



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**EVALUACIÓN DE MUTANTES EN LOS GENES DE  
VIRULENCIA DE H37RV EN UN MODELO MURINO  
DE TUBERCULOSIS PROGRESIVA**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**BIÓLOGO**

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

**CAMILO MOLINA ROMERO**

**DIRECTOR DE TESIS:  
DRA. DIANA ELOISA AGUILAR LEÓN  
2010**

**Hoja de Datos del Jurado**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

1. Datos del alumno

Molina

Romero

Camilo

Teléfono 5516799598

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

40509419-8

2. Datos del tutor

Dra

Diana Elodia

Aguilar

León

3. Datos del sinodal 1

Dr

Erasmus

Martinez

Cordero

4. Datos del sinodal 2

Dra

Blanca

Bazan

Perkins

5. Datos del sinodal 3

M en C

José Luis

Silencio

Barrita

6. Datos del sinodal 4

Biól

Edgar

Sánchez

Guerrero

# Evaluación de mutantes en los genes de virulencia de H37Rv en un modelo murino de tuberculosis progresiva

Índice	1
Resumen	2
1 Introducción	3
2 <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	6
2.1 Estructura de la pared celular	7
2.2 Requerimientos nutricionales y ambientales	11
3 Mecanismos inmunológicos en la tuberculosis.	12
4 Modelos experimentales de la tuberculosis	13
5 Genes relacionados con la virulencia	15
5.1 Pho P	15
5.2 FadD26	17
6 Vacunas contra la tuberculosis	17
6.2 Vacunas vivas atenuadas	18
6.3 Vacunas de subunidades	19
6.4 Vacunas de ADN	19
7 Hipótesis	20
8 Objetivo	20
8.1 General	20
8.2 Particulares	21
9 Material y Métodos	21
9.1 Preparación de las cepas H37Rv y MT103	21
9.2 Modelo Experimental de fase progresiva	23
9.3 Carga bacteriana (UFC´s)	23
9.4 Preparación del tejido pulmonar para el estudio histológico y morfométrico.	23
9.5 Análisis estadístico	24
10 Resultados.	24
10.1 Sobrevida, histopatología y carga bacilar en los ratones Balb/C infectados vía intratraqueal	24
10.1.1 Cepa mutante fadD26 y la cepa parental <i>Mycobacterium tuberculosis</i> MT103.	24
10.1.2 Cepa mutante pho P (SO2) y la cepa parental <i>Mycobacterium Tuberculosis</i> MT103.	26
Discusión	28
Conclusión	29
Bibliografía	30

## Resumen

La Tuberculosis es una enfermedad infectocontagiosa causada por el microorganismo patógeno intracelular facultativo *Mycobacterium tuberculosis*, este puede producir tanto enfermedad progresiva como infección latente asintomática. Alrededor de un tercio de la población mundial está infectada, sin embargo, solo 5% de los infectados desarrollan la enfermedad en los primeros años de haberse dado la exposición. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 2007 se presentaron 9.27 millones de casos nuevos de tuberculosis y alrededor de 3 millones de muertes [1]. Existen una gran variedad de factores que contribuyen al incremento de estos números como: la pobreza, la desnutrición, las guerras y el virus de inmunodeficiencia humana (VIH). Para este último, la tuberculosis es la primera enfermedad secundaria en individuos VIH positivos [2]. A pesar de la existencia de tratamientos con antibióticos eficaces (isoniazida, rifampicina, piracinamida, estreptomycin y etambutol), la duración de estos tratamientos es de por lo menos 6 meses. La razón, es que algunas bacterias persisten ya que su metabolismo no se encuentra activo por estar en fase estacionaria, o puede que se estén replicando muy lentamente en viejas lesiones o en sitios de fibrosis, en donde la cantidad de oxígeno es muy baja [3]. La larga duración de la terapia antifímica combinada y sus efectos secundarios, facilita la aparición de cepas resistentes a múltiples antibióticos.

La cepa atenuada BCG-Phipps proveniente de la cepa *Mycobacterium bovis*, fue descubierta en 1908 y usada por primera vez como vacuna en 1921. Es la única vacuna disponible actualmente en contra de la tuberculosis y la más ampliamente administrada de todas. Sin embargo, un promedio de la efectividad global de la vacuna, resulta en una eficacia de alrededor del 50%, lo cual hace de la BCG una vacuna poco satisfactoria. Por lo tanto, el desarrollo de nuevas vacunas contra la tuberculosis es esencial, pero no trivial.

La secuenciación del genoma de *Mycobacterium tuberculosis* puede representar uno de los avances más importantes rumbo al desarrollo de una nueva vacuna, pues, por medio de estrategias como la mutación *in Vitro*, utilizando transposones [61] para evaluar diversos genes potencialmente importantes en la virulencia, el grupo de investigación de la Dra. Brigitte Gicquel [58], ha generado bacterias mutantes para los genes *phoP* y *FadD26*. El primero, forma parte de un sistema que controla la transcripción de varios genes que son esenciales para la supervivencia de la bacteria en la célula huésped en diversas bacterias patógenas como en el caso de *Salmonella*, *Shigella* o *Yersinia* [54] y el segundo codifica enzimas encargadas de la biosíntesis de dimicocerosatos de ftiocerol (DIM por su abreviatura en inglés). DIM's son una de las seis familias de ácidos grasos largos, ramificados y multi-metilados (en sus ramificaciones), que se sitúan en la envoltura celular de *Mycobacterium tuberculosis* [59]. Para evaluar el efecto de infección de estas bacterias mutantes con respecto a su cepa parental, se usó el modelo murino de tuberculosis pulmonar progresiva del laboratorio del Dr. Rogelio Hernández Pando [53] y se pudo observar que los dos tipos de mutantes muestran ser hipervirulentas cuando tienen ausencia de los genes *fadD26* y *phoP*, presentando una buena sobrevivencia, una baja cantidad de UFC's así como muy poco o nulo daño tisular, cuando son comparados con el grupo de referencia o su parental.

## 1 Introducción

La Tuberculosis es una enfermedad infectocontagiosa causada por el microorganismo patógeno intracelular facultativo *Mycobacterium tuberculosis*, este puede producir tanto enfermedad progresiva como infección latente asintomática. Generalmente la infección inicial ocurre durante la niñez y el sistema inmune es capaz de controlarla. Es entonces que la enfermedad se encuentra en estado latente y aunque se ha controlado, no todas las bacterias han sido eliminadas y se pueden encontrar en los tejidos de forma quiescente con poca o nula actividad reproductiva por el resto de la vida del individuo infectado. Este estado es asintomático y solo puede ser revelado por un estudio radiográfico de tórax que muestre nódulos fibróticos o cicatrices calcificadas o por un resultado positivo en el examen de hipersensibilidad cutánea a la tuberculina (PPD) [1].

Basta inhalar una pequeña cantidad de bacilos que hayan sido expulsados por una persona con tuberculosis pulmonar al toser, estornudar, hablar o escupir para contraer la enfermedad. Alrededor de un tercio de la población mundial está infectada, sin embargo, solo 5% de los infectados desarrollan la enfermedad en los primeros años de haberse dado la exposición. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 2007 se presentaron 9.27 millones de casos nuevos de tuberculosis y alrededor de 3 millones de muertes [1].

Existen una gran variedad de factores que contribuyen al incremento de estos números como: la pobreza, la desnutrición, las guerras y el virus de inmunodeficiencia humana (VIH). Para este último, la tuberculosis es la primera enfermedad secundaria que se puede presentar en individuos VIH positivos, de acuerdo con la OMS, de los 9.27 millones de casos reportados en 2007, alrededor de 1.37 millones eran individuos VIH positivo [2].

A pesar de la existencia de tratamientos con antibióticos eficaces (isoniazida, rifampicina, piracinamida, estreptomina y etambutol), la duración de estos tratamientos es de por lo menos 6 meses. La razón, es que algunas bacterias persisten ya que su metabolismo no se encuentra activo por estar en fase estacionaria, o puede que se estén replicando muy lentamente en viejas lesiones o en sitios de fibrosis, en donde la cantidad de oxígeno es muy baja [3].

La larga duración de la terapia antifúngica combinada y sus efectos secundarios, facilita la aparición de cepas resistentes a múltiples antibióticos. Esto, ocurriendo tanto en países subdesarrollados como en vías de desarrollo, ya que los pacientes, al sentirse mejor y/o al presentar efectos secundarios, suelen abandonar el tratamiento. Una solución a este problema ha sido el tratamiento estrictamente supervisado, el cual, consiste en supervisar al paciente diariamente mientras ingiere su dosis de tratamiento. Esta es una solución muy eficaz sin embargo, su aplicación en países subdesarrollados y en vías de desarrollo muchas veces no es viable por las carencias existentes en los servicios de salud, así como los costos extras y la falta de acceso a unidades médicas cercanas [3].

Debido a lo anterior, en casi todos los países en donde existe esta infección, se registran cerca de 490 000 casos nuevos cada año de cepas resistentes a múltiples antibióticos (MDR) y de 40 000 casos nuevos cada año de cepas extensamente resistentes a antibióticos (XDR-TB). La OMS, basada en datos colectados en 100 países durante la última década, calcula que representan alrededor del 5% de todos los casos y considera que una cepa MDR es aquella que resiste como mínimo a los antibióticos isoniazida y rifampicina, por lo cual, se debe tratar con antibióticos de segunda línea cuyos precios son elevados y aumentando los efectos secundarios. Para las cepas XDR-TB no existe tratamiento [1].

En México la cantidad de personas con tuberculosis sigue siendo relativamente alta en términos de incidencia. Para el año 2006 se reportaron 16 000 casos nuevos, cifra que corresponde a una incidencia de 21 por 100 000 habitantes [4]. Con respecto a la resistencia bacteriana, México ocupa el primer lugar de resistencia en toda América (13%). Estos datos nos dejan ver el impacto que este microorganismo tiene actualmente, y el fenómeno que estamos presenciando nos recuerda a lo vivido durante la época preantibiótica [5]. Para el 2006 se estimó una prevalencia de MDR de 2.4% para casos nuevos (24% de MDR-TB en pacientes previamente tratados y 5.8% de MDR-TB de todos los casos de tuberculosis), sin embargo, estos casos corresponden solamente a algunos estados de la república por lo que es esperado que las tasas sean mucho mayores; así mismo, sólo se reportaron casos aislados de XDR-TB.

La lucha del hombre contra la tuberculosis se ha caracterizado por diversas instancias en las que parecería que el control de la enfermedad está por alcanzarse. Robert Koch

en 1882, identifica al microorganismo responsable de la tuberculosis y en 1890 creyó haber encontrado un tratamiento efectivo contra esta enfermedad con el purificado parcial de la tuberculina (PPD). Posteriormente, se comprobó que este purificado solo funciona como herramienta de apoyo en el diagnóstico de la tuberculosis [6]. La cepa atenuada BCG-Phipps proveniente de la cepa *Mycobacterium bovis*, fue descubierta en 1908 y usada por primera vez como vacuna en 1921. En la década de 1940, la estreptomycinina fue considerada como el bálsamo milagroso contra la tuberculosis y para la década de 1950 con los tratamientos multidrogas (isoniazida, rifampicina, etambutol) se llegó a pensar que se erradicaría finalmente esta enfermedad. Sin embargo, para finales del siglo XX, la aparición de cepas drogo-resistentes y la epidemia mundial del VIH, el objetivo parece alejarse cada vez mas [7]. La preocupación a nivel mundial que esta enfermedad ha generado, hace necesario contar con nuevas estrategias que ayuden a disminuir sus efectos.

En la patogenia de la tuberculosis participan factores del huésped, el medio ambiente y de la propia micobacteria. En relación con los factores del huésped, es especialmente importante la eficiencia de la inmunidad celular. En esta ultima participan genes de resistencia y susceptibilidad a la enfermedad como Nramp y sst1 [8-11]. Existen varias evidencias experimentales que demuestran que la protección inmunológica en la tuberculosis depende de un patrón tipo Th1, conformado por citocinas como la Interleucina-1 (IL-1), interleucina-2 ( IL-2), Interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) y Factor de Necrosis tumoral alpha (TNF- $\alpha$ ), mientras que durante la progresión de la enfermedad se observa un predominio de citocinas tipo Th2, caracterizado por la presencia de Interleucina-4 (IL-4), Interleucina-5 (IL-5) e Interleucina-10 (IL-10) así como la presencia del factor de transformación tumoral beta (TGF- $\beta$ ), que además de contribuir a la actividad del patrón de citocinas tipo 2, presenta una actividad de inactivador de macrófagos [3, 12-14]. En relación a los factores ambientales, es claro que el estado nutricional, el hacinamiento, además del contacto con micobacterias saprofitas, son factores de suma importancia [15-17]. Por otro lado, el agente infecciosos juega un papel importante en el desarrollo y progresión de la enfermedad. A pesar de esto, los factores de virulencia de la micobacteria, son de lo menos estudiado. Hoy día, gracias a la secuenciación del genoma de la *Mycobacterium tuberculosis*, se ha despertado el interés de diversos grupos en el estudio de dichos factores como probables alternativas de tratamiento y protección [18].

## 2 *Mycobacterium Tuberculosis*

Las bacterias del genero *Mycobacterium* son bacilos rectos o ligeramente curvados que miden entre 0.2-0.6  $\mu\text{m}$  de ancho por 1-10  $\mu\text{m}$  de largo (comparable al diámetro del núcleo de un linfocito), sin motilidad e incapaces de producir esporas. Usualmente presentan un alto contenido de G+C (guanina+citosina) en su ADN genómico así como un alto contenido de lípidos en su pared celular (probablemente el más alto en bacterias), los cuales contribuyen a la extrema hidrofobicidad de la bacteria, resistencia a daños (Ej. resistencia a antibióticos) y puede que también sea una causa importante del lento crecimiento de la bacteria, ya que puede ser un factor en la restricción en la entrada de nutrientes. Muchos ácidos micólicos en la membrana que las envuelve son distintivos de este género y puede que funcionen como reservas de carbón, constituyendo mas de la mitad del peso seco de la bacteria [19]. A pesar de presentar una morfología bastante homogénea, el genero *Mycobacterium* presenta una gran diversidad en varios aspectos. La mayoría de las especies, viven y se replican de forma libre en la naturaleza y raras veces causan enfermedades; solo algunas micobacterias son patógenos exitosos de vertebrados mayores y habitan preferentemente de forma intracelular en los fagocitos mononucleares. Las micobacterias que dependen de un hospedero para desarrollarse son *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium lepraemyrium*, *Mycobacterium avium* subesp. *Paratuberculosis* y los miembros del complejo *Mycobacterium tuberculosis*. Estas últimas se pueden cultivar *in vitro* en medio de cultivo, a diferencia de *Mycobacterium leprae* y *Mycobacterium lepraemyrium* que necesitan el medio intracelular para sobrevivir [19].

De acuerdo a las condiciones de crecimiento y la edad del cultivo, los bacilos pueden variar en forma y tamaño pudiendo ser observados como pequeños cocobacilos o bacilos largos. A diferencia de algunas micobacterias de crecimiento largo y otros actinomicetales, *Mycobacterium tuberculosis* presenta pleomorfismo en raras ocasiones y no se elonga en filamentos ni forma ramificaciones. Cuando se presenta en grandes números y en división activa, el bacilo es fuertemente ácido y tiende a formar conglomerados hidrofóbicos; en el hospedero el bacilo es muy numeroso en las células fagocíticas [19].

## 2.1 Estructura de la pared celular

La envoltura de la bacteria está compuesta por la membrana plasmática, la pared celular y una capsula externa. La principal característica de la membrana plasmática de la micobacteria es la presencia de algunos lipopolisacáridos que son compartidos por todos los actinomicetos (Figura 1. D)) [20]. Esta es la encargada de mediar la comunicación entre el citoplasma y el ambiente, así como de dar la protección osmótica necesaria. La membrana plasmática se encuentra rodeada por una pared celular (Figura 1 [21]) que protege el contenido bacteriano, da soporte mecánico y es responsable de la forma característica de la bacteria. Esta pared celular es única entre los procariontes ya que está constituida por una capa interna de peptidoglicanos (Figura 1. B)) que se encuentran unidos por entrecruzamientos (en mayor grado que en otras bacterias, para *Mycobacterium tuberculosis* entre un 70%-80%) y presentan residuos químicos muy particulares [19].

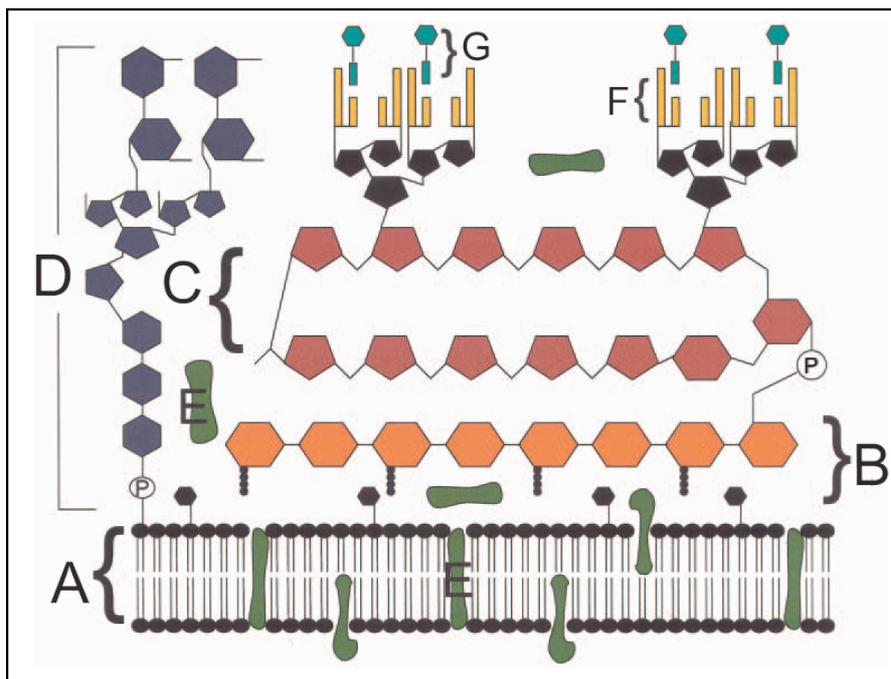


Figura 1: Representación esquemática de la envoltura celular de *Mycobacterium tuberculosis* (Besra and Chatterjee, 1994; Brennan and Nikaido, 1995; Iseman, 2000). Los componentes incluidos son (A) membrana plasmática, (B) peptidoglicanos, (C) arabinogalactano, (D) lipoarabinomano cubierto por manosa, (E) membrana plasmática y proteínas asociadas a la envoltura celular, (F) ácidos micólicos y (G) glicolípidos superficiales asociados a ácidos micólicos. [21]

Unidos covalentemente a los peptoglicanos, se encuentra un polisacárido ramificado llamado arabinogalactano (Figura 1. C)) cuyos extremos externos se encuentran esterificados con ácidos grasos de alto peso molecular (cadenas de entre 60-90 átomos de carbono) llamados ácidos micólicos (Figura 1. F)), en conjunto con otros lípidos (Figura 1. G)), forman la pared externa del bacilo constituyendo una barrera muy hidrofóbica [21]. El arreglo de los ácidos micólicos es especie-específico, propiedad que permite identificar diferentes especies de micobacterias por medio de HPLC. Los ácidos micólicos específicos de *Mycobacterium tuberculosis* son alfa, ceto y metoxi-micólicos (Figura 2. A), B) y C) respectivamente [22]), presentando de 76-82, 84-89 y de 83-90 carbonos respectivamente [19, 20].

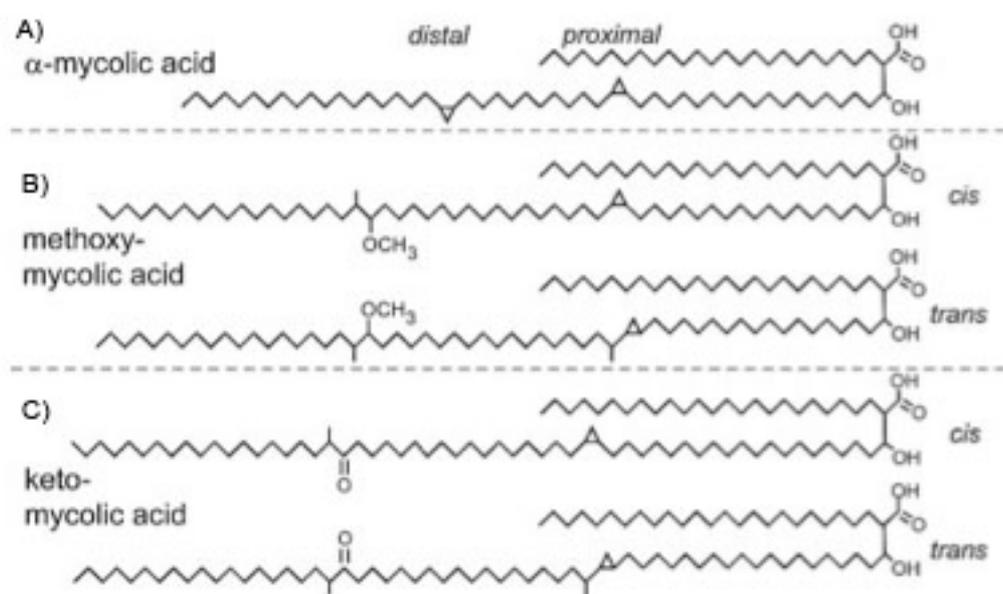


Figura 2. Ácidos micólicos (Takayama et al. 2005) A) Ácido micólico-alfa. B) Ácido micólico-metoxi. C) Ácido micólico-ceto. [22]

Atravesando toda la cubierta, glicolípidos como el manósido fosfatidil-mio-inositol, el lipomanano (LM) y el lipoarabinomanano (LAM) (Figura 3 [23]), se encuentran anclados a la membrana y se extienden hasta el exterior de la pared celular (Figura 1. D)). Los LAM's presentan diferentes estructuras dependiendo de la especie de micobacteria y se han descrito tres clases generales: i) ManLAM que se presenta en cepas virulentas H37Rv y H37Ra. Se caracteriza por tener una extensa capa de manosa en su arabino-terminal. Esta, ayuda a "burlar" la activación de la respuesta granulocítica, importante en la respuesta inmune temprana [24, 25], al bloquear la actividad de los macrófagos por medio de la inhibición de la expresión de TNF- $\alpha$  y de IL-12 [26], ii) PiLAM presente en

cepas de crecimiento rápido *M. smegmatis* y *M. fortuitum* y se caracteriza por tener una capa de fosfo-mio-inositol, iii) AraLAM que ha sido descrito en la cepa de crecimiento rápido *M. chelonae* y se caracteriza por no tener ninguna modificación en su arabinoterminal [21].

A pesar de ser una bacteria Gram-negativa, las micobacterias no presentan una membrana adicional en su pared externa y están más cercanamente emparentadas con las bacterias Gram-positivas. Sin embargo, no están clasificadas dentro del grupo de las bacterias Gram-positivas pues en su pared celular se encuentran lípidos (alrededor del 40% del peso seco) [27] en lugar de proteínas o polisacáridos. Por esta razón, no retienen el colorante cristal violeta y su pared celular cerosa es impermeable a la anilina y otros colorantes a menos que, estos sean combinados con fenol. Robert Koch tuvo que desarrollar procesos de tinción utilizando colorantes alcalinos para poder descubrir el agente causal de la tuberculosis. También describió el arreglo de las colonias del bacilo y en general, observó que en el caso de los bacilos frescos y virulentos de *Mycobacterium tuberculosis*, se producen colonias rugosas y con textura en medio sólido, velos gomosos y expandidos en la superficie del medio líquido y serpentinadas en los cubreobjetos (estas se observan todas y por lo general en cepas virulentas). Estas características han sido atribuidas a la presencia de la trehalosa 6,6'-dimicolato (TMD), un glicolípido que consiste en dos moléculas de ácido micólico ligeramente unidas a la cubierta externa de la pared celular. A este compuesto, conocido como "factor cordón", se le atribuyen actividades biológicas relacionadas con la patogenicidad, toxicidad y protección contra la respuesta inmune del huésped [21].

Los ácidos micólicos empaquetados de forma tan estrecha, proveen a la micobacteria de una protección muy eficiente y de una impermeabilidad excepcional. A parte de la cápsula, el bacilo presenta una capa aun más delgada de carbohidratos y proteínas en la parte externa de la capa lipídica, esta impide la difusión de grandes moléculas (ej. enzimas) y protege a la capa lipídica en sí.

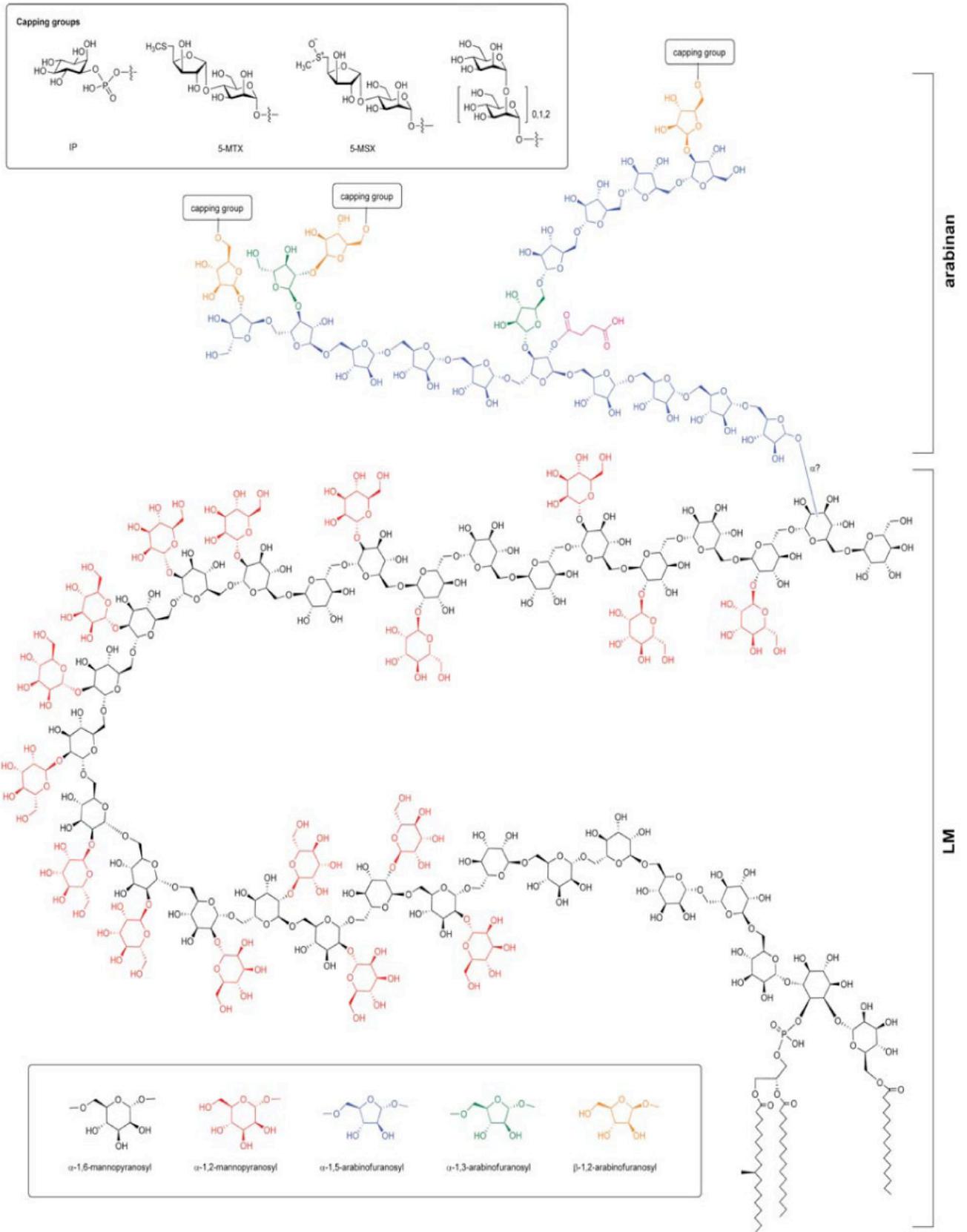


Figura 3. Modelo estructural del lipoarabinomannano y sus grupos terminales (Spencer J.W. 2009). El tamaño de las cadenas de manano y de la arabinosa es mas corto que los encontrados en la naturaleza. [23]

## 2.2 Requerimientos nutricionales y ambientales

El bacilo tuberculoso es prototrófico (puede construir todos sus componentes a partir de fuentes básicas de carbono y nitrógeno) y heterotrófico (puede usar componentes orgánicos, que ya han sido sintetizados, como fuentes de carbono). La estructura macromolecular y fisiológica del bacilo, se adapta a las condiciones del medio natural o de cultivo en el que se esté desarrollando. Un ejemplo es la manera en que *Mycobacterium tuberculosis* cambia su metabolismo de aerobio, a uno en el que el metabolismo de carbohidratos es microaerofílico y se utilizan lípidos, los cuales, son abundantes en el tejido del hospedero [28, 29]. Sin embargo, *Mycobacterium tuberculosis* necesita el oxígeno como aceptor final de electrones en la cadena transportadora. Debido a esto, en la naturaleza, el bacilo crece mejor en tejidos con mayores concentraciones de oxígeno, como lo son los pulmones (sobretudo en lóbulos superiores). El dióxido de carbono es también esencial y puede ser asimilado de la atmósfera así como de los carbonatos y bicarbonatos (en cultivo de 5-10% de CO<sub>2</sub> favorece el crecimiento). Como fuentes de nitrógeno *Mycobacterium tuberculosis* prefiere amonio y asparagina, sin embargo, en cultivos *in vitro* puede utilizar nitratos y nitritos también. El enzima nitrato reductasa es muy activa en el bacilo e incrementa su actividad en condiciones de hipoxia. *Mycobacterium tuberculosis* es capaz de producir amonio a partir de urea por medio de reacciones catalizadas por una ureasa (*ureABC*). Esta debe ser importante en la adquisición de nitrógeno ya que incrementa su actividad cuando este último es limitado. Adicionalmente, los iones amonio son capaces de alcalinizar el microambiente inhibiendo la maduración de los fagolisosomas y contribuyendo a la maduración defectuosa de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad II (MHC II) en los monocitos del hospedero [30].

Al tener *Mycobacterium tuberculosis* un ciclo de vida dependiente de un hospedero, su multiplicación queda restringida a las condiciones fisiológicas que ofrecen los animales de sangre caliente, estas son tanto neutrófilas (pH neutro) como mesófilas (37° C), presentando un rango muy estrecho en ambas para poderse multiplicar. En condiciones favorables *Mycobacterium tuberculosis* es capaz de dividirse en intervalos de tiempo de entre 12-24 horas, un tiempo bastante considerable [19].

### 3 Mecanismos inmunológicos en la tuberculosis.

La bacteria ingresa por la vía aérea y se distribuye de su punto inicial de infección por medio de los nódulos linfáticos o la sangre. La fagocitosis de *Mycobacterium tuberculosis* por los macrófagos alveolares, es el primer evento en la relación patógeno-hospedero. En este punto, la destrucción de la bacteria dependerá de la capacidad bacteriobiciida de los macrófagos del huésped y de la virulencia de la bacteria. Las bacterias que escapen al ataque de los macrófagos, se multiplicarán destruyendo a los primeros. Cuando esto sucede, monocitos sanguíneos y otras células inflamatorias son atraídas al pulmón. Estos monocitos, se diferenciarán en macrófagos que a su vez, fagocitaran a la bacteria pero no la destruirán. En este punto, la bacteria crecerá logaritmicamente y mas macrófagos derivados de monocitos se acumularan pero, con poco daño en los tejidos. De 2 a 6 semanas después de la infección, se desarrolla la inmunidad mediada por células T. Aparecerá un gran flujo de linfocitos T antígeno-específicos y gran cantidad de macrófagos activados que formaran granulomas. El crecimiento exponencial de la bacteria se verá frenado y los macrófagos muertos formaran un "caseum" dentro de los granulomas. La bacteria puede permanecer ahí por siempre o ser reactivada tiempo después [31, 32].

Los organismos que han sido fagocitados, son sujetos a degradación por hidrolasas ácidas intralisosomales. Este evento constituye una importante arma de defensa antimicrobial de los fagocitos. Hart et al., propuso que la prevención de la fusión al fagolisosoma, es la forma en la que *Mycobacterium tuberculosis* puede sobrevivir dentro de los macrófagos [33]. Otras estrategias que este organismo puede utilizar para sobrevivir dentro del macrófago son: la inhibición de la acidificación del fagosoma [34], la modificación intracelular del trafico de vesículas [35] y causar que cantidades importantes de LAM se inserten en dominios ricos en glicosilfosfatidilinositol (GPI) de la membrana celular. LAM en sí, es un GPI de estructura glicano inusual que tiene la habilidad de modificar numerosas funciones del macrófago, como la respuesta a IFN- $\gamma$  o la capacidad de presentar antígenos [36] a largo plazo a las células T CD4+ [37, 38]. La inmunidad protectora en contra de *Mycobacterium tuberculosis* depende de la participación de linfocitos T cooperadores de tipo 1 (CD4+ Th1) los cuales son capaces de secretar citocinas, principalmente IFN- $\gamma$  activando de esta forma a los macrófagos [38].

Existen evidencias que señalan a las células T-CD8 citotóxicas, como otros elementos importantes en la inmunidad protectora contra la tuberculosis ya que también, son capaces de secretar citocinas como IFN- $\gamma$  e IL-4. La respuesta de células T, en su mayoría, es antígeno-específica y su respuesta se desarrolla en el contexto de los receptores de células T (TCR), los cuales, son parecidos a las inmunoglobulinas de las células B, pero a diferencia de estas, los TCR's solo se presentan unidos a las membranas de estas células y solo pueden reconocer antígenos que se encuentren unidos al complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) [39, 40].

Por otro lado, los linfocitos T cooperadores pueden también presentar una respuesta de tipo Th2, esta se caracteriza por la alta producción de IL-4 [41]. Ambas respuestas provienen de linfocitos T inmaduros y son dependientes del medio ambiente, mientras que la IL-12 es una citocina generada por macrófagos activados y células dendríticas. IL-12 es la principal citocina inductora de la respuesta Th1, mientras que la IL-4 es de la respuesta Th2 [42].

En estudios en donde se presentan mutaciones genéticas que afectan al sistema IL-12/IL-23/IFN- $\gamma$ , se ha observado que se produce un incremento en la susceptibilidad a desarrollar tuberculosis [38]. Igualmente en estudios de ratones "knockout" para el gen IFN- $\gamma$ , se observó que estos eran susceptibles a *Mycobacterium tuberculosis* [43]. Por otro lado, en individuos carentes del receptor IFN- $\gamma$ , se observó una gran susceptibilidad a infecciones con micobacterias [44]. Esta evidencia confirma que la respuesta Th-1 es muy importante en el desarrollo de la tuberculosis. En cambio, la respuesta Th2 y sus citocinas, que se incrementa en pacientes con tuberculosis, es capaz de inhibir la producción in vitro de IFN- $\gamma$  [45] y por lo tanto, la activación de macrófagos [46] y su capacidad de presentar antígenos por medio de MHC. Generando una disminución en las defensas contra la tuberculosis.

#### **4 Modelos experimentales de tuberculosis**

Los modelos experimentales animales son críticos para esbozar los mecanismos generales que determinan el tipo de respuesta así como la patología de la tuberculosis. Aunque los resultados observados deben tomarse con cautela ya que, no es posible

extrapolar estos a humanos pues existen claras diferencias entre el modelo animal y el hombre [47]. En 1890 Koch refirió que, no se debe esperar un comportamiento idéntico entre el hombre y el modelo animal por lo que, las apreciaciones u observaciones deben tomarse con cautela [6].

Muchos de los elementos que actualmente se conocen de la forma en como progresa o se controla la infección por *Mycobacterium tuberculosis*, han sido deducidas a partir de experimentos realizados en murinos, que sin duda, son el modelo mas sofisticado y eficiente para el estudio de la tuberculosis. La respuesta inmune en el ratón, ha sido bien caracterizada gracias al desarrollo de técnicas con una gran variedad de anticuerpos en contra diversos marcadores y citocinas. Además, la manipulación genética de esta especie ha sido de las más estudiadas [47, 48]. El conocimiento actual del genoma completo del ratón y el de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, puede generar una nueva etapa de investigación en la cual, mediante microarreglos, será posible estudiar la regulación de la expresión genética que induce el agente patógeno en el huésped y viceversa. Haciendo posible analizar las interacciones multigenicas que permitan identificar patrones de expresión que correlacionen con el control de la infección y mejoren el monitoreo de la eficiencia de posibles vacunas [47].

En los casos en donde el modelo murino no permite obtener datos que puedan ser trasladados al hombre, ha sido necesario recurrir a cobayos e incluso a primates. Por ejemplo, a pesar de que existen linfocitos  $T\gamma\delta$  en el ratón, existe una diferente especificidad de ligandos para estas células entre el ratón y el hombre [49]. Por el contrario, se ha comprobado que tanto la respuesta inmune, como la patología de la infección con *Mycobacterium tuberculosis* es muy similar en humanos y en otros primates [50], pero debido a las consideraciones éticas necesarias al trabajar con primates, los ensayos deben restringirse a experimentos cruciales justo antes de comenzar ensayos clínicos en humanos, incluso en aquellos casos en los que el costo y la dificultad inherentes al trabajo con primates lo hacen prohibitivo.

Los cobayos son mucho mas económicos que los primates y presentan menos restricciones éticas. Cabe destacar que, las lesiones granulomatosas que desarrollan son muy similares a los generados por la tuberculosis humana (se le ha considerado como el modelo mas cercano al humano en el desarrollo patológico de la enfermedad). Además

es altamente susceptible a *Mycobacterium tuberculosis*, por lo que frecuentemente son utilizados para pruebas pre-clínicas de vacunas y estudios patológicos.

También, se ha observado que antígenos como el CD1, con capacidad de presentar ácidos micólicos y otros componentes de la pared celular, no se encuentran en el ratón pero si en los cobayos [51, 52], lo que hace a estos animales un modelo más confiable para el estudio de glicolípidos.

A pesar de las cualidades que tienen otros modelos, el modelo murino tiene una ventaja esencial: el costo. La factible manipulación, así como la facilidad de trabajo con gran número de animales, pueden ser utilizados para identificar posibles vacunas. Las cuales, podrán ser llevadas después, a estudios más detallados una vez se hayan identificado las mas prometedoras [47].

En un modelo experimental de tuberculosis pulmonar progresiva, desarrollado por el Dr. Rogelio Hernández Pando [53], son utilizados ratones sin-génicos BALB/c infectados por vía intratraqueal con 250 000 bacterias vivas y virulentas. En este, se ha establecido claramente que, durante el primer mes de infección se expresa una fase de protección con predominio de citocinas tipo 1, baja carga bacteriana y presencia de granulomas para después, pasar a una fase de progresión, la cual, va del día 28 al 120 post-infección. Durante esta etapa, los animales sufren de neumonía progresiva que los lleva a la muerte en asociación con un patrón de citocinas tipo 2, gran cantidad de bacterias en el pulmón así como una elevada producción de TGF- $\beta$  [12, 53]. Este modelo, ha sido ampliamente caracterizado y es por lo tanto una excelente herramienta para estudiar eventos patogénicos relevantes de la enfermedad.

## **5 Genes candidatos relacionados con la virulencia**

La secuenciación del genoma completo de la cepa prototipo de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, ha hecho factible estudiar de forma mas dirigida los denominados genes micobacterianos de virulencia como los que se enumeran a continuación.

### 5.1 Pho P

Para sobrevivir, los microorganismos deben de tener la capacidad de reconocer e integrar diversas señales que provienen del ambiente y ejecutar acciones que les

permitan su supervivencia como un mecanismo de adaptación [54]. En particular, es común que en las bacterias existan sistemas de dos componentes, ambos son proteínas reguladoras, las cuales funcionan, como factores adaptativos y proteínas sensoriales que son generadas en respuesta a rangos amplios de estímulos ambientales. Este es el caso del sistema genético *phoP/phoQ*. Este sistema controla la transcripción de varios genes que son esenciales para la supervivencia de la bacteria en la célula huésped en diversas bacterias patógenas como en el caso de *Salmonella*, *Shigella* o *Yersinia* [54]. En realidad estos sistemas, transducen las señales extracelulares con el objetivo de coordinar las funciones metabólicas y de crecimiento, funcionando como ATP para promover otros procesos metabólicos.

En años recientes, se han identificados varios sistemas de dos componentes en el genoma de *Mycobacterium tuberculosis* de la cepa H37Rv, entre estos está el locus *phoP/phoR* que está involucrado en el metabolismo de fosfatos y que tienen un alto grado de similitud con otros sistemas incluyendo *phoP/phoQ* [55]. En estudios realizados con una mutante incapaz de expresar *phoP*, se observaron diferencias en el tamaño del bacilo y cambios dramáticos en las propiedades del factor cordón de las células en fase logarítmica, modificando de manera indirecta su virulencia [54].

Por otra parte, se ha sugerido que un elemento conocido como *IdeR* (iron dependent represor), controla la expresión de genes involucrados en la virulencia de *Mycobacterium tuberculosis* incluyendo *phoP*, con ello, se sugiere que existe una interconexión entre los factores adaptativos de la micobacteria *IdeR/phoP*, que la prepara para la posible agresión de su hospedero o del medio ambiente [56]. Así mismo, se ha comprobado ya en otras especies, que la alteración de este sistema reduce la capacidad de respuesta del patógeno ante los retos que para él supone el sistema inmune del hospedero, pues se ha visto que mutantes de *Salmonella* que carecen de *phoP*, son incapaces de sintetizar muchas proteínas que se expresan normalmente en la interacción con macrófagos [57]. En *Mycobacterium tuberculosis*, se ha comprobado que la alteración del gen *phoP* acarrea una disminución en la proporción de lipoarabinomananos manosilados que juegan un papel clave en la supervivencia de las micobacterias dentro de los macrófagos [58].

## 5.2 FadD26

La secuenciación del genoma de *Mycobacterium tuberculosis*, permitió identificar una secuencia de inserción de un transposón en 583 pares de bases (pb). El gen fadD26 acil-CoA sintetasa, estas son enzimas encargadas de la biosíntesis de dimicocerosatos de ftiocerol (DIM por su abreviatura en inglés). DIM's son una de las seis familias de ácidos grasos largos, ramificados y multi-metilados (en sus ramificaciones), que se sitúan en la envoltura celular de la *Mycobacterium tuberculosis* [59].

La biosíntesis de lípidos de la micobacteria es muy importante. De ella depende, la formación de la pared celular, el transporte a través de la membrana y la protección en contra de la actividad bactericida del macrófago [60]. Por ello, es importante el estudio de moléculas involucradas en este proceso, tal es el caso del producto del gen fadD26. Este presenta una gran homología con el de la acil-CoA sintetasa, una enzima esencial, involucrada en el metabolismo de los lípidos. El gen fadD26 esta localizado muy cerca de los genes ppsA, B, C, D y E, los cuales codifican enzimas requeridas para la biosíntesis de ftiocerol y fenol-ftiocerol, esta organización genética revela que la expresión de los genes de fadD26 y pps podrían estar funcionalmente acopladas [58]. Con el uso de elementos de inserción móviles (transposones) y mutación dirigida, se ha podido definir la importancia de fadD26 en la virulencia de este microorganismo [61]. Se observo de hecho, que en la cepa mutante de *Mycobacterium tuberculosis* (1A29) en la que se eliminó el gen fadD26, se manifestaron importantes anomalías en la síntesis de la acil-CoA sintetasa, ftiocerol y fenol-ftiocerol, moléculas importantes para la sobrevivencia de la micobacteria dentro del macrófago [58].

## **6 Vacunas contra la tuberculosis**

La vacuna BCG (bacilo de Calmette-Guérin), desarrollada por los científicos franceses que le dan nombre en la última década del siglo XIX, es la única vacuna disponible actualmente en contra de la tuberculosis. También, es la vacuna más ampliamente administrada de todas ya que, por más de 70 años, más de 3 mil millones de individuos han sido vacunados con ella y 100 millones más se suman anualmente. Los efectos secundarios de esta vacuna resultan tolerables y confiere una buena protección contra las formas diseminadas y meníngeas de la tuberculosis, sin embargo, la protección que confiere en contra de la forma pulmonar prevalente de la enfermedad, dista de ser la

ideal. Diversos estudios han mostrado que la protección conferida por esta vacuna, varía del 0% en India al 80% en el Reino Unido [62]. Un promedio de la efectividad global de la vacuna, resulta en una eficacia de alrededor del 50%, lo cual hace de la BCG una vacuna poco satisfactoria.

El desarrollo de una nueva vacuna no constituye un reto trivial pues, tomando en cuenta que ratones que han sido sanados con antifímicos, no se encuentran protegidos de una segunda infección y el hecho de que, incluso en aquellos casos en los que el individuo presenta una infección latente (que teóricamente es mantenida bajo control por el sistema inmune), este puede ser reinfectado. Se puede deducir que, una vacuna contra la tuberculosis, debe provocar una respuesta inmune superior a la que la misma *Mycobacterium tuberculosis* es capaz de inducir [48].

La secuenciación del genoma de *Mycobacterium tuberculosis* puede representar uno de los avances más importantes rumbo al desarrollo de una nueva vacuna. La información de la secuencia de los 4000 genes del patógeno, puede usarse para identificar antígenos relevantes en la virulencia-protección de y contra el agente patógeno. Mas de 100 candidatos a vacunas han surgido y se requiere de los ensayos de protección en modelos animales para seleccionar aquellos que vale la pena llevar más allá. Los modelos de vacunas que se encuentran en estudio caen en una de las 3 categorías:

- Vacunas vivas atenuadas
- Vacunas de subunidades
- Vacunas de ADN

### 6.1 Vacunas vivas atenuadas

Puede tratarse de cepas de BCG modificadas para expresar antígenos protectores de *Mycobacterium tuberculosis* o de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* modificadas genéticamente de manera que pierdan su virulencia. Algunos ejemplos son cepas mutantes como: *Mycobacterium tuberculosis* RD1, este operon afecta la capacidad citolítica de neumocitos y macrófagos, posiblemente por medio de ESAT 6 [63], o la cepa mutante secA2, la cual es incapaz de secretar proteínas asociadas a virulencia y aumenta la apoptosis de macrófagos infectados al disminuir la secreción de la superóxido-dismutasa micobacteriana [64]. Otras vacunas vivas pueden ser vectores distintos de

*Mycobacterium* (vaccinia, listeria) que expresen antígenos protectores de *Mycobacterium tuberculosis*. La ventaja de este tipo de vacunas es que tienen la habilidad potencial de generar memoria inmunológica, inducir respuesta inmune en la superficie de la mucosa y ser relativamente baratas de elaborar. La desventaja es el riesgo de los efectos que puede tener cualquier vacuna viva, particularmente cuando se administra a individuos inmunodeficientes [65].

### 6.2 Vacunas de subunidades

Consiste de proteínas o péptidos y posiblemente lípidos y carbohidratos. Varias vacunas de subunidades han demostrado contribuir a la protección en modelos animales cuando se administran con adyuvantes que potencian su habilidad de generar respuestas inmunes y prolongan la duración de la protección. Entre las subunidades más importantes se encuentran los antígenos secretados Esat-6 y CFP10, los cuales se encuentran codificados en la región RD1, la cual, no se encuentra presente en BCG pero sí en cepas virulentas como la H37Rv [65].

La ventaja de las vacunas de subunidades es que consisten de componentes moleculares definidos. Estos en general, presentan menos reacciones adversas y son más fáciles de reproducir confiablemente que las vacunas de células completas. La limitación que tienen es que, la purificación es relativamente cara y la inmunidad es de duración corta, se requieren adyuvantes complejos o sistemas de liberación particulares [65].

### 6.3 Vacunas de ADN

Consisten de ADN que codifica para antígenos de protección. El ADN es inyectado en el músculo o la piel y los antígenos de protección son producidos por las propias células. En modelos animales se ha observado la inducción de una respuesta tanto citotóxica como celular, y en algunos casos esta ha persistido durante períodos largos de tiempo. Entre los antígenos que han sido probados, se encuentran principalmente proteínas inmunogénicas como Esat-6, MPT64, Ag84A/B y MPT83 [65]. Por otro lado, la eficacia a largo plazo y la seguridad al usar vacunas de ADN en humanos no han sido establecidas, aunque tienen la ventaja de la simplicidad y la capacidad para introducir múltiples antígenos a bajo costo [65].

La mayoría de las vacunas que se usan hoy en día protegen contra la enfermedad, no contra la infección y en términos generales las vacunas vivas no requieren de la aplicación de múltiples dosis pero, si inducen reactividad contra la prueba de la tuberculina, lo cual interfiere con el valor diagnóstico de esta prueba, mientras que lo contrario ocurre en el caso de las vacunas de subunidades [62].

Los 4000 genes que posee *Mycobacterium tuberculosis* hacen que resulte muy importante la determinación de sobre cuales de ellos debe centrarse la investigación para el desarrollo de nuevas vacunas. Una de las estrategias más prometedoras que se han usado para evaluar diversos genes potencialmente importantes en virulencia, es la mutación *in vitro* utilizando transposones [61]. Utilizando esta técnica de mutación dirigida, el grupo de investigación de la Dra. Brigitte Gicquel [58], ha generado bacterias mutantes para los genes *phoP* y *FadD26*. Para evaluar el efecto de infección de estas bacterias mutantes con respecto a su cepa parental, se usará el modelo murino de tuberculosis pulmonar progresiva del laboratorio del Dr. Rogelio Hernández Pando [53]. Este permitirá evaluar de manera muy precisa la participación de estos genes en la capacidad de la bacteria para producir la enfermedad *in vivo* [58].

## **7 Hipótesis**

Las bacterias atenuadas mediante la mutación de los alelos relacionados con virulencia *fadD26* y *phoP* producirán una forma significativamente atenuada de la infección comparada con la cepa virulenta control H37Rv al probarse en el modelo experimental murino de tuberculosis pulmonar.

## **8 Objetivos**

### 8.1 General

Investigar como afecta la virulencia de *Mycobacterium tuberculosis* la introducción de mutaciones en los genes involucrados con virulencia *fadD26* y *pho P*, para determinar si estas cepas menos virulentas podrían ser aceptables candidatos a vacunas en comparación con la actual BCG. Todo esto en el marco del modelo experimental murino de tuberculosis pulmonar.

## 8.2 Particulares

1. Establecer las curvas de sobrevivencia de los animales infectados con las bacterias mutantes, comparándolas con las que se observaran al infectar con las cepas de referencia a partir de las cuales se generaron las mutantes, H37Rv y MT103
2. Evaluar tamaño de granulomas y extensión de neumonía inducida en los pulmones de los animales infectados.
3. Establecer la carga bacteriana en pulmón, inducida por cada una de las cepas de *Mycobacterium tuberculosis*.

## **9 Material y Método**

### 9.1 Preparación de las cepas H37Rv, SO2 y MT103

Las cepas de referencia H37Rv, SO2 y MT103 así como las bacterias mutantes se crecieron en medio Middlebrook 7H9 Broth (BD USA, DIFCO, Cat. 271310), el cual se preparó pesando 4.7g de polvo en 900 ml de agua destilada adicionando 5 ml de glicerol. Se esterilizó en autoclave a 121°C por 15 minutos, pasado el tiempo de esterilización se dejó enfriar a 40°C.

En una campana de bioseguridad nivel III (Forma Class II A2, Thermo Electro Corp.), limpia y esterilizada con luz UV, por 10 minutos, se procedió a adicionar 100 ml de enriquecimiento ADC (glucosa, albúmina, y catalasa, Middlebrook, BD), por cada 900 ml de medio. Se homogenizó y vertió en botellas de cultivo de 275 cm<sup>2</sup> de poliestireno con cuello angulado y tapa con filtro (Corning, 75cm<sup>2</sup>). Estas, se colocaron en una incubadora con 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C por 3 días para realizar prueba de esterilidad.

Pasado este tiempo, nuevamente en la campana de bioseguridad nivel III, se tomaron con una asa bacteriológica, 20ul de bacteria del medio Lowenstein-Jensen y se colocaron en botellas con el medio 7H9. Posteriormente estas botellas se colocaron en una incubadora de CO<sub>2</sub>. En la primera semana, se mantuvo el medio estático y a partir de la segunda semana, se empezaron a tomar lecturas de absorbancia a 600 nm para detener el cultivo en fase estacionaria temprana.

Transcurrido este tiempo, la micobacteria se recupero en la campana de bioseguridad nivel III, colectándola en tubo cónico de 50 ml (Falcon, BD, Cat, 352070) nuevo y estéril. Se centrifugo a 2000 rpm por 10 minutos. El sobrenadante se desecho y el botón bacteriano se resuspendió en 5 ml de PBS (solución amortiguadora de fosfatos) -Tween 80 al 0.05%. Se le adicionaron 2 ml de perlas de vidrio de 3 mm de diámetro estériles. El tubo se cerro perfectamente y se dejo en agitación a 37°C toda la noche.

Al día siguiente, el tubo se agito en un vortex en ciclos de 1 minuto de agitación por un minuto de reposo al menos 10 veces. Se centrifugo a 2500 rpm 15 min., este proceso de homogenizado se repitió, pero esta vez se centrifugo a 1500 rpm. El sobrenadante se transfirió a un tubo cónico de 50 ml nuevo y estéril. Se centrifugo a 2000 rpm por 10 min., el sobrenadante se elimino y el botón micobacteriano se lavo dos veces con PBS estéril. Al final, se resuspendió el botón adicionando 5 ml de PBS-20% de glicerol, esta suspensión se guardo a -70°C hasta su utilización.

Días previos a la inoculación, el tubo se descongelo gradualmente de -70°C hasta -20°C y finalmente hasta 4°C. Una vez descongelado, dentro de la campana de bioseguridad nivel III, la bacteria se lavo con PBS-tween por 5 minutos en agitación para eliminar el tween y células muertas. Después, se lavo 2 veces más con PBS para realizar la cuenta bacteriana.

La cuenta bacteriana se realizo utilizando Diacetato de Fluoresceina (DAF, Sigma, Cat. MFCD01866182). Para esto, se preparo una solución stock, disolviendo 5 mg de DAF en 1 ml de acetona fría a -20°C. De esta se preparo la solución de trabajo tomando 12.5 µl de la solución stock y diluyendo en 1 ml de PBS. Con esta solución, se realizo una dilución 1:100 con la bacteria (1ul de muestra H37Rv, 49 µl de solución de trabajo y 50 µl de PBS). Esta dilución se incubo durante 20 minutos en oscuridad. Pasado el tiempo, se coloco la muestra en una cámara de Neubauer y se realizo la cuenta en un microscopio de fluorescencia. Se consideraron bacterias vivas aquellas que presentaron fluorescencia. Para obtener el número total de bacterias se utilizo la siguiente fórmula:

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

Las bacterias se ajustaron a una concentración de 250 000 en 100 ul de PBS. Este volumen se inoculo en el ratón. Antes de utilizarse las bacterias fueron contadas nuevamente.

## 9.2 Modelo Experimental de fase progresiva

Ratones sin g6nicos machos Balb/C de 6 a 8 semanas de edad fueron anestesiados por v6a peritoneal con 56 mg/kg de pentobarbital s6dico. Una vez anestesiado el rat6n, la traquea se expuso quir6rgicamente y a trav6s de ella se inyectaron con jeringa de insulina 250 000 bacterias vivas resuspendidas en 100 ml de PBS. Posteriormente, la incisi6n quir6rgica se suturo con seda est6ril. Los ratones infectados se almacenan en grupos de 10 animales por caja. Estas fueron colocadas en micro aisladores conectados a un sistema de presi6n negativa [15, 53]. Todo este procedimiento, as6 como el sacrificio de los animales, se realizo siempre en campanas de seguridad biol6gica nivel III. Para cada cepa se utilizo un grupo de 10 animales.

## 9.3 Carga bacteriana (UFC's)

Para determinar la carga bacteriana se tomaron los pulmones de ratones por cada d6a de sacrificio. Despu6s del sacrificio, por exsanguinaci6n de cada animal, el pulm6n se colocó en un criotubo y se congelo inmediatamente en nitr6geno l6quido. Los pulmones fueron conservados a -70°C hasta su uso.

Los pulmones se descongelaron y enseguida se homogenizaron con la ayuda de un politron (politron USA) en 1 ml de PBS-0.05% de tween 80. De este homogenizado, se hicieron diluciones seriadas las cuales fueron sembradas en medio 7H10 agar (Difco Laboratorios, Detroit, MI. USA) suplementado con OADC (enriquecimiento ox6lico alb6mina, catalasa, dextrosa) (Difco Laboratorios). Despu6s de 15 d6as de cultivo, se realizaron las cuentas de colonias en cada diluci6n.

## 9.4 Preparaci6n del tejido pulmonar para el estudio histol6gico y morfom6trico.

Para el estudio histol6gico se utilizaron cuatro ratones en cada tiempo de sacrificio (d6as 1, 3, 7, 14, 21, 28, 60 y 120) despu6s de la infecci6n. En dos experimentos diferentes, los pulmones se fijaron por perfusi6n intratraqueal con etanol absoluto. Despu6s de esto, el tejido se deshidrato con alcoholes y xilenos, para luego ser embebido en parafina. Los bloques se cortaron a 5 micras de espesor. Estos cortes fueron montados en portaobjetos y te6idos con hematoxilina-eosina (10-12) [3, 10, 11]. Estos portaobjetos fueron utilizados para determinar el 6rea promedio de los granulomas, as6 como la superficie pulmonar afectada por neumon6a, utilizando un equipo automatizado de imagen Zidas Zeiss (Carl Zeiss Ltd, Herts, UK) y Q500IW Leica.

### 9.5 Análisis estadístico

El análisis estadístico fue utilizado para las curvas de sobrevida. La prueba de Kaplan-Meier y la prueba de T de Student's se utilizaron para determinar la significancia estadística de las UFC e Histopatología considerando significativa cuando la  $P < 0.05$ .

## 10 Resultados

### 10.1 Sobrevida, histopatología y carga bacilar en los ratones Balb/C infectados vía intratraqueal.

#### 10.1.1 Cepa mutante fadD26 y la cepa parental *Mycobacterium tuberculosis* MT103.

Se analizó la sobrevida de los ratones Balb/C después de la infección vía intratraqueal con 250 000 bacterias vivas. Los animales inoculados con la cepa mutante fadD26 después de 4 meses post-infección, presentaron un 60% de sobrevida, mientras que los animales inoculados con la cepa *Mycobacterium tuberculosis* MT103 empezaron a morir en la tercera semana después de la infección y para la novena semana ya habían muerto todos los animales (Fig. 4A).

El análisis histopatológico mostró numerosos granulomas en los pulmones de los ratones infectados con la cepa parental *Mycobacterium tuberculosis* MT103 en el día 14 post-infección. Observándose un incremento progresivo en el tamaño de los granulomas mostrando un pico máximo para el día 28 y que disminuye drásticamente para el día 60. Mientras que los granulomas en los animales infectados con la mutante fad26 muestran una cinética parecida pero significativamente ( $P < 0.05$ ) menor a los inducidos por la cepa MT103. Para la cepa mutante fadD26, en el día 60 y 120 se observan granulomas de mediano tamaño (Fig. 4B). El área pulmonar afectada por neumonía, empezó a manifestarse en el día 21 post-infección con *Mycobacterium tuberculosis* MT103, observándose un pico máximo para el día 60 con un 60% de área pulmonar afectada. Mientras que para los ratones infectados con la cepa mutante fadD26, el área neumónica se observa tardíamente, afectando aproximadamente el 40% del área pulmonar total (Fig.

4C). Lo anterior correlaciona con la carga bacilar de los pulmones obtenidos de los animales infectados, mientras que en la primera semana de infección se observan números similares para ambas cepas, después del día 14 se manifiesta un incremento significativo ( $P < 0.05$ ) de la carga bacilar en los ratones infectados con la cepa parental MT103 con respecto a los animales inoculados con la cepa mutante *fadD26* (Fig. 4D).

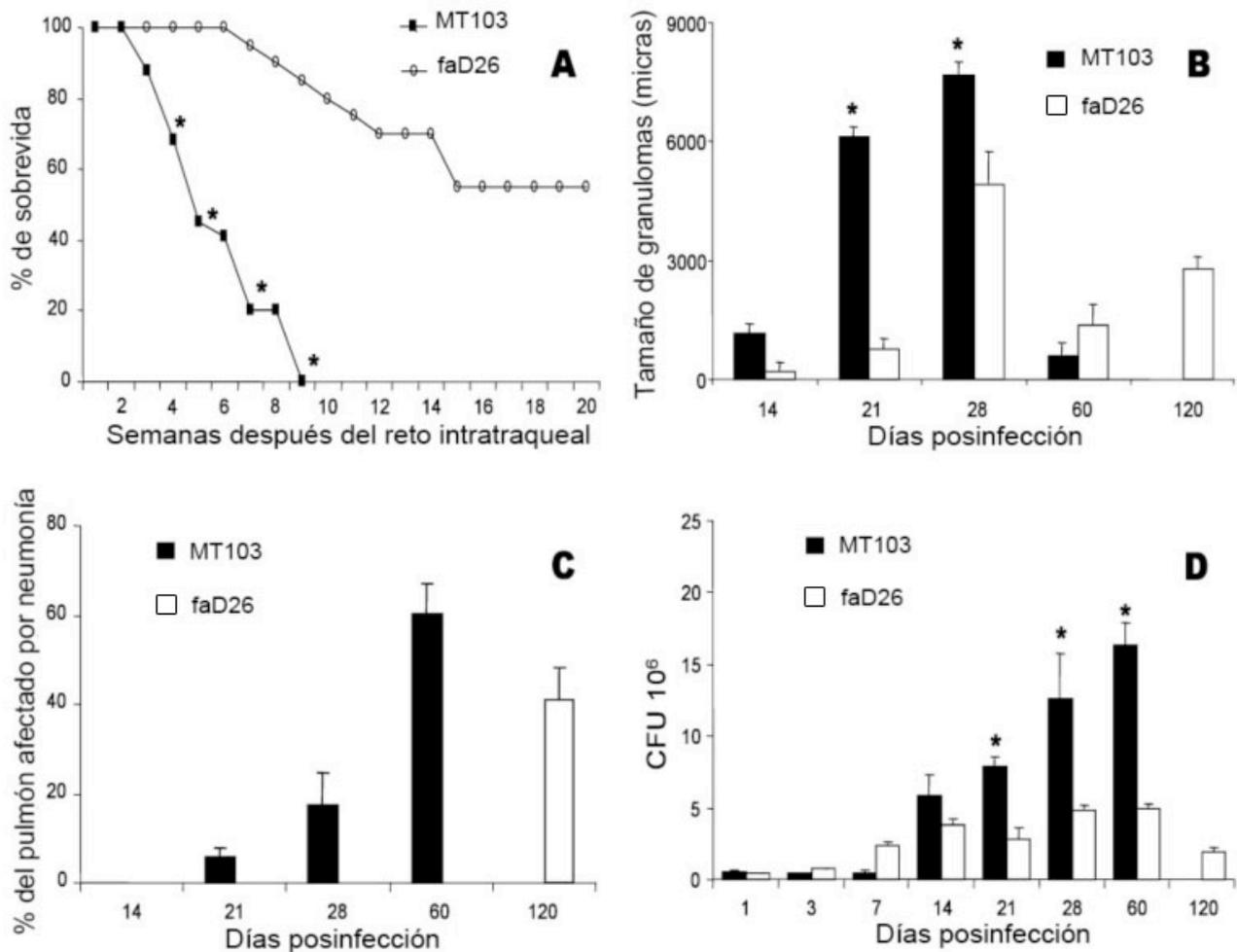


Figura 4. Sobrevida, patología y carga bacilar durante la infección con la mutante *fadD26* y la cepa parental MT103 en ratón Balb/C. (A) Todos los animales infectados con la cepa MT103 (n=20) murieron 9 semanas después de la infección (cuadros negros), mientras que los ratones infectados con la mutante *fadD26* (cuadros blancos) tienen un 60% de sobrevivencia ( $p < 0.05$ ). (B) Tamaño de los granulomas, (C) porcentaje de pulmón ocupado por neumonía, ratones infectados con la cepa MT103 (barras negras) y la mutante *fadD26* (barras blancas). (D) Comparación de las unidades formadoras de colonias por pulmón, en ratones infectados con la cepa MT103 (barras negras) y la mutante *fadD26* (barras

blancas). Los datos de UFC's y morfometría se obtuvieron de 4 diferentes animales de cada tiempo de sacrificio en dos diferentes experimentos. Los asteriscos representan significancia estadística del grupo control versus la cepa mutante fadD26 ( $p < 0.05$ ).

#### 10.1.2 Cepa mutante pho P (SO2) y la cepa parental *Mycobacterium Tuberculosis* MT103.

Para evaluar la virulencia de la cepa phoP, ratones Balb/C fueron inoculados vía intratraqueal con 250 000 bacterias vivas y se observó la sobrevivencia a lo largo de 4 meses post-infección, en dos experimentos diferentes. Los animales inoculados con la cepa mutante phoP mostraron 100% de sobrevivencia en el día 120 mientras que los animales que fueron inoculados con la cepa parental MT103 empiezan a morir en la tercera semana post-infección y para la semana nueve todos los animales inoculados con esta cepa murieron (Fig. 5A).

En tanto, la carga bacteriana durante la primera semana post-infección fue similar en ambos grupos, pero en el día 14 empiezan a observarse diferencias, mostrando el mayor punto en el día 21 y manteniéndose elevados para el día 28 y 60 en los animales que fueron inoculados con la cepa parental MT103, mientras que para la cepa SO2 los niveles se incrementan en el día 28 y decrecen significativamente para el día 60 y 120 (Fig. 5B).

La histología muestra numerosos granulomas aislados que son observados en los pulmones de los animales infectados con la cepa virulenta MT103 en el día 14 post-infección, observándose en el día 60 lesiones granulomatosas de gran tamaño (Fig. 5C). Después de la infección con la cepa MT103 se observa una neumonía progresiva, apareciendo las neumonías en el día 21, manifestándose un 60% de daño en el día 60 en los pulmones de los animales infectados con la cepa virulenta (Fig. 5D). En contraste, la histopatología de los ratones infectados con la cepa *Mycobacterium tuberculosis* SO2 es limitada, relativamente pocos granulomas de tamaño medio que se ven en el día 60 post-infección mientras que en el día 120 no son evidentes (Fig. 5C).

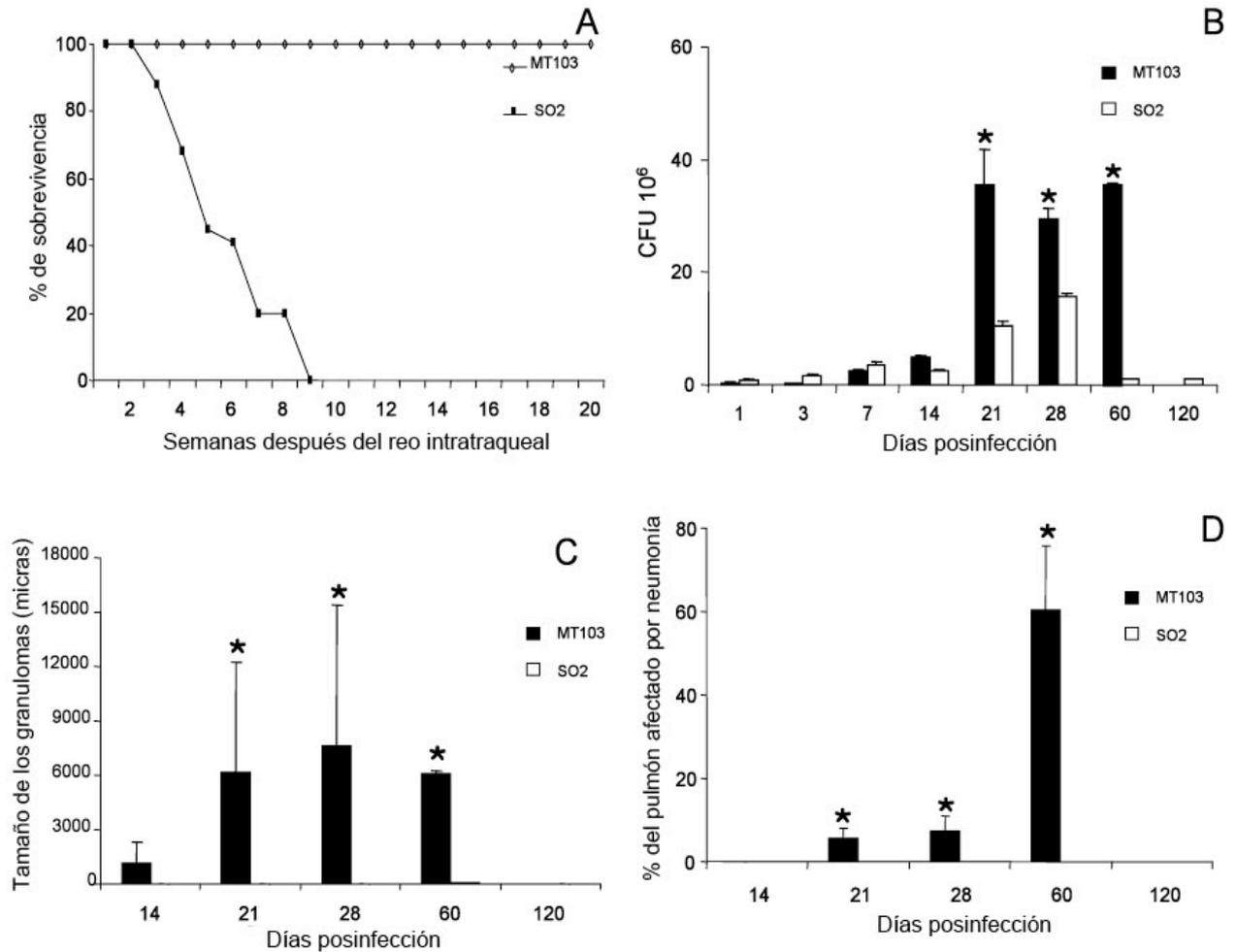


Figura 5. Evaluación de la atenuación de *Mycobacterium tuberculosis phoP* en ratón Balb/C. (A) Sobrevivencia de los ratones Balb/C infectados con *Mycobacterium tuberculosis* MT103 y que mueren al día 60 pos-infección comparado con la cepa atenuada *Mycobacterium tuberculosis phoP* SO2, donde observamos que se obtiene 100% de sobrevivencia hasta el día 120 pos-infección, (B) el número de UFC's en el pulmón comparando la cepa MT103 y la mutante *phoP* SO2, (C) área en micras, ocupada por granulomas en el pulmón infectado con *Mycobacterium tuberculosis* MT103 en barras negras y la cepa atenuada *Mycobacterium tuberculosis phoP* SO2 barras blancas, (D) porcentaje de superficie pulmonar afectada por neumonía (MT103 en negro y la mutante SO2 en blanco).

## Discusión

Una de las más distintivas características de *Mycobacterium tuberculosis*, es el alto contenido de lípidos en la envoltura de la bacteria, constituyendo un 40% de peso seco [27]. Complejo único de lípidos de la pared celular, como los DIM's, son producto de la acción combinada de la síntesis de ácidos grasos y poliquetidos sintetasas (PKS). *FadD26* que codifica para una Acetil-CoA sintetasa participa en la síntesis de ácidos grasos de cadenas largas como lo son los acil-adenilatos. En esta vía, los ácidos grasos son activados y transferidos por proteínas PKS, permitiendo la subsecuente extensión, incorporación y producción de DIM's [59]. DIM's son moléculas fisiológicamente importantes para el metabolismo de las micobacterias, están involucrados en la permeabilidad de la pared celular [59] y por consiguiente en la virulencia de la micobacteria [58].

El control parcial de la proliferación, generada por la respuesta Th1 es mantenida. Estos datos de *fadD26*, sugieren una significativa disminución de la virulencia con respecto a la cepa parental, aunque no completamente avirulenta cuando se administra en dosis altas. Esto es importante considerarlo, ya que, al no perder totalmente la virulencia su uso como vacuna queda limitado. Sin embargo, se le podrían adicionar otras mutaciones (por ej. *phoP*) que disminuyan la virulencia. Aun así, no debe ser descartada como una potencial candidato para vacuna, basándonos en lo que muestra el modelo murino de tuberculosis.

Este es el primer estudio en el cual se observan la virulencia e inmunogenicidad de la *fadD26*, usando el modelo progresivo de tuberculosis pulmonar en ratones Balb/c, manifestando que la mutante *fadD26* es un buen candidato a vacuna.

El gen *phoP* de la mutante *Mycobacterium tuberculosis* SO2, es parte de un sistema de dos componentes *phoP/phoQ*, este sistema controla la transcripción de genes de virulencia en patógenos intracelulares como la *Salmonella* sp. [18, 56]. La inactivación del factor de transcripción en *Mycobacterium tuberculosis* causa cambios en la forma y tamaño de la bacteria por lo tanto, afecta la morfología de las colonias cuando se compara con la cepa *Mycobacterium tuberculosis* MT103, indicando que *PhoP* es un regulador de diferentes genes [58]. La cepa *Mycobacterium tuberculosis* SO2, al usarla en macrófagos de ratón, muestra que se reduce la multiplicación bacilar y al utilizar un

modelo murino infectado por vía intravenosa, sugiere un papel importante de *phoP* en la regulación de genes de virulencia de *Mycobacterium tuberculosis* [57, 58].

Cuando se observa la carga bacteriana, extensión de neumonía y mortalidad, comparando con la cepa parental, observamos que disminuye la virulencia de la bacteria mutantes con un 100% de supervivencia después de 4 meses de infección, mientras que la cepa parental muestra al día 60, la muerte de todos los animales infectados con la cepa mutante (figura 5). Se observan pequeños granulomas, así como infiltrado perivascular comparando con la cepa MT103 que muestra en el día 60 un 60% de área afectada por neumonía que correlaciona con el incremento de la carga bacteriana. Esto sugiere que las vacunas basadas en *Mycobacterium tuberculosis phoP* pueden ser un potencial de vacuna.

## Conclusión

Con los resultados obtenidos podemos concluir:

Las cepas mutadas de *Mycobacterium tuberculosis*, poseen genes o proteínas que están involucrados en la virulencia y prevalencia de *Mycobacterium tuberculosis* dentro del hospedero y que no solo es uno de ellos, sino el conjunto, los que pueden estar regulando su proliferación y mantenimiento dentro de las células huésped.

Los dos tipos de mutantes muestran ser hipervirulentas, cuando tienen ausencia de los genes *fadD26* y *phoP*, mostrando una buena sobrevivencia, una baja cantidad de UFC's así como muy poco o nulo daño tisular, cuando son comparados con el grupo de referencia o su parental. Con estos antecedentes se propone que el uso de mutantes en más de dos genes involucrados en la virulencia, tal vez podrían ser mejores candidatos a vacunas.

## Bibliografía

1. OMS. *Tuberculosis*. 2010 Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/es/index.html>.
2. WHO, *Global Tuberculosis Control. Epidemiology, Strategy and Financing.*, in *WHO report 2009*, W.L.C.-P. Data, Editor. 2009, WHO.
3. Rook, G.A. and R. Hernandez-Pando, *The pathogenesis of tuberculosis*. *Annu Rev Microbiol*, 1996. **50**: p. 259-84.
4. Anzures Azarell, G.N., *Emergencia mundial de tuberculosis MDR y XDR*. *Revista de Enfermedades Infecciosas en Pediatría*, 2008. **XXII**(85): p. 1-2.
5. Napoleón, G., *Estado Actual de la Tuberculosis en México y en el ámbito Mundial*. *Vacunación Hoy*, 2007. **15**(6): p. 50-55.
6. Kaufmann, S.H., *A short history of Robert Koch's fight against tuberculosis: those who do not remember the past are condemned to repeat it*. *Tuberculosis (Edinb)*, 2003. **83**(1-3): p. 86-90.
7. McFadden, J., *Comment: Tuberculosis*. *Microbiology Today*, 2001. **28**.
8. Skamene, E., et al., *Genetic regulation of resistance to intracellular pathogens*. *Nature*, 1982. **297**(5866): p. 506-9.
9. W.W., S., *Genetics and resistance to tuberculosis. Could resistance be enhanced by genetic engineering?* *Annals of Internal Medicine*, 1992. **1**(116(11)): p. 937-41.
10. Bellamy, R., *Genetics and pulmonary medicine. 3. Genetic susceptibility to tuberculosis in human populations*. *Thorax*, 1998. **53**(7): p. 588-93.
11. Kramnik, I., et al., *Genetic control of resistance to experimental infection with virulent Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. **97**(15): p. 8560-5.
12. Hernandez-Pando, R., et al., *Correlation between the kinetics of Th1, Th2 cells and pathology in a murine model of experimental pulmonary tuberculosis*. *Immunology*, 1996. **89**(1): p. 26-33.
13. Smith, S.M., et al., *Decreased IFN- gamma and increased IL-4 production by human CD8(+) T cells in response to Mycobacterium tuberculosis in tuberculosis patients*. *Tuberculosis (Edinb)*, 2002. **82**(1): p. 7-13.
14. Aubert-Pivert, E.M., et al., *Cytokine transcripts in pediatric tuberculosis: a study with bronchoalveolar cells*. *Tuber Lung Dis*, 2000. **80**(6): p. 249-58.
15. Hernandez-Pando, R., et al., *Pathogenesis of tuberculosis in mice exposed to low*

- and high doses of an environmental mycobacterial saprophyte before infection.* Infect Immun, 1997. **65**(8): p. 3317-27.
16. Houk, V.N., et al., *The epidemiology of tuberculosis infection in a closed environment.* Arch Environ Health, 1968. **16**(1): p. 26-35.
  17. Nardell, E.A., *Tuberculosis in homeless, residential care facilities, prisons, nursing homes, and other close communities.* Semin Respir Infect, 1989. **4**(3): p. 206-15.
  18. Pelicic, V., J.M. Reyrat, and B. Gicquel, *Genetic advances for studying Mycobacterium tuberculosis pathogenicity.* Mol Microbiol, 1998. **28**(3): p. 413-20.
  19. Juan Carlos Palomino, S.C.L.o., Viviana Ritacco, *In Tuberculosis 2007. From basic science to patient care.* 1º Edición ed, ed. TuberculosisTextbook.com. 2007.
  20. Mahapatra S, B.J., Brennan P, Crick D, *In Tuberculosis and the Tubercle bacillus.* 1º Edición ed. 2005, Washington DC ASM Press. 603.
  21. Karakousis, P.C., W.R. Bishai, and S.E. Dorman, *Mycobacterium tuberculosis cell envelope lipids and the host immune response.* Cell Microbiol, 2004. **6**(2): p. 105-16.
  22. Takayama, K., C. Wang, and G.S. Besra, *Pathway to synthesis and processing of mycolic acids in Mycobacterium tuberculosis.* Clin Microbiol Rev, 2005. **18**(1): p. 81-101.
  23. Cao, B. and S.J. Williams, *Chemical approaches for the study of the mycobacterial glycolipids phosphatidylinositol mannosides, lipomannan and lipoarabinomannan.* Nat Prod Rep. **27**(6): p. 919-47.
  24. Appelberg, R., et al., *Susceptibility of beige mice to Mycobacterium avium: role of neutrophils.* Infect Immun, 1995. **63**(9): p. 3381-7.
  25. Saunders, B.M. and C. Cheers, *Intranasal infection of beige mice with Mycobacterium avium complex: role of neutrophils and natural killer cells.* Infect Immun, 1996. **64**(10): p. 4236-41.
  26. Knutson, K.L., et al., *Lipoarabinomannan of Mycobacterium tuberculosis promotes protein tyrosine dephosphorylation and inhibition of mitogen-activated protein kinase in human mononuclear phagocytes. Role of the Src homology 2 containing tyrosine phosphatase 1.* J Biol Chem, 1998. **273**(1): p. 645-52.
  27. Anderson, R.J., *The Chemistry of the Lipids of the Tubercle Bacillus.* Yale Journal of Biology and Medicine, 1943. **15**(3): p. 311–345
  28. Bloch, H. and W. Segal, *Biochemical differentiation of Mycobacterium tuberculosis grown in vivo and in vitro.* J Bacteriol, 1956. **72**(2): p. 132-41.

29. Neyrolles, O., et al., *Is adipose tissue a place for Mycobacterium tuberculosis persistence?* PLoS One, 2006. **1**: p. e43.
30. Sendide, K., et al., *Mycobacterium bovis BCG urease attenuates major histocompatibility complex class II trafficking to the macrophage cell surface.* Infect Immun, 2004. **72**(7): p. 4200-9.
31. Raja, A., *Immunology of tuberculosis.* Indian J Med Res, 2004. **120**: p. 213-232.
32. van Crevel, R., T.H. Ottenhoff, and J.W. van der Meer, *Innate immunity to Mycobacterium tuberculosis.* Clin Microbiol Rev, 2002. **15**(2): p. 294-309.
33. Hart, P.D., et al., *Ultrastructural study of the behavior of macrophages toward parasitic mycobacteria.* Infect Immun, 1972. **5**(5): p. 803-7.
34. Sturgill-Koszycki, S., et al., *Lack of acidification in Mycobacterium phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton-ATPase.* Science, 1994. **263**(5147): p. 678-81.
35. Xu, S., et al., *Intracellular trafficking in Mycobacterium tuberculosis and Mycobacterium avium-infected macrophages.* J Immunol, 1994. **153**(6): p. 2568-78.
36. Ilangumaran, S., et al., *Integration of mycobacterial lipoarabinomannans into glycosylphosphatidylinositol-rich domains of lymphomonocytic cell plasma membranes.* J Immunol, 1995. **155**(3): p. 1334-42.
37. Barnes PF, M.R., Ellner JJ, *Tuberculosis: Pathogenesis, protection and control.* 1st edition ed. 1994, Washington, DC: ASM Press. 417-435.
38. Ottenhoff, T.H., et al., *Control of human host immunity to mycobacteria.* Tuberculosis (Edinb), 2005. **85**(1-2): p. 53-64.
39. Stenger, S. and R.L. Modlin, *T cell mediated immunity to Mycobacterium tuberculosis.* Curr Opin Microbiol, 1999. **2**(1): p. 89-93.
40. Geluk, A., et al., *Identification of major epitopes of Mycobacterium tuberculosis AG85B that are recognized by HLA-A\*0201-restricted CD8+ T cells in HLA-transgenic mice and humans.* J Immunol, 2000. **165**(11): p. 6463-71.
41. Mosmann, T.R., et al., *Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins.* 1986. J Immunol, 2005. **175**(1): p. 5-14.
42. Abbas, A.K., K.M. Murphy, and A. Sher, *Functional diversity of helper T lymphocytes.* Nature, 1996. **383**(6603): p. 787-93.
43. Cooper, A.M., et al., *Disseminated tuberculosis in interferon gamma gene-disrupted mice.* J Exp Med, 1993. **178**(6): p. 2243-7.

44. Flynn, J.L., et al., *An essential role for interferon gamma in resistance to Mycobacterium tuberculosis infection*. J Exp Med, 1993. **178**(6): p. 2249-54.
45. Lucey, D.R., M. Clerici, and G.M. Shearer, *Type 1 and type 2 cytokine dysregulation in human infectious, neoplastic, and inflammatory diseases*. Clin Microbiol Rev, 1996. **9**(4): p. 532-62.
46. Bekker, L.G., et al., *Immunopathologic effects of tumor necrosis factor alpha in murine mycobacterial infection are dose dependent*. Infect Immun, 2000. **68**(12): p. 6954-61.
47. Kaufmann, S.H., *Immune response to tuberculosis: experimental animal models*. Tuberculosis (Edinb), 2003. **83**(1-3): p. 107-11.
48. H. E. Kaufmann, S., *Is the development of a new tuberculosis vaccine possible?* Nature Medicine, 2000. **6**(9): p. 955 - 960.
49. Kaufmann, S.H., *gamma/delta and other unconventional T lymphocytes: what do they see and what do they do?* Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(6): p. 2272-9.
50. Shen, Y., et al., *Adaptive immune response of Vgamma2Vdelta2+ T cells during mycobacterial infections*. Science, 2002. **295**(5563): p. 2255-8.
51. Schaible, U.E. and S.H. Kaufmann, *CD1 and CD1-restricted T cells in infections with intracellular bacteria*. Trends Microbiol, 2000. **8**(9): p. 419-25.
52. Orme, I.M., *The mouse as a useful model of tuberculosis*. Tuberculosis (Edinb), 2003. **83**(1-3): p. 112-5.
53. Hernandez-Pando, R., et al., *Analysis of the local kinetics and localization of interleukin-1 alpha, tumour necrosis factor-alpha and transforming growth factor-beta, during the course of experimental pulmonary tuberculosis*. Immunology, 1997. **90**(4): p. 607-17.
54. Manabe, Y.C., et al., *Attenuation of virulence in Mycobacterium tuberculosis expressing a constitutively active iron repressor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(22): p. 12844-8.
55. Cole, S.T., et al., *Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence*. Nature, 1998. **393**(6685): p. 537-44.
56. Buchmeier, N.A. and F. Heffron, *Induction of Salmonella stress proteins upon infection of macrophages*. Science, 1990. **248**(4956): p. 730-2.
57. Ludwiczak, P., et al., *Mycobacterium tuberculosis phoP mutant: lipoarabinomannan molecular structure*. Microbiology, 2002. **148**(Pt 10): p. 3029-37.
58. Camacho, L.R., et al., *Identification of a virulence gene cluster of Mycobacterium*

- tuberculosis by signature-tagged transposon mutagenesis*. Mol Microbiol, 1999. **34**(2): p. 257-67.
59. Infante, E., et al., *Immunogenicity and protective efficacy of the Mycobacterium tuberculosis fadD26 mutant*. Clin Exp Immunol, 2005. **141**(1): p. 21-8.
  60. Fine, P.E., *Variation in protection by BCG: implications of and for heterologous immunity*. Lancet, 1995. **346**(8986): p. 1339-45.
  61. Pelicic, V., et al., *Efficient allelic exchange and transposon mutagenesis in Mycobacterium tuberculosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(20): p. 10955-60.
  62. Buddle, B.M., et al., *Development of vaccines to control bovine tuberculosis in cattle and relationship to vaccine development for other intracellular pathogens*. Int J Parasitol, 2003. **33**(5-6): p. 555-66.
  63. Hsu, T., et al., *The primary mechanism of attenuation of bacillus Calmette-Guerin is a loss of secreted lytic function required for invasion of lung interstitial tissue*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(21): p. 12420-5.
  64. Hinchey, J., et al., *Enhanced priming of adaptive immunity by a proapoptotic mutant of Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Invest, 2007. **117**(8): p. 2279-88.
  65. Delogu, G. and G. Fadda, *The quest for a new vaccine against tuberculosis*. J Infect Dev Ctries, 2009. **3**(1): p. 5-15.