna se lavó con 700  $\mu$ l de 2 buffers que incluía el mini kit RNeasy (Qiagen, Hilden, Alemania), finalmente se eluyó con 50  $\mu$ l de agua libre de RNAsas. El RNA fue tratado con una unidad de DNasa (Invitrogen life technology, Carisbad CA) por cada microgramo de RNA. La calidad y cantidad del RNA también fueron evaluadas por espectrofotometría (260nm/280nm) y geles de agarosa. El cDNA fue sintetizado utilizando el kit omniscrypt RT (Qiagen, Hilden, Alemania) y oligo dT (Promega corporation Madison WI) y 100ng de RNA. La expresión del gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH) fue determinada por RT-PCR convencional, los cDNAs fueron amplificados con la DNA Polimerasa Hot Start Taq (Qiagen, USA).

### **2. PCR EN TIEMPO REAL**

La PCR en tiempo real fue desarrollada utilizando el equipo 7500 real time PCR system (Applied Biosystems, USA). Se utilizaron 100 ng de cDNA, 12.5  $\mu$ l de la mezcla Quantitect SYBR Green PCR (Qiagen,USA). (QuantiTect SYBR Green PCR Buffer: (que contiene Tris-Cl, KCl,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , pH 8.7), la mezcla de dNTP's

(dATP, dCTP, dGTP, dTTP/dUTP), SYBR green I y ROX), 50 pmol del iniciador sentido y 50 pmol del iniciador antisentido.

La formación de sólo un producto de PCR y el tamaño esperado del amplicón se confirmó por electroforesis del producto de PCR. Las alícuotas de los productos de PCR fueron usadas para la cuantificación en un gel por la medición y la comparación de las intensidades de los fragmentos teñidos con Sybr Green con un marcador de masa de DNA (Invitrogen). La curva estándar fue generada con una serie de diluciones seriadas de cada una de las citocinas. Las curvas estándar de productos de PCR cuantificados y diluidos, así como controles negativos, se incluyeron en cada corrida de PCR. Los iniciadores específicos fueron diseñados utilizando el programa Primer Express (Applied Biosystems, USA) para los siguientes blancos: G3PDH: 5'-ggcgctcacaaaacatca-3', 5'-ccggaatgccattcctgtta -3', iNOS: 5'-agcgaggagcaggtggaag-3', 5'-catttcgctgtctcccaa-3', TNF $\alpha$ : 5'-tgtggcttcgacctctacctc-3', 5'-gccgagaaaggctgcttg-3', IFN $\gamma$ : 5'-ggtgacatgaaaatcctgcag-3', 5'-cctcaaacttgcaatactcatga-3', CCL2 5'-ctcttctcctccaccacatg-3', 5'-ttaactgcatctgcctgagcc-3' y CCL3 5'-ccagccaggtgtcatttcc-3', 5'ttgagtcagcgcagatgtg-3'. Las condiciones usadas fueron: desnaturalización inicial a 95°C for 15 min, seguidas por 40 ciclos a 95°C por 20 seg, 60°C o 58°C por 20 seg, 72°C por 34 seg. La cantidades del RNAm específico en la muestra fueron medidas de acuerdo a lo que corresponde el gen específico estándar. El número de copias RNAm de cada citocina estuvieron relacionadas con un millón de copias de RNAm que codifican al gen de G3PDH.

### **VIII. ANÁLISIS DE CITOMETRÍA DE FLUJO**

Se utilizaron suspensiones celulares de pulmón para evaluar las subpoblaciones de T, los anticuerpos utilizados fueron antiCD3-PE (BD, Pharmigen San José CA.USA), anti-CD4-CY5 (BD, Pharmigen San Jose CA.USA) y anti-CD8-FITC (BD, Pharmigen San Jose CA.USA). Como previamente se describió en Pedroza, 2004. Las muestras fueron evaluadas en el equipo FACS Calibur utilizando el software CellQuest (BD. Biosciences). Los datos colectados fueron analizados con el software flowjo 6.1.

### **ESTADÍSTICA**

El análisis de varianza de una vía (ANOVA), fue usado para comparar las posibles diferencias en la carga bacilar y en la morfometría. Las diferencias significativas se buscaron entre el grupo control y el grupo de ratones tratados con AdIFN $\gamma$  así como el grupo que recibió el tratamiento combinado. Se utilizó el software SPSS 12.0 para Windows XP. Las diferencias entre los grupos tratados para el PCR tiempo-real y la concentración de nitritos fueron determinadas utilizando la prueba t-Student. La significancia fue aceptada a un valor de  $P < 0.05$ .

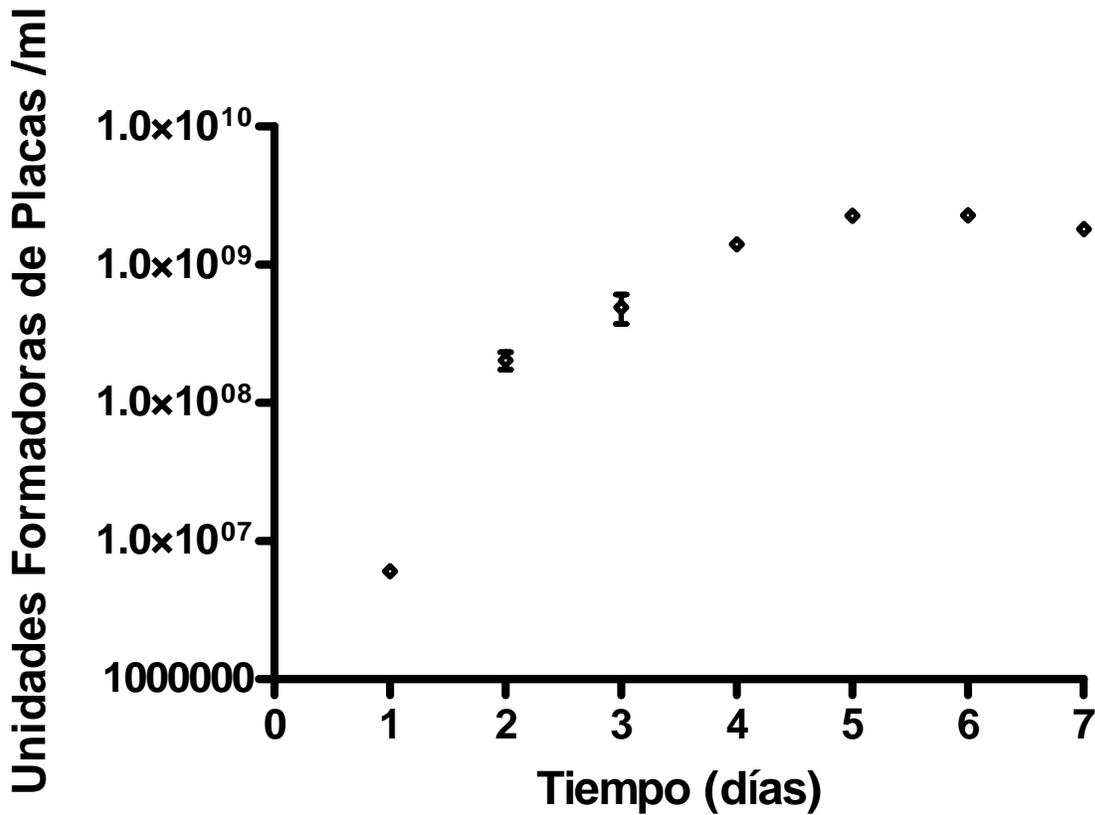
## RESULTADOS

### ***I. CINÉTICA DE LA PRODUCCIÓN ADENOVIRAL***

Para conocer el tiempo óptimo para recolectar la mayor cantidad de adenovirus de los cultivos en “spinner baskets”, se tomo una alícuota diariamente por 7 días y se determinó por inmunocitoquímica el título adenoviral. Como se observa en la **Figura 3** los días óptimos son el quinto y sexto con títulos de  $2.26 \times 10^9$  y  $2.28 \times 10^9$  pfu/ml respectivamente, en el séptimo día el título también fue bueno  $1.82 \times 10^9$  pfu/ml. La MOI utilizada fue de 0.1, este resultado nos permitió recolectar con confiabilidad el sobrenadante al quinto día en las posteriores amplificaciones virales.

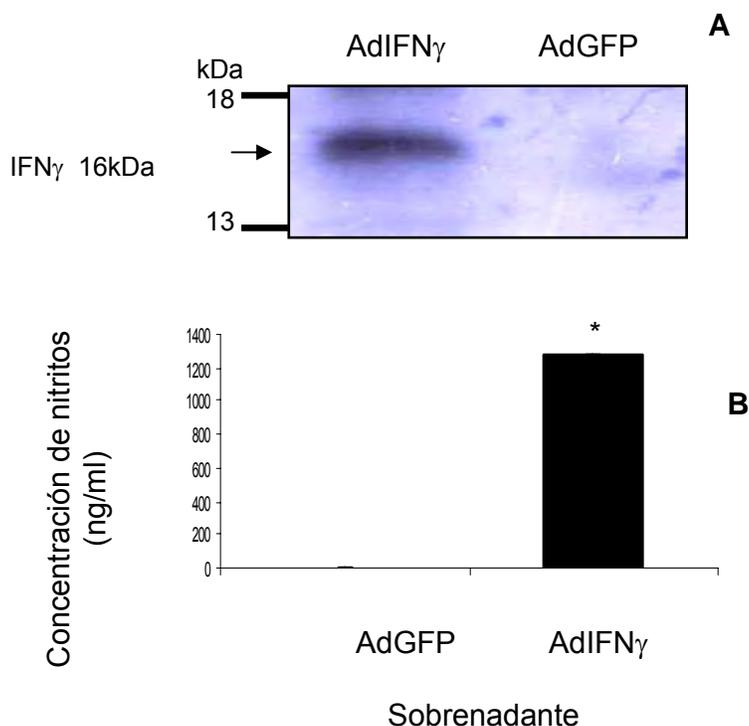
### ***II. ANÁLISIS IN VITRO E IN VIVO DE LA CAPACIDAD DE AdIFN $\gamma$ PARA INFECTAR CÉLULAS Y PARA SECRETAR IFN $\gamma$ CON ACTIVIDAD BIOLÓGICA EFICIENTE***

Para evaluar la actividad biológica *in vitro* del vector adenoviral, AdIFN $\gamma$ , las células epiteliales de pulmón (Mv1Lu) se infectaron a un MOI de 250 con AdIFN $\gamma$  y el adenovirus control, que exclusivamente expresa GFP (AdGFP). Después de 3 días de infección, los sobrenadantes del cultivo fueron colectados y se determinó la presencia de IFN $\gamma$  por Western blot y ELISA. Como se presenta en la **Figura 4A**, sólo en el sobrenadante del cultivo de las células infectadas con AdIFN $\gamma$ , se detectó una banda de 16 kDa, utilizando anticuerpos policlonales específicos que detectan IFN $\gamma$  murino. Por el ensayo de ELISA, se encontraron 156 ng/ml de la citocina (datos no mostrados) mientras que en los sobrenadantes de las células infectadas con AdGFP, no se detectó IFN $\gamma$  por ninguna de las técnicas mencionadas.



**Figura 3. Cinética de la producción adenoviral.** Se recolectaron alícuotas del medio de cultivo durante siete días y se determinó el título adenoviral mediante inmunocitoquímica. Encontramos que en el día cinco y seis se obtenía la mayor producción adenoviral,  $2.26 \times 10^9$  y  $2.28 \times 10^9$  pfu/ml respectivamente, en el día 7 disminuía un poco  $1.82 \times 10^9$  pfu/ml. El MOI utilizado fue de 0.1, la titulación se hizo por duplicado. Este resultado fue de gran utilidad para las posteriores amplificaciones de los adenovirus, porque nos indicaba que en el quinto y sexto día podíamos recuperar el sobrenadante con confiabilidad.

## RESULTADOS



**Figura 4. Los adenovirus recombinantes que codifican a IFN $\gamma$  inducen la secreción de la citocina con actividad biológica eficiente. (A)** Western blot de los sobrenadantes del cultivo de las células Mv1Lu infectadas con AdIFN $\gamma$  y AdGFP (MOI=250). La banda de 16 kDa que corresponde a IFN $\gamma$ , fue detectada utilizando anticuerpos anti-IFN $\gamma$  de ratón. **(B)** Producción de nitritos por macrófagos peritoneales de ratón, incubados con los sobrenadantes de cultivo de las células Mv1Lu, infectadas con AdIFN $\gamma$  o AdGFP (MOI=250). Se detectaron concentraciones altas de nitritos sólo en los macrófagos peritoneales incubados con los sobrenadantes de las células Mv1Lu infectadas con AdIFN $\gamma$ . Los datos son la media  $\pm$  desviación estandar (DE) de 2 experimentos realizados por triplicado. Los asteriscos representan una diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ ).

## RESULTADOS

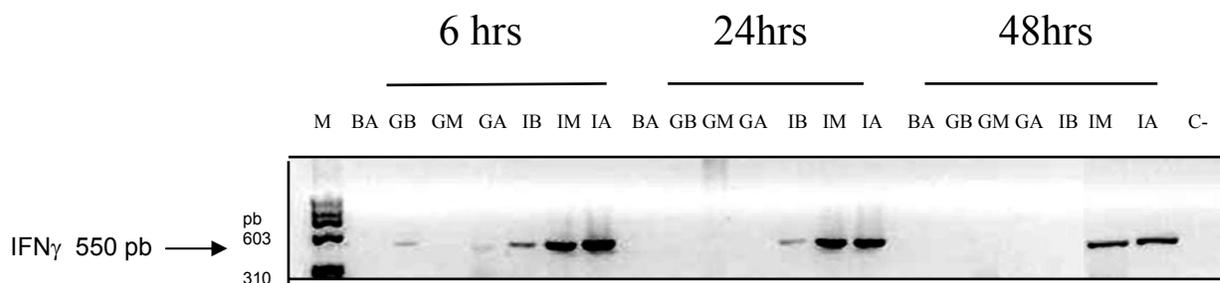
---

---

Estos resultados corroboran la secreción eficiente de IFN $\gamma$  por las células infectadas con AdIFN $\gamma$ . La actividad biológica del IFN $\gamma$  secretado, fue determinada por la capacidad del medio celular condicionado para estimular la producción de nitritos en macrófagos peritoneales murinos. Después de 18 hrs. de incubación de los macrófagos con el sobrenadante de células Mv1Lu infectadas con AdIFN $\gamma$ , se detectaron 1269 ng/ml de nitritos. En contraste con las células Mv1Lu infectadas con el virus control, AdGFP, cuyo sobrenadante no indujo la producción de nitritos (**Figura 4B**). Por lo anterior, se concluye que el adenovirus recombinante, tiene la capacidad de producir la citocina con actividad biológica efectiva.

Para estudiar la capacidad AdIFN $\gamma$  de infectar y producir IFN $\gamma$  *in vivo*, se realizó un experimento piloto, en el que se determinó la expresión del RNAm de IFN $\gamma$  por PCR convencional. Los ratones BALB/c sanos, se infectaron por la vía intratraqueal con AdIFN $\gamma$  y AdGFP. Las dosis utilizadas fueron: una dosis baja ( $3.4 \times 10^8$  PFU), una dosis intermedia ( $1.7 \times 10^9$  PFU) y una dosis alta ( $3.4 \times 10^9$  PFU) de adenovirus por ratón. La electroforesis de la PCR convencional, nos sugería que las dosis intermedia y alta eran las más adecuadas, porque a las 6, 24 y 48 hrs hubo mayor expresión del RNAm de IFN $\gamma$  (**Figura 5**). La dosis intermedia mostraba un nivel de expresión génica similar a la inducida por la dosis alta y permitía ahorrar adenovirus recombinante por lo que se decidió utilizar en los experimentos posteriores. Esta dosis cae dentro del rango utilizado en estudios similares previamente publicados (Lei, 1997; Gao, 2002). Cabe mencionar, que se detectó una ligera expresión de RNAm de IFN $\gamma$  a las 6hrs en los ratones que recibieron el adenovirus control, AdGFP. Para las 24 y 48 hrs no se observó ninguna expresión.

## RESULTADOS



**Figura 5. Cinética de la expresión de IFN $\gamma$  en ratones sanos infectados con diferentes dosis de adenovirus recombinantes.** Electroforesis de una PCR convencional de IFN $\gamma$  de ratones infectados con tres dosis de AdIFN $\gamma$  y AdGFP (baja  $3.4 \times 10^8$  pfu, intermedia  $1.7 \times 10^9$  pfu y alta  $3.4 \times 10^9$  pfu) a diferentes tiempos. **(M)** Peso molecular, **(BA)** Buffer de almacenamiento del adenovirus, **(GB)** AdGFP dosis baja, **(GM)** AdGFP dosis intermedia, **(GA)** AdGFP dosis alta, **(IB)** AdIFN $\gamma$  dosis baja **(IM)** AdIFN $\gamma$  dosis intermedia **(IA)** AdIFN $\gamma$  dosis alta, **(C-)** Control negativo. Este experimento piloto, nos sugería que la dosis intermedia era la más adecuada para utilizar en los experimentos posteriores. Además de que la dosis intermedia presenta mayor expresión de RNAm de IFN $\gamma$  a las 6, 24 y 48 h con respecto a la dosis baja, presenta niveles similares a los de la dosis alta, el uso de la dosis intermedia, nos permitía ahorrar dosis de adenovirus recombinante.

## RESULTADOS

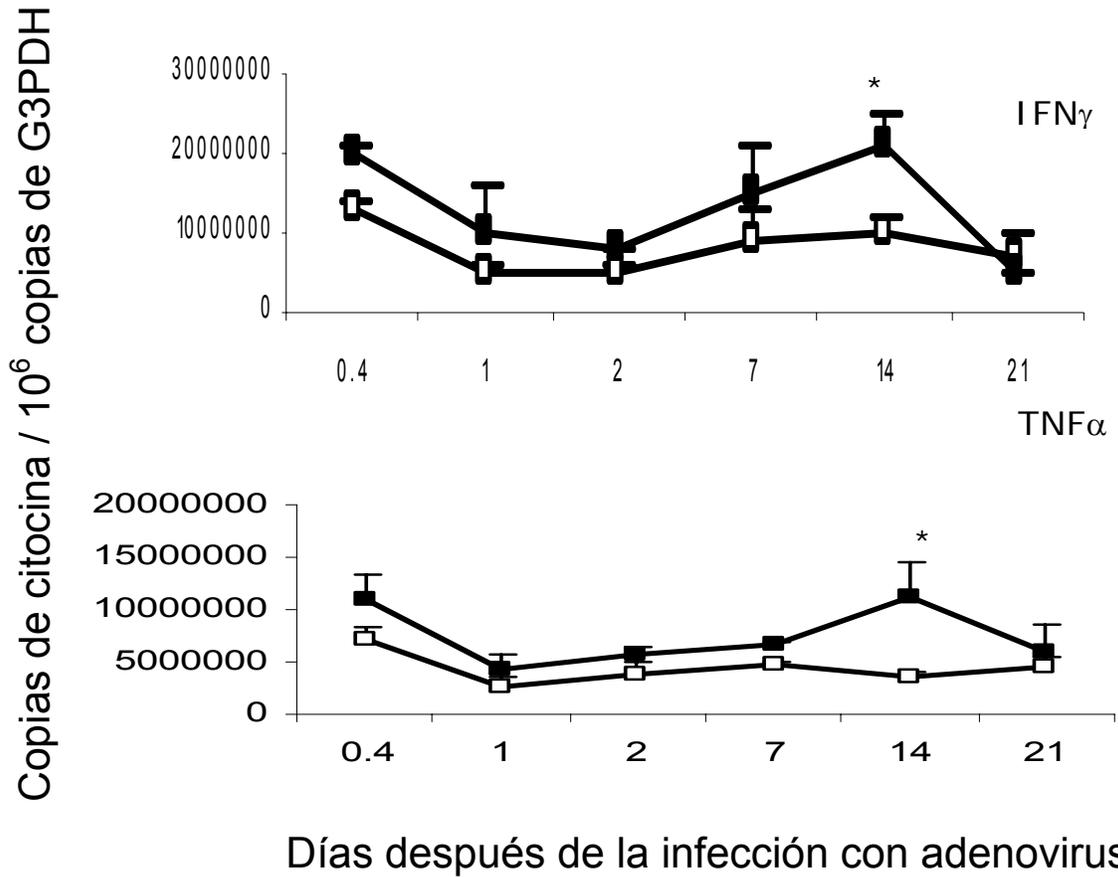
---

---

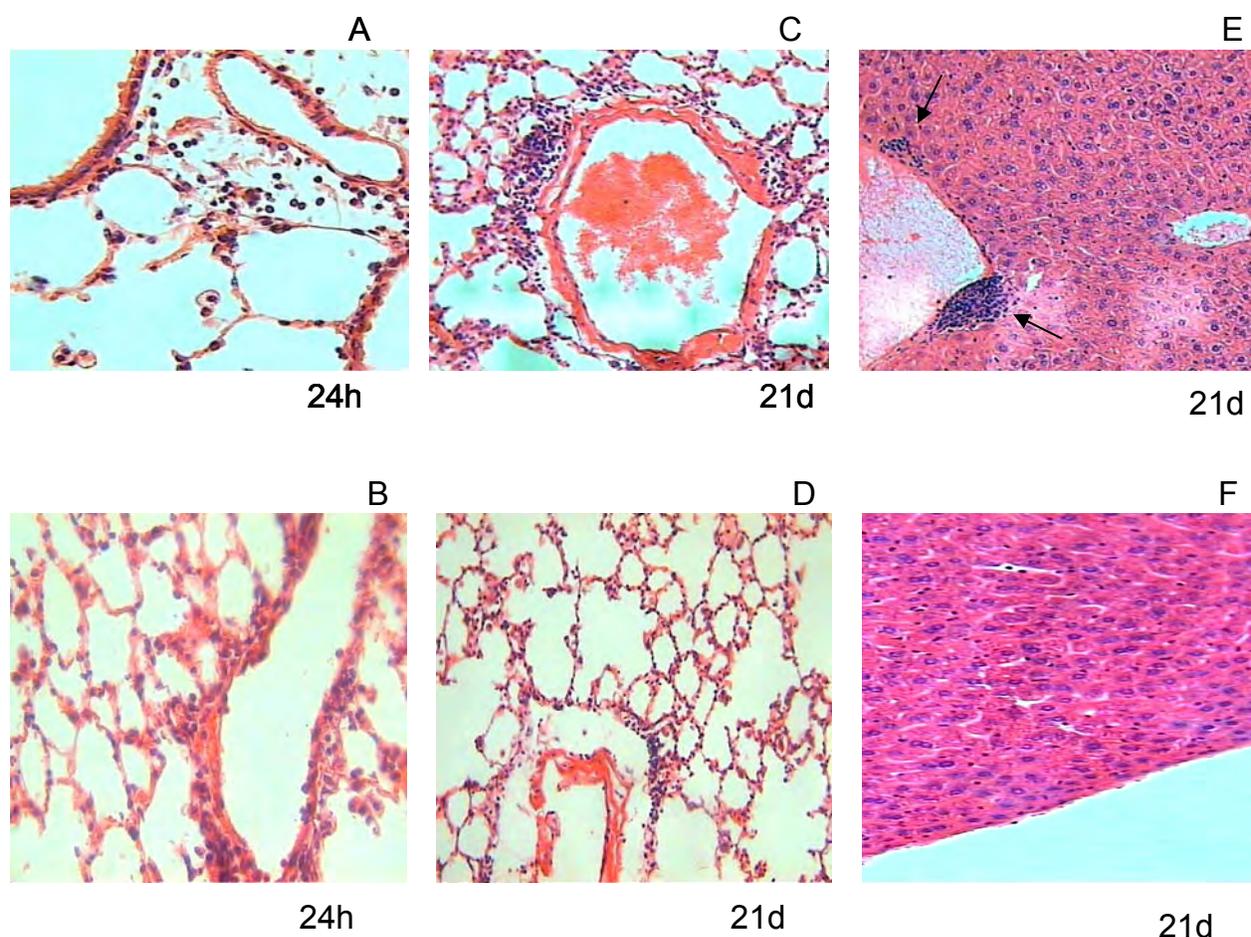
Para obtener un análisis cuantitativo de la expresión del RNAm de  $IFN\gamma$  y de  $TNF\alpha$ , que es una citocina que la producen los macrófagos por la activación con  $IFN\gamma$ . Se determinó por RT-PCR en tiempo-real, la expresión de  $IFN\gamma$  y  $TNF\alpha$ , para ello se administró a ratones sanos la dosis intermedia de Ad $IFN\gamma$  y AdGFP ( $1.7 \times 10^9$  PFU). Como se presenta en la **Figura 6**, después de 14 días de la administración intratraqueal con los adenovirus recombinantes, Ad $IFN\gamma$ , se induce una alta expresión de RNAm para  $IFN\gamma$  y  $TNF\alpha$  con diferencia significativa con respecto a la expresión inducida por los adenovirus control, AdGFP.

También se realizó un estudio histopatológico de los pulmones, hígado y riñones de estos ratones. A las 24 h después de la inoculación de los adenovirus recombinantes, Ad $IFN\gamma$  y AdGFP, se observa en el pulmón una respuesta inflamatoria moderada constituida por neutrófilos, linfocitos y macrófagos localizados alrededor de las paredes vasculares y bronquiales, así como en el intersticio alveólo capilar (**Figura 7A y 7B**). A los 21 días, la respuesta inflamatoria de los pulmones de los ratones tratados con Ad $IFN\gamma$  y AdGFP disminuye progresivamente, persistiendo como una hiperplasia moderada del tejido linfoide asociada con la mucosa bronquial (**Figura 7C y 7D**). En la **Figura 7C**, se observan pequeños y dispersos acúmulos linfocíticos alrededor de los vasos sanguíneos. A los 21 días después de la infección, el estudio histopatológico del hígado de los ratones inoculados con Ad $IFN\gamma$ , presentó nódulos lobulares pequeños y dispersos constituidos por linfocitos y ligera inflamación en algunas áreas portales sin necrosis (**Figura 7E**).

## RESULTADOS



**Figura 6.** Los adenovirus recombinantes AdIFN $\gamma$ , inducen la expresión de RNAm de IFN $\gamma$  y TNF $\alpha$  *in vivo* en ratones sanos. Se realizó una cinética de la expresión del RNAm de IFN $\gamma$  y TNF $\alpha$  determinada por PCR en tiempo real. Los ratones BALB/c sanos fueron infectados con  $1.7 \times 10^9$  pfu de AdIFN $\gamma$  (símbolos negros) o AdGFP (símbolos blancos). Los datos son la media  $\pm$  DE de 2 experimentos realizados por triplicado. Los asteriscos representan una diferencia estadística significativa ( $P < 0.05$ ). Los adenovirus recombinantes, AdIFN $\gamma$ , inducen la expresión de RNAm de IFN $\gamma$  y TNF $\alpha$  *in vivo*, el pico máximo se encontró en el día 14 para ambas citocinas.



**Figura 7. Los adenovirus recombinantes causan inflamación pulmonar y hepática moderada.** Histología representativa del pulmón e hígado de ratones sanos infectados con adenovirus recombinantes, tinción con hematoxilina / eosina. **(A)** A las 24h, los ratones sanos tratados con AdIFN $\gamma$  o con **(B)** AdGFP, presentan pulmones con un ligero infiltrado inflamatorio alrededor de los vasos sanguíneos y bronquios. **(C, D)** Después de 21 días de la inoculación con AdIFN $\gamma$  y AdGFP, los pulmones se observan con una moderada inflamación alrededor de los vasos sanguíneos. **(E)** Después de 21 días de la inoculación con AdIFN $\gamma$ , se observan nódulos pequeños inflamatorios localizados alrededor de las áreas portales hepáticas (flechas). **(F)** El hígado de los tratados con AdGFP no presenta alteraciones. El pulmón e hígado de los ratones tratados con AdGFP presentan menor inflamación que los tratados con AdIFN $\gamma$ . El aumento en A y B es de 400X, para las figuras C, D, E y F el aumento es 200X.

## RESULTADOS

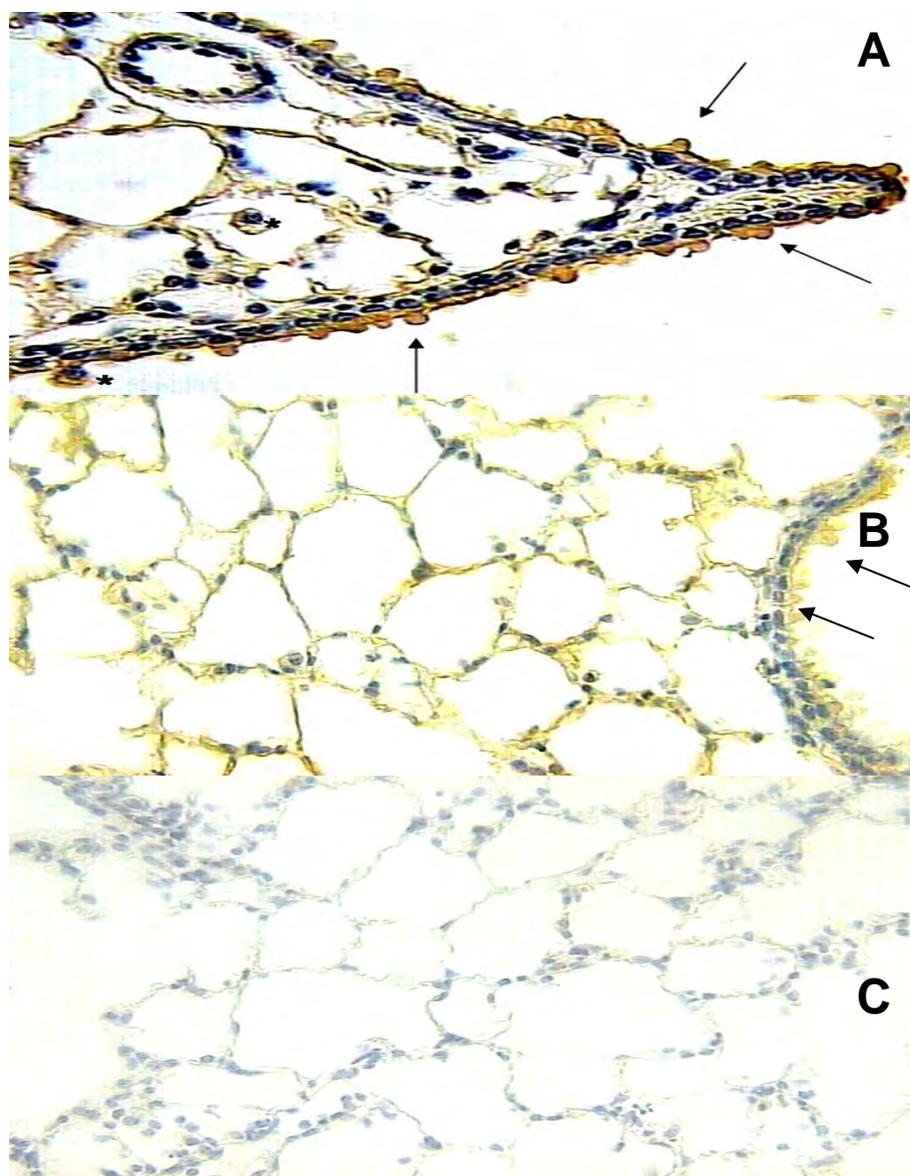
---

---

Los ratones tratados con el adenovirus control, no presentan alteraciones en el hígado (**Figura 7F**). Los riñones no presentaron anomalías histológicas (fotografía no mostrada). Estos resultados sugieren que los adenovirus recombinantes, AdIFN $\gamma$ , inducen una inflamación más intensa en pulmón e hígado que los adenovirus recombinantes AdGFP, debido a que el IFN $\gamma$ , que se produce funciona como una citocina proinflamatoria.

Para poder definir el tipo de células infectadas por los adenovirus recombinantes, realizamos un ensayo de inmunohistoquímica para detectar los antígenos específicos del adenovirus. Se utilizaron cortes de pulmón de ratones BALB/c sanos, infectados por la vía intratraqueal con AdIFN $\gamma$  y AdGFP. Se observó una fuerte inmunotinción en las células epiteliales bronquiales y en algunos macrófagos localizados en el infiltrado inflamatorio de los ratones inoculados con AdIFN $\gamma$  y con AdGFP (**Figuras 8A y 8B**). Este experimento mostró que la administración de los adenovirus recombinantes por vía intratraqueal induce una infección eficiente del epitelio bronquial y algunos macrófagos, sin embargo, causa una inflamación hepática y pulmonar moderada, al menos durante un mes después del tratamiento.

Para estudiar el impacto de este tratamiento en la inflamación sistémica, se determinaron los niveles de la proteína C reactiva en los sueros de los ratones, en ninguno de ellos se detectó la proteína C reactiva.

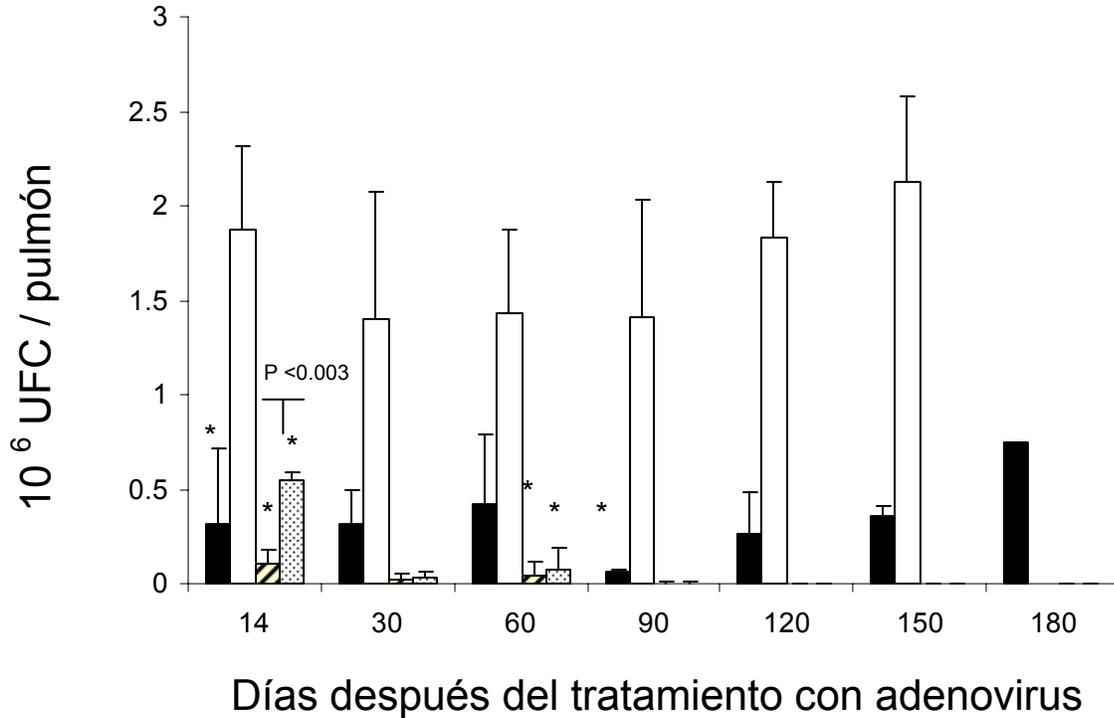


**Figura 8. Los adenovirus recombinantes inducen una eficiente infección en las células del epitelio bronquial y algunos macrófagos.** Inmunohistoquímica de pulmón de ratones sanos infectados después de 6 horas con adenovirus recombinantes, AdIFN $\gamma$  (A); AdGFP (B) y control negativo, sin anticuerpo primario (C). Se utilizaron anticuerpos contra proteínas adenovirales, los cuales se obtuvieron al inmunizar conejos con un sonocado de adenovirus tipo 5, se obtuvo el suero y resultó ser específico para identificar a las proteínas adenovirales por inmunohistoquímica e inmunocitoquímica. Células epiteliales bronquiales (flechas) y macrófagos (asteriscos). Aumento 400X.

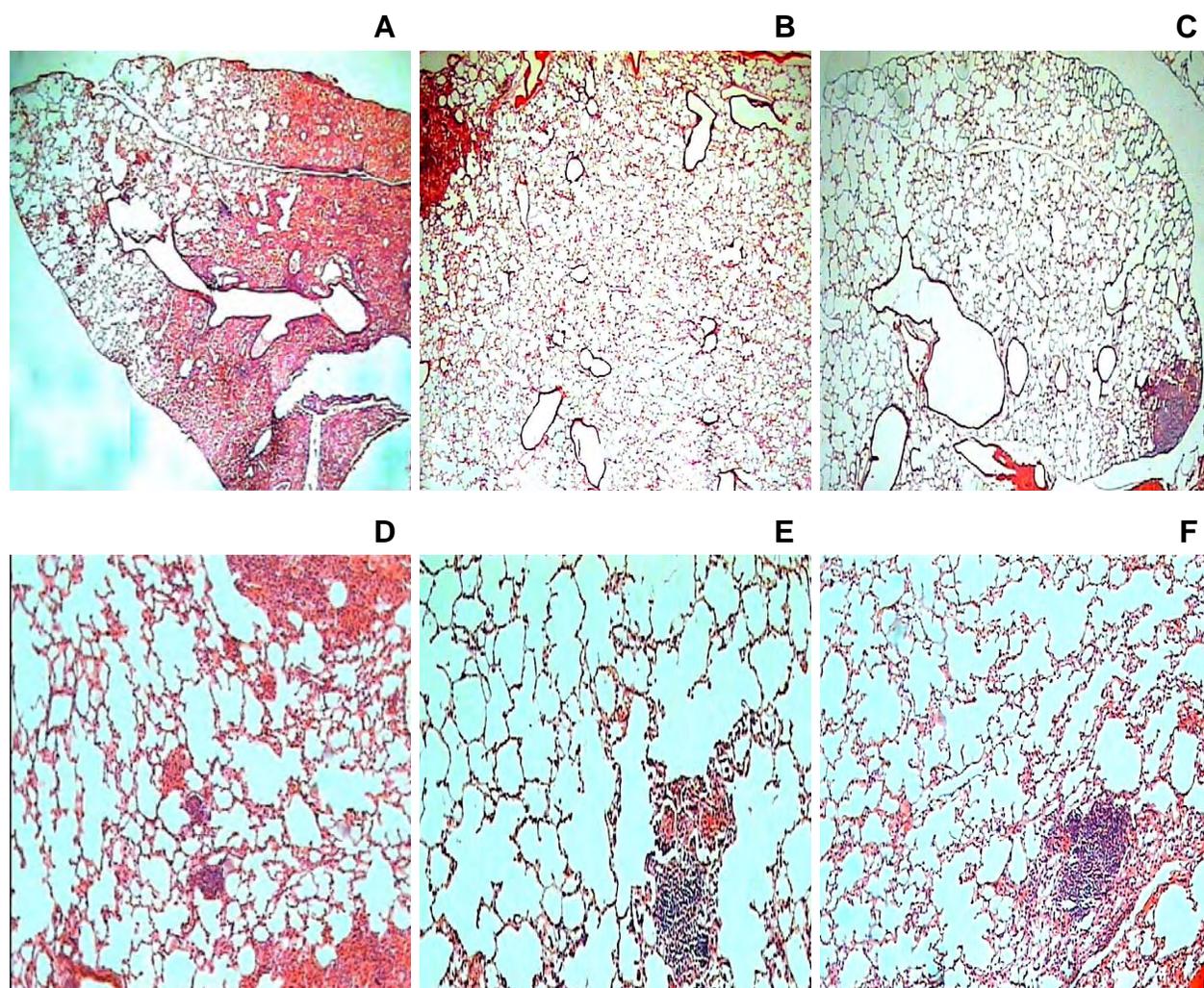
**III. ACTIVIDAD TERAPÉUTICA DE AdIFN $\gamma$  EN RATONES BALB/C INFECTADOS CON LA CEPA H37Rv DE *M. tuberculosis* Y SU EFECTO CUANDO SE ADMINISTRA EN COMBINACIÓN CON LA QUIMIOTERAPIA CONVENCIONAL.**

La administración de una sola dosis de AdIFN $\gamma$  ( $1.7 \times 10^9$  PFU) significativamente redujo el número de las unidades formadoras de colonias (UFC) después de dos semanas de tratamiento en ratones tuberculosos. La disminución de la carga bacteriana, en los ratones tratados con una sola dosis de AdIFN $\gamma$ , se mantuvo baja con respecto a los ratones control hasta los 5 meses. De hecho, los ratones tratados con AdGFP presentaron alta carga bacilar y a los 6 meses después del tratamiento, todos ellos habían muerto (**Figura 9**). La disminución en el número de bacilos vivos que presentaron los ratones tratados con AdIFN $\gamma$  correlacionó con la histopatología del pulmón (**Figura 10**). Como se muestra en las **Figuras 10B y 11A**, estos ratones presentaron una rápida disminución de la superficie pulmonar afectada por neumonía y un significativo aumento en el tamaño de los granulomas (**Figuras 10E y 11B**) al día 30, el cual fue de 7.5 veces más grandes que los ratones control.

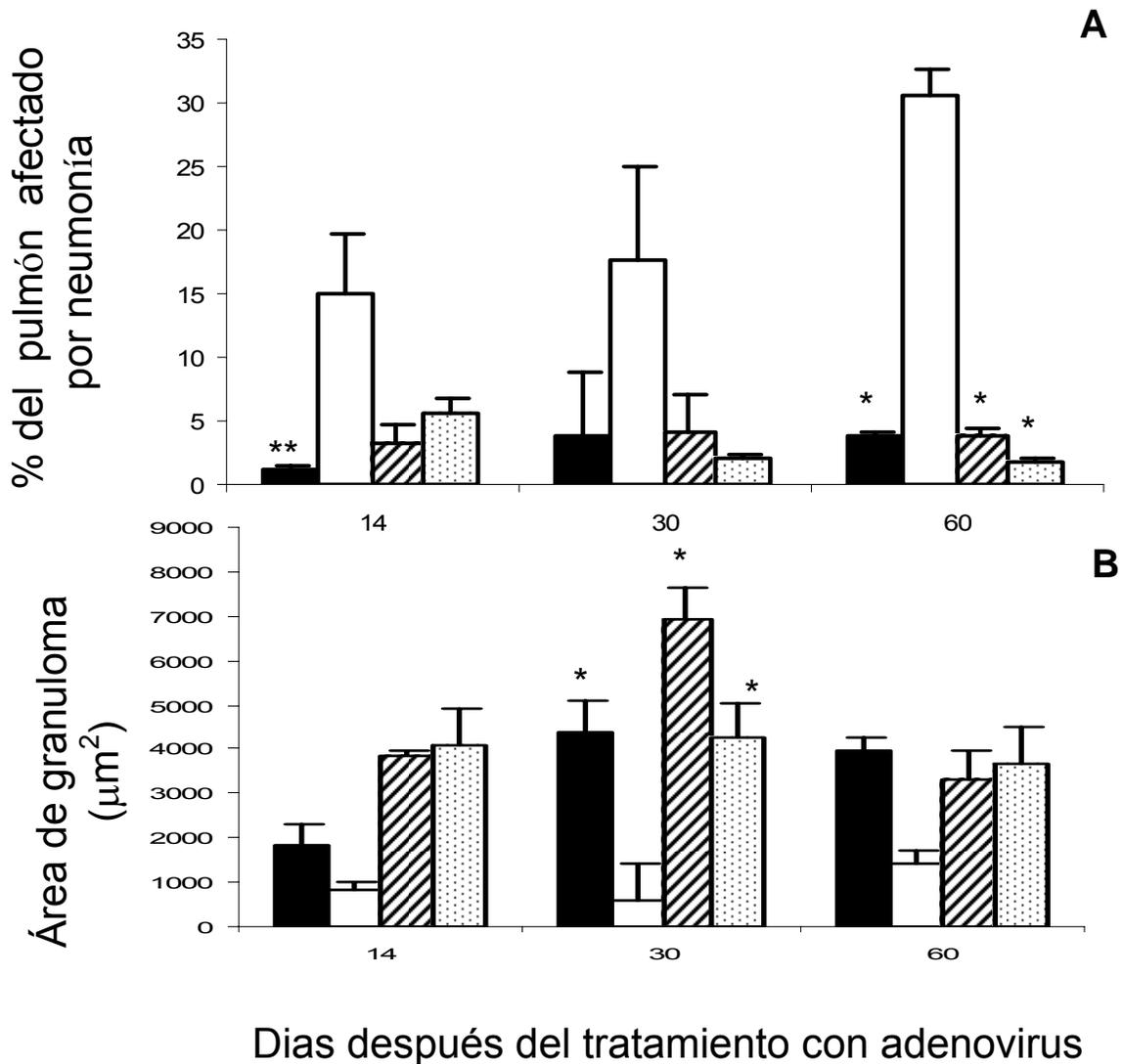
## RESULTADOS



**Figura 9. Efecto terapéutico de una sola administración de AdIFN $\gamma$  sobre el número de UFC en los pulmones de ratones infectados con *Mycobacterium tuberculosis* de la cepa H37Rv.** Los ratones tuberculosos fueron tratados con AdIFN $\gamma$  (barras negras), control AdGFP (barras blancas), AdIFN $\gamma$  más quimioterapia convencional (barras con líneas), o sólo con quimioterapia (barras con puntos). Todos los tratamientos significativamente reducen la carga bacilar pulmonar cuando se comparan con los ratones tratados con AdGFP. Una sola dosis de AdIFN $\gamma$  reduce la carga bacteriana después de 2 semanas de tratamiento con respecto a los ratones tratados con AdGFP, esta tendencia fue consistente hasta los 5 meses. La terapia combinada, disminuye significativamente la carga bacteriana a un nivel más bajo que la quimioterapia convencional en el día 14 ( $p < 0.003$ ). Apartir del día 90 y hasta el 180 no hubo detección de UFC en los grupos de tratamiento combinados y quimioterapia sola. En el día 180, todos los ratones que recibieron AdGFP habían muerto. Los datos son la media  $\pm$  DE de 3 experimentos. Los asteriscos representan una significancia estadística ( $P < 0.05$ ).



**Figura 10. Histopatología representativa del pulmón de ratones tratados con adenovirus recombinantes después de dos meses de la infección con *Mycobacterium tuberculosis* de la cepa H37Rv. (A)** Neumonía extensa después de 4 meses de infección en ratones infectados con la cepa H37Rv y tratados con los adenovirus control, AdGFP. **(B)** En contraste, la neumonía escasa es aparente después de 2 meses administración de AdIFN $\gamma$  en ratones infectados con la cepa H37Rv **(C)** También se observa menor neumonía después de 2 meses de la administración de una sola dosis de AdIFN $\gamma$  más quimioterapia convencional administrada diariamente en ratones infectados con la cepa H37Rv. **(D)** Granulomas pequeños se observan en ratones infectados con H37Rv y tratados con el AdGFP control. **(E)** Granulomas grandes se observan en ratones infectados con H37Rv y tratados con AdIFN $\gamma$ . **(F)** Granulomas grandes también son observados en ratones tratados con la combinación de AdIFN $\gamma$  más la quimioterapia convencional. Tinción hematoxilina / eosina. El aumento de las figuras A, B y C es 25X y el aumento de las figuras D, E y F es 100X.



**Figura 11. Morfometría de pulmones de ratones infectados con *Mycobacterium tuberculosis* de la cepa H37Rv tratados con una sola dosis de AdIFN $\gamma$ , AdGFP, tratamiento combinado y sólo con quimioterapia. (A) Porcentaje del pulmón ocupado por neumonía. (B) Área de granulomas. Los ratones tuberculosos fueron tratados con AdIFN $\gamma$  (barras negras), control AdGFP (barras blancas), AdIFN $\gamma$  más quimioterapia convencional (barras con líneas), o sólo con quimioterapia (barras con puntos). El tratamiento combinado, la quimioterapia y una sólo dosis de AdIFN $\gamma$ , disminuyen la neumonía y aumentan el tamaño de los granulomas. Los datos son la media  $\pm$  DE de 2 experimentos. Los asteriscos representan una significancia estadística con respecto al grupo control ( $P < 0.05$ ).**

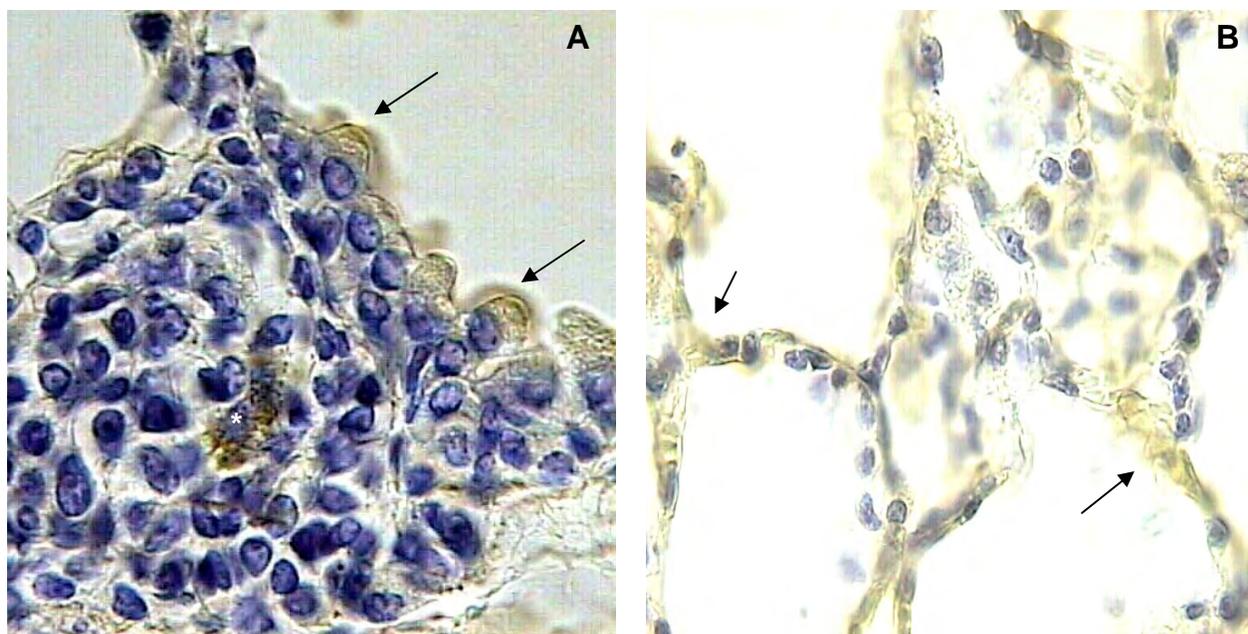
## RESULTADOS

---

---

Se realizó un análisis inmunohistoquímico, para detectar antígenos específicos de adenovirus localizados en los granulomas de ratones tuberculosos, con el objetivo de conocer qué células del granuloma se infectan con los adenovirus recombinantes. Se encontró que los granulomas de ratones tratados después de 14 días con AdIFN $\gamma$ , presentan inmunotinción positiva en las células epiteliales bronquiales y algunos macrófagos (**Figura 12A**). En cambio, los ratones tuberculosos tratados después de 14 días con el AdGFP, presentan escasos y pequeños granulomas, también con tinción positiva en el epitelio bronquial (**Figura 12B**).

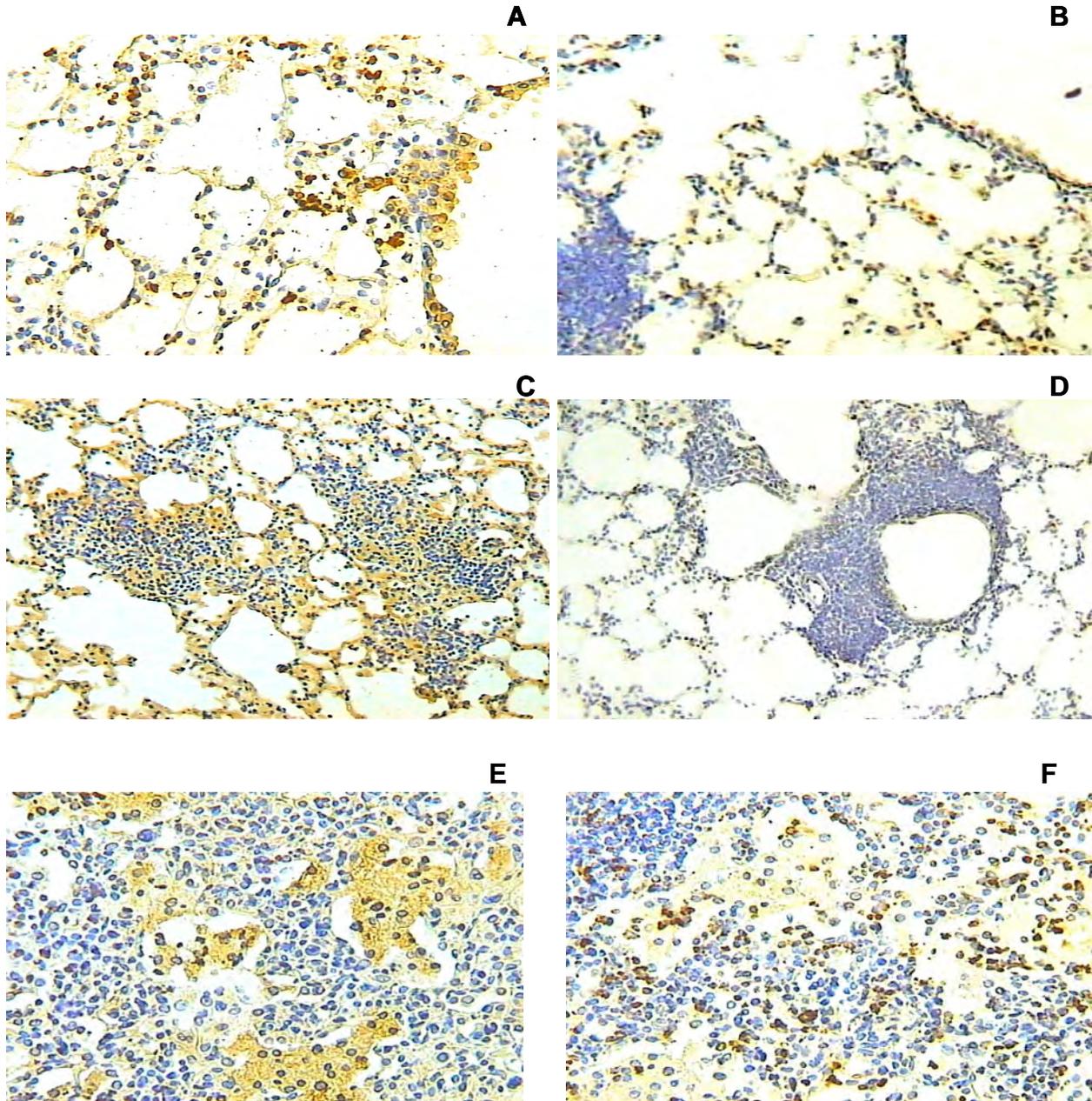
También se realizó una inmunohistoquímica para detectar IFN $\gamma$ , encontramos que los pulmones de ratones tuberculosos tratados con AdIFN $\gamma$ , presentan células epiteliales y macrófagos IFN $\gamma$  positivos después de 7 días del tratamiento (**Figura 13A**). Por otra parte se observa una ligera inmunotinción positiva para los linfocitos de los ratones tratados con AdGFP en el mismo tiempo (**Figura 13B**). Los granulomas de ratones tuberculosos tratados con AdIFN $\gamma$  presentan inmunotinción positiva para IFN $\gamma$  principalmente en los macrófagos, linfocitos y células epitelioideas después de 30 días del tratamiento (**Figura 13C**). Los escasos granulomas de los ratones tuberculosos, tratados con AdGFP presentan escasa inmunotinción positiva para IFN $\gamma$  principalmente en algunos linfocitos (**Figura 13D**). Las áreas neumónicas, de los pulmones provenientes de los ratones tratados con AdIFN $\gamma$  presentan una tinción positiva para IFN $\gamma$  en macrófagos y linfocitos (**Figura 13E**). Las áreas neumónicas de los ratones tratados con el vector control, AdGFP, presentan linfocitos positivos para IFN $\gamma$  (**Figura 13F**).



**Figura 12. Inmunohistoquímica para la detección de adenovirus en los granulomas. (A)**

Se observa una inmunotinción positiva para antígenos adenovirales en macrófagos (asteriscos) localizados en un granuloma peribronquial y células epiteliales bronquiales (flechas) ésta laminilla corresponde a un ratón en fase crónica de la tuberculosis y tratado después de 14 días con AdIFN $\gamma$ . **(B)** En los pulmones de ratones tuberculosos tratados con AdGFP, los granulomas son muy escasos y pequeños, se observa inmunotinción positiva principalmente en el epitelio bronquial. Aumento 1000X.

## RESULTADOS



**Figura 13. Inmunohistoquímica para la detección de IFN $\gamma$  en pulmones de ratones tuberculosos tratados con adenovirus recombinantes. (A)** Se observa una fuerte inmunotinción positiva para IFN $\gamma$  en las células epiteliales y macrófagos de pulmones de ratones tuberculosos tratados después de 7 días con AdIFN $\gamma$ . **(B)** En este mismo tiempo, los ratones tratados con AdGFP, presentan inmunotinción positiva para algunos linfocitos. **(C)** Dentro de los granulomas de los ratones tratados con AdIFN $\gamma$  se observan macrófagos, linfocitos y células epiteloides positivas para IFN $\gamma$ , después de 30 días de la infección con el AdIFN $\gamma$ . **(D)** Los ratones control, presentan granulomas escasos y pequeños que son positivos para algunos linfocitos. **(E)** En las áreas neumónicas de los ratones tratados después de 30 días con AdIFN $\gamma$ , se observan macrófagos y linfocitos positivos para IFN $\gamma$ . **(F)** Las áreas neumónicas de los ratones tratados después de 30 días con AdGFP, presentan algunos linfocitos positivos para el IFN $\gamma$ . El aumento de la figura A es de 400X, para las figuras B a la F, el aumento es de 200X.

## RESULTADOS

---

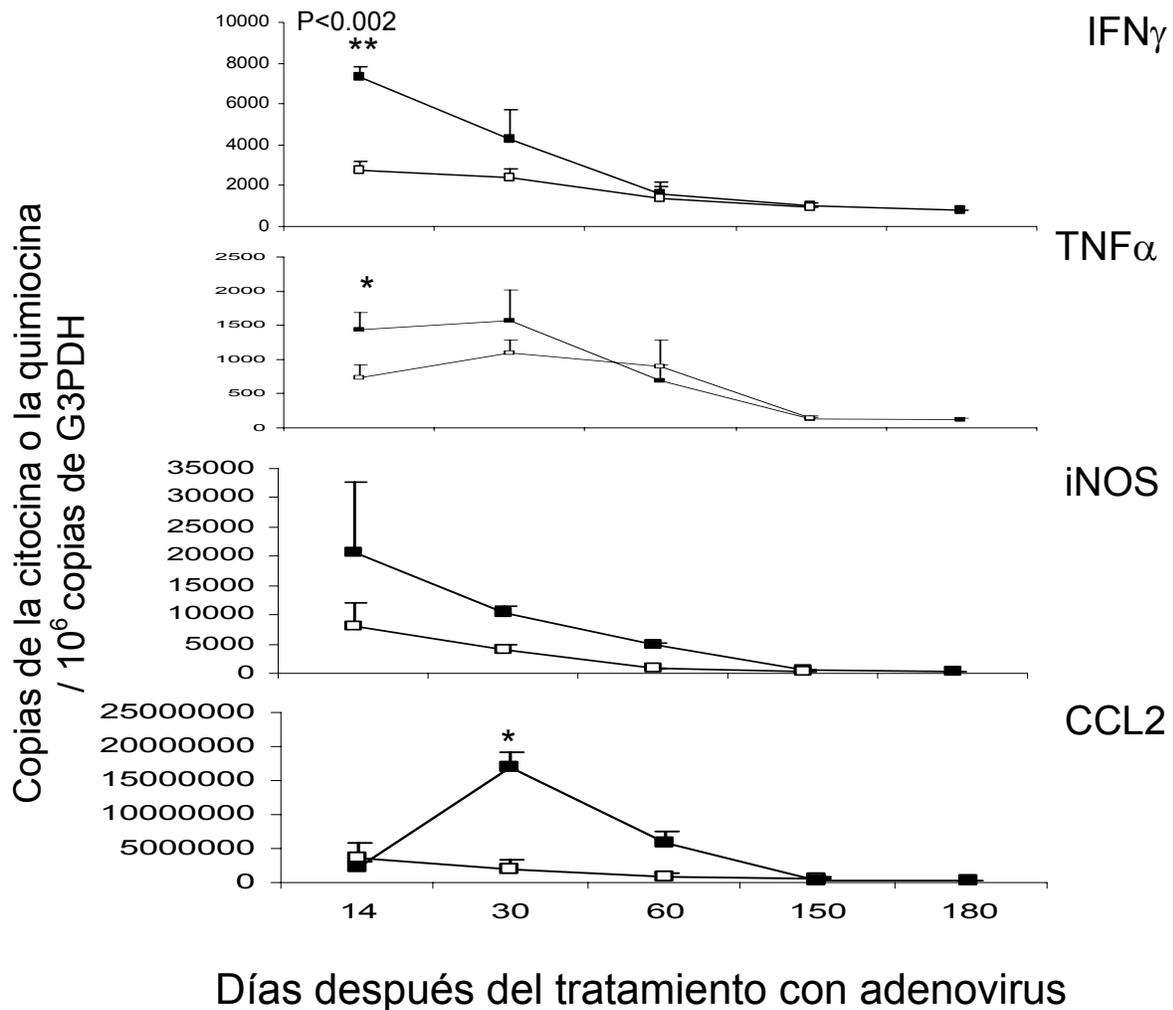
---

Como se presentó en la inmunohistoquímica para los adenovirus (**Figura 8**), las células epiteliales bronquiales y macrófagos se infectan por los adenovirus recombinantes, así mismo, los granulomas de ratones tuberculosos tratados con AdIFN $\gamma$ , también presentan éstas células positivas (**Figura 12A**), por último, la inmunohistoquímica para el IFN $\gamma$ , de los ratones tuberculosos tratados con AdIFN $\gamma$ , indica que las células epiteliales bronquiales y macrófagos se infectan con el adenovirus y que producen la citocina.

Con respecto a la expresión de las citocinas, la **Figura 14** muestra que el tratamiento con AdIFN $\gamma$  induce una expresión alta de IFN $\gamma$  y TNF $\alpha$  a las 2 semanas, este incremento es estadísticamente significativo con respecto al tratamiento con AdGFP. Los ratones tratados con AdIFN $\gamma$  también presentaron una alta expresión de iNOS con respecto al grupo control, pero ésta diferencia no fue significativa. Con respecto a la expresión de las quimiocinas, el tratamiento con AdIFN $\gamma$  induce una significativa y mayor expresión de CCL2 al día 30 cuando se compara con el grupo control, el cual presentó niveles bajos constantes (**Figura 14**). La expresión de CCL3 inducida por los adenovirus recombinantes fue baja durante todo el estudio, por lo que estos datos no se presentan.

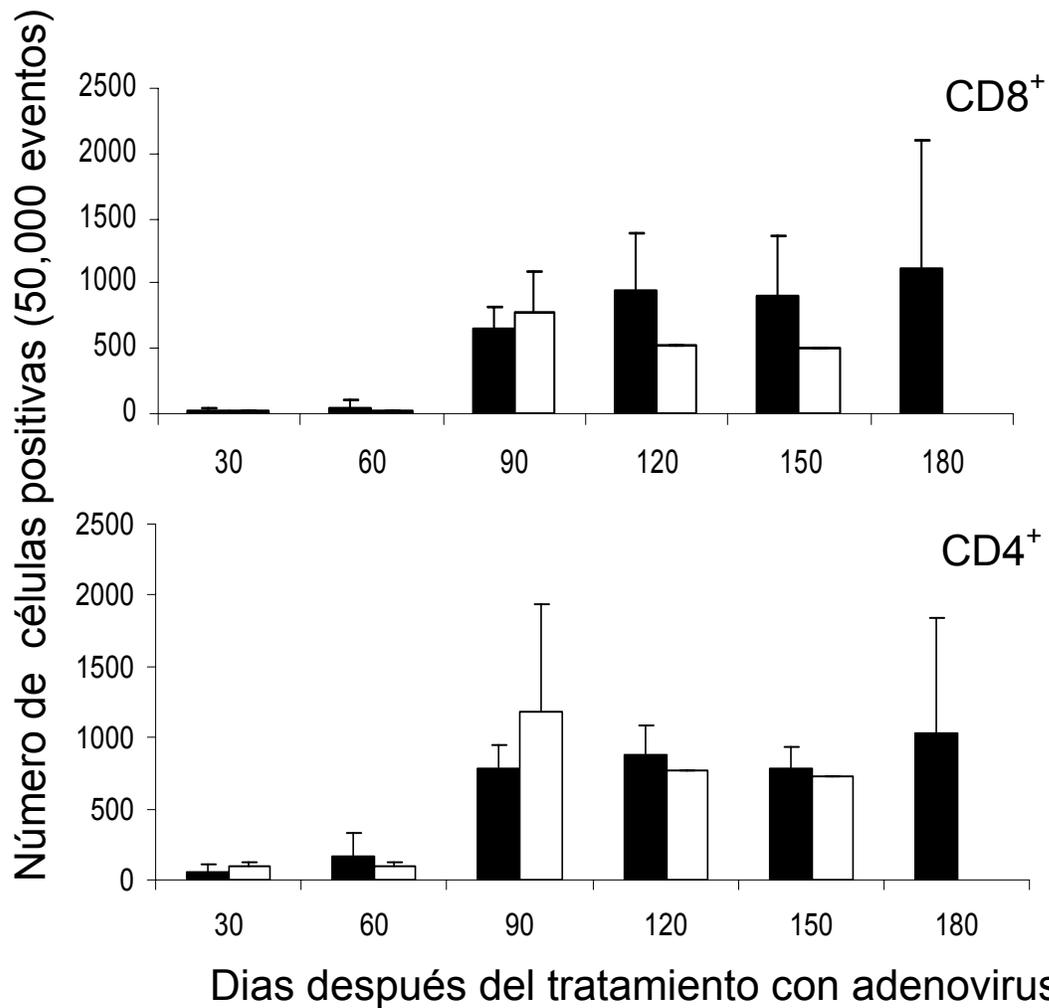
El análisis de citofluorometría, utilizando el mismo número de células de las suspensiones pulmonares, presentaron más células T CD8<sup>+</sup> a los 4 y 5 meses después del tratamiento con AdIFN $\gamma$  con respecto a los ratones que recibieron el adenovirus control (**Figura 15**), mientras que hubo números similares de células T CD4<sup>+</sup> en los ratones tratados con AdGFP y AdIFN $\gamma$ .

## RESULTADOS



**Figura 14. Efecto de una sola administración de AdIFN $\gamma$  sobre la expresión de citocinas y CCL2 en pulmones de ratones infectados con la cepa H37Rv de *Mycobacterium tuberculosis*.** Los ratones fueron tratados con una sola dosis de AdIFN $\gamma$   $1.7 \times 10^9$  pfu/ratón (símbolos negros), o con el control AdGFP  $1.7 \times 10^9$  pfu/ratón (símbolos blancos) en el día 60 después de la infección. La expresión génica se determinó por tiempo real. Los resultados son la media  $\pm$  DE. Los asteriscos representan una significancia estadística ( $P < 0.05$ ).

## RESULTADOS



**Figura 15. Determinación de los subtipos de células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> en los homogenados de pulmón de ratones infectados con H37Rv tratados con adenovirus recombinantes.** Ratones tratados con AdIFN $\gamma$  (barras negras) inducen un alto número de células T CD8<sup>+</sup> más que los ratones tratados con el control AdGFP (barras blancas) en el día 120 and 150, mientras que números similares de células T CD4<sup>+</sup> se observaron en ambos grupos. La determinación se realizó por citometría de flujo.

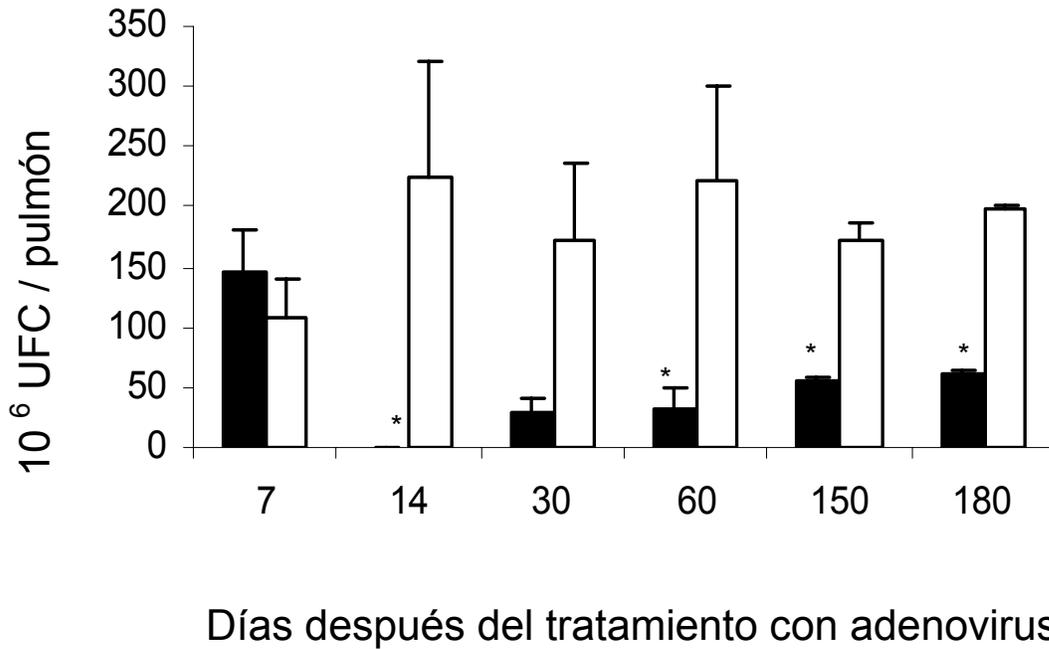
Después, evaluamos si el tratamiento con AdIFN $\gamma$  ayuda a acortar la duración de la quimioterapia convencional. Para esto, un grupo de ratones tuberculosos fueron tratados con AdIFN $\gamma$  más quimioterapia convencional (tratamiento combinado), y se comparó con otro grupo de ratones tratados exclusivamente con antibióticos. En comparación con los ratones que exclusivamente fueron tratados con quimioterapia convencional, los ratones tratados durante 2 semanas con la terapia combinada presentaron una disminución significativa de la carga bacilar ( $P < 0.003$ ) (**Figura 9**).

Como se describió anteriormente, la administración de AdIFN $\gamma$  también reduce la carga bacteriana del pulmón después de 14 días, pero esta no fue estadísticamente significativa con respecto al tratamiento combinado. Por otra parte, en este mismo tiempo, la reducción de las UFC's inducida por el tratamiento con AdIFN $\gamma$  fue ligeramente más baja que con la quimioterapia convencional. Desde el día 90 y hasta el 180, no hubo detección de carga bacteriana en los pulmones de los ratones que recibieron el tratamiento combinado y los ratones tratados exclusivamente con la quimioterapia (**Figura 9**).

Con respecto a la morfometría, en el día 60 después del tratamiento, ambas terapias combinada y la quimioterapia significativamente redujeron el porcentaje de la neumonía (**Figuras 10C y 11A**) en comparación con el grupo control (**Figura 11A**). Las terapias combinada y quimioterapia inducen 11.8 y 7.2 veces un incremento en el tamaño de los granulomas después de un mes de tratamiento con respecto al control (**Figuras 10F y 11B**).

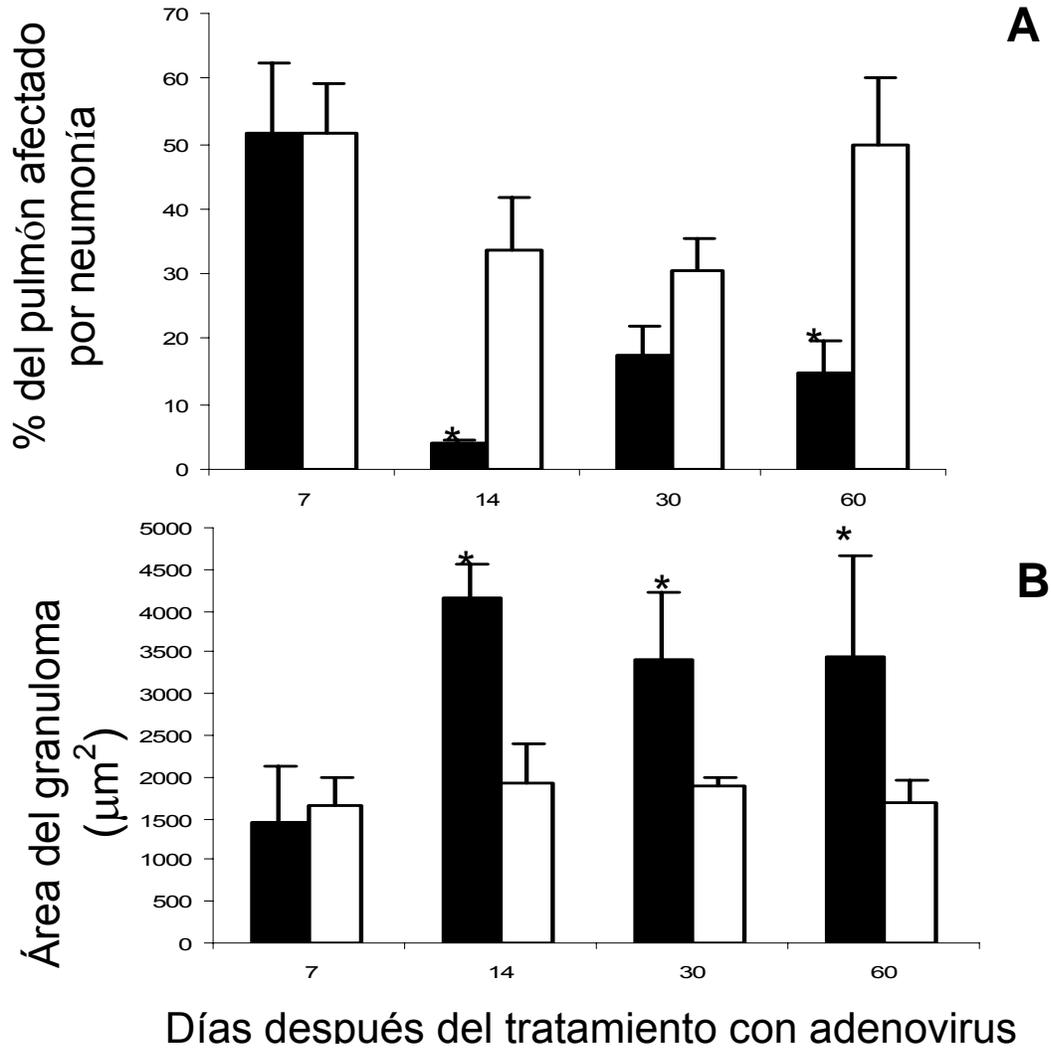
**IV. EFECTO TERAPÉUTICO DE AdIFN $\gamma$  EN RATONES BALB/C INFECTADOS CON UN AISLADO CLÍNICO MULTIDROGORESISTENTE DE *M. tuberculosis***

Debido a la re-emergencia mundial de cepas MDR es necesario buscar nuevas formas de terapia. La **Figura 16**, muestra que una sola dosis de AdIFN $\gamma$  ( $1.7 \times 10^9$  PFU) administrada a ratones infectados con una cepa MDR, produjo un efecto de larga duración, disminuyendo significativamente la carga bacilar pulmonar desde los 14 días y hasta el día 180 posterior al inicio del tratamiento. La carga bacilar aumentó ligeramente después del día 30, pero fue más baja que en el grupo control. Como en los ratones infectados con la cepa H37Rv, los ratones infectados con la cepa MDR y tratados con AdIFN $\gamma$  también presentaron correlación entre la disminución de la carga bacilar en el pulmón y los resultados del análisis morfométrico (**Figura 17 y 18**). Una sola aplicación de AdIFN $\gamma$  fue suficiente para inducir una significativa reducción de 8.5- y 3.3- veces del área neumónica en los días 14 y 60 respectivamente, cuando se compara con los controles (**Figura 17A**), mientras que el tamaño de los granulomas fue dos veces más grande que en el grupo control en los mismos tiempos (**Figura 17B**).

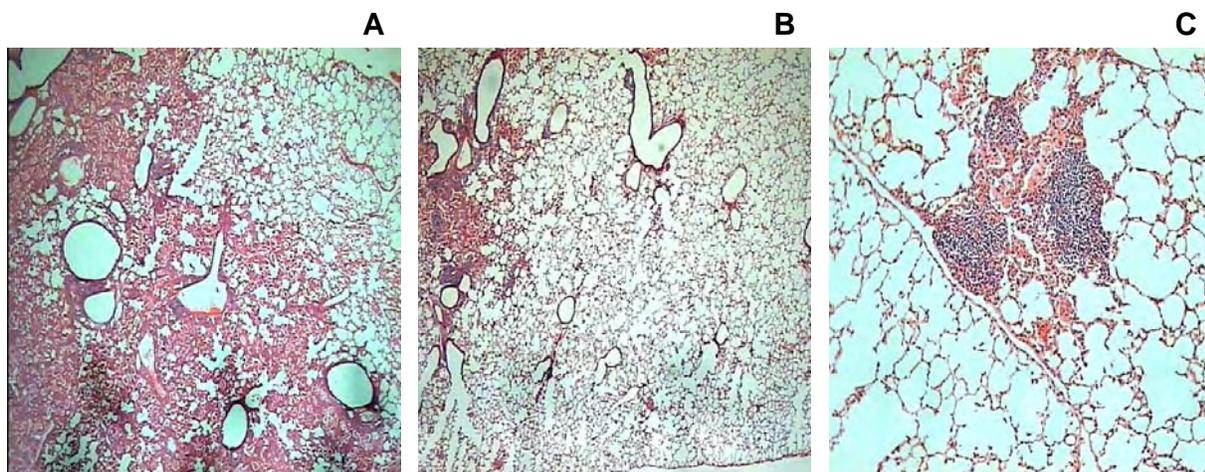


**Figura 16. Efecto terapéutico de una sola administración de AdIFN $\gamma$  sobre el número de UFC en los pulmones de ratones infectados con un aislado multidrogaresistente de *Mycobacterium tuberculosis*.** Los ratones tuberculosos fueron tratados con  $1.7 \times 10^9$  pfu/ratón de adenovirus AdIFN $\gamma$  (barras negras) o con el adenovirus control AdGFP (barras blancas) en el día 60 después de la infección con los bacilos MDR. La carga bacilar pulmonar significativamente disminuye en los ratones tratados con AdIFN $\gamma$  después del día 14 y hasta el 180 con respecto a los ratones tratados con el adenovirus control. El límite de detección es de 1000 UFC a 250 millones de UFC. Los resultados son la media  $\pm$  DE de 2 experimentos. Los asteriscos representan una significancia estadística ( $P < 0.05$ ).

## RESULTADOS

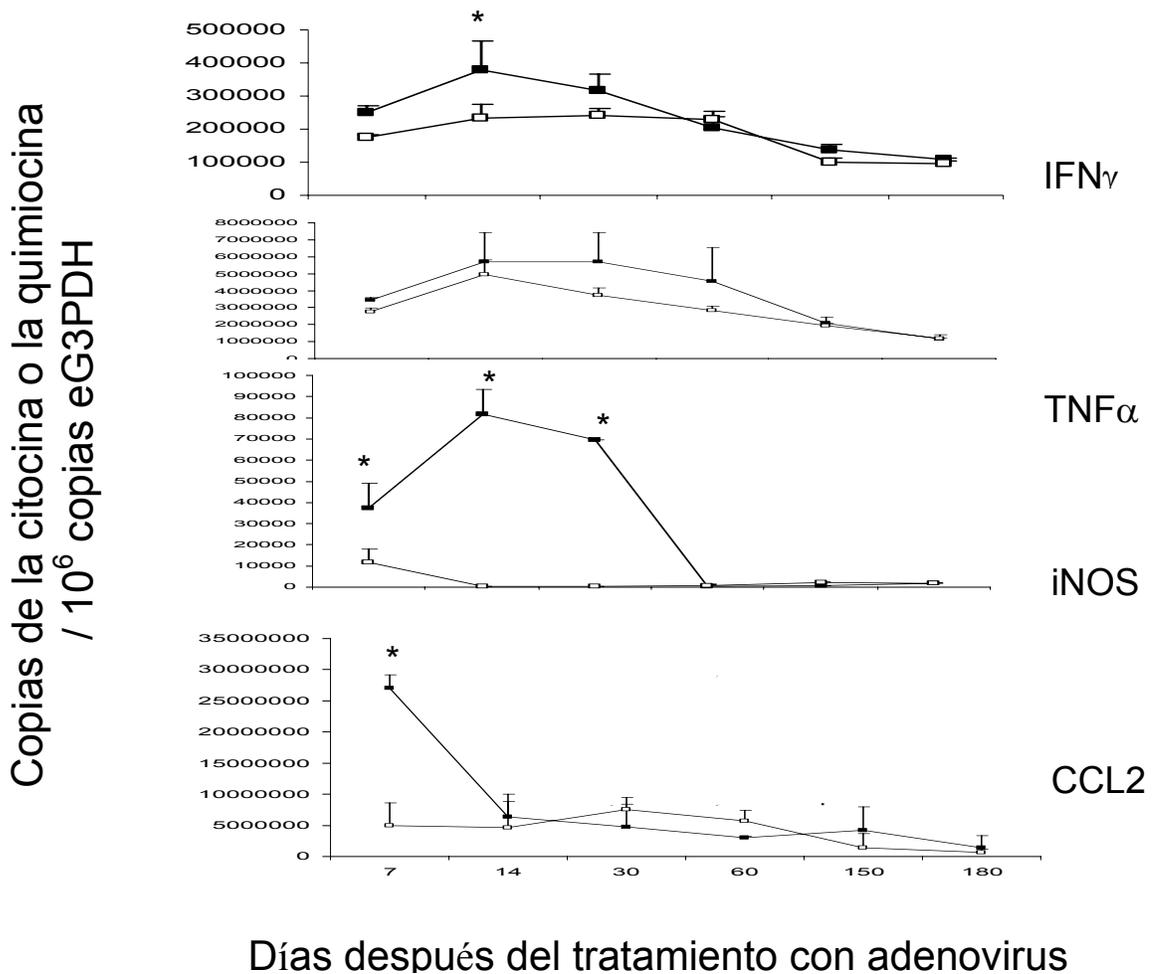


**Figura 17. Morfometría de pulmones de ratones infectados con un aislado clínico MDR de *Mycobacterium tuberculosis*. (A) Porcentaje del pulmón ocupado por neumonía. (B) Área de granulomas. Los ratones tuberculosos fueron tratados con  $1.7 \times 10^9$  pfu/ratón de AdIFN $\gamma$  (barras negras) o con el control AdGFP (barras blancas) en el día 60 después de la infección con los bacilos MDR. Una sola dosis de AdIFN $\gamma$ , redujo el área neumónica e incrementó el tamaño de los granulomas. Los datos son la media  $\pm$  DE de 2 experimentos. Los asteriscos representan una significancia estadística con respecto al grupo control ( $P < 0.05$ ). No hubo material disponible para la morfometría después del día 60 postratamiento.**



**Figura 18. Histopatología representativa del pulmón de ratones tuberculosos, tratados con adenovirus recombinantes, después de dos meses de la infección con un aislado clínico MDR. (A)** Dos meses después de la administración del adenovirus control, AdGFP, los ratones infectados con la cepa MDR presentaron neumonía extensa. **(B)** En contraste, los ratones infectados con la cepa MDR y tratados dos meses después con AdIFN $\gamma$ , presentaron pequeñas áreas neumónicas y **(C)** granulomas grandes. El AdIFN $\gamma$  disminuyó el área neumónica e incrementó el tamaño de los granulomas. El aumento de las figuras A y B es 25X y el aumento en C es de 100x

## RESULTADOS



**Figura 19. Efecto de una sola administración de AdIFN $\gamma$  sobre la expresión de citocinas y CCL2 en pulmones de ratones infectados con un aislado clínico MDR de *Mycobacterium tuberculosis*.** Los ratones tuberculosos fueron tratados con AdIFN $\gamma$   $1.7 \times 10^9$  pfu/ratón (símbolos negros), o con el control AdGFP  $1.7 \times 10^9$  pfu/ratón (símbolos blancos) en el día 60 después de la infección con la cepa MDR. La expresión génica se determinó por PCR en tiempo real. Los resultados son la media  $\pm$  DE. Los asteriscos representan una significancia estadística ( $P < 0.05$ ).

## RESULTADOS

---

---

Con respecto a la expresión de las citocinas, los ratones infectados con la cepa MDR y tratados con AdIFN $\gamma$  presentaron un aumento significativo en la expresión de IFN $\gamma$  después de 2 semanas, seguida por una disminución progresiva, mientras que la expresión de TNF $\alpha$  también aumento después de 2 semanas y permaneció constante hasta el día 30, aunque éste incremento no fue significativo (**Figura 19**). Después de 7, 14 y 30 días, la expresión de iNOS fue significativamente más alta en los ratones tratados con AdIFN $\gamma$  respecto a los ratones tratados con el adenovirus control. La expresión de CCL2 fue significativamente más alta a una semana de la administración de AdIFN $\gamma$  seguida por una disminución progresiva (**Figura 19**). Como se observó en los ratones infectados con la cepa H37Rv, los ratones infectados con la cepa MDR tratados con ambos adenovirus recombinantes presentaron niveles bajos y similares de expresión de CCL3.

### DISCUSIÓN

Nuestros resultados, utilizando un modelo bien caracterizado de tuberculosis pulmonar progresiva y adenovirus recombinantes que eficientemente infectan células y expresan IFN $\gamma$  activo, confirman la significativa participación de esta citocina en la protección inmune contra *M. tuberculosis*, y sugiere que esta forma de terapia puede ser útil como un nuevo tratamiento eficiente para la tuberculosis pulmonar sensible y resistente a antibióticos. De hecho, una sola administración de AdIFN $\gamma$  durante la fase tardía de la tuberculosis pulmonar, en ratones infectados con la cepa de laboratorio H37Rv, significativamente disminuyó la carga bacilar y el tejido dañado. Estos resultados correlacionan con alta expresión de IFN $\gamma$  y TNF $\alpha$ . Esta nueva terapia molecular, utilizando adenovirus que codifican a citocinas protectoras, tienen varias ventajas importantes. Primero, la expresión génica de la citocina es transitoria pero muy eficiente (Graham, 2000) y se localiza preferencialmente hacia el pulmón por el tropismo natural de los adenovirus hacia el epitelio respiratorio (Tatsis, 2004). Además, dado que el gen de la citocina fue liberado como un transgen colocado dentro del genoma adenoviral, sustituyendo a los genes virales E1 y E3 involucrados en evadir la inmunidad del huésped y en la replicación viral (He, 1998), éste induce sólo una inflamación transitoria y moderada en el pulmón con mínima diseminación sistémica, como fue confirmada por la observación histológica de una ligera inflamación en el hígado y la ausencia de la proteína C reactiva en los sueros de los ratones infectados con los adenovirus.

A pesar de que el uso de los adenovirus ha sido muy exitoso en modelos *in vivo*, (Alba, 2005) también ha sido muy criticado porque no puede administrarse una segunda

## DISCUSIÓN

---

---

dosis, por la formación de anticuerpos neutralizantes. En estudios recientes, se ha reportado que la liberación sistémica de los adenovirus de primera generación, inducen una fuerte respuesta inmune, dando lugar a una rápida eliminación de las células transducidas por los adenovirus y a la generación de anticuerpos contra la cápside adenoviral. Desde el primer contacto de los adenovirus recombinantes, la respuesta inmune innata se activa, así mismo, la respuesta inmune adaptativa celular y humoral se desencadena, induciéndose la producción de citocinas proinflamatorias y la inducción de linfocitos T citolíticos específicos para el adenovirus (Alba , 2005).

En este trabajo, se utilizaron adenovirus recombinantes de primera generación y se administraron por vía intratraqueal, muy probablemente se indujeron anticuerpos, lo cual no influyó en nuestros experimentos, pues sólo se utilizó una dosis. Probablemente, hubo inducción de clonas de linfocitos T citolíticos, las cuales tal vez eliminaron algunas células transducidas, sin embargo, determinamos una expresión transitoria de RNAm de  $IFN\gamma$ , y por inmunohistoquímica encontramos células epiteliales bronquiales y macrófagos inmunopositivos para antígenos adenovirales e  $IFN\gamma$ . Además, la expresión transitoria de  $IFN\gamma$ , indujo la expresión de otras citocinas como  $TNF\alpha$  e iNOS. Confirmamos que la administración de adenovirus recombinantes que expresan  $IFN\gamma$ , disminuye la carga bacteriana y el daño tisular en ratones con tuberculosis progresiva, con respecto a los ratones tuberculosos que recibieron los adenovirus control.

Aunque los adenovirus recombinantes son una herramienta muy útil, parecen estar lejos de su uso en humanos, ya que se ha reportado que una gran proporción de la población humana tiene niveles significativos de anticuerpos contra los adenovirus,

asi que una inmunidad pre-existente es un problema fundamental (Alba, 2005). A pesar de ello, el uso de *Gendicine* (adenovirus tipo 5 humano que expresa la proteina p53) en China parece tener resultados exitosos (Peng, 2005), probablemente porque los pacientes que reciben el adenovirus se encuentran en fases terminales.

Los adenovirus gutless o de última generación, inducen una menor respuesta inmune, debido a que carecen de regiones que codifican a proteínas virales y la expresión del transgen es más prolongada, que los adenovirus de primera o segunda generación. Sin embargo, la liberación sistémica de los adenovirus gutless, también induce la producción de anticuerpos contra las proteínas de la cápside. El desarrollo de anticuerpos específicos contra el adenovirus no contribuye a la eliminación de las células transducidas y no se ve afectada la expresión del transgen. Sin embargo, los anticuerpos específicos contra el adenovirus pueden unir el adenovirus gutless readministrado, prevenir la entrada a la célula y promover su opsonización por los macrófagos (Alba, 2005). Se han buscado alternativas para readministrar los adenovirus sin efectos adversos, para ello se utilizan diferentes serotipos y el uso de adenovirus no humanos. En cada readministración el nivel de expresión de transgen disminuye, probablemente debido a la reacción cruzada de los linfocitos T citolíticos entre los diferentes serotipos. Cuando se readministran adenovirus gutless, no disminuyen los niveles del transgen como en el caso de los adenovirus de primera y segunda generación (Alba, 2005).

Los ratones sanos tratados con AdIFN $\gamma$  presentaron expresión alta de IFN $\gamma$  sólo 2 semanas después de la administración del vector. Esta producción transitoria de IFN $\gamma$  fue suficiente para reactivar la inmunidad protectora y controlar el crecimiento bacilar

con una duración extensa. Este efecto bacteriostático eficiente fue posible porque  $IFN\gamma$  es una citocina pleiotrópica capaz de activar macrófagos y regular de manera positiva la expresión de moléculas del MHC clase I y II en un amplio rango de tipos celulares (Young, 2002; Boehm, 1997), además de potenciar la presentación de antígeno a células T, produce diversas citocinas protectoras (IL-12, IL-15,  $TNF\alpha$ ), quimiocinas (CXCL9 y CXCL10), y otros factores importantes que participan en el control de la infección por patógenos intracelulares (Flynn, 2001 ; Young, 2002 ; Boehm, 1997).

Nuestros resultados muestran que este tratamiento induce altos niveles de  $TNF\alpha$ , una citocina pro-inflamatoria involucrada en la potenciación de la producción de intermediarios reactivos del nitrógeno y oxígeno, ambos factores bactericidas esenciales (Flynn, 2001 ; Young, 2002 ; Boehm, 1997). El  $TNF\alpha$  es muy importante, ya que el uso de los anticuerpos monoclonales anti- $TNF\alpha$  inhiben la formación de los granulomas en ratones infectados con el bacilo Calmette-Guerin (Kindler, 1989).

La producción de óxido nítrico (NO) es uno de los más distintivos productos de la activación de macrófagos inducidos por  $IFN\gamma$  (Flynn, 1993). Es conocido que el NO es importante en el control del crecimiento micobacteriano en ratones. Por ejemplo, los ratones *knock-out* para iNOS son muy susceptibles a la infección micobacteriana y el uso de inhibidores del NO en los ratones tuberculosos resulta en cargas bacilares altas y severo daño tisular, sugiriendo que el NO puede estar involucrado en evitar el exceso de inflamación (Cooper, 2002). Se sabe que el NO impide la adherencia y la trans migración de monocitos y granulocitos, así que su ausencia puede contribuir a la generación de neumonía progresiva, como se observa en la fase tardía del modelo de tuberculosis pulmonar progresiva. Además, se demostró en nuestro modelo, que el NO

reacciona con radicales libres de oxígeno que también son producidos en gran cantidad, generando así la producción de peroxinitrilos, compuestos muy inestables que se asocian rápidamente a proteínas, especialmente a la tirosina. Las proteínas nitrosiladas, experimentan cambios conformacionales con la pérdida irreversible de sus funciones lo que contribuye a la muerte celular (Hernández-Pando, 2001).

Por otra parte, los ratones *knock-out* de  $\text{IFN}\gamma$  presentan activación de linfocitos excesiva y descontrolada (las células T  $\text{CD4}^+$  no sufren apoptosis), hay granulomas necróticos y purulentos con crecimiento bacilar descontrolado y diseminación sistémica (Cooper, 1993). En este sentido, la producción eficiente de  $\text{IFN}\gamma$  después de la administración de Ad $\text{IFN}\gamma$  permitió controlar el crecimiento bacteriano y también reducir la inflamación excesiva (Mühl, 2003). Este tratamiento también incrementó el tamaño de los granulomas, ya que el  $\text{IFN}\gamma$  contribuye a la organización de los mismos, principalmente por la inducción de quimiocinas tal como CCL2 y moléculas de adhesión con alta especificidad para linfocitos más que para granulocitos (Cooper, 2002). Se analizó la expresión de CCL2 y CCL3, porque son quimiocinas que atraen células mononucleares a los sitios de inflamación crónica, sólo encontramos elevada la expresión de CCL2, también conocida como proteína quimioattractante de monocitos-1 que es un potente agonista para monocitos, células dendríticas, células T de memoria y basófilos (Charo, 2006). No se detectó la expresión de CCL3 o proteína inflamatoria macrofágica ( $\text{MIP-1}\alpha$ ). En este modelo experimental, el tamaño de los granulomas correlaciona con protección, mientras que la neumonía está asociada con la progresión de la enfermedad. (Hernández-Pando, 2005; Hernández-Pando, 1997).

## DISCUSIÓN

---

---

Interesantemente, el tratamiento con AdIFN $\gamma$  induce altos niveles de células T CD8<sup>+</sup>, un resultado que correlaciona con recientes regímenes inmunoterapéuticos exitosos en la tuberculosis experimental (Rook, 2007).

En concordancia con nuestros resultados, han sido encontrados efectos terapéuticos eficientes similares en ratones infectados con *Pseudomonas aeruginosa* y tratados con una sola dosis de AdIFN $\gamma$  (10<sup>9</sup> PFU) (Lei, 1997). Nuestros resultados también concuerdan con las observaciones clínicas de pacientes tuberculosos tratados con IFN $\gamma$  recombinante, administrada por aerosol, la cual indujo la expresión de factores de transcripción, tales como Stat-1 y los factores IRF-1 e IRF9, (Condos, 2003) así como la IP-10, permitiendo un control eficiente de la enfermedad (Raju, 2004).

Uno de los principales problemas en el control de la tuberculosis es la falta de apego al tratamiento de los pacientes debido a lo largo del mismo pues requiere de cuando menos 6 meses con 3 antibióticos diferentes. Por esta razón, se evaluó si el AdIFN $\gamma$  junto con la quimioterapia convencional podría acortar el largo régimen de antibióticos que se necesitan para tratar la tuberculosis pulmonar. Algunos efectos terapéuticos benéficos tal como la eliminación acelerada de la bacteria pueden ser obtenidos cuando el AdIFN $\gamma$  es usado como un adyuvante a la quimioterapia convencional, y una sola dosis de adenovirus recombinantes es más conveniente para administrar que la dosis diaria de antibióticos. Es posible que el tratamiento combinado pudiera proveer el apoyo inmunológico que se necesita para limitar la reactivación de la infección; otro problema importante en el control de la tuberculosis es la aparición de las cepas MDR. Aproximadamente 300,000 nuevos casos de tb MDR surgen en todo el mundo cada año, y esta forma de tuberculosis ha sido identificada como un problema

significativo en las regiones supervisadas por la Organización Mundial de la Salud (World Health Organization, 2005). El tratamiento de la tuberculosis producida por cepas MDR requiere de la combinación de fármacos de segunda línea que son más caros, más tóxicos y menos efectivos que los fármacos utilizados en la terapia estándar. Nuestros resultados muestran que la terapia génica utilizando AdIFN $\gamma$  puede ser un tratamiento nuevo y eficiente para el control de la tuberculosis MDR. En concordancia con nuestros resultados experimentales, estudios en pacientes con tuberculosis MDR han demostrado que el tratamiento con IFN $\gamma$  recombinante administrado por aerosoles incrementa la respuesta inmune local con toxicidad insignificante (Condos, 1997) y disminuye el tamaño de las lesiones cavitatorias después de 6 meses de la terapia (Koh, 2004). Nosotros consideramos que la terapia génica utilizando AdIFN $\gamma$  puede ser preferible que el tratamiento con IFN $\gamma$  recombinante (Graham, 2000; Varga, 2000), porque la producción de AdIFN $\gamma$  es menos costosa y una sola dosis fue suficiente para controlar el crecimiento bacilar en los ratones con enfermedad crónica grave.

Cabe resaltar que la respuesta inmune que inducen las cepas de *M. tuberculosis* es distinta y también depende del fondo genético de la cepa de ratones que se utilice. Marquina-Castillo y cols., han clasificado diferentes cepas de *M. tuberculosis* en cuatro fenotipos en base a la expresión de las citocinas, la carga bacilar, la sobrevivencia y la transmisibilidad en modelos animales. A pesar de que las cepas tienen diferente antigenicidad y el genotipo es diferente, pueden agruparse en un mismo fenotipo porque su respuesta inmune es similar, como en el caso de las cepas Beijing (López, 2003) y las del fenotipo 1, ambas inducen sobrevivencias cortas con alta carga bacilar, con alta expresión de IL4, IL10 y poca expresión de IFN $\gamma$  (Marquina-Castillo, 2008). Así

## DISCUSIÓN

---

---

mismo se demostró que diferentes cepas de micobacterias provenientes de aislados clínicos tienen diferente inmunogenicidad y virulencia que influye en las manifestaciones clínicas y severidad de la tuberculosis en humanos.

En el laboratorio, se ha caracterizado la tuberculosis pulmonar que produce la cepa H37Rv en ratones BALB/c singénicos (Hernández-Pando, 1996). Brevemente, la tuberculosis pulmonar murina se caracteriza por una fase aguda con baja carga bacilar y alta expresión de  $IFN\gamma$  y  $TNF\alpha$ , que mantienen controlada la infección. Después de tres semanas, inicia la fase progresiva, en ella, hay una disminución de estas citocinas y un incremento en la expresión de IL-4, IL-10 y  $TGF\beta$ , lo que en conjunto desactiva la respuesta inmune celular protectora provocando un incremento en la carga bacilar y un aumento en el tejido pulmonar dañado lo que provoca la muerte de los ratones (Hernández-Pando, 1996). Cuando se utiliza la cepa de ratones C57BL/6, que por su fondo genético es resistente a la infección, el panorama de infección cambia. Los ratones C57BL/6 infectados con la cepa H37Rv, inducen una gran inflamación desde un inicio, ya que esta cepa produce una gran cantidad de  $IFN\gamma$ , así que contrario a lo que se pensaría, los ratones C57BL/6 infectados con *M.tuberculosis*, H37Rv, mueren por exceso de inflamación (observaciones no publicadas).

En este estudio utilizamos la cepa H37Rv y un aislado clínico MDR, por los resultados de la PCR en tiempo real, podemos darnos cuenta que cada cepa tiene un patrón distinto en la expresión de citocinas y quimiocinas. Los ratones tuberculosos infectados con la cepa H37Rv, tratados con adenovirus recombinantes, Ad $IFN\gamma$ , inducen la expresión de  $IFN\gamma$  y  $TNF\alpha$ , a los 14 días postratamiento, no hubo expresión significativa de iNOS pero sí hubo expresión de CCL2 a los 30 días. Al inicio del

## DISCUSIÓN

---

---

tratamiento, los ratones estaban cursando la fase progresiva de la enfermedad, caracterizada por un predominio en citocinas Th2. La administración de los adenovirus recombinantes, AdIFN $\gamma$ , indujeron la expresión transitoria de IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  y CCL2, que controló de forma drástica la infección, aunado a la posible activación de células como macrófagos y linfocitos TCD8<sup>+</sup> que ayudaron a controlar la infección disminuyendo la carga bacilar y el tejido dañado por neumonía. Resultados similares se encontraron en el caso de los ratones infectados con la cepa MDR, y tratados con AdIFN $\gamma$ . La expresión de las citocinas protectoras en los ratones infectados con la cepa MDR fue más evidente, ya que además de la expresión de CCL2, de IFN $\gamma$  y TNF $\alpha$  en los días 7 y 14 respectivamente, hubo una expresión significativa de iNOS desde el día 7 que se mantuvo hasta el día 30. El aumento de las citocinas Th1, inducido por los adenovirus recombinantes AdIFN $\gamma$ , dio lugar a la disminución en la carga bacteriana, disminución del tejido dañado lo que condujo a un control de la tuberculosis pulmonar.

### **CONCLUSIONES**

En resumen, nosotros hemos examinado por primera vez una forma eficiente de terapia génica para tratar la tuberculosis pulmonar activa, basada en la administración de adenovirus recombinantes que expresan IFN $\gamma$ . Éste tratamiento aumenta la inmunidad protectora cuando se administra a ratones que están en fase progresiva avanzada de tuberculosis pulmonar inducida por cepas MDR y no-MDR. Estos resultados, en asociación con el hecho de que AdIFN $\gamma$  no puede replicarse e integrarse al genoma del huésped, sugieren que esta forma de terapia génica puede ser eficiente para el tratamiento de la tuberculosis en humanos.

### **PERSPECTIVAS**

Utilizar el AdIFN $\gamma$ , en experimentos de convivencia, como profiláctico en ratones sanos para evitar el contagio de ratones infectados con cepas hipervirulentas como la cepa Beijing.

Utilizar el AdIFN $\gamma$ , combinado y solo con antibióticos en experimentos que eviten la reactivación en un modelo de tuberculosis latente.

Utilizar el AdIFN $\gamma$ , en modelos experimentales cuya enfermedad se vea comprometida la respuesta Th1 o como adyuvante para potenciar la respuesta inmune celular.

**BIBLIOGRAFÍA**

**Aguet M**, Merlin G. Purification of human  $\gamma$  interferon receptors by sequential affinity chromatography on immobilized monoclonal antireceptor antibodies and human  $\gamma$  interferon. *J.Exp.Med.* 1987;165:988-999.

**Alba R**, Bosch A, Chillon M. Gutless adenovirus: last generation adenovirus for gene therapy. *Gene therapy.* 2005;12: 518-527.

**Alba R**, Hearing P, Bosch A, Chillon M. Differential amplification of adenovirus vectors by flanking the packaging signal with attB/attP-PhiC31 sequences: implications for helper dependent adenovirus production. *Virology.* 2007.367:51-58.

**Bach E**, Aguet M, Schreiber R.D. The IFN $\gamma$  receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling. *Annu.Rev.Immunol.* 1997;15:563-591.

**Barbulescu K**, Becker C, Schaak JF, Schmitt E, Meyer ZB, Neurath MF. Cutting edge: IL-12 and IL-18 differentially regulate the transcriptional activity of the human IFN- $\gamma$  promoter in primary CD4+ T lymphocytes. *J.Immunol.* 1998;160:3642-3647.

**Barrera Lucia**. The Basics of Clinical Bacteriology. En el libro Tuberculosis 2007.From basic science to patient care. [www.Tuberculosis Textbook.com](http://www.Tuberculosis Textbook.com). Primera edición. Editorial Bourcillier Kamps. pp 91-112.

**Beck JM**, Liggitt HD, Brunette EN, Fuchs HJ, Shellito JE, Debs RJ. Reduction in intensity of Pneumocystis carinii pneumonia in mice by aerosol administration of interferon gamma. *Infect.Immun.* 1991; 59:3859-3862.

**Boehm U**, Klamp T, Groot M, Howard JC. Cellular responses to interferon- $\gamma$ . *Annu .Rev.Immunol.* 1997;15:749-795.

**Bogdan C**. Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol.* 2001. 2:907-916.

**Bogdan C** and Schleicher U. Production of interferon- $\gamma$  by myeloid cells- fact or fancy. *Trends in immunology.* 2006; 27:282-289.

**Brandes M**, Willimann K, Moser B. Professional antigen-presentation function by human gammadelta T Cells. *Science* 2005; 309: 264-8.

**Brooks Geo F**, Batel Janet S., Morse S.A. Microbiología Médica de Jawetz, Melnick y Adelberg. Ed. El Manual Moderno. ed. 17a. pp-451-456. México D.F. 2002

**Charo IF**, Ransohoff RM. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N.Engl J Med.* 2006.354:610-621

**Cheney IW**, Lai V, Zhong W, Brodhag T, Dempsey , Lim C, et al. Comparative analysis of anti-hepatitis C virus activity and gene expression mediated by alpha, beta and gamma interferons. *J.Virol.* 2002.76:11148-11154.

**Condos R**, Rom WN, Schluger NW. Treatment of multi-drug resistant pulmonary tuberculosis with interferon  $\gamma$  via aerosol. *Lancet.* 1997;349:1513-1515.

**Condos R**, Raju B, Canova A, Zhao BY, Weiden M, Rom WN, et al. Recombinant gamma interferon stimulates signal transduction and gene expression in alveolar macrophages in vitro and in tuberculosis patients. *Infect and Immun.* 2003; 71: 2058-2064.

**Cooper AM**, Dalton DK, Stewart TA, Griffin JP, Russell DG, Orme IM. Disseminated tuberculosis in interferon- $\gamma$  gene-disrupted mice. *J. Exp. Med.* 1993; 178: 2243-2247.

**Cooper AM**, Adams LB, Dalton DK, Appelberg R, Ehlers S. X. IFN- $\gamma$  and NO mycobacterial disease: new jobs for old hands. *Trends Microbiol.* 1993. 10:221-227.

**Dalton DK**, Pitts-Meek S, Keshav S, Figari IS, Bradley A, Stewart TA. Multiple defects of immune cell function in mice with disrupted interferon- $\gamma$  genes. *Science.* 1993;259:1739-1742.

**Davis BD**, Dulbecco R, Eisen H, Ginsberg H. Tratado de Microbiología.Ed. Masson.ed.4ta. pp875-882. España, 1996.

**Dorman SE**, Holland SM. Mutation in the signal transducing chain of the interferon-receptor and susceptibility to mycobacterial infection.*J.Clin.Inv.*1998;101:2364-2369.

**Dorman SE**, Holland SM. Interferon- $\gamma$  and interleukin-12 pathway defects and human disease. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2000;11:321-333.

**Durbin JE**, Hackenmiller R, Simon MC, Levy DE. Targeted disruption of the mouse STAT-1 gene results in compromised innate immunity to viral infection. *Cell.* 1996;84:443-50.

**Ealick SE**, Cook WJ,Vijay-Kumar S, Carson M, Nagabhushan TL, Trotta PP, et al. Three-dimensional structure of recombinant human interferon- $\gamma$ . *Science.* 1991;252:698-702.

**Farrar MA**, Schreiber RD. The molecular cell biology of interferon- $\gamma$  and its receptor. *Annu.Rev.Immunol.* 1993; 11:571-611.

**Fillat C**. Avances pediátricos BSCP Can Ped. 2004; 28 - nº 2 y 3. Perspectivas actuales de la terapia génica. Centre de Regulació Genòmica-CRG. Barcelona.

**Flynn JL**, Chan J, Triebold KJ, Dalton DK, Stewart TA, Bloom BR. An essential role for interferon gamma in resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J. Exp. Med.* 1993;178: 2249-2254.

**Flynn JL**, Chan J. Immunology of tuberculosis. *Annu .Rev. Immunol.* 2001;19: 93-129.

**Gao Z**, Kang Y, Xu Y, Shang Y, Gai J, He Q. Inhibition of allergic responsiveness in a murine asthma model via IFN-gamma transgene expression. *Chn.Med.J (Engl).* 2002;115:1470-1474.

**Gorocica P**, Jiménez-Martínez M, Garfias Y, Sada I, Lascurain R. Componentes glicosilados de la envoltura de *Mycobacterium tuberculosis* que intervienen en la patogénesis de la tuberculosis. *Rev.Inst.Nal.Enf.Resp.Mex.*2005.18:142-153.

**Graham FL**, Smiley J, Russell WC, Naim R. Characteristics of a human cell lines transformed by DNA from human adenovirus type 5.1977;36:59-74.

**Graham FL**. Adenovirus vectors for high-efficiency gene transfer into mammalian cells. *Immunol Today.* 2000; 21:426-428.

**Gray PW**, Goeddel DV. Cloning and expression of murine immune interferon cDNA. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 1983 ;80:5842-5846.

**Günzburg W**, Salmons B.Virus vector design in gene therapy.*Molecular Medicine Today.* 2005. 410-417.

**Gysemans C**, Callewaert H, Overbergh L, Mathieu C.Cytokine signalling in the beta cell: a dual role for IFN gamma. *Biochem.Soc.Trans.*2008;36:328-33.

**Haas C**, Ryffel B, Le Hir M. IFN $\gamma$  is essential for the development of autoimmune glomerulonephritis in MRL/lpr mice. *J.Immunol.* 1997; 158:5484-5491.

**Hahm E**, Lee Y.S, Jun HS. Suppressive effects of glucagon like peptide-1 on interferon-gamma-induced nitric oxide production in insulin-producing cells is mediated by inhibition of tumor necrosis alpha production. *J.Endocrinol.Invest.* 2008;31:334-40.

**Hallstrand TS**, Ochs HD, Zhu Q, Liles WC.. Inhaled IFN $\gamma$  for persistent nontuberculous mycobacterial pulmonary disease due to functional IFN $\gamma$  deficiency.*Eur.Respir.J.* 2004. 24:367-370.

**He TC**, Zhou S, Da Costa L, Yu Jian, Kinzler KW, Vogelstein. A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.*1998; 95: 2509-2514.

**Hernández-Pando R**, Orozco H, Sampieri A, Pavón L, Velasquillo C, Larriva-Sahd J, et al. Correlation between kinetics of Th1/Th2 células and pathology in a murine model of experimental pulmonary tuberculosis. *Immunol.* 1996; 89:26-33.

**Hernández-Pando R**, Orozco EH, Arriaga AK, Sampieri A, Larriva-Sahd J, Madrid MV. 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. *Immunol.* 1997;90:607-617.

**Hernández-Pando R**, Schön T, Orozco EH, Serafín J, Estrada-García I. Expression of nitric oxide synthase and nitrotyrosine during the evolution of experimental pulmonary tuberculosis. *Exp. Toxicol. Pathol.* 2001;53:257-65.

**Hernández-Pando R**, Aguilar León D, Orozco EH, Serrano A, Ahlem C, Trauger R, et al. 16-alpha-bromoepiandrosterone (HE2000) restores Th1 and accelerates chemotherapy-induced bacterial clearance in a model of progressive pulmonary tuberculosis. *J. Infec. Dis.* 2005;191: 299-306.

**Hernández-Pando R**, Chacón-Salinas R, Serafín-López J, Estrada I. Immunology, Pathogenesis, Virulence. En el libro Tuberculosis 2007. From basic science to patient care. www.Tuberculosis Textbook.com. Primera edición. Editorial Bourcillier Kamps. pp157- 206

**Huang S**, Hendriks W, Althage A, Hemmi S, Bluethmann H, Kamijo R, et al. Immune response in mice that lack the interferon- $\gamma$  receptor. *Science.* 1993;259:1742-1745.

**Isaacs A**, Lindenmann J. Virus interference. I. The interferon. *Proc R Soc Lond Ser B Biol Sci.* 1957; 147:258-267

**Janssen R**, Wengen A, Verhard E, Boer T, Zomerdijk T, Ottenhoff T, et al. Divergent role for TNF- $\alpha$  in IFN- $\gamma$ -induced killing of *Toxoplasma gondii* and *Salmonella typhimurium* contributes to selective susceptibility of patients with partial IFN- $\gamma$  receptor 1 deficiency. *J.Immunol.* 2002;169:3900-3907.

**Jarnagin JL**, Luschinger DW. The use of fluorescein diacetate and ethidium bromide as a stain for evaluating viability of mycobacteria. *Stain Technol.* 1980;55:253-258.

**Jouanguy E**, Lamhamedi CS, Lammas D, Dorman S, Fondanèche MC, Dupuis S, et al. A human IFNGR1 small deletion hotspot associated with dominant susceptibility to mycobacterial infection. *Nat Genetics.*1999;21:370-378.

**Kamijo R**, Le J, Shapiro D, Havell EA, Huang S, Aguet M, et al. Mice that lack that interferon- $\gamma$  receptor have profoundly altered response to infection with Bacillus Calmette-Guerin and subsequent challenge with lipopolysaccharide. *J.Exp.Med* 1993;178:1435-40.

**Kelker HC**, Le J, Rubin BY, Yip YK, Nagler C, Vilcek J. Three molecular weight forms of natural human interferon gamma revealed by immunoprecipitation with monoclonal antibody. *J.Biol.Chem.* 1984;259:4301-4.

**Kindler V**, Sappino I, Grau G, Piguet P, Vassalli P. The inducing role of tumor necrosis factor in the development of bactericidal granulomas during BCG infection. *Cell*. 1989;56:731-40.

**Koh WJ**, Kwon OJ, Suh GY, Chung MP, Kim H, Lee NY, et al. Six-month therapy with aerosolized interferon- $\gamma$  for refractory multidrug-resistant pulmonary tuberculosis. *J.Korean Med Sci*. 2004;19:167-171.

**Lai WC**, Bennett M, Pakes SP, Kumar V, Steurtemann D, Owusu I, et al. Resistance to *Mycoplasma pulmonis* mediated by activated natural killer cells. *J.Infect.Dis*. 1990;161:1269-1275.

**Lei D**, Lancaster JR, Joshi MS, Nelson S, Stoltz D, Bagby GJ, et al. Activation of alveolar macrophages and lung host defenses using transfer of the interferon-  $\gamma$  gene. *Am.J.Physiol*. 1997;272:L852-L859.

**Lockhart E**, Green AM, Flynn JL. IL-17 production is dominated by  $\gamma\delta$  T cells rather than CD4 T cells during *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Immunol* 2006; 177: 4662-9.

**López B**, Aguilar D, Orozco H, Burger M, Espitia C, Ritacco, Barrera L, Kremer K, et al. A marked difference in pathogenesis and immune response induced by different *Mycobacterium tuberculosis* genotypes. *Clin.Exp.Immunol*. 2003;133:30-37.

**Marquina-Castillo B**, García-García L, Ponce de León A, Jiménez-Corona M, Bobadilla del Valle M, Cano-Arellano B, et al. Virulence, immunopathology and transmissibility of selected strains of *Mycobacterium tuberculosis* in a murine model. *Immunology*.2008;

**Mata-Espinosa DA**, Clonación, expresión y ensayos funcionales de IL-1  $\alpha$ , IL-2 e IFN $\gamma$ . Tesis de Maestría. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN. 2001. pp60-64.

**Mata-Espinosa DA**, Mendoza-Rodríguez V, Aguilar-León D, Rosales R, López-Casillas F, Hernández-Pando R. Therapeutic effect of recombinant adenovirus encoding interferon-  $\gamma$  in a murine model of progressive pulmonary tuberculosis. *Mol.Ther*. 2008;16:1065-1072.

**Mather S.G**, Romero-Weaver A.L, Scarzello A.J, Gamero A.M. Interferon : cellular executioner or white knight? *Curr. Med. Chem*. 2007;14:1279-1289.

**Meraz MA**, White JM, Sheehan KCF, Bach EA, Rodig SJ, Dighe AS, et al. Targeted disruption of the STAT-1 gene in mice reveals unexpected physiologic specificity in the JAK-STAT signaling pathway. *Cell*. 1996. 84:431-42.

**Mühl H**, Pfeilschifter J. Anti-inflammatory properties of pro-inflammatory interferon  $\gamma$ . *Int Immunopharmacol*. 2003;3:1247-1255.

**Neumann**, Emmanuilidis, Stadler, Holzmann. Distinct functions of interferon- $\gamma$  for chemokine expression in models of acute lung inflammation. *Immunol.* 1998;95:512-521.

**Nicoletti F**, Di Marco R, Zaccone P, Xiang M, Magro G, Grasso S, et al. Dichotomic effects of IFN- $\gamma$  on the development of systemic lupus erythematosus-like syndrome in MRL-lpr/lpr mice. *Eur J.Immunol.* 2000;30:438-47.

**North RJ**, Jung YJ. Immunity to tuberculosis. *Annu .Rev. Immunol.* 2004;22: 599-623.

**Novick D**, Orcnansky P, Revel M, Rubinstein M. The human interferon- $\gamma$  receptor. *J. Biol. Chem.*1987; 262:8483-8487.

**Parvez MK**, Sehgal D, Sarin SK, Basir SF, Jameel S. Inhibition of hepatitis B virus DNA replicative intermediate forms by recombinant interferon- $\gamma$ . *World J.Gastroenterol.* 2006;12:3006-3014.

**Pedroza-González A**, García-Romo GS, Aguilar-León D, Calderón-Amador J, Hurtado-Ortiz R, Orozco-Estevez H, et al. In situ analysis of lung antigen-presenting células during murine pulmonary infection with virulent *Mycobacterium tuberculosis*. *Int.J.Exp.Pathol.* 2004.85:135-145.

**Peng Zhaohui**. Current status of Gendicine in China: Recombinant human Ad-p53 agent for treatment of cancers. *Human Gene Therapy* .2005.16:1016-1027.

**Pestka S**, Krause C, Walter M. Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunol Rev.*2004;202:8-32.

**Raju B**, Hoshino Y, Kuwabara K, Belitskaya I, Prabhakar S, Canova A, et al.. Aerolized gamma interferon (IFN- $\gamma$ ) induces expression of the genes encoding the IFN- $\gamma$ -inducible 10-kilodalton protein but not inducible nitric oxide synthase in the lung during tuberculosis. *Infect and Immun.* 2004.72: 1275-1283.

**Ramos–Bello D**, Ramos-Niembro F. Interferón: 50 años después (1957-2007). *Gac Méd Mex.* 2008; 144:55-65.

**Rao, A**. NF-AT: a transcription factor required for the co-ordinate induction of several cytokine genes. *Immunol Today.* 1994;15:274-281.

**Räty JK**, Lesch HP, Wirth T, Ylä-Herttuala S. Improving safety of gene therapy. *Current Drug Safety.* 2008. 3:46-53.

**Rook GAW**, Lowry D, Hernández Pando R. Immunotherapeutics for tuberculosis in experimental animals: Is there a common pathway activated by effective protocols. *J.Infec. Dis.* 2007.196: 191-198.

**Russell WC.** Update on adenovirus and its vectors. *J Gen Virol.* 2000.81, 2573-2606.

**Russell WC.** Adenoviruses: update on structure and function. *J Gen Virol.* 2009.90, 1-20.

**Schroder K,** Hertzog P, Ravasi T, Hume D. Interferon- $\gamma$ : an overview of signals, mechanisms and functions. *J.Leukoc.Biol.*2004.75:163-189.

**Schroecksnadel K,** Fuchs D. Interferon- $\gamma$  for counteracting T cell activation. *Trends Immunol.* 2006; 27:398.

**Seed B,** Arrufo A. Molecular cloning of the CD2 antigen, the T cell erythrocyte receptor, by a rapid immunoselection procedure. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 1987;84:3365-3369

**Segura MM,** Alba R, Bosch A, Chillón M. Advances in helper-dependent adenoviral vector research. *Current Gene Therapy.* 2008. 4:222-235.

**Sen GC.** Viruses and Interferons. *Annu.Rev.Microbiol.* 2001;55:255-81.

**Sherris J.C,** Kenneth J.R. Ray C.G. Microbiología Médica. Una introducción a las enfermedades infecciosas. Ed.Mc Graw Hill Interamericana.ed 1ª.México, 2005.pp 477-489.

**Skerrett SJ,** Martin TR. Intratracheal Interferon- $\gamma$  augments pulmonary defenses in experimental legionellosis. *Am. J.Respir.Crit.Care.Med.* 1994 ;149: 50-58.

**Smith-Jones P,** Werner L, Virgolini I. Interferon  $\gamma$  for respiratory diseases. *Lancet.* 1997.350: 524.

**Steinmüller C,** Franke-Ullmann, Lohnmann-Matthes ML, Emmendörffer A. Local activation of non-specific defense against a respiratory model infection by application of interferon- $\gamma$ : comparison between rat alveolar and interstitial lung macrophages. *Am. J. Respir. Cell Mol.Biol.* 2000; 22: 481-490.

**Su C,** Peng L, Sham J, Wang X, Zhang Q, Chua D, et al. Immune gene-viral therapy with triplex efficacy mediated by oncolytic adenovirus carrying and interferon-g gene yields efficient antitumor activity in immunodeficient and immunocompetent mice. *Mol Ther.*2006;13:918-927.

**Suárez-Méndez R,** García I, Fernández N, Valdés M, Milanés H, Carbonell D, et al. Adjuvant interferon gamma in patients with drug-resistant pulmonary tuberculosis: a pilot study. *BMC. Infect Dis.* 2004.4:44.

**Suzuki Y**, Joh K, Kobayashi A. Tumor necrosis factor-independent protective effect of recombinant IFN- $\gamma$  against acute toxoplasmosis in T-cell deficient mice. *J.Immunol.* 1991;147:2728-2733.

**Tang C**, Inman MD, Rooyen N, Yang P, Shen H, Matsumoto K, et al. Th Type1-stimulating activity of lung macrophages inhibits Th2- mediated allergic airway inflammation by an IFN $\gamma$ - dependent mechanism. *J.Immunol.* 2001;166:1471-1481.

**Tatsis N**, Ertl Hildegund C.J. Adenoviruses as vaccine vectors. *Mol.Ther.* 2004;10:616-629.

**Uzé G**, Monneron D. IL-28 and IL-29: Newcomers to the interferon family. *Biochimie.*2007; 89:729-734.

**Varga CM**, Wickham TJ, Lauffenburger DA.. Receptor-mediated targeting of gene delivery vectors: Insights from molecular mechanisms for improved vehicle design. *Biotechnol and Bioeng.* 2000.70:593-604.

**Walter M**, Windsor W, Nagabhushan T, Lundell D, Lunn C, Zauodny P, et al. Crystal structure of a complex between interferon- $\gamma$  and its soluble high-affinity receptor. *Nature.* 1995; 376:230-235.

**Warren SA**, Starr R, Fenner JE, Scott CL, Handman E, Sprigg N, et al. SOCS1 is a critical inhibitor of interferon signaling and prevents the potentially fatal neonatal actions of this cytokine. *Cell.*1999; 98:597-608.

**Wood KJ.** and Sawitzki B. Interferon- $\gamma$ : a crucial role in the function of induced regulatory T cells in vivo. *Trends Immunol.* 2006; 27: 183-187.

**World Health Organization.**2005. The WHO/IVATLD Global project on anti-tuberculosis drug resistance surveillance.1999-2002. World Health Organization. Geneva. Switzerland.

**Xu D**, Qu CK. Protein tyrosine phosphatases in the JAK/STAT pathway. *Front Biosci.* 2008.13:4925-32.

**Young D**, Hessel T, Dougan G. Chronic bacterial infections: living with unwanted guests. *Nat Immunol.* 2002.3:1026-1032.

**Wilson JM.** Gendicine: the first commercial gene therapy product. *Human Gene Therapy.*2005.16:1014.

**Therapeutic Effect of Recombinant Adenovirus Encoding Interferon- $\gamma$  in a Murine Model of Progressive Pulmonary Tuberculosis**

Dulce A.Mata-Espinosa, Valentín Mendoza-Rodríguez , Diana Aguilar-León, Ricardo Rosales, Fernando López-Casillas, Rogelio Hernández-Pando .  
Molecular .Therapy. 2008;16:1065-1072.

# Therapeutic Effect of Recombinant Adenovirus Encoding Interferon- $\gamma$ in a Murine Model of Progressive Pulmonary Tuberculosis

Dulce A Mata-Espinosa<sup>1,2</sup>, Valentin Mendoza-Rodríguez<sup>2</sup>, Diana Aguilar-León<sup>1</sup>, Ricardo Rosales<sup>3</sup>, Fernando López-Casillas<sup>2</sup> and Rogelio Hernández-Pando<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Patología, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán", Mexico City, Mexico; <sup>2</sup>Departamento de Biología Celular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico; <sup>3</sup>Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

We constructed recombinant adenoviruses encoding murine *interferon- $\gamma$*  (AdIFN $\gamma$ ) and tested its therapeutic efficiency in a well characterized model of progressive pulmonary tuberculosis (TB) in Balb/c mice, infected through the trachea with the laboratory drug-susceptible H37Rv strain or multidrug-resistant (MDR) clinical isolate. When the disease was in a late phase, 2 months after infection, we administered by intratracheal cannulation a single dose [ $1.7 \times 10^9$  plaque forming units (pfu)] of AdIFN $\gamma$  or the control adenovirus. Groups of mice were killed at different time-points and the lungs were examined to determine bacilli colony forming units (CFU), cytokine/chemokine gene expression, and CD4/CD8 subpopulations, and also subjected to automated histomorphometry. In comparison with the control group, after 2 weeks of treatment and during the next 6 months, AdIFN $\gamma$ -treated animals infected with either the H37Rv strain or the MDR strain showed significantly lower bacilli loads and tissue damage (pneumonia), higher expressions of *IFN- $\gamma$* , *tumor necrosis factor* (TNF), and inducible *nitric oxide synthase* (iNOS), and bigger granulomas. When compared with the results from conventional chemotherapy or AdIFN $\gamma$  treatment alone, the combined treatment with AdIFN $\gamma$  plus conventional chemotherapy shortened the time taken for reduction of bacillary load. This shows that gene therapy with AdIFN $\gamma$  efficiently reconstituted the protective immune response and controlled the progress of pulmonary TB produced by MDR or non-MDR strains.

Received 10 November 2006; accepted 21 January 2008; published online 22 April 2008. doi:10.1038/mt.2008.69

## INTRODUCTION

Tuberculosis (TB) continues to be a major public health problem, accounting for ~1.5 million deaths annually, with a third of the world population being latently infected. In the developed world, TB is a prototypical re-emerging infectious disease, while

in developing nations it is a devastating health problem.<sup>1</sup> TB incidence varies from 7/100,000 in Northern Europe to 300/100,000 in various parts of Africa. In Eastern Europe, the current incidence of TB exceeds 100/100,000 with a high proportion of them being multidrug-resistant (MDR) cases.

In mice as well as in humans, immunity against *Mycobacterium tuberculosis* is crucially linked to Th1 cytokines and tumor necrosis factor (TNF- $\alpha$ ).<sup>2-4</sup> Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) is a cytokine that promotes and plays a central role in the Th1-type immune response. Children with genetic mutations in *IFN- $\gamma$*  receptors are very susceptible to mycobacterial infections.<sup>5</sup> IFN- $\gamma$  or IFN- $\gamma$  receptor-knockout mice show many immune function defects,<sup>6,7</sup> and increased susceptibility to many intracellular pathogens, such as *Leishmania major*, *Listeria monocytogenes*, *M. tuberculosis*, and viruses.<sup>4,8</sup> Indeed, *IFN- $\gamma$*  gene-knockout mice are unable to contain and control virulent *M. tuberculosis* infection, because these mice fail to produce reactive nitrogen intermediates and the growth of the bacilli is exacerbated. These studies also demonstrate that IFN- $\gamma$  is essential for the integrity of granulomas.<sup>8,9</sup>

The main cellular sources of IFN- $\gamma$  are activated Th1 cells, natural killer cells, and CD8<sup>+</sup> cytotoxic T cells.<sup>2-4</sup> IFN- $\gamma$  induces expression of class II major histocompatibility complex molecules, TNF- $\alpha$  and its receptor, as well as inducible nitric oxide synthase (iNOS), which produces NO, stimulating the bactericidal activity of phagocytes.<sup>4,10</sup> In fact, both IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  have synergistic effects, IFN- $\gamma$  acting on the induction of the *nuclear factor- $\kappa$ B* gene and TNF- $\alpha$  on the activation of this factor that induces the transcription of target genes.<sup>11</sup>

The administration of IFN- $\gamma$  to animals increases resistance to several facultative intracellular pathogens.<sup>4,12-14</sup> Indeed, recombinant IFN- $\gamma$  has been used as an immunoadjuvant in patients with MDR TB and also in those with non-resistant TB, both with successful results.<sup>15,16</sup> Sputum cultures and smears become negative to mycobacteria, with clinical and radiographic improvements visible within 3 months after administration of IFN- $\gamma$ .<sup>16,17</sup> After 1 year of treatment, most patients are smear- and culture-negative for the bacillus.<sup>18</sup> This treatment is in general well tolerated.<sup>19</sup> Recombinant adenoviruses encoding cytokines can also be used

**Correspondence:** Rogelio Hernández-Pando, Experimental Pathology, National Institute of Medical Sciences and Nutrition "Salvador Zubirán", Calle Vasco de Quiroga 15, Tlalpan, CP14000 Mexico City, Mexico. E-mail: rhpando@quetzal.innsz.mx

as efficient immunomodulators. They possess several advantages, such as their natural tropism to the bronchial epithelium, inability to replicate, efficient adjuvanticity to Th1 cells, and the low cost of production.<sup>20,21</sup>

When Balb/c mice are infected through the intratracheal route with a high dose of *M. tuberculosis* H37Rv strain, there is a Th1 response peaking at 3 weeks, which temporarily controls bacterial growth.<sup>22</sup> Thereafter bacterial proliferation resumes, accompanied by an increment in Th2 cytokines, and a decrease in IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  and iNOS;<sup>23–25</sup> these changes mimic the course of the disease in humans. In this study, we used this model of progressive pulmonary TB by infecting mice with the laboratory strain H37Rv or with an MDR clinical isolate, so as to investigate the therapeutic potential of recombinant nonreplicative adenoviruses that express IFN- $\gamma$  (AdIFN $\gamma$ ) if administered during the progressive phase of the disease. We showed that, when administered at day 60 after infection, AdIFN $\gamma$  is effective in restoring Th1 activity, enhancing TNF- $\alpha$  and iNOS expressions, and reducing bacillary loads and tissue damage.

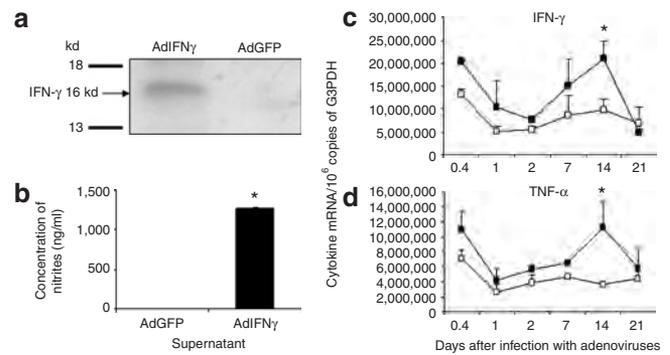
## RESULTS

### Analysis of the ability of AdIFN $\gamma$ to infect cells and secrete IFN- $\gamma$ with efficient biological activity

In order to evaluate the biological activity of our AdIFN $\gamma$  adenoviral vector *in vitro*, Mv1Lu lung epithelial cells were infected at a multiplicity of infection of 0.1–250 with AdIFN $\gamma$  or the control adenovirus that exclusively expresses *green fluorescent protein* (AdGFP). In order to overexpress the protein, we used a multiplicity of infection of 250. After 3 days of infection, the culture supernatants were collected, and the presence of IFN- $\gamma$  was determined using Western blot and enzyme-linked immunosorbent assay. As shown in **Figure 1a**, in the culture supernatants from AdIFN $\gamma$ -infected cells, one band of 16kd was detected using specific polyclonal antibodies against murine IFN- $\gamma$  (mIFN- $\gamma$ ), and 156 ng/ml of the cytokine was detected using enzyme-linked immunosorbent assay. In contrast, in the supernatants of AdGFP-infected cells, neither of these techniques was able to detect IFN- $\gamma$ . Both techniques, therefore, produced corroboration of efficient IFN- $\gamma$  secretion by AdIFN $\gamma$ -infected cells.

The biological activity of the secreted IFN- $\gamma$  was estimated in terms of the ability of the cell-conditioned media to stimulate the production of nitrites, after incubation with peritoneal murine macrophages. We detected 1,269 ng/ml of nitrites after incubating macrophages for 18 hours with the supernatant from Mv1Lu cells infected with AdIFN $\gamma$ . In contrast, Mv1Lu cells infected with the control virus AdGFP did not induce the production of nitrites (**Figure 1b**).

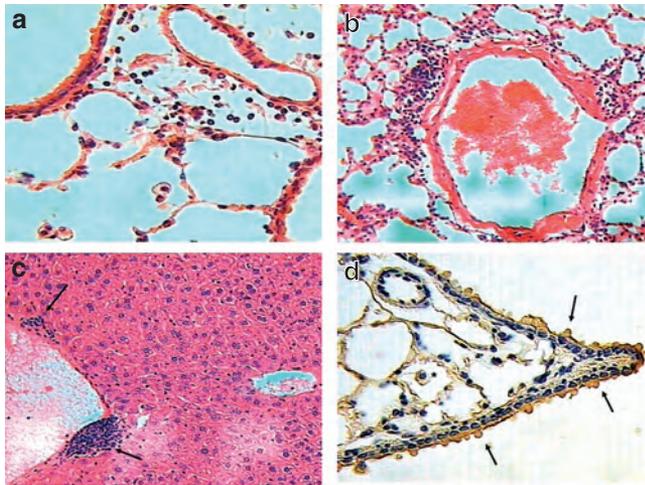
In order to study the ability of AdIFN $\gamma$  to infect and produce IFN- $\gamma$  *in vivo*, we determined the kinetics of IFN- $\gamma$  mRNA expression using conventional and real-time reverse transcriptase-PCR (RT-PCR) in nontuberculous Balb/c mice, after intratracheal administration of either AdIFN $\gamma$  or AdGFP, infecting mice with a low dose [ $3.4 \times 10^8$  plaque forming units (pfu)], intermediate dose ( $1.7 \times 10^9$  pfu), or high dose ( $3.4 \times 10^9$  pfu) of adenoviruses. Conventional RT-PCR showed that the intermediate dose ( $1.7 \times 10^9$  pfu) was the best, because it induced a level of gene expression similar to that induced by the high dose (data not shown), and it lies



**Figure 1** *In vitro* analysis of adenovirus encoding *interferon- $\gamma$*  (IFN- $\gamma$ ) (AdIFN $\gamma$ ), kinetics of IFN- $\gamma$ , and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) mRNA expression, after intratracheal inoculation with AdIFN $\gamma$  or control adenovirus expressing *green fluorescent protein* (AdGFP) in Balb/c mice. **(a)** Western blot of culture supernatants from Mv1Lu cells infected with AdIFN $\gamma$  and AdGFP [multiplicity of infection (MOI) = 250]. The band of 16kd corresponds to IFN- $\gamma$  detected using an anti-mouse IFN- $\gamma$  antibody. **(b)** Production of nitrites by peritoneal macrophages incubated with culture supernatants from Mv1Lu cells infected with AdIFN $\gamma$  or AdGFP (MOI = 250); high concentration of nitrites was detected only in peritoneal macrophages incubated with supernatants from Mv1Lu cells infected with AdIFN $\gamma$ . **(c)** Kinetics of IFN- $\gamma$  and **(d)** TNF- $\alpha$  gene expression determined using real-time PCR in the lungs of healthy Balb/c mice infected with  $1.7 \times 10^9$  plaque forming units/mouse of AdIFN $\gamma$  (closed squares) or control AdGFP (open squares). Data are the mean values  $\pm$  SD from two experiments, each carried out in triplicate. Asterisks represent statistical significance ( $P < 0.05$ ).

within the dose range used in other similar published studies.<sup>12,26</sup> For better quantitative analysis of induced cytokine expression in healthy mice after the administration of an intermediate dose of AdIFN $\gamma$ , the kinetics of IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  expression were determined using real-time PCR. As shown in **Figure 1c**, both AdGFP and AdIFN $\gamma$  induced rapid and high IFN- $\gamma$  expression (the level of expression induced by AdIFN $\gamma$  being higher), followed by progressive decrease on days 1 and 2. At the time-points of 1 week and 2 weeks after the intratracheal administration, higher IFN- $\gamma$  expression was seen in mice treated with AdIFN $\gamma$ , while animals infected with AdGFP maintained constant lower levels. Similar expression kinetics were observed for TNF- $\alpha$  mRNA (**Figure 1d**).

Additionally, we conducted a histopathological study of the lungs, liver, and kidneys of these animals. At 24 hours after inoculation of recombinant adenoviruses, middle inflammatory response comprised of neutrophils, lymphocytes, and macrophages was seen around the bronchial and vascular walls, as well as in the alveolar-capillary interstitium (**Figure 2a**). AdIFN $\gamma$  induced a more severe inflammation than AdGFP did. At the time-points of 7, 14, and 21 days, these inflammatory response were observed to decrease progressively, persisting as mild hyperplasia of the lymphoid tissue associated with bronchial mucosa and small and scattered lymphocytic cuffs around small blood vessels (**Figure 2b**). At 14 and 21 days after infection, the histopathological study of the liver showed scattered, small lobular nodules comprised of lymphocytes, and slight inflammation in some portal areas, without necrosis (**Figure 2c**). The kidneys did not show histological abnormalities. In order to define the type of cells infected by recombinant adenoviruses, we carried out immunohistochemical tests to detect adenovirus-specific

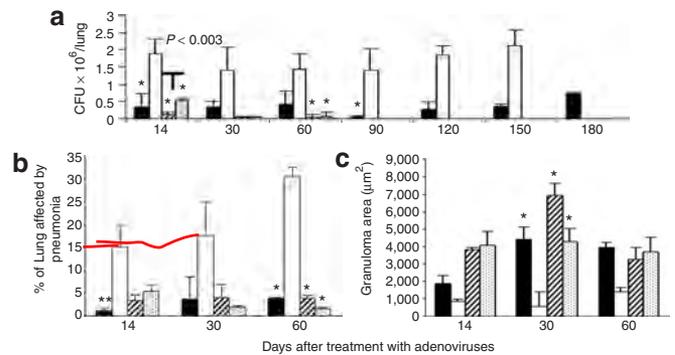


**Figure 2** Representative lung histopathology findings and immunohistochemical data from healthy mice infected with recombinant adenoviruses by intratracheal cannulation. **(a)** Slight inflammatory infiltrate around small blood vessels and bronchi is seen 24 hours after adenovirus encoding *interferon- $\gamma$*  (AdIFN- $\gamma$ ) administration. **(b)** At 21 days after AdIFN $\gamma$  administration, there is mild chronic inflammation around blood vessels. **(c)** Small nodules of chronic inflammation, located around hepatic portal areas (arrows), as seen at 21 days after AdIFN $\gamma$  administration. **(d)** When specific antibodies against adenoviral proteins are used, strong immunostaining is exhibited by bronchial epithelial cells (arrows) and macrophages (asterisk).

antigens. Strong immunostaining in bronchial epithelial cells, and macrophages located in inflammatory infiltrates were seen (**Figure 2d**). This experiment showed, therefore, that the administration of recombinant adenoviruses by the intratracheal route induced efficient infection of the epithelium and macrophages, and mild pulmonary and hepatic inflammation, at least during 1 month after the treatment. In order to study the impact of this treatment in systemic inflammation, we measured reactive C-protein in the sera of these animals. We did not detect this acute-phase protein in any mouse sera (data not shown).

### Therapeutic activity of AdIFN $\gamma$ in Balb/c mice infected with *M. tuberculosis* H37Rv strain, and its effect when administered in combination with conventional chemotherapy

The administration of a single dose of AdIFN $\gamma$  ( $1.7 \times 10^9$  pfu) significantly reduced colony forming units (CFU) after 2 weeks of treatment in tuberculous mice. This trend was consistent up to 6 months after adenovirus administration. In contrast, control animals treated with AdGFP showed higher lung bacillary loads and, at 5 months after the treatment, all of them were dead (**Figure 3a**). The decrease in the numbers of live bacilli exhibited by AdIFN $\gamma$ -treated mice correlated with lung histopathology (**Figure 4b**). As shown in **Figures 3b** and **4b**, these animals exhibited rapid decrease of the lung surface affected by pneumonia, and a significant increase in granuloma size (**Figures 3c** and **4e**) at day 30, 7.5-fold bigger than in control mice. Moreover, immunohistochemical analysis to detect adenovirus-specific antigens and IFN- $\gamma$  showed strong immunostaining in bronchial epithelial cells, and macrophages located in granulomas and pneumonia (**Figure 4e** inset). This shows that epithelial cells and

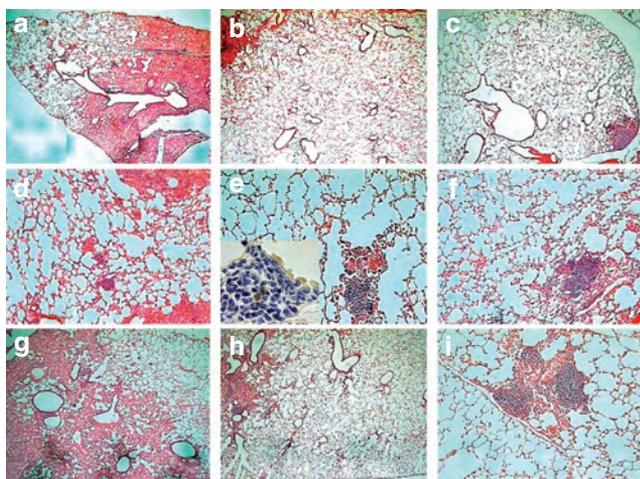


**Figure 3** Effect of a single administration of adenovirus encoding *interferon- $\gamma$*  (AdIFN $\gamma$ ) on the number of colony forming units (CFUs), and morphometry results in mice lungs infected with *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv strain. **(a)** Colony bacilli forming units from tuberculous mice treated with AdIFN $\gamma$  (black bars), control adenovirus expressing *green fluorescent protein* (AdGFP) (white bars), AdIFN $\gamma$  plus conventional chemotherapy (cross-hatched bars), and only with bacilli chemotherapy (dotted bars). The limits of detection of CFUs are 100–250 million numbers. **(b)** Percentage of the lung occupied by pneumonia. **(c)** Granuloma area. All treatments significantly reduced bacillary load in the lung when compared with results in control mice treated with AdGFP. The combination treatment significantly reduced the number of CFUs as compared to the results with chemotherapy alone, when measured on day 14 ( $P < 0.003$ ). From days 90 to 180 there were no bacilli detected in the groups of mice that had received combination treatment and chemotherapy alone. On day 180 there were no surviving animals in the control group that had received AdGFP. The data are mean values  $\pm$  SD from three different experiments. Asterisks on the AdIFN $\gamma$  bar represent statistical significance relative to the control group ( $P < 0.05$ ).

macrophages were efficiently infected by AdIFN $\gamma$  and expressed IFN- $\gamma$ , whereas in control animals bronchial epithelium and macrophages showed antigen adenovirus immunostaining without IFN- $\gamma$  positivity.

With regard to cytokine expression, **Figure 5** shows that AdIFN $\gamma$  treatment induced higher IFN- $\gamma$  expression which peaked at 2 weeks, and that the expression of TNF- $\alpha$  also increased, peaking at 4 weeks. Mice treated with AdIFN $\gamma$  also exhibited higher but nonsignificant *iNOS* expression than the control group. With regard to chemokine expression, the treatment with AdIFN $\gamma$  induced significantly higher *CCL2* expression at day 30 when compared with the control group, which showed constant low levels (**Figure 5**). The expressions of *CCL3* induced by the two recombinant adenoviruses were similar (data not shown). Cytofluorometry analysis, using the same number of cells from lung suspensions, showed higher CD8 $^+$  T cells at the time-points of 4 and 5 months after treatment with AdIFN $\gamma$  (**Figure 6**), while there were similar numbers of CD4 $^+$  T cells in mice treated with either AdGFP or AdIFN $\gamma$ .

These data therefore indicate that the administration of AdIFN $\gamma$  by itself mitigates the progression of murine pulmonary TB. Next, we evaluated whether AdIFN $\gamma$  treatment helps to shorten the duration of conventional chemotherapy. For this purpose, groups of tuberculous mice were treated with AdIFN $\gamma$  plus conventional chemotherapy (combined treatment), and compared with another group of animals treated exclusively with antibiotics. In comparison with mice exclusively treated with conventional chemotherapy, animals treated during 2 weeks with the combined therapy showed a significant decrease in bacillary loads ( $P < 0.003$ )



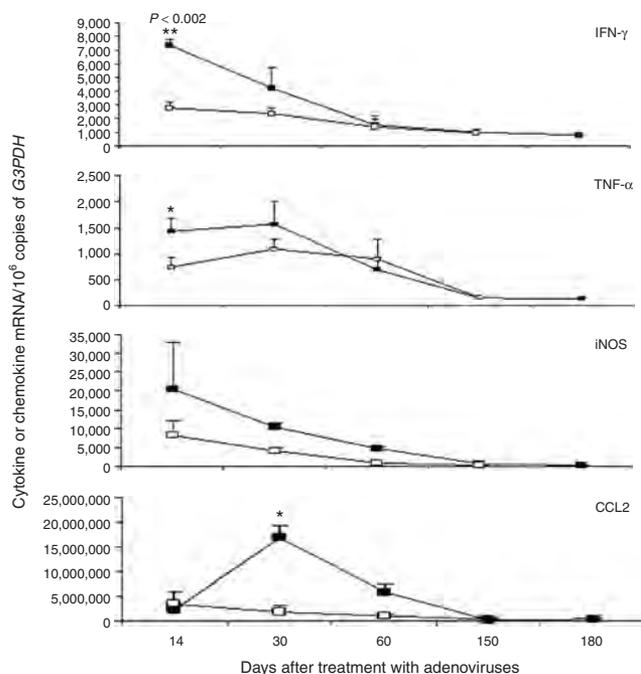
**Figure 4** Representative lung histopathology from mice treated with recombinant adenoviral vector 60 days after infection with *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv strain or multidrug-resistant (MDR) clinical isolate. **(a)** Extensive pneumonia in mice infected with the H37Rv strain, as assessed at 2 months after treatment with control adenovirus expressing *green fluorescent protein* (AdGFP). **(b)** In contrast, very little pneumonia is apparent 2 months after adenovirus encoding *interferon-γ* (AdIFN $\gamma$ ) administration in mice infected with the same H37Rv strain. **(c)** Even less pneumonia is observed 2 months after a single dose of AdIFN $\gamma$  plus conventional chemotherapy administered daily in animals infected with the same H37Rv strain. **(d)** Small granulomas were observed in mice infected with H37Rv and treated with control AdGFP. **(e)** Larger granulomas are observed in mice infected with H37Rv strain and treated with AdIFN $\gamma$ . The inset represents immunohistochemical detection of adenovirus, showing strong positivity in macrophages (arrow) located in peribronchiolar granulomas, as well as in the bronchiolar epithelium. **(f)** Large granulomas are also seen in mice treated with the combination of AdIFN $\gamma$  plus conventional chemotherapy. **(g)** Two months after administration of control vector AdGFP, mice infected with the MDR strain showed extensive pneumonia. In contrast, 2 months after AdIFN $\gamma$  administration, mice that had been infected with the MDR strain showed **(h)** small pneumonic areas and **(i)** large granulomas.

(**Figure 3a**). As described earlier, the administration of AdIFN $\gamma$  also reduced bacillary loads in the lung after 14 days, but not to the statistically significant extent observed with the combined treatment. On the other hand, at the same time-point, the extent of reduction in CFU induced by AdIFN $\gamma$  treatment was slightly lower than with conventional chemotherapy. However, on day 120 the bacillary loads in the lungs of mice that received the combined treatment were similar to those shown by mice treated exclusively with chemotherapy. Then, no bacilli growth was detected in lung homogenates from both groups at 3 to 6 months after the treatment (**Figure 3a**).

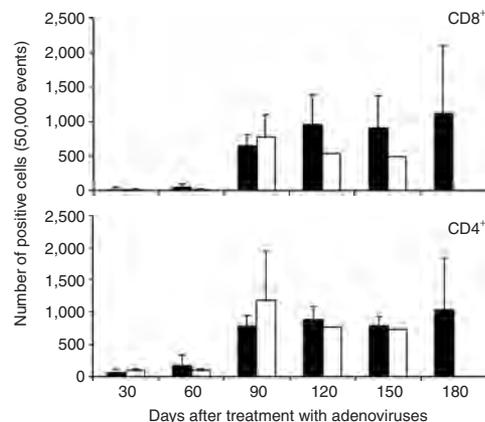
At day 60 after the treatment, both the combined treatment and chemotherapy had significantly reduced the percentage of pneumonia (**Figures 3b** and **4c**) in comparison with the control group (**Figure 4a**). Combined therapy and chemotherapy induced 11.8- and 7.2-fold increases respectively in granuloma size after 1 month of treatment (**Figures 3c** and **4f**).

### Therapeutic effect of AdIFN $\gamma$ in Balb/c mice infected with MDR mycobacteria

Because of re-emerging MDR strains, it is necessary to search for new therapeutic approaches. **Figure 7a** shows that a single dose

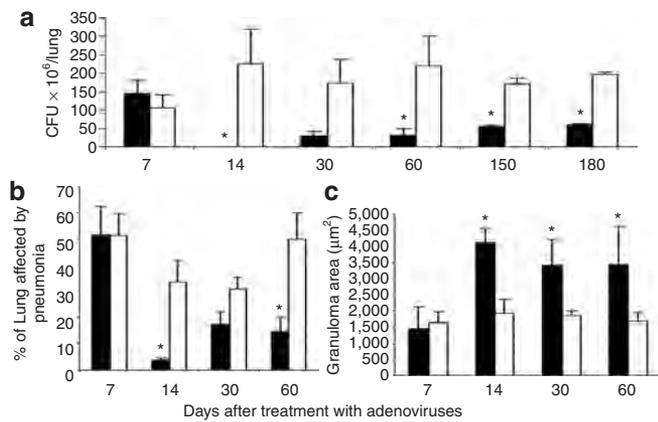


**Figure 5** Effect of a single administration of adenovirus encoding *interferon-γ* (AdIFN $\gamma$ ) on the expression of *cytokines* and *CCL2* in mice lungs infected with *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv strain. Mice were treated with a single dose of AdIFN $\gamma$  at  $1.7 \times 10^9$  plaque forming units (pfu)/mouse (closed squares), or with control adenovirus expressing *green fluorescent protein* (AdGFP) at  $1.7 \times 10^9$  pfu/mouse (open squares) on day 60 after infection with tuberculosis (TB), and the gene expression of the indicated cytokine or chemokine was determined using real-time reverse transcriptase-PCR. The results are given as mean values  $\pm$  SD. Asterisks represent statistical significance ( $P < 0.05$ ). iNOS, inducible nitric oxide synthase; TNF- $\alpha$ , tumor necrosis factor- $\alpha$ .



**Figure 6** Determination of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell subsets in lung homogenates from H37Rv-infected mice treated with recombinant adenoviruses. Adenovirus encoding *interferon-γ* treatment (black bars) induced a higher number of CD8<sup>+</sup> T cells than control adenovirus expressing *green fluorescent protein* (AdGFP) treatment (white bars) at days 120 and 150, while similar numbers of CD4<sup>+</sup> T cells were seen in both groups.

of AdIFN $\gamma$  ( $1.7 \times 10^9$  pfu), given to mice infected with the MDR strain, produced long-duration, significant decreases in bacillary loads in the lung from days 14 to 180 of treatment (**Figure 7a**). The bacillary loads increased slightly after day 30, but were lower than in the control group. As in mice infected with the H37Rv strain,

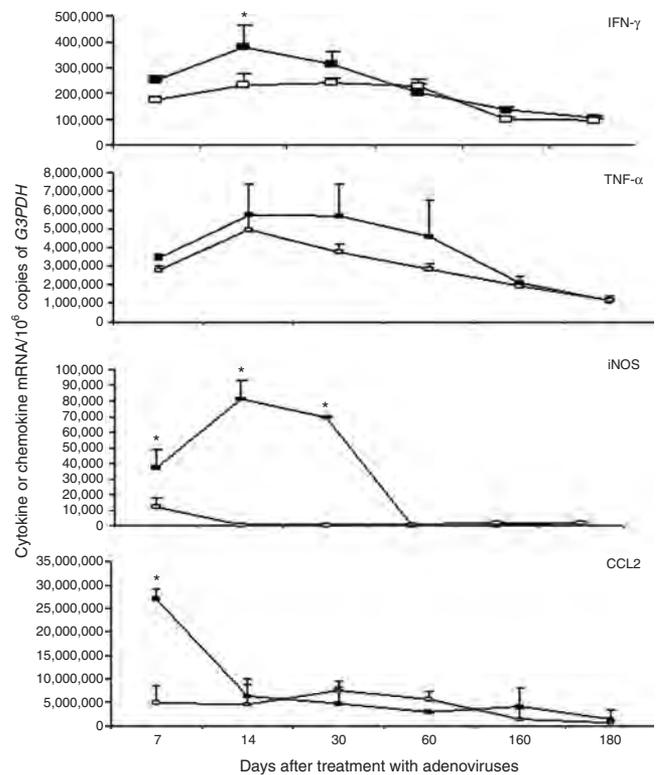


**Figure 7** Effect of a single administration of adenovirus encoding *interferon- $\gamma$*  (AdIFN $\gamma$ ) on the bacillary load and morphometry in mice lungs infected with multidrug resistant (MDR) *Mycobacterium tuberculosis* isolate. **(a)** Mice were treated with  $1.7 \times 10^9$  plaque forming units (pfu)/mouse of AdIFN $\gamma$  (black bars) or control adenovirus expressing *green fluorescent protein* (AdGFP) (white bars) on day 60 after infection with MDR bacilli. Bacillary loads in the lungs significantly decreased in mice treated with AdIFN $\gamma$  after day 14 and up to day 180. **(b)** Percentage of the lung occupied by pneumonia. **(c)** Granuloma area. Results are mean values  $\pm$  SD from four mice from three different experiments. Asterisks represent statistical significance ( $P < 0.05$ ). There was no material available for morphometry after day 60 after treatment.

animals infected with the MDR strain and treated with AdIFN $\gamma$  also showed correlation between the decrease in bacillary loads in the lung and the results of morphometry analysis (Figure 4g–i). Even a single application of AdIFN $\gamma$  was sufficient to induce significant 8.5-fold and 3.3-fold reductions in pneumonic area at the time-points of day 14 and day 60, respectively, when compared with the controls (Figures 4h and 7b), while granuloma size was 2-fold bigger than in the control group at the same time-points (Figures 4i and 7c). With regard to the expression of cytokines, MDR-infected mice treated with AdIFN $\gamma$  showed significantly higher *IFN- $\gamma$*  expression after 2 weeks, followed by a progressive decrease, while *TNF- $\alpha$*  expression also increased after 2 weeks and remained steady until day 30 (Figure 8). After 1 week of treatment, the expression of *iNOS* was significantly higher reaching a peak 1 week later (days 14 and 30). *CCL2* expression was significantly higher at 1 week of AdIFN $\gamma$  administration, followed by a progressive decrease (Figure 8). As was shown in H37Rv-infected mice, MDR-infected animals treated with either of the recombinant adenoviruses showed similar levels of *CCL3* expression (data not shown).

## DISCUSSION

Our results, using a well characterized model of progressive pulmonary TB and recombinant adenoviruses that efficiently infect cells and expresses active IFN $\gamma$ , confirm the significant participation of this cytokine in the immune protection against *M. tuberculosis*, and suggest that this approach could be potentially very useful as a highly efficient treatment strategy for drug-sensitive as well as drug-resistant pulmonary TB. In fact, a single administration of AdIFN $\gamma$  during the late stages of pulmonary TB, in mice infected with the laboratory strain H37Rv, significantly decreased bacillary loads and tissue damage. This finding correlated with the observed higher



**Figure 8** Effect of a single administration of adenovirus encoding *interferon- $\gamma$*  (AdIFN $\gamma$ ) on the expression of cytokines and *CCL2* in mice lungs infected with *Mycobacterium tuberculosis* multidrug-resistant (MDR) strain. Mice treated with  $1.7 \times 10^9$  plaque forming units/mouse of AdIFN $\gamma$  (closed squares) or control adenovirus expressing *green fluorescent protein* (AdGFP) (open squares) on day 60 after infection with MDR strain. Results are mean values  $\pm$  SD. Asterisks represent statistical significance ( $P < 0.05$ ).

expressions of *IFN- $\gamma$* , *TNF- $\alpha$* , and *iNOS*. This novel molecular therapy of pulmonary TB, using adenoviruses encoding protective cytokines, has several important advantages. First, the cytokine gene expression is transient but very high,<sup>20</sup> and localizes preferentially to lung because of the natural tropism of the adenoviruses for the respiratory epithelium.<sup>21</sup> Besides, because the cytokine gene was delivered as a transgene engineered into the adenoviral gene backbone, substituting the viral genes E1 and E3 that are involved in avoidance of host immunity, killing of infected cells, and viral replication,<sup>27</sup> it induces only mild and transient inflammation in the lung with minimal systemic dissemination, as was confirmed by the finding of only a slight inflammation of the liver.

Mice treated with AdIFN $\gamma$  showed high *IFN- $\gamma$*  expression only 2 weeks after the administration of the vector. This transient IFN $\gamma$  production was enough to reactivate protective immunity and control the growth of bacilli for an extended duration. This efficient bacteriostatic effect was possible because IFN $\gamma$  is a pleiotropic cytokine capable of priming macrophages and upregulating the expression of class II major histocompatibility complex molecules in a wide range of cell types,<sup>3,4</sup> enhancing antigen presentation to T cells, and producing diverse protective cytokines (interleukin-12, interleukin-15, and TNF- $\alpha$ ), chemokines (CXCL9 and CXCL10), and other significant factors that participate in the control of infection by intracellular pathogens.<sup>2–4</sup>

Our results show that this treatment efficiently induced high levels of *TNF- $\alpha$* , a significant pro-inflammatory cytokine involved in triggering the production of reactive nitrogen and oxygen intermediates, both of which are essential bactericidal factors.<sup>2-4</sup> Indeed, the production of NO is one of the most distinctive results of macrophage activation induced by IFN- $\gamma$ .<sup>10</sup> It is known that NO is important in the control of mycobacterial growth in mice. For example, iNOS-knockout mice are very susceptible to mycobacterial infection, and the use of NO inhibitors in tuberculous mice results in high bacillary loads and severe tissue damage, thereby suggesting that NO could also have a role to play in controlling excessive inflammation.<sup>28</sup> NO is known to impede adherence and transmigration of monocytes and granulocytes, and therefore its absence can contribute to progressive pneumonia, as was observed in the late phase of our animal model. On the other hand, IFN- $\gamma$ -knockout mice present uncontrolled lymphocyte activation (CD4<sup>+</sup> T cells fail to undergo apoptosis), and purulent and necrotic granulomas with uncontrolled growth of bacilli and systemic dissemination.<sup>9,28</sup> The efficient production of IFN- $\gamma$  after AdIFN $\gamma$  administration permitted control of bacterial growth and also reduced excessive inflammation.<sup>29</sup> This treatment also increased granuloma size, because IFN- $\gamma$  contributes to granuloma organization, mainly by the induction of chemokines such as CCL2 and adhesion molecules with high specificity for lymphocytes rather than for granulocytes.<sup>28</sup> In this experimental model, granuloma size correlated with protection, while pneumonia was associated with disease progression.<sup>30,31</sup> Interestingly, AdIFN $\gamma$  treatment induced higher levels of CD8<sup>+</sup> T cells, a finding that is in agreement with those of recent successful immunotherapeutic regimens in experimental TB.<sup>32</sup> Likewise, the anti-TNF- $\alpha$  monoclonal antibody inhibits the formation of granulomas in mice infected with bacille Calmette-Guérin.<sup>33</sup>

In agreement with our results, similar efficient therapeutic effects have been found in mice infected with *Pseudomonas aeruginosa* and treated with a single dose of AdIFN $\gamma$  (10<sup>9</sup> pfu).<sup>12</sup> The peak expression of IFN- $\gamma$  was observed on day 3 and efficient control of the infection was achieved. It has also been shown that when patients with TB were treated with recombinant IFN- $\gamma$ , administered by aerosol, transcription factors were induced, such as the signal transducer and activator of transcription-1 (STAT-1), IFN regulatory factor-1 and IFN regulatory factor-9 (ref. 34), and chemokines such as the IFN-inducible 10-kd protein (IP-10), leading to efficient control of the disease.<sup>35</sup>

A major problem in the control of TB is the failure on the part of patients to comply with the 6-month treatment regimens. For this reason, we tested whether AdIFN $\gamma$  in conjunction with conventional chemotherapy could shorten the long duration of the antibiotic regimen needed for the treatment of pulmonary TB. Some beneficial therapeutic effects such as accelerated elimination of bacteria can be obtained when AdIFN $\gamma$  is used as an adjunct to conventional chemotherapy, and a single dose of recombinant adenoviruses is more convenient to administer than the daily doses of antibiotics. Perhaps the combined treatment could also provide the immunological support needed in order to limit recurrence of infection; this experiment is now in progress in our laboratory.

Another important problem in the control of TB is the emergence of MDR strains. Worldwide, ~300,000 new cases of MDR

TB emerge each year, and this form of TB has been identified as a significant problem in every region under World Health Organization surveillance.<sup>36</sup> Treatment of MDR is resource intensive, and usually requires a combination of second-line drugs that are more expensive, more toxic, and less effective than the drugs used in standard therapy. Our results show that gene therapy using AdIFN $\gamma$  could prove to be an efficient and novel treatment to control MDR TB. In agreement with our experimental results, studies in patients with MDR TB have demonstrated that treatment with recombinant IFN- $\gamma$  administered by aerosols increased the local immune responses with no significant toxicity,<sup>17</sup> decreasing the size of cavitory lesions after 6 months.<sup>16</sup> We consider that gene therapy using AdIFN $\gamma$  could be preferable to recombinant IFN- $\gamma$  treatment,<sup>20,37</sup> because production of AdIFN $\gamma$  is less expensive, and only one dose has been shown to be sufficient to control the growth of bacilli in mice in the late stages of severe TB.

In summary, we have tested for the first time an efficient form of gene therapy to treat active pulmonary TB, based on the administration of recombinant adenoviruses that express IFN- $\gamma$ . This treatment increased protective immunity when administered to mice that were already in the late progressive phase of either MDR or non-MDR pulmonary TB. These findings, combined with the fact that AdIFN $\gamma$  cannot replicate and integrate to the host genome, suggest that this form of gene therapy could be efficient for the treatment of TB in humans.

## MATERIALS AND METHODS

**Construction of recombinant adenoviruses encoding mIFN- $\gamma$ .** mIFN- $\gamma$  cDNA was obtained from the plasmid pcDNA3-mIFN $\gamma$  (kindly provided by Dr. J. Berumen, Experimental Medicine Unit, General Hospital of Mexico). The *Xba*I and *Bam*HI cDNA fragment encoding mIFN- $\gamma$  was checked by automatic sequencing and confirmed by comparing with the description by Gray and Goeddel, NM\_008337 (ref. 38). The cDNA was subcloned specifically in the *Xba*I and *Bam*HI restriction sites into the polylinker of pCMV5 vector. In order to check the biological activity of IFN- $\gamma$ , COS-1 cells (American Type Culture Collection, ATCC no. CRL-1650) were transiently transfected through the diethylaminoethyl-dextran method<sup>39</sup> using the constructed pCMV5-IFN- $\gamma$  and the empty vector pCMV5. The supernatants were harvested 24 hours after transfection, and used for determining the concentration and biological activity of IFN- $\gamma$ , using enzyme-linked immunosorbent assay and nitrites production assay, respectively.

For producing AdIFN $\gamma$  and AdGFP, we followed the procedure described by He *et al.*<sup>27</sup> For details see **Supplementary Materials and Methods**.

These recombinant adenoviruses that exclusively express GFP were used for checking the efficiency of cell infection *in vitro* using fluorescence microscopy, and were also used as controls in the *in vivo* experiments.

**Production of high titers of AdIFN $\gamma$  and AdGFP.** Efficient high-level AdIFN $\gamma$  production was obtained using Fibracel disks (New Brunswick Scientific, Edison, NJ) and Spinner Baskets (New Brunswick Scientific, Edison, NJ). For a detailed description see **Supplementary Materials and Methods**.

**Determination of IFN- $\gamma$  secretion and bioactivity in the supernatants of Mv1Lu cells infected with recombinant adenoviruses.** The ability of the recombinant adenovirus to infect eukaryotic cells and to transduce the IFN- $\gamma$  gene was confirmed using three different methods: enzyme-linked immunosorbent assay, western blot, and nitrite production. For details see **Supplementary Materials and Methods**.

**Determination of extent of infection with AdIFN $\gamma$  and IFN- $\gamma$  gene expression in lungs of mice.** The ability of AdIFN $\gamma$  to infect the lungs of mice, and the appropriate dose of recombinant adenovirus required to treat TB in mice were determined by infecting normal Balb/c mice with one of three different doses ( $3.4 \times 10^8$ ,  $1.7 \times 10^9$ , and  $3.4 \times 10^9$  pfu) of the adenovirus through the intratracheal route, and checking the level and duration of IFN- $\gamma$  expression, using conventional PCR, as described earlier.<sup>23</sup> Groups of 10 male Balb/c mice each were anesthetized by introducing sevoflurane vapor (Abbott Laboratories, Mexico City, Mexico) into a sealed acrylic cage. The mice were then placed immobile on cardboard and infected, using a rigid stainless steel cannula (Thomas Scientific, Swedesboro, NJ) connected to an insulin syringe. The cannula was introduced into the mouth and then directed into the trachea, and the selected dose of recombinant adenoviruses suspended in 100  $\mu$ l of storage buffer was injected. The mice were maintained in a vertical position until the effect of the anesthesia passed. Groups of three mice each were killed by exsanguination under terminal anesthesia after 6 hours, and after 1, 2, 7, 14, and 21 days, and the lungs were immediately collected and frozen in liquid nitrogen. Total RNA was isolated using RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) as described in the subsequent text.

**Experimental model of progressive pulmonary TB in Balb/c mice.** The experimental model of progressive pulmonary TB has been described in detail earlier.<sup>23,24</sup> Briefly, the virulent strains of *M. tuberculosis* H37Rv and MDR (clinical isolate, resistant to all first-line antibiotics) were cultured in Proskauer and Beck medium (Difco Laboratories, Detroit, MI). After 1 month of culture, mycobacteria were harvested and adjusted to  $2.5 \times 10^5$  cells in 100  $\mu$ l phosphate-buffered saline, aliquoted, and maintained at  $-70^\circ\text{C}$  until use. Before use, the bacteria were re-counted and their viability was checked as described.<sup>40</sup> For details see **Supplementary Materials and Methods**.

Animals that were still alive 60 days after H37Rv or MDR strain infection were randomly allocated into six groups awaiting treatment. All treatments were started 60 days after infection, and groups of five animals each were killed at days 7, 14, 30, 60, 90, 120, 150, and 180 after starting treatment in order to study the effects of each treatment. All data points are mean values  $\pm$  SD of five animals for a representative experiment, and three separate experiments were carried out. The first group of 20 mice with TB received a single dose of AdIFN $\gamma$  ( $1.7 \times 10^9$  pfu). The second group received a combination therapy, including conventional chemotherapy, that is, rifampicin (10 mg/kg), isoniazid (10 mg/kg), and pyrazinamide (30 mg/kg), administered daily through intragastric cannula, plus AdIFN $\gamma$  administered by intratracheal cannulation in a single dose. The third group of mice received only conventional chemotherapy. The fourth group consisted of mice infected with the MDR strain and treated with a single dose of AdIFN $\gamma$  ( $1.7 \times 10^9$  pfu). The control groups infected with either H37Rv or MDR strains received the control adenovirus AdGFP at the same dose,  $1.7 \times 10^9$  pfu. The effectiveness of the various treatments was determined by quantifying the bacillary load in the lungs (CFU), assessing the extent of tissue damage using histopathology/automated morphometry, and determining the levels of cytokine expression using real-time RT-PCR.

**Determination of CFU in infected lungs.** Right or left lungs from four mice were used in two different experiments immediately after the animals were killed. The lungs were homogenized with a polytron (Kinematica, Lucerne, Switzerland) in sterile tubes containing 2 ml phosphate-buffered saline-Tween-80 at 0.05%. Four or five dilutions of each homogenate were spread onto duplicate plates containing Bacto Middlebrook 7H10 agar (Difco laboratories, Detroit, MI) enriched with oleic acid, albumin, catalase, and dextrose-enriched medium (Becton, Dickinson, Sparks, MD). The number of colonies was counted at 21 days after inoculation.

**Preparation of lung tissue for histology/morphometry and immunohistochemical studies.** For the histological study, the right or left lung from

three different mice per group was intratracheally perfused with 10% formaldehyde (J.T. Baker, Estado de México, México) dissolved in phosphate-buffered saline. Parasagittal sections were dehydrated and embedded in paraffin (Oxford Labware, St. Louis, MO), sectioned, and stained with hematoxylin and eosin. The area of granuloma (measured in square microns) and the percentage of lung surface affected by pneumonia were determined using an automated image analyzer (Q Win Leica, Milton Keynes, Cambridge, UK), as described.<sup>24</sup> Measurements were taken by investigators who were blinded as to the treatment groups, and the data are reported as the mean values  $\pm$  SD from three different mice at each time-point in each of two different experiments. For immunohistochemical studies, see the **Supplementary Materials and Methods**.

**RT-PCR and real-time PCR analysis of expression of cytokines, chemokines, and iNOS in lung homogenates.** Three lungs, right or left, from two different experiments were removed and used for isolating RNA from the different mice groups, using RNeasy minikit (Qiagen, Hilden, Germany), immediately after the animals were killed. Each lung was placed in 2 ml Roswell Park Memorial Institute medium (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) containing 0.5 mg/ml of collagenase type 2 (Worthington, Lakewood, NJ), and incubated for 1 hour at  $37^\circ\text{C}$ ; it was then passed through a 70- $\mu$ m cell sieve (BD Biosciences, Bedford, MA), crushed with a syringe plunger, and rinsed with the medium. The cells were centrifuged, the supernatant was removed, and red cells were eliminated using lysis buffer. After the cells were counted, 350  $\mu$ l RLT buffer (Qiagen, Hilden, Germany) was added to  $5 \times 10^6$  cells, and RNA was extracted using the RNeasy mini kit (Qiagen, Hilden, Germany), in accordance with the manufacturer's instructions. The RNA was treated with 1 U DNase (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) for each microgram of RNA. The quality and quantity of RNA were evaluated using spectrophotometry (260/280 nm) on agarose gels. Reverse transcription of the mRNA was performed with 5  $\mu$ g RNA and oligo-dT (Promega, Madison, WI), using the Omniscript kit (Qiagen, Hilden, Germany). Real-time PCR was performed using the 7500 real-time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA) and Quantitect SYBR Green Master-mix kit (Qiagen, Hilden, Germany). Standard curves of quantified and diluted PCR product, as well as negative controls, were included in each PCR run. For primers sequences, see **Supplementary Materials and Methods**. The cell cycling conditions used were initial denaturation at  $95^\circ\text{C}$  for 15 minutes, followed by 40 cycles each at  $95^\circ\text{C}$  for 20 seconds,  $60^\circ\text{C}$  for 20 seconds, and  $72^\circ\text{C}$  for 34 seconds. Quantities of the specific mRNA in the sample were measured in accordance with the corresponding gene-specific standard. The mRNA copy number of each cytokine was related to 1 million copies of mRNA encoding the *G3PDH* gene.

**Flow cytometry analysis.** Lung cell suspensions were used for evaluating lung subpopulations of T lymphocytes using fluorescence-activated cell sorting. The antibodies used were anti-CD3-PE (BD Pharmingen, San Jose, CA), anti-CD4-CY5 (BD Pharmingen, San Jose, CA), and anti-CD8-FITC (BD Pharmingen, San Jose, CA), as described earlier.<sup>41</sup>

**Statistics.** A one-way analysis of variance was used for comparing possible differences in bacilli load in the lungs and results of morphometry analysis between the control group and the treatment groups (the group treated with AdIFN $\gamma$  and those that received the combined treatment). We used the SPSS 12.0 software for Windows XP. Differences between treatment groups relating to real-time RT-PCR and concentrations of nitrites were determined using Student's *t*-test. Significance was accepted at a *P* value  $<0.05$ .

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank Kornelia Polyak (Dana Farber Cancer Institute, Boston, MA) for her guidance and assistance in the production of adenoviral vectors. This work was supported in part by grants from the Universidad Nacional Autónoma de México, PAPIIT IN-239602 (to F.L.-C.), the International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology (to F.L.-C.), the

Wellcome Trust (to R.H.-P.), European Community (INCO DC ICA4-CT-2002-10063 to R.H.-P.), and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACyT G36923 M (to R.H.-P.), México. D.A.M.-E. was a recipient of a PhD scholarship also provided by CONACyT. The authors declare no conflict of interest.

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

### Materials and Methods.

## REFERENCES

- North, RJ and Jung, YJ (2004). Immunity to tuberculosis. *Annu Rev Immunol* **22**: 599–623.
- Flynn, JL and Chan, J (2001). Immunology of tuberculosis. *Annu Rev Immunol* **19**: 93–129.
- Young, D, Hussels, T and Dougan, G (2002). Chronic bacterial infections: living with unwanted guests. *Nat Immunol* **3**: 1026–1032.
- Boehm, U, Klamp, T, Groot, M and Howard, JC (1997). Cellular responses to interferon- $\gamma$ . *Annu Rev Immunol* **15**: 749–795.
- Dorman, SE and Holland, SM (2000). Interferon- $\gamma$  and interleukin-12 pathway defects and human disease. *Cytokine Growth Factor Rev* **11**: 321–333.
- Dalton, DK, Pitts-Meek, S, Keshav, S, Figari, IS, Bradley, A and Stewart, TA (1993). Multiple defects of immune cell function in mice with disrupted interferon- $\gamma$  genes. *Science* **259**: 1739–1742.
- Huang, S, Hendriks, W, Althage, A, Hemmi, S, Bluethmann, H, Kamijo, R *et al.* (1993). Immune response in mice that lack the interferon- $\gamma$  receptor. *Science* **259**: 1742–1745.
- Bogdan, C (2001). Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol* **2**: 907–916.
- Cooper, AM, Dalton, DK, Stewart, TA, Griffin, JP, Russell, DG and Orme, IM (1993). Disseminated tuberculosis in interferon- $\gamma$  gene-disrupted mice. *J Exp Med* **178**: 2243–2247.
- Flynn, JL, Chan, J, Triebold, KJ, Dalton, DK, Stewart, TA and Bloom, BR (1993). An essential role for interferon  $\gamma$  in resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Exp Med* **178**: 2249–2254.
- Baldwin, AS Jr. (1996). The NF- $\kappa$ B and I $\kappa$ B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol* **14**: 649–683.
- Lei, D, Lancaster, JR Jr, Joshi, MS, Nelson, S, Stoltz, D, Bagby, GJ *et al.* (1997). Activation of alveolar macrophages and lung host defenses using transfer of the interferon- $\gamma$  gene. *Am J Physiol* **272**: L852–L859.
- Skerrett, SJ and Martin, TR (1994). Intratracheal interferon- $\gamma$  augments pulmonary defenses in experimental legionellosis. *Am J Respir Crit Care Med* **149**: 50–58.
- Steinmüller, C, Franke-Ullmann, G, Lohnmann-Matthes, ML and Emmendorffer, A. (2000). Local activation of nonspecific defense against a respiratory model infection by application of interferon- $\gamma$ : comparison between rat alveolar and interstitial lung macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol* **22**: 481–490.
- Smith-Jones, PM, Linkesch, W and Virgolini, I (1997). Interferon- $\gamma$  for respiratory diseases. *Lancet* **350**: 524.
- Koh, WJ, Kwon, OJ, Suh, GY, Chung, MP, Kim, H, Lee, NY *et al.* (2004). Six-month therapy with aerosolized interferon- $\gamma$  for refractory multidrug-resistant pulmonary tuberculosis. *J Korean Med Sci* **19**: 167–171.
- Condos, R, Rom, WN and Schluger, NW (1997). Treatment of multi-drug resistant pulmonary tuberculosis with interferon- $\gamma$  via aerosol. *Lancet* **349**: 1513–1515.
- Suárez-Méndez, R, García-García, I, Fernández-Olivera, N, Valdés-Quintana, M, Milanés-Virelles, MT, Carbonell, D *et al.* Adjuvant interferon  $\gamma$  in patients with drug-resistant pulmonary tuberculosis: a pilot study. (2004). *BMC Infect Dis* **4**: 44.
- Hallstrand, TS, Ochs, HD, Zhu, Q and Liles, WC (2004). Inhaled IFN- $\gamma$  for persistent nontuberculous mycobacterial pulmonary disease due to functional IFN- $\gamma$  deficiency. *Eur Respir J* **24**: 367–370.
- Graham, FL (2000). Adenovirus vectors for high-efficiency gene transfer into mammalian cells. *Immunol Today* **21**: 426–428.
- Tatsis, N and Ertl, HC (2004). Adenoviruses as vaccine vectors. *Mol Ther* **10**: 616–629.
- Rook, GA, Dheda, K and Zumla, A (2005). Do successful tuberculosis vaccines need to be immunoregulatory rather than merely Th1-boosting? *Vaccine* **23**: 2115–2120.
- Hernández-Pando, R, Orozco, H, Sampieri, A, Pavón, L, Velasquillo, C, Larriva-Sahd, J *et al.* (1996). Correlation between kinetics of Th1, Th2 cells and pathology in a murine model of experimental pulmonary tuberculosis. *Immunology* **89**: 26–33.
- Hernández-Pando, R, Orozco, EH, Arriaga, AK, Sampieri, A, Larriva-Sahd, J and Madrid, MV (1997). 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* **90**: 607–617.
- Hernandez-Pando, R, Schön, T, Orozco, EH, Serafini, J and Estrada-García, I (2001). Expression of inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine during the evolution of experimental pulmonary tuberculosis. *Exp Toxicol Pathol* **53**: 257–265.
- Gao, Z, Kang, Y, Xu, Y, Shang, Y, Gai, J and He, Q (2002). Inhibition of allergic responsiveness in a murine asthma model via IFN- $\gamma$  transgene expression. *Chin Med J (Engl)* **115**: 1470–1474.
- He, TC, Zhou, S, da Costa, LT, Yu, J, Kinzler, KW and Vogelstein, B (1998). A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 2509–2514.
- Cooper, AM, Adams, LB, Dalton, DK, Appelberg, R and Ehlers, S (2002). IFN- $\gamma$  and NO mycobacterial disease: new jobs for old hands. *Trends Microbiol* **10**: 221–226.
- Mühl, H and Pfeilschifter, J (2003). Anti-inflammatory properties of pro-inflammatory interferon- $\gamma$ . *Int Immunopharmacol* **3**: 1247–1255.
- Hernández-Pando, R, Aguilar-Leon, D, Orozco, H, Serrano, A, Ahlem, C, Trauger, R *et al.* (2005). 16- $\alpha$ -Bromoepiandrosterone restores T helper cell type 1 activity and accelerates chemotherapy-induced bacterial clearance in a model of progressive pulmonary tuberculosis. *J Infect Dis* **191**: 299–306.
- Hernández-Pando, R, Pavón, L, Arriaga, K, Orozco, H, Madrid-Marina, V and Rook, G (1997). Pathogenesis of tuberculosis in mice exposed to low and high doses of an environmental mycobacterial saprophyte before infection. *Infect Immun* **6**: 84–90.
- Rook, GA, Lowrie, D and Hernández-Pando, R (2007). Immunotherapeutics for tuberculosis in experimental animals: is there a common pathway activated by effective protocols. *J Infect Dis* **196**: 191–198.
- Kindler, V, Sappino, AP, Grau, GE, Pigué, PF and Vassalli, P (1989). The inducing role of tumor necrosis factor in the development of bactericidal granulomas during BCG infection. *Cell* **56**: 731–740.
- Condos, R, Raju, B, Canova, A, Zhao, BY, Weiden, M, Rom, WN *et al.* (2003). Recombinant  $\gamma$  interferon stimulates signal transduction and gene expression in alveolar macrophages *in vitro* and in tuberculosis patients. *Infect Immun* **71**: 2058–2064.
- Raju, B, Hoshino, Y, Kuwabara, K, Belitskaya, I, Prabhakar, S, Canova, A *et al.* (2004). Aerosolized  $\gamma$  interferon (IFN- $\gamma$ ) induces expression of the genes encoding the IFN- $\gamma$ -inducible 10-kilodalton protein but not inducible nitric oxide synthase in the lung during tuberculosis. *Infect Immun* **72**: 1275–1283.
- World Health Organization (2005). The WHO/IUATLD Global project on anti-tuberculosis drug resistance surveillance 1999–2002. World Health Organization: Geneva, Switzerland.
- Varga, CM, Wickham, TJ and Lauffenburger, DA (2000). Receptor-mediated targeting of gene delivery vectors: insights from molecular mechanisms for improved vehicle design. *Biotechnol Bioeng* **70**: 593–605.
- Gray, PW and Goeddel, DV (1983). Cloning and expression of murine immune interferon cDNA. *Proc Natl Acad Sci USA* **80**: 5842–5846.
- Seed, B and Aruffo, A (1987). Molecular cloning of the CD2 antigen, the T-cell erythrocyte receptor, by a rapid immunoselection procedure. *Proc Natl Acad Sci USA* **84**: 3365–3369.
- Jarnagin, JL and Luchsinger, DW (1980). The use of fluorescein diacetate and ethidium bromide as a stain for evaluating viability of mycobacteria. *Stain Technol* **55**: 253–258.
- Pedroza-González, A, García-Romo, GS, Aguilar-León, D, Calderón-Amador, J, Hurtado-Ortiz, R, Orozco-Estevez, H *et al.* (2004). *In situ* analysis of lung antigen-presenting cells during murine pulmonary infection with virulent *Mycobacterium tuberculosis*. *Int J Exp Pathol* **85**: 135–145.