



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

**INFLUENCIA DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA DE LA MICOBACTERIA EN
LA INMUNOPATOGENESIS DE LA TUBERCULOSIS PULMONAR
EXPERIMENTAL**

Tesis para obtener el grado de:
DOCTORA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
PRESENTA:
BIÓL. BRENDA NOEMÍ MARQUINA CASTILLO

TUTOR PRINCIPAL
DR. ROGELIO HERNÁNDEZ PANDO

COMITE TUTORAL
DRA. LOURDES GARCÍA GARCÍA
DR. ALFREDO PONCE DE LEÓN

ASESOR
DR. JOSÉ SIFUENTES OSORNIO



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.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

**INFLUENCIA DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA DE LA MICOBACTERIA EN
LA INMUNOPATOGENESIS DE LA TUBERCULOSIS PULMONAR
EXPERIMENTAL**

Tesis para obtener el grado de:

Doctora en Ciencias Biomédicas

PRESENTA:

Biól. Brenda Noemí Marquina Castillo

TUTOR PRINCIPAL

DR. ROGELIO HERNÁNDEZ PANDO

COMITE TUTORAL

DRA. LOURDES GARCÍA GARCÍA

DR. ALFREDO PONCE DE LEÓN

ASESOR

DR. JOSÉ SIFUENTES OSORNIO

A Aquiles

A José Andrés y María José

A la memoria de mis padres

Emma Castillo Lara y Gilberto Marquina Domínguez

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Patología Experimental del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán” con el apoyo de las siguientes instituciones: CONACyT (G26264M, 30987-M, SALUD-2003-C01-132-A-1) Institutes of Health of the United States (A135969 and K01TW000001), Wellcome Trust (176W009), Howard Hughes Medical Institute (55000632) y la DEGEP, Universidad Nacional Autónoma de México.

Agradecimientos.

Al Dr. Rogelio Hernández Pando por el tiempo, la paciencia y la confianza que siempre ha depositado en mí, gracias.

A mi comité tutorial: a la Dra. Lourdes García García, al Dr. Alfredo Ponce de León y al Dr. José Sifuentes Osornio por todo su apoyo, paciencia y conocimientos compartidos en la elaboración de este trabajo. Gracias por el tiempo dedicado a las 10 grandes y a este gran proyecto.

A las Dra. Miriam Bobadilla y Areli Martínez por su asesoría y apoyo en el manejo microbiológico y molecular de las 10 grandes.

A todo el equipo de la Dra. Lourdes García García, por todo el trabajo de campo y epidemiológico que está detrás de las 10 grandes y que sin él no sería posible este proyecto.

A mis hermanos : Gilberto, Berenice, Denise y Luis por toda la paciencia que siempre han tenido conmigo en tiempos difíciles. Gracias.

Y por supuesto a Aquiles, José Andrés y María José por el amor y paciencia, por el tiempo compartido para llevar a buen fin este gran proyecto. Gracias amores.

Resumen

A partir de un estudio prospectivo con base poblacional en pacientes con tuberculosis pulmonar (1995-2003) en Orizaba, Veracruz, México, seleccionamos 8 aislados clínicos basados en sus patrones clínicos y epidemiológicos relevantes. Evaluamos la patogenicidad y virulencia de cada uno de estos aislados en un modelo de tuberculosis pulmonar progresiva en ratones BALB/c bien caracterizado. Además con estos aislados evaluamos un nuevo modelo de transmisibilidad en el ratón que consistió en la estrecha y prolongada convivencia (por más de 60 días) de ratones infectados y ratones sanos. Encontramos cuatro fenotipos basados en la virulencia de la cepa (sobrevivencia en el ratón, carga bacilar pulmonar y daño tisular), respuesta inmune (expresión de citocinas determinada por PCR en tiempo real) y transmisibilidad (carga bacilar pulmonar y respuesta a la DTH en los ratones contacto). Estos fenotipos son: fenotipo 1 cepa hipervirulenta que induce una respuesta inmune no protectora y altamente transmisible; fenotipo 2 cepa virulenta, asociada con alta expresión de citocinas pro-inflamatorias y baja expresión de citocinas anti-inflamatorias, la cual induce muerte acelerada por inmunopatología; fenotipo 3 cepa que induce una eficiente respuesta inmune protectora con baja virulencia; y fenotipo 4, cepas que presentaron una fuerte y temprana activación de macrófagos (inmunidad innata) con retardo en la participación de la inmunidad adquirida (expresión de interferón). Correlacionamos los fenotipos de virulencia y transmisibilidad en el modelo animal con los marcadores de transmisión en la comunidad, como son reactividad a la tuberculina entre contactos, rápida progresión a la enfermedad y estatus del grupo. Sin embargo, dos de los fenotipos encontrados no correlacionaron con estos marcadores de transmisión en la comunidad. Nuestro modelo de transmisibilidad apoya la hipótesis de que en estas cepas el incremento de la virulencia está unido al incremento en la transmisión.

Abstract

Clinical isolated 8 based on their relevant clinical and epidemiological patterns we selected from a prospective study in patients with pulmonary tuberculosis (1995-2003) in Orizaba, Veracruz, Mexico, population based. We evaluate pathogenicity and virulence of each of these isolated in a model of progressive pulmonary tuberculosis in mice BALB/c well characterized. In addition with these isolated evaluate a new model of transmissibility in the mouse that consisted of the close and prolonged coexistence (for more than 60 days) of infected mice and healthy mice. We found four phenotypes based on the virulence of the strain (survival in mouse, lung bacillary load and tissue damage), immune response (expression of cytokine determined by PCR in real time) and transmissibility (pulmonary bacillary load and response to the DTH in mice contact). These phenotypes are: Phenotype 1 hypervirulent strain that induces an immune response not protective and highly transmissible; phenotype 2 virulent strain associated with high expression of pro-inflammatory cytokines and low expression of anti-inflammatory cytokines, which induces death accelerated immunopathology; phenotype 3 strain that induces an efficient immune response protective with low virulence and phenotype 4 strains, that showed a strong and early activation of macrophages (innate immunity) delayed the participation of acquired immunity (interferon expression). We do correlate the phenotypes of virulence and transmissibility in the animal model with markers of transmission in the community, such as reactivity to tuberculin among contacts, rapid progression to disease and status of the group. However, two of the phenotypes found not correlated with these markers of transmission in the community. Our model of transmissibility supports the hypothesis that increased virulence is linked to the increase in transmission in these strains.

Abreviaturas

19kDa	Proteína de 19 kiloDalton
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AG	Arabinogalactano
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ARNr	Ácido ribonucleico ribosomal
ARNt	Ácido ribonucleico de transferencia
BAAR+	Bacilo ácido alcohol resistente
BALB/c	Cepa de ratón de la especie <i>Mus musculus</i> utilizada para investigación científica
BCG	Bacillus Calmette-Guérin
C	Citocina
CDC 1551	Cepa causante de un importante brote en los Estados Unidos
Cepa W	Cepa de <i>M. tuberculosis</i> miembro de la familia Beijing
CO ₂	Dióxido de carbono
CR3	Receptor 3 del complemento
DC-SIGN	Célula dendrítica – molécula de adhesión intracelular específica – 3 Grabbing No integrina
DOTS	Siglas en ingles de tratamiento acortado directamente supervisado (<i>Directly observed treatment, short-course</i>)
DR	Secuencias repetidas directas
DTH	Hipersensibilidad de tipo retardada
Fas	Miembro de la familia de receptores TNF con función de apoptosis
FoxP3	Factor regulador de la transcripción, implicado en la regulación del sistema inmune
G	Guanina
G3PDH	Gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos
H37Rv	Cepa prototipo de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
HIV	Virus de inmunodeficiencia humana

ICAM-3	Molécula de adhesión intracelular 3
IKK	Ikappa B kinasa
IL-1	Interleucina 1
IL-10	Interlucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-13	Interleucina 13
IL-17	Interleucina 17
IL-18	Interleucina 18
IL-1R	Receptor de interleucina 1
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IL-2	Interleucina 2
IL-21	Interleucina 21
IL-22	Interleucina 22
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IL-6	Interleucina 6
INF- γ	Interferón gamma
iNOS2	Sintasa inducible del oxido nítrico 2
IRAK1	Receptor de interleucina 1 – asociado a kinasa 1
IS	Secuencias de inserción.
KO	Knock-out
LAM	Familia Latino – Americano -Mediterráneo
LAM	Lipoarabinomanano
LM	Lipomanano
LPS	Lipopolisacarido
mAGP	Complejo micolil-arabinogalactano-peptidoglicano
MHC I	Complejo mayor de histocompatibilidad clase I
MHC II	Complejo mayor de histocompatibilidad clase II
MMR	Receptor de manosa
MTC	Complejo de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MyD88	Factor de diferenciación mieloide 88

NF- κ B	Factor nuclear kappa B
<i>nm</i>	nanómetros
OMS	Organización Mundial de la Salud
ON	Óxido Nítrico
pb	Pares de bases
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
PE o PPE	Familia multigenes de <i>M. tuberculosis</i> con motivos de prolina – glutamato (PE) o prolina-prolina-glutamato (PPE) con posible origen de variación antigénica
PG	Peptidoglcano
PGRS	Polimorfismo de las secuencias ricas en GC (guanina, citosina)
PIMs	fosfatidil-mio-inositol-manosidos
PPD	Derivado proteico purificado
PRR	Receptores de reconocimiento a patrones
RFLP	Longitud del polimorfismo en los fragmentos de restricción
RFLP-IS6110	Longitud del polimorfismo en los fragmentos de restricción de la secuencia de inserción 6110 de <i>M. tuberculosis</i>
RIN	Reactivos intermediarios del nitrógeno
RN	Especies reactivas de nitrógeno
RO	Especies reactivas de oxígeno
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real o cuantitativa
SIRE	Estreptomicina – Isoniazida – Rifampicina - Estambutol
T CD4+	Linfocitos T CD4
T CD8+	Linfocitos T CD8
TB	Tuberculosis
TGF- β	Factor de crecimiento transformante tipo beta
Th1	Respuesta inmune tipo Th1
Th17	Subgrupo de células Th que producen citocinas como IL-17, IL-17F, etc.
Th2	Resouesta inmune tipo Th2
TLR	Receptor Toll-Like
TLR2	Receptor Toll-Like 2

TLR4	Receptor Toll-like 4
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
TRADD	Receptor de TNF tipo 1 – asociado a dominio de muerte
TRAF2	Factor 2 asociado a TNF
TRAF6	Factor 6 asociado a TNF
Treg	Subgrupo de linfocitos T reguladores
UFC	Unidades formadoras de colonias
VIH-SIDA	Virus de Inmunodeficiencia Humana – Síndrome Inmunodeficiencia Adquirida
WHO	Siglas en inglés de la Organización Mundial de la Salud (<i>World Health Organization</i>)
μm	Micrómetro

Índice

1. Antecedentes	14
1.1. Historia de la tuberculosis	14
1.2. Epidemiología de la tuberculosis	16
1.3. Biología de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .	18
1.3.1. Pared celular de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	20
1.4. Patogénesis de la tuberculosis	21
1.4.1. Aspectos clínicos y patológicos en la tuberculosis	23
1.4.2. Eventos en el proceso de infección	24
1.5. Respuesta Inmune contra <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	26
1.5.1. Inmunidad Innata	27
1.5.2. Inmunidad Adquirida	32
1.6. Genética de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	35
1.6.1. Genoma de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	35
1.7. Epidemiología Molecular	37
1.7.1. Métodos de análisis de epidemiología molecular	39
1.8. Variabilidad genética de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	42
1.9. Modelo de tuberculosis pulmonar experimental en ratones BALB/c	45
2. Antecedentes del estudio epidemiológico	50
3. Justificación	52
4. Hipótesis	53

5. Objetivos	53
6. Materiales y métodos	54
6.1. Selección de aislados clínicos de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	54
6.2. Selección de las cepas de estudio	56
6.3. Cultivo de aislados y preparación del inóculo.	58
6.4. Modelo de tuberculosis pulmonar experimental en ratones BALB/c	58
6.5. Preparación del tejido pulmonar para análisis histopatológico y morfométrico	59
6.6. Determinación de unidades formadoras de colonias (UFC) en los pulmones infectados	59
6.7. Análisis de citocinas por PCR en tiempo Real de los homogeneizados pulmonares	60
6.8. Modelo Experimental de transmisibilidad de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> en ratones BALB/c	61
6.9. Análisis estadístico	62
7. Resultados	63
8. Discusión	81
9. Conclusiones	90
10. Perspectivas	93
11. Anexos	94
12. Bibliografía	112

1. Antecedentes

1.1. Historia de la tuberculosis

La tuberculosis es una de las enfermedades infecciosas más antiguas, considerada como una de las primeras de las que se tiene registro, se estima una antigüedad entre 15,000 y 20,000 años. A lo largo de los años se ha conocido como consunción, tisis, escrófula, mal de Pott, mal del rey o plaga blanca. Los primeros indicios datan del Neolítico en huesos humanos, aunque no es posible conocer con exactitud la incidencia y prevalencia antes del siglo XIX (Gutierrez and others, 2005).

Sin embargo, durante la Edad Media y el Renacimiento hubo una alta incidencia de tuberculosis que fue en aumento durante el siglo XVIII y hasta finales del siglo XIX. Esto contribuyó a los desplazamientos masivos de campesinos en busca de trabajo hacia las grandes ciudades, lo que conllevó a hacinamiento, pobreza, largas jornadas de trabajo, viviendas mal ventiladas y húmedas, es decir, condiciones propicias para la diseminación y propagación del bacilo de la tuberculosis (Daniel, 2006).

Ya desde 1865 Jean-Antoine Vellemin (1827-1892) hizo una notable observación al proponer que un microorganismo es el causante de la enfermedad, él demostró que la consunción puede ser transmitida de humanos al ganado, y del ganado al conejo. Al mismo tiempo William Budd (1811-1880), con base en sus estudios epidemiológicos concluyó que la tuberculosis se disemina en la sociedad a través de un germen específico.

Sin embargo, fue hasta 1882 que Robert Koch, después de analizar muestras de esputo de pacientes con tuberculosis revelaría que el agente causal de esta enfermedad era un bacilo, el *Mycobacterium tuberculosis* o bacilo de Koch, como más tarde se le conocería (Daniel, 2006).

Después de numerosas observaciones con éste y otros microorganismos Robert Koch en 1890 describe los postulados sobre las enfermedades transmisibles. Estos postulados consisten en cuatro criterios para establecer la relación causal entre un microorganismo y la enfermedad producida.

- i.* El agente causal debe encontrarse en todos los animales que sufren la enfermedad, pero no en los animales sanos.
- ii.* El organismo debe ser aislado de animales enfermos y crecer en un cultivo puro.
- iii.* El organismo cultivado deberá causar enfermedad cuando se inocule en animales susceptibles.
- iv.* El organismo deberá ser aislado de nuevo de un animal infectado experimentalmente.

Tras la publicación de estos resultados, la comunidad científica en el mundo se dedicó al estudio del bacilo tuberculoso y es así como Franz Ziehl y Friedrich Neelsen mejoraron el método de tinción para la observación del bacilo (tinción de Ziehl-Neelsen). En 1908 Robert Koch, en colaboración con Camille Guerin, desarrolló la tuberculina, un derivado proteico purificado del bacilo (PPD) que se pensaba útil como agente inmunizante, y que más tarde Charles Mantoux mejoraría para administrarlo por vía intradérmica como método diagnóstico (ya que al aplicarse de manera intradérmica en el antebrazo, se genera una respuesta inmunitaria si el individuo ha estado en contacto previo con el bacilo tuberculoso) (Palomino JC, 2007).

1.2. Epidemiología de la tuberculosis

A pesar de los esfuerzos globales por combatir la tuberculosis, ésta permanece como uno de los principales problemas de salud pública en el mundo. Causa alrededor de 8.8 millones de casos al año en el mundo, un tercio de la población mundial se encuentra infectada y al menos el 5% desarrollará la enfermedad en los 2 años posteriores a la fecha de contacto sin tener condiciones que lo predispongan (Vynnycky and Fine, 1997; WHO, 2011).

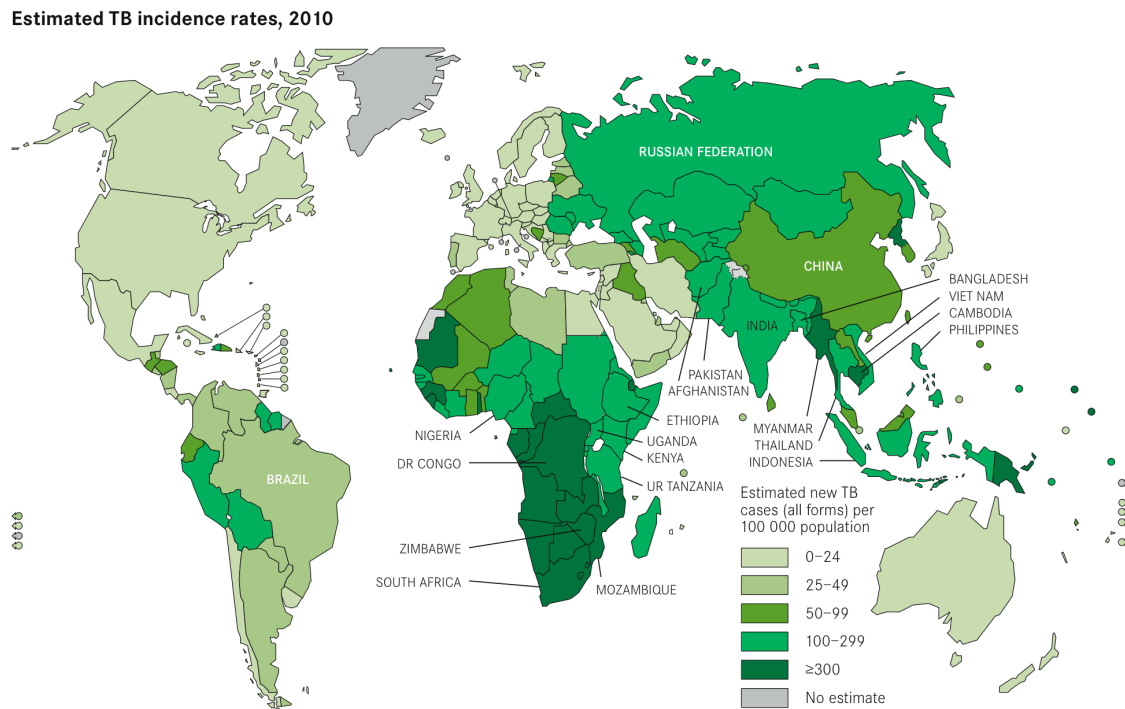


Fig 1. Tasas de incidencia estimada, 2010. WHO REPORT 2011 Global Tuberculosis Control

La Organización Mundial de la Salud (por sus siglas en inglés WHO), en su reporte anual por país para 2010, estima para México importantes tasas de incidencia (16 x 100,000 habitantes), mortalidad (0.84 x 100,000 habitantes) y prevalencia (18 x 100,000 habitantes).

La tuberculosis representa en México, desde hace ya varios años, un grave problema de salud pública (tabla1). (WHO México, 2011).

Estimado para 2010	Número (en miles)	Tasa (por 100 000 habitantes)
Mortalidad (excluyendo HIV)	0.96 (0.77-1.2)	0.84 (0.68-1)
Prevalencia (incluyendo HIV)	21 (5-36)	18 (4.4-32)
Incidencia (incluyendo HIV)	18 (16-21)	16 (14-19)
Incidencia (HIV- positivo)	0-92 (0.68 -1.2)	0.81 (0.6 -1.1)
Casos detectados, todas las formas (%)	110 (91 120)	

Tabla 1. Tasas de incidencia, mortalidad y prevalencia para México, 2010. WHO Report 2011 www.who.int/tb/country/en/index.html

Desde que se describió el bacilo de la tuberculosis en 1882 por Robert Koch hasta nuestros días, esta enfermedad es una de las principales causas de muerte en el mundo. Actualmente ocupa el séptimo lugar en causas de muerte a nivel mundial con 1.1 millón de muertes al año. (Dye, 2006; WHO, 2011).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) en 1993 declaró a la tuberculosis como una enfermedad re-emergente, y desde entonces se iniciaron programas para tratar de erradicarla. El DOTS (*Directly observed treatment, short-course*) es una estrategia recomendada para el control y erradicación de la tuberculosis en México y el mundo, que ha demostrado ser una herramienta útil para disminuir las tasas de tuberculosis y la frecuencia de resistencias antimicrobianas (WHO, 2011). Actualmente la OMS estableció una propuesta para detener la tuberculosis: “stop-TB” 2006-2015, reforzando los programas de prevención y tratamiento de la tuberculosis en el mundo, donde se pretende alcanzar la detección del 70% de los casos bacilo ácido-alcohol resistente (BAAR +) en expectoración y la cura del 85% de estos casos; reducir la prevalencia e incidencia en un 50% y por

supuesto evitar que la tuberculosis sea un problema de salud pública para 2015 (WHO, 2011).

1.3. Biología de *Mycobacterium tuberculosis*

El *Mycobacterium tuberculosis* es un bacilo de 3 a 5 μm de longitud, 0.2 a 0.6 μm de ancho, ligeramente curvo, inmóvil, no esporulado y de crecimiento rápido. Posee una gran cantidad de lípidos (20 a 60%) en su pared y tiene un alto contenido (65%) de guaninas y citosinas (G+C) en su genoma. Los lípidos constituyen casi la mitad de peso seco de la micobacteria. Sin embargo la composición de lípidos varía dependiendo de la disponibilidad de nutrientes. Esta cubierta serosa le da características típicas al género *Mycobacterium*: alta hidrofobicidad, resistencia a antibióticos, propiedades inmunológicas y probablemente contribuye al lento crecimiento; también las hace resistentes a desinfectantes y colorantes utilizados en tinciones comunes en el laboratorio, como la tinción de Gram y la de Giemsa. Por esta característica se les llamó bacterias ácido-alcohol-resistentes y pueden teñirse con tinciones especiales como: Ziehl-Neelsen, auramina-rodamina y naranja de acridina (Palomino JC, 2007; Riley, 2006; Smith, 2003).



Fig 2. Tinción Ziehl-Neelsen de *Mycobacterium tuberculosis* 1000x.

El género *Mycobacterium* presenta una gran diversidad, algunas especies puede replicarse de forma libre y rara vez causar enfermedad. Otras micobacterias son patógenas en

ambientes intracelulares y otras más como *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium lepraemurium*, *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* y los miembros del complejo *Mycobacterium tuberculosis*, dependen del hospedero para duplicarse.

Algunas de estas micobacterias se cultivan *in vitro*, sin embargo *M. leprae* y *M. lepraemurium* no pueden cultivarse *in vitro*, requieren al hospedero para su sobrevivencia y propagación.

Los miembros del complejo *Mycobacterium tuberculosis*, tienen diferentes hospederos, potencial zoonótico y reservorios. *M. tuberculosis*, *M. africanum* y “*M. canettii*” infectan principalmente al humano. *M. bovis* y *M. microti* causan tuberculosis en animales y pueden transmitirla al humano (Palomino JC, 2007).

Reino	Bacteria
Phylum	Actinobacteria
Clase	Actinobacteria
Subclase	Actinobacteridae
Orden	Actinomycetales
Suborden	Corynebacterineae
Familia	Mycobacteriaceae
Genero	Mycobacterium (único género)
Especie	<i>M. tuberculosis</i> <i>M. bovis</i> <i>M. africanum</i> <i>M. microti</i> “ <i>M. canettii</i> ” <i>M. caprae</i> <i>M. pinnipedii</i>

Fig 2. Taxonomía de *Mycobacterium*. (NBI, 2011) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/>

1.3.1. Pared celular de *Mycobacterium tuberculosis*

La pared celular de la micobacteria presenta una cubierta compuesta por peptidoglicano (PG) unido covalentemente con arabinogalactano (AG) y ácidos micólicos, formando el complejo micolil-arabinogalactano-peptidoglicano (mAGP). Presenta también una parte externa compuesta por lípidos unidos a ácidos grasos, fosfatidil-mio-inositol manósidos (PIMs), lipomanano (LM) y lipoarabinomanano (LAM). Estas proteínas junto con los lípidos actúan como moléculas efectoras de procesos de señalización y la pared celular altamente hidrofóbica son vitales para la viabilidad celular (Mishra AK, 2011; Rajni and others, 2011).

Las proteínas y lípidos en la pared celular, no solamente están relacionadas con el crecimiento y viabilidad de la micobacteria, sino también están involucrados en la interacción patógeno-hospedero, por medio de los lipoglicanos con el sistema inmune (Mishra AK, 2011).

El PIMs, lipomanano y lipoarabinomanano interaccionan con diferentes receptores del sistema inmune del hospedero. Lipomanano asociado a receptores Toll-like (TLR), PIMs y Man-LAM son reconocidos por lectinas tipo-C, ICAM-3, DC-SIGN y receptores de manosa (MMR) (Chatterjee and Khoo, 1998; Geijtenbeek and others, 2003; Maeda and others, 2003; Schlesinger and others, 1994) y están implicados en el arresto de la maduración del fagosoma (Vergne and others, 2003; Welin and others, 2008).

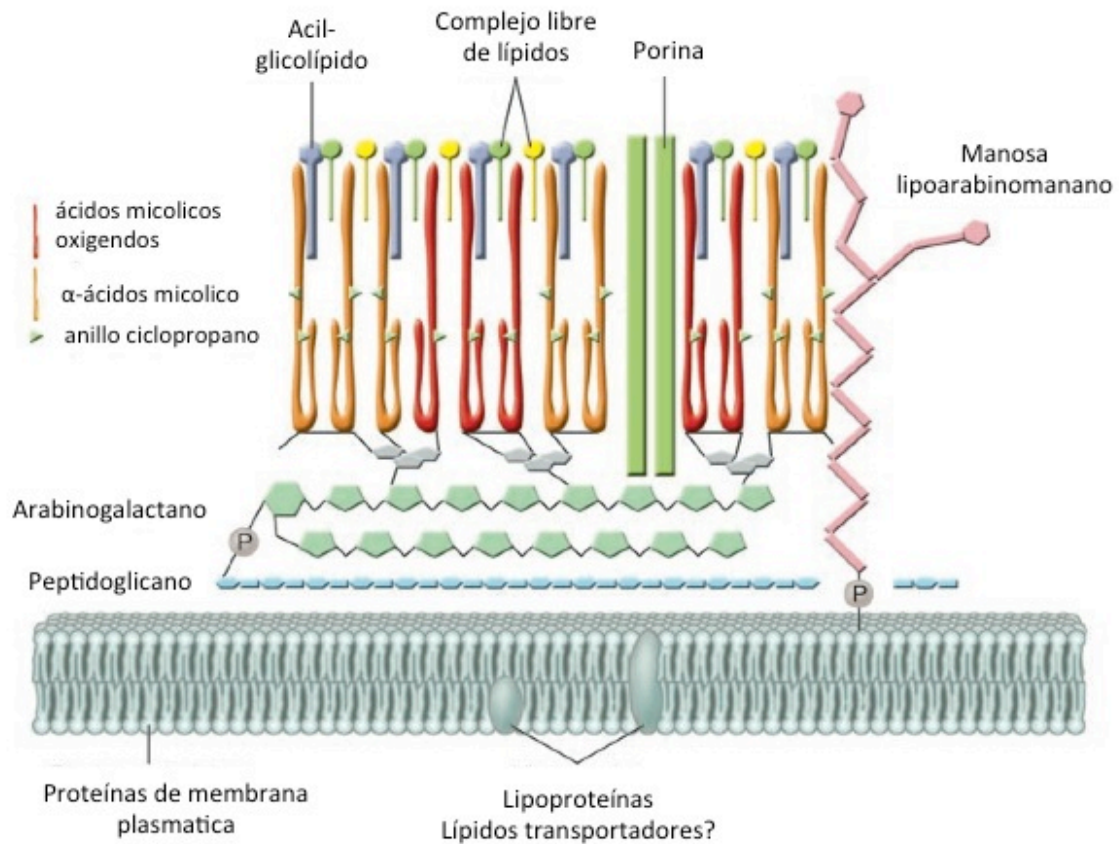


Fig 3. Estructura de la pared celular de *Mycobacterium tuberculosis*. (Riley, 2006)

1.4. Patogénesis de la tuberculosis.

Desde el primer contacto del hospedero con el bacilo de *M. tuberculosis*, se desencadena una serie de eventos inmunológicos que definen el curso de la infección. El 5% de los individuos infectados llegarán a desarrollar enfermedad primaria progresiva después de la infección (Cole and others, 1998; Finch and others, 1991), existe una amplia gama de manifestaciones clínicas que pueden presentarse en cualquier momento de la vida de aquellos individuos que no pudieron controlar la infección (Fig 4). Por lo tanto, las consecuencias clínicas y epidemiológicas de la

tuberculosis dependen de la compleja interacción hospedero-patógeno, ambiente y factores bacterianos (Rook and Hernandez-Pando, 1996; Vynnycky and Fine, 1997).

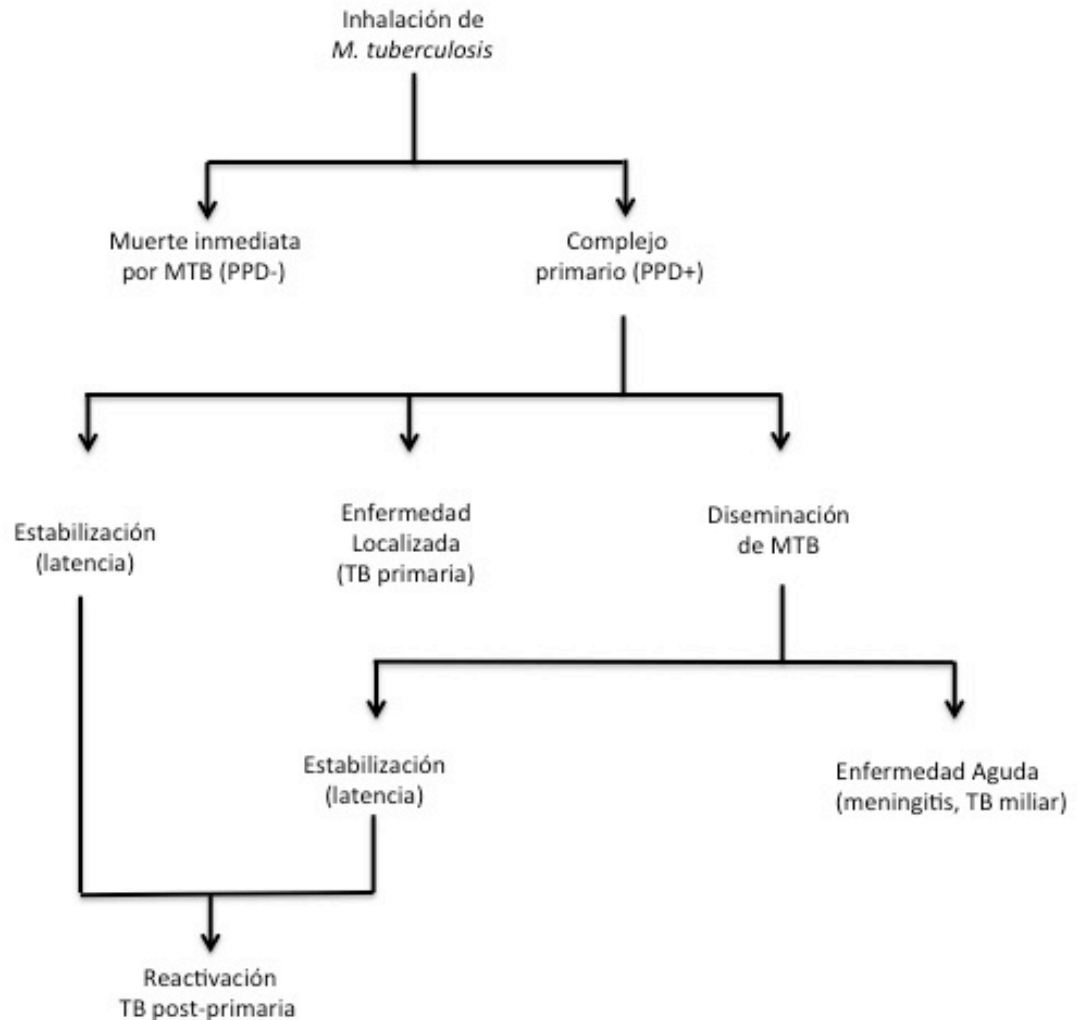


Fig 4. Eventos cronológicos después de la inhalación del bacilo de *Mycobacterium tuberculosis*. (Van Crevel, R 2002)

Factores como pobreza, desnutrición, hacinamiento, viviendas mal ventiladas y con poca iluminación; exposición a micobacterias saprófitas; abuso de alcohol, tabaco y drogas; la falta de servicios sanitarios y de salud; la presencia de enfermedades como VIH-SIDA (Perez and others, 2006) y *Diabetes mellitus* (Garcia-Garcia and others,

2000a) influyen de manera importante en la susceptibilidad a desarrollar la enfermedad. Así como también las diferencias étnicas influyen en la gravedad clínica y frecuencia de la enfermedad (Kamerbeek and others, 1997).

1.4.1. Aspectos clínicos y patológicos en la tuberculosis

La tuberculosis es una infección transmisible por vía aérea, que al llegar a los pulmones puede diseminarse a todo el organismo (tuberculosis miliar). La tuberculosis puede ser clasificada en tres estados: tuberculosis primaria, latente y secundaria (Ferraz and others, 2006).

La tuberculosis primaria usualmente ocurre durante la infancia después de un contacto inicial con el bacilo tuberculoso. Frecuentemente es asintomática. Después de una alveolitis, hay formación de granulomas con la llegada de neutrófilos y monocitos, linfocitos B y T alrededor de macrófagos, células dendríticas y fibroblastos. El granuloma tuberculoso es un mecanismo por el cual se limita la diseminación micobacteriana (Dheda and others, 2005). La infección primaria es frecuentemente controlada en este momento, pero llegan a persistir algunos bacilos por meses o años, sin crecimiento pero viables, a esta característica se le ha llamado “persistencia no replicativa” (Ferraz and others, 2006) o tuberculosis latente, donde el hospedero monta una fuerte respuesta inmune, la cual contiene pero no elimina la infección. Al fallar los mecanismos de resistencia inmune, puede reactivarse la infección y desarrollarse una tuberculosis secundaria. En este estado hay un proceso inflamatorio exudativo con características neumónicas y con síntomas clásicos de la enfermedad como son: tos, expectoración, fiebre, sudoración nocturna, anorexia y pérdida de peso. Puede haber hemoptisis como resultado de la formación de

cavitaciones, áreas caseosas y fibrosis, es decir, el proceso infeccioso se vuelve crónico (Ferraz and others, 2006).

1.4.2. Eventos en el proceso de infección

La tuberculosis pulmonar se inicia al ser inhalado el bacilo de *Mycobacterium tuberculosis*, a través de partículas de saliva o gotitas de Flügge emitidas por la boca o nariz de una persona infectada o bacilífera. Las gotitas de Flügge son partículas de saliva de 0.5 a 10 μm de diámetro que contienen bacilos y son capaces de permanecer hasta por 30 minutos en suspensión y de propagar la infección al ser inhaladas por otro individuo (Daffé M and G, 1999; James BW and others, 2000).

Los macrófagos alveolares ingieren al bacilo, que frecuentemente es destruido, ésta es la primera estrategia de defensa y es un primer contacto que define el curso de la infección.

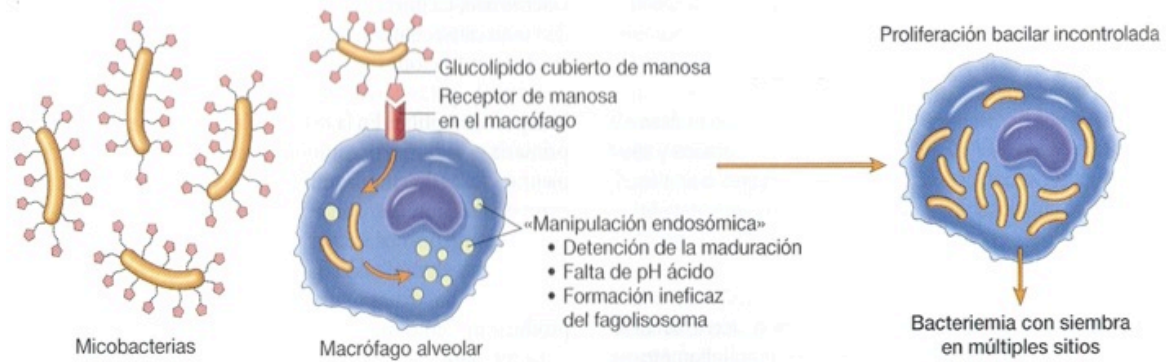
La destrucción de la micobacteria depende de la capacidad microbicida de la fagocitosis del hospedero y de los factores de virulencia de la micobacteria (Rook and Hernandez-Pando, 1996; van Crevel and others, 2002).

La micobacteria que escapa a la fagocitosis puede multiplicarse y producir destrucción del macrófago, al mismo tiempo monocitos y células inflamatorias son reclutadas al sitio de infección, los cuales pueden diferenciarse a macrófagos y rápidamente ingerir a la micobacteria, como medida de contención. En este momento la micobacteria crece logarítmicamente y se acumula en los macrófagos y células inflamatorias.

Después de 2 a 3 semanas de infección se desarrolla la inmunidad mediada por células T, con linfocitos antígeno-específico que llegan al sitio de infección, los bacilos proliferan dentro de estas lesiones o granulomas y activan macrófagos que ayudan a eliminar a la

micobacteria intracelular con un daño mínimo al tejido del hospedero. En el centro de los granulomas se forman centros necróticos que inhiben y contienen el crecimiento extracelular de la micobacteria, produciendo infección latente (Rook and Hernandez-Pando, 1996; van Crevel and others, 2002).

La enfermedad puede progresar si existen condiciones que comprometan al sistema inmunológico como diabetes, VIH-SIDA, etcétera; y producir diseminación hematógona meses o años después de la primoinfección. Las lesiones primarias pueden formar centros caseosos y cavidades que proveen condiciones para el crecimiento extracelular de *M. tuberculosis* y pueden conducir a la ruptura de bronquios cercanos permitiendo que el bacilo se disperse a través de la vía aérea a otras partes del pulmón y puedan ser expelidos hacia el exterior (Rook and Hernandez-Pando, 1996; van Crevel and others, 2002). Fig 5.



B. TUBERCULOSIS PULMONAR PRIMARIA (> 3 semanas)

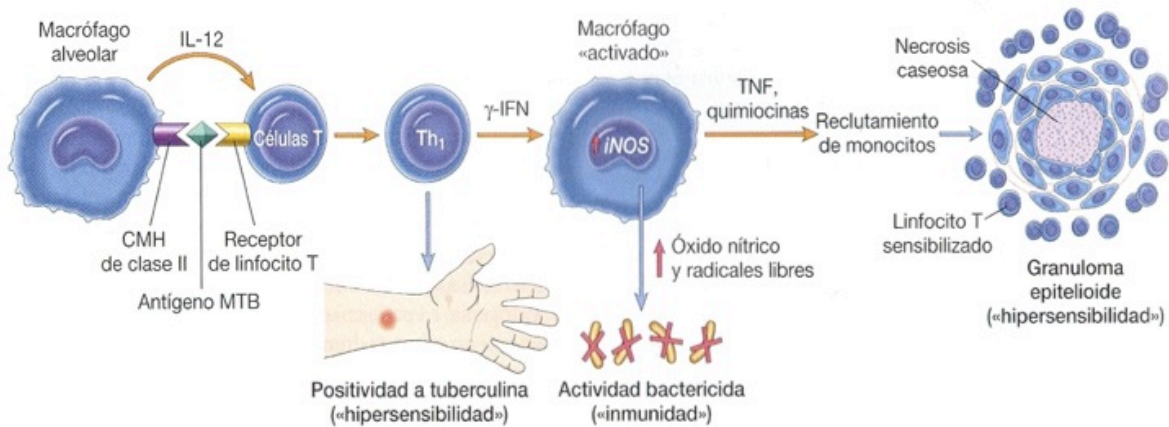


Fig 5. Eventos de infección de Mtb.

1.5. Respuesta Inmune contra *Mycobacterium tuberculosis*

La respuesta inmune contra la tuberculosis juega un papel fundamental en el desenlace de la infección por *M. tuberculosis*. El sistema inmune en general reacciona de manera eficiente para contener la mayoría de las infecciones. Sin embargo la respuesta inmune no es uniforme en todas las personas infectadas. La gran mayoría de las personas infectadas nunca desarrollarán la enfermedad, sino hasta muchos años después de haber sido expuestos al bacilo (Vynnycky and Fine, 1997). Esto se ha relacionado con la duración y la

intensidad de la exposición, la carga bacilar en el esputo del caso de índice y la eficiencia del sistema inmune para eliminar al bacilo (Nicol and Wilkinson, 2008).

La interacción macrófago-micobacteria y el papel de la respuesta del hospedero puede ser resumida como sigue: unión de superficie de *M. tuberculosis* al macrófago; fusión del fagosoma-lisosoma; inhibición del crecimiento micobacteriano y muerte; reclutamiento de células inmunes por una respuesta inflamatoria local y presentación de antígenos a las células T y desarrollo de la inmunidad adquirida.

1.5.1. Inmunidad Innata

La respuesta inmune innata contra el bacilo tuberculoso no ha sido comprendida del todo, pero para aquellos individuos expuestos a *M. tuberculosis* que no llegan a infectarse es clara la importancia que tiene esta respuesta. Los mecanismos de defensa innata contra *M. tuberculosis* involucran macrófagos alveolares, células dendríticas, neutrófilos, linfocitos B y T, células epiteliales, así como factores solubles como mucina, lisosima, lactoferrina, surfactantes, defensinas, catelicidinas, fosfolipasa A2, inmunoglobulinas y proteínas del complemento, encargadas de la eliminación de partículas extrañas o bacterias que entren por el tracto respiratorio y por medio de la interacción de estos, mantener así la integridad pulmonar (Ganz, 2002; van Crevel and others, 2002).

El hospedero presenta receptores de reconocimiento a patrones específicos (PRR) para detectar moléculas asociadas a patógenos. Estos receptores pueden activar diferentes rutas de señalización dependiendo del tipo de molécula asociada a la micobacteria que sea reconocida, la cual eventualmente activará el factor de transcripción NF- κ B, induciendo la

producción de quimiocinas y citocinas pro y anti- inflamatorias (Kleinnijenhuis and others, 2011; Strieter and others, 2002).

Los neutrófilos al igual que los macrófagos, se consideran las primeras células blanco para *M. tuberculosis*. Son las principales células que se reclutan al sitio de infección donde se encuentra algún agente patógeno o alguna señal de inflamación en el organismo. Los neutrófilos ejercen su acción microbicida a través de radicales libres y la mieloperoxidasa, también secretan quimiocinas que les permiten controlar la infección, al menos parcialmente, en la fase temprana. En un modelo experimental de tuberculosis en ratones, se detectaron neutrófilos al inicio de la infección y varios días después, se cree que tienen un importante papel en el control del crecimiento micobacteriano, ya que si se eliminan los neutrófilos antes de la infección, el crecimiento micobacteriano se incrementa, por otro lado si se trata a los animales con un agente que incremente los neutrófilos, la carga bacilar disminuye (Palomino JC, 2007) (Barrios-Payan and others, 2006) .

Los macrófagos pueden eliminar a la micobacteria a través de diferentes mecanismos, como son la producción de especies reactivas de nitrógeno y oxígeno (RO, RN), acidificación del fagosoma y la fusión del fagosoma con el lisosoma. Dentro del fagolisosoma la micobacteria es destruida por enzimas lisosomales y sus antígenos procesados y presentados a linfocitos T CD4+ (MHC II) y CD8+ (MHC I).

La fagocitosis de *M. tuberculosis* se lleva a cabo por los macrófagos a través de diversos mecanismos, sin embargo, *M. tuberculosis* favorece su propia fagocitosis utilizando receptores del hospedero como son: receptor scavenger, receptor de manosa (MR) y receptores del complemento. La fagocitosis involucra la captación del bacilo por opsonización con factores del complemento o puede iniciarse como un evento no opsónico. En experimentos *in vitro* se ha demostrado que el receptor 3 del complemento (CR3) está

involucrado en el 80% de la fagocitosis de *M. tuberculosis* cuando se encuentra opsonizada. Los mecanismos no opsónicos de la fagocitosis son un proceso importante en la infección primaria en el pulmón, porque los factores del complemento están ausentes en el espacio alveolar (Aderem and Underhill, 1999; Ernst, 1998; Kleinnijenhuis and others, 2011).

El destino de la micobacteria intracelular es también influido por la autofagia, un proceso celular en el que están involucrados componentes celulares, como organelos y patógenos intracelulares, que son secuestrados en una doble membrana unida al autofagosoma que será liberada para su degradación por el lisosoma. La activación de la autofagia lleva a la maduración del fagosoma incrementando la acidificación y eliminando a las micobacterias dentro del macrófago. Sin embargo, *M. tuberculosis* dentro del macrófago puede secuestrar la maquinaria inmune innata y evadir la destrucción evitando la fusión del fagolisosoma (Kleinnijenhuis and others, 2011).

Los receptores Toll (Toll like receptors-TLRs) representan los receptores clave en el reconocimiento de antígenos micobacterianos y la activación de macrófagos y células dendríticas. Los TLR2 y TLR4 están implicados en el reconocimiento de la micobacteria y en componentes de la pared celular, como son: lipoarabinomanano, lipomanano, fosfatidil-mio-inositol manosido y la lipoproteína de 19kDa. La forma activa de la vitamina D (1,25-D3) puede estimular vía el heterodímero TLR2/TLR1 y el receptor de la vitamina D, la síntesis de LL-37 (catelicidina), un péptido antimicrobiano responsable del incremento de la muerte del bacilo dentro de las vacuolas de los macrófagos. La activación de TLR2 por *M. tuberculosis* puede inducir la producción de IL-10, una citocina anti-inflamatoria y esta representa un posible mecanismo de evasión microbiana de la respuesta adaptativa (Rivas-Santiago and others, 2005)

Los receptores toll (TLR2/TLR4) de los macrófagos pueden interactuar con componentes de la pared de la micobacteria (LAM, PIM, proteínas) e inducir la producción de IL-1 β y TNF- α , dos de las más importantes citocinas de respuesta temprana en la inmunidad innata. IL-1 β /IL-1R y el complejo TLR2/CD14/MD2/Ag utilizan moléculas como MyD88, IRAK1, TRAF6, NIK, IKK, NF- κ B, mientras que TNF- α interactúa con su receptor e inicia la señalización por medio de TRADD, TRAF2, teniendo el mismo factor de transcripción (NF- κ B) e induciendo la expresión de genes que codifican para ciclooxigenasa, moléculas de adhesión celular, sintasa inducible del óxido nítrico (iNOS2), proteínas de fase aguda, citocinas proinflamatorias y quimiocinas (Kleinnijenhuis and others, 2011; Strieter and others, 2002) (Dheda and others, 2010; Rivas-Santiago and others, 2005).

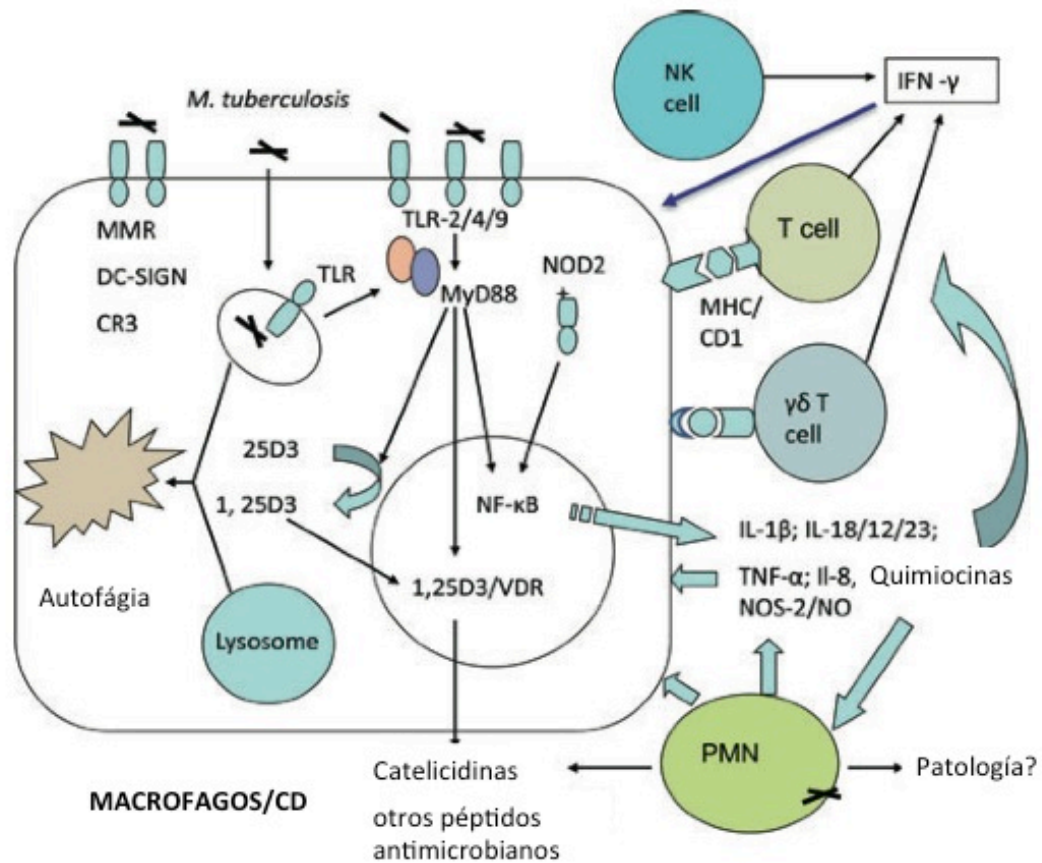


Fig 6. Inmunidad Innata de la infección por tuberculosis. *M. tuberculosis* es fagocitada por macrófagos y células dendríticas a través de receptores de membrana como CR3, receptor scavenger, MMR, TLR, NOD2 y DC-SIGN. Estos conducen a la activación de macrófagos a través de la ruta de señalización NF-κB, produciendo secreción de citocinas pro-inflamatorias, quimiocinas y moléculas antimicrobianas, y el receptor de la vitamina D, este ultimo induce la expresión de catelicidinas y β-defensinas. Por otro lado la autofagia también controla la actividad antimicrobiana. Las células polimorfo nucleares reconocen y fagocitan a *M. tuberculosis* y secretan péptidos antimicrobianos para matar a la bacteria. Las células NK, las células T γδ y las células T restringidas a CD1 son también activadas por citocinas y ligandos específicos, liberando factores citotóxicos y secretando IFN-γ que activan macrófagos (Dhedha and others, 2010).

TNF-α es una citocina derivada de fagocitos mononucleares que tiene efectos pleitrópicos.

TNF-α es un homotrímero que se une a dos diferentes receptores de superficie celular, p55 y p75. El receptor p55 es el receptor de Fas, contiene un dominio 60 aminoácidos conocido como “dominio de muerte”, el cual es esencial para la señal de transducción de la señal apoptótica. Así como la señalización de IL-1 y LPS, la señalización de TNF-α ocurre a

través de NIK y MAP / MEK $\frac{1}{2}$, la cual activa NF- κ B, aumentando la transcripción de genes.

1.5.2. Inmunidad Adquirida

En contraste con los mecanismos innatos, la respuesta inmune adquirida es específica y requiere del reconocimiento de antígenos extraños. El sistema inmune innato influye profundamente en el tipo de mecanismo inmune adquirido generado y viceversa, la respuesta inmune específica responde de diferentes maneras a funciones efectoras vía la activación de componentes de la inmunidad innata. La respuesta inmune adquirida puede ser dividida en mecanismos mediados por células (los cuales incluyen la activación de células T y mecanismos efectoras) y la respuesta inmune humoral, que consiste en la maduración de las células B y la producción de anticuerpos. Estos mecanismos no son excluyentes y las células T requieren de la maduración de anticuerpos, el cambio de isotipos y células de memoria (Palomino JC, 2007).

En la respuesta inmune humoral, frecuentemente se piensa que el bacilo tuberculoso por su localización intracelular, no está expuesto a anticuerpos, sin embargo este tipo de respuesta inmune es considerada como no-protectora. Así, durante la etapa inicial de la infección, los anticuerpos solos o en conjunto con citocinas, pueden proveer importantes funciones, tales como prevenir la entrada de bacterias a la superficie de la mucosa respiratoria.

Los anticuerpos en la tuberculosis pueden aumentar la inmunidad a través de diversos mecanismos, como son neutralización de toxinas, opsonización, activación del complemento, promueven la liberación de citocinas, citotoxicidad dependiente de anticuerpos e incrementan la presentación de antígenos. En este sentido, se ha visto que los anticuerpos anti-micobacterianos tienen un papel importante en varios estados de la

respuesta del hospedero a la infección por *M. tuberculosis*. Se ha visto que los anticuerpos específicos pueden incrementar la internalización y muerte de BCG por neutrófilos y macrófagos. Por otro lado, las células dendríticas procesan y presentan más eficientemente al bacilo de BCG cuando se encuentra cubierto con anticuerpos, para la estimulación de la respuesta de las células T CD4+CD8+(de Valliere and others, 2005; Palomino JC, 2007).

La respuesta inmune celular es específica y su desarrollo depende de la eficiencia de la respuesta inmune innata, si los macrófagos no son capaces de controlar la infección se favorece una respuesta inmune humoral (Th2) no protectora, caracterizada por la producción de citocinas como IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 y TGF- β , estas citocinas antagonizan la respuesta tipo Th1 caracterizada por la producción de citocinas como INF- γ , IL-2, IL-12, IL-18 y TNF- α (Flynn and Chan, 2001).

Las células T CD4 se han clasificado en células Th1, Th2, Th17 y Treg. Las células Th1 producen citocinas, principalmente INF- γ , TNF- α , IL-2, linfotoxina y GM-CSF, los cuales promueven la estimulación de las células Th1, linfocitos citotóxicos y la maduración y activación de macrófagos y granulocitos. Las células Th2 producen factores de estimulación de células B, como son, IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, que promueven la producción de anticuerpos pero suprimen la respuesta inmune tipo Th1. Las células Th17 son un subgrupo de las células Th, producen solamente citocinas como IL-17, IL-17F, IL-21 y IL-22, las cuales estimulan la producción de defensinas y el reclutamiento de neutrófilos y monocitos/macrófagos al sitio de inflamación y están involucrados en la fase temprana de la defensa del hospedero. Los subgrupos de las células Th1, Th2 y Th17 pueden ser moduladas por las células Treg, que pueden presentar diferentes tipos, las Treg

naturales CD4+CD25+FoxP3+ se caracterizan por la producción de TGF- β e IL-10 (Dheda and others, 2010). Sin embargo, el papel de las células Treg no ha sido completamente entendido en la patogénesis de la tuberculosis. El ambiente de citocinas puede influir en la diferenciación de los subgrupos de células T (Dheda and others, 2010).

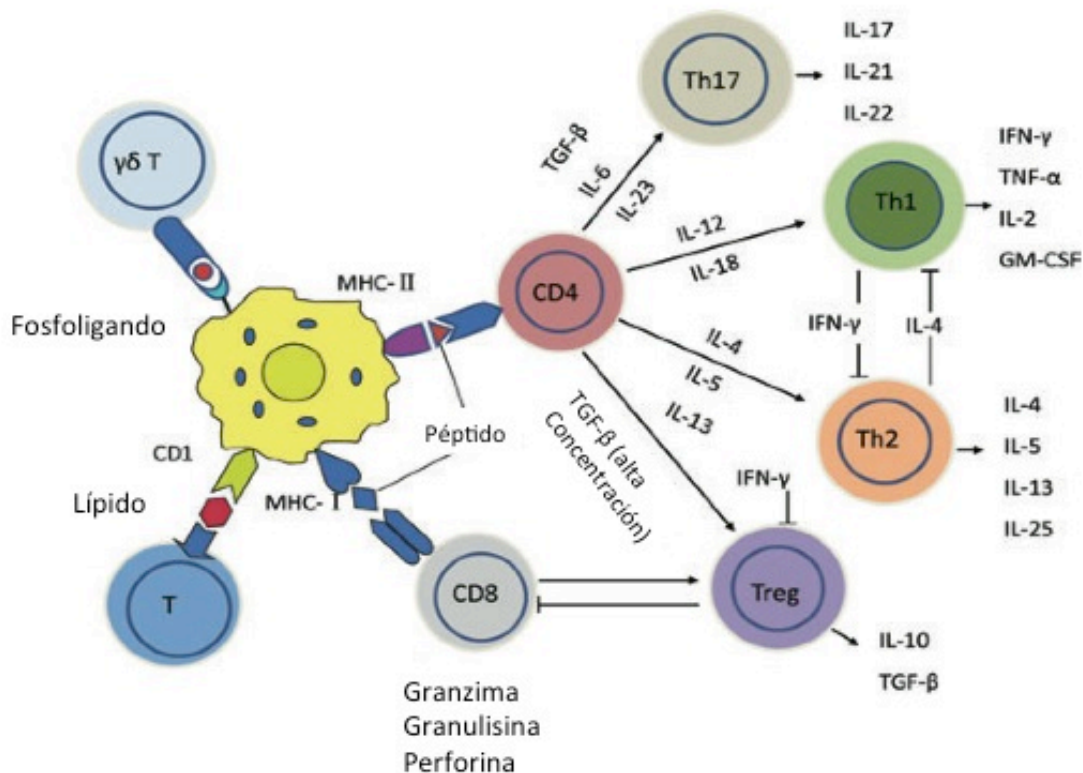


Fig 8. Los macrófagos infectados y las células dendríticas secretan IL-12, IL-23, IL-17, IL-15 y TNF- α y presentan antígenos a diferentes poblaciones de células T incluyendo CD4+ (MHC II), y CD8+ (MHC I), Células T- CD1 (glicolípidos) y células T $\gamma\delta$ (fosfoligandos). Las células T secretan INF- γ que activa macrófagos y junto con TNF- α matan a la bacteria intracelular a través de intermediarios de oxígeno y nitrógeno. Las células T CD8+ eliminan a la bacteria a través de granulosimas y perforinas. Las Células Th2 CD4+ producen citocinas inmunosupresoras como IL-4, y las Treg CD4+CD25+FoxP3+ producen IL-10 que pueden suprimir la capacidad micobactericida. Las células Th17 que se producen en presencia de IL-23, se caracterizan por la producción de IL-17, que es un importante modulador de la inflamación y de la respuesta de memoria (Dheda and others, 2010).

1.6. Genética de *Mycobacterium tuberculosis*

No solamente la gravedad y la forma clínica de la tuberculosis dependen del ambiente (Hernandez-Pando and others, 1997b) y de factores del huésped. En los últimos años se ha considerado la variabilidad genética de la micobacteria como un factor importante en el desarrollo de la enfermedad. La infección y sus consecuencias epidemiológicas dependen de la compleja interacción hospedero-patógeno, ambiente y factores micobacterianos. Con el descubrimiento de la secuencia genómica completa de la cepa H37Rv de *M. tuberculosis* (Cole and others, 1998), se ha dado pauta para comparar la secuencia genética de diferentes aislados y así definir la diversidad genética micobacteriana. Se creía que el Complejo de *Mycobacterium tuberculosis* (MTC) estaba constituido por un grupo de bacterias genéticamente conservado. Por lo que la mayoría de los estudios realizados, utilizaban cepas prototipo como H37Rv, CDC1551 o Erdman principalmente (Chan J, 1992; Manca and others, 2001).

1.6.1. Genoma de *Mycobacterium tuberculosis*

Con la secuenciación del genoma de la cepa prototipo *M. tuberculosis* H37Rv (Cole and others, 1998) se han alcanzado grandes progresos en la investigación de la tuberculosis. Se han generado nuevas expectativas y se han aclarado ciertas dudas de las características de la biología del bacilo tuberculoso, así como la complejidad de la pared celular, de ciertos genes relacionados con virulencia y persistencia, y la aparente estabilidad de su genoma. *M. tuberculosis* H37Rv posee una secuencia de 4,411,529 pb (Cole and others, 1998). Presenta un alto contenido de guaninas y citocinas (65% de G+C) de manera uniforme en todo su genoma, con algunas regiones con ligeras alteraciones en el contenido de G+C. Presenta un grupo de genes con un contenido muy alto de G+C (> 80%) que pertenece a la familia de

proteínas PE o PPE y que parecen únicas en la micobacteria. Por otro lado presenta pocos genes con un particular bajo contenido de G+C (< 50% G+C) y que codifican para proteínas transmembrana o poliquétidos sintasas, que se cree son consecuencia de aminoácidos hidrofóbicos esenciales en los dominios transmembrana que están codificados en estos codones con bajo contenido de G+C (Cole and others, 1998; Palomino JC, 2007).

Una de las características mas ampliamente estudiadas dentro del genoma de *M. tuberculosis* es la presencia y distribución de las secuencias de inserción (*IS*). En particular la secuencia *IS6110*, una secuencia de la familia *IS3* que ha sido ampliamente usada en epidemiología molecular y para tipificar cepas debido a su variación en los sitios de inserción y al número de copias dentro del genoma (van Embden JD, 1993). Todos las secuencias de inserción que se han encontrado en *M. tuberculosis* pertenecen a la familia *IS* descrita previamente (Chandler M, 2002).

Características	<i>M. tuberculosis</i>
Tamaño del genoma (pb)	4, 411,529
Genes que codifican proteínas	3927
G+C (%)	65%
Proteínas codificadas (%)	91.3%
Densidad de genes (bp/gene)	1114
Promedio longitud de genes	1012
tRNAs	45
rRNA operon	1

Tabla 3 . Principales características del genoma de *M. tuberculosis*. (Tomado de Marri, 2006)

La información obtenida de los estudios de secuenciación del genoma de *M. tuberculosis* es muy amplia y ha permitido identificar funciones de genes dentro del genoma. Por otro lado

ha dado la pauta para la secuenciación y comparación de diferentes cepas y aislados clínicos de *M. tuberculosis* (Fleischmann and others, 2002; Malik and Godfrey-Faussett, 2005).

Clase	Función biológica	Número de genes
0	Virulencia, detoxificación, adaptación	91
1	Metabolismo de lípidos	233
2	Rutas de información	229
3	Pared y procesos celulares	708
4	RNAs estables	50
5	Secuencias de inserción y phagos	149
6	Proteínas PE y PPE	170
7	Metabolismos intermediarios y respiración	894
8	Proteínas de función desconocida	272
9	Proteínas reguladoras	189
10	Proteínas hipotéticamente conservadas	1051

Tabla 4 . Función biológica de los genes de *M. tuberculosis*. Datos tomados de Fleischman, 2002

1.7. Epidemiología Molecular

La epidemiología molecular ha ayudado a tratar de entender la transmisión de la bacteria y ha sido herramienta importante para el control de la tuberculosis en los programas de salud pública. Los estudios de epidemiología molecular o huellas de DNA han demostrado la prevalencia de cepas en ciertas áreas geográficas, permitiendo preguntarnos acerca de los factores bacterianos involucrados en la patogénesis, el desarrollo de la enfermedad y su distribución global.

La utilización de técnicas modernas basadas en el estudio de microarreglos de DNA, la longitud del polimorfismo en los fragmentos de restricción (RFLP) y espoligotipo, utilizando todo el genoma micobacteriano (Friedman and others, 1997; García-García ML and Source, 2001; Sampson and others, 1999), han revelado una considerable variabilidad genética entre las cepas. Estas técnicas de epidemiología molecular han permitido la diferenciación de *M. tuberculosis* en cepas y familias. Las diferencias en la transmisibilidad y virulencia específica de las cepas se han relacionado con el fondo genético de los organismos (Malik and Godfrey-Faussett, 2005). Los re-arreglos en el cromosoma micobacteriano incluyendo deleciones, inserciones y duplicaciones son la base para la extensa variación genotípica. Dichos re-arreglos incrementan la virulencia ya sea por ganancia o pérdida de nichos de patogenicidad. Estas técnicas han permitido investigar las bases genéticas de la variabilidad y virulencia, así como sugerir genes candidatos que contribuyan a la patogenicidad de la micobacteria (Smith, 2003).

La identificación y caracterización de fragmentos de DNA repetidos en el cromosoma de *M. tuberculosis* ha mostrado polimorfismos entre diferentes cepas (Friedman and others, 1997; Sampson and others, 1999; van Soolingen and others, 1991) y ha permitido rastrear cepas específicas dentro de poblaciones abiertas (Barnes and others, 1997; Godfrey-Faussett and others, 2000; Small and others, 1994).

La secuencia de inserción IS6110 se ha propuesto como un importante agente de variación genómica (Sampson and others, 1999; Sampson and others, 2003). La transposición de IS6110 puede interferir en los fragmentos de lectura abierta, produciendo deleciones en el genoma micobacteriano. Se ha propuesto que las deleciones mediadas por las secuencias de inserción son un importante mecanismo que dirige la variación genómica micobacteriana (Sampson and others, 2003; van Soolingen and others, 1991).

IS6110 es una secuencia de inserción específica para el complejo de *M. tuberculosis* y su distribución dentro del cromosoma bacteriano se ha utilizado para tipificar cepas (Barnes and others, 1997; Cousins and others, 1998; Godfrey-Faussett and others, 2000; Sampson and others, 2004; Sampson and others, 1999; Sampson and others, 2003; Small and others, 1994; van Embden JD, 1993; van Soolingen and others, 1991). Este fragmento de inserción se presenta dentro de regiones intergénicas y por lo tanto, el patrón global de las huellas de DNA es poco probable que cambie o se asocie con cualquier diferencia funcional entre las cepas.

1.7.1. Métodos de análisis de epidemiología molecular

El análisis del polimorfismo en los fragmentos de restricción o RFLP (*restriction-fragment-length polymorphism*) utiliza la distribución de la secuencia de inserción IS6110 de diferentes cepas, para determinar el genotipo micobacteriano. Este método está basado en las diferencias en el número de copias (de 0 a cerca de 25) y la posición de las secuencias de inserción de IS6110, dentro del cromosoma micobacteriano (van Embden JD, 1993; van Soolingen and others, 1991).

Para los aislados sin copias de IS6110 o con un bajo número de éstas, la genotipificación basada en el RFLP-IS6110, no es suficiente para la identificación y discriminación de entre cepas, por lo que se han empleado otro tipo de metodologías (Kamerbeek and others, 1997). Los espoligotipos, el FAFLP (*Fluorescent Amplified-fragment length polymorphism*), las secuencias repetidas directas (DRs) o el polimorfismo de las secuencias ricas en GC (PGRS), son técnicas que se han empleado como métodos adicionales para tratar de discriminar entre patrones de RFLP-IS6110 muy parecidos (Barnes and Cave, 2003; Van Soolingen, 2001).

El espoligotipo (*spacer oligonucleotide typing*) es utilizado como un método alternativo para tipificar cepas con menos de 5 copias de IS6110. Está basado en el polimorfismo del locus DR (Repetidos Directos), el cual contiene un número variable de secuencias cortas repetidas intercaladas con secuencias cortas no repetidas dentro del cromosoma micobacteriano (Barnes and Cave, 2003). Las secuencias espaciadoras entre dos DRs están conservadas entre cepas y sólo difieren en la presencia o ausencia de espaciadores específicos; el patrón de espaciadores en una cepa es característico, de ahí que pueda ser utilizado para tipificar cepas del complejo *M. tuberculosis* (Friedman and others, 1997; van Soolingen and others, 1995).

El espoligotipo pone de manifiesto información genética más conservada por lo que permite clasificar a las cepas del complejo *M. tuberculosis* en subespecies, un ejemplo de esto son las cepas de la familia “Beijing” en donde solo están presentes los últimos 9 espaciadores (Braden and others, 1997; Filliol and others, 2002). A muchas de las cepas de *M. bovis* le faltan los espaciadores 39-43; sin embargo, a *M. bovis* BCG además le faltan los espaciadores 3, 9 y 16 (Braden and others, 1997; Friedman and others, 1997).

La estandarización de los métodos de genotipificación utilizando el RFLP de IS6110 y el espoligotipo basados en el polimorfismo de la región repetida directa del cromosoma de *M. tuberculosis*, ha permitido establecer bases de datos internacionales con los patrones de RFLP de aislados, de grandes áreas geográficas. Esto ha permitido realizar estudios de transmisión, establecer genotipos predominantes en áreas geográficas o trazar el origen de brotes en ciertas áreas (Barnes and others, 1997; Godfrey-Faussett and others, 2000; Sampson and others, 2004; Small and others, 1994).

La genotipificación ha permitido realizar estudios de transmisión, en áreas de baja incidencia, donde se pensaban que los casos eran debidos a una reactivación más que a una

transmisión reciente. Cuando se trata de una tuberculosis recurrente, la susceptibilidad del aislado original puede servir de guía para el tratamiento, ya que permite diferenciar si se trata de una reactivación o recaída (una infección con la misma cepa), o si se tratara de una cepa diferente implicaría una re-infección, por lo que se debe buscar el origen de ésta (Finch and others, 1991).

La genotipificación ha permitido evaluar la presencia de brotes recientes. En combinación con datos epidemiológicos, la genotipificación es útil para evaluar si se trata de un brote nuevo o solamente es una coincidencia de un gran número de casos. Estas estrategias pueden ayudar a tomar medidas de salud pública para reducir el riesgo de transmisiones (van Soolingen and others, 1995). En diversos estudios epidemiológicos se ha visto que los aislados de pacientes sin una aparente relación epidemiológica, presentan genotipos muy diversos, mientras que los genotipos de aislados de pacientes que fueron infectados por un origen común son idénticos (Barnes and others, 1997; Braden and others, 1997; Filliol and others, 2002; Garcia Garcia and others, 1995; Godfrey-Faussett and others, 2000; Small and others, 1994). Por lo tanto los casos de tuberculosis en “cluster” o conglomerados, se definen como aquellos en los cuales los aislados tienen un genotipo idéntico o estrechamente relacionado. En contraste, los casos en los cuales el genotipo es único representan la reactivación de una infección adquirida en el pasado (Small and others, 1994; Van Soolingen, 2001). Sin embargo, estos conceptos se deben interpretar con cuidado, y siempre acompañados de los datos epidemiológicos.

Los estudios de epidemiología molecular han ayudado demostrar la variabilidad geográfica de la dinámica de transmisión de la tuberculosis. De igual manera se ha visto que los sitios de reunión o convivencia social (centros comunitarios, cantinas, etcétera) son importantes focos de transmisión (Garcia-Garcia and others, 2000a; Genewein and others, 1993). Estos

estudios han ayudado a identificar poblaciones de alto riesgo y sitios de transmisión importantes para un efectivo control de la tuberculosis (Garcia-Garcia and others, 1999; van Soolingen and others, 1995).

Las nuevas herramientas de epidemiología molecular y las huellas de DNA nos han permitidos entender la dinámica de transmisión de la tuberculosis. La amplia diversidad genética entre las cepas de *M. tuberculosis* ha dado la posibilidad de que algunas de ellas presenten incrementada su capacidad de transmisión y resistencia a fármacos, permitiendo su dispersión alrededor del mundo.

La variabilidad genética entre aislados de *M. tuberculosis* es de reciente interés, se reportan cepas con diferencias genotípicas que inducen una respuesta inmune diferente durante el desarrollo de la enfermedad en ratones (Dormans and others, 2004; Lopez and others, 2003); por lo que estudiar cepas que presenten variabilidad genotípica dentro de una población específica es de vital importancia para tratar de entender y controlar la enfermedad.

1.8. Variabilidad genética de *Mycobacterium tuberculosis*

Las cepas de *M. tuberculosis* generalmente se han visto como igual de virulentas, sin embargo, la genotipificación de aislados de estudios de base poblacional, ha demostrado que un porcentaje importante de cepas se relacionan con una gran cantidad de casos de tuberculosis activa. Implicando que algunas cepas son más efectivas para diseminarse y transmitirse que otras, lo cual les permite tener ciertas ventajas biológicas. En un estudio realizado en la ciudad de New York entre 1991 y 1994 se registró un brote de tuberculosis, donde el 51% de los casos estaba asociado al genotipo C, estas fueron más resistentes a reactivos intermediarios del nitrógeno (RIN) que otras cepas, favoreciendo la sobrevivencia

dentro del macrófago y su diseminación en la ciudad (Friedman and others, 1997). Otra cepa causante de brotes importantes en los Estados Unidos es la CDC1551, esta cepa considerada de baja incidencia, produce altas concentraciones de citocinas pro-inflamatorias en monocitos al estimularlos con fracciones lipídicas (Manca and others, 1999) y los ratones infectados con esta cepa son incapaces de montar una respuesta inmune apropiada (Manca and others, 2001), por lo que se ha sugerido que las cepas de *M. tuberculosis* difieren en su capacidad de interactuar con el hospedero y por lo tanto, presentan diferente capacidad para transmitirse (Malik and Godfrey-Faussett, 2005).

Otra cepa de *M. tuberculosis* ampliamente estudiada es la familia Beijing, porque ha causado gran cantidad de brotes en todo el mundo. Desde sus primeros reportes en Beijing China hasta ahora, se ha encontrado una cepa predominante en Asia, América del Norte y Rusia. Los miembros de esta familia tienen la inserción de IS6110 en el origen de replicación del cromosoma micobacteriano, un patrón de espoligotipo específico aunque el patrón de RFLP puede cambiar (Bifani and others, 2002). La familia Beijing incluye a la cepa W que ha causado importantes brotes de tuberculosis asociados a multidrogo resistencia en el noreste de Estados Unidos, también a este grupo pertenece la cepa 210 prevalente en el sureste de Estados Unidos. Estas cepas presentan 16 sitios de inserción para IS6110 y esta inserción puede alterar la expresión de genes adyacentes, favoreciendo la dispersión de la cepa en la población. La amplia distribución de las cepas de la familia Beijing se piensa que ha sido a causa de la facilidad de formar aerosoles y poder establecer una infección más efectiva o desarrollar rápidamente enfermedad progresiva (van Soolingen and others, 1995). En un estudio con aislados de la familia Beijing en Vietnam, se vio que éstos eran más frecuentes en pacientes jóvenes que en pacientes viejos, sugiriendo que estas cepas habían sido transmitidas recientemente (Zhang and others,

1999). Por otro lado la cepa 210 puede evitar la defensa del hospedero más que otras cepas, al crecer rápidamente dentro de los macrófagos humanos (van Crevel and others, 2001).

La vacunación con BCG ha sido un factor que se piensa, ha favorecido dentro de las cepas de la familia Beijing la resistencia a fármacos, el incremento en la transmisión y la virulencia (van Soolingen and others, 1995). Sin embargo, existen estudios en los que se han comparado pacientes vacunados previamente con BCG y pacientes que no habían sido vacunados y no se ha encontrado asociación con la vacunación con BCG y las cepas Beijing (van Crevel and others, 2001). En esta familia se han encontrado altos rangos de resistencia a drogas antituberculosas en prisiones en Rusia y en refugios en Estados Unidos. Las mutaciones relacionadas a la resistencia a fármacos podrían estar incrementando la capacidad infectiva de la bacteria o lo que se ha llamado el *fitness bacteriano* (Cohen and others, 2003).

La cepa Beijing puede tener un mejor rango de transmisión, mejor capacidad de dispersarse y establecer infección entre personas, que otras cepas. Esta familia ha causado brotes recientes de tuberculosis y una rápida diseminación, lo que ha llevado a pensar que son infecciones de reciente transmisión (Anh and others, 2000). Los miembros de la familia Beijing también presentan una mejor capacidad infectiva, crecen rápidamente dentro de macrófagos, y experimentalmente se han asociado con mayor daño patológico en el tejido pulmonar, mayor neumonía y muerte que otras cepas del complejo *M. tuberculosis*. Se ha visto que presentan un perfil de citocinas tipo Th2, por lo tanto una respuesta inmune no protectora (Anh and others, 2000).

1.9. Modelo de tuberculosis pulmonar experimental en ratones BALB/c

La respuesta inmune contra la infección por *M. tuberculosis* ha sido ampliamente estudiada. La respuesta inmune en el humano y el ratón induce la activación de macrófagos a través de la expresión de citocinas de tipo Th1. Interferón – gamma (INF- γ) y el factor de necrosis tumoral - alfa (TNF- α) tienen un papel central en la activación del macrófago, así como la expresión de óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS) para la producción de óxido nítrico (ON) que participa en la muerte intracelular micobacteriana. En los ratones knock-out (KO) para el gene de iNOS, presentan mayor susceptibilidad a infección por patógenos intracelulares (Chan J, 1992), en los humanos aún no está clara su participación. La actividad protectora de la respuesta Th1 falla, si se induce la expresión de citocinas de tipo Th2 (Seah and others, 2000).

El modelo de tuberculosis pulmonar experimental murina se caracteriza por presentar dos etapas durante el desarrollo de la enfermedad: la fase aguda que corresponde al primer mes de infección, se distingue por infiltrado inflamatorio constituido por linfocitos y macrófagos en el intersticio alveolo-capilar, alrededor de vénulas y bronquios, con la formación de granulomas hacia la segunda semana de infección. Los granulomas constituidos por linfocitos y macrófagos se encuentran organizados en estructuras redondas y son fundamentales para la contención de los bacilos tuberculosos. Durante esta etapa los linfocitos Th1 productores de INF- γ e IL-2 y macrófagos activados productores de TNF- α e IL-1 se encuentran en el granuloma y en el infiltrado inflamatorio (Hernandez-Pando and others, 1997a; Hernandez-Pando and others, 1996). Durante esta fase los linfocitos Th1 presentan una elevada producción de INF- γ que activa a los macrófagos estimulándolos

para producir grandes cantidades de iNOS, lo que permite el control temporal de la enfermedad (Hernandez-Pando and others, 2001).

La iNOS genera gran producción de óxido nítrico (ON) que reacciona con radicales libres de oxígeno, generando peroxinitrilos, compuestos muy inestables que se asocian a proteínas, nitrosilándolas. Las proteínas nitrosiladas pierden su función lo que conlleva a la muerte celular (Hernandez-Pando and others, 2001). Por otro lado los macrófagos activados secretan IL-1 y TNF- α que contribuyen a activar a más macrófagos y estimulan la producción de IL-2 y su receptor, esta citocina al igual que INF- γ es producida por los linfocitos Th1 que inducen el reclutamiento celular, lo que contribuye a contener la infección (Hernandez-Pando and others, 1997a; Hernandez-Pando and others, 2001).

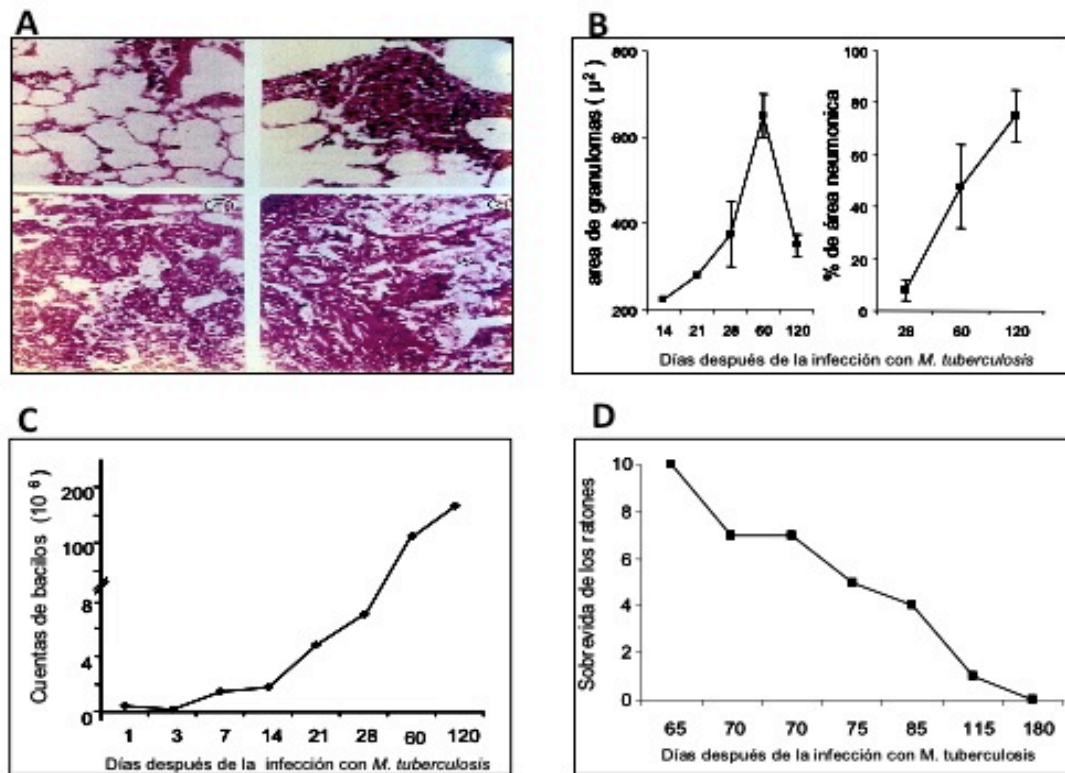


Fig 7. Tuberculosis pulmonar progresiva en ratones BALB/c. A) Imagen histológica de la fase temprana o aguda (inflamación y granulomas) y fase progresiva o crónica (neumonía, necrosis y fibrosis). B) Morfometría automatizada del tamaño y porcentaje de la superficie pulmonar afectada por neumonía a lo largo de la enfermedad. C) Determinación de unidades formadoras de colonias bacterianas en homogenizados pulmonares. D) curva de sobrevida de los animales durante el curso de la enfermedad. Tomado de Hernández-Pando, 2004

La segunda fase, crónica o progresiva de la enfermedad, es una etapa más avanzada caracterizada por neumonía progresiva, necrosis focal y fibrosis intersticial, con predominio de citocinas tipo Th2, alta producción de TGF- β , IL-4, 5, 6, 10 y 13, disminución progresiva de IL-1 y TNF- α , aumento de la carga bacilar pulmonar, supresión de la inmunidad celular, progresión de la enfermedad y muerte (Hernández-Pando R, 2004; Hernandez-Pando and others, 1997a; Hernandez-Pando and others, 1996; Hernandez-Pando and others, 1997b)

La IL-4 es una citocina inductora de diferenciación de linfocitos B productores de anticuerpos, considerados en la tuberculosis como no protectores. IL-4, 10 y 13 son citocinas antagonistas de las células Th1, por lo que se considera que los linfocitos Th2 durante la fase progresiva o crónica de la enfermedad pueden contrarrestar la actividad protectora de las células Th1 y desviar la inmunidad celular hacia inmunidad humoral, favoreciendo la progresión de la enfermedad (Hernández-Pando R, 2004). Por otro lado, los macrófagos al fagocitar bacterias se llenan de vacuolas que contienen lípidos bacterianos, principalmente lipoarabinomanano, que es un lípido de la pared micobacteriana que actúa inactivando a los macrófagos. Los macrófagos vacuolados disminuyen la producción de TNF α , IL-1 e iNOS y son importantes productores de citocinas antiinflamatorias y supresoras de la inmunidad celular como IL-10 y TGF- β (Hernandez-Pando and others, 1997a; Hernandez-Pando and others, 2001). TGF- β contribuye a generar fibrosis al ser inductora de proliferación fibroblástica y de la síntesis de colágena (Dheda and others, 2005). Por lo que la fase progresiva o crónica presenta importantes alteraciones inmunológicas que permiten el crecimiento bacteriano, como la actividad de linfocitos Th2 y macrófagos desactivados productores de citocinas supresoras de la inmunidad celular como TGF- β . Estas alteraciones permiten que la enfermedad progrese y genere extensas áreas neumónicas en el parénquima pulmonar y muerte por insuficiencia respiratoria (Hernández-Pando R, 2004; Hernandez-Pando and others, 1997a; Hernandez-Pando and others, 1996; Hernandez-Pando and others, 1997b; Hernandez-Pando and others, 2001).

Fase temprana o aguda	Fase progresiva o crónica:
<ul style="list-style-type: none"> • Inflamación mononuclear y granulomatosa. • Predominio de citocinas Th1. • Alta producción de IL-1 y TNF-α, IL-2, IL-12, INFγ. • Del día 1 al 21 post-infección 	<ul style="list-style-type: none"> • Neumonía progresiva, necrosis focal y fibrosis intersticial. • Predominio de citocinas Th2: IL-4, \uparrow TGF- β, \downarrowIL-1 y TNF • Aumento de la carga bacilar. • Supresión de la inmunidad celular. • Progresión de la enfermedad y muerte. • Del día 14 al 120 post-infección.

Tabla 5. Respuesta inmune en el modelo de tuberculosis pulmonar experimental en ratones.

2. Antecedentes del estudio epidemiológico.

Este estudio es parte un proyecto de investigación de vigilancia epidemiológica y de control de la tuberculosis en la Jurisdicción Sanitaria de Orizaba, Veracruz, México. El Estado de Veracruz cuenta con mas de 6 millones de habitantes, presenta un importante problema de tuberculosis, con altos rangos de morbilidad (23.5 casos por 100,000) y mortalidad (2.8 casos por 100,000) comparados con los rangos nacionales (13.4 casos por 100,000 y 1.84 casos por 100,000). El estado comprende 207 municipios, organizados en 11 jurisdicciones sanitarias. El estudio se llevó a cabo en la Jurisdicción Sanitaria de Orizaba, que comprende 5 municipios (Orizaba, Río Blanco, Nogales, Cuidad Mendoza e Ixtaczoquitlán) con una extensión de 261 km², con una población rural del 11%. (2009a; 2009b); (Anuarios de morbilidad 1997-2008, DGE, SSA. Cubos de Mortalidad 1997-2007. SINAIS, DGIS, SSA).

La población rural está dedicada principalmente a la agricultura, sin embargo, la principal economía del estado es la industria de textiles, papel, cemento, aceite y azúcar. A pesar de la industria, 13% de las familias viven en casas con pisos de tierra, 8% no tienen acceso a agua potable y 9% de la población es analfabeta.

Entre 1995 y 2008 se estudió a todas las personas residentes en el área de estudio con más de dos semanas de tos y con baciloscopia positiva o cultivo positivo de *Mycobacterium tuberculosis* en la expectoración. A todos los pacientes se les realizó una historia clínica, se les aplicó un cuestionario estandarizado y se les realizó una radiografía de tórax y una búsqueda de anticuerpos anti-VIH. Todos los pacientes fueron referidos a las instituciones de salud para recibir tratamiento antituberculoso de acuerdo con lo establecido por el Programa de Prevención y Control de la Tuberculosis. Como parte del estudio

epidemiológico se visitaron los domicilios de los pacientes en búsqueda de contactos, y en su caso aplicar su tratamiento de acuerdo a las normas vigentes. Entre 2000 y 2005 se llevó a cabo un estudio epidemiológico e inmunológico de contactos domiciliarios y comunitarios. De manera adicional, a todos los pacientes reclutados se les dio seguimiento para conocer su evolución clínica y el resultado hasta finalizar el tratamiento. Además se investigó el desarrollo de nuevos episodios de tuberculosis y en caso de fallecimiento se investigó la causa de la muerte (Garcia-Garcia and others, 1999; Jimenez-Corona and others, 2009).

3. Justificación

Al caracterizar de manera adecuada las diferencias genéticas que están relacionadas con la expresión de genes involucrados con la transmisibilidad, virulencia y manifestaciones clínicas, permitirá relacionarlos con factores patogénicos importantes del huésped proporcionando así información fundamental que permita proponer abordajes novedosos en la producción de nuevas vacunas y drogas para un mejor control de la enfermedad.

4. Hipótesis

La variabilidad genética de la bacteria esta relacionada con diferencias en virulencia y respuesta inmune del huesped.

5. Objetivos

El objetivo de este trabajo es correlacionar la información clínica y epidemiológica de un estudio realizado en la Ciudad de Orizaba, Veracruz, México, con las características genóticas de los aislados clínicos (RFLP, espoligotipos) y el tipo de enfermedad producida fundamentalmente en relación a virulencia y respuesta inmune, estudiada en un modelo experimental ampliamente caracterizado de tuberculosis pulmonar progresiva en ratones singénicos BALB/c infectados por vía intratraqueal.

Por otro lado evaluar la capacidad de las cepas o aislados clínicos para producir enfermedad y transmitirse, utilizando la carga bacilar de animales sanos y la respuesta de hipersensibilidad de tipo retardada (DTH) contra antígenos micobacterianos como marcadores de enfermedad y transmisión respectivamente, en un modelo experimental de transmisión basado en la convivencia de animales sanos e infectados.

6. Materiales y métodos

6.1. Selección de aislados clínicos de *Mycobacterium tuberculosis*

A partir de un estudio prospectivo de base poblacional, realizado entre marzo de 1995 y mayo 2003, en la ciudad de Orizaba, Veracruz, se reclutaron 8202 individuos con más de dos semanas de tos y con baciloscopia positiva o cultivo positivo de *Mycobacterium tuberculosis* en expectoración; a 667 pacientes con tuberculosis pulmonar, se les realizó cuestionario estandarizado, radiografía de tórax, anticuerpos anti-VIH y exámenes micobacteriológicos y moleculares. Todos los procedimientos microbiológicos, así como los procedimientos de tipificación molecular se realizaron de acuerdo a procedimientos estandarizados. De la mayoría de los pacientes se aisló el organismo infectante, el cual fue genotipificado por medio de la longitud del polimorfismo de los fragmentos de restricción (por sus siglas en inglés RFLP), espoligotipo y deligotipo. Se realizó la prueba de susceptibilidad antimicrobiana en los cultivos de todos los aislados.

También se realizó un seguimiento de contactos domiciliarios como parte del estudio epidemiológico, donde se visitaron los domicilios de los pacientes en búsqueda de contactos (Garcia-Garcia and others, 2000a; Garcia-Garcia and others, 2000b; Garcia-Garcia and others, 1999; Jimenez-Corona and others, 2006).

Principales características de pacientes y contactos		
Características	n/total	%
Pacientes		
Hombres	398/667	59.7
Edad en años(media, SD)	44.5	17.7
Educación básica terminada	350/664	52.7
HIV	16/632	2.5
Fiebre	435/667	65.2
Pérdida de peso	497/666	74.6
Hemoptisis	218/662	32.9
Cavitaciones en Rx de tórax	201/602	33.4
Sensibilidad a drogas		
Pan-sensible	527/665	79.2
Resistente a Isoniazida y Rifampicina	50/665	7.5
Otras resistencias	88/665	13.2
Consecuencias Clínicas		
Cura	472/586	80.6
Fallas	27/586	4.7
Abandonos	58/586	9.9
transferencias	9/586	1.5
Seguimientos		
Muerte por cualquier causa	65/667	9.7
Muerte por tuberculosis	42/667	6.3
Status del clúster		
Clúster	150/667	22.5
Únicas	502/667	75.3
Desconocidas	15/667	2.2
Contactos		
Hombres	322/777	41.4
Edad (Media, SD)	26.2	20.6
TST (Prueba de Tuberculina) positiva	351/779	45.1
TST (Prueba de Tuberculina) positiva entre individuos con familia relacionado con el caso índice	208/438	47.5
Tuberculosis activa durante el seguimiento	6/779	0.8

SD, desviación estándar

Tabla 6. Resumen de los criterios de selección los aislados

6.2. Selección de las cepas de estudio

Se definieron 4 grupos principales de aislados de pacientes, se tomaron en cuenta las características clínicas y epidemiológicas, conglomerados o grupos moleculares y reactividad al PPD entre los contactos domiciliarios, de los cuales seleccionamos 2 cepas para cada uno de los siguientes grupos:

1. ***Organismos altamente transmisibles***: seleccionamos aquellos aislados recuperados de pacientes que tenían alta proporción basal de reactividad a la tuberculina o alto intervalo de conversión al PPD entre sus contactos sanos. La cepa **9005186** pertenecía a un grupo o clúster de reciente transmisión (compartía genotipo con otros aislados y durante 1 año no tuvieron historial de viajes a otras regiones) y la cepa **3004245** tenía un genotipo único, que no fue parte de la cadena de transmisión (reactivación de la enfermedad).
2. ***Organismos de baja transmisibilidad***: seleccionamos aquellos aislados de pacientes que no producen enfermedad entre sus contactos (PPD negativo), sin casos secundarios de TB intrafamiliar. Para este tipo de experimentos seleccionamos una cepa que pertenecía a un grupo (cepa **2008920**) y otra cepa que fuera única en la población (cepa **1036226**).
3. ***Organismos con un corto periodo de latencia***: seleccionamos aquellos aislados recuperados de casos familiares con el caso índice bien definido y con casos de tuberculosis secundarios (causados por el mismo genotipo) y que fueran detectados dentro de los siguientes 2 años posteriores al caso índice y que no tuvieran datos clínicos sugestivos de tuberculosis activa. Seleccionamos una cepa que pertenecía a un grupo molecular (cepas **1015312**) y otra cepa que era única en la población (cepa **1020319**).

4. **Organismos con un largo periodo de latencia:** seleccionamos dos distintos aislados que fueran monoresistentes a estreptomycin. Este antibiótico no fue utilizado para tratar la tuberculosis en los últimos 25 años en esta área geográfica en particular y sólo fue utilizado para tratar otras condiciones médicas. Ambos pacientes sin relación alguna. Las cepas eran únicas en la población (Cepas **09985449** y **2013094**).

Aislados clínicos	IS6110 RFLP	Enfer asociada	BCG	Cavitación Rx	Gravedad clínica	SIRE	Reactividad		Conversión	
							#/tot	%	#/tot	%
Alta transmisibilidad							#/tot	%	#/tot	%
9005186	grupo (17)	NO	NO	ND	G	SSSS	12/22	54.5	2/8	25
3004245	unica	NO	SI	NO	M	SSSS	5/8	62.5	3/3	100
Baja transmisibilidad										
1036226	unica	NO	NO	NO	M	SRSS	0/4	0	0/4	0
2008920	grupo (3)	NO	SI	SI	M	SSSS	2/9	22.2	0/6	0
Periodo de latencia corta										
1015312	grupo (3)	NO	NO	NO	M	SSSS	4/5	80	0/1	0
1020319	grupo (3)	NO	SI	SI	M	SRSS	0/4	0	0/4	0
Periodo de latencia larga										
9985449	cluster (11)	NO	NO	SI	M	RSSS	3/6	50	0/4	0
2013094	unica	NO	NO	NO	M	RSSS	1/3	33.3	ND	ND

Tabla 7. Características clínicas y epidemiológicas de los aislados seleccionados para el estudio. RFLP basado en IS 6110, entre paréntesis tamaño del grupo; Enfermedad asociada: Diabetes, VIH-SIDA, etc.; BCG: vacunación con *Bacillus Calmette-Guérin*; Cavitación Rx: diagnóstico por radiografía de tórax; SIRE: Estreptomycin, Isoniazida, Rifampicina, Etambutol; ND: No Determinado.

6.3. Cultivo de aislados y preparación del inóculo.

El crecimiento de las bacterias se realizó en caldo de cultivo Middlebrook 7H9 (Difco, Detroit, MI USA) enriquecido con glicerol y albúmina, catalasa y dextrosa (Becton Dickinson, Cockysville MD, USA) e incubados en agitación constante a 37°C y 5% de CO₂ durante 21 días. El crecimiento fue monitoreado por densitometría. Tan pronto como los cultivos alcanzaron la fase exponencial de crecimiento (Densidad óptica 600 nm = 1) los bacilos fueron cosechados y se ajustó la concentración a 2.5 x 10⁵ bacilos viables por mililitro de solución salina, determinados por la incorporación de diacetato de fluoresceína (Jarnagin and Luchsinger, 1980) y almacenados a -70°C hasta su uso.

6.4. Modelo de tuberculosis pulmonar experimental en ratones BALB/c

Para evaluar la virulencia y la respuesta inmune inducida por cada uno de los aislados, se utilizaron ratones machos de la cepa BALB/c de 6 a 8 semanas de edad. Para inducir la tuberculosis pulmonar, los ratones fueron anestesiados con sevoflurano e inoculados con 2.5 x 10⁵ bacilos en 100 µl de PBS por vía intratraqueal (Hernandez-Pando and others, 1997a; Hernandez-Pando and others, 1996; Hernandez-Pando and others, 1997b). Después de suturar la incisión, los ratones infectados fueron puestos en posición vertical hasta que pasara el efecto de la anestesia. Se formaron 9 grupos de 70 ratones; cada grupo fue infectado con uno de los 8 diferentes aislados clínicos de *M. tuberculosis* y uno más con H37Rv como control; los 20 ratones de cada grupo fueron aislados para llevar un control de la sobrevivencia a partir del día 8 y hasta el día 120 post infección. En los días 1, 3, 7, 14, 21, 28, 60 y 120 post infección, sacrificamos a 6 animales de cada grupo por exanguinación. Perfundimos con etanol absoluto el pulmón derecho o izquierdo de cada ratón para su

estudio histopatológico. El otro pulmón fue congelado en nitrógeno líquido y almacenado a -70°C para su estudio microbiológico y análisis inmunológico (Hernandez-Pando and others, 1997a; Hernandez-Pando and others, 1996; Hernandez-Pando and others, 1997b).

Todos los procedimientos se realizaron en gabinetes de bioseguridad clase II y en cuartos de trabajo con bioseguridad nivel III. Los animales infectados se mantuvieron en cajas para animales con micro-aisladores conectados a presión negativa. El trabajo con los animales se realizó de acuerdo con el comité de ética institucional y a las regulaciones nacionales de cuidado animal y experimentación.

6.5. Preparación del tejido pulmonar para análisis histopatológico y morfométrico

El pulmón izquierdo o derecho de cada uno de los ratones sacrificados, fue fijado por perfusión intratraqueal con etanol absoluto por 24 horas, se seccionó a través del hilio pulmonar y se embebió en parafina. El análisis histo-morfológico se hizo por medio de una tinción de hematoxilina – eosina en cortes de 5 µm de cada uno los pulmones obtenidos. El porcentaje de área pulmonar afectada por neumonía fue determinado con un analizador de imágenes automatizado (Q Win Leica, Milton Keynes) (Hernandez-Pando and others, 1997a; Hernandez-Pando and others, 1996; Hernandez-Pando and others, 1997b).

6.6. Determinación de unidades formadoras de colonias (UFC) en los pulmones infectados.

El pulmón derecho o izquierdo de cuatro ratones de cada uno de los tiempos de sacrificio de dos diferentes experimentos se usaron para la determinación de las unidades formadoras

de colonias (UFC). Los pulmones se homogeneizaron con un politrón (Kinematica, Luzern, Suiza) en 1 ml de solución salina isotónica estéril. Se hicieron 4 diluciones de cada uno de los homogeneizados y se sembraron por duplicado en placas de agar Bacto Middlebrook 7H10 (Difco Lab code 0627-17-4, Difco Labs, Detroit, MI) enriquecidos con ácido oleico, albúmina, catalasa y dextrosa. Se incubaron a 37°C y 5% de CO₂, el número de colonias fue contado después de 14 y 21 días (Dormans and others, 2004; Infante and others, 2005).

6.7. Análisis de citocinas por PCR en tiempo real de los homogeneizados pulmonares

Los pulmones derecho o izquierdo de tres diferentes ratones por grupo de dos diferentes experimentos fueron utilizados para aislar RNAm con el RNeasy Mini Kit (Quiagen), de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. La calidad y cantidad de RNA fue evaluado por medio de espectrofotometría (260/280 *nm*) y por electroforesis en geles de agarosa. Para la transcripción reversa del RNAm se utilizaron 5 µg de RNA total, oligo-dT y el Kit Omniscript (Quiagen). La PCR en tiempo real se realizó con el sistema Quantitect SYBR Green Mastermix kit (Qiagen) en el termociclador 7500 Real Time PCR system (Applied Biosystems, USA). Se cuantificaron y diluyeron curvas control para cada una de las citocinas, así como controles negativos para cada una de las corridas de PCR. Se diseñaron oligonucleótidos específicos empleando el programa Primer Express (Applied Biosystems, USA) para las siguientes citocinas:

Gene	Iniciador sentido	Iniciador antisentido
Gliceraldehído-3-phosphato dehidrogenasa (G3PDH)	5'-cattgtggaaggctcatga-3'	5'-ggaaggccatgccagtgagc-3'
Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α):	5'-tgtggcttcgacctctacctc-3'	5'-gccgagaaggctgcttg-3'
Interferón gamma (IFN- γ):	5'-ggtgacatgaaaatcctgcag-3'	5'-cctcaaactggcaatactcatga-3'
Interleucina 4 (IL-4):	5'cgctctcacagcaacggaga 3'	5'gcagcttatcgatgaatccagg 3'

Tabla 8. Secuencia de oligonucleótidos utilizados en la PCR en tiempo real.

Las condiciones en el termociclador fueron las siguientes: desnaturalización inicial a 95°C por 15 min, 40 ciclos de 95°C por 20sec, 60°C por 20 sec, 72°C por 34 sec. La cantidad de ARNm específico en la muestra fue cuantificado de acuerdo a la curva estándar de su gen correspondiente. El número de copias de ARNm de cada citocina fue relacionado a un millón de copias de ARNm que codifica para el gene G3PDH (Infante and others, 2005).

6.8. Modelo Experimental de transmisibilidad de *Mycobacterium tuberculosis* en ratones BALB/c.

Para evaluar la transmisión de cada uno de los aislados seleccionados, tratamos de reproducir el estrecho contacto que se da entre los pacientes con tuberculosis y sus contactos domiciliarios en los ratones BALB/c. Para lo cual infectamos por vía intratraqueal 5 ratones con los aislados seleccionados y convivieron en el mismo microaislador desde el primer día de infección con 5 ratones sanos no infectados (contactos sanos). Para determinar si los ratones sanos fueron infectados por los ratones enfermos de tuberculosis, sacrificamos a 3 ratones sanos después de 30 y 60 días de contacto y convivencia, obtuvimos el pulmón perfundido con etanol absoluto para su estudio

histopatológico y otro se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido para determinar carga bacilar a través de unidades formadoras de colonias (UFC), como se describió previamente para el modelo de tuberculosis experimental murina.

Para tratar de reproducir la prueba de tuberculina en piel o PPD, a los ratones sanos se les realizó una prueba de hipersensibilidad de tipo retardada (DTH) contra antígenos micobacterianos totales de medio cultivo. Para lo cual, se recuperó el medio de cultivo donde creció *M. tuberculosis* durante 4-5 semanas, se filtró y precipitó con sulfato de amonio al 45% (peso/volumen), se lavó y se disolvió en PBS. Para evaluar la DTH, se aplicó por vía subcutánea a cada ratón 20µg de antígeno en 40µl de PBS en el cojinete plantar de la pata izquierda. Se tomaron medidas del cojinete plantar con un micrómetro de precisión antes y 24 horas después de la aplicación del antígeno (Infante and others, 2005).

6.9. Análisis estadístico

Para analizar estadísticamente las curvas de supervivencia se utilizó la prueba de Long Rank y Kaplan-Meier. Para determinar la significancia estadística de las unidades formadoras de colonias (UFC), histopatología y expresión de citocinas se utilizó la prueba *t- Students*, paramétrica, de dos colas de distribución. Considerando significativa una $p < 0.05$.

7. Resultados

Con los modelos de virulencia y transmisibilidad utilizados y descritos previamente en materiales y métodos, infectamos ratones por vía intratraqueal con los aislados seleccionados del estudio epidemiológico previo. Con base en los resultados obtenidos, clasificamos los aislados clínicos en 4 fenotipos según los resultados inmunopatológicos.

Fenotipo 1. Cepas o aislados incapaces de inducir una respuesta inmune protectora y muestran incremento en la virulencia y transmisibilidad.

La cepa 9005186 representa claramente esta categoría. Los ratones BALB/c infectados con esta cepa empiezan a morir después de la semana 3 post infección y para la semana 5 post infección alcanzan el 100% de mortalidad (Fig. 8A). Esta cepa se duplica rápidamente en el pulmón. Los animales infectados con esta cepa presentan dos veces más UFC al día 21 de infección, que los animales infectados con la cepa control H37Rv (Fig. 8B) y produce significativamente mayor área neumónica (68.8% de área pulmonar afectada por neumonía) al día 28 post infección que los infectados con H37Rv (30% de neumonía) (Fig. 8C).

En comparación con los ratones infectados con H37Rv, los infectados con la cepa 9005186, presentaron una inducción retardada de la expresión de IFN- γ , alta y rápida expresión de IL-4, pero la expresión de TNF- α aunque alta fue transitoria, casi 10 veces más que H37Rv durante la primera semana post infección (Fig. 9 A,B,C). En general estos resultados indican que esta cepa es muy virulenta, incapaz de inducir una respuesta inmune protectora eficiente en nuestro modelo animal de tuberculosis.

En el estudio de transmisibilidad basado en el estrecho contacto de animales sanos y animales infectados, mostró que esta cepa es altamente transmisible. Los pulmones de los ratones sanos que estuvieron en contactos con los animales infectados mostraron tres veces más UFC que los contactos sanos de los animales infectados con H37Rv después de 1 mes y cuatro veces más UFC después de 2 meses de contacto (Fig. 10A). La DTH o respuesta de hipersensibilidad retardada fue significativamente mayor a los 30 días de contacto (Fig 10B). Estos resultados correlacionaron con la información clínico epidemiológica, la cual mostró que este aislado fue parte de un gran grupo, 17 casos en la comunidad, con un alto porcentaje de conversiones (2/8, 25%) entre los contactos domiciliarios (Tabla 7).

Virulencia Fenotipo 1

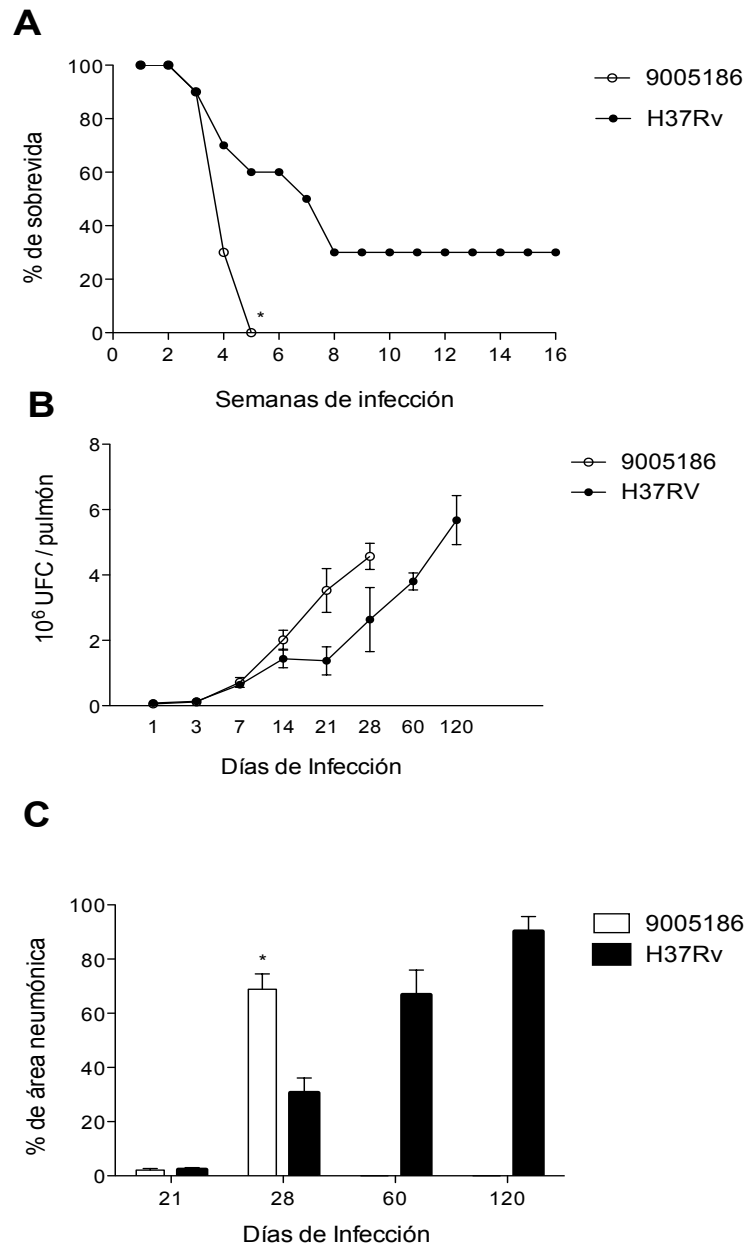


Fig 8. **Virulencia fenotipo 1.** A) Porcentaje de supervivencia producidos por el aislado 9005186 y la cepa H37Rv de *Mycobacterium tuberculosis* en ratones BALB/c infectados por vía intratraqueal. * Diferencias significativas con un valor de $p < 0.05$, al compararse con los ratones infectados con la cepa H37Rv con la prueba estadística Kaplan-Meier. B) Cinética de la carga bacilar o unidades formadoras de colonias UFC, C) Porcentaje de área pulmonar afectada por neumonía. En las gráficas se presentan la media y desviación estándar de los datos. * Diferencias significativas con un valor de $p < 0.05$, cuando se compara con los ratones infectados con la cepa H37Rv.

Respuesta Inmune Fenotipo 1

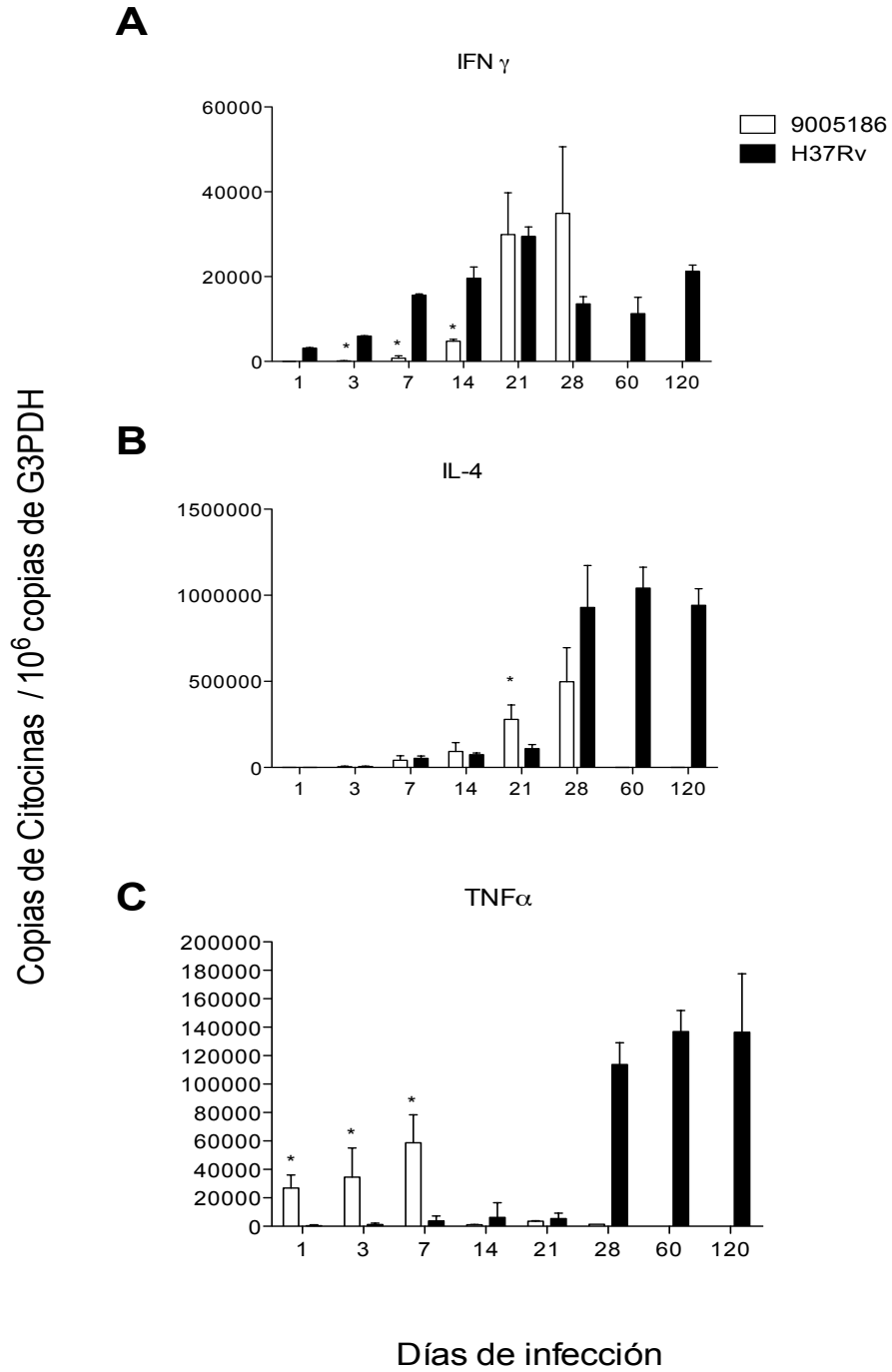


Fig 9. **Respuesta inmune fenotipo 1**. Expresión de genes de citocinas por RT-PCR en tiempo real en los pulmones infectados. A) expresión de interferón- γ (IFN- γ), B) interleucina -4 (IL-4) y C) factor de necrosis tumoral- α (TNF- α). En las gráficas se presentan la media y desviación estándar de los datos. * Diferencias significativas con un valor de $p < 0.05$, cuando se compara con los ratones infectados con la cepa H37Rv.

Transmisibilidad Fenotipo 1

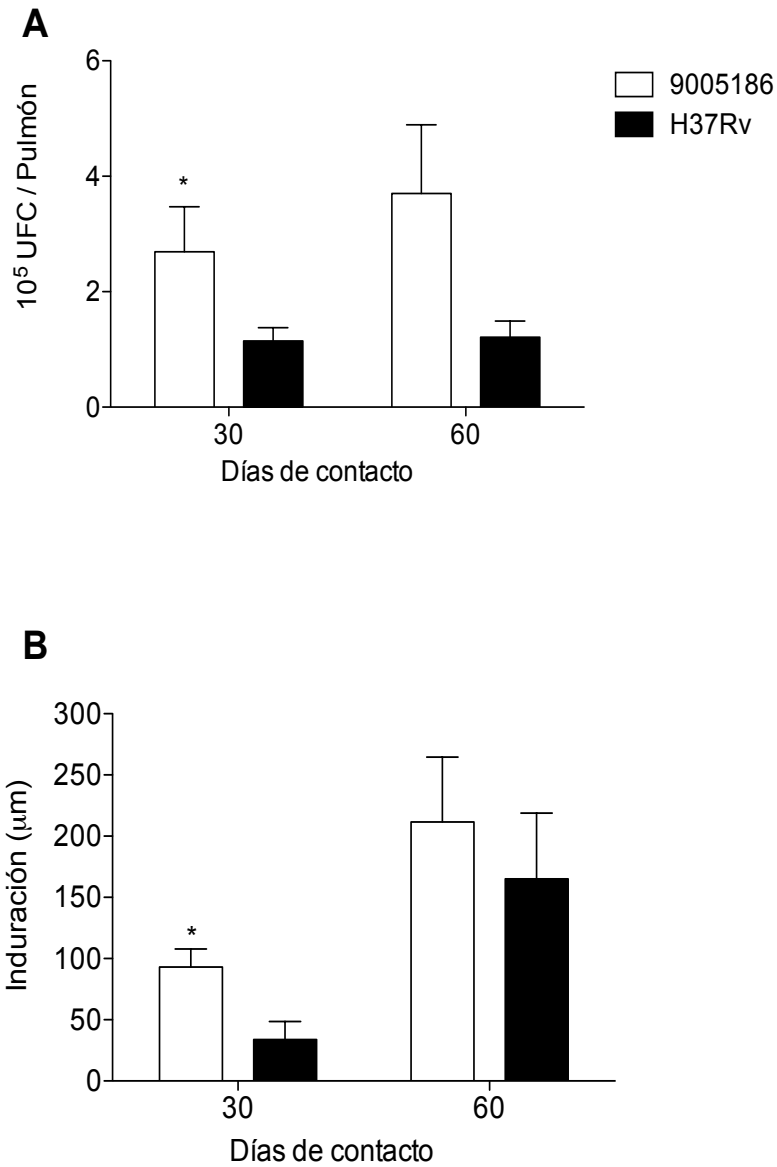


Fig 10. **Modelo de transmisibilidad.** Carga bacilar pulmonar en animales con infección natural después de la convivencia durante 1 y 2 meses con ratones infectados con el aislado 9005186 y la cepa control H37Rv. A) carga bacilar o UFC (unidades formadoras de colonias) y B) Respuesta de hipersensibilidad retardada o DTH. En las gráficas se presentan la media y desviación estándar de los datos. * Diferencias significativas con un valor de $p < 0.05$, cuando se compara con los ratones infectados con la cepa H37Rv.

Fenotipo 2. Cepas o aislados que inducen una baja respuesta de citocinas inflamatorias y muestran incremento en la virulencia.

Los ratones infectados con la cepa 1020319 mostraron 100% de mortalidad después de 9 semanas post infección (Fig. 11A), 62% de área pulmonar afectada por neumonía (Fig. 11C), pero similar carga bacilar que los ratones infectados con H37Rv (Fig. 11B). Los animales infectados con esta cepa en comparación con los infectados con la cepa control H37Rv, inducen mayor expresión de INF- γ durante la fase tardía de la enfermedad (Fig. 12 A), altos niveles de expresión de TNF- α durante todo el experimento (Fig. 12 C) y niveles muy bajos de expresión de IL-4 e IL-10 (Fig. 12 B, D).

Los animales sanos que estuvieron en contacto con los animales infectados con la cepa 1020319 mostraron similar carga bacilar (Fig.13A), pero una respuesta a la DTH significativamente mayor después de 1 mes de contacto (Fig. 13B), cuando se compara con los animales sanos que estuvieron en estrecho contacto con los animales infectados con la cepa control H37Rv, sin embargo a los 2 meses no hay diferencia.

Dentro de la información clínico epidemiológica de este aislado, tenemos que es un aislado de latencia corta, pertenece a un grupo pequeño de 3 miembros dentro de la comunidad y provoca enfermedad activa en los contactos domiciliarios en los primeros 2 años posteriores al diagnóstico del caso índice (Tabla 7).

Virulencia Fenotipo 2

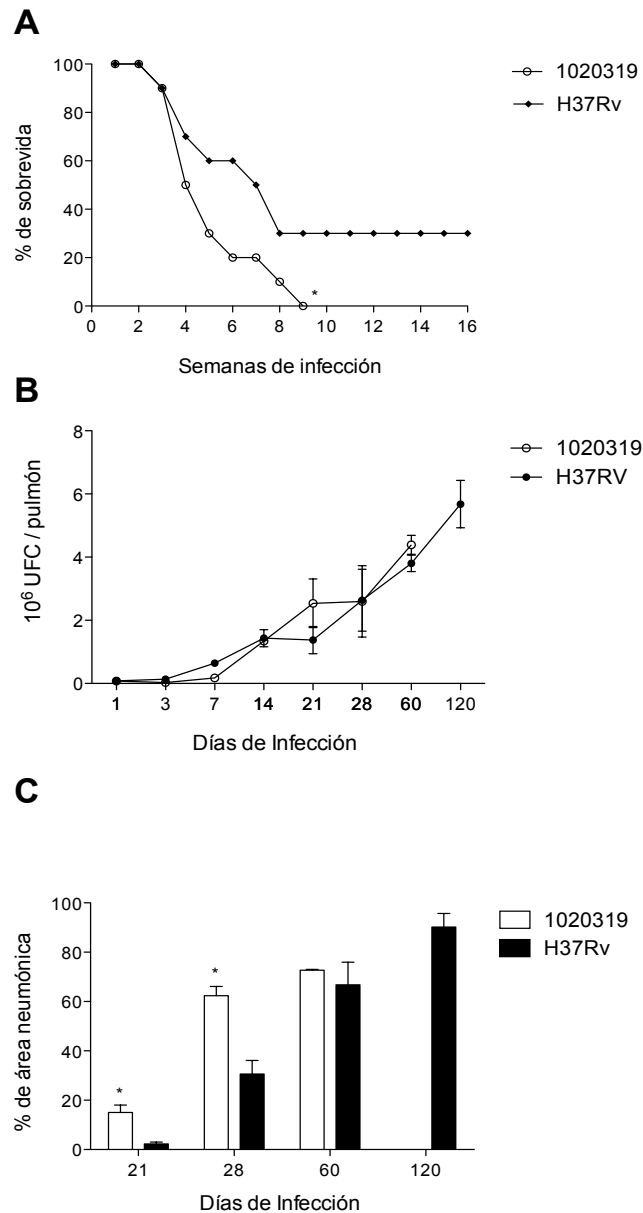


Fig 11. **Virulencia fenotipo 2.** A) Porcentaje de supervivencia producidos por el aislado 1020319 y la cepa H37Rv de *Mycobacterium tuberculosis* en ratones BALB/c infectados por vía intratraqueal. * Diferencias significativas con un valor de $p < 0.05$, cuando se compara con los ratones infectados con la cepa H37Rv con la prueba estadística Kaplan-Meier. B) Cinética de la carga bacilar o unidades formadoras de colonias UFC, C) Porcentaje de área pulmonar afectada por neumonía. En las gráficas se presentan la media y desviación estándar de los datos. * Diferencias significativas con un valor de $p < 0.05$, cuando se compara con los ratones infectados con la cepa H37Rv.

Respuesta Inmune Fenotipo 2

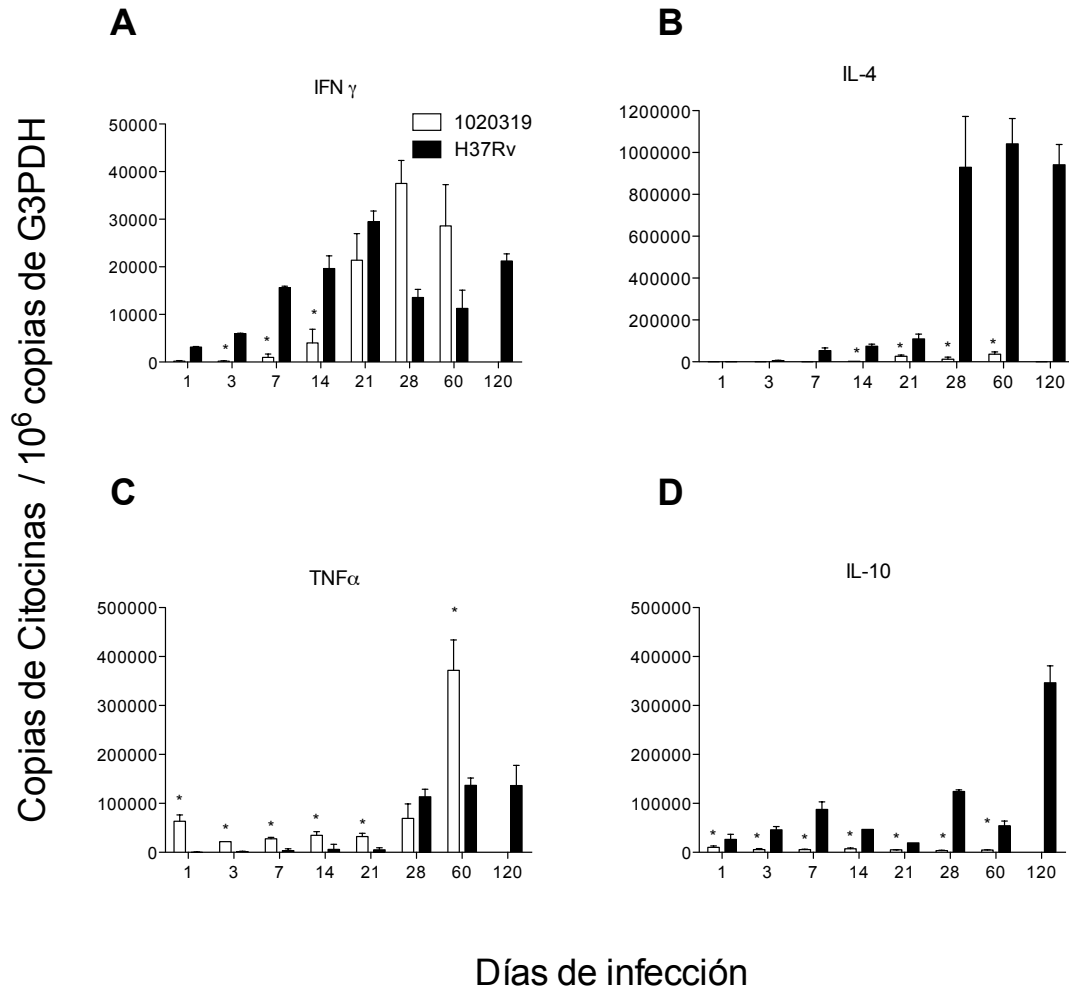


Fig 12. **Respuesta inmune fenotipo 2**. Expresión de genes de citocinas por RT-PCR en tiempo real en los pulmones infectados con el aislado 1020319 y la cepa control H37Rv. A) expresión de interferon- γ (IFN- γ), B) interleucina-4 (IL-4), C) factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) y D) interleucina-10 (IL-10). En las gráficas se presentan la media y desviación estándar de los datos. * Diferencias significativas con un valor de $p < 0.05$, cuando se compara con los ratones infectados con la cepa H37Rv.

Transmisibilidad Fenotipo 2

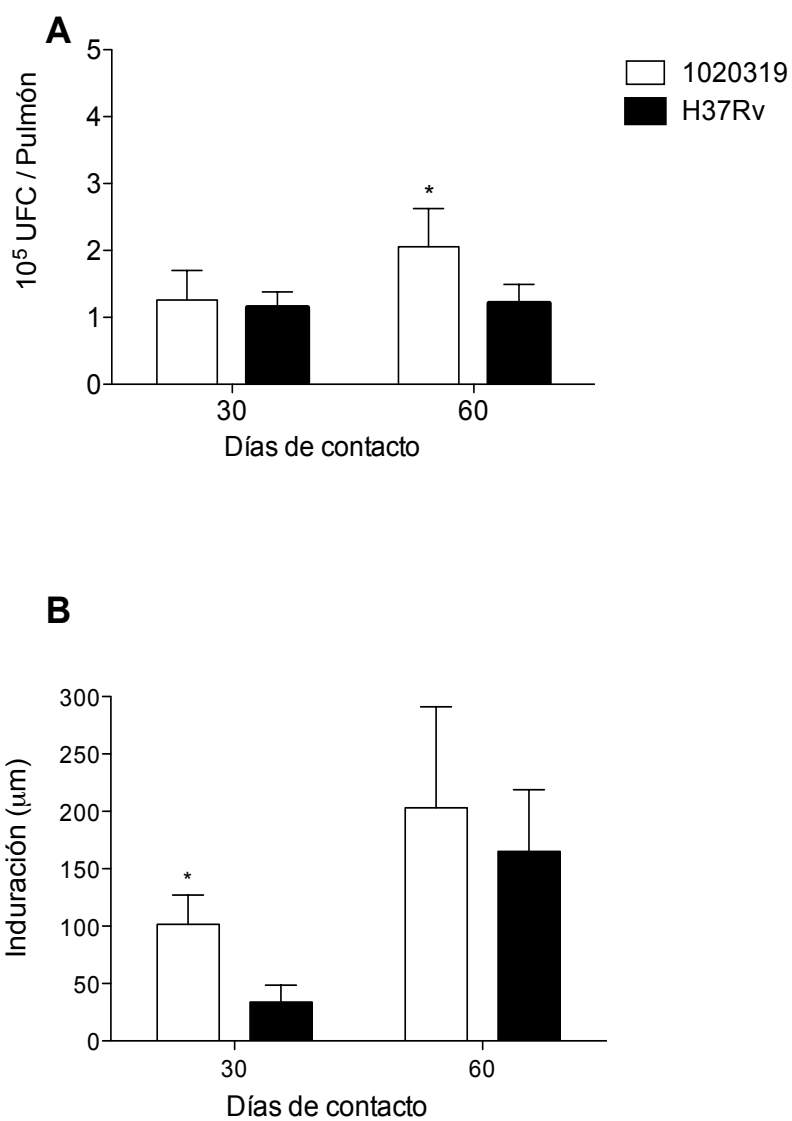


Fig 13. **Modelo de transmisibilidad.** Carga bacilar pulmonar en animales con infección natural después de la convivencia durante 1 y 2 meses con ratones infectados con el aislado 9005186 y la cepa control H37Rv. A) Carga bacilar o unidades formadoras de colonias UFC y B) Respuesta de hipersensibilidad retardada o DTH. En las gráficas se presentan la media y desviación estándar de los datos. * Diferencias significativas con un valor de $p < 0.05$, cuando se compara con los ratones infectados con la cepa H37Rv.

Fenotipo 3. Cepas o aislados que inducen una fuerte respuesta inmune protectora durante la fase temprana de infección y muestran menor virulencia.

Los animales infectados con la cepa 2008920 presentan una sobrevivencia del 70%, los animales infectados con la cepa control H37Rv del 30%, a las 16 semanas post infección (Fig. 14 A). Esto coincide con la baja carga bacilar y menor área pulmonar afectada por neumonías a los 4 meses post infección (Fig. 14 B,C). La expresión de citocinas en los pulmones infectados mostró que esta cepa induce alta expresión de INF- γ durante la primera semana de infección en comparación con los pulmones de los animales infectados con H37Rv, y esta se mantiene durante la fase progresiva de la enfermedad (Fig.15 A). La interleucina-4 presentó bajos niveles de expresión (Fig.15 B), mientras TNF- α fue significativamente mayor durante la fase temprana y tardía de la enfermedad (Fig. 15 C). Esta cepa fue menos virulenta y estimula una eficiente respuesta inmune celular protectora. La carga bacilar en los pulmones de los animales contacto fue similar a la que producen los animales sanos que estuvieron en contacto con los animales infectados de la cepa control H37Rv (Fig. 16A), pero la respuesta a la DTH fue significativamente mayor después de 1 mes de contacto (Fig. 16B). Esta cepa fue descrita como pobremente transmisible, los contactos domiciliarios de los pacientes con tuberculosis que presentaban esta cepa, fueron PPD negativos y no convirtieron durante el seguimiento. Esta cepa pertenecía a un grupo pequeño de tres miembros dentro de la comunidad (Tabla 7).

Virulencia Fenotipo 3

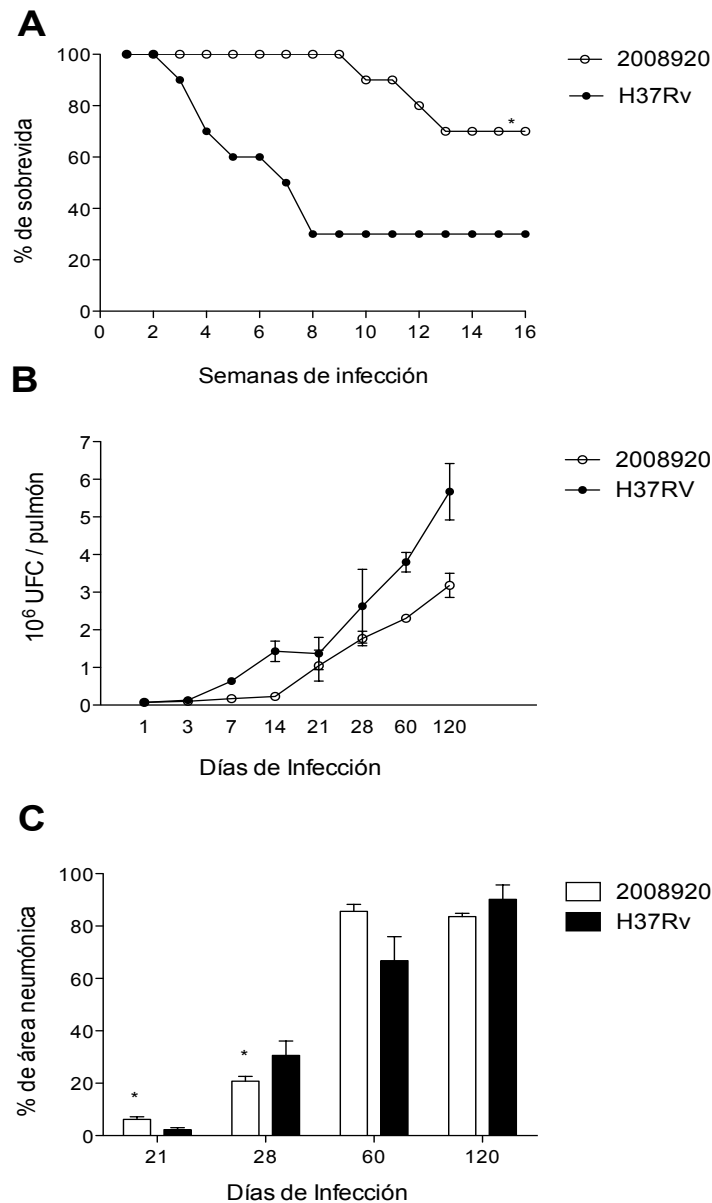


Fig 14. **Virulencia fenotipo 3.** A) Porcentaje de supervivencia producidos por el aislado 2008920 y la cepa H37Rv de *Mycobacterium tuberculosis* en ratones BALB/c infectados por vía intratraqueal. * Diferencias significativas con un valor de $p < 0.05$, cuando se compara con los ratones infectados con la cepa H37Rv con la prueba estadística Kaplan-Meier. B) Cinética de la carga bacilar o unidades formadoras de colonias UFC, C) Porcentaje de área pulmonar afectada por neumonía. En las gráficas se presentan la media y desviación estándar de los datos. * Diferencias significativas con un valor de $p < 0.05$, cuando se compara con los ratones infectados con la cepa H37Rv.

Respuesta Inmune Fenotipo 3

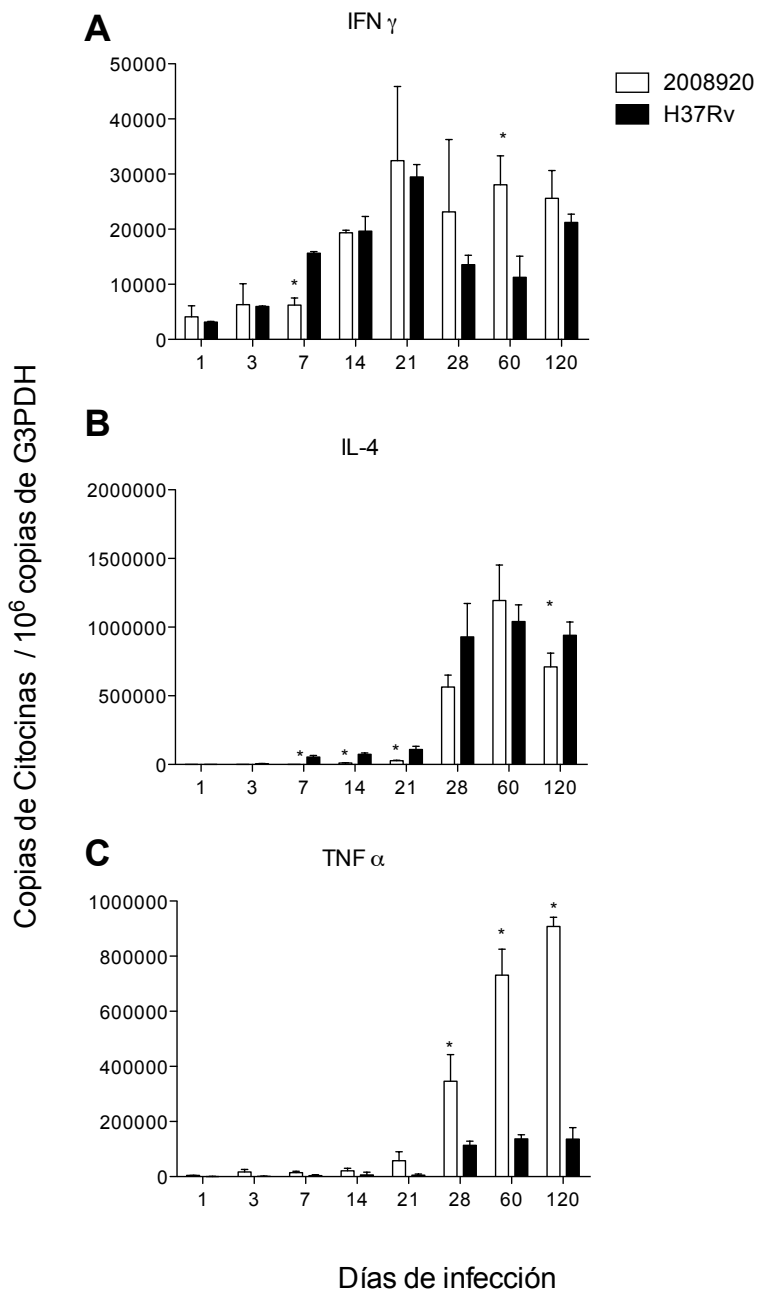


Fig 15. **Respuesta inmune fenotipo 3**. Expresión de genes de citocinas por RT-PCR en tiempo real en los pulmones infectados con el aislado 2008920 y la cepa control H37Rv. A) expresión de interferón- γ (IFN- γ), B) interleucina -4 (IL-4) y C) factor de necrosis tumoral- α (TNF- α). En las gráficas se presentan la media y desviación estándar de los datos. * Diferencias significativas con un valor de $p < 0.05$, cuando se compara con los ratones infectados con la cepa H37Rv.

Transmisibilidad Fenotipo 3

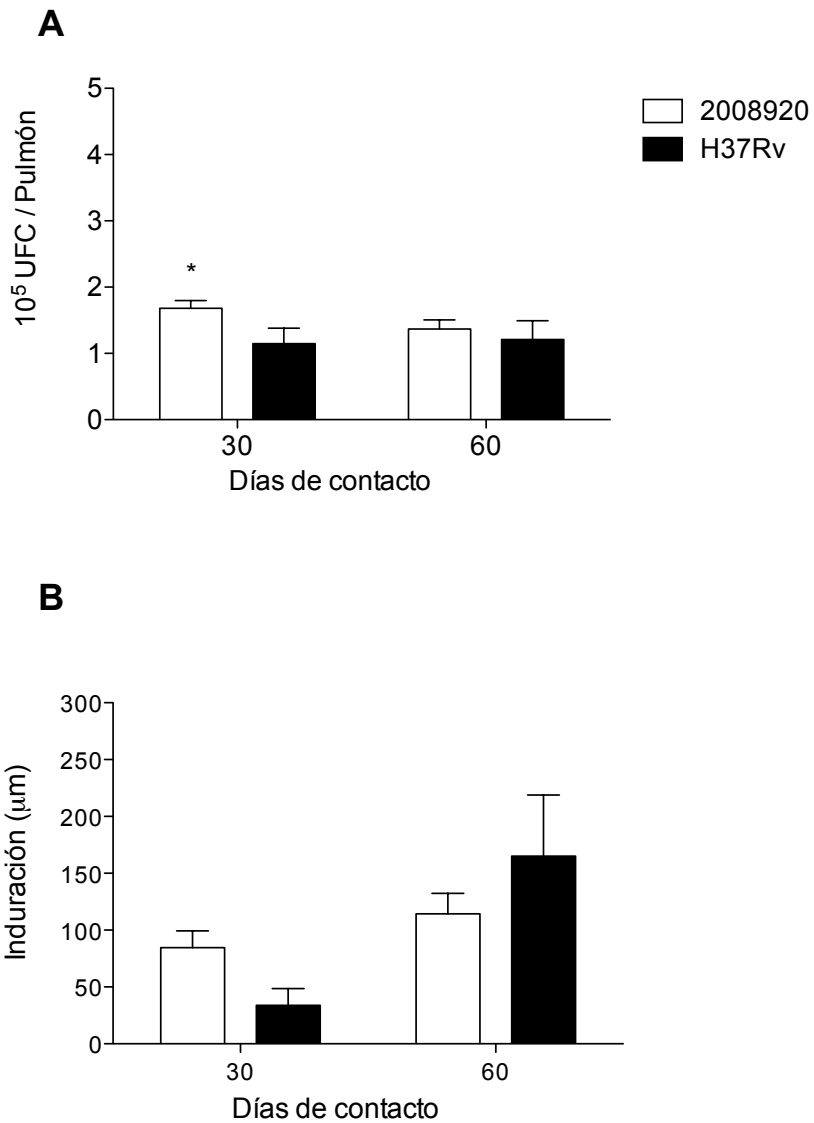


Fig 16. **Modelo de transmisibilidad.** Carga bacilar pulmonar en animales con infección natural después de la convivencia de 1 y 2 meses con ratones infectados con el aislado 2008920 y la cepa control H37Rv. A) carga bacilar o unidades formadoras de colonias UFC, B) Respuesta de hipersensibilidad retardada o DTH. En las gráficas se presentan la media y desviación estándar de los datos. * Diferencias significativas con un valor de $p < 0.05$, cuando se compara con los ratones infectados con la cepa H37Rv.

Fenotipo 4. Cepas o aislados que eventualmente inducen una respuesta inmune adquirida y menor virulencia.

Varias cepas mostraron este fenotipo. Por ejemplo, la cepa 9985449 fue clasificada como un aislado de latencia larga a partir de los datos clínico epidemiológicos. Los animales infectados con esta cepa mostraron un incremento del 90% en el rango de supervivencia después de las 16 semanas de infección (Fig. 17A), con menor carga bacilar y menor área pulmonar afectada por neumonía que los animales infectados con la cepa control H37Rv durante la infección (Fig. 17B, C). Durante la fase temprana de infección (el primer mes) y en comparación con H37Rv, esta cepa induce menores niveles de expresión de INF- γ , sin embargo, durante la fase progresiva de la infección se produce un incremento sostenido de la expresión de esta citocina (Fig. 18A). La expresión de TNF- α fue alta desde el primer día de infección (Fig. 18C), con significativamente bajos niveles de expresión de IL-4 (Fig. 18B). Las cepas 1015312, 1036226, 3004245 y 2013094 producen un fenotipo inmune similar en los ratones infectados con la cepa 9985449 (Figs. 17 y 18).

En los experimentos de transmisión, los animales sanos que estuvieron en contacto con los animales infectados con estas cepas, mostraron similar carga bacilar que los contactos sanos de los animales infectados con la cepa control H37Rv (Fig. 19A). La respuesta a las DTH fue similar después de 1 mes de contacto (Fig. 19B). De las cinco cepas que presentan este fenotipo, la cepa 1036226 y 2013094 fueron aislados de pacientes con contactos domiciliarios con prueba a la tuberculina negativa; ambas cepas tenían huellas de DNA o RFLP únicos. Los datos clínico epidemiológicos de estas cepas correlacionaba muy bien con el fenotipo murino. Las otras tres cepas no coincidía el comportamiento, la cepa 1015312, presenta alto porcentaje de reactividad entre sus contactos (80%), la cepa

09985449 pertenecía a un grupo de 11 miembros y eran monoresistente a estreptomicina, con 50% de reactividad entre sus contactos, y la cepa 3004245 presentaba alto porcentaje de reactividad (60.5%) y 100% de conversión entre sus contactos domiciliarios.

Virulencia Fenotipo 4

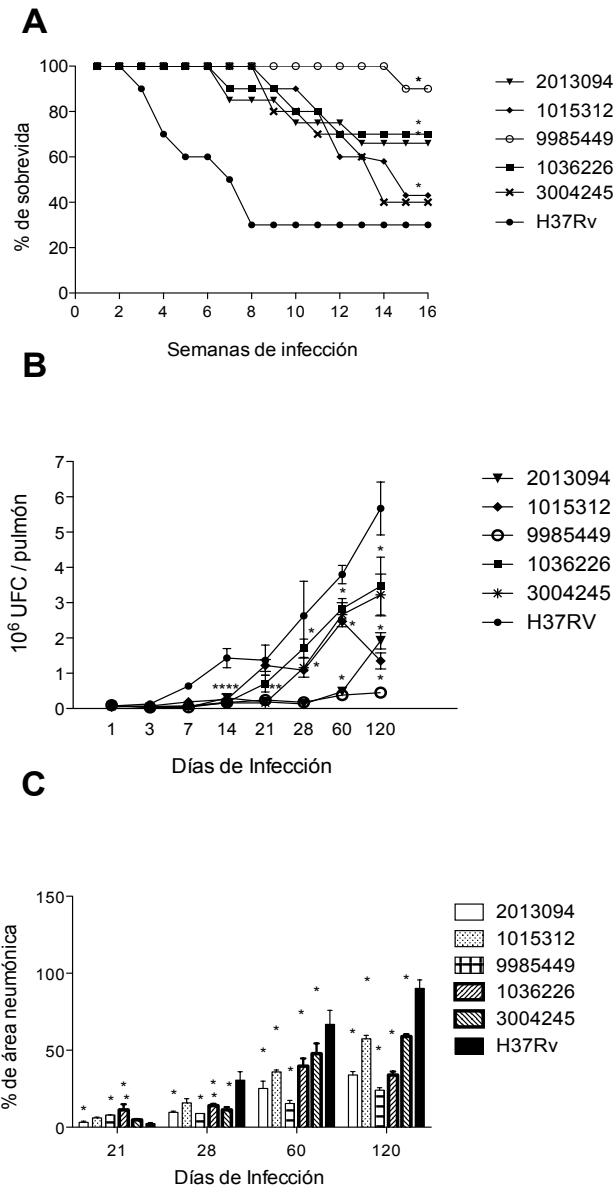


Fig 17. **Virulencia fenotipo 4.** A) Porcentaje de supervivencia producidos por los aislados 2013094, 1015312, 9985449, 1036226, 3004245 y la cepa control H37Rv de *Mycobacterium tuberculosis* en ratones BALB/c infectados por vía intratraqueal. * Diferencias significativas con un valor de $p < 0.05$, cuando se compara con los ratones infectados con la cepa H37Rv con la prueba estadística Kaplan-Meier. B) Cinética de la carga bacilar C) Porcentaje de área pulmonar afectada por neumonía. En las gráficas se presentan la media y desviación estándar de los datos. * Diferencias significativas con un valor de $p < 0.05$, cuando se compara con los ratones infectados con la cepa H37Rv.

Respuesta Inmune Fenotipo 4

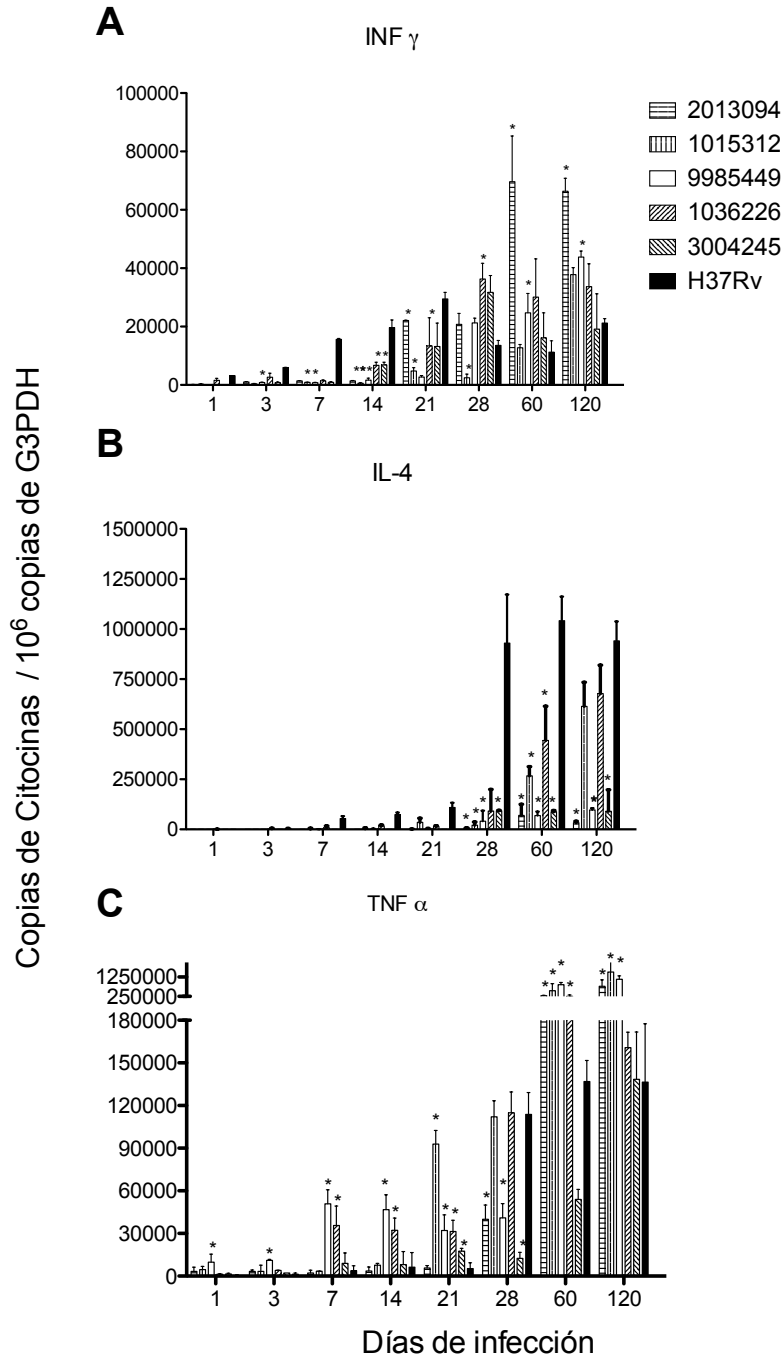


Fig 18. **Respuesta inmune fenotipo 4.** Expresión de genes de citocinas por RT-PCR en tiempo real en los pulmones infectados con los aislados 2013094, 1015312, 9985449, 1036226, 3004245 y la cepa control H37Rv para determinar A) expresión de IFN- γ , B) Interleucina -4 (IL-4) y C) TNF- α . En las gráficas se presentan la media y desviación estándar de los datos. * Diferencias significativas con un valor de $p < 0.05$, cuando se compara con los ratones infectados con la cepa H37Rv.

Transmisibilidad Fenotipo 4

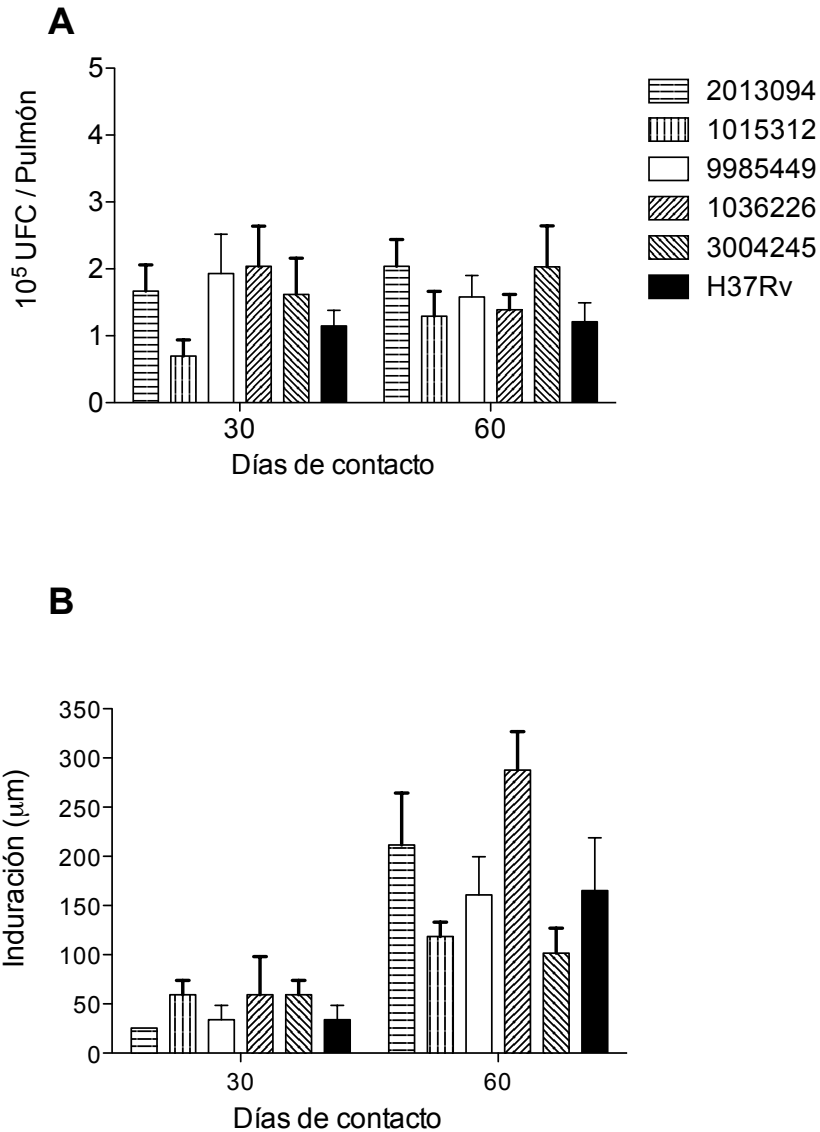


Fig 19. **Modelo de transmisibilidad.** Carga bacilar pulmonar en animales con infección natural después de la convivencia de 1 y 2 meses con ratones infectados con los aislados 2013094, 1015312, 9985449, 1036226, 3004245 5186 y la cepa control H37Rv. A) Carga bacilar o unidades formadoras de colonias o UFC. B) Respuesta de hipersensibilidad retardada o DTH. En las gráficas se presentan la media y desviación estándar de los datos. * Diferencias significativas con un valor de $p < 0.05$, cuando se compara con los ratones infectados con la cepa H37Rv.

8. Discusión

En este trabajo nos basamos en un estudio prospectivo con base poblacional de tuberculosis pulmonar en pacientes en Orizaba, Veracruz, México, para seleccionar aislados que representaran la diversidad clínica y epidemiológica en la población (Garcia-Garcia and others, 2000b; Garcia-Garcia and others, 2000c; Jimenez-Corona and others, 2006). Se detectaron todos los casos de tuberculosis pulmonar, se realizó un amplio estudio de contactos domiciliarios, así como una exhaustiva colección de datos clínicos y epidemiológicos, que incluían seguimiento de pacientes con tuberculosis y sus contactos. Se caracterizaron la mayoría de los aislados a través de huellas de DNA usando herramientas de genotipificación como RFLP *IS6110*, espoligotipo y/o deligotipo. De este estudio seleccionamos 8 cepas que presentaban el genotipo Latino-Americano-Mediterráneo (Familia LAM) y se probaron en el modelo de tuberculosis pulmonar progresiva en ratones BALB/c inducida por infección intratraqueal (Dormans and others, 2004; Infante and others, 2005). Por otro lado, se evaluó un nuevo modelo de transmisibilidad, que consiste en un estrecho y prolongado contacto (mas de 60 días) entre ratones BALB/c sanos y ratones infectados. Basados en la virulencia de las cepas (sobrevida de los ratones, carga bacilar pulmonar y daño tisular), respuesta inmune (expresión de citocinas) y transmisibilidad usando el modelo de contactos entre ratones infectados y ratones sanos, identificamos 4 fenotipos que definen claramente a las cepas seleccionadas. Sin embargo, no encontramos una absoluta correlación con los datos clínicos y epidemiológicos. Encontramos correlación con alta mortalidad, alta carga bacilar, extenso daño tisular, respuesta inmune consistente con una respuesta Th2 y transmisión de la infección a los animales contactos (fenotipo 1 y 2) con los indicadores de transmisión en la comunidad, como son tamaño de conglomerado y reactividad a la tuberculina (cepa

9005186) o rápida progresión de la enfermedad (1020319) entre los contactos domiciliarios. Sin embargo, cuando analizamos los fenotipos 3 y 4 en el modelo de ratón, caracterizados por una sobrevida larga, baja carga bacilar, menor daño tisular, citocinas consistentes con una respuesta Th1 y ausencia o poca transmisión a los contactos, sólo dos de las seis cepas mostraron patrones consistentes. Estas cepas mostraron una reducida transmisión en la comunidad (las cepas 1036226 y 2013094, presentaron pocos contactos domiciliarios PPD+ y eran cepas únicas).

El modelo de transmisibilidad trata de reproducir el estrecho y prolongado contacto que se da entre pacientes con tuberculosis y sus contactos domiciliarios, usando cajas para animales con un microaislador, donde se ponen en contacto durante 2 meses animales infectados y animales sanos. Las UFC de los pulmones, demuestran que este estrecho contacto permite transmitir eficientemente la infección natural a los animales sanos e inducir la activación de la inmunidad celular, como lo demuestra la respuesta a la DTH. Los animales sanos que fueron expuestos a la cepa virulenta 9005186 desarrollaron huellas de enfermedad progresiva (parches neumónicos) después de 2 meses de contacto, mientras las cepas de virulencia intermedia o baja virulencia, solamente inducen pocos granulomas e infiltrado inflamatorio crónico. En todos los casos, a los animales contacto se les realizó cultivo de heces fecales, orina, pelo y saliva, a los 30 y 60 días de contacto, sin embargo, solo las heces fecales producen cultivos positivos. Por lo que la transmisión del bacilo de los animales infectados a los animales sanos, probablemente es resultado de la coprofagia.

El patrón o fenotipo 1, representado por la cepa hipervirulenta 9005186, con una respuesta inmune no protectora y altamente transmisible, produce alta mortalidad con extenso daño tisular o neumonía, alta carga bacilar, baja y tardía expresión de IFN- γ , alta y rápida

expresión de IL-4 y efímera producción de TNF- α . Estas características correlacionan con las manifestaciones clínicas del paciente, el cual desarrolló enfermedad grave (fiebre, hemoptisis y pérdida de peso), alto porcentaje de reactividad entre sus contactos y forma un gran grupo o conglomerado que se encuentra sobre-expresado en la comunidad. Este comportamiento sólo había sido descrito en los miembros de la familia Beijing, prevalente en China, Mongolia, Corea del Sur y Tailandia, esta familia ha estado involucrada en diversos brotes de tuberculosis en diferentes regiones del mundo con altas tasas de incidencia (Anh and others, 2000; Chan and others, 2001; Finch and others, 1991). El genotipo Beijing fue asociado a transmisiones recientes de tuberculosis entre pacientes jóvenes, así como resistencia a antibióticos en Indonesia y Vietnam, principalmente a isoniazida (Anh and others, 2000; van Crevel and others, 2001). En Rusia se han reportado altos rangos de resistencia a antibióticos principalmente en pequeñas comunidades y prisiones (Toungousova and others, 2002). En los Estados Unidos, en el estado de New York la cepa W, que es parte de la familia Beijing, fue responsable de un gran brote de casos de tuberculosis en hospitales y prisiones, asociado principalmente a infección con VIH y multidrogo resistencia (Agerton and others, 1999), sugiriendo que ha emergido recientemente de un ancestro único (Friedman and others, 1997).

Se ha encontrado que la cepa Beijing presenta mayor crecimiento en monocitos humanos que otras cepas (Manca and others, 1999). En trabajos experimentales en ratones, la cepa Beijing fue asociada con inmunopatologías más severas en pulmones, con áreas de neumonía extensas y muerte comparada con otras cepas. La respuesta de citocinas como TNF- α fue elevada y rápida, declinando rápidamente en el pulmón, con un retardo en la respuesta de INF- γ comparada con otras cepas (Lopez and others, 2003).

La más severa patología inducida por la cepa Beijing coexiste con una respuesta inmune del hospedero dirigida probablemente hacia mecanismos no protectores. Inicialmente presenta alta y transitoria expresión de TNF- α e iNOS, sugiriendo que los macrófagos son activados en la etapa temprana de la infección, pero la débil expresión de INF- γ indica probablemente que los macrófagos no fueron activados eficientemente, por lo tanto no hay estimulación eficiente de células Th1, que permitan detener el crecimiento bacteriano, resultando en neumonía masiva y mortalidad temprana (Dormans and others, 2004; Lopez and others, 2003; van Crevel and others, 2001). Sin embargo, otros estudios no han encontrado diferencias en la producción de citocinas o susceptibilidad a reactivos intermediarios de oxido nítrico que son producidos por macrófagos activados (Zhang and others, 1999).

El aislado clínico 9005186 induce una patología y respuesta inmune muy similar a los miembros de la familia Beijing, sin embargo, al comparar el patrón de espoligotipo, deligotipo y RFLP-*IS* 6110 del aislado clínico 9005186 con el de la familia Beijing, no se encontró similitud, por lo que presenta un genotipo diferente.

Al patrón o fenotipo 2, pertenece la cepa 1020319, es hipervirulenta, con alta expresión de INF- γ y TNF- α asociada con baja expresión de IL-4 y de IL-10 durante la fase progresiva de la enfermedad, dando como resultado inflamación pulmonar masiva y muerte. La alta expresión de INF- γ se observó en la tuberculosis humana, mientras que el infiltrado pulmonar linfocitario se asoció con genes micobacterianos específicos, que correlaciona con inmunopatología más que con protección. Por ejemplo, la mutante Δ SigH es capaz de crecer eficientemente en los pulmones de ratones induciendo baja inflamación, lo cual permite una sobrevida prolongada. (Kaushal and others, 2002). Interesantemente, la

observación de que esta cepa induce baja expresión de IL-4 nos motivó a extender el estudio a otras citocinas anti-inflamatorias como IL-10. La PCR en tiempo real mostró que los animales infectados con la cepa 1020319 también presentan menor expresión de IL-10 que los animales infectados con la cepa control H37Rv. En los seres humanos y en los ratones la alta producción de citocinas inmunomoduladoras durante la tuberculosis activa y alguna porción micobacteriana como glicolípido fenólico o lipoarabinomanano pueden inducir la producción de estas citocinas (Manca and others, 2004; Reed and others, 2004). De tal manera, la baja producción de citocinas inmunomoduladoras con alta producción de citocinas proinflamatorias inducen muerte por inmunopatología. En el modelo de transmisibilidad, esta cepa mostró carga bacilar similar a H37Rv, pero una DTH mayor, indicando una fuerte respuesta inflamatoria. Por sus características clínicas y epidemiológicas la cepa 1020319 fue clasificada en el grupo de “latencia corta”, es parte de un grupo o conglomerado y produce enfermedad activa entre sus contactos domiciliarios, sugiriendo que esta cepa fue eficiente para producir enfermedad activa. El patrón de respuesta inmune que induce esta cepa, sugiere que el balance entre el patrón de citocinas pro-inflamatorias (IL-12, INF- γ , TNF- α) y anti-inflamatorias (IL-4, IL-10, TGF- β), es crucial para el desarrollo de la enfermedad. Una respuesta pro-inflamatoria alta junto con una baja producción de citocinas anti-inflamatorias, produce extenso daño tisular e inflamación, mientras por otro lado, la baja producción de citocinas pro-inflamatorias y la alta respuesta anti-inflamatoria, permite la proliferación del bacilo, que avanza la enfermedad y eventualmente la muerte. Así, el balance entre la respuesta pro-inflamatoria y anti-inflamatoria es crucial para un apropiado control del crecimiento bacilar y protección del tejido.

Al tercer patrón o fenotipo, corresponde la cepa menos virulenta, la cepa 2008920, la cual induce una fuerte y vigorosa respuesta inmune protectora, con baja mortalidad, disminución de la carga bacilar y menor daño tisular. También produce rápida y alta expresión de INF- γ con baja producción de IL-4, mientras que en la fase tardía de la enfermedad la expresión de INF- γ se mantiene alta, con expresión moderada de IL-4, significativamente alta expresión de TNF- α , lo que resulta en una rápida y eficiente respuesta inmune celular protectora, que controla eficientemente el crecimiento del bacilo, pero sin una excesiva consolidación pulmonar. En el modelo de transmisibilidad en el ratón, la cepa 2008920, mostró alta respuesta a la DTH después de un mes de contacto. Desde la perspectiva inmunopatológica, esta cepa fue similar al aislado CDC 1551, el cual también induce una fuerte respuesta Th1 en los ratones y no es hipervirulenta (Manca and others, 1999). En 1998 en Tennessee y Kentucky, USA, se describió una cepa con características muy similares a este aislado, fue un brote de tuberculosis que involucraba altos porcentajes de contactos expuestos, en un área que en promedio presentaba menos de un caso por año. La cepa responsable de este brote fue la cepa CDC1551, que esta asociada con una fuerte y temprana respuesta inmune, con altos rangos de reactividad a la tuberculina entre sus contactos (Valway and others, 1998). Las fracciones lípidicas de esta cepa indujeron altas concentraciones de citocinas pro-inflamatorias en monocitos estimulados y los ratones infectados con esta cepa fueron incapaces de desarrollar una respuesta inmune apropiada (Manca and others, 1999; Manca and others, 2001).

En un estudio realizado en la ciudad de New York entre 1991 y 1994 se registró un brote de tuberculosis, donde el 51% de los casos estaba asociado al genotipo C, estas cepas fueron más resistentes a reactivos intermediarios del nitrógeno (RIN) que otras, favoreciendo la

sobrevivencia dentro del macrófago y su diseminación entre los habitantes de esta ciudad (Friedman and others, 1997). Estas observaciones, sugieren que las cepas de *M. tuberculosis* difieren en su capacidad de interactuar con el hospedero y que pueden tener también diferente capacidad para transmitirse (Barnes and Cave, 2003). Hasta hace poco tiempo se creía que los aislados clínicos y las cepas prototipo de *M. tuberculosis* eran igualmente virulentas, sin embargo, la genotipificación de los aislados en estudios de base poblacional, han demostrado que un porcentaje importante de cepas se relacionan con una gran cantidad de casos de tuberculosis activa. Esto implica que algunas cepas son más efectivas para diseminarse y transmitirse que otras, lo cual les permite tener ciertas ventajas biológicas. Se trata de cepas altamente transmisibles e inmunogénicas. Sin embargo este fenotipo no correlaciona con los datos clínicos y epidemiológicos

Al cuarto patrón o fenotipo, pertenecen las cepas menos virulentas, con una respuesta inmune protectora adquirida tardía. Cinco aislados clínicos mostraron esta característica: 2013094, 1015312, 3004245, 09985449 y 1036226. Estos aislados clínicos inducen una expresión tardía de INF- γ (después de un mes de infección), en contraste con la infección producida por H37Rv en donde en este momento de la infección, declina la expresión de esta citocina después de un pico al día 21 post infección. La activación tardía de la respuesta Th1 junto con una temprana y alta expresión de TNF- α , sugiere que la inmunidad innata puede ser un factor significativo en el control temprano de la infección. La alta expresión de TNF- α (la cual revela una eficiente activación de macrófagos) durante el primer mes de infección, sugiere que estas cepas pueden ser eliminadas eficientemente por los macrófagos pulmonares activados durante la infección temprana, retardando la

participación de los linfocitos T. Recientemente se demostró en este modelo de enfermedad progresiva que las beta-defensinas 3 y 4 son alta y rápidamente expresadas durante la fase temprana de la infección con H37Rv, seguido por una fuerte disminución en la fase progresiva de la enfermedad, sugiriendo que estos péptidos antimicrobianos pueden participar en el control del crecimiento bacilar durante la infección temprana (Rivas-Santiago and others, 2006). Sin embargo, cuando determinamos la expresión de beta-defensinas por PCR en tiempo real en los pulmones de los animales infectados con estos aislados clínicos, observamos una moderada y constante expresión de estos péptidos antimicrobianos durante la infección. Estas beta-defensinas no están involucradas en el eficiente y temprano control del crecimiento bacteriano, aunque los macrófagos pueden estar involucrados en este fenómeno. Estos aislados clínicos mostraron similar transmisibilidad (3004245, 2013094 y 1015312) o menor (cepa 2013094) que la cepa control H37Rv en el modelo de transmisibilidad en el ratón. Cuando comparamos con las características clínicas y epidemiológicas de los aislados, solamente las cepas 1036226 y 1013094 mostraron una reducida transmisión en la comunidad. Este patrón o fenotipo inmune inducido por la mayoría de las cepas del estudio, sugiere que el sistema inmune innato puede ser uno de los factores más importantes en la prevención de la enfermedad y que la mayoría de las personas manifiestan después de la infección primaria (Vynnycky and Fine, 1997).

De forma similar la cepa Canetti provoca inflamación rápida y conspicua. Alta y sostenida expresión de TNF- α e iNOS, lo que provoca una lenta progresión de la enfermedad, que se refleja por el limitado daño tisular y la baja mortalidad. Quizá este eficiente y temprano control de la infección por activación de macrófagos no requiere alta expresión de INF- γ

durante la primera y segunda semana de infección. Por lo tanto la alta y constante expresión de INF- γ puede contribuir a la lenta progresión de la enfermedad (Lopez and others, 2003). La primera cepa Canetti fue aislada en Francia en 1969, desde entonces esta cepa ha sido utilizada extensamente en la búsqueda de antígenos para pruebas de inmunodiagnóstico (Daffe and others, 1991). La bacteria Canetti produce colonias lisas y brillantes, lo cual es inusual en las bacterias del complejo *M. tuberculosis*. Esta morfología de colonias lisas solo se ha visto en *M. avium*. Esta morfología de colonias lisas y baja virulencia de la cepa Canetti fue atribuida a la diferencia en el contenido de glicolípidos (Daffe and others, 1991; van Soolingen and others, 1997). Sin embargo, todos estos aislados clínicos (2013094, 1015312, 3004245, 09985449 y 1036226) inducen una patología y respuesta inmune muy similar a la cepa Canetti, sin embargo al comparar los espoligotipos, deligotipos y RFLP-IS 6110 de cada un de los aislados estos pertenecen a la familia LAM (Latino Americana – Mediterránea).

Es importante enfatizar que todas las cepas utilizadas en este estudio se comportaron de manera similar *in vitro*, es decir, no presentaron diferencias en términos de formación de cordón, curvas de crecimiento, exposición a peróxido de hidrogeno y otros nutrientes. Por lo que estos factores no son la razón de las diferencias observadas en el modelo de enfermedad progresiva en el ratón.

9. Conclusiones

En este estudio correlacionamos las características clínicas y epidemiológicas de los aislados clínicos de la jurisdicción sanitaria de Orizaba, Veracruz, con la enfermedad producida en el modelo de tuberculosis pulmonar y de transmisibilidad en ratones BALB/c, en el cual, al utilizar ratones singénicos dentro de un ambiente controlado descartamos la influencia de factores ambientales y del hospedero que pudieran influir en el progreso de la enfermedad, por lo tanto las diferencias en la patología y respuesta inmune en los animales son debidas a las diferencias genotípicas de los aislados clínicos seleccionados.

Todas las cepas utilizadas en este estudio presentaron un comportamiento similar *in vitro*, por lo que las diferencias observadas en el modelo experimental de enfermedad progresiva y transmisibilidad son debidas a las características genotípicas de cada uno de los aislados clínicos seleccionados.

La cepa 9005186 con fenotipo 1, fue una cepa extremadamente virulenta, con respuesta inmune no protectora y altamente transmisible. Con un rápido balance de citocinas Th1/Th2, expresión tardía de IFN- γ , alta y rápida expresión de IL-4 y expresión transitoria de TNF- α , y con mayor carga bacilar y mayor respuesta a DTH entre contactos. Esto correlaciona con los datos clínico epidemiológicos, es decir, pertenecía a un grupo numeroso dentro de la comunidad, con alta proporción de PPD+ y conversiones entre sus contactos.

La cepa 1020319 con fenotipo 2, fue una cepa muy virulenta, con mayor neumonía y similar carga bacilar a la cepa control. Con predominio de citocinas pro-inflamatorias y deficiente expresión de citocinas inflamatorias IL-4 e IL-10, induce alta expresión de INF- γ

en la etapa progresiva de la enfermedad y niveles sostenidos de TNF- α . Los animales contacto en el experimento de transmisibilidad mostraron similar carga bacilar que H37Rv, pero una respuesta alta a la DTH después de un mes de convivencia. Esta cepa fue parte de un grupo o conglomerado, producía enfermedad activa en los contactos dentro de los 2 años siguientes al caso índice.

Fenotipo 3, cepa 2008920 fue menos virulenta y estimula una fuerte respuesta inmune celular protectora. Presentó una sobrevida media, carga bacilar igual a H37Rv y menor áreas neumónicas. Alta expresión de INF, baja expresión de IL-4 y mayor expresión de TNF durante todo el experimento. En los animales contactos presentaron similar carga bacilar que H37Rv, pero mayor respuesta a la DTH al mes de contacto. Esta cepa fue de baja transmisibilidad, contactos con PPD-, pero pertenece a un grupo de 3 miembros en la comunidad.

Fenotipo 4, fueron cepas con una respuesta inmune protectora y menor virulencia. Presentaron mayor sobrevida, menor daño tisular y carga bacilar similar a la cepa control. El perfil de citocinas fue característico de una respuesta TH, alta y sostenida inducción de INF, alta inducción de TNF y baja inducción de IL-4. Los animales contacto, mostraron menor o similar carga bacilar y respuesta a la DTH. Sin embargo, sólo las cepas 1036226 y 2013094 correlacionaron con los datos clínico epidemiológicos, fueron cepas únicas con contactos PPD negativos. Las otras tres cepas no correlacionaron con los datos clínico epidemiológicos. La cepa 1015312 produce rápida conversión entre contactos domiciliarios, la cepa 09985449 fue monoresistente a estreptomicina y pertenece a una grupo o conglomerado numeroso. La cepa 3004245 presentó alto porcentaje de reactividad entre sus contactos.

En general, las cepas en grupos o conglomerados son más virulentas y transmisibles que las cepas esporádicas o únicas, y existen varios patrones o fenotipos de respuesta inmune inducidas por cepas con genotipo diferente.

Se pudo observar que el balance entre la respuesta pro-inflamatoria y anti-inflamatoria es crucial para un apropiado control del crecimiento bacilar y protección del tejido.

Las diferentes cepas de *M. tuberculosis* difieren en su capacidad de interactuar con el hospedero y tienen diferente capacidad para transmitirse.

El modelo experimental de transmisibilidad demostró que la mayor virulencia se asocia a mayor transmisibilidad.

En este trabajo se pudo correlacionar virulencia y transmisibilidad en el ratón con marcadores de transmisión en la comunidad (PPD entre contactos, progresión de la enfermedad y grupos o conglomerados), sin embargo, no pudimos correlacionar otros datos clínicos epidemiológicos.

El modelo experimental de enfermedad progresiva y transmisibilidad es útil para evaluar la patogenicidad y respuesta inmune inducida por cepas bien seleccionadas de estudios epidemiológicos.

10. Perspectivas.

Estos resultados sugieren realizar estudios de secuenciación de los aislados clínicos virulentos, con el fin de encontrar diferencias que nos puedan ayudar a identificar genes o factores de virulencia asociados con la calidad de la respuesta inmune del hospedero.

Así mismo, los estudios de genómica, transcriptoma y proteómica comparativa podrían ayudarnos a identificar la diversidad genética *M. tuberculosis* en cepas bien seleccionadas de estudios epidemiológicos.

11.Anexos

Virulence, immunopathology and transmissibility of selected strains of *Mycobacterium tuberculosis* in a murine model

Brenda Marquina-Castillo,¹ Lourdes García-García,^{2*} Alfredo Ponce-de-León,^{3*} Maria-Eugenia Jimenez-Corona,² Miriam Bobadilla-del Valle,³ Bulmaro Cano-Arellano,² Sergio Canizales-Quintero,² Areli Martinez-Gamboa,³ Midori Kato-Maeda,⁴ Brian Robertson,⁵ Douglas Young,⁵ Peter Small,⁶ Gary Schoolnik,⁷ Jose Sifuentes-Osornio³ and Rogelio Hernandez-Pando¹

¹Sección de Patología Experimental, Departamento de Patología, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición, Salvador Zubiran, Mexico, ²Unidad de Tuberculosis, Instituto Nacional de Salud Pública, Mexico, ³Laboratorio de Microbiología Clínica, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición, Salvador Zubiran, Mexico, ⁴San Francisco General Hospital, University of California, San Francisco, CA, USA, ⁵Imperial College London, South Kensington Campus, London, UK, ⁶Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA, USA, and ⁷Department of Microbiology and Immunology, Stanford University, Stanford, CA, USA

doi:10.1111/j.1365-2567.2008.03004.x

Received 6 September 2008; revised 21 October 2008; accepted 27 October 2008.

*These authors contributed equally to this work.

Correspondence: L. García-García, Instituto Nacional de Salud Pública, Av. Universidad # 655, Col. Sta. María Ahuacatitlán, C.P. 62508, Cuernavaca, Morelos, Mexico.
Email: garcigarm@gmail.com
Senior author: Rogelio Hernandez-Pando, email: rhpando@quetzal.innsz.mx

Introduction

Tuberculosis (TB) remains a major public health problem, with almost two million deaths annually, and a third of the global population latently infected. In the developed world, TB is a prototypical re-emerging infectious

Summary

After encounter with *Mycobacterium tuberculosis*, a series of non-uniform immune responses are triggered that define the course of the infection. Eight *M. tuberculosis* strains were selected from a prospective population-based study of pulmonary tuberculosis patients (1995–2003) based on relevant clinical/epidemiological patterns and tested in a well-characterized BALB/c mouse model of progressive pulmonary tuberculosis. In addition, a new mouse model of transmissibility consisting of prolonged cohousing (up to 60 days) of infected and naïve animals was tested. Four phenotypes were defined based on strain virulence (mouse survival, lung bacillary load and tissue damage), immunology response (cytokine expression determined by real-time polymerase chain reaction) and transmissibility (lung bacillary loads and cutaneous delayed-type hypersensitivity in naïve animals). We identified four clearly defined strain phenotypes: (1) hyper-virulent strain with non-protective immune response and highly transmissible; (2) virulent strain, associated with high expression of proinflammatory cytokines (tumour necrosis factor and interferon) and very low anti-inflammatory cytokine expression (interleukins 4 and 10), which induced accelerated death by immunopathology; (3) strain inducing efficient protective immunity with lower virulence, and (4) strain demonstrating strong and early macrophage activation (innate immunity) with delayed participation of acquired immunity (interferon expression). We were able to correlate virulent and transmissible phenotypes in the mouse model and markers of community transmission such as tuberculin reactivity among contacts, rapid progression to disease and cluster status. However, we were not able to find correlation with the other two phenotypes. Our new transmission model supported the hypothesis that among these strains increased virulence was linked to increased transmission.

Keywords: immunogenicity; immunopathology; molecular epidemiology; murine model; transmission; tuberculosis

disease, while in the developing nations TB is a devastating health problem.¹

After encounter with *Mycobacterium tuberculosis*, a series of immune responses are triggered that define the course of the infection. However, this host response is not uniform in exposed people. Indeed, the vast majority

of humans never develop overt disease despite being infected for many years.² Furthermore, an array of clinical manifestations may occur at any stage of life in those patients who cannot control the infection. Although considerable information is already available about host determinants and the environmental factors that influence a particular outcome,²⁻⁴ there is a lack of systematic information on the influence of the genetic diversity of the pathogen itself that may provide important clues for basic and applied research on TB and its relation with the human host.

To explain this variability, it has been proposed that the course of the infection and its epidemiological consequences depend upon a complex interplay of factors. It is increasingly thought that the virulence and load of the infecting strain, together with host genetic factors, contribute to such differences.^{3,5,6} In particular, several reports have demonstrated that the severity and clinical manifestations of TB depend on differences in the immunogenicity and pathogenicity of the infecting strains of *M. tuberculosis*.⁶⁻¹⁰ Some of these results are derived from animal models that take advantage of a uniform immune response within the host, allowing the genetic diversity among strains to be analysed.⁵⁻⁹ One such model has been used extensively by our group to demonstrate major differences in the progress of infection after exposure to selected genotypes using the intratracheal route of administration.¹¹⁻¹⁴ This model offers the following benefits: first, it is based on airway infection, which is the usual route in humans. Second, the rate of bacterial multiplication in the lungs correlates with the extent of tissue damage (pneumonia) and mortality. Third, the infection is controlled successfully as long as a strong T helper type 1 (Th1) cell response is sustained, which is endorsed by previous evidence on the protective role of Th1 cytokines against mycobacterial infection.¹¹⁻¹⁴ Consequently, in the light of the high degree of genetic diversity observed among *M. tuberculosis* isolates worldwide in the last decade, it seems worthwhile to investigate differences in the pathogenicity and immunogenicity of a spectrum of bacterial genotypes from an area that provides a unique opportunity to study well-characterized mycobacterial isolates.

Another important concern in TB is the relationship between transmissibility and bacterial genotype. In fact, the relationship between the transmission dynamics of infectious diseases and the evolution of pathogenic organisms has been a matter of controversy for many years.¹⁵ The question of how the virulence of any particular pathogen is linked to its transmission is important because transmission determines the evolutionary success of pathogenic organisms. This important matter has not been studied in TB in a well-controlled system because of the lack of an experimental transmission model. Differences in transmissibility could be related to differences in

bacterial virulence and the immune responses evoked by different mycobacterial strains.

We have conducted a population-based prospective study of pulmonary TB in Southern Mexico since 1995. All cases of pulmonary TB within the area have been detected and their clinical isolates have been well characterized. We have also obtained in-depth analysis of household contacts, as well as comprehensive epidemiological and clinical data, including follow-up outcomes of TB patients and their contacts. Moreover, the majority of these isolates have been fingerprinted using a number of genotyping tools.¹⁶⁻¹⁹

In this study, we used the BALB/c mouse model of progressive pulmonary TB by the intratracheal route to examine the course of infection in terms of strain virulence (mouse survival, lung bacillary load, histopathology) and immune responses [cytokine expression determined by real-time polymerase chain reaction (PCR)] produced by different *M. tuberculosis* strains selected from our clinical/epidemiological study in Orizaba, Mexico. In a second part of the study, we designed a new mouse model of transmissibility, which consists of prolonged cohousing (up to 60 days) of infected and naïve animals. The ability of these strains to be transmitted was measured using lung bacillus loads of the naïve animal and cutaneous delayed type hypersensitivity (DTH) against mycobacterial antigens as markers of disease and transmission, respectively.

We selected a panel of isolates representing clinical/epidemiological diversity in the population of *M. tuberculosis* strains in Mexico and tested them in both animal models. We were able to define a series of distinct bacterial phenotypes in the mouse models based on time to death, bacterial load, immunology kinetics and transmission to naïve animals. We then tried to correlate these bacterial phenotypes with simple clinical/epidemiology markers.

Materials and methods

Selection of M. tuberculosis clinical isolates

The study site, enrolment, follow-up and laboratory procedures have been described previously.¹⁶⁻¹⁹ Briefly, between March 1995 and May 2003, 8202 individuals with more than 2 weeks of productive cough were screened for acid-fast bacilli or *M. tuberculosis* in sputa; 667 pulmonary TB patients underwent epidemiological, clinical [standardized questionnaire, physical examination, chest radiograph, human immunodeficiency virus (HIV) test], mycobacteriological and molecular evaluations. Two hundred and ninety-six patients (44.3%) belonged to 75 IS6110-restriction fragment length polymorphism and spoligotype clusters: the size of clusters ranged from 2 to 20 members. Fifty per cent of clustered isolates belonged to small clusters (three or fewer isolates). Treatment was

provided using the official norms of Mexico's National Tuberculosis Control Programme in accordance with the World Health Organization (WHO) guidelines for the period in which the cases were detected. Results of treatment were classified as described previously,²⁰ and follow-up visits were made 6 months later and then on an annual basis to monitor the results of treatment, the incidence of retreatments and patients' vital status during the duration of the study. All deaths were confirmed by death certificates. The homes of deceased patients were visited to interview the person who had attended the person during the terminal stage and to collect data on their symptoms. The surveys were reviewed by two physicians, who determined if death was attributable to TB. Causes of death were established as reported previously.²¹ Of the 667 patients, 42 (6.2%) died from TB. For analysis, we only considered one TB isolate per patient. A summary of the main epidemiological and clinical characteristics of the patients with TB is shown in Table 1. More than half of patients were male, HIV infection was infrequent, one-third of patients had more severe clinical manifestations such as weight loss, haemoptysis or cavitations, approximately one-fifth of patients harboured drug resistance. Treatment was administered under the WHO recommended control strategy DOTS (Directly-Observed Treatment, Short-course), including its five components: government commitment; case detection by predominantly passive case-finding; standardized short-course chemotherapy to, at least, all confirmed sputum smear-positive cases, provided under proper case management conditions; a system of regular drug supply; and a monitoring system for programme supervision and evaluation. More than 80% of patients were cured, 6% died from TB.

Contact investigations

After May 2003, we also collected information from 779 household contacts with a standardized questionnaire and tuberculin skin test (TST) (Tuberculin PPD RT 23 SSI, 2 T.U./0.1 ml, Statens Serum Institut, Copenhagen, Denmark). Individuals with a negative baseline TST were retested at least once a year (minimum of 3 months after the initial test to avoid boosting) for up to 2 years after diagnosis of the index case, to detect TST conversion. Individuals were considered TST positive if they presented an induration of at least 10 mm.²² In compliance with international recommendations, a TST conversion was defined as an increase of > 10 mm in the diameter of the TST, and was considered a true biological phenomenon representing a newly acquired infection.²³ Of the 779 contacts, 300 (38.5%) were tuberculin reactive. Of the 384 contacts who were initially tuberculin non-reactive and were retested at 3-monthly intervals, 51 (13.2%) converted. A summary of the main epidemiological and

Table 1. Summary of main characteristics of patients and contacts

Characteristic	n/total	%
Patients		
Males	398/667	59.7
Age in years (mean, SD)	44.5	17.7
Completed elementary school	350/664	52.7
HIV infection	16/632	2.5
Fever	435/667	65.2
Weight loss	497/666	74.6
Haemoptysis	218/662	32.9
Cavitation in chest X-ray	201/602	33.4
Drug sensitivity		
Pan-sensitive	527/665	79.2
Joint resistant to isoniazid and rifampin	50/665	7.5
Other resistance	88/665	13.2
Clinical outcomes		
Cure	472/586	80.6
Failure	27/586	4.7
Drop out	58/586	9.9
Death	20/586	3.4
Transfer	9/586	1.5
Follow up		
Death due to any cause	65/667	9.7
Death due to tuberculosis	42/667	6.3
Cluster status		
Cluster	150/667	22.5
Unique	502/667	75.3
Unknown	15/667	2.2
Contacts		
Males	322/777	41.4
Age (mean, SD)	26.2	20.6
Tuberculin skin test positive	351/779	45.1
Tuberculin skin positive among individuals with family relatedness with index case	208/438	47.5
Active tuberculosis during follow up	6/779	0.8

SD, standard deviation.

clinical characteristics of the household contacts is shown in Table 1. There were a larger proportion of females among this group and they were younger than the patients. The proportion of individuals who were family related to the index case and tuberculin reactive (208/438, 47.4%) was similar to the proportion of individuals who were not family related and tuberculin reactive (143/341, 41.9%), $P = \text{NS}$. Therefore, it is unlikely that tuberculin reactivity was attributable to genetic predisposition to TB. Six individuals developed active disease.

Selection of study strains

For the purpose of this study, we defined as follows four major groups of isolates depending on clinical and epidemiologic characteristics, molecular fingerprinting and TST results among their household contacts:

(1) Tuberculosis cases in which more than 20% of their household contacts either were TST positive at the moment of recruitment for contact investigation studies or, although their initial TST was negative, they converted during follow up. Thirty-two patients met this condition, 23 shared their *M. tuberculosis* strain genotype with another isolate in the collection (totalling 19 clones) and nine were unique fingerprints. Among the 23 strains, we selected one (09005186) that belonged to a cluster of recently transmitted infection overrepresented in this community (17 isolates shared the same genotype), and for comparison, we selected one strain (3004245) among the nine non-clustered strains with a high percentage of purified protein derivative reactivity in their contacts; this strain had a unique genotype and therefore was considered the result of reactivated disease. There were no deaths attributed to TB in any of these groups. We considered these cases and their isolates as 'highly transmissible'.

(2) Tuberculosis cases in which their household contacts were always TST negative, at detection of the TB case or during follow-up. There were 122 patients that met this condition, 65 of their isolates (53.3%) were clustered with 37 different fingerprint patterns. We tested two strains: 2008920 which belonged to a cluster (with three members) and 1036226 which had a unique fingerprint. We considered these cases and their isolates as 'poorly transmissible'.

(3) Cases with a 'short' period of latency: individuals living in the same household as the pulmonary TB index case who were diagnosed with active pulmonary TB within 2 years from the diagnosis of the first case, and whose *M. tuberculosis* isolates shared the same genotype. We found 10 cases meeting these criteria, from which we selected strains 1015312 and 1020319 from two different clusters.

(4) Cases in which we suspected reactivated disease after a 'long' period of latency: to meet the criteria, we chose clinical isolates that were monoresistant to streptomycin. This is a rare phenotype in this region and in other regions of the country. We found this characteristic in 14 of 779 (2%) of all isolates. We selected strain 09985449, which was the index case of a cluster of 11 members, and strain 2013094, which had a unique pattern.

The research protocols were approved by the appropriate institutional review boards of participating institutions and all patients and their contacts signed informed consent before enrolment.

Experimental model of pulmonary TB in BALB/c mice

Virulence (as determined by survival, lung pathology and bacterial load) and immune response induced by each isolate were evaluated in 6- to 8-week-old male BALB/c mice as previously described.^{7,11-14,24} Briefly, to induce

progressive pulmonary TB, mice were anaesthetized with sevoflurane and inoculated intratracheally with 2.5×10^5 bacilli in 100 μ l phosphate-buffered saline (PBS).^{12,13} Infected mice were kept in a vertical position until the effect of anaesthesia had passed. Bacteria were grown in Middlebrook 7H9 broth (Difco, Detroit, MI) enriched with glycerol and albumin, catalase and dextrose (Becton Dickinson, Cockysville, MD), and incubated with constant agitation at 37° and 5% CO₂ for 21 days. Growth was monitored by densitometry. As soon as the culture reached stationary phase (optical density at 600 nm = 1), the bacilli were harvested, and the concentration was adjusted to 2.5×10^5 viable bacilli per millilitre of PBS as determined by diacetate of fluorescein (DAF) incorporation,²⁴ and 100- μ l were aliquots frozen at -70° until use.

Two experiments were performed: in each experiment nine groups of 70 mice were infected with the eight different *M. tuberculosis* clinical isolates plus H37Rv controls; 20 mice from each group were left undisturbed to record survival from day 8 up to day 120 after infection. Six animals from each group were killed by exsanguination at 1, 3, 7, 14, 21, 28, 60 and 120 days after infection. One lung lobe, right or left, was perfused with 10% formaldehyde dissolved in PBS and prepared for histopathological studies. The other lobe was snap-frozen in liquid nitrogen then stored at -70° for microbiological and immunological analysis.^{12,13} All procedures were performed in a class III cabinet in a biosafety level III facility. Infected mice were kept in cages fitted with microisolators connected to negative pressure.

Progression of disease in our model has been previously described.¹² Briefly, after inoculation with the laboratory strain H37Rv, an initial immune response dominated by high production of Th1 cell cytokines and tumour necrosis factor- α (TNF- α) is induced and temporarily controls the infection. Granulomas develop during this phase. After the third week of infection, there is a drop in interferon- γ (IFN- γ) expression with high expression of Th2 cytokines. Gradually, pneumonic areas prevail over granulomas. Pneumonia, in coexistence with a high burden of bacteria, causes death. Animal work was performed in accordance with the National Regulations on Animal Care and Experimentation.

Preparation of lung tissue for histology and automated morphometry

One lobe of the lung was fixed by intratracheal perfusion with 10% formaldehyde for 24 hr, then sectioned through the hilus and embedded in paraffin. Sections, 5 μ m thick, were stained with haematoxylin & eosin for the histological/morphometric analysis. The percentage of the pulmonary area affected by pneumonia was determinate using an automated image analyser (Q Win Leica, Milton Keynes, UK).^{12,13}

Determination of colony-forming units in infected lungs

Right or left lungs from four mice at each time-point, in two different experiments, were used for colony counting. Lungs were homogenized with a Polytron (Kinematica, Luzern, Switzerland) in sterile 50-ml tubes containing 3 ml isotonic saline. Four dilutions of each homogenate were spread onto duplicate plates containing Bacto Middlebrook 7H10 agar (Difco Lab code 0627-17-4; Difco) enriched with oleic acid, albumin, catalase and dextrose. The time for incubation and colony counting was 21 days.¹⁴

Real-time PCR analysis of cytokines in lung homogenates

Left or right lung lobes from three different mice per group in two different experiments were used to isolate messenger RNA (mRNA) using the RNeasy Mini Kit (QIAGEN Mexico, Colima, México), according to the recommendations of the manufacturer. Quality and quantity of RNA were evaluated through spectrophotometry (260/280) and on agarose gels. Reverse transcription of the mRNA was performed using 5 µg RNA, oligo-dT and the Omniscript kit (QIAGEN Mexico). Real-time PCR was performed using the 7500 real-time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and Quantitect SYBR Green Mastermix kit (Qiagen). Standard curves of quantified and diluted PCR product, as well as negative controls, were included in each PCR run. Specific primers were designed using the program PRIMER EXPRESS (Applied Biosystems) for the following targets: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH): 5'-CATTGTGGAA GGGCTCATGA-3', 5'-GGAAGGCCATGCCAGTGAGC-3'; TNF- α : 5'-TGTGGCTTCGACCTCTACCTC-3', 5'-GCCG AGAAAGGCTGCTTG-3'; IFN- γ : 5'-GGTGACATGAAAA TCCTGCAG-3', 5'-CCTCAAACCTGGCAATACTCATGA -3'; and interleukin-4 (IL-4): 5'-CGTCCTCACAGCA ACGGAGA-3', 5'-GCAGCTTATCGATGAATCCAGG-3'. Cycling conditions used were: initial denaturation at 95° for 15 min, followed by 40 cycles at 95° for 20 seconds, 60° for 20 seconds, 72° for 34 seconds. Quantities of the specific mRNA in the sample were measured according to the corresponding gene-specific standard. The mRNA copy number of each cytokine was related to one million copies of mRNA encoding the GAPDH gene.¹⁴ H37Rv was used as a control for all experiments in our BALB/c model.

Experimental model of M. tuberculosis transmissibility in BALB/c mice

To evaluate the transmissibility of each selected clinical isolate, we tried to reproduce the close-contact living conditions between TB patients and their household contacts. Five BALB/c mice, all infected with one of the selected strains, were kept in the same microisolator cage from

the first day of infection with another five healthy non-infected BALB/c mice (healthy contacts). To determine if these animals were infected by their close and long-term contact with the tuberculous mice, we killed them after 1 and 2 months of cohousing with the infected mice and determined lung colony-forming units (CFU) as described above, as well as DTH against whole mycobacterial antigens from culture filtrate harvested from *M. tuberculosis* H37Rv grown as described above for 4–5 weeks. Culture filtrate protein antigens were obtained by precipitation with 45% (w/v) ammonium sulphate, washed and redissolved in PBS. For DTH measurement, each mouse received an injection of 20 µg antigen in 40 µl PBS into the hind footpad. The footpad was measured with a precision micrometer before and 24 hr after the antigen injection, as previously described.¹⁴

Statistical analysis

Statistical analysis of survival curves was performed using Kaplan–Meier plots and Long Rank tests. Student's *t*-test was used to determine statistical significance of CFU, histopathology and cytokine expression. *P* < 0.05 was considered significant.

Results

The eight strains of *M. tuberculosis* representing the groups defined in the Materials and methods section were used to infect mice by the intratracheal route in both virulence and transmissibility models. Based on the results from these models, we were able to classify these clinical isolates into four groups based on immunopathology.

Phenotype 1: strain that does not induce a protective immune response and shows increased virulence and transmission

The strain which clearly represents this category is 9005186. BALB/c mice infected with this clinical isolate started to die after 3 weeks, and by the 5th week all the animals had died (Fig. 1a). This strain grew rapidly in the lung, peaking at day 21 with a CFU double that of the control strain H37Rv (Fig. 2a), and produced significantly more pneumonic areas at day 28 than H37Rv (Fig. 3a). In comparison with mice infected with H37Rv, in mice infected with strain 9005186, the induction of IFN- γ expression was delayed, but there was rapid and high IL-4 expression (Fig. 4a,b). Interestingly, this strain also induced high but transient TNF- α expression (Fig. 4c). Overall, these results indicate that this strain is more virulent and does not induce a protective immune response in our animal model.

Our transmissibility study based on cohousing of infected and healthy mice showed that this strain was

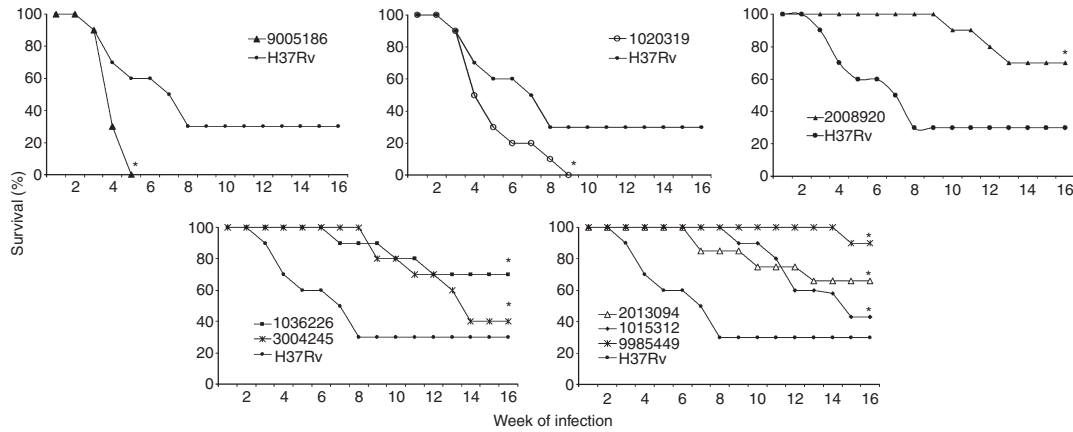


Figure 1. Survival rates produced by selected *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. Twenty mice were infected with the indicated *M. tuberculosis* strain by the intratracheal route, and spontaneous death was recorded along the infection comparing with control animals infected with the laboratory strain H37Rv. *Statistically significant ($P < 0.05$), when compared with mice infected with H37Rv strain analysed by Kaplan–Meier test.

highly transmissible, as demonstrated by the fact that the lungs from contact mice showed threefold more CFU than the contacts of H37Rv-infected animals after 1 month, and fourfold more CFU after 2 months (Fig. 5a). There were also significantly higher DTH responses at 30 days (data not shown). These results were in agreement with the clinical/epidemiological information, which showed that this isolate was part of a big cluster that was over-represented in the community and that was highly transmissible as indicated by a high per-

centage of purified protein derivative conversion in household contacts.

Phenotype 2: strain that induces a low anti-inflammatory cytokine response and shows increased virulence

Mice infected with strain 1020319 showed 100% mortality after 9 weeks postinfection (Fig. 1b), more pneumonia than H37Rv-infected mice (Fig. 3b), but similar CFUs

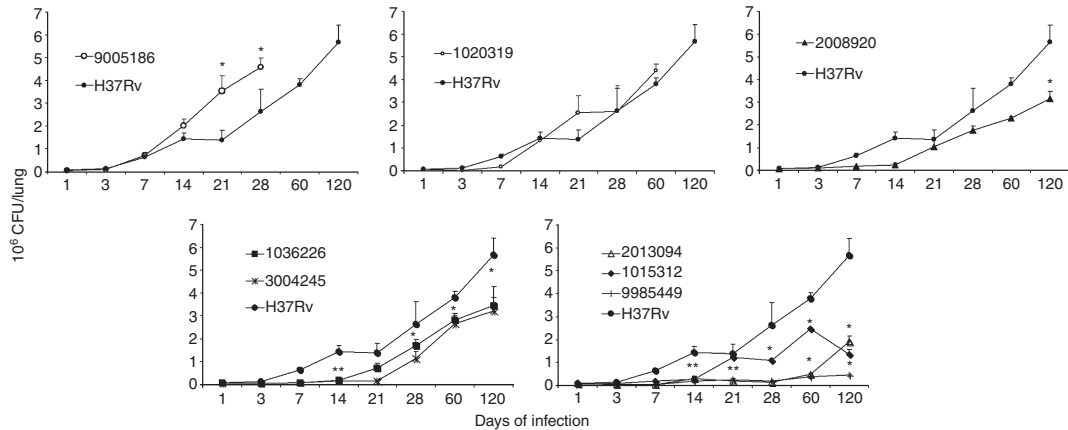


Figure 2. Kinetics of lung bacillary loads along the infection. BALB/c mice were infected through the intratracheal route with the indicated *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolate and groups of four animals were killed at different time-points after infection, their lungs were removed and used to determine bacillary loads by counting colony forming units (CFU), animals infected with laboratory strain H37Rv were used as controls. Data are presented as mean and standard deviation at each time-point. *Statistically significant ($P < 0.05$) when compared with mice infected with H37Rv strain.

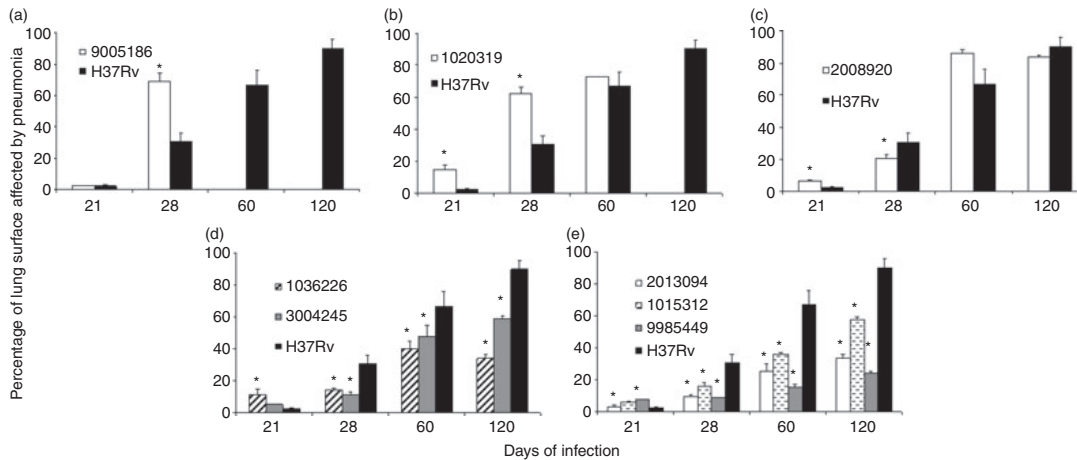


Figure 3. Percentage of lung surface affected by pneumonia. Lung histology sections from four animals per time-point infected with the indicated strain were used to determine the percentage of lung surface affected by pneumonia using automated morphometry. Data are presented as mean and standard deviation. *Statistically significant ($P < 0.05$) when compared with mice infected with H37Rv strain.

(Fig. 2b). In comparison with animals infected with H37Rv, this strain induced higher expression of IFN- γ during late stages of disease, higher TNF- α levels throughout, and very low IL-4 and IL-10 expression (Fig. 4a–c).

Healthy contact animals cohoused with mice infected with this 1020319 strain showed similar lung CFU (Fig. 5b), but a significantly higher DTH response after 1 month of cohabitation, when compared with contact mice that lived together with H37Rv-infected animals, although the difference in DTH was gone by 2 months (data not shown). By our clinical/epidemiological criteria, strain 1020319 was one of the short latency strains, which was part of a cluster and provoked active disease in a household contact within the first 2 years after diagnosis of the index case.

Phenotype 3: strain that induces a strong protective immune response early during infection and shows less virulence

Animals infected with strain 2008920 survived better than H37Rv-infected animals, with 70% survival compared with 30% survival at 16 weeks postinfection (Fig. 1c). This was coincident with lower CFUs and less lung surface affected by pneumonia at 4 months postinfection (Figs 2c and 3c). The study of cytokine expression in infected lungs showed that this strain induced higher expression of IFN- γ during the first week in comparison with H37Rv, and this was maintained during progressive disease (Fig. 4a). Interleukin-4 was expressed at low levels (Fig. 4b), whereas expression of TNF- α was significantly higher during early and late disease (Fig. 4c). It would seem that strain 2008920 is less virulent and stimulates an

effective, protective cellular immune response. The bacillus loads in the lungs of contact animals were similar to those produced by H37Rv-infected mice (Fig. 5c), but the induced DTH was significantly higher after 1 month (data not shown). The clinical/epidemiological picture of these strains was one of 'poorly transmissible', with most of the household contacts of the TB patient who harboured strain 2008920 remaining skin test negative, although the strain belonged to a small cluster of three members.

Phenotype 4: strains that eventually induced a protective acquired immune response, and were less virulent

Several strains showed this pattern. For example, 9985449, which was classified as a 'long' latency isolate from the clinical/epidemiological data. Animals infected with this strain showed an increased survival rate of 90% after 16 weeks of infection (Fig. 1e), with lung bacterial loads and pneumonic areas less than those seen in H37Rv-infected mice at all time-points (Figs 2e and 3e). During early infection (first month) and in comparison with H37Rv, this strain induced lower levels of IFN- γ , followed by very high and sustained IFN- γ . However, there was very high TNF- α expression from the first day of infection with significantly lower IL-4 expression (Fig. 4). Strains 1015312, 1036226, 3004245 and 2013094 produced a similar mouse phenotype (Figs 1–3).

In the transmission experiments, healthy contact animals cohoused with mice infected with these strains showed similar lung CFU to contacts of H37Rv-infected animals (Fig. 5d,e). Similar DTH responses were also seen after 1 month of cohousing (data not shown). Of the five

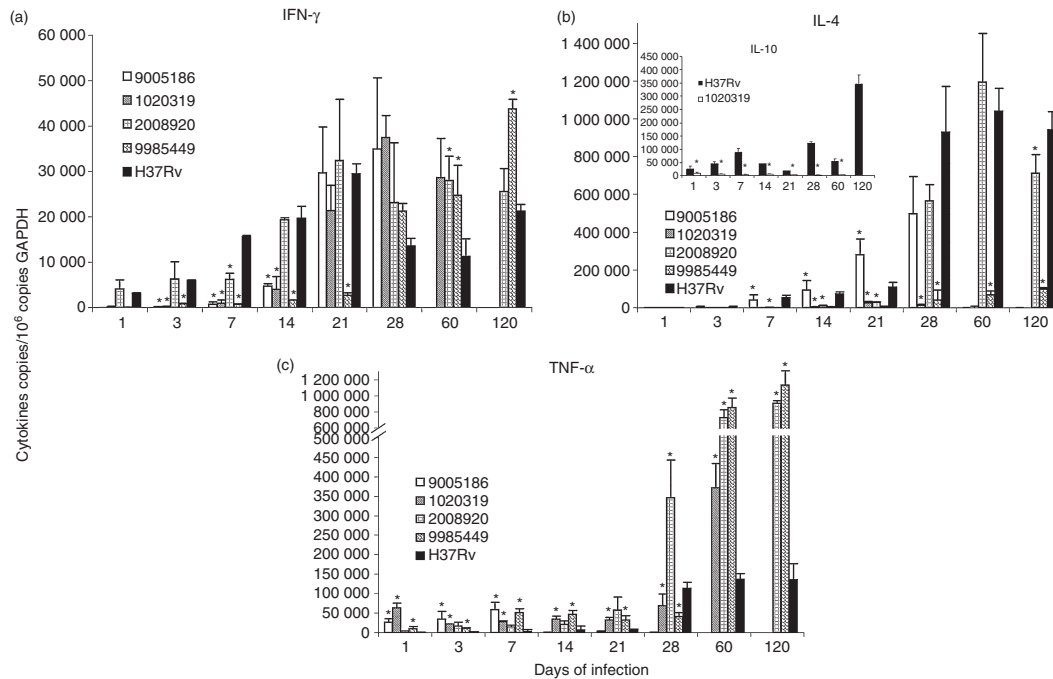


Figure 4. Gene expression of cytokines determined by real-time reverse transcription–polymerase chain reaction in the infected lungs. BALB/c mice were infected with the indicated *Mycobacterium tuberculosis* strain and killed at different time-points. The lungs from four different animals at each time-point were used to determine the gene expression of interferon- γ (IFN- γ), interleukin-4 (IL-4) and tumour necrosis factor- α (TNF- α). In comparison with control strain H37Rv (black bars), clinical isolate 9005186 (white bars) induced delayed IFN- γ expression (a), rapid and higher IL-4 expression (b), and higher but ephemeral TNF- α expression (c). After the first month of infection, clinical isolate 1020319 (diagonal lines) induced higher expression of IFN- γ (a), with very low IL-4 and IL-10 expression (b) and constantly higher TNF- α (c). Strain 2008920 (white squares) induced higher IFN- γ expression during the first week and later infection (a), lower IL-4 (b) and higher TNF- α expression (c) during late disease. Strain 9985449 (hatched bars) induced lower IFN- γ expression during early disease, followed by very high and sustained IFN- γ ; lower IL-4 during late disease and higher TNF- α expression particularly during the first month of infection. Data are the means and standard deviation. *Statistically significant ($P < 0.05$) when compared with mice infected with H37Rv strain.

strains that demonstrated this phenotype, strains 1036226 and 2013094 were recovered from patients whose household contacts were mostly tuberculin negative; both strains had unique fingerprints. Therefore, the clinical/epidemiological picture for these strains fitted well with the murine phenotype. The other three strains did not match because they produced rapid skin test conversion among household contacts (1015312), monoresistance to streptomycin but belonged to a cluster of 11 members (09985449) and high frequency of tuberculin reactivity among household contacts (3004245).

Discussion

In this study, we took advantage of our population-based study,^{17,19,25} to select a panel of isolates representing clinical/epidemiological diversity, and tested them in two animal models. The first model has been previously

characterized by our group,^{7,11–14,24} and is based on time to death, bacterial load, tissue damage and immunology kinetics. The second model is new and additionally considers bacterial pulmonary load and delayed tuberculin reactivity among healthy mice that are cohoused with infected animals. Based upon these markers, we were able to identify four clearly defined strain phenotypes in the mouse models. However, there was no absolute correlation with the clinical/epidemiological criteria. We found that rapid death, higher bacterial loads, more tissue damage, immunological responses consistent with a Th2 response and transmission of infection to contact animals (phenotypes 1 and 2) correlated with indicators of transmission in the community, such as size of cluster and tuberculin reactivity (strain 09005186) or rapid progression to disease (1020319) among household contacts. However, when we analysed the mouse-model phenotypes (3 and 4) characterized by slower time to death, lower

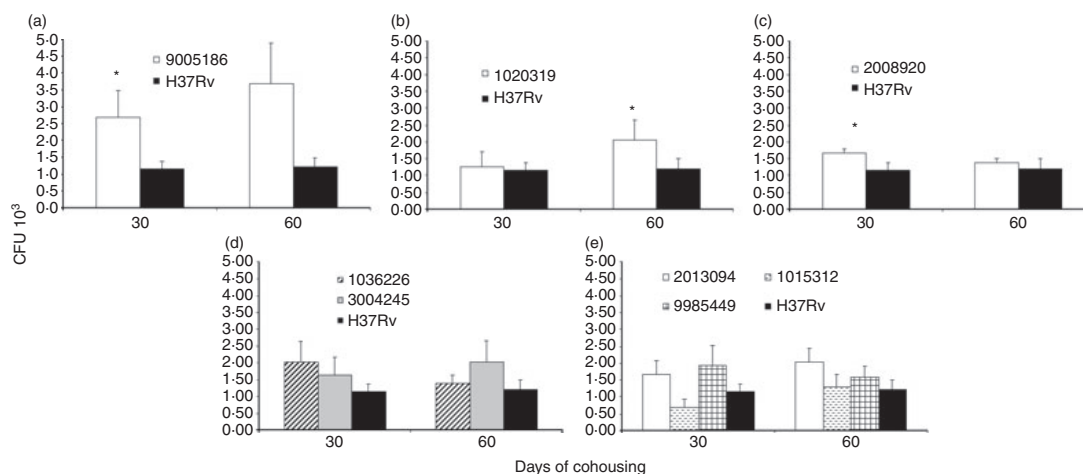


Figure 5. Pulmonary bacillary loads in animals with natural infection after cohousing with infected mice (transmissibility model). Groups of five infected mice with the indicated strain were cohoused with five naïve mice for 1 or 2 months, after which they were killed and their lungs were cultured to determine bacterial colony forming units (CFU). Data are means and standard deviation. *Statistically significant ($P < 0.05$) when compared with the control group.

bacterial loads, less tissue damage, cytokines indicating a Th1 response and absence or very little transmission to contacts, only two of six tested strains showed consistent patterns. These strains showed reduced transmission in the community (very few tuberculin-positive household contacts and unique fingerprint patterns, strains 1036226 and 2013094).

Our transmissibility model tries to reproduce the close and prolonged contact between patients with TB and household contacts using microisolator cages where infected animals and naïve mice lived together during 2 months. Lung CFUs demonstrated that this close contact efficiently permitted the natural infection of naïve animals, and also induced activation of cellular immunity, as was demonstrated by the DTH responses. Linkage between high transmissibility and high virulence governs the evolution of a wide range of infectious organisms,²⁶ particularly when the virulence is associated with pathogen rate of replication and transmission.²⁷ Animals that were exposed to the more virulent strain 09005186 developed the hallmark of progressive disease (pneumonic patches) after 2 months of cohousing, whereas the other low or intermediate virulence strains only induced small granulomas and chronic inflammatory infiltrates (data not shown). Transmission of bacilli from infected to naïve contact mice probably resulted from coprophagia because only faeces produced positive cultures.

The first pattern was represented by a more virulent, highly transmissible organism (09005186) with lower and delayed expression of IFN- γ and more rapid and higher IL-4 expression and ephemeral TNF- α production. Both IFN- γ , leading to macrophage activation,²⁸ and the

emergence of a Th2 response counteracting the protective Th1 response through IL-4 expression correlate with the severity of human and murine disease.^{29,30} Interestingly, 30 days after infection there were high bacillary loads despite high IFN- γ expression, suggesting involvement of other protective mechanisms. The clinical/epidemiological profile of strain 09005186 fits these criteria well because it formed a large clone overrepresented in the community, and produced higher tuberculin reactivity among household contacts.

The second pattern was represented by strain 1020319, which was a more virulent strain with higher IFN- γ and TNF- α expression associated with very low IL-4 and IL-10 expression during the progressive phase of the disease (after 1 month of infection) resulting in significantly higher lung inflammation and death. High expression of IFN- γ has been observed in human TB, while experimental lymphocytic lung infiltration, associated with specific mycobacterial genes,²⁷ has been correlated with immunopathology rather than protection. Consequently, very low production of immunomodulatory cytokines together with high production of proinflammatory cytokines induced death by immunopathology. This clinical isolate showed similar lung bacillus counts to H37Rv in the transmissibility model but higher DTH, indicating strong inflammatory responses. From the epidemiological point of view, strain 102319 was classified as a member of the 'short latency' group; it was part of a cluster and produced active disease in a household contact suggesting that this strain was efficient in producing active disease.

The third pattern was related to a less virulent strain (2008920) which induced an early and vigorous protective

immune response resulting in lower mortality, decreased bacillus loads and less tissue damage. This strain also induced rapid and higher IFN- γ expression with lower IL-4 production, whereas during late disease IFN- γ expression was maintained at high levels with significantly higher expression of TNF- γ , and mild expression of IL-4 resulting in efficient and rapid protective cellular immune response, without excessive lung consolidation. Transmissibility experiments showed higher DTH after 1 month. This strain is similar to isolate CDC 1551, which also induced strong Th1 responses in mice and is not hyper-virulent.⁵ We were unable to correlate this mouse phenotype with the clinical epidemiological data.

The fourth pattern was related to less virulent strains with delayed acquired protective immune responses. Five clinical isolates showed these characteristics (strains 2013094, 1015312, 3004245, 09985449 and 1036226). These clinical isolates induced higher IFN- γ expression after 1 month of infection, contrasting with progressive disease and the decline of this Th1 cytokine in controls. Delayed activation of a Th1 response together with early higher TNF- α expression suggested that innate immunity could be a significant factor for efficient control of early infection. Contrasting with previous observations,³¹ beta-defensins were not involved in the early efficient control of bacillus growth (data not shown). These clinical isolates showed transmissibility that was similar to (strains 3004245, 2013094, 1015312) or lower than (strain 2013094) that of H37Rv in the murine model. When the clinical and epidemiological characteristics were reviewed only strains 1036226 and 2013094 showed reduced transmission in the community.

It is important to emphasize that all of these strains had similar *in vitro* phenotypes (cord formation, growth curves, response to exposure to hydrogen peroxide, data not shown). Moreover, our data suggest that the current use of H37Rv as the standard for animal models may be flawed because there were important differences in pathology caused by H37Rv.

Our results warrant further studies using subtractive genomics, transcriptome hybridization and comparative proteomics to better identify the extent to which the genetic and genomic diversity of *M. tuberculosis* is correlated with the quality of the host immune response.

Acknowledgements

We thank the population, patients and health-care workers of the Orizaba Health Jurisdiction, Mexico, for their generous support and cooperation; Dr Carmen Soler for performing the HIV tests, Drs Manuel Tielve, Ruben Acevedo and Luis Felipe Alva for chest radiograph interpretation, and the personnel of the Orizaba health jurisdiction who supported the study among patients. This study was supported by the Mexican Secretariat of Health, the National

Institutes of Health of the United States (A135969 and K01TW000001), Wellcome Trust (176W009), Howard Hughes Medical Institute (55000632) and by the Mexican Council of Science and Technology (G26264M, 30987-M, SALUD-2003-C01-132-A-1). Ms Brenda Marquina received a doctoral scholarship from the Posgrado en Ciencias Biomédicas, Fac. Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Funding agencies did not participate in the study design, nor did they participate in the decision to submit the paper for publication.

References

- 1 Bloom BR, Murray CJ. Tuberculosis: commentary on a re-emergent killer. *Science* 1992; **257**:1055–64.
- 2 Vynnycky E, Fine PE. The natural history of tuberculosis: the implications of age-dependent risks of disease and the role of reinfection. *Epidemiol Infect* 1997; **119**:183–201.
- 3 Gutacker MM, Smoot JC, Migliaccio CA *et al.* Genome-wide analysis of synonymous single nucleotide polymorphisms in *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms: resolution of genetic relationships among closely related microbial strains. *Genetics* 2002; **162**:1533–43.
- 4 Nardell EA. Environmental control of tuberculosis. *Med Clin North Am* 1993; **77**:1315–34.
- 5 Manca C, Tsenova L, Barry CE. 3rd *et al.* *Mycobacterium tuberculosis* CDC1551 induces a more vigorous host response *in vivo* and *in vitro*, but is not more virulent than other clinical isolates. *J Immunol* 1999; **162**:6740–6.
- 6 Manca C, Tsenova L, Bergtold A *et al.* Virulence of a *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolate in mice is determined by failure to induce Th1 type immunity and is associated with induction of IFN-alpha/beta. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; **98**:5752–7.
- 7 Dormans J, Burger M, Aguilar D, Hernandez-Pando R, Kremer K, Roholl P, Arend SM, Van Soolingen D. Correlation of virulence, lung pathology, bacterial load and delayed type hypersensitivity responses after infection with different *Mycobacterium tuberculosis* genotypes in a BALB/c mouse model. *Clin Exp Immunol* 2004; **137**:460–8.
- 8 Fleischmann RD, Alland D, Eisen JA *et al.* Whole-genome comparison of *Mycobacterium tuberculosis* clinical and laboratory strains. *J Bacteriol* 2002; **184**:5479–90.
- 9 Lopez B, Aguilar D, Orozco H *et al.* A marked difference in pathogenesis and immune response induced by different *Mycobacterium tuberculosis* genotypes. *Clin Exp Immunol* 2003; **133**:30–7.
- 10 Malik AN, Godfrey-Faussett P. Effects of genetic variability of *Mycobacterium tuberculosis* strains on the presentation of disease. *Lancet Infect Dis* 2005; **5**:174–83.
- 11 Hernandez-Pando R, Orozco H, Arriaga K, Sampieri A, Larriva-Sahd J, Madrid-Marina V. 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**:607–17.
- 12 Hernandez-Pando R, Orozco H, Sampieri A, Pavon L, Velasquillo C, Larriva-Sahd J, Alcocer JM, Madrid MV. Correlation between the kinetics of Th1, Th2 cells and pathology in a mur-

- ine model of experimental pulmonary tuberculosis. *Immunology* 1996; **89**:26–33.
- 13 Hernandez-Pando R, Pavon L, Arriaga K, Orozco H, Madrid-Marina V, Rook G. Pathogenesis of tuberculosis in mice exposed to low and high doses of an environmental mycobacterial saprophyte before infection. *Infect Immun* 1997; **65**:3317–27.
 - 14 Infante E, Aguilar LD, Gicquel B, Pando RH. Immunogenicity and protective efficacy of the *Mycobacterium tuberculosis* fadD26 mutant. *Clin Exp Immunol* 2005; **141**:21–8.
 - 15 Lipsitch M, Moxon ER. Virulence and transmissibility of pathogens: what is the relationship? *Trends Microbiol* 1997; **5**:31–7.
 - 16 Garcia-Garcia M, Palacios-Martinez M, Ponce-de-Leon A *et al.* The role of core groups in transmitting *Mycobacterium tuberculosis* in a high prevalence community in Southern Mexico. *Int J Tuberc Lung Dis* 2000; **4**:12–7.
 - 17 Garcia-Garcia ML, Jimenez-Corona ME, Ponce-de-Leon A *et al.* *Mycobacterium tuberculosis* drug resistance in a suburban community in southern Mexico. *Int J Tuberc Lung Dis* 2000; **4**:S168–70.
 - 18 Garcia-Garcia ML, Small PM, Garcia-Sancho C *et al.* Tuberculosis epidemiology and control in Veracruz, Mexico. *Int J Epidemiol* 1999; **28**:135–40.
 - 19 Jimenez-Corona ME, Garcia-Garcia L, DeRiemer K *et al.* Gender differentials of pulmonary tuberculosis transmission and reactivation in an endemic area. *Thorax* 2006; **61**:348–53.
 - 20 DeRiemer K, Garcia-Garcia L, Bobadilla-del-Valle M, Palacios-Martinez M, Martinez-Gamboa A, Small PM, Sifuentes-Osornio J, Ponce-de-Leon A. Does DOTS work in populations with drug-resistant tuberculosis? *Lancet* 2005; **365**:1239–45.
 - 21 Garcia-Garcia Mde L, Ponce-De-Leon A, Garcia-Sancho MC *et al.* Tuberculosis-related deaths within a well-functioning DOTS control program. *Emerg Infect Dis* 2002; **8**:1327–33.
 - 22 Secretaria de Salud. *Norma Oficial Mexicana NOM-006-ssa2-1993, para la prevención y control de la tuberculosis en la atención primaria a la salud.* Río Amazonas, México: Diario Oficial de la Federación, 1995:20–9.
 - 23 Anonymous. Screening for tuberculosis and tuberculosis infection in high-risk populations. Recommendations of the Advisory Council for the Elimination of Tuberculosis. *MMWR Recomm Rep* 1995; **44**:19–34.
 - 24 Jarnagin JL, Luchsinger DW. The use of fluorescein diacetate and ethidium bromide as a stain for evaluating viability of mycobacteria. *Stain Technol* 1980; **55**:253–8.
 - 25 Garcia-Garcia ML, Ponce de Leon A, Jimenez-Corona ME *et al.* Clinical consequences and transmissibility of drug-resistant tuberculosis in southern Mexico. *Arch Intern Med* 2000; **160**:630–6.
 - 26 Ewald P. *Evolution of Infectious Disease.* New York: Oxford University Press, 1994.
 - 27 Kaushal D, Schroeder BG, Tyagi S *et al.* Reduced immunopathology and mortality despite tissue persistence in a *Mycobacterium tuberculosis* mutant lacking alternative sigma factor, SigH. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; **99**:8330–5.
 - 28 Ottenhoff TH, Verreck FA, Hoeve MA, Van de Vosse E. Control of human host immunity to mycobacteria. *Tuberculosis (Edinb)* 2005; **85**:53–64.
 - 29 Seah GT, Scott GM, Rook GA. Type 2 cytokine gene activation and its relationship to extent of disease in patients with tuberculosis. *J Infect Dis* 2000; **181**:385–9.
 - 30 van Crevel R, Karyadi E, Preyers F, Leenders M, Kullberg BJ, Nelwan RH, van der Meer JW. Increased production of interleukin 4 by CD4+ and CD8+ T cells from patients with tuberculosis is related to the presence of pulmonary cavities. *J Infect Dis* 2000; **181**:1194–7.
 - 31 Rivas-Santiago B, Sada E, Tsutsumi V, Aguilar-Leon D, Contreras JL, Hernandez-Pando R. Beta-defensin gene expression during the course of experimental tuberculosis infection. *J Infect Dis* 2006; **194**:697–701.

Los conocimientos adquiridos durante mi estancia en el doctorado me permitieron contribuir en los siguientes trabajos.

Transgenic tomato expressing interleukin-12 has a therapeutic effect in a murine model of progressive pulmonary tuberculosis

A. L. Elías-López,* B. Marquina,*
A. Gutiérrez-Ortega,† D. Aguilar,*
M. Gomez-Lim† and
R. Hernández-Pando*

*Instituto Nacional de Ciencias Médicas y
Nutrición 'Salvador Zubirán', Departamento de
Patología, Patología Experimental, and
†Departamento de Ingeniería Genética de
Plantas, Centro de Investigación y de Estudios
Avanzados del IPN, Unidad Irapuato

Accepted for publication 10 June 2008

Correspondence: R. Hernández-Pando, Experimental Pathology, National Institute of Medical Sciences and Nutrition 'Salvador Zubirán', Calle Vasco de Quiroga 15, Tlalpan, CP 14000, México DF, México.
E-mail: rhpando@quetzal.innsz.mx

Introduction

Tuberculosis (TB) is one of the most pervasive diseases nowadays, with over one-third of the world population infected with *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) and 2 million deaths every year [1]. After primary infection, only 5–10% of the infected hosts develop active disease, whereas a high percentage of the remainder experience latent infection [2]. Depending on the nature and extent of the host response to infection, there can be tissue damage and even death [3]. Anti-mycobacterial therapy remains the cornerstone in controlling TB. Given the increase in numbers of immunosuppressed individuals at risk for infection and the rising prevalence of multi-drug-resistant (MDR) isolates, other therapeutic options for TB, such as immunomodulators, are becoming attractive [4].

Host control of mycobacterial infection, in both human and mouse models, has been associated with the production of interferon (IFN)- γ by CD4⁺ T cells [3]. Interleukin (IL)-12 is known to be a crucial cytokine in the differentiation of

Summary

Host control of mycobacterial infection, in both human and mouse models, has been shown to be associated with the production of interferon (IFN)- γ by CD4⁺ T cells. Interleukin (IL)-12 is known to be a crucial cytokine in the differentiation of IFN- γ -producing T helper 1 (Th1) cells. To determine whether continuous administration of IL-12 expressed in transgenic tomato (TT-IL-12) has therapeutic efficacy in a murine model of pulmonary tuberculosis, BALB/c mice were infected with either *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv strain or a multi-drug-resistant clinical isolate (MDR) and treated with a daily oral dose of TT-IL12 crude fruit extracts. For the early H37Rv infection, TT-IL-12 administration was started 1 day before infection and continued for 60 days. In the H37Rv or MDR late infection, treatment was started 60 days after infection and continued for another 60 days. In both phases of infection, TT-IL-12 administration resulted in a reduction of bacterial loads and tissue damage compared with wild-type tomato (non-TT). The Th1 response was increased and the Th2 response was reduced. In the late infection, a long-term treatment with TT-IL-12 was necessary. We demonstrate that TT-IL-12 increases resistance to infection and reduces lung tissue damage during early and late drug-sensitive and drug-resistant mycobacterial infection.

Keywords: IL-12, multi-drug-resistant tuberculosis, oral therapy, pulmonary tuberculosis, transgenic tomato

IFN- γ -producing T helper 1 (Th1) cells [5]. This cytokine has two subunits, p35 and p40, and is produced by dendritic cells and phagocytes after microbial or cytokine stimulation. After its production, IL-12 can direct the proliferation and activation of T lymphocytes, natural killer (NK) cells and NK T cells and can induce both IFN- γ and increased cytotoxic activity. The IL-12 receptor has two chains, beta 1 and beta 2, the latter being expressed mainly by Th1 cells [5]. Multiple reports have shown that the administration of a neutralizing antibody against IL-12 [6] or using IL-12 knock-out mice (p35^{-/-}, p40^{-/-} or p35^{-/-}-p40^{-/-}) decreases the IFN- γ response and increases susceptibility to Mtb infection [7,8]. Furthermore, early administration of recombinant IL-12 (rIL-12) to Mtb-infected mice reduced bacterial burdens and improved survival rate [9]. In addition, chronic TB IL-12-reconstituted IL-12p40^{-/-} mice showed restricted mycobacterial growth and prolonged survival, as well as long-term protection to Mtb-challenged RAG^{-/-} mice by adoptive transference of CD4⁺ T cells isolated from wild-type infected mice [2]. Although the aforementioned experiments established an essential role for

Investigación sobre epidemiología convencional y molecular de tuberculosis en Orizaba, Veracruz, 1995-2008

Ma Eugenia Jiménez-Corona, MC, Dra en C,⁽¹⁾ Lourdes García-García, MC, Dra en C,⁽¹⁾ Alfredo Ponce de León, MC,⁽²⁾ Miriam Bobadilla-del Valle, QFB, Dra en C,⁽²⁾ Martha Torres, QFB, Dra en C,⁽³⁾ Sergio Canizales-Quintero, Biól,⁽¹⁾ Carmen Palacios-Merino, MC,⁽¹⁾ Susana Molina-Hernández, QFB,⁽¹⁾ Rosa Areli Martínez-Gamboa, Dra en C,⁽²⁾ Luis Juárez-Sandino, TI,⁽¹⁾ Bulmaro Cano-Arellano, Ing en C,⁽¹⁾ Leticia Ferreyra-Reyes, MC,⁽¹⁾ Luis Pablo Cruz-Hervert, Lic en Odont,⁽¹⁾ Renata Báez-Saldaña, MC, Dra en C,⁽¹⁾ Elizabeth Ferreira-Guerrero, MC,⁽¹⁾ Eduardo Sada, MC,⁽³⁾ Brenda Marquina, MC,⁽²⁾ José Sifuentes-Osornio, MC.⁽²⁾

Jiménez-Corona ME, García-García L, Ponce de León A, Bobadilla-del Valle M, Torres M, Canizales-Quintero S, Palacios-Merino C, Molina-Hernández S, Martínez-Gamboa RA, Juárez-Sandino L, Cano-Arellano B, Ferreyra-Reyes L, Cruz-Hervert LP, Báez-Saldaña R, Ferreira-Guerrero E, Sada E, Marquina B, Sifuentes-Osornio J. Investigación sobre epidemiología convencional y molecular de tuberculosis en Orizaba, Veracruz, 1995-2008. *Salud Publica Mex* 2009;51 suppl 3:S470-S478.

Jiménez-Corona ME, García-García L, Ponce de León A, Bobadilla-del Valle M, Torres M, Canizales-Quintero S, Palacios-Merino C, Molina-Hernández S, Martínez-Gamboa RA, Juárez-Sandino L, Cano-Arellano B, Ferreyra-Reyes L, Cruz-Hervert LP, Báez-Saldaña R, Ferreira-Guerrero E, Sada E, Marquina B, Sifuentes-Osornio J. Research on conventional and molecular epidemiology of tuberculosis in Orizaba, Veracruz, 1995-2008. *Salud Publica Mex* 2009;51 suppl 3:S470-S478.

Resumen

Se describen los resultados de investigación del Consorcio Mexicano contra la Tuberculosis, en la Jurisdicción Sanitaria de Orizaba, Veracruz, entre 1995 y 2008. Las aportaciones principales de los trabajos se refieren a los siguientes rubros: 1. Epidemiología convencional y molecular (medición de la carga de la enfermedad, tendencias, factores de riesgo y grupos vulnerables; descripción de las consecuencias de la farmacorresistencia e identificación de factores que favorecen la transmisión en la comunidad y en los hospitales). 2. Desarrollo de técnicas rápidas para conservación de muestras respiratorias que permitan el aislamiento y diagnóstico de farmacorresistencia de *M. tuberculosis* en campo. 3. Evaluación de la prueba tuberculínica, respuesta inmunológica al Bacilo de Calmette-Guerin (BCG), biomarcadores de la respuesta inmunitaria y medidas de control. 4. Comentarios en torno a aspectos éticos de la investigación en tuberculosis. Además se describe el impacto en políticas públicas, la transferencia de tecnología, la formación de recursos humanos y las perspectivas a futuro.

Palabras clave: tuberculosis; epidemiología molecular; transmisión; México

Abstract

This study describes the achievements of the Mexican Consortium against Tuberculosis, in the Sanitary District of Orizaba, Veracruz, Mexico between 1995 and 2008. In brief, the main results can be classified as follows: 1) Conventional and molecular epidemiology (measurement of burden of disease, trends, risk factors and vulnerable groups, consequences of drug resistance, identification of factors that favor nosocomial and community transmission); 2) Development of diagnostic techniques to detect drug resistance, description of circulating clones and adaptation of simple techniques to be used in the field; 3) Evaluation of usefulness of tuberculin skin test, immunologic responses to BCG, impact of directly observed therapy for tuberculosis (DOTS), and study of immunological biomarkers and 4) Comments on ethical aspects of tuberculosis research. Additionally, we describe the impact on public policies, transference of technology, capacity building and future perspectives.

Key words: tuberculosis; molecular epidemiology; transmission; Mexico

- (1) Instituto Nacional de Salud Pública. Cuernavaca, Morelos, México.
 (2) Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. México, DF, México.
 (3) Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias. México, DF, México.

Fecha de recibido: 28 de julio de 2008 • Fecha de aceptado: 14 de noviembre de 2008

Solicitud de sobretiros: Dra. Lourdes García-García. Centro de Investigación sobre Enfermedades Infecciosas, Instituto Nacional de Salud Pública.

Av. Universidad 655, col. Santa María Ahuacatlán. 62100, Cuernavaca, Mor. México.

Correo electrónico: garcigarm@gmail.com



MODEL SYSTEMS

Specific bacterial genotypes of *Mycobacterium tuberculosis* cause extensive dissemination and brain infection in an experimental modelRogelio Hernandez Pando^{a,*}, Diana Aguilar^a, Ingrid Cohen^b, Martha Guerrero^c, Wellman Ribon^c, Patricia Acosta^a, Hector Orozco^a, Brenda Marquina^a, Citlal Salinas^d, Daniel Rembao^d, Clara Espitia^b^a Experimental Pathology Section, Department of Pathology, National Institute of Medical Sciences, Mexico City, Mexico^b Department of Immunology, Biomedical Research Institute, National Autonomous University of Mexico, Mexico City, Mexico^c Mycobacteria Group, Research Division, National Institute of Health, Bogotá, Colombia^d Department of Pathology, National Institute of Neurology and Neurosurgery, Mexico City, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 December 2009

Received in revised form

7 May 2010

Accepted 10 May 2010

Keywords:

Meningeal tuberculosis

Experimental models

Mycobacterial hematogenous dissemination

Tuberculosis immunopathology

SUMMARY

Meningeal tuberculosis is a severe type of extrapulmonary disease, which is thought to begin with respiratory infection, followed by hematogenous dissemination and brain infection. Host genetic susceptibility factors and specific mycobacterial substrains could be involved in its development. From an epidemiological study in Colombia, we selected three *Mycobacterium tuberculosis* clinical strains isolated from the cerebrospinal fluid (CSF) of patients with meningeal tuberculosis, and used them to infect BALB/c mice through the intratracheal route. These strains showed a distinctive spoligotype pattern. The course of infection in terms of strain virulence (mice survival, bacillary loads in lungs), bacilli dissemination and extrapulmonary infection (bacilli loads in blood, brain, liver, kidney and spleen), and immune responses (cytokine expression determined by real time PCR in brain and lung) was studied and compared with that induced by the laboratory strain H37Rv and other five clinical strains isolated from patients with pulmonary TB. All the clinical isolates from meningeal TB patients disseminated extensively through the hematogenous route infecting the brain, producing inflammation in the cerebral parenchyma and meninges, whereas H37Rv and clinical isolates from pulmonary TB patients showed very limited efficiency to infect the brain. Thus, it seems that mycobacterial strains with a distinctive genotype are able to disseminate extensively after the respiratory infection and infect the brain.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Tuberculosis involvement of the central nervous system (CNS) is a serious type of extrapulmonary disease, it constitutes approximately 5–15% of the extrapulmonary cases and is often fatal.¹ There are different clinical/pathological types of cerebral tuberculosis; the most common is tuberculous meningitis.² It is believed that cerebral tuberculosis, like any other form of tuberculosis, begins with respiratory infection followed by hematogenous dissemination to extrapulmonary sites. On the basis of their clinical and experimental observations, Rich and Mc Cordock suggested that cerebral tuberculosis develops in two stages. Initially small tuberculous

lesions (Rich's foci) develop in the brain during the bacteremia stage of the primary infection. These early lesions can be located in the subpial or subependymal surface, and may remain dormant for long time. Later, rupture or growth of these lesions into the sub-arachnoidal space or into the ventricular system produces meningitis.³

Animal models of cerebral tuberculosis have been established in rabbits,^{4,5} mice^{6,7} and pigs.⁸ Although they reproduce the human lesions to some extent, these models are artificial because they use the direct intracerebral or intravenous route of infection, instead of the natural respiratory route. Thus, it is important to establish an experimental model that reproduces more closely the human disease, including the initial respiratory route of infection. However, such a model is difficult to achieve because of the efficient CNS protection conferred by the blood–brain-barrier (BBB).⁹ The BBB is composed of tightly associated endothelial cells covered by pericytes and outgrowths of astrocytes, so to produce CNS infection some microorganisms have evolved specific virulence factors that permit endothelial invasion followed by brain

* Corresponding author. Experimental Pathology Section, Department of Pathology, National Institute of Medical Sciences and Nutrition "Salvador Zubirán", Calle Vasco de Quiroga 15, Tlalpan, CP 14000, Mexico City, Mexico. Tel./fax: +52 55 54 85 34 91.

E-mail addresses: rhdezpando@hotmail.com, rhpando@quetzal.innsz.mx (R. Hernandez Pando).

Overexpression of Na_v1.6 channels is associated with the invasion capacity of human cervical cancer

Everardo Hernandez-Plata¹, Cindy S. Ortiz², Brenda Marquina-Castillo², Ingrid Medina-Martinez³, Ana Alfaro³, Jaime Berumen³, Manuel Rivera¹ and Juan C. Gomora¹

¹División de Neurociencias, Departamento de Neuropatología Molecular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México, DF, México

²Departamento de Patología, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, México, DF, México

³Unidad de Medicina Genómica, Hospital General de México/Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México, DF, México

Functional activity of voltage-gated sodium channels (VGSC) has been associated to the invasion and metastasis behaviors of prostate, breast and some other types of cancer. We previously reported the functional expression of VGSC in primary cultures and biopsies derived from cervical cancer (CaC). Here, we investigate the relative expression levels of VGSC subunits and its possible role in CaC. Quantitative real-time PCR revealed that mRNA levels of Na_v1.6 α -subunit in CaC samples were ~40-fold higher than in noncancerous cervical (NCC) biopsies. A Na_v1.7 α -subunit variant also showed increased mRNA levels in CaC (~20-fold). All four Na_v β subunits were also detected in CaC samples, being Na_v β 1 the most abundant. Proteins of Na_v1.6 and Na_v1.7 α -subunits were immunolocalized in both NCC and CaC biopsies and in CaC primary cultures as well; however, although in NCC sections proteins were mainly relegated to the plasma membrane, in CaC biopsies and primary cultures the respective signal was stronger and widely distributed in both cytoplasm and plasma membrane. Functional activity of Na_v1.6 channels in the plasma membrane of CaC cells was confirmed by whole-cell patch-clamp experiments using Cn2, a Na_v1.6-specific toxin, which blocked ~30% of the total sodium current. Blocking of sodium channels VGSC with tetrodotoxin and Cn2 did not affect proliferation neither migration, but reduced by ~20% the invasiveness of CaC primary culture cells *in vitro* assays. We conclude that Na_v1.6 is upregulated in CaC and could serve as a novel molecular marker for the metastatic behavior of this carcinoma.

Cervical cancer (CaC) is the third most common female tumor worldwide and the second in developing countries, with an estimated annual incidence of 452,000 cases.¹ In view of

Key words: cervical cancer, Na_v1.6, invasiveness, molecular marker, Na_v1.7

Abbreviations: CaC: cervical cancer; Cn2: B-class toxin from the scorpion *Centruroides noxius*; *HPRT1*: hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1; HPV: human papillomavirus; Na_v1.6: voltage-gated sodium channel α -subunit encoded by the *SCN8A* gene; Na_v β 1: voltage-gated sodium channel β -subunit encoded by the *SCN1B* gene; NCC: noncancerous cervix; TTX: tetrodotoxin; VGSC: voltage-gated sodium channels
Additional Supporting Information may be found in the online version of this article

Conflicts of interest: None

Grant sponsor: Instituto de Ciencia y Tecnología del DF (ICYTDF);

Grant number: PICDS08-28; **Grant sponsor:** Dirección General de Asuntos del Personal Académico of the Universidad Nacional Autónoma de México (DGAPA-UNAM); **Grant number:** IN206008
DOI: 10.1002/ijc.26210

History: Received 16 Mar 2011; Accepted 16 May 2011; Online 31 May 2011

Correspondence to: Juan C. Gomora, División de Neurociencias, Departamento de Neuropatología Molecular, Instituto de Fisiología Celular, UNAM, Mexico City, 04510 México, Tel.: +(52-55)-5622-5752, Fax: +(52-55)-5622-5607, E-mail: jgomora@ifc.unam.mx

the finding that carcinogenic human papillomavirus (HPV) infections cause virtually all CaC cases, recently a new approach for CaC prevention has emerged with the HPV vaccination of younger women (aged ≤ 18 years).² Despite the highly significant advance that the vaccine itself represents, a mathematical model has predicted an increase in CaC incidence if vaccination is not followed by a continuous Pap smear screening program.³ Therefore, the finding of effective diagnosis and therapeutic strategies for CaC still remains as a priority.

Lately, there has been an increasing amount of evidences that correlate the function of ion channels with several aspects of cancer progression.^{4,5} In particular, voltage-gated sodium channels (VGSC) have been clearly associated to invasion and metastasis behaviors in several types of cancer, including breast, colon, lung, ovary and prostate.⁶⁻¹⁰ Sodium channels are protein complexes formed by a large α -subunit and smaller auxiliary β -subunits. The α -subunit alone is sufficient to form a functional channel, but its biophysical properties, trafficking and anchoring to the cell membrane are modulated by β -subunits.¹¹ The VGSC family is composed by nine different α -subunits (Na_v1.1–Na_v1.9) and four β -subunits (Na_v β 1–Na_v β 4); all of them have been cloned, functionally expressed and characterized.¹² A useful tool to discriminate among VGSC is their sensitivity to tetrodotoxin (TTX); Na_v1.1–Na_v1.4, Na_v1.6 and Na_v1.7 are blocked by nanomolar concentrations of TTX, whereas Na_v1.5, Na_v1.8



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Infection, Genetics and Evolution

journal homepage: www.elsevier.com/locate/meegid

Use of mouse models to study the variability in virulence associated with specific genotypic lineages of *Mycobacterium tuberculosis*

R. Hernández-Pando*, B. Marquina-Castillo, J. Barrios-Payán, D. Mata-Espinosa

Experimental Pathology Section, Department of Pathology, National Institute of Medical Sciences and Nutrition "Salvador Zubiran", Mexico City, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:
Available online 8 March 2012

Keywords:
Tuberculosis
Genotype
Mouse models
Pathogenesis
Virulence
Immune response

ABSTRACT

The host response against *Mycobacterium tuberculosis* show a wide spectrum of clinical manifestations in those patients who fail to control the infection. The course of the infection and its epidemiological consequences depend upon a complex interplay of host, environmental and bacterial factors. Experimental animal models have helped to define the influence of bacterial genetic diversity on virulence and on the immune response that is induced. For this purpose, experimental animals such as mice, guinea pigs and rabbits have been infected with selected clinical isolates obtained from outbreaks or from clinical epidemiology settings. Here we review the contribution of mouse models to defining the variability in virulence and immune response in relation to mycobacterial genetic diversity. Low dose aerosol infection in C57Bl mice or high dose intratracheal infection in BALB/c mice have demonstrated wide variability in virulence and immune responses induced by different bacterial genotypes, and each genotype has different phenotypes, with high and low virulence variants. In general, these studies have shown that high prevalent strains from big clusters are more virulent than low prevalent sporadic clinical isolates, and highly virulent strains induce non-protective immune responses with some correlation with clinical–epidemiological data. In the future selected strains from these types of studies should be analyzed with molecular technologies. These kinds of study will contribute to the identification of mycobacterial genes associated with virulence and immunogenicity.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

After encounter with *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*), immune responses are triggered that define the course of the infection. However, this host response is not uniform in exposed people. Indeed, the vast majority of humans never develop overt disease despite being infected for many years (Vynnycky and Fine, 1997). This may relate to the duration and intensity of exposure, the sputum bacillary load of the source case and the participation of innate pre-immune clearance of bacilli (Nicol and Wilkinson, 2008). Furthermore, an array of clinical manifestations may occur at any stage of life in those patients who cannot control the infection. These manifestations are quite varied, ranging from self-limiting pulmonary infection to localized extrapulmonary infection and disseminated disease. This variability in the course of mycobacterial infection and its epidemiological consequences depend upon a complex interplay of factors, which are not completely understood but may relate to variation in the host, the pathogen and the environment. Host factors include single gene defects that

affect the IFN- γ /IL-12 axis (Altare et al., 1998; Kampmann et al., 2005; Newport et al., 1996), or treatment with blockers of tumor necrosis factor alpha (TNF- α) which induce reactivation of latent tuberculosis (TB) (Keane et al., 2001), as well as certain genetic polymorphisms, such as those involving *MCPI* and *NRAMP1*. Regarding environmental factors, vitamin D deficiency (Martineau et al., 2007) or micronutrient deficiency (McMurray et al., 1990) have been associated with higher susceptibility to TB. Interestingly, there is increasing evidence that the virulence and load of the infecting strain can also contribute to such differences (Malik and Godfrey-Faussett, 2005).

Molecular epidemiology has contributed substantially to our understanding of the prevalence and transmission of *Mtb*, showing that certain strains are more prevalent in certain geographic regions. Much of the information about *Mtb* strain variation comes from experimental animal models, particularly mouse models, which take advantage of a uniform immune response within the host allowing the genetic diversity among strains to be analyzed (Malik and Godfrey-Faussett, 2005). These studies have shown several differences among bacterial strains, and although these findings cannot be directly extrapolated to human infection, they have helped to define the pathogenesis and presentation of the disease. Here we review the contribution of mouse models to

* Corresponding author. Address: Vasco de Quiroga 15, Tlalpan Mexico DF, CP 14000, Mexico. Tel./fax: +52 55 54 85 34 91.

E-mail addresses: rhdezpando@hotmail.com, rogelio.hernandezp@quetzal.innsz.mx (R. Hernández-Pando).

Bibliografía

- Aderem A, Underhill DM. 1999. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annual review of immunology* 17:593-623.
- Anh DD, Borgdorff MW, Van LN, Lan NT, van Gorkom T, Kremer K, van Soolingen D. 2000. Mycobacterium tuberculosis Beijing genotype emerging in Vietnam. *Emerg Infect Dis* 6(3):302-305.
- Barnes PF, Cave MD. 2003. Molecular epidemiology of tuberculosis. *N Engl J Med* 349(12):1149-1156.
- Barnes PF, Yang Z, Preston-Martin S, Pogoda JM, Jones BE, Oyata M, Eisenach KD, Knowles L, Harvey S, Cave MD. 1997. Patterns of tuberculosis transmission in Central Los Angeles. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 278(14):1159-1163.
- Barrios-Payan J, Aguilar-Leon D, Lascurain-Ledezma R, Hernandez-Pando R. 2006. [Neutrophil participation in early control and immune activation during experimental pulmonary tuberculosis]. *Gaceta medica de Mexico* 142(4):273-281.
- Bifani PJ, Mathema B, Kurepina NE, Kreiswirth BN. 2002. Global dissemination of the Mycobacterium tuberculosis W-Beijing family strains. *Trends Microbiol* 10(1):45-52.
- Braden CR, Templeton GL, Cave MD, Valway S, Onorato IM, Castro KG, Moers D, Yang Z, Stead WW, Bates JH. 1997. Interpretation of restriction fragment length polymorphism analysis of Mycobacterium tuberculosis isolates from a state with a large rural population. *J Infect Dis* 175(6):1446-1452.
- Chan J XY, Magliozzo RS, Bloom BR. 1992. Killing of virulent Mycobacterium tuberculosis by reactive nitrogen intermediates produced by activated murine macrophages. *J Exp Med* 175(4):1111-1122.
- Chandler M MJ. 2002. Insertion sequences revisited. In: Craig NL CR, Gellert M, Lambowitz AM, editor. *Mobile DNA II*: ASM Press.
- Chatterjee D, Khoo KH. 1998. Mycobacterial lipoarabinomannan: an extraordinary lipoheteroglycan with profound physiological effects. *Glycobiology* 8(2):113-120.
- Cohen T, Sommers B, Murray M. 2003. The effect of drug resistance on the fitness of Mycobacterium tuberculosis. *Lancet Infect Dis* 3(1):13-21.
- Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, Gordon SV, Eiglmeier K, Gas S, Barry CE, 3rd and others. 1998. Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence. *Nature* 393(6685):537-544.
- Cousins D, Williams S, Liebana E, Aranaz A, Bunschoten A, Van Embden J, Ellis T. 1998. Evaluation of four DNA typing techniques in epidemiological investigations of bovine tuberculosis. *J Clin Microbiol* 36(1):168-178.
- Daffé M, G E. 1999. The capsule of Mycobacterium tuberculosis and its implications for pathogenicity. *Tuber Lung Dis* 79(3):153-169.
- Daffé M, McNeil M, Brennan PJ. 1991. Novel type-specific lipooligosaccharides from Mycobacterium tuberculosis. *Biochemistry* 30(2):378-388.
- Daniel TM. 2006. The history of tuberculosis. *Respiratory medicine* 100(11):1862-1870.

- de Valliere S, Abate G, Blazevic A, Heuertz RM, Hoft DF. 2005. Enhancement of innate and cell-mediated immunity by antimycobacterial antibodies. *Infection and immunity* 73(10):6711-6720.
- Dheda K, Booth H, Huggett JF, Johnson MA, Zumla A, Rook GA. 2005. Lung remodeling in pulmonary tuberculosis. *J Infect Dis* 192(7):1201-1209.
- Dheda K, Schwander SK, Zhu B, van Zyl-Smit RN, Zhang Y. 2010. The immunology of tuberculosis: from bench to bedside. *Respirology* 15(3):433-450.
- Dormans J, Burger M, Aguilar D, Hernandez-Pando R, Kremer K, Roholl P, Arend SM, van Soolingen D. 2004. Correlation of virulence, lung pathology, bacterial load and delayed type hypersensitivity responses after infection with different *Mycobacterium tuberculosis* genotypes in a BALB/c mouse model. *Clin Exp Immunol* 137(3):460-468.
- Dye C. 2006. Global epidemiology of tuberculosis. *Lancet* 367(9514):938-940.
- Ernst JD. 1998. Macrophage receptors for *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 66(4):1277-1281.
- Ferraz JC, Melo FB, Albuquerque MF, Montenegro SM, Abath FG. 2006. Immune factors and immunoregulation in tuberculosis. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica [et al]* 39(11):1387-1397.
- Fillioli I, Driscoll JR, Van Soolingen D, Kreiswirth BN, Kremer K, Valetudie G, Anh DD, Barlow R, Banerjee D, Bifani PJ and others. 2002. Global distribution of *Mycobacterium tuberculosis* spoligotypes. *Emerg Infect Dis* 8(11):1347-1349.
- Finch PJ, Millard FJ, Maxwell JD. 1991. Risk of tuberculosis in immigrant Asians: culturally acquired immunodeficiency? *Thorax* 46(1):1-5.
- Fleischmann RD, Alland D, Eisen JA, Carpenter L, White O, Peterson J, DeBoy R, Dodson R, Gwinn M, Haft D and others. 2002. Whole-genome comparison of *Mycobacterium tuberculosis* clinical and laboratory strains. *J Bacteriol* 184(19):5479-5490.
- Flynn JL, Chan J. 2001. Immunology of tuberculosis. *Annual review of immunology* 19:93-129.
- Friedman CR, Quinn GC, Kreiswirth BN, Perlman DC, Salomon N, Schluger N, Lutfey M, Berger J, Poltoratskaia N, Riley LW. 1997. Widespread dissemination of a drug-susceptible strain of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Infect Dis* 176(2):478-484.
- Ganz T. 2002. Antimicrobial polypeptides in host defense of the respiratory tract. *The Journal of clinical investigation* 109(6):693-697.
- Garcia Garcia ML, Valdespino Gomez JL, Garcia Sancho MC, Salcedo Alvarez RA, Zacarias F, Sepulveda Amor J. 1995. Epidemiology of AIDS and tuberculosis. *Bulletin of the Pan American Health Organization* 29(1):37-58.
- Garcia-Garcia M, Palacios-Martinez M, Ponce-de-Leon A, Jimenez-Corona ME, Jimenez-Corona A, Balandrano-Campos S, Olivera-Diaz H, Valdespino-Gomez JL, Small PM. 2000a. The role of core groups in transmitting *Mycobacterium tuberculosis* in a high prevalence community in Southern Mexico. *Int J Tuberc Lung Dis* 4(1):12-17.
- Garcia-Garcia ML, Jimenez-Corona ME, Ponce-de-Leon A, Jimenez-Corona A, Palacios-Martinez M, Balandrano-Campos S, Ferreyra-Reyes L, Juarez-Sandino L, Sifuentes-Osornio J, Olivera-Diaz H and others. 2000b. *Mycobacterium tuberculosis* drug resistance in a suburban community in southern Mexico. *Int J Tuberc Lung Dis* 4(12 Suppl 2):S168-170.

- García-García ML S-OJ, Jiménez-Corona ME, Ponce-de-León A, Jiménez-Corona A, Bobadilla-del Valle M, Palacios-Martínez M, Canales G, Sanginés A, Jaramillo Y, Martínez-Gamboa A, Balandrano S, Valdespino-Gómez JL, Small P., Source. 2001. Drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* in Orizaba, Veracruz. Implications for the tuberculosis prevention and control program. *Rev Invest Clin* 53(4):315-323.
- García-García ML, Small PM, García-Sancho C, Mayar-Maya ME, Ferreyra-Reyes L, Palacios-Martínez M, Jimenez S, Canales G, Quiroz G, Yanez L and others. 1999. Tuberculosis epidemiology and control in Veracruz, Mexico. *Int J Epidemiol* 28(1):135-140.
- Geijtenbeek TB, Van Vliet SJ, Koppel EA, Sanchez-Hernandez M, Vandenbroucke-Grauls CM, Appelmelk B, Van Kooyk Y. 2003. Mycobacteria target DC-SIGN to suppress dendritic cell function. *The Journal of experimental medicine* 197(1):7-17.
- Genewein A, Telenti A, Bernasconi C, Mordasini C, Weiss S, Maurer AM, Rieder HL, Schopfer K, Bodmer T. 1993. Molecular approach to identifying route of transmission of tuberculosis in the community. *Lancet* 342(8875):841-844.
- Godfrey-Faussett P, Sonnenberg P, Shearer SC, Bruce MC, Mee C, Morris L, Murray J. 2000. Tuberculosis control and molecular epidemiology in a South African gold-mining community. *Lancet* 356(9235):1066-1071.
- Gutierrez MC, Brisse S, Brosch R, Fabre M, Omais B, Marmiesse M, Supply P, Vincent V. 2005. Ancient origin and gene mosaicism of the progenitor of *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS pathogens* 1(1):e5.
- Hernández-Pando R OEH, Aguilar León D, López Casillas, Rook Graham. 2004. Mensaje Bioquímico. In: Flores Herrera O RRH, Sosa Peinado A, Vázquez Contreras E editor. *Inmunopatología de la tuberculosis pulmonar experimental: Facultad de Medicina, UNAM.*
- Hernandez-Pando R, Orozco H, Arriaga K, Sampieri A, Larriva-Sahd J, Madrid-Marina V. 1997a. 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* 90(4):607-617.
- Hernandez-Pando R, Orozco H, Sampieri A, Pavon L, Velasquillo C, Larriva-Sahd J, Alcocer JM, Madrid MV. 1996. Correlation between the kinetics of Th1, Th2 cells and pathology in a murine model of experimental pulmonary tuberculosis. *Immunology* 89(1):26-33.
- Hernandez-Pando R, Pavon L, Arriaga K, Orozco H, Madrid-Marina V, Rook G. 1997b. Pathogenesis of tuberculosis in mice exposed to low and high doses of an environmental mycobacterial saprophyte before infection. *Infect Immun* 65(8):3317-3327.
- Hernandez-Pando R, Schon T, Orozco EH, Serafin J, Estrada-Garcia I. 2001. Expression of inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine during the evolution of experimental pulmonary tuberculosis. *Experimental and toxicologic pathology : official journal of the Gesellschaft fur Toxikologische Pathologie* 53(4):257-265.
- Infante E, Aguilar LD, Gicquel B, Pando RH. 2005. Immunogenicity and protective efficacy of the *Mycobacterium tuberculosis* fadD26 mutant. *Clin Exp Immunol* 141(1):21-28.
- James BW, Williams A, PD. M. 2000. The physiology and pathogenicity of *Mycobacterium tuberculosis* grown under controlled conditions in a defined medium. *J Appl Microbiol* 88(4):669-677.

- Jarnagin JL, Luchsinger DW. 1980. The use of fluorescein diacetate and ethidium bromide as a stain for evaluating viability of mycobacteria. *Stain Technol* 55(4):253-258.
- Jimenez-Corona ME, Garcia-Garcia L, DeRiemer K, Ferreyra-Reyes L, Bobadilla-del-Valle M, Cano-Arellano B, Canizales-Quintero S, Martinez-Gamboa A, Small PM, Sifuentes-Osornio J and others. 2006. Gender differentials of pulmonary tuberculosis transmission and reactivation in an endemic area. *Thorax* 61(4):348-353.
- Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, van Agterveld M, van Soolingen D, Kuijper S, Bunschoten A, Molhuizen H, Shaw R, Goyal M and others. 1997. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol* 35(4):907-914.
- Kleinnijenhuis J, Oosting M, Joosten LA, Netea MG, Van Crevel R. 2011. Innate immune recognition of *Mycobacterium tuberculosis*. *Clinical & developmental immunology* 2011:405310.
- Lopez B, Aguilar D, Orozco H, Burger M, Espitia C, Ritacco V, Barrera L, Kremer K, Hernandez-Pando R, Huygen K and others. 2003. A marked difference in pathogenesis and immune response induced by different *Mycobacterium tuberculosis* genotypes. *Clin Exp Immunol* 133(1):30-37.
- Maeda N, Nigou J, Herrmann JL, Jackson M, Amara A, Lagrange PH, Puzo G, Gicquel B, Neyrolles O. 2003. The cell surface receptor DC-SIGN discriminates between *Mycobacterium* species through selective recognition of the mannose caps on lipoarabinomannan. *J Biol Chem* 278(8):5513-5516.
- Malik AN, Godfrey-Faussett P. 2005. Effects of genetic variability of *Mycobacterium tuberculosis* strains on the presentation of disease. *Lancet Infect Dis* 5(3):174-183.
- Manca C, Reed MB, Freeman S, Mathema B, Kreiswirth B, Barry CE, 3rd, Kaplan G. 2004. Differential monocyte activation underlies strain-specific *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis. *Infect Immun* 72(9):5511-5514.
- Manca C, Tsenova L, Barry CE, 3rd, Bergtold A, Freeman S, Haslett PA, Musser JM, Freedman VH, Kaplan G. 1999. *Mycobacterium tuberculosis* CDC1551 induces a more vigorous host response in vivo and in vitro, but is not more virulent than other clinical isolates. *J Immunol* 162(11):6740-6746.
- Manca C, Tsenova L, Bergtold A, Freeman S, Tovey M, Musser JM, Barry CE, 3rd, Freedman VH, Kaplan G. 2001. Virulence of a *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolate in mice is determined by failure to induce Th1 type immunity and is associated with induction of IFN-alpha /beta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(10):5752-5757.
- Mishra AK DN, Appelmelk BJ, Besra GS. 2011. Lipoarabinomannan and related glycoconjugates: structure, biogenesis and role in *Mycobacterium tuberculosis* physiology and host-pathogen interaction. *FEMS Microbiol Rev* 35(6):1126-1157.
- NBCI. 2011. Taxonomy NBCI.
- Nicol MP, Wilkinson RJ. 2008. The clinical consequences of strain diversity in *Mycobacterium tuberculosis*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 102(10):955-965.
- Palomino JC LoS, Ritacco V. . 2007. Tuberculosis 2007. From basic science to patient care. In: Palomino JC LoS, Ritacco V. , editor.

- Perez A, Brown HS, 3rd, Restrepo BI. 2006. Association between tuberculosis and diabetes in the Mexican border and non-border regions of Texas. *Am J Trop Med Hyg* 74(4):604-611.
- Rajni, Rao N, Meena LS. 2011. Biosynthesis and Virulent Behavior of Lipids Produced by *Mycobacterium tuberculosis*: LAM and Cord Factor: An Overview. *Biotechnology research international* 2011:274693.
- Reed MB, Domenech P, Manca C, Su H, Barczak AK, Kreiswirth BN, Kaplan G, Barry CE, 3rd. 2004. A glycolipid of hypervirulent tuberculosis strains that inhibits the innate immune response. *Nature* 431(7004):84-87.
- Riley LW. 2006. Of mice, men, and elephants: *Mycobacterium tuberculosis* cell envelope lipids and pathogenesis. *The Journal of clinical investigation* 116(6):1475-1478.
- Rivas-Santiago B, Sada E, Tsutsumi V, Aguilar-Leon D, Contreras JL, Hernandez-Pando R. 2006. beta-Defensin gene expression during the course of experimental tuberculosis infection. *J Infect Dis* 194(5):697-701.
- Rivas-Santiago B, Vieyra-Reyes P, Araujo Z. 2005. [Cell immunity response in human pulmonary tuberculosis. Review]. *Invest Clin* 46(4):391-412.
- Rook GAW, Hernandez-Pando R. 1996. The pathogenesis of Tuberculosis. *Annu Rev Microbiol* 50:259-284.
- Sampson SL, Richardson M, Van Helden PD, Warren RM. 2004. IS6110-mediated deletion polymorphism in isogenic strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 42(2):895-898.
- Sampson SL, Warren RM, Richardson M, van der Spuy GD, van Helden PD. 1999. Disruption of coding regions by IS6110 insertion in *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuber Lung Dis* 79(6):349-359.
- Sampson SL, Warren RM, Richardson M, Victor TC, Jordaan AM, van der Spuy GD, van Helden PD. 2003. IS6110-mediated deletion polymorphism in the direct repeat region of clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol* 185(9):2856-2866.
- Schlesinger LS, Hull SR, Kaufman TM. 1994. Binding of the terminal mannosyl units of lipoarabinomannan from a virulent strain of *Mycobacterium tuberculosis* to human macrophages. *J Immunol* 152(8):4070-4079.
- Seah GT, Scott GM, Rook GA. 2000. Type 2 cytokine gene activation and its relationship to extent of disease in patients with tuberculosis. *J Infect Dis* 181(1):385-389.
- Small PM, Hopewell PC, Singh SP, Paz A, Parsonnet J, Ruston DC, Schechter GF, Daley CL, Schoolnik GK. 1994. The epidemiology of tuberculosis in San Francisco. A population-based study using conventional and molecular methods. *N Engl J Med* 330(24):1703-1709.
- Smith I. 2003. *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis and molecular determinants of virulence. *Clin Microbiol Rev* 16(3):463-496.
- Strieter RM, Belperio JA, Keane MP. 2002. Cytokines in innate host defense in the lung. *The Journal of clinical investigation* 109(6):699-705.
- van Crevel R, Nelwan RH, de Lenne W, Veeraragu Y, van der Zanden AG, Amin Z, van der Meer JW, van Soolingen D. 2001. *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype strains associated with febrile response to treatment. *Emerg Infect Dis* 7(5):880-883.

- van Crevel R, Ottenhoff THM, van der Meer JWM. 2002. Innate Immunity to Mycobacterium tuberculosis. CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS 15(2):294-309.
- van Embden JD CM, Crawford JT, Dale JW, Eisenach KD, Gicquel B, Hermans P, Martin C, McAdam R, Shinnick TM, et al. 1993. Strain identification of Mycobacterium tuberculosis by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. J Clin Microbiol 31(2):406-409.
- Van Soolingen D. 2001. Molecular epidemiology of tuberculosis and other mycobacterial infections: main methodologies and achievements. Journal of internal medicine 249(1):1-26.
- van Soolingen D, Hermans PW, de Haas PE, Soll DR, van Embden JD. 1991. Occurrence and stability of insertion sequences in Mycobacterium tuberculosis complex strains: evaluation of an insertion sequence-dependent DNA polymorphism as a tool in the epidemiology of tuberculosis. J Clin Microbiol 29(11):2578-2586.
- van Soolingen D, Hoogenboezem T, de Haas PE, Hermans PW, Koedam MA, Teppema KS, Brennan PJ, Besra GS, Portaels F, Top J and others. 1997. A novel pathogenic taxon of the Mycobacterium tuberculosis complex, Canetti: characterization of an exceptional isolate from Africa. International journal of systematic bacteriology 47(4):1236-1245.
- van Soolingen D, Qian L, de Haas PE, Douglas JT, Traore H, Portaels F, Qing HZ, Enkhsaikan D, Nymadawa P, van Embden JD. 1995. Predominance of a single genotype of Mycobacterium tuberculosis in countries of east Asia. J Clin Microbiol 33(12):3234-3238.
- Vergne I, Chua J, Deretic V. 2003. Tuberculosis toxin blocking phagosome maturation inhibits a novel Ca²⁺/calmodulin-PI3K hVPS34 cascade. The Journal of experimental medicine 198(4):653-659.
- Vynnycky E, Fine PE. 1997. The natural history of tuberculosis: the implications of age-dependent risks of disease and the role of reinfection. Epidemiol Infect 119(2):183-201.
- Welin A, Winberg ME, Abdalla H, Sarndahl E, Rasmusson B, Stendahl O, Lerm M. 2008. Incorporation of Mycobacterium tuberculosis lipoarabinomannan into macrophage membrane rafts is a prerequisite for the phagosomal maturation block. Infect Immun 76(7):2882-2887.
- WHO. 2011. <http://www.who.int/tb/en/>.
- WHO México. 2011. Tuberculosis profile, México WHO 2011. <http://www.who.int/tb/country/en/index.html>.
- Zhang M, Gong J, Yang Z, Samten B, Cave MD, Barnes PF. 1999. Enhanced capacity of a widespread strain of Mycobacterium tuberculosis to grow in human macrophages. J Infect Dis 179(5):1213-1217.