



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

Cinética de producción de IL-17 e IL-23 inducida por cepas de
***Mycobacterium bovis* y *Mycobacterium tuberculosis* en un modelo murino de**
tuberculosis pulmonar

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA:

YADIRA ROCIO RODRÍGUEZ MÍGUEZ

TUTORES

DR. JOSÉ ÁNGEL G. GUTIÉRREZ PABELLO-FMVZ

DR. ROGELIO HERNÁNDEZ PANDO-INCMNSZ

COMITÉ TUTOR

DR. EDUARDO GARCÍA ZEPEDA-IIB

MÉXICO, D. F.

MAYO 2013



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.

A mi Mamá por el apoyo incondicional, la confianza, por mostrarme que existe un camino repleto de cosas que explorar, por las palabras de aliento, por creer en mí y recordarme cada día lo fuerte que puedo ser, infinitas gracias.

A mi Hermana por la sabiduría y las críticas compartidas, por las múltiples aventuras y por ayudarme durante ésta travesía, mil gracias.

A Víctor, por tu admiración, tu confianza, tu amor, por entenderme y por estar ahí cuando te necesito, gracias.

Por último, a ti que sigues mis pasos y guías mi alma aún sin estar presente.

Simplemente, les quiero...

Agradecimientos

Al Dr. Rogelio Hernández Pando por abrirme las puertas de su grupo de trabajo, por hacerme partícipe de éste proyecto de investigación, así como por su apoyo y confianza.

Al Dr. José Ángel Gutiérrez Pabello por su tiempo, sus críticas y su objetividad durante la realización de este proyecto.

Al Dr. Eduardo García Zepeda por los consejos y conocimientos compartidos, gracias.

A las doctoras Sara Huerta y Guillermina Baay por la asesoría en la utilización de técnicas de Patología Digital, tecnología clave para el desarrollo de esta tesis.

A Brenda Marquina por su interés durante el desarrollo de éste trabajo de investigación.

A todos mis compañeros del laboratorio de Patología Experimental del INCMNSZ por el intercambio de cultura y conocimientos, por las palabras de aliento y el apoyo durante el desarrollo y culminación de este proyecto.

Por último, a mi Hermana por el tiempo y la disposición de revisar y proponer los últimos ajustes de redacción de esta tesis.

Índice

Índice	I
Lista de cuadros.....	III
Lista de figuras.....	III
Abreviaturas.....	V
Resumen	VIII
Abstract.....	IX
1. Introducción	1
1.1 Tuberculosis	1
1.2 Etiología	6
1.3 Patogenia	7
1.4 Respuesta inmunológica	7
1.4.1 Respuesta inmune innata.....	7
1.4.2 Respuesta inmune adaptativa	9
1.5 Modelo experimental de tuberculosis pulmonar progresiva.....	10
1.6 Linfocitos T Cooperadores	16
1.6.1 Diferenciación de linfocitos T cooperadores.....	17
1.6.2 Linfocitos Th17	19
1.6.3 Balance de la respuesta Th17	22
1.7 Interleucina 23.....	23
1.8 Interleucina 17	24
1.9 Relación de la tuberculosis con la respuesta inmunológica Th17	27
2. Justificación	34
3. Hipótesis	35
4. Objetivos	35
4.1 Objetivo general	35
4.2 Objetivos particulares	36
5. Materiales y métodos.....	37
5.1 Ubicación.....	37

5.2 Cepas de <i>Mycobacterium spp</i>	37
5.3 Preparación de inóculos	37
5.4 Modelo murino de tuberculosis pulmonar progresiva	38
5.5 Determinación de la carga bacilar en pulmón por conteo de UFC	38
5.6 Histopatología y morfometría	39
5.7 Análisis de citocinas por Inmunohistoquímica (IHQ)	39
5.8 Análisis de citocinas por PCR-Tiempo Real	41
5.9 Análisis estadístico	42
6. Resultados	43
6.1 <i>Mycobacterium bovis</i> cepas 303 y 534.	43
6.1.1 Evaluación del nivel de virulencia en el modelo murino de tuberculosis pulmonar progresiva.....	43
6.1.2 Evaluación de la expresión de citocinas mediante RT-PCR en Tiempo Real.....	46
6.1.3 Evaluación de la producción de IL-17 e IL-23 mediante Inmunohistoquímica	48
6.2 <i>Mycobacterium tuberculosis</i> cepas H37Rv y 48p.....	51
6.2.1 Evaluación del nivel de virulencia.....	51
6.2.2 Evaluación de la expresión de citocinas mediante RT-PCR en Tiempo Real.....	53
6.2.3 Evaluación de la producción de IL-17 e IL-23 mediante Inmunohistoquímica	55
7. Discusión	60
8. Conclusiones	68
9. Perspectivas	68
10. Bibliografía	69

Lista de cuadros

Cuadro 1.	Secuencia de cebadores utilizados en la PCR-TR	42
-----------	--	----

Lista de figuras

Figura 1.	Tasa de incidencia de la tuberculosis mundial en el 2011	2
Figura 2.	Mapa situacional de la tuberculosis bovina en el mundo	4
Figura 3.	Mapa situacional de la tuberculosis bovina en México	5
Figura 4.	Ciclo de vida de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	11
Figura 5.	Características fundamentales del modelo murino de la TB pulmonar progresiva	12
Figura 6.	Características de la infección con <i>M. bovis</i> en el modelo murino de TB pulmonar progresiva	15
Figura 7.	Expresión de citocinas por PCR-TR en pulmones de ratones BALB/c infectados con diferentes cepas de <i>M. bovis</i>	16
Figura 8.	Diferenciación y regulación de células T cooperadoras	18
Figura 9.	Diferenciación de células T vírgenes	19
Figura 10.	Diferenciación de Linfocitos Th17	21
Figura 11.	IL-17 y células Th17 juegan un papel central en la infección por tuberculosis	30
Figura 12.	Virulencia de las cepas de <i>M. bovis</i> 534 (baja virulencia) y 303 (alta virulencia) en el modelo de tuberculosis pulmonar progresiva	44
Figura 13.	Características histológicas de pulmones de ratones infectados con <i>M. bovis</i> 534 y 303	45

Figura 14.	Expresión de citocinas por RT-PCR en Tiempo Real durante la infección con <i>M. bovis</i>	47
Figura 15.	Expresión de IL-17 por IHQ durante la infección con <i>M. bovis</i>	49
Figura 16.	Cuantificación de la intensidad de expresión de IL-17 durante la infección con <i>M. bovis</i>	50
Figura 17.	Virulencia de las cepas de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv y 48p en el modelo de tuberculosis pulmonar progresiva	52
Figura 18.	Características histológicas de pulmones de ratones infectados con <i>M. tuberculosis</i> H37Rv y 48p	54
Figura 19.	Expresión de citocinas por RT-PCR en Tiempo Real durante la infección con <i>M. tuberculosis</i>	56
Figura 20.	Expresión de IL-17 por IHQ durante la infección con <i>M. tuberculosis</i>	57
Figura 21.	Cuantificación de la intensidad de expresión de IL-17 durante la infección con <i>M. tuberculosis</i>	59

Abreviaturas

ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
BALB/c	Cepa de ratón de la especie <i>Mus musculus</i> utilizada para la investigación científica
BCG	Bacilo Calmette-Guérin
C57BL/6	Cepa de ratón de la especie <i>Mus musculus</i> utilizada para la investigación científica
CD	Células dendríticas
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
CPA	Células presentadoras de antígenos
EAE	Encefalomiелitis autoinmune experimental
EDTA	Ácido etilen-diamino-tetra-acético
ETOH	Etanol
Foxp3	Factor de transcripción de linfocitos Treg
GAPDH	Deshidrogenasa gliceraldehído 3 fosfato
G-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos
HIF	Factor inducible de hipoxia
ICAM-1	Molécula de adhesión intercelular de tipo 1
IHQ	Inmunohistoquímica
IL	Interleucina
IL-23R	Receptor de interleucina 23
IFN- γ	Interferón gamma
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
Ip	Intensidad total de células positivas
Isp	Intensidad fuerte total de células positivas
KO	“Knock out”
LAM	Lipoarabinomanano

LAM	Familia Latino-Americano Mediterráneo
Ly δ	Linfocitos gamma delta
<i>M. bovis</i>	<i>Mycobacterium bovis</i>
<i>M. tb</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MDR/MFR	Multifármacorresistente
MHC I	Moléculas de histocompatibilidad tipo I
MHC II	Moléculas de histocompatibilidad tipo II
MIP-2	“Macrophage inflammatory protein 2”
MTBC	Complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
NF- κ B	Factor nuclear kappa B
NK	Células “natural killer”
nm	Nanómetros
NOD	Receptor tipo Nod
OIE	Oficina Internacional de Epizootias
OMS	Organización Mundial de la Salud
ON	Óxido nítrico
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PCR-TR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
PMN	Polimorfonucleares
ROR γ t	Receptor gamma t huérfano relacionado con ácido retinoico
rpm	Revoluciones por minuto
RPMI	Medio Roswell Park Memorial Institute
PRRs	Receptores de reconocimiento a patrones
RT-PCR	Transcripción reversa-reacción en cadena de la polimerasa
SENASICA	Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
STAT	Transductor de señales y activador de la transcripción
TB	Tuberculosis

TCD4+	Linfocitos TCD4
TCD8+	Linfocitos TCD8
TCR	Receptor de células T
Th1	Linfocitos T cooperadores de tipo 1
Th2	Linfocitos T cooperadores de tipo 2
Th9	Linfocitos T cooperadores de tipo 9
Th17	Linfocitos T cooperadores de tipo 17
Th22	Linfocitos T cooperadores de tipo 22
TLR	Receptor tipo toll
TGF- β	Factor de crecimiento transformante tipo beta
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
Treg	Linfocitos T reguladores
UFC	Unidades formadoras de colonia
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
WHO	"World Health Organization"

Resumen

La tuberculosis causada por *M. bovis* es una enfermedad zoonótica, mientras que la causada por *M. tuberculosis* es un problema re-emergente de salud pública a nivel mundial. Se ha reportado que la respuesta inmune celular juega un papel importante en la resolución de la infección causada por micobacterias, los linfocitos Th17 productores de IL-17 así como la IL-23, están relacionados con el reclutamiento celular y el control de infecciones micobacterianas. El objetivo de este trabajo fue determinar la cinética de expresión génica y proteica de la IL-17 y la IL-23 inducida por cepas de baja e intermedia virulencia (*M. bovis* 534 o *M. tuberculosis* H37Rv), y cepas de elevada virulencia (*M. bovis* 303 o *M. tuberculosis* 48p) en un modelo murino de tuberculosis. Se evaluó la sobrevivencia de los ratones, y el tejido pulmonar fue analizado para la determinación de la carga bacilar, el porcentaje de necrosis, y la expresión génica y proteica de IL-17 e IL-23 mediante PCR-TR e IHQ, respectivamente. Los animales infectados con *M. tuberculosis* 48p o con *M. bovis* 303 mostraron 100% de mortalidad a los días 28 y 21 pos-infección, respectivamente; los pulmones presentaron alta carga bacilar y necrosis extensa. En contraste, los animales infectados con *M. tuberculosis* H37Rv o *M. bovis* 534 mostraron una sobrevivencia del 80% y 100% al día 120 pos-infección, menor carga bacilar y neumonía sin la presencia de necrosis. La expresión génica de IL-17 e IL-23 fue similar en los animales infectados con *M. bovis*, mientras que en los infectados con *M. tuberculosis* H37Rv se indujo una mayor expresión de las citocinas comparado con los infectados con la cepa de *M. tuberculosis* 48p. Tanto el epitelio como el endotelio pulmonar mostraron inmunotinción positiva durante la infección temprana. Existe una expresión similar de IL-17 e IL-23 en pulmón durante la infección temprana por cepas de *M. bovis*, mientras que la cepa H37Rv induce una mayor expresión que la cepa de alta virulencia de *M. tuberculosis*, lo que sugiere que ambas citocinas podrían correlacionar con un reclutamiento celular y control de crecimiento bacteriano, dirigido quizás con el inicio de una respuesta innata y una posterior inducción de la respuesta adaptativa.

Palabras clave: Tuberculosis IL-17, IL-23, *M. tuberculosis*, *M. bovis*.

Abstract

Tuberculosis caused by *M. bovis* is a worldwide zoonotic disease, while caused by *M. tuberculosis* is a re-emergent worldwide public health problem. It has been reported that the cellular immune response plays an important role in the resolution of mycobacterial infection, Th17 lymphocytes producing IL-17 and IL-23, are related to cell recruitment and control of mycobacterial infections. The aim of this work was to determine the kinetics of gene and protein expression of IL-17 and IL-23 induced by low and intermediate virulence strains (*M. bovis* 534 or *M. tuberculosis* H37Rv) and highly virulent strains (*M. bovis* 303 or *M. tuberculosis* 48p) in a murine model of pulmonary tuberculosis. Survival was assessed in mice, and lung tissue was analyzed for determination of the bacterial load, the percentage of necrosis, the gene and protein expression of IL-17 and IL-23 by RT-PCR and IHC, respectively. Animals infected with *M. tuberculosis* 48p or *M. bovis* 303 showed 100% mortality at 28 and 21 after infection, respectively, the lungs showed high bacterial load and extensive necrosis. In contrast, the animals infected with *M. tuberculosis* H37Rv or *M. bovis* 534 showed a survival of 80% and 100% at day 120 post-infection, low bacilli burdens and lesser pneumonia without necrosis. The gene expression of IL-17 and IL-23 was similar in animals infected with either *M. bovis* strains, while those infected with *M. tuberculosis* H37Rv induced increased expression of cytokines compared to those infected with *M. tuberculosis* 48p strain. Both the pulmonary epithelium and endothelium showed strong immunostaining during early infection. There is a similar expression of IL-17 and IL-23 in the lung during early infection by strains of *M. bovis*, while H37Rv strain induced higher expression than hypervirulent *M. tuberculosis* strain; suggesting that the two cytokines may correlate with cell recruitment and control bacterial growth, perhaps led to the start of an innate response and subsequent induction of the adaptive response.

Key words: Tuberculosis, IL-17, IL-23, *M. tuberculosis*, *M. bovis*.

Cinética de producción de IL-17 e IL-23 inducida por cepas de *Mycobacterium bovis* y *Mycobacterium tuberculosis* en un modelo murino de tuberculosis pulmonar

1. Introducción

1.1 Tuberculosis

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa crónica y progresiva de distribución mundial, causada por bacterias del complejo *Mycobacterium*, que afecta a un amplio espectro de hospederos [1]. La TB humana es causada principalmente por el patógeno intracelular facultativo *Mycobacterium tuberculosis*, el cual puede producir tanto enfermedad progresiva, como infección latente asintomática.

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), la TB es la segunda causa mundial de mortalidad por un agente infeccioso después del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) [2]. En el 2011 se presentaron 8,7 millones de nuevos casos y 1,4 millones de muertes por TB, estimando una tasa de incidencia de 125 casos por cada 100 000 habitantes (Figura 1); los factores que contribuyen al incremento de estos números son: la pobreza, el hacinamiento, la desnutrición y el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH). En México la incidencia de TB sigue siendo relativamente baja; en el 2011 se estimaron 15 casos nuevos por cada 100,000 habitantes [2], sin embargo los datos anteriores sobre la incidencia mundial y del país pueden estar subestimados, debido a que muchos casos no son reportados.

Alrededor de un tercio de la población mundial está infectada, sin embargo, solo 5% de los infectados desarrollan la enfermedad durante los primeros años de

ocurrir la exposición [2]. Se ha estimado que la dosis mínima infectante para contraer la enfermedad es de una bacteria [3]. La primo-infección puede evolucionar a TB pulmonar, o puede diseminarse vía linfo-hematógena y causar TB miliar, genitourinaria, osteoarticular u otras formas extra-pulmonares, de las cuales la meníngea es una de las más importantes [4].

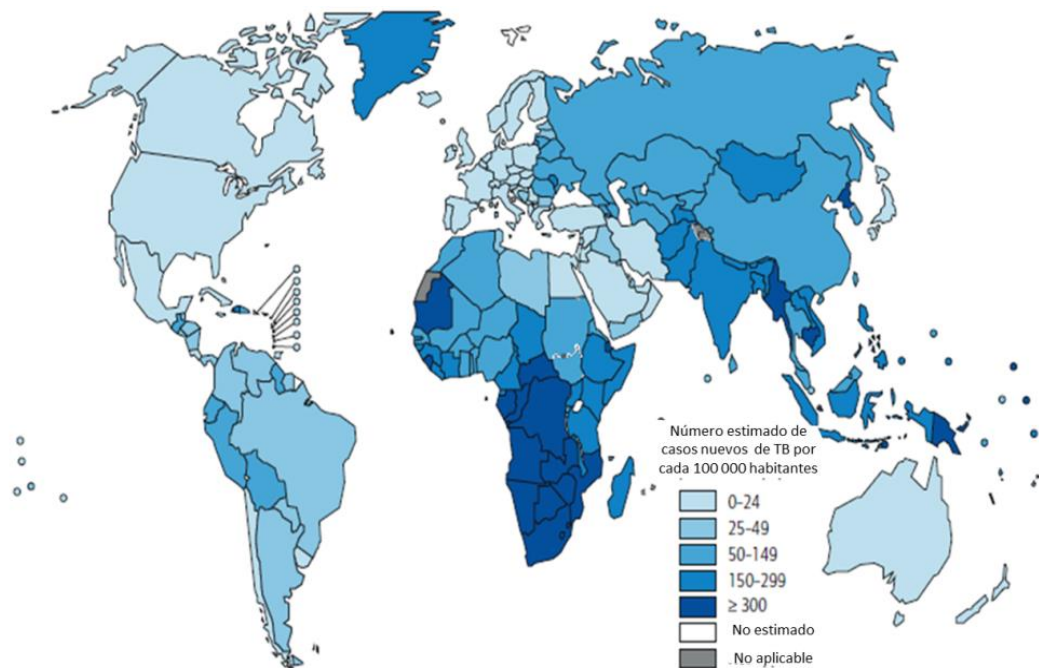


Figura 1. Tasa de incidencia de la tuberculosis mundial en el 2011. Representación del número estimado de casos nuevos de tuberculosis humana en cada país del mundo, reporte de la Organización Mundial de la Salud (Reporte 2012, WHO).

En el humano la infección es causada principalmente por *M. tuberculosis*; sin embargo, la TB bovina causada por *Mycobacterium bovis* es considerada una zoonosis importante [5]. *M. bovis* es el agente responsable del 5-10% de los casos totales de TB humana [6]. La transmisión de *M. bovis* a humanos, ocurre por

contacto directo entre personas que están bajo exposición constante con el patógeno, como veterinarios, trabajadores de la industria de la carne, frigoríficos, establecimientos lecheros y todos los que manipulan animales y vísceras bovinas potencialmente contaminadas [4]. *M. bovis* es causa de TB primaria (frecuentemente extra-pulmonar) en niños, principalmente por la ingestión de leche y subproductos no pasteurizados [7].

La importancia de la infección por *M. bovis* en las personas principalmente en países desarrollados, ha reducido desde principios del siglo XX [5], debido a la práctica de procesos de pasteurización de la leche y al éxito en la implementación de campañas de identificación y eliminación de animales positivos a *M. bovis*, lo cual ha disminuido la incidencia de animales reactivos a la tuberculina e incluso la presentación clínica de la enfermedad [8]

En el año 2012, ante la Oficina Internacional de Epizootias (OIE) actualmente llamada Organización Mundial de Sanidad Animal, México presentaba el estado de “enfermedad limitada a una o varias zonas” (Figura 2) [9]. La TB bovina en el país es importante: la prevalencia en la región norte se ha estimado en 2.1% para el ganado lechero y en 0.1% para el ganado productor de carne; en comparación con el centro y sur del país donde se han reportado prevalencias mayores al 25%. La consecuencia de estas cifras elevadas se reflejan en pérdidas económicas por la reducción de la exportación de ganado y productos lácteos, disminución de la producción, desecho prematuro y muerte de animales, sin olvidar el riesgo latente de infección para el humano [10].

La TB bovina en el ganado es difícil de controlar, incluso en países desarrollados, debido a que los animales silvestres infectados con *M. bovis* actúan como reservorios, por lo que se consideran fuentes potenciales de infección [11]. En México, el riesgo de la TB humana causada por *M. bovis* se explica por la elevada prevalencia de la enfermedad en el ganado lechero, la falta de

participación de los establos en campañas de erradicación y el hecho de que el 30 al 40% de la leche que se produce no se pasteuriza [12].

En 1995 se publicó la Norma Oficial Mexicana NOM-031-ZOO-1995, “Campaña Nacional Contra la Tuberculosis Bovina (*Mycobacterium bovis*)”, la cual permanece vigente, y bajo su aplicación se han logrado mantener territorios principalmente del norte de la república con muy bajas prevalencias de la enfermedad. A partir de su ejecución, se ha avanzado considerablemente; actualmente, existen 25 regiones en el país en estado de erradicación con prevalencias menores al 0.5% (Figura 3) [13].

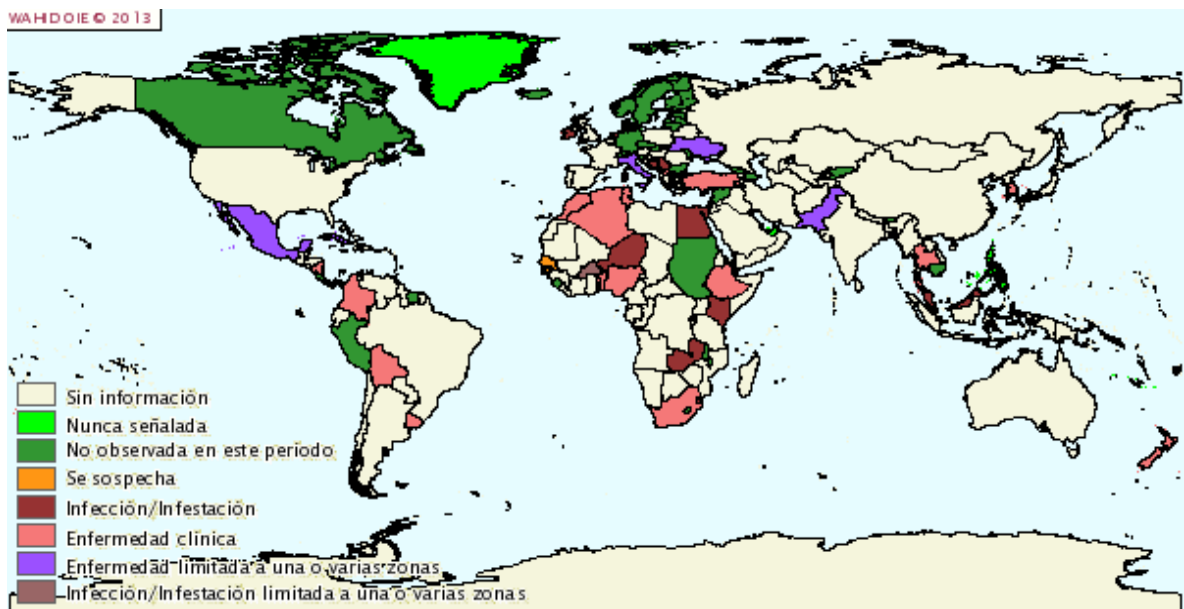


Figura 2. Mapa situacional de la tuberculosis bovina en el mundo. Representación de la situación de la tuberculosis bovina de cada país del mundo. Datos obtenidos de la OIE (semestre julio-diciembre 2012).

En los últimos años la TB se ha establecido como un problema re-emergente, debido a la aparición de cepas multifármacorresistentes (MDR/MFR) a los fármacos de primera línea para el tratamiento de la TB humana, la aparición del VIH, el establecimiento de reservorios silvestres y la persistencia de la enfermedad en el ganado doméstico. El esfuerzo conjunto de los sistemas de salud pública y de sanidad animal, el mejoramiento del diagnóstico y el desarrollo de vacunas más efectivas para la prevención de la infección son las principales estrategias que se pretenden poner en práctica para el control de esta enfermedad [5, 8].



Figura 3. Mapa situacional de la tuberculosis bovina en México. Representación de la situación de la tuberculosis bovina en los estados de la República Mexicana según la Campaña Nacional contra la Tuberculosis Bovina NOM-03-ZOO-1995. Datos obtenidos de SENASICA-SAGARPA (2013).

1.2 Etiología

Las bacterias del género *Mycobacterium* son bacilos rectos o ligeramente curvados, miden entre 0.2-0.6 µm por 1-10 µm, no flagelados. Usualmente presentan un alto contenido de guanina y citocina en su ADN, así como un alto contenido de lípidos en su pared celular, los cuales, contribuyen a la extrema hidrofobicidad de la bacteria y a la resistencia a daños físicos. Como característica distintiva presentan gran cantidad de ácidos micólicos en su pared celular [14], se piensa que pueden funcionar como factores de virulencia para modificar la respuesta inmune encabezada por las células del hospedero [15].

La mayoría de las micobacterias, viven y se replican de forma libre en la naturaleza y pocas veces causan enfermedades; sólo algunas son patógenos exitosos de mamíferos. Por lo que éstas últimas se denominan patógenas y habitan de forma intracelular en fagocitos mononucleares. Las más importantes son los miembros del complejo *M. tuberculosis* (MTBC) [16]. El MTBC se refiere a un grupo de especies (*M. tuberculosis*, *Mycobacterium canettii*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium microti*, *M. bovis*, *Mycobacterium caprae* y *Mycobacterium pinnipedii*) genéticamente similares.

Los genomas de *M. bovis* y de *M. tuberculosis* son idénticos en un 99.95% a nivel de nucleótidos [17]. Ambas bacterias presentan un mejor crecimiento en tejidos con altas concentraciones de oxígeno, como en los pulmones. En condiciones favorables pueden dividirse en rangos de tiempo de entre 12 y 24 horas [16, 18]. Para su diferenciación se utilizan pruebas bioquímicas como la reducción de nitratos y acumulación la de niacina, siendo *M. tuberculosis* positivo en ambas, a diferencia de *M. bovis* [19].

1.3 Patogenia

La infección con *M. tuberculosis* sigue ciertos patrones que se han establecido a partir de los modelos en animales, así como de la observación de la TB humana [20, 21].

Estudios experimentales sugieren que la transmisión se realiza por vía aérea y comienza con la inhalación de aerosoles (gotitas de 1 a 2 micras) que contienen al bacilo y que fueron producidas por un individuo o animal enfermo. Una vez alojado el bacilo en los alveolos, comienza la propagación a otros tejidos, la formación de lesiones y la destrucción del sitio afectado.

En el ganado bovino, la progresión ha alcanzado sus últimas etapas cuando existe propagación a nódulos linfáticos u otros órganos, por lo que pueden estar liberando bacterias a través de expectoraciones. La transmisión se da principalmente de bovino a bovino, aunque en el ciclo también suelen intervenir animales silvestres que sirven de reservorio. La severidad de las lesiones y la progresión de la enfermedad dependen de la dosis infectante: a mayor cantidad de bacilos inoculados mayor severidad [8].

1.4 Respuesta inmunológica

El pulmón es el sitio principal de infección por *M. tuberculosis* y por lo tanto es un órgano crítico, por esta razón, el que se establezca una respuesta inmune no controlada fácilmente puede interrumpir su función fisiológica esencial [22].

1.4.1 Respuesta inmune innata

La infección por micobacterias es el ejemplo clásico de una respuesta inmune mediada por células contra un parásito intracelular. Su fagocitosis por macrófagos alveolares es el primer evento en la relación patógeno-huésped. El reconocimiento

de los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) por receptores de reconocimiento a patógenos (PRRs) es central en el inicio y coordinación de la respuesta inmune innata en el hospedero [23] . En este punto, la destrucción del agente dependerá de la capacidad bactericida de los macrófagos del huésped y de la virulencia de la bacteria [24].

Para su establecimiento, las micobacterias utilizan diferentes vías de entrada a las células fagocíticas; los receptores que intervienen en la fagocitosis están presentes en la superficie de dichas células: 1) receptores para porción Fc de las inmunoglobulinas, 2) receptores de complemento como CR1 y CR3/CR4, 3) receptores de manosa, 4) receptores carroñeros (scavenger) 5) receptores a fibronectina y 6) receptores para la proteína surfactante A5, en el caso de macrófagos alveolares [25, 26].

Se ha propuesto que la vía de entrada de la micobacteria determina su destino dentro de los macrófagos. En el interior de las células fagocíticas, las bacterias son capaces de evadir la respuesta humoral y mantener viabilidad por largos períodos de tiempo [27]. Esto lo llevan a cabo modulando la activación de dichas células para evitar ser eliminadas; por ejemplo: la internalización de la micobacteria opsonizada a través de los receptores Fc, induce la producción de intermediarios de oxígeno y favorece la fusión fagosoma-lisosoma necesaria para la eliminación de la bacteria, mientras que su entrada a través de receptores de complemento como CR3 inhibe el estallido respiratorio y evita la maduración de los fagosomas y por consecuencia evita su eliminación [26]. Otros estudios han demostrado que el lipoarabinomanano (LAM) puede inducir por un lado quimiotaxis y por otro la inhibición de la actividad fagocítica de macrófagos al interactuar con receptores celulares de manosa. Todos estos mecanismos se traducen en la sobrevivencia de la micobacteria dentro de los macrófagos [14, 15, 28].

Lipoproteínas y glicoproteínas de la bacteria, al unirse al receptor tipo toll (TLR) 2 de los macrófagos alveolares inducen la producción de moléculas como interleucina-1 (IL-1), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y óxido nítrico (ON), que estimulan señales intracelulares para la producción de proteínas involucradas en la respuesta inmune. Este mecanismo activa vías de señalización que tienen en común el factor nuclear κ B (NF- κ B), induciéndose la expresión de citocinas y moléculas involucradas en la polarización hacia una respuesta inmune encabezada por linfocitos T cooperadores de perfil Th1 pro-inflamatorios [24], lo que trae como consecuencia el reclutamiento de células mononucleares de los vasos sanguíneos vecinos. Estas células son los principales constituyentes de los granulomas, los cuales son estructuras consolidadas constituidas por macrófagos, rodeados por linfocitos activados y una capa de fibrina, con la función de contener a las micobacterias, dicha conformación se considera la característica diagnóstica de esta enfermedad (Figura 4) [3, 29, 30].

1.4.2 Respuesta inmune adaptativa

Las células dendríticas (CD) en los pulmones o en las vías respiratorias también fagocitan micobacterias y migran a los nódulos linfáticos, donde son las encargadas de estimular una respuesta de linfocitos T [31]. Tanto los macrófagos como las CD actúan como células presentadoras de antígenos (CPA) a linfocitos T CD4⁺ acoplados a moléculas de histocompatibilidad tipo II (MHC II), o a linfocitos T CD8⁺ acoplados a moléculas de histocompatibilidad tipo I (MHC I), que contribuyen a la secreción de IL-2 e interferón gamma (IFN- γ) para inducir la activación de macrófagos [30, 32].

Con el desarrollo de una respuesta inmune específica de tipo Th1, se establece una respuesta de hipersensibilidad retardada tipo IV, la que colabora a que el granuloma adquiera una estructura organizada y estratificada [3, 31]. Esta respuesta está mediada por IL-1, IL-12, por linfocitos T CD4⁺ y la secreción de IL-

2 e IFN- γ . La respuesta inmune controla, pero no elimina al patógeno, por lo que, la falta de una respuesta apropiada da como resultado una TB aguda [27].

1.5 Modelo experimental de tuberculosis pulmonar progresiva

El modelo experimental de tuberculosis pulmonar progresiva desarrollado por el grupo de investigación del Dr. Hernández-Pando, se fundamenta en el uso de una cepa de ratones genéticamente idénticos (BALB/c) de 6 a 8 semanas de edad, que son infectados vía intra-traqueal con bacterias vivas y virulentas de la cepa prototipo de *M. tuberculosis* H37Rv a una dosis elevada de 2.5×10^5 bacterias.

Se caracteriza por el establecimiento de dos fases principales durante el desarrollo de la enfermedad. La primera fase es la *etapa temprana*, la cual corresponde al primer mes de infección y se representa histológicamente por la presencia en pulmón de infiltrado inflamatorio constituido por linfocitos y macrófagos en el intersticio alveolo-capilar, alrededor de vénulas y bronquios, y la formación de granulomas en la segunda semana de infección, constituidos principalmente por el acumulamiento de linfocitos y macrófagos, organizados en estructuras redondas u ovoides de límites precisos para contener a las bacterias.

Dichos granulomas están constituidos principalmente por linfocitos T CD4⁺ productores de citocinas tales como IFN- γ e IL-2 y macrófagos activados productores de TNF- α , IL-1 y gran cantidad de iNOS. En el modelo, el día clave que corresponde al clímax de una respuesta protectora es el día 21, cuando los granulomas alcanzan su plena madurez (Figura 5).

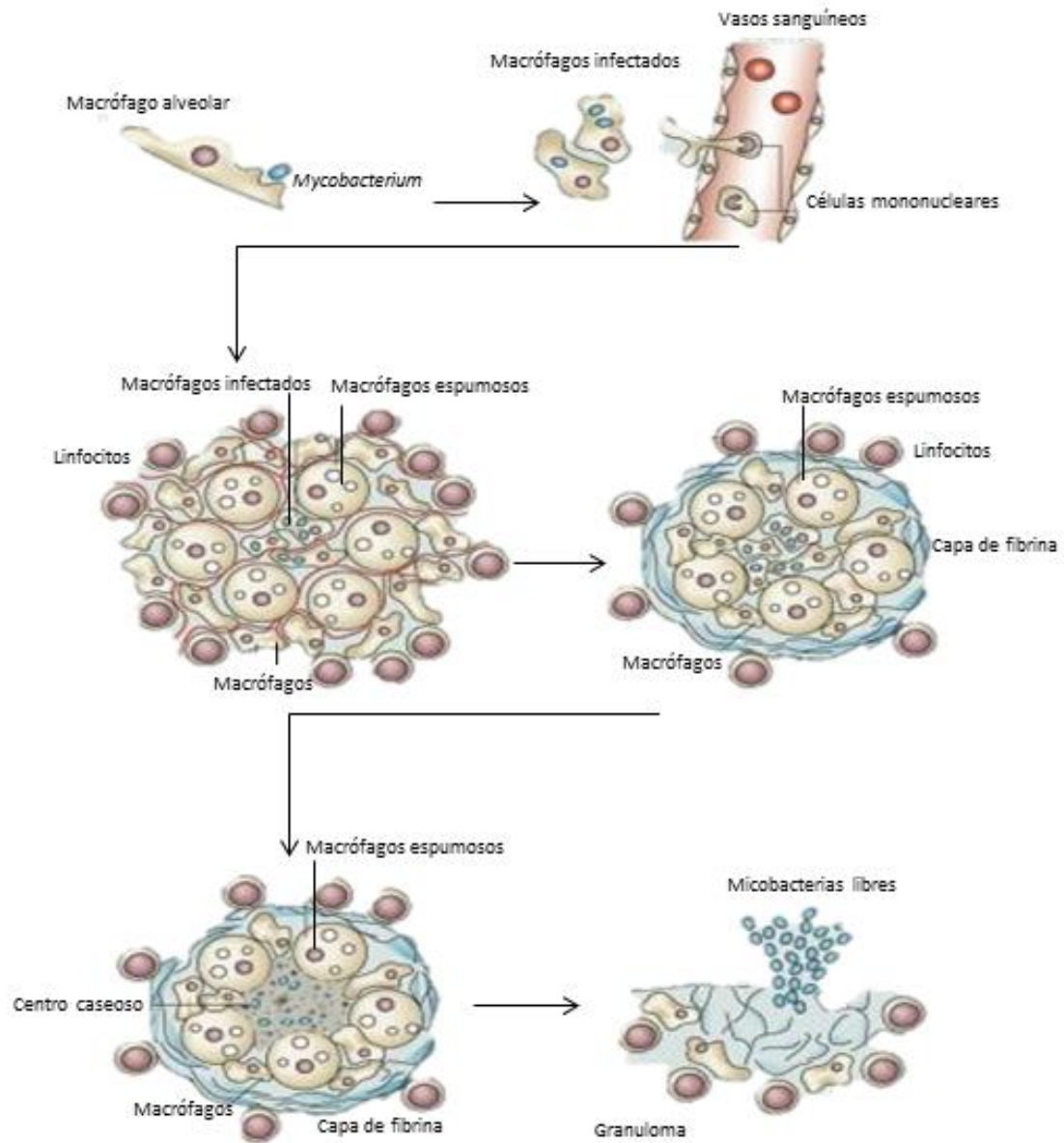


Figura 4. Ciclo de vida de *Mycobacterium tuberculosis*. La infección por micobacterias inicia cuando la bacteria es fagocitada por macrófagos alveolares, desencadenando una respuesta pro-inflamatoria, representada por el reclutamiento celular para la formación de granulomas con el propósito del aislamiento del patógeno. Estas estructuras bajo ciertas circunstancias pueden colapsar y las bacterias quedan libres en pulmón, lo que conlleva a la progresión de la enfermedad (Tomado de Russel, et al., 2010).

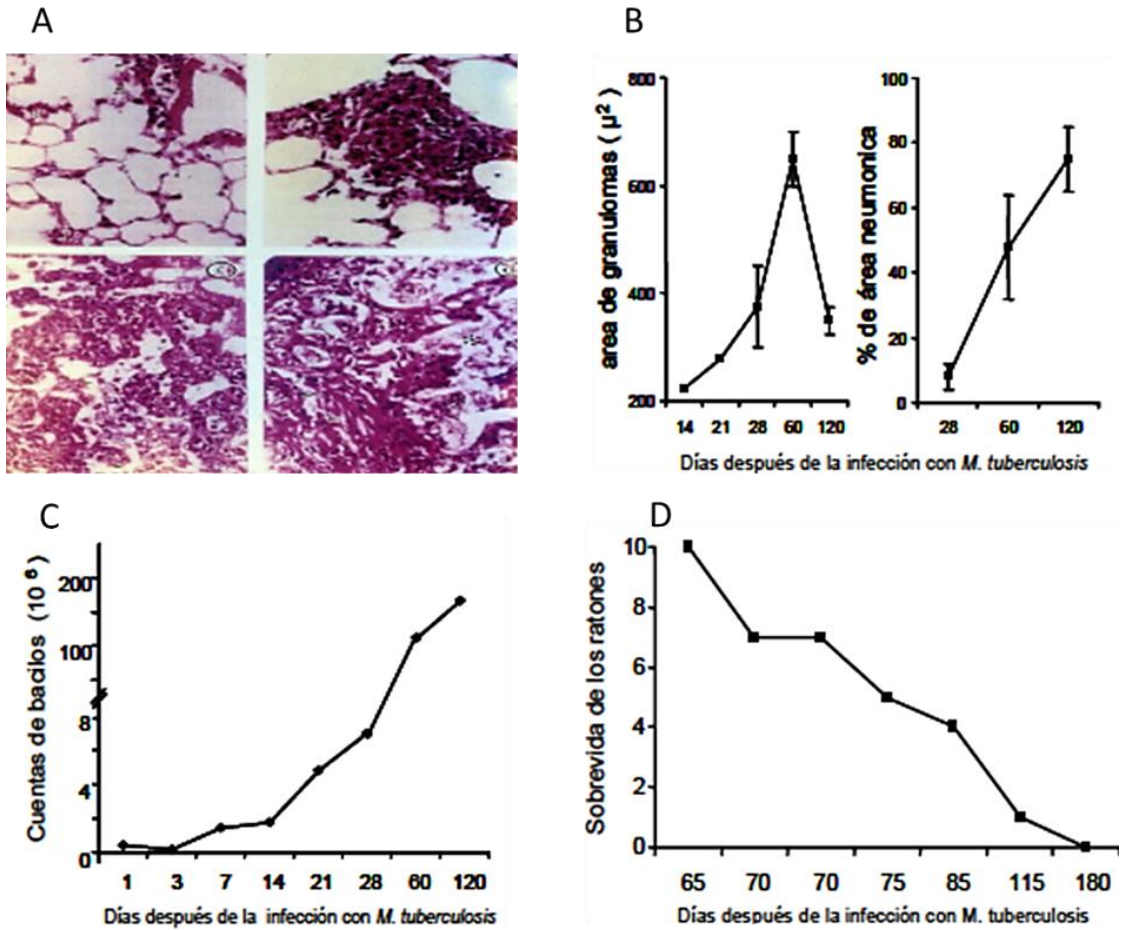


Figura 5. Características fundamentales del modelo murino de la TB pulmonar progresiva. (A) Imágenes histológicas representativas de la fase temprana (parte superior) y de la fase progresiva (parte inferior). (B) Morfometría automatizada del tamaño de los granulomas y el porcentaje de neumonía. (C) Determinación de unidades formadoras de colonia bacterianas en homogenizados pulmonares. (D) Curva prototipo de la supervivencia de los animales (Tomado de Hernández-Pando et al., 2004).

La segunda fase de la enfermedad corresponde a la *etapa avanzada o progresiva*, la cual se caracteriza por un gran incremento en el número de bacterias vivas a nivel pulmonar, así como por áreas de consolidación neumónica con focos de necrosis y extensa fibrosis intersticial. Durante esta fase se

incrementa significativamente la presencia y actividad de los linfocitos T cooperadores de tipo 2 (Th2), que se caracterizan por producir las interleucinas 4, 5, 6, 10 y 13.

En particular, la IL-4 es una citocina fundamental en la inducción de la diferenciación de los linfocitos B productores de anticuerpos; además, la IL-4 al igual que la IL-10 y la IL-13 son eficientes antagonistas de las células Th1 y de esta manera se desvía la inmunidad celular hacia la inmunidad humoral, contribuyendo así a favorecer la progresión de la enfermedad.

Los macrófagos disminuyen significativamente la producción de TNF- α , IL-1 e iNOS, e incrementan notablemente su capacidad productora de potentes citocinas anti-inflamatorias y supresoras de la inmunidad celular, como el factor de transformante beta (TGF- β) y la IL-10. El TGF- β es también una eficiente citocina inductora de la proliferación fibroblástica y de la síntesis de colágena, contribuyendo así a generar fibrosis. Estas alteraciones inmunológicas permiten que la enfermedad progrese generando extensa consolidación neumónica y muerte de los ratones por insuficiencia respiratoria (Figura 5) [33, 34].

En éste modelo se han reportado diferentes niveles de virulencia en cepas y aislados de *M. tuberculosis*, con diferentes porcentajes de sobrevida, daño pulmonar y expresión de citocinas [35-38]. Estudios previos han mostrado que algunas cepas de la familia Beijing son sumamente patógenas y además éstas correlacionan con aislados humanos con alta tasa de transmisibilidad, esto en base a indicadores epidemiológicos, mientras que otras cepas mostraron crecimiento reducido y baja incidencia de mortalidad en los ratones, siendo éstas correspondientes a los aislados humanos reportados epidemiológicamente sin transmisión entre la población [35].

En un estudio más se caracterizaron cepas de la familia Beijing, donde relacionaron la producción de grandes áreas de neumonía con la expresión temprana pero efímera de TNF- α e iNOS a nivel pulmonar y la elevada mortalidad

de los ratones; de esta forma se clasificaron como hipervirulentas por desencadenar una respuesta no protectora en comparación con lo previamente reportado con H37Rv [36].

En cuanto a *M. bovis* existe un estudio con diferentes aislados provenientes de Argentina, los cuales fueron probados en el modelo murino de TB pulmonar progresiva [34]. Se utilizaron diversas cepas, tanto virulentas como poco virulentas. *M. bovis* AN5 (cepa tipo) se caracterizó por tener una virulencia intermedia produciendo 50% de mortalidad después de 4 meses de infección y una moderada carga bacilar a nivel pulmonar. Después de dos semanas de infección esta cepa induce una fuerte respuesta inflamatoria con numerosa producción de granulomas y neumonía progresiva, afectando más del 60% de la superficie pulmonar (Figuras 6 y 7). En cambio los ratones infectados con la cepa 04-303, un aislado de jabalí proveniente de La Pampa, Argentina, presentaron elevada mortalidad, empezando a sucumbir a partir de la tercera semana pos-infección y para la sexta semana todos los animales habían muerto; de igual forma presentaron dos veces más unidades formadoras de colonia (UFC), en comparación con la cepa de referencia (Figura 6), con una respuesta inflamatoria moderada en la primera y segunda semana pos-infección, seguida de una repentina consolidación pulmonar con necrosis extensa. De la misma manera, se detectaron niveles bajos de citocinas pro-inflamatorias como de IFN- γ TNF- α e IL-4 (Figura 7).

En el mismo estudio, las cepas provenientes de aislados de ganado bovino fueron menos virulentas (534, V2 y 02-2B), lo cual permitió el 100% de sobrevivencia de los ratones después de 4 meses de infección. Los pulmones presentaron baja carga bacilar y pequeños parches de neumonía que afectaron menos del 20% de la superficie pulmonar y exhibieron poco desarrollo de granulomas en comparación con la cepa de referencia AN5 (Figura 6) [39].

Estos estudios muestran que en este modelo, algunos aislados de *M. bovis* se comportan como cepas altamente virulentas, además de que presentan un balance en el perfil Th1/Th2 durante todo el experimento en comparación con lo observado previamente con *M. tuberculosis*. Las cepas de *M. bovis* aisladas de animales salvajes demostraron ser más virulentas y provocar una respuesta inflamatoria no protectora, mientras que las aisladas de humanos o ganado exhibieron menor virulencia, mostrando un perfil Th1/Th2 al inicio de la infección y en la etapa tardía un perfil Th1 [39].

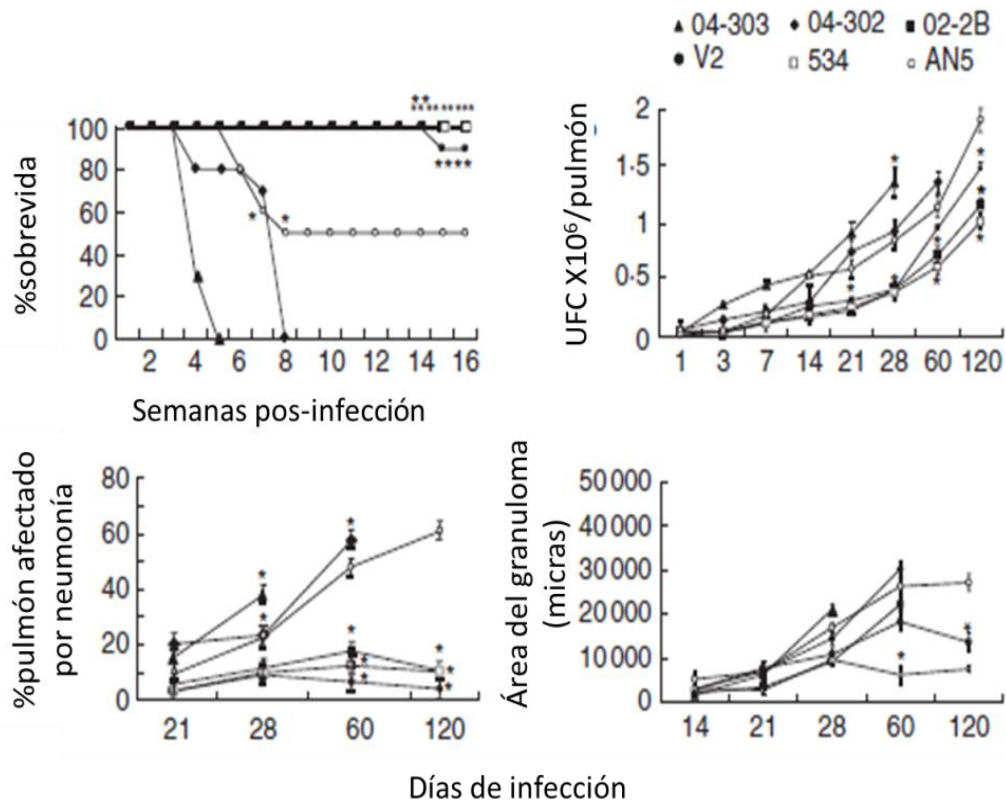


Figura 6. Características de la infección con *M. bovis* en el modelo murino de TB pulmonar progresiva. Sobrevida, carga bacilar pulmonar y morfometría (porcentaje de superficie pulmonar afectada con neumonía y tamaño de granulomas) en ratones BALB/c infectados con diferentes cepas de *M. bovis*. (Tomado de Aguilar et al., 2009).

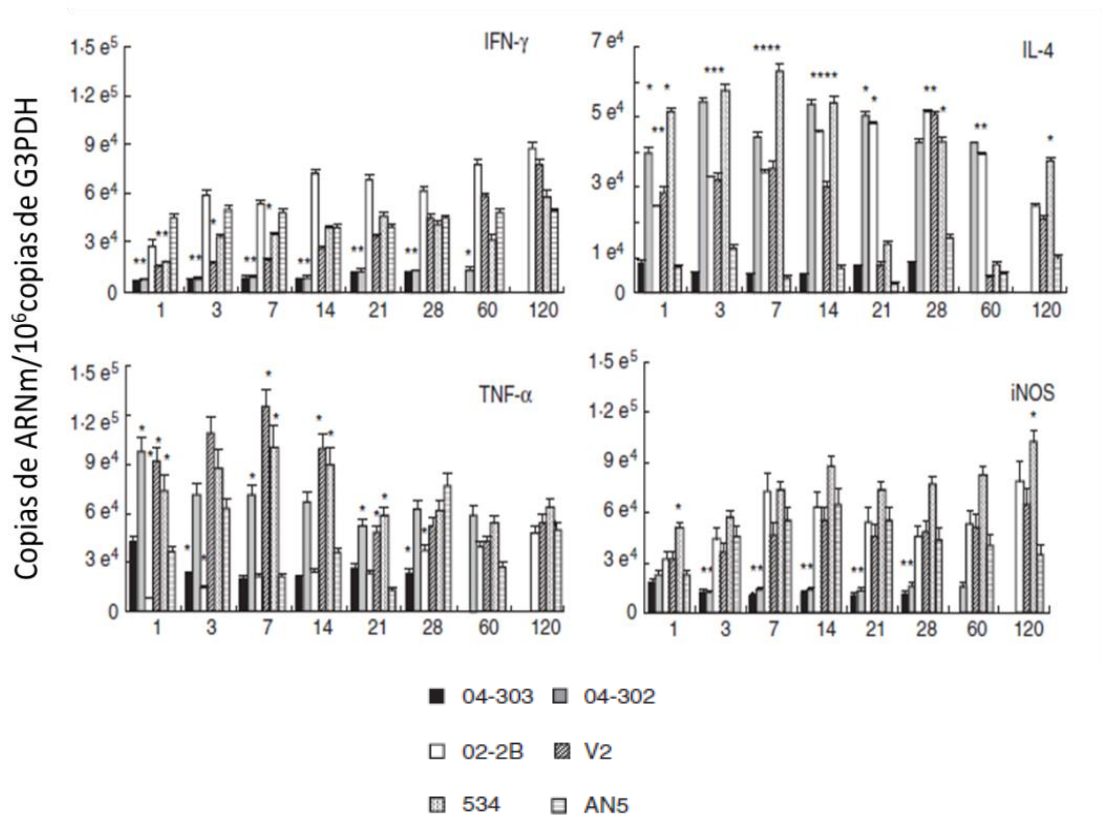


Figura 7. Expresión de citocinas por PCR-TR en pulmones de ratones BALB/c infectados con diferentes cepas de *M. bovis*. Determinación de la expresión del mensajero de las citocinas pro-inflamatorias TNF- α , IFN- γ e iNOS y de anti-inflamatorias como IL-4, durante la infección con diferentes cepas de *M. bovis* en un modelo murino. (Tomado de Aguilar et al., 2009).

1.6 Linfocitos T cooperadores

El sistema inmune es capaz de atacar una variedad de patógenos invasores. A pesar de que muchos tipos celulares participan en el control y eliminación de las infecciones, las células TCD4⁺ son las que dirigen la respuesta inmune contra microorganismos intracelulares. También son conocidas como células Th o T cooperadoras [40]. Ayudan a las células B a producir anticuerpos, al cambio de

clase de los mismos y a la maduración de afinidad, reclutan y activan células TCD8+, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos y otras células efectoras. También actúan directamente sobre varios tipos celulares, incluyendo células epiteliales y células de la mucosa, durante el proceso de eliminación de patógenos. Las diversas funciones de las células TCD4+ están determinadas por sus patrones de secreción de citocinas y sus tejidos de localización [41].

1.6.1 Diferenciación de linfocitos T cooperadores

La fuente inicial de factores de diferenciación para células Th1 y Th2 son células del sistema inmune innato que responden a antígenos microbianos; sin embargo, las citocinas efectoras que son subsecuentemente producidas por estas células pueden potencializar (alimentando y amplificando) la diferenciación del respectivo grupo de células T. Dependiendo el perfil de citocinas en el ambiente las células se polarizan para diferenciarse en grupos específicos de células efectoras [42].

La diferenciación de las células T cooperadoras es iniciada por señales combinadas que activan cascadas de señalización a través de receptores de citocinas y el receptor de células T (TCR). Estas señales inducen y activan factores de transcripción responsables de la expresión de genes específicos de linajes y citocinas características de una población celular [42].

Se pensaba que las células TCD4+ vírgenes, también llamadas Th0, sólo se diferenciaban en dos subpoblaciones celulares con funciones diferentes, tradicionalmente denominadas Th1 y Th2, determinadas por la forma de inducción, los patrones de citocinas que producen y sus mecanismos efectoras.

Para su diferenciación, las células Th1 necesitan la presencia de estímulos que favorezcan la producción de IL-12 por parte de las CPA. Los organismos intracelulares activan vías de señalización donde intervienen STAT1 (del inglés Signal Transducer and Activator of Transcription) y STAT4 que a su vez estimulan

al factor de transcripción T-bet para la inducción de la producción de IFN- γ y la inhibición del desarrollo de una respuesta de tipo Th2.

Por el contrario, la diferenciación de las células Th2 depende de estímulos que lleven a la producción de IL-4, como los que brindan los parásitos y los alérgenos, que bajo el control de STAT6, activan el factor de transcripción GATA-3, llevando a la producción de un patrón de citocinas caracterizado por IL-4, IL-5 e IL-13 que inhiben el desarrollo de las células de tipo Th1 (Figura 8).

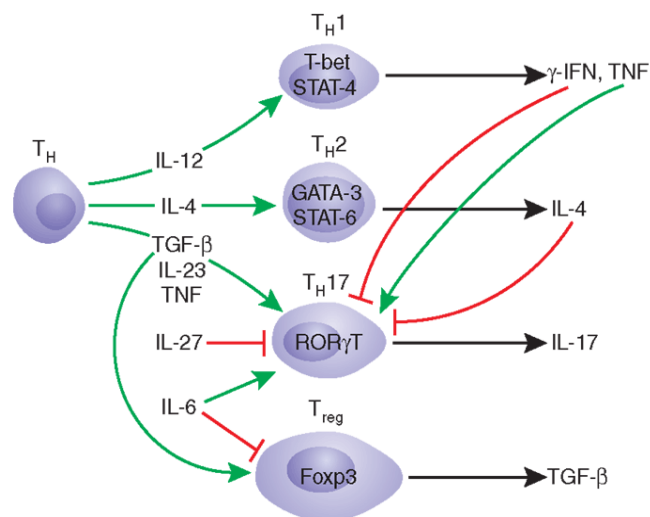


Figura 8. Diferenciación y regulación de células T cooperadoras. Las flechas verdes indican la regulación positiva, mientras que las líneas rojas indican inhibición. Los factores de transcripción de los linajes particulares se encuentran en el núcleo de las células (Tomado de Steinman, 2007).

El anterior paradigma ha sido alterado por hallazgos que sugieren la existencia de diferentes tipos de células TCD4⁺ efectoras que producen una gama de diversas citocinas por lo que constituyen linajes diferentes [43]. Hoy en día se han caracterizado varias subpoblaciones de linfocitos TCD4⁺ efectoras, dentro de las cuales se incluyen los linfocitos Th1, Th2, T reguladores (Treg), Th17, Th22, Th9 (Figura 9) [43-49].

1.6.2 Linfocitos Th17

Los linfocitos Th17 constituyen una reciente subpoblación del sistema inmune adaptativo; su función no está totalmente dilucidada, pero datos sugieren que este tipo celular está encargado de la liquidación de patógenos, principalmente extracelulares que requieren una respuesta inflamatoria masiva y que no se eliminan eficazmente bajo la acción de las células Th1/Th2 [45, 50].

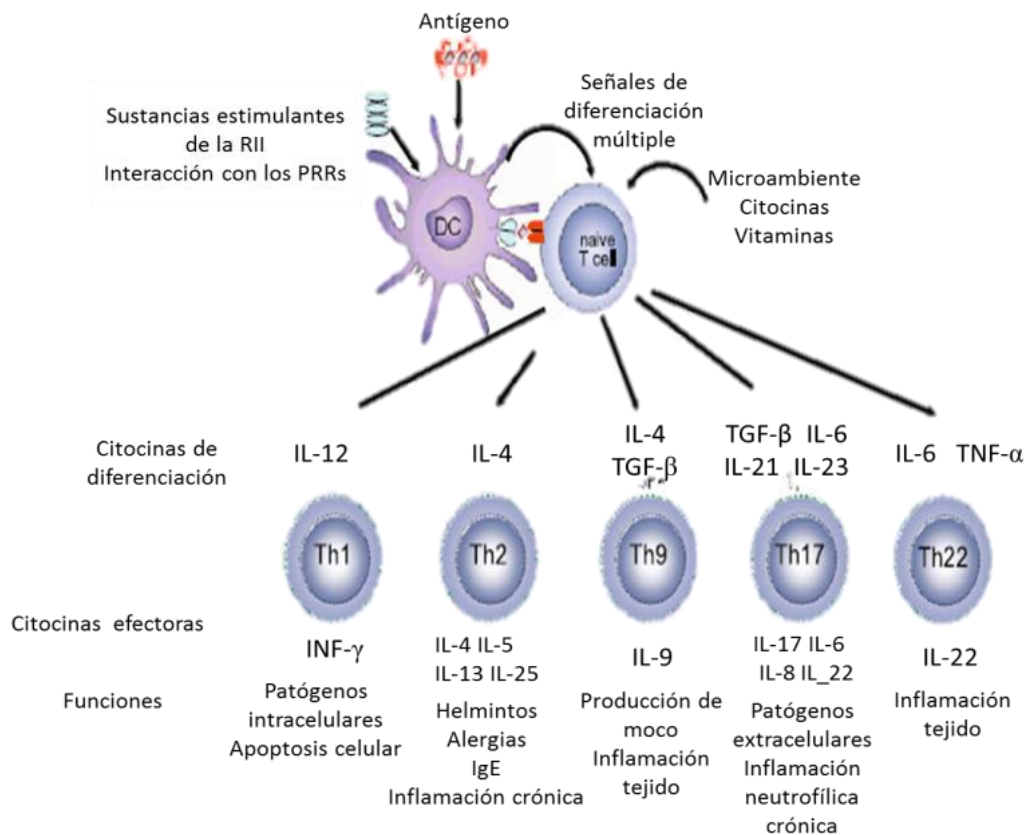


Figura 9. Diferenciación de células T vírgenes. Dependiendo de los estímulos desencadenados por el antígeno y el microambiente de citocinas, las células T vírgenes se pueden diferenciar en Th1, Th2, Th9, Th17, Th22, entre otros tipos, con base en perfiles específicos de citocinas e interacción con otras células. Estos subconjuntos de células promueven diferentes tipos de respuestas inflamatorias (Tomado de Jutel y Akdis, 2011).

En un principio las células Th17 y la Interleucina 17 (IL-17), principal citocina que produce esta población celular, se relacionaron con la respuesta inmune protectora a bacterias extracelulares en pulmón y mucosa intestinal, asociándolas con el reclutamiento de neutrófilos y reparación tisular; actualmente también se vinculan con una respuesta inflamatoria protectora anti-fúngica [41, 42, 49, 51].

Las células Th17 no sólo producen IL-17A (comúnmente llamada IL-17), si no también IL-17F, IL-22 e IL-21. Estas interleucinas tienen efectos en diversos tipos celulares e inducen la producción de citocinas y quimiocinas pro-inflamatorias para la movilización de neutrófilos [42, 51], particularmente a la mucosa en el intestino y pulmón [52].

Al ser potentes inductores de inflamación de tejidos, las células Th17, han sido asociadas con la patogenia de condiciones inflamatorias como dermatitis (eczema), psoriasis, enfermedad inflamatoria del intestino y sobre todo con enfermedades autoinmunes, especialmente durante el desarrollo de artritis reumatoide, miocarditis y encefalitis autoinmune experimental en modelos murinos. Los mecanismos por los que las células Th17 causan cambios patológicos en estos modelos de ratones autoinmunes sólo se conocen parcialmente. Uno de estos se le atribuye a la IL-17, porque con la neutralización de esta citocina *in vivo* se obtiene un efecto significativo y en la mayoría de las veces beneficioso al disminuir la inflamación [53, 54]. Una respuesta de tipo Th17 es la teoría más reciente para explicar estos fenómenos de daño a los tejidos mediado por células T [55].

Para su diferenciación, los linfocitos Th17 requieren cantidades bajas de TGF- β en combinación con otras citocinas como interleucina-6 (IL-6), IL-1 β e interleucina-23 (IL-23). En este caso, TGF- β es totalmente necesario para inducir un receptor nuclear de tipo esteroideo ROR γ t (receptor gamma t huérfano relacionado con ácido retinoico), mediante la vía de STAT3 en ratones, para

inducir la transcripción de genes codificantes de IL-17 y otros factores pro-inflamatorios [56]. La expresión de ROR γ t sucede solamente con una señal adicional de IL-6 o interleucina 21 (IL-21); de esta manera el factor nuclear se libera de la represión y promueve el programa transcripcional Th17 para mantener la señal de diferenciación (Figura 10) [57, 58].

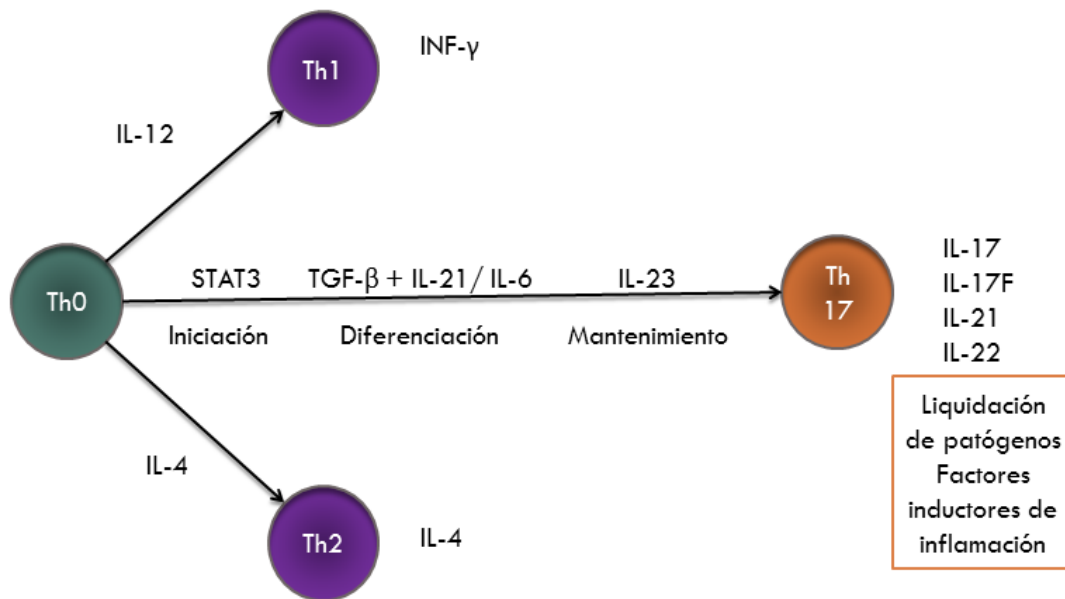


Figura 10. Diferenciación de Linfocitos Th17. Factores como TGF- β e IL-6 son necesarios para la diferenciación de los linfocitos Th17; por su parte, la IL-23 mantiene una respuesta de este tipo (Modificado de Korn et. al., 2008).

Varios estudios han demostrado que TGF- β es indispensable para la diferenciación de las células Th17 humanas, no siendo así para las células TCD4+ vírgenes de ratón, sugiriendo que los requerimientos para su polarización hacia Th17 son diferentes tanto en el ratón como en el humano. Por otra parte, TGF- β es absolutamente necesario para la inducción inicial de IL-17 en células TCD4+ vírgenes y para la inducción del receptor de IL-23, el cual potencializa la

diferenciación a Th17 al ser capaces las células de responder a IL-23, y así promover su maduración [42].

1.6.3 Balance de la respuesta Th17

Existe poca información sobre la regulación de la respuesta Th17, pero se sabe que puede ser controlada eficazmente por las células Treg. Un método propuesto es que a través de grandes cantidades de TGF- β se induce el factor de transcripción Foxp3 para la proliferación de los linfocitos Treg y así la inhibición de las células Th17. IL-10, es un factor de crecimiento para las células Treg; así que en grandes cantidades inhibe la generación de células Th17 [42].

Un componente más que frena su diferenciación es el ácido retinoico, debido a que éste actúa directamente sobre las células T vírgenes, incrementando las vías de señalización de TGF- β e inhibiendo la señalización de IL-6. De forma contraria, la presencia de IL-6 inhibe la diferenciación de las células Treg y promueve una respuesta tipo Th17 [52].

La interleucina-27 (IL-27) es otra citocina que forma parte de la familia de la IL-12; se relaciona con la inhibición de la diferenciación de células Th17, con el fin de limitar la producción de inflamación de origen infeccioso o autoinmune. IL-10 e IL-27 pueden servir como citocinas reguladoras para prevenir inmunopatologías extensas manteniendo una respuesta celular controlada [51].

Recientemente también se ha descrito que el Factor Inducible de Hipoxia (HIF) regula ambas poblaciones Th17 y Treg. Dependiendo del microambiente externo, HIF promueve el desarrollo Th17 mediante la activación directa de ROR γ t y la colaboración con el mismo para activar genes característicos de los linfocitos Th17, como el gen de la IL-17. De forma contraria, HIF inhibe la diferenciación de linfocitos Treg mediante un mecanismo diferente y no transcripcional. HIF marca a Foxp3 para su ubiquitinación y degradación dentro del proteosoma, usando su propio sistema de ubiquitina ligasa responsable de su degradación. Estos

mecanismos se activan dependiendo el ambiente metabólico de la célula, siendo capaz ésta de elegir su destino pro-inflamatorio o regulador [57].

1.7 Interleucina 23

La IL-23 es miembro de la familia de la IL-12. Fue descrita por primera vez en el año 2000 como un heterodímero compuesto por dos subunidades p19 y p40; esta última es compartida con la IL-12. No está involucrada en la polarización inicial de células Th17, pero es necesaria para sustentar una completa diferenciación, por lo que expande y estabiliza las respuestas tipo Th17 [42].

Es producida por macrófagos, células dendríticas, células T, células endoteliales [59]; su receptor es expresado en células NK, macrófagos, CD de médula ósea, linfocitos TCD4+ activados y linfocitos TCD4+ de memoria, y no en células T vírgenes. En intestino es producida por células del sistema inmune innato, como CD y macrófagos [60].

Se ha reportado que la IL-23 promueve la producción de IL-17 en linfocitos TCD8+ y TCD4+ de memoria. Dicha actividad esta mediada por la activación de la vía JAK/STAT después de unirse a su receptor. Actúa sobre CD mieloides incrementando su producción de IFN- γ . Actualmente se desea determinar si tiene un efecto inmunorregulador, disminuyendo la producción de IL-12 y, por lo tanto, sus funciones [60].

Suprime la producción de citocinas anti-inflamatorias como IL-10 e induce la producción de IL-17, IL-1, TNF- α e IL-6 en células del sistema inmune innato. Se necesita una concentración sostenida para que se mantenga un respuesta Th17, por lo que se podría llamar como un factor determinante de una respuesta inmune inflamatoria de tipo Th17. Además de que actúa como puente entre las células de la respuesta inmune innata y la respuesta adaptativa Th17 [42].

En psoriasis, las células extraídas de lesiones de piel muestran predominantemente un fenotipo Th17 [42]. En 2003, se descubrió que ratones deficientes de la subunidad p19 de IL-23 eran resistentes al desarrollo de encefalomielitis autoinmune experimental (EAE) y poseían muy pocas células capaces de secretar IL-17 [59].

1.8 Interleucina 17

La familia de citocinas a la que pertenece la IL-17 es un grupo de 6 miembros recientemente descubierto, que incluye a la IL-17A, B, C, D, IL-17E (o IL-25) y la IL-17F. IL-17 (IL-17A) es el miembro original de esta familia. La IL-25 es producida principalmente por las células Th2, mientras que los linfocitos Th17, los linfocitos gamma delta (Ly δ), las células NK y neutrófilos son productores de IL-17F [45].

Hasta la fecha, la mayoría de los reportes se han centrado en tres citocinas dicha familia: IL-17A, IL-17E y la IL-17F. La función principal de estos 3 miembros es el reclutamiento de diferentes tipos de células a través de la inducción de otras citocinas y quimiocinas. IL-25 (IL-17E) induce la expresión de citocinas de tipo Th2, por lo que participa durante las respuestas alérgicas de tipo Th2 [3]. Tanto la IL-17A como la IL-17F tienen propiedades pro-inflamatorias, promueven la migración de neutrófilos y actúan sobre una amplia gama de tipos de células para inducir la expresión de factores inflamatorios [45].

La IL-17 fue clonada en 1993 y se limitó en gran medida a la expresión de células TCD4+ de memoria. Sus actividades biológicas inicialmente eran atribuidas a la diferenciación de progenitores de granulocitos mediante la estimulación de la producción del factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) y la secreción de IL-3 en las células estromales de médula ósea [61].

La IL-17 es producida por varios tipos celulares, incluyendo $\text{Ly}\delta$ [62], células NK, neutrófilos, eosinófilos y CD (Langerhans) [63] tanto en la respuesta inmune innata como adaptativa, por lo que funciona como una conexión entre ambas [64]. Es una citocina clave para el reclutamiento, activación y migración de neutrófilos [54]. Tiene propiedades pro-inflamatorias, induce la expresión de citocinas ($\text{TNF-}\alpha$, IL-1 β), factores estimulantes de colonias (GM-CSF, G-CSF), quimiocinas (CXCL1, CXCL8, CXCL10) y metaloproteasas que median la destrucción del tejido [42, 60, 65].

Se le ha relacionado con la protección contra agentes patógenos extracelulares induciendo una respuesta inmune innata epitelial, promoviendo la movilización de células del sistema inmune mediante la inducción de quimiocinas en células epiteliales y la regeneración de tejido. Se piensa que otro mecanismo probable en el que puede estar participando es en la estimulación de la producción de péptidos antimicrobianos, como β -defensinas en las células epiteliales de la piel, los pulmones y el sistema gastrointestinal. En general, la IL-17, induce una fuerte reacción pro-inflamatoria y refuerza la respuesta inmune Th1 citotóxica mediante el aumento de la molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1) para el contacto celular dependiente de células T y los queratinocitos [53].

También existe evidencia de que induce la producción de ON y aumenta los niveles de ácido ribonucleico mensajero (ARNm) de la iNOS en condrocitos de cartílago osteoartrítico, llevando al daño y destrucción de la matriz extracelular, contribuyendo a una reducción total de la función articular.

La unión de IL-17 a su receptor da como resultado la activación del factor de transcripción nuclear NF- κ B con la ayuda de la proteína adaptadora ACT1 y la proteína de unión TRAF6 [42, 53]. Además de los efectos directos sobre la expresión génica en las células diana, IL-17 funciona como estabilizador del $\text{TNF-}\alpha$. También activa otros factores de transcripción como TNFR (Receptor del TNF), que junto con NF- κ B, regulan positivamente la expresión de citocinas pro-

inflamatorias como IL-1, IL-6, IL-17F, IL-8, TNF- α , factores de crecimiento y quimiocinas. Estos eventos parecen promover efectos inflamatorios y movilización de neutrófilos al sitio de la infección aguda [43]. IL-17 actúa para regular la homeostasis de granulocitos [66].

En general, induce una respuesta tisular, encabezada por neutrófilos, sin embargo, si la producción de esta citocina no es controlada, se corre el riesgo de causar daño inmunopatológico severo [42]. Ratones knock out (KO) para el receptor de IL-17 muestran en sangre periférica números de neutrófilos circulantes casi normales, pero son mucho más susceptibles a la radiación gamma sub-lethal y manifiestan una reducida recuperación de neutrófilos [61].

En infecciones bacterianas intracelulares el papel de IL-17 no está bien comprendido. Estudios recientes sugieren que esta citocina aumenta la inmunidad contra algunos patógenos intracelulares; sin embargo, el efecto no es tan dramático como en infecciones bacterianas extracelulares. IL-17 es necesaria para la protección contra la neumonía por *Chlamydia muridarum* [67], *Klebsiella*, *Citrobacter rodentium*, *Candida albicans* y *Mycoplasma pulmonis* [64, 66, 68]. Finalmente, IL-17 ha sido ampliamente implicado como mediador de enfermedades autoinmunes [66].

Algunos estudios han demostrado que las citocinas IL-1 β e IL-18, promueven la producción innata de IL-17 por Ly δ y por células TCD4+ durante enfermedades autoinmunes experimentales inducidas por la inmunización de auto-antígenos en el adyuvante completo de Freund's (siendo *M. tuberculosis* su componente inmunomodulador). *M. tuberculosis* activa la vía del inflamósoma induciendo el procesamiento de pro-IL-1 β e IL-18 en citocinas maduras, las cuales a su vez inducen la producción de IL-17. Por lo anterior, la IL-1 β ha sido considerada blanco de fármacos importante para las enfermedades autoinmunes, porque está implicada en el desarrollo de la patología local, asociada a la activación de células T y de sus productos pro-inflamatorios [62]. En el Vitiligo se

ha visto el mismo acontecimiento: antígenos estimulan a las células dendríticas para la producción de interleucina IL-1 β que a su vez interviene en la polarización hacia una respuesta Th17 [69].

En modelos de infección con *Salmonella entérica* y *Listeria monocytogenes*, ratones deficientes en la producción de IL-17 presentaron una disminución en el reclutamiento de neutrófilos, asociado con un aumento de susceptibilidad a la infección; sin embargo, no se sabe si es el único mecanismo por el cual IL-17 incrementa la inmunidad contra estos patógenos [70, 71]. Además del defectuoso reclutamiento de neutrófilos en respuesta a la infección de bacterias, la administración local de IL-17 en el pulmón o en el espacio sinovial [72] resulta en una significativa acumulación de neutrófilos en estos compartimentos de tejido *in vivo* [61].

1.9 Relación de la tuberculosis con la respuesta inmunológica Th17

La importancia de las células Th17 y la producción de citocinas durante el combate de infecciones y el mantenimiento de la homeostasis de las superficies mucosas se contrastan con su capacidad para participar en la destrucción de tejido. Por lo que el potencial de IL-17 de mediar la patología inmune, como se ha visto en diversos modelos de infección y enfermedades autoinmunes, sugiere que podría tener un efecto perjudicial en infecciones bacterianas crónicas como TB [51].

La respuesta Th17 recientemente estudiada en infecciones con patógenos intracelulares, se relaciona con la función de promover el reclutamiento y supervivencia eficiente de neutrófilos. Lo anterior podría ser un mecanismo por el cual la integridad de los granulomas se mantenga, independientemente de la respuesta protectora Th1, durante las infecciones por micobacterias.

La IL-23 se considera capaz de inducir la producción de IFN- γ en las células Th1 [47, 73]; del mismo modo, es crucial para la diferenciación de células Th17, las cuales, mediante la producción IL-17, inducen mediadores inflamatorios que favorecen el reclutamiento celular y la formación del granuloma [53]

IL-17 está relacionada con la inducción de programas inflamatorios asociados a secreción de quimiocinas y el reclutamiento de polimorfonucleares (PMN). No es sorprendente que la ausencia de esta citocina no signifique un gran impacto en la habilidad de controlar la infección por TB. Sin embargo, su presencia puede facilitar el reclutamiento de células protectoras y la organización de focos inflamatorios en pulmón, por lo que se le vincula con la formación temprana de granulomas [74], siendo los Ly δ la fuente principal de esta citocina [75-77].

Por otro lado, la excesiva producción de IL-23 e IL-17 puede causar inmunopatología por un reclutamiento celular indiscriminado. Por lo anterior, cabe mencionar, que el fino balance entre las repuestas Th1 y Th17 es central para definir el resultado de la infección por *M. tuberculosis* [51, 78], por lo que una respuesta Th17 puede proveer una protección independiente de IFN- γ , que contribuye al control temprano de la infección, pero a su vez, este efecto está asociado con el incremento de infiltrado por neutrófilos y daño al tejido infectado [79, 80].

El grupo de trabajo de la Dra. Cooper propuso un esquema general de la respuesta Th17 en TB, en el cual consideran que citocinas específicas en el sitio de inflamación producidas por células infectadas por micobacterias son cruciales para el balance de una respuesta Th1/ Th17. También analizaron la expresión de IL-12p40 en CPA en respuesta a *M. tuberculosis*, demostrando que se determina el perfil de la respuesta inmune dependiendo el estímulo de citocinas como la IL-12 o la IL-23. Esta inducción está asociada al tipo de receptores que reconocen la bacteria, tales como los TLRs, NOD (del inglés Nod-like receptors) y lectina tipo C. Los TLRs son importantes inductores de IL-12p40 (subunidad que comparten IL-

12 e IL-23). En dosis bajas de infección con *M. tuberculosis*, el TLR9 es requerido para la inducción de IL-12p40 *in vivo*, mientras que TLR2 es necesario *in vitro*. Otro receptor intracelular implicado en el reconocimiento de *M. tuberculosis* es NOD/CARD15, el cual reconoce específicamente de peptidoglicanos de la pared celular y de esta forma se induce a la producción de IL-12p40. [51].

En un estudio en CD demostraron que IL-23 fue preferentemente producida de manera dependiente de TLR2 en ausencia de IFN- γ , mientras que en presencia del estímulo de IFN- γ se produjeron ambas citocinas tanto IL-12 como IL-23, sugiriendo que antes de la expresión de IFN- γ , las principales células efectoras son productoras de IL-17, pero después, durante la infección ambas citocinas son inducidas [51]. De igual forma, han asociado al TLR4 y a Dectina-1 (principal receptor de beta-glucano de la familia lectina-C) en la inducción de la producción de IL-17 bajo estímulo de *M. tuberculosis*. Este proceso es completamente dependiente de IL-1 β endógena [81]. Con estos estudios se corrobora que *M. tuberculosis* es reconocido por distintos receptores y es capaz de inducir tanto IL-12 como IL-23, las cuales se encargaran de diferenciar la respuesta en Th1 o Th17 respectivamente.

Es probable que IL-23 actúe tanto en el tejido como en los nódulos linfáticos, primero para conducir la respuesta adquirida y posteriormente para promover la expresión de un fenotipo celular encargado de la infiltración de linfocitos durante el desarrollo de la inflamación crónica del tejido pulmonar. Como IL-23 se produce tempranamente por macrófagos alveolares, está en condiciones de conducir una pronta respuesta de IL-17 a partir de células innatas en el pulmón, las cuales son importantes para el control de infecciones bacterianas agudas [22].

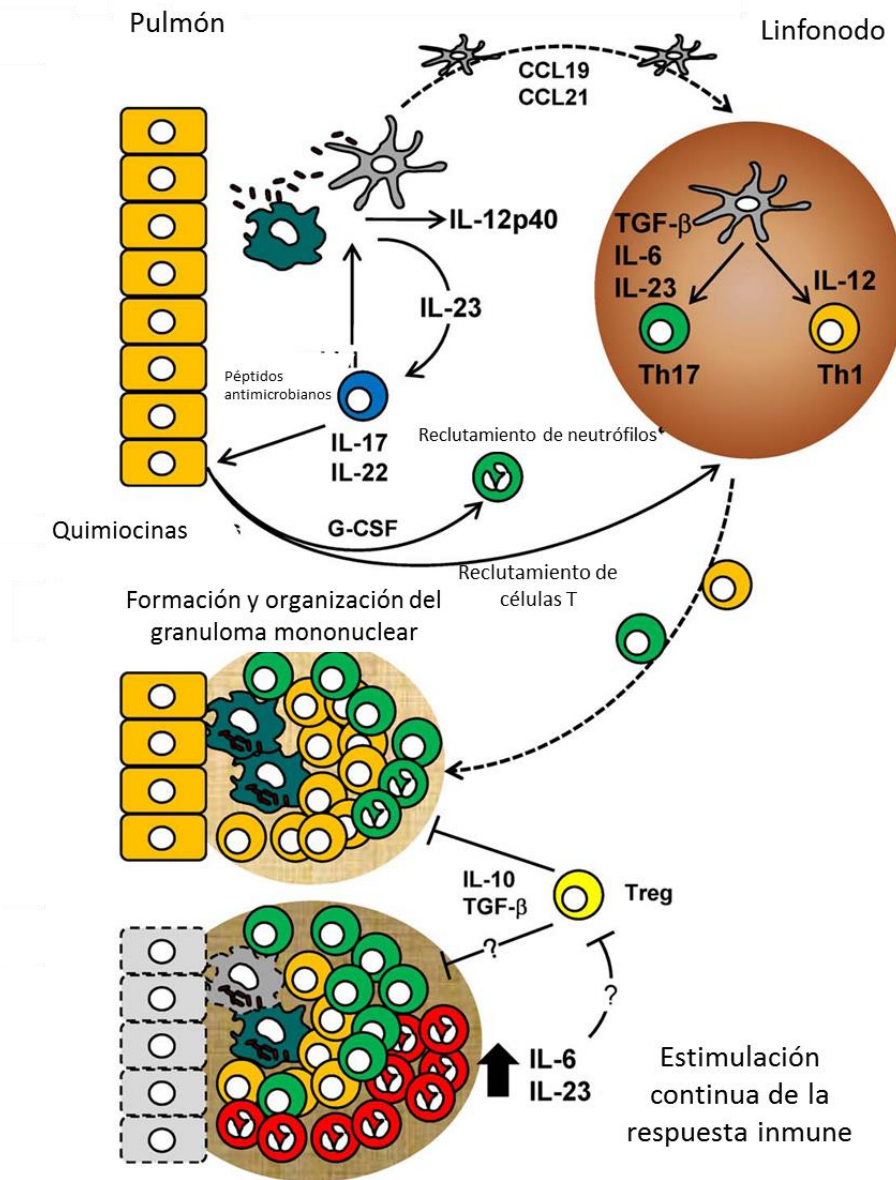


Figura 11. IL-17 y células Th17 juegan un papel central en la infección por tuberculosis. Durante las etapas iniciales de la infección IL-17 es producida por células innatas; actúa promoviendo la secreción de péptidos antimicrobianos, G-CSF y quimiocinas. Cuando las CD migran al ganglio linfático, se polarizan tanto linfocitos Th1 como Th17. La producción de quimiocinas promueve el reclutamiento celular y la formación de granulomas. Un aumento constante de citocinas pro-inflamatorias ocasiona acumulación celular excesiva y desarrollo de daño patológico (Tomado de Torrado y Cooper, 2010).

IL-17 puede tener efectos tempranos benéficos, como el reclutamiento de neutrófilos y la promoción de la secreción de quimiocinas específicas de tejido (CXCL9, CXCL10 y CXCL11), pero una exposición prolongada de los neutrófilos a IL-17 o IL-23 puede hacer que las células sobrevivan más tiempo y cambien su fenotipo provocando daño tisular (Figura 11) [51]. Se ha demostrado que IL-17 induce en fibroblastos y células epiteliales humanas la expresión de factores reclutadores de neutrófilos como IL-8 y G-CSF [82].

En estudios recientes, se ha determinado la importancia de las funciones de IL-17 e IL-23 en la respuesta inmune principalmente contra *M. tuberculosis* y *M. bovis* [66, 74, 78, 82, 83].

Ratones deficientes de IL-23 infectados con *M. tuberculosis* mostraron muy poca inducción del ARNm de IL-17 en pulmón junto con una respuesta granulomatosa alterada en su modelo. En este sentido, la falta de una respuesta temprana de IL-17 se ha visto en ratones infectados con TB deficientes de Ly β [66].

Okamoto y colaboradores en el 2010 demostraron que la ausencia de IL-23 o IL-17 no causa gran impacto en la capacidad de los ratones para controlar la infección por *M. tuberculosis* en una dosis baja; pero ante una dosis alta, los ratones deficientes a IL-17 son incapaces de controlar la infección [74].

Cruz y colaboradores en el 2010 demostraron que una vacunación repetitiva por vía subcutánea con BCG en ratones infectados con *M. tuberculosis*, resulta en una elevada respuesta tipo Th17 comparada con el ratón control. Junto con el incremento en el número de células productoras de IL-17 también se vio un incremento en la expresión de citocinas pro-inflamatorias como TNF- α , IL-6 y MIP-2, coincidiendo con un aumento en el número de neutrófilos en pulmón. También determinaron que la acumulación de células productoras de IL-17 es dependiente de la expresión local de IL-23, concluyendo que esta respuesta es altamente patológica y causa daño tisular extenso [78].

En un estudio del 2011 donde co-infectaron ratones con *M. bovis* y *Strongyloides venezuelensis*, helminto intestinal, describieron una respuesta inmune deficiente para controlar la infección por micobacterias, basada en una reducción de la producción de IL-17 por las células pulmonares y aumento de la carga bacteriana, concluyendo que una co-infección con helmintos intestinales altera la susceptibilidad de los individuos a infecciones micobacterianas y desarrollo de TB [83].

Al comparar células de sangre periférica de individuos sanos y de personas con TB activa, en este último grupo se describieron 2 poblaciones de linfocitos T de memoria con perfil pro-inflamatorio, los productores de IL-17 y los productores de IL-22, estirpes totalmente diferentes a los Th1, que contribuyen a la protección montando una respuesta inmune adaptativa contra la infección. En este mismo estudio reportaron que, antígenos específicos de *M. tuberculosis* inducen la producción de IL-17 en células mononucleares de individuos sanos. También reportaron que existe menor expresión de estas citocinas en sangre periférica que en lavados bronquio-alveolares, sugiriendo que, en el sitio de infección, es decir, el pulmón, la expresión de IL-17 en pacientes tuberculosos podría ser diferente que la expresión en sangre periférica [82].

Una reducción de la respuesta Th17 por la regulación de la expresión negativa del receptor de IL-6 puede estar asociada con la evolución clínica de la infección por *M. tuberculosis*, por lo que puede ser un mecanismo importante en el desarrollo de la TB activa [84].

En 2012, Basile y colaboradores reportaron que las cepas MDR/MFR son fuertes inductoras de IL-17 en comparación con las cepas susceptibles a antibióticos de la familia Harlem y familia LAM. Los pacientes con TB MDR/MFR mostraron la más alta expresión de IL-17. Estos autores concluyeron que las células productoras de IL-17 podrían desempeñar un papel inmunopatológico en la TB MDR/MFR, promoviendo daño severo del tejido que puede estar asociado con

la baja eficacia de los fármacos de segunda línea empleados en el tratamiento convencional [85].

La regulación de la inmunopatología durante la infección crónica por TB es esencial para la supervivencia del huésped; la IL-23, la IL-17 y las células Th17 juegan un papel importante mediante mecanismos que incluyen el reclutamiento de neutrófilos y la organización del granuloma; sin embargo, estos eventos necesitan ser regulados, porque grandes cantidades de neutrófilos en el pulmón, están asociados con un incremento en la patología y un mal pronóstico.

2. Justificación

La TB es considerada una enfermedad muy compleja en la que participan diversos factores del huésped (constitución génica, respuesta inmunológica), del patógeno (genes y factores de virulencia) y del ambiente (pobreza, desnutrición, hacinamiento). Es importante el desarrollo de modelos animales de infección con micobacterias que colaboren a la caracterización de los mecanismos inmunológicos que contribuyan a la protección contra cepas de *M. bovis* y *M. tuberculosis* de baja e intermedia virulencia, y de los mecanismos inmunopatológicos mediados por cepas de alta virulencia que participan en el proceso de daño tisular y progresión de la enfermedad.

En los últimos años se ha descrito una nueva población celular denominada Th17, linfocitos que con ayuda de otras citocinas como IL-23 e IL-17 son capaces de desarrollar una respuesta inmune pro-inflamatoria benéfica contra diversos patógenos, entre ellos, micobacterias. Por otro lado, estas citocinas también se han relacionado como parte efectora del desarrollo de respuestas inmunopatológicas, participando en la estimulación excesiva de la respuesta inflamatoria y el consecuente daño tisular.

Por esta razón, es importante estudiar la cinética de producción de citocinas como IL-17 e IL-23 durante el desarrollo de la respuesta inmune tras la infección con cepas de baja, intermedia y alta virulencia para identificar su participación como una vía alterna de protección o de desarrollo patológico de la enfermedad, lo cual ayudará a tener un mayor conocimiento de la respuesta inmune frente a micobacterias.

3. Hipótesis

La cinética de expresión génica y la producción de IL-17 e IL-23 depende del nivel de virulencia de la cepa infectante de *M. bovis* y *M. tuberculosis* en el modelo murino de tuberculosis pulmonar progresiva.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

Determinar la cinética de expresión de IL-17 e IL-23 en pulmones de ratones infectados con cepas de *M. bovis* y *M. tuberculosis* de virulencia diferente utilizando el modelo murino de tuberculosis pulmonar progresiva.

4.2 Objetivos particulares

1. Determinar el nivel de virulencia de las cepas de *M. bovis* (534 y 303) y *M. tuberculosis* (H37Rv y 48p) durante la infección de ratones en el modelo experimental de tuberculosis pulmonar progresiva mediante la evaluación de sobrevivencia, daño tisular (porcentaje de neumonía y necrosis) y carga bacilar pulmonar.
2. Identificar la cinética de expresión de IL-17 e IL-23 utilizando la técnica de PCR-Tiempo Real a lo largo del modelo experimental de tuberculosis pulmonar progresiva.
3. Estudiar mediante inmunohistoquímica (IHQ) la expresión a nivel de proteína y la fuente celular de IL-17 en zonas de inflamación perivascular, intersticial y peribronquial, granulomas y neumonía durante la infección en el modelo murino de tuberculosis pulmonar progresiva.

5. Materiales y métodos

5.1 Ubicación

La parte experimental del presente trabajo se llevó a cabo en el laboratorio de Patología Experimental del Departamento de Patología del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán” (INCMNSZ).

5.2 Cepas de *Mycobacterium spp.*

Para la infección con *M. tuberculosis*, se utilizó la cepa prototipo H37Rv y la cepa Beijing 48p; esta última es un aislado clínico proveniente de Sudáfrica que fue inoculado y recuperado de un ratón vacunado con BCG Phipps. Para *M. bovis* se emplearon las cepas 534 de baja virulencia, aislada de ganado y la cepa 04-303 de alta virulencia, aislada de jabalí, ambas provenientes de Argentina [39] .

5.3 Preparación de inóculos

Las cepas se crecieron en medio 7H9 Middlebrook (Difco) enriquecido con ADC (albumina, dextrosa y catalasa; Becton Dickinson) a 37°C en agitación constante por aproximadamente 21 días. El crecimiento bacteriano fue monitoreado por densitometría (600 nm) hasta alcanzar la fase de crecimiento exponencial. Una vez en esta etapa, las bacterias fueron cosechadas y almacenadas en alícuotas a -70°C. Para su ajuste a 2.5×10^5 células viables en 100µl de solución salina, las alícuotas fueron descongeladas y las suspensiones bacterianas fueron contadas por microscopía mediante la incorporación de diacetato de fluoresceína [86]. Una vez obtenida la concentración deseada, los inóculos se ocuparon inmediatamente para la infección.

5.4 Modelo murino de tuberculosis pulmonar progresiva

El modelo murino de tuberculosis pulmonar progresiva ha sido previamente descrito [33, 87]. Brevemente, en este experimento por cada cepa se anestesiaron con sevoflurano (Sevorane) y se inocularon vía intra-traqueal 48 ratones singénicos BALB/c machos de 6-8 semanas de edad con 2.5×10^5 bacterias suspendidas en 100 μ l de solución salina; los animales se mantuvieron en posición vertical hasta su recuperación (presencia de reflejos y contracción muscular); después fueron albergados en grupos de 10 animales en cajas de policarbonato (microaisladores) almacenadas dentro de un sistema de micro-ventilación individual positiva (Allentown).

Durante todo el experimento se monitoreó la sobrevivencia. Se sacrificaron 6 ratones por cepa y por tiempo de sacrificio en los días 1, 3, 7, 14, 21, 28, 60 y 120 pos-infección mediante exanguinación a través del corte del plexo branquial. Se recuperaron 6 pulmones derechos y 3 pulmones izquierdos, los cuales fueron congelados en nitrógeno líquido para la determinación de UFC y para estudios de biología molecular respectivamente. Los 3 pulmones izquierdos restantes fueron perfundidos con etanol absoluto (ETOH) para estudios histológicos.

Todos los procedimientos de infección y sacrificio se realizaron en una campana de seguridad biológica tipo 3. El uso de animales fue aprobado por el comité de ética del INCMNZS y por el Subcomité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales Experimentales del Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal (SICUAE).

5.5 Determinación de la carga bacilar en pulmón por conteo de UFC

Seis pulmones (lóbulo derecho) por tiempo de sacrificio fueron homogenizados con ayuda de un politrón (Kinematica, Luzern) en tubos estériles con 1 ml de

solución PBS-tween 0.05%. Cuatro diluciones de cada homogenizado fueron sembradas por duplicado en cajas con agar Middlebrook 7H10 (Difco) enriquecido con OADC (ácido oleico, albumina, dextrosa y catalasa, Becton Dickinson), las cuales fueron incubadas a 37°C con 5% de dióxido de carbono. El número de colonias fueron contadas 14 y 21 días después de la siembra.

5.6 Histopatología y morfometría

Para el análisis histopatológico, los pulmones perfundidos y almacenados por 24 horas mínimo en etanol absoluto, fueron divididos sagitalmente a través del hilio pulmonar, deshidratados y embebidos en parafina para después ser cortados en secciones de 4 micras y teñidos con hematoxilina-eosina. El análisis del porcentaje de necrosis se determinó mediante la medición de las áreas afectadas en micras cuadradas utilizando el sistema de análisis de imágenes Leica Q500/W (Leica, Milton Keynes), reportando la media y desviación estándar (DE), considerando 3 pulmones por tiempo de sacrificio.

5.7 Análisis de citocinas por Inmunohistoquímica (IHQ)

De los pulmones embebidos previamente en parafina de 3 ratones diferentes por tiempo de sacrificio se tomaron secciones histológicas de 4µm; se procedió a desparafinar por 20 minutos a 60°C para después colocar las muestras en un tren de hidratación comenzando por xileno, pasando por alcoholes en concentraciones decrecientes hasta agua destilada. Se utilizó el kit comercial PolyDetector HRP (Bio SB), así como sus recomendaciones [88]. Una vez rehidratadas las muestras, se sumergieron en buffer de citrato de sodio al 10mM (20X ImmunoDNA Retriever with Citrate, Bio SB) y fueron autoclaveadas por 20 minutos en una olla de presión para exponer los epítomos y/o cambiar la estructura conformacional de las

proteínas (desenmascaramiento del antígeno). Luego se realizó un lavado con PBS pH 7.6 y los cortes se trataron con un bloqueador de peroxidasa endógena (Peroxidase/AP Blocker, Bio SB) por 10 min y durante 5 minutos más con un bloqueador de proteínas universal (Background Sniper). Después de otro lavado, las muestras se incubaron por 45 minutos con los anticuerpos primarios anti-IL-17 (Abcam ab79056) a una dilución 1:50 o anti-IL-23 (Abcam ab45420) a una dilución 1:400. Los anticuerpos fueron previamente diluidos (ImmunoDetector Protein Blocker/Antibody Diluent, Bio SB). Se continuó con el lavado del anticuerpo primario y con la colocación del anticuerpo secundario biotinilado (PolyDetector HRP Label, Bio BS), el cual se incubó durante 40 minutos; se realizó un lavado más y se reveló con diaminobencidina (PolyDetector DAB, Bio SB) bajo el microscopio para visualizar el cambio de coloración de la reacción de la enzima con el sustrato. Finalmente los cortes fueron contrateñidos con hematoxilina, seguido de un tren de deshidratación por alcoholes en concentraciones crecientes hasta xileno para culminar con el montaje de la muestra y su interpretación al microscopio.

Para el estudio de las inmunohistoquímicas, se procedió con el escaneo de laminillas utilizando el equipo de patología digital Aperio (ePathology Solutions) y para el análisis de intensidad total de marcaje positivo de IL-17 en pulmón se usó el software ImageScope. Se escaneó cada laminilla teniendo 3 ratones por tiempo de sacrificio por cada zona del pulmón a estudiar, es decir, áreas neumónicas, granulomas y zonas de inflamación perivascular, intersticial y peribronquial. Se seleccionaron 3 áreas de un promedio de micras cuadradas similar. De dichas áreas el equipo midió la intensidad total de células positivas (Ip) y la intensidad de tinción fuerte total de células positivas (Isp). Con estos dos valores (Ip e Isp) se determinó el promedio de cada zona y a su vez se obtuvo la media y la DE de las 3 zonas por pulmón y de los 3 pulmones por tiempo. El resultado se expresó como Intensidad Total de Expresión.

5.8 Análisis de citocinas por PCR-Tiempo Real

De tres ratones por tiempo de sacrificio se extrajo ARN. Cada pulmón fue colocado en 1 ml de medio RPMI (Gibco) adicionado con 0.5mg/ml de colagenasa (Sigma) e incubado por 1 hora a 37°C. Después el pulmón fue macerado con ayuda de un émbolo de jeringa y pasado por un filtro celular de 70 micras (BD, Bio). Las células obtenidas fueron centrifugadas a 3000 rpm (1620 gravedades) a 4°C. Posteriormente se decantó el sobrenadante y se adicionaron 1.5 ml de buffer de lisis (cloruro de amonio 0.34M y EDTA 0.12mM, pH 7.2) para romper las células rojas. Se procedió con un lavado con 1 ml de medio RPMI y se centrifugó bajo las condiciones anteriormente mencionadas. Una vez decantado el sobrenadante, la extracción prosiguió conforme a las especificaciones del Kit Mini RNeasy (Qiagen).

El ARN obtenido se cuantificó por espectrofotometría (A260/280) y se analizó su calidad mediante geles de agarosa. Se ocuparon 100 ng de ARN para la producción de cDNA mediante una reacción de retro-transcripción (RT) siguiendo las indicaciones del kit Omniscript (Qiagen). Con el producto se realizó una Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) punto final para amplificar el gen constitutivo de la Deshidrogenasa Gliceraldehído 3-fosfato (GAPDH), bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 95°C por 15 min, seguido de 40 ciclos a 95°C por 30s, 60°C por 30s, 72°C por 60s y extensión final a 72°C por 10 min.

Para la PCR en Tiempo Real (PCR-TR) se utilizó el sistema PCR-TR 7500 (Applied Biosystems), y el kit Quantitect SYBR Green Mastermix (Qiagen), incluyendo en cada corrida las curvas estándar generadas a partir de diluciones seriadas de productos de PCR cuantificados de cada una de las citocinas, así como un control negativo. Cebadores específicos (Invitrogen) se diseñaron con el programa BLAST (Pubmed) para los blancos mostrados en la Tabla 1. El número de copias de cada citocina fue normalizado con un millón de copias de ARNm que

codifica para el gen GAPDH. La reacción se efectuó con un paso inicial de desnaturalización a 95°C por 10 minutos, seguido de 40 ciclos a 95°C por 20s, 60°C por 20s, 72°C por 35s.

Citocina	Cebador sentido	Cebador antisentido
GAPDH	5'-CATTGTGGAAGGGCTATGA-3'	5'-GGAAGGCCATGCCAGTGAGC-3'
IL-17	5'-CACCAGCTGATCAGGACGCGC-3'	5'-GGACCCCAACAGCTGGAATAGAGC-3'
IL-23	5'-CGGGGGTGATCCTCTGGCTGAAAG-3'	5'-GGAAGGCCATGCCAGTGAGC-3'
TNF- α	5'-GCCGAGAAAGGCTGCTTG-3'	5'-TGTGGCTTCGACCTCTACCTC-3'

Cuadro 1. **Secuencia de cebadores utilizados en la PCR-TR.**

5.9 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó mediante el programa GraphPad Prism versión 5.0. Para las curvas de supervivencia se utilizó la prueba de Log Rank y Kaplan-Meier. Entre cepas del mismo género, el análisis de varianza de medias del número de UFC's, porcentaje de necrosis y expresión de citocinas por PCR-TR e IHQ fue realizado mediante la prueba *t* de Student. Las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0.05$.

6. Resultados

Tomando como referencia el modelo murino de TB pulmonar progresiva anteriormente descrito, se infectaron 2 grupos de ratones con cepas de *M. tuberculosis* y 2 grupos más con cepas de *M. bovis*. A continuación se muestran los resultados obtenidos por cada especie de *Mycobacterium* en apartados diferentes.

6.1 *Mycobacterium bovis* cepas 303 y 534.

6.1.1 Evaluación del nivel de virulencia en el modelo murino de tuberculosis pulmonar progresiva

Mediante el procedimiento previamente descrito en material y métodos, se infectaron vía intra-traqueal 2 grupos de ratones con 2.5×10^5 bacterias de las cepas *M. bovis* de baja virulencia 534 y de alta virulencia 303. Para corroborar virulencia se monitoreó la sobrevivencia, se determinó la carga bacilar en pulmones y se valoró el daño histológico pulmonar mediante la estimación del porcentaje de necrosis.

Los animales infectados con la cepa 534 mostraron el 100% de sobrevivencia durante todo el experimento (4 meses). En comparación, la cepa 303 ocasionó la muerte temprana de todos los animales al día 21 pos-infección. Al analizar ambas curvas de sobrevivencia con la prueba de Kaplan-Meier, éstas fueron estadísticamente diferentes (Figura 12 A). En cuanto al número de UFC's en pulmón, los animales infectados con la cepa 534 mantuvieron una carga constante de bacterias desde el día 1 hasta el día 28; para el resto del experimento (día 60 y 120) ya no fue detectable crecimiento bacteriano alguno. Los ratones infectados con la cepa 303 evolucionaron de forma diferente; el número de UFC's aumentó exponencialmente

a partir del día 3 pos-infección alcanzando para el día 21 más de 4.5 billones de bacterias en el pulmón (Figura 12 B).

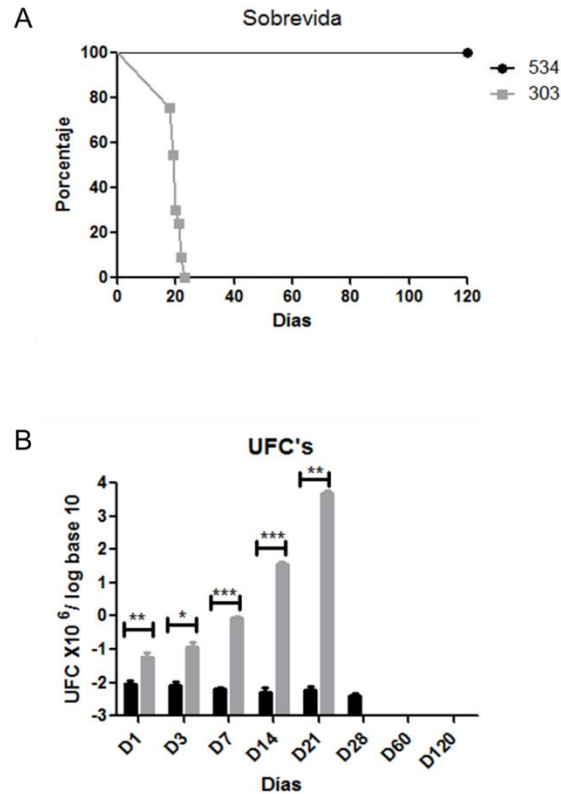


Figura 12. Virulencia de las cepas de *M. bovis* 534 (baja virulencia) y 303 (alta virulencia) en el modelo de tuberculosis pulmonar progresiva. (A) Curva de sobrevivida de los animales durante el curso de la enfermedad. (B) Determinación de la carga bacilar en homogenizados pulmonares de ratones infectados. Los asteriscos representan diferencia estadística significativa (* $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.001$) en la comparación entre cepas.

En cuanto a la apreciación del daño histológico pulmonar, en los animales infectados con la cepa 534 fue indetectable durante todo el experimento. Durante los primeros días pos-infección se mantuvo la estructura pulmonar con escaso

infiltrado intersticial (Figura 13 A). En comparación, los pulmones de los ratones infectados con la cepa 303 no evidenciaron presencia de infiltrado celular hasta el día 14 pos-infección, manifestando la formación de granulomas escasos, un limitado infiltrado inflamatorio alrededor de vasos y de bronquios, y aproximadamente 2% de daño pulmonar ocasionado por necrosis celular. El cambio histopatológico fue extremo en el día 21 pos-infección, donde el 40% del área pulmonar presentó necrosis con abundante infiltrado perivascular, intersticial y peribronquial, así como diversas zonas neumónicas (Figura 13 A, B).

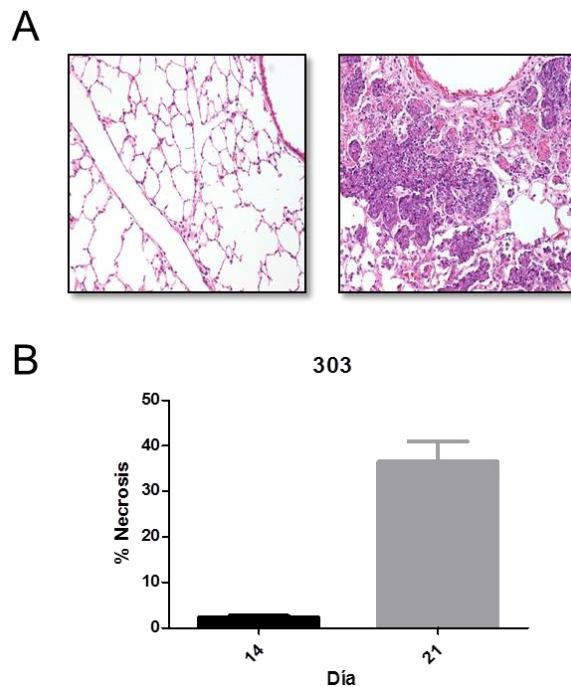


Figura 13. Características histológicas de pulmones de ratones infectados con *M. bovis* 534 y 303. (A) Micrografías representativas del pulmón en el día 21 posterior a la infección con la cepa 534 (imagen izquierda) con escaso infiltrado perivascular e intersticial, e infección con la cepa 303 (imagen derecha) que muestra necrosis extensa y pérdida de la estructura pulmonar. (B) Determinación del porcentaje de superficie pulmonar con daño tisular provocado por necrosis a lo largo de la enfermedad en ratones infectados con la cepa 303.

6.1.2 Evaluación de la expresión de citocinas mediante RT-PCR en Tiempo Real

La valoración de la respuesta inmune a nivel pulmonar se hizo comparando la expresión de IL-17 e IL-23 entre animales infectados con ambas cepas utilizando la técnica de PCR-TR. Cabe mencionar que se determinó TNF- α para tener un control interno de expresión en el modelo, además de que se ha reportado previamente como una citocina pro-inflamatoria, cuyo aumento de expresión está asociado con la fase protectora de la enfermedad principalmente con la activación de macrófagos y la estimulación de la producción de IL-2, con el propósito de mantener bajo control el número de micobacterias [34].

La expresión de IL-17 e IL-23 aumentó tras la infección con ambas cepas. Los pulmones de ratones infectados con *M. bovis* 534 mostraron el máximo nivel de expresión de IL-17 al día 28 pos-infección regresando a niveles basales en la etapa tardía de la infección. En cuanto a IL-23, se definieron varios incrementos pronunciados de expresión en los días 7, 21 y 28 pos-infección y dichos valores disminuyeron considerablemente durante la fase avanzada de la enfermedad (Figura 14 A, B).

La IL-17 tuvo un incremento de expresión en los días 1 y 21 durante la infección con *M. bovis* 303, sosteniendo una meseta de expresión desde el día 3 hasta el 14, mientras que para la IL-23 la expresión fue variable con la presencia de dos momentos de máxima expresión en los días 7 y 14 pos-infección, disminuyendo notablemente para el día 21 (Figura 14 A, B).

Al comparar la cinética de expresión de IL-17 tras la infección con ambas cepas, observamos que fue similar durante todo el experimento, pero cabe destacar que con la infección con *M. bovis* 303 se obtuvieron mayores niveles en el día 1 y el 21. En comparación con lo encontrado con IL-23 donde la expresión fue inconstante y muy diferente en ambas cepas.

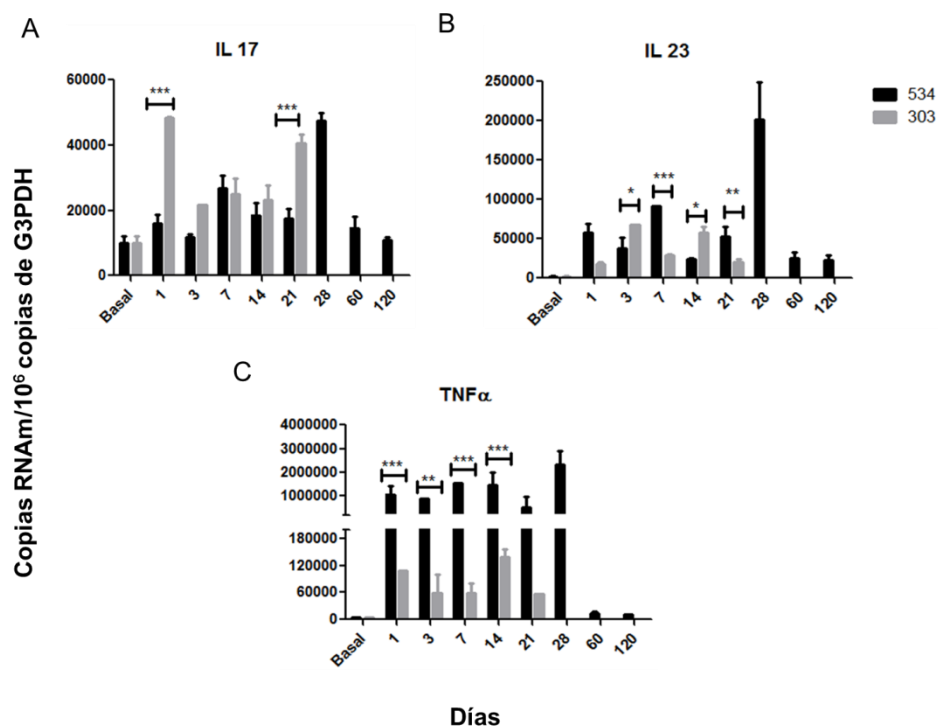


Figura 14. Expresión de citocinas por RT-PCR en Tiempo Real durante la infección con *M. bovis*. En pulmones de ratones infectados con las cepas 534 y 303 se determinó la expresión de ARNm de A) IL-17, B) IL-23 y C) TNF α . Los asteriscos representan diferencia estadística significativa (* $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.001$) en la comparación entre cepas.

Durante la infección con la cepa 534 aumentó la expresión génica en pulmón de TNF- α desde el primer día pos-infección y se mantuvo constante durante toda la fase temprana del modelo (del día 1 al día 28) para disminuir durante la etapa avanzada. Tras la infección con la cepa 303 se evidenciaron niveles altos de la expresión de TNF- α al día 1 y al día 14 para después reducir en el día 21. Al comparar las cepas de *M. bovis* se observó una producción mucho más elevada de TNF- α por la cepa de baja virulenta que por la de alta virulenta durante todo el experimento (Figura 14 C).

6.1.3 Evaluación de la producción de IL-17 e IL-23 mediante Inmunohistoquímica

Durante los días de sacrificio preestablecidos en el modelo tras la infección con ambas cepas, la IL-23 mostró una expresión similar a la IL-17 a nivel pulmonar. La IL-23 se evidenció desde los primeros días pos-infección en epitelio bronquial, siendo característico también el marcaje de macrófagos en infiltrado intersticial y vascular. Por otro lado, una gama más extensa de células resultaron positivas a IL-17 en el citoplasma o en la membrana celular. Las células que mostraron fuerte inmunomarcaje fueron macrófagos, linfocitos, neutrófilos, células endoteliales, células epiteliales e incluso adipocitos (Figura 15 B).

En los pulmones de ratones infectados con *M. bovis* 303 se observó que tanto el epitelio bronquial como el infiltrado inflamatorio perivascular fueron positivos durante todos los días de sacrificio hasta el día 21 cuando se observó disminución del marcaje; las células positivas predominantes fueron granulocitos, linfocitos y macrófagos activados durante los primeros días del experimento, para después disminuir la positividad de éstos y encontrar algunos macrófagos vacuolados con citoplasma positivo (Figura 15 B).

Mientras que, tras la infección con la cepa 534 se observó marcaje positivo en todos los tiempos de sacrificio principalmente en el infiltrado perivascular, intersticial y el epitelio bronquial (Figura 15). Cabe mencionar que, debido a que hubo menor infiltrado inflamatorio crónico, la mayoría de marcaje existió en granulocitos y macrófagos en los primeros días, mientras que las células epiteliales se mantuvieron positivas durante todo el desarrollo del experimento.

Haciendo más específico el estudio de la expresión y comportamiento de IL-17 en el modelo, se realizó la cuantificación de la intensidad del marcaje utilizando patología digital y siguiendo el procedimiento previamente redactado en material y métodos. Se obtuvo la cinética de expresión de IL-17 en pulmón durante

los días de sacrificio en infiltrado intersticial, peribronquial, perivascular, neumonía y granulomas (Figura 16).

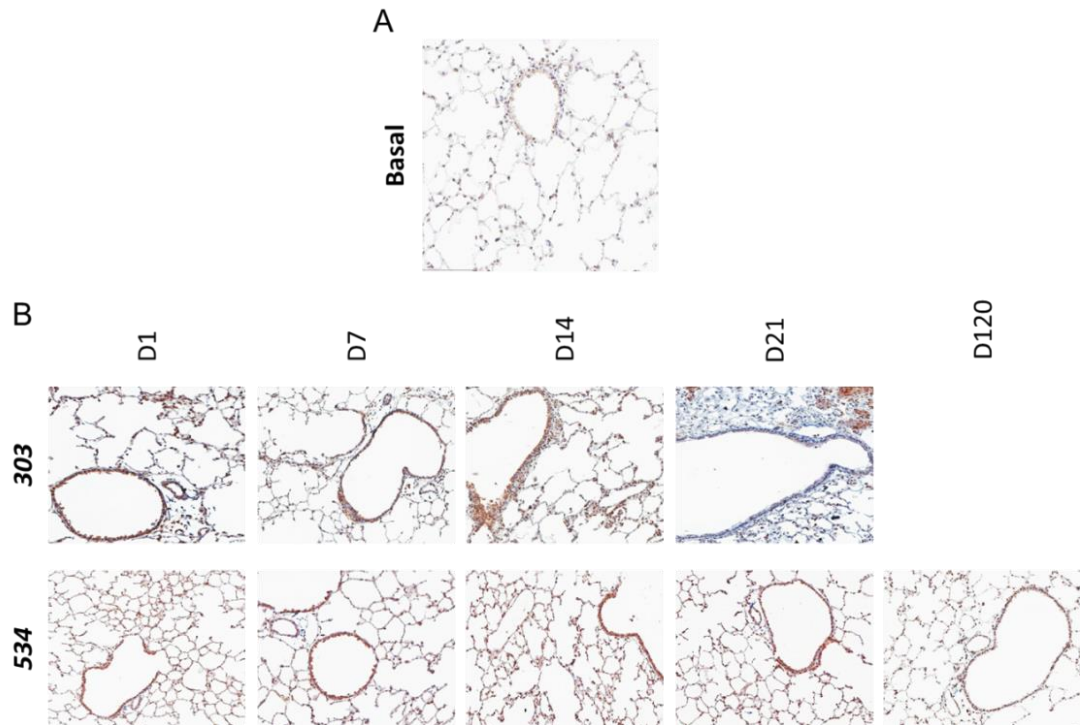


Figura 15. Expresión de IL-17 por IHQ durante la infección con *M. bovis*. Micrografías representativas de pulmones de ratones infectados con las cepas 534 y 303 en los cuales se identificó IL-17 mediante IHQ durante la progresión de la enfermedad. A) Expresión basal IL-17 en un ratón sano. B) Expresión de IL-17 en los días 1, 7, 14, 21 y 120 post-infección con las cepas 303 y 534 en la parte superior e inferior respectivamente.

Los pulmones de ratones sanos mostraron una expresión basal de IL-17 en epitelio bronquial, en infiltrado intersticial principalmente de macrófagos y marcaje reducido en el endotelio vascular (Figura 15 A y 16). En cuanto a la infección con *M. bovis* 534, los pulmones presentaron un aumento de intensidad positiva en el infiltrado intersticial y perivascular desde el día 1 hasta el 60, disminuyendo para el

120 (Figura 16 A, B); en cambio, el epitelio bronquial mantuvo niveles de positividad estables durante todo el experimento (Figura 16 C).

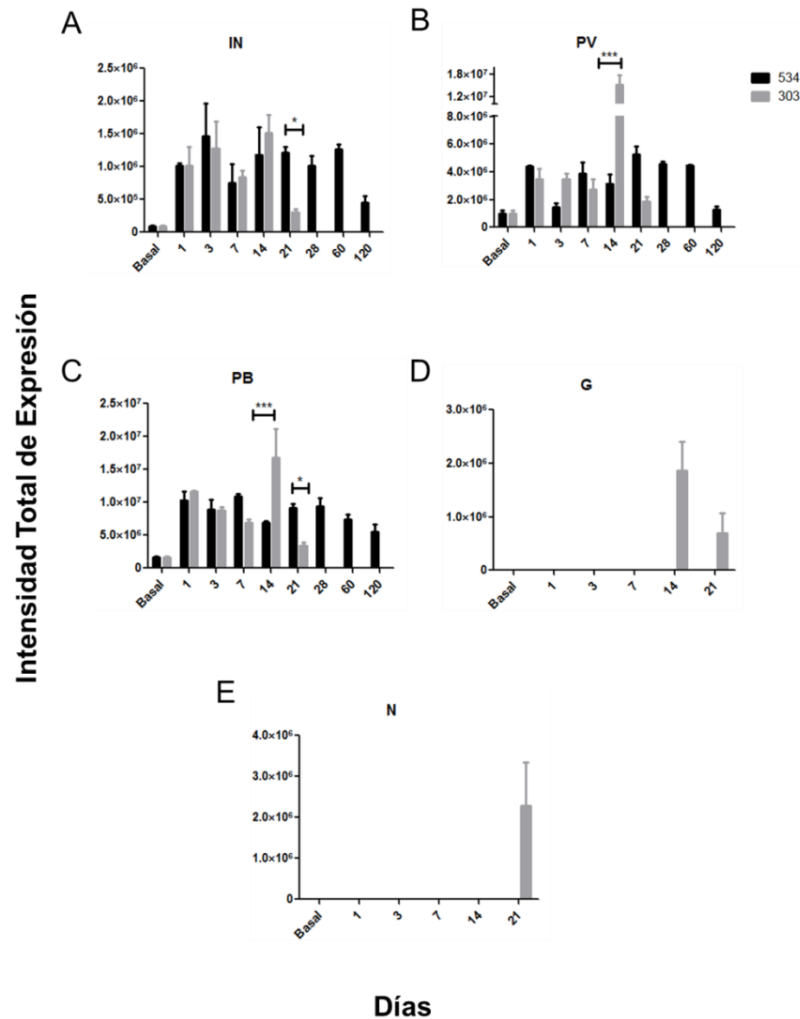


Figura 16. Cuantificación de la intensidad de expresión de IL-17 durante la infección con *M. bovis*. Utilizando el programa de patología digital ImageScope, se cuantificó el grado de expresión de IL-17 en pulmones durante el curso de la enfermedad, determinando intensidad total de expresión de marcaje positivo en A) infiltrado intersticial (IN), B) infiltrado perivascular (PV), C) infiltrado peribronquial (PB), D) granulomas (G) y E) neumonía (N). Los asteriscos representan diferencia estadística significativa (* $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.001$) en la comparación entre cepas.

Los pulmones de animales retados con la cepa 303 tuvieron una cinética de expresión un poco diferente. Se presentó un aumento de marcaje en células de infiltrado inflamatorio intersticial así como en el epitelio bronquial desde el día 1 hasta el 14 pos-infección principalmente de macrófagos y granulocitos en los primeros días y de macrófagos linfocitos al día 14 pos-infección, reduciendo dicha positividad notablemente para el día 21 (Figura 16 A, C). El endotelio vascular y las células inflamatorias mostraron positividad desde el primer día pos-infección con un incremento máximo al día 14 para disminuir 8 días después (Figura 16 B). En granulomas (Figura 16 D) la intensidad fue mucho mayor al día 14 que al día 21. Se inspeccionó de igual forma la expresión de IL-17 en zonas neumónicas (Figura 16 E), donde sólo escaso número de macrófagos y linfocitos fueron positivos.

6.2 *Mycobacterium tuberculosis* cepas H37Rv y 48p

6.2.1 Evaluación del nivel de virulencia

Utilizando el modelo murino de TB pulmonar progresiva previamente descrito en material y métodos, se infectaron 2 grupos de ratones con las cepas *M. tuberculosis* H37Rv de virulencia intermedia y 48p de alta virulenta. Se monitoreó la sobrevida, se determinó la carga bacilar en pulmones (UFC) y se valoró el daño histológico pulmonar a través de la evaluación del porcentaje de necrosis.

El grupo experimental de ratones retado con la cepa tipo (H37Rv) mostró sobrevida del 80% al finalizar el experimento en comparación con el grupo infectado con la cepa 48p, la cual causó la muerte de todos los animales al día 28 pos-infección (Figura 17 A). Los ratones infectados con la cepa H37Rv exhibieron una disminución de la carga bacilar en pulmón en los primeros días de la infección seguido del aumento constante y sostenido de entre 20 y 28 millones de UFC desde el día 14 hasta el 120. Los sujetos experimentales retados con *M.*

tuberculosis 48p evolucionaron de diferente forma; durante los primeros días de la infección el número de colonias bacterianas fue mínimo pero se elevó exponencialmente desde el día 14 pos-infección alcanzando para el día 28 casi 300 millones de UFC en homogenizados pulmonares (Figura 17 B).

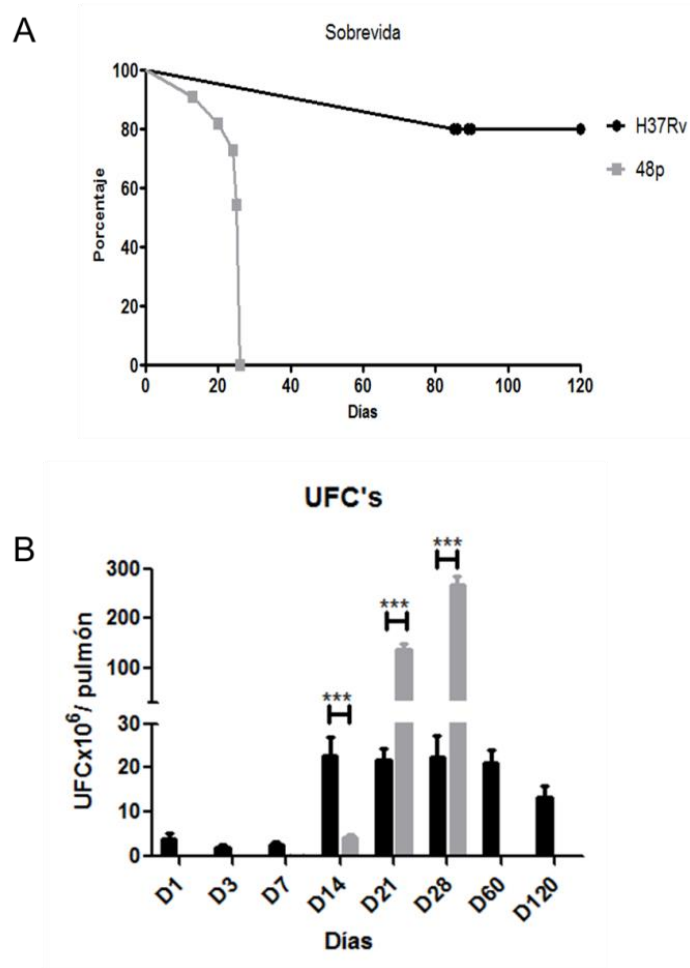


Figura 17. Virulencia de las cepas de *M. tuberculosis* H37Rv y 48p en el modelo de tuberculosis pulmonar progresiva. (A) Curva de supervivencia de los animales durante el curso de la enfermedad. (B) Determinación de la carga bacilar en homogenizados pulmonares de ratones infectados. Los asteriscos representan diferencia estadística significativa (* $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.001$) en la comparación entre cepas.

El daño histológico en pulmón causado por H37Rv durante el experimento coincidió con lo previamente reportado [87]. Durante los primeros días de infección se observó poco infiltrado intersticial siendo hasta el día 14 cuando hubo un aumento en el volumen celular y fue el inicio de la formación de estructuras granulomatosas, las cuales aumentaron en número y tamaño para el día 21 y 28 pos-infección. En la etapa progresiva de la enfermedad se observó una acumulación considerable de células inflamatorias, produciendo parches de neumonía abarcando áreas extensas del pulmón; esto principalmente en el día 120 pos-infección (Figura 18 A).

En contraparte, los pulmones de animales retados con la cepa 48p manifestaron presencia de infiltrado inflamatorio hasta el día 14 pos-infección, siendo visibles granulomas y escaso flujo de células inflamatorias en las inmediaciones de vasos y de bronquios. Siete días después, la morfología mostró un cambio dramático, caracterizado por focos de necrosis que abarcaron más del 10% del área pulmonar, abundantes células inflamatorias próximas a vasos sanguíneos, bronquios e intersticio y el comienzo de la formación de zonas neumónicas que para el día 28 pos-infección se convirtieron en su gran mayoría en áreas necróticas abarcando más del 20% del pulmón (Figura 18 A, B).

6.2.2 Evaluación de la expresión de citocinas mediante RT-PCR en Tiempo Real

Se comparó a nivel pulmonar la expresión de IL-17, IL-23 y TNF- α después de la infección de ratones con ambas cepas obteniendo los siguientes resultados. De la misma forma que lo observado durante la infección con *M. bovis*, tras la infección con las cepas H37Rv y 48p aumentó la expresión del ARNm tanto de IL-17 como de IL-23.

Durante la infección con *M. tuberculosis* H37Rv, se incrementó la expresión de IL-17 desde el primer día hasta el día 28, disminuyendo considerablemente para el día 60 e incrementando nuevamente en el día 120. IL-23 tuvo un

comportamiento similar, con expresión máxima en los días pos-infección 14, 21 y 28; al día 60 los niveles se redujeron para volver a elevarse al día 120. En cuanto a la expresión pulmonar tras el reto con *M. tuberculosis* 48p, IL-17 sostuvo una señal constante desde el día 3 hasta el día 28 de la infección. Se observaron dos picos de máxima expresión de IL-23 en los días 14 y 21 de la infección para después disminuir en el día 28 (Figura 19 A, B).

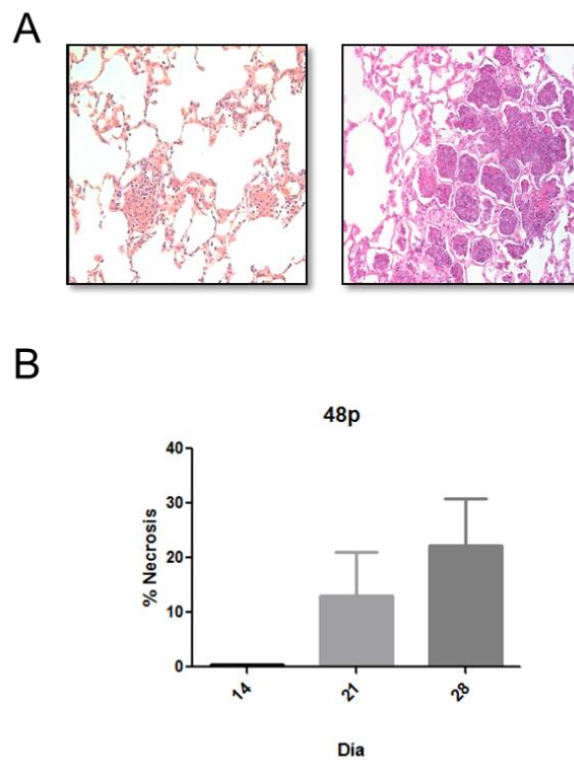


Figura 18. Características histológicas de pulmones de ratones infectados con *M. tuberculosis* H37Rv y 48p. (A) Imágenes histológicas representativas del día 21 posterior a la infección con la cepa H37Rv (imagen izquierda) que muestra predominio de granulomas e infiltrado intersticial y con la cepa 48p (imagen derecha) con áreas de necrosis extensa y pérdida de la estructura pulmonar. (B) Determinación del porcentaje de superficie pulmonar con daño tisular provocado por necrosis a lo largo de la enfermedad en ratones infectados con la cepa 48p.

Si comparamos la cinética de expresión pulmonar de IL-17 después del reto con ambas cepas, observamos similitudes durante casi todo el experimento, encontrando diferencias estadísticamente significativas al día 14 y al día 3 tras la infección con *M. tuberculosis* H37Rv y 48p, respectivamente. Por otra parte, la infección con H37Rv indujo la elevación de IL-23 en los días 14, 21 y 28 en comparación con los niveles observados tras la infección con la cepa 48p (Figura 19 A, B).

La infección con la cepa H37Rv indujo el aumento de la expresión de TNF- α a nivel pulmonar desde el primer día pos-infección y se mantuvo durante todos los tiempos de sacrificio. En cambio tras el reto con la cepa 48p, se determinaron mayores niveles a los días 14, 21 y 28 después de la infección, no siendo así en los primeros días del experimento. Al comparar la producción de esta citocina tras la infección con las 2 cepas, se detectaron niveles mucho más elevados tras el reto con H37Rv que con la cepa 48p (Figura 19 C).

6.2.3 Evaluación de la producción de IL-17 e IL-23 mediante Inmunohistoquímica

La infección con cepas de *M. tuberculosis* mostró una expresión similar de IL-17 (Figura 20 A, B) e IL-23 en tejido pulmonar. Particularmente durante la infección con H37Rv se observó positividad a IL-23 durante todo el experimento en epitelio bronquial. Durante la etapa temprana el infiltrado intersticial, infiltrado perivascular y zonas granulomatosas fueron positivos, siendo principalmente macrófagos y granulocitos las células marcadas positivamente en estas zonas, mientras que en la fase progresiva disminuyó la positividad especialmente en macrófagos vacuolados. En cuanto a IL-17 durante la fase temprana se observaron neutrófilos, macrófagos, adipocitos, células endoteliales y epiteliales positivas. Cabe mencionar que en los días de máxima expresión de la respuesta inmune en el modelo se encontraron positivos macrófagos y linfocitos principalmente formando

la estructura de los granulomas; para la fase progresiva se mantuvo el marcaje de epitelio y endotelio así como de macrófagos espumosos.

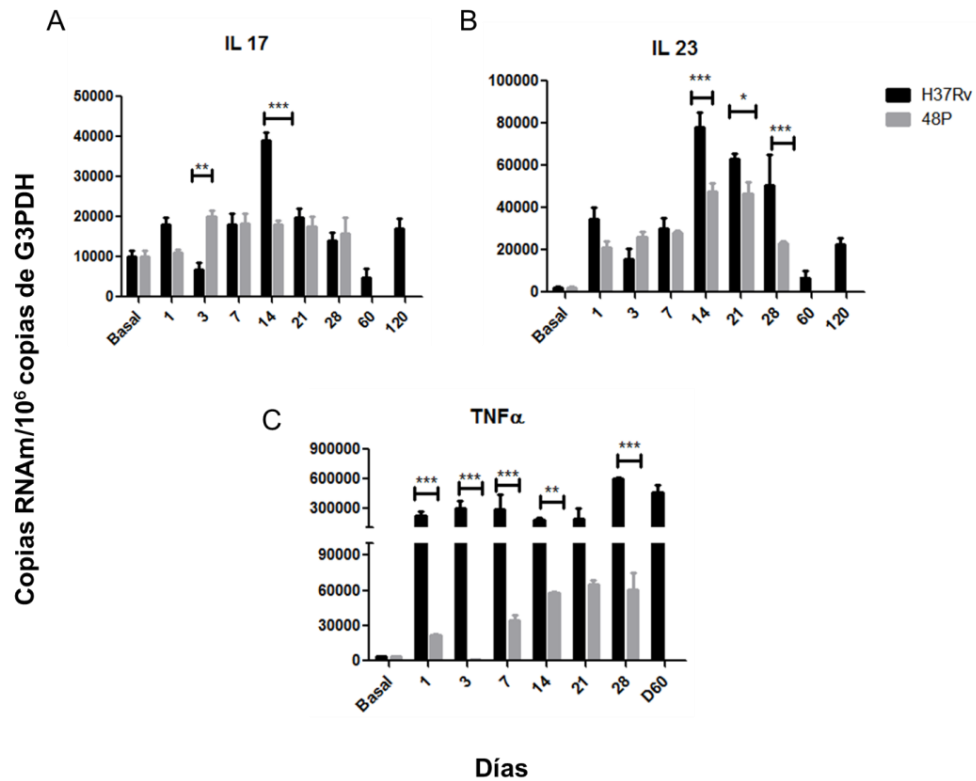


Figura 19. Expresión de citocinas por RT-PCR en Tiempo Real durante la infección con *M. tuberculosis*. De pulmones de ratones infectados con las cepas H37Rv y 48p se determinó la expresión de ARNm de A) IL-17, B) IL-23 y C) TNF- α . Los asteriscos representan diferencia estadística significativa (* $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.001$) en la comparación entre cepas.

Durante la cinética de infección con *M. tuberculosis* 48p los mismos grupos celulares se observaron positivos en pulmón para IL-23. Es importante mencionar que esta expresión disminuyó progresivamente del día 14 al 28, cuando el epitelio bronquial se tornó totalmente negativo. IL-17 siguió el mismo curso: en los

primeros días se notó marcaje principalmente de granulocitos y macrófagos para después encontrar linfocitos positivos, pero para el día 28, en su mayoría, dichos tipos celulares se convirtieron negativos.

Respecto al análisis del tejido pulmonar, aplicando la metodología de medición de intensidad de expresión mediante la aplicación del programa ImageScope de Patología Digital, se determinó la expresión de IL-17, siguiendo el procedimiento previamente redactado en material y métodos.

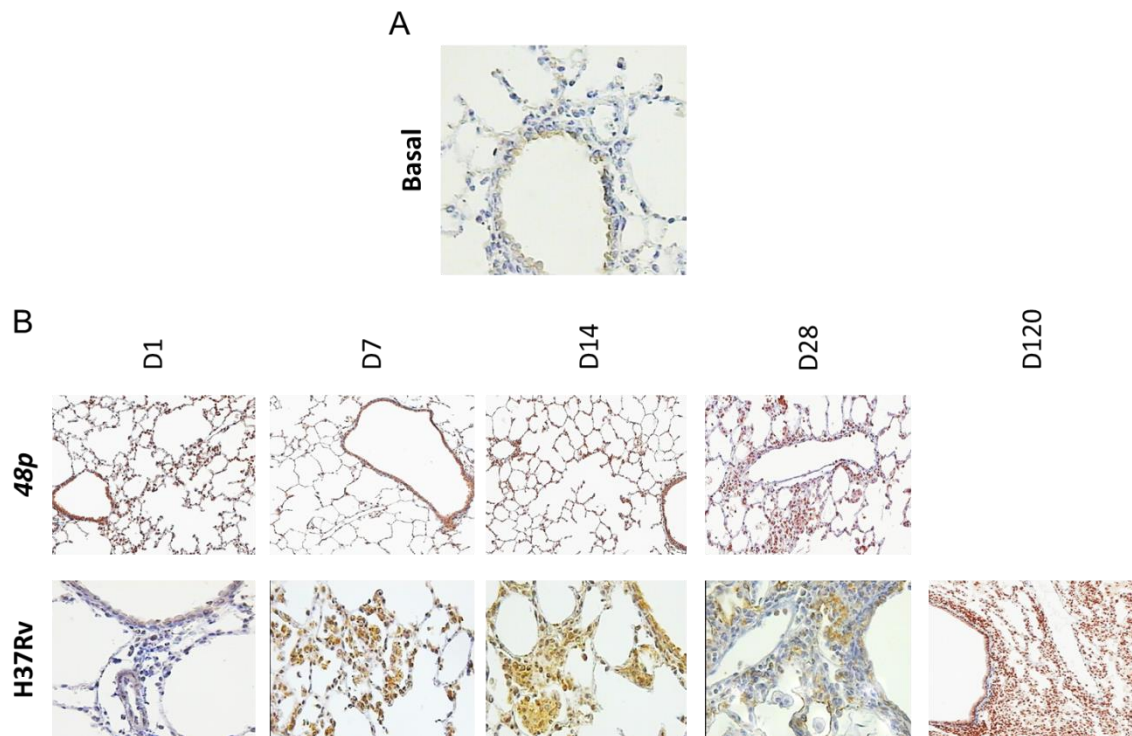


Figura 20. Expresión de IL-17 por IHQ durante la infección con *M. tuberculosis*. Micrografías representativas de pulmones de ratones infectados con las cepas H37Rv y 48p, en los cuales se identificó IL-17 mediante IHQ durante la progresión de la enfermedad. A) Expresión basal IL-17 en un ratón sano. B) Expresión de IL-17 en los días 1, 7, 14, 28 y 120 pos-infección con las cepas H37Rv y 48p, parte superior e inferior, respectivamente.

Los pulmones de ratones retados con la cepa tipo de *M. tuberculosis* presentaron un incremento de expresión de IL-17 en el infiltrado intersticial desde el día 1, siendo más elevado en los días 14, 21 y 28 pos-infección correspondientes a la fase temprana del modelo (Figura 21 A). En cambio, el marcaje positivo fue tanto intensificándose en el infiltrado perivascular y en el peribronquial conforme avanzaba el experimento, alcanzando los niveles superiores de expresión al día 120 pos-infección (Figura 21 B, C). En granulomas la mayor positividad se encontró en los días 21 y 28 que conforman parte de la etapa protectora de la enfermedad; de igual forma, durante la fase tardía se detectó marcaje positivo en zonas neumónicas (Figura 20 y Figura 21D, E).

Los ratones infectados con la cepa 48p presentaron a nivel pulmonar un aumento sostenido de marcaje positivo en células de infiltrado intersticial. En cambio, en el epitelio bronquial y en el endotelio vascular la expresión fue incrementando paulatinamente con el transcurso de la enfermedad, observándose niveles superiores en el día 28 pos-infección (Figura 21 A-C). El marcaje en células formadoras de granulomas fue mayor al día 14 que a los días 21 y 28. Cabe mencionar que en zonas neumónicas se encontró muy poca participación de la citocina de interés (Figura 21 D, E).

Al comparar la cinética de expresión en los animales infectados con ambas cepas observamos una distribución diferente de IL-17. Los pulmones de ratones retados con H37Rv muestran mayores concentraciones de IL-17 en zonas de acumulación celular intersticial, perivascular, granulomas y neumonía, en comparación con los pulmones de ratones retados con la cepa 48p (Figura 21).

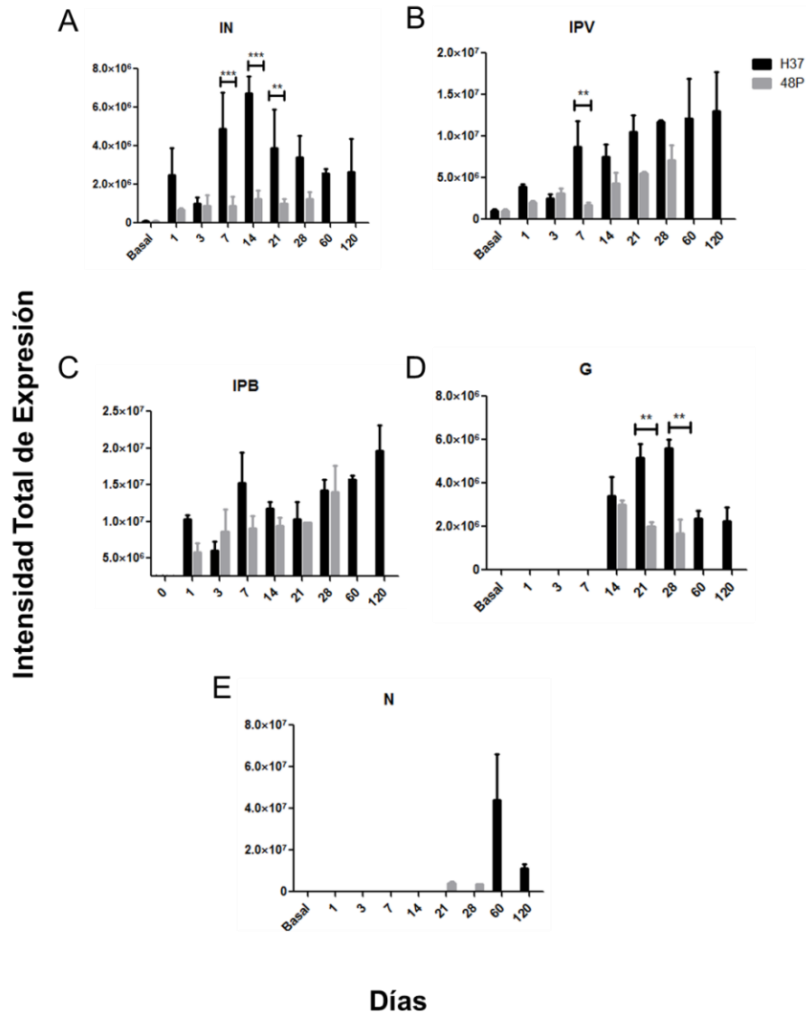


Figura 21. Cuantificación de la intensidad de expresión de IL-17 durante la infección con *M. tuberculosis*. Utilizando el programa de patología digital ImageScope, se determinó el grado de expresión de IL-17 en pulmones durante el curso de la enfermedad, determinando la intensidad total de expresión de marcaje positivo en A) infiltrado intersticial (IN), B) infiltrado perivascular (PV), C) infiltrado perobronquial (PB), D) granulomas (G) y E) neumonía (N). Los asteriscos representan diferencia estadística significativa (* $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.001$) en la comparación entre cepas.

7. Discusión

Para controlar y contener la infección provocada por microorganismos intracelulares como *M. tuberculosis* y *M. bovis*, se requiere de la participación de linfocitos y citocinas de perfil Th1. Se sabe que una respuesta Th17 no es tan indispensable en la protección contra infecciones por patógenos intracelulares como lo es para las infecciones de bacterias extracelulares. De hecho en los últimos años se ha reportado que el eje de producción de IL-23 e IL-17 no parece ser esencial para el control primario de *M. tuberculosis* [77], pero se ha involucrado con el reclutamiento eficiente de células y la supervivencia de neutrófilos, mecanismo por el cual se mantiene la integridad de los granulomas [74]. En parte, este efecto es mediado por la liberación de quimiocinas que reclutan células protectoras a los focos de infección. Sin embargo, la producción excesiva de IL-23 y IL-17 puede causar inmunopatología debido a un excesivo reclutamiento particularmente de neutrófilos que al degranularse producen necrosis [78].

Debido a que la inmunopatología es una característica central de la infección pulmonar por *M. tuberculosis* y su regulación durante la fase avanzada es esencial para la supervivencia del huésped, se piensa que la IL-17 y las células Th17 participan en la inducción del reclutamiento y la activación de PMN, así como desencadenando la producción de citocinas pro-inflamatorias y quimiocinas [89]. Por otro lado, estudios recientes en modelos animales han demostrado que IL-17 es esencial para el desarrollo de la respuesta protectora durante la infección por micobacterias [74, 77].

Por lo que es crucial dilucidar los mecanismos de protección y de daño tisular asociados con la producción de IL-17, y de esta manera utilizar este conocimiento para generar estrategias que promuevan una respuesta inmune adquirida equilibrada que coexista con daño colateral mínimo.

Con base en lo anterior, durante la realización de este estudio experimental se seleccionaron 2 cepas de *M. bovis* y 2 de *M. tuberculosis* para ser utilizadas en el modelo murino experimental de TB pulmonar progresiva [33, 87]. Se consideraron diferentes niveles de virulencia con el fin de relacionar su participación con el desarrollo de una respuesta protectora o inmunopatológica mediada por IL-23 e IL-17, siendo estas últimas inductoras de mediadores pro-inflamatorios que regulan principalmente el reclutamiento celular.

En cuanto a la diferencia entre especies, cabe recalcar que aunque haya un 99.95% de similitud genética entre *M. tuberculosis* y *M. bovis* [17], la respuesta inmune que desarrollan los ratones después de la infección es sumamente diferente. Ese porcentaje tan reducido de diferencias a nivel génico es el responsable de la variedad en la virulencia y del tipo de respuesta inmune en los hospederos. En el mismo modelo murino de tuberculosis pulmonar progresiva se demostró que *M. bovis* activa en la fase temprana un perfil de citocinas tanto Th1 como Th2, el cual se define en la fase progresiva donde linfocitos Th1 favorecen a la resolución de la enfermedad, mientras que una polarización de linfocitos hacia Th2 es característico de las cepas altamente virulentas, las cuales parecen asociarse a al desarrollo de daño pulmonar extenso y muerte del animal [39]. Hasta ahora son muchos los factores que están participando en el montaje de una respuesta inmune y la eliminación del patógeno, pero la existencia de una diversidad dentro de estas micobacterias hace que el estudio de las mismas sea cada vez más complejo e interesante.

La infección con la cepa 534 de *M. bovis* se caracterizó por una cuenta baja de bacterias en pulmón, sobrevida del 100% durante todo el experimento y escaso infiltrado celular en cortes histológicos de pulmón, mostrando baja virulencia y niveles altos de citocinas pro-inflamatorias como TNF- α , como fue previamente reportado [39]. Los patrones de expresión génica y proteica de IL-17 e IL-23 fueron mayores durante la fase temprana del modelo; los niveles de expresión más alta durante los primeros días probablemente indican el inicio del

reclutamiento temprano de células de la inmunidad innata como PMN y macrófagos para la eliminación de la bacteria y así evitar la progresión de la enfermedad. De igual forma, la ausencia de bacterias en pulmón durante la etapa progresiva se podría relacionar con la disminución de las citocinas a nivel de ARNm y de proteína; lo anterior ha sido previamente reportado por Umemura y colaboradores [77], donde observaron que los niveles de IL-17 e IL-23 son similares principalmente durante la fase temprana de la infección con *M. bovis* BCG en un modelo *in vivo* utilizando ratones de la cepa C57BL/6.

Se confirmó que *M. bovis* 303 es una cepa de alta virulencia, y que causa el 100% de mortalidad al día 23 pos-infección, un incremento constante y significativo de bacterias en pulmón; de igual forma, en cortes histológicos se observó pérdida de la estructura pulmonar, causada primordialmente por abundantes lesiones inflamatorias, parches neumónicos y zonas de necrosis, como fue anteriormente reportado [39], en asociación con un perfil bajo de citocinas antiinflamatorias como IFN- γ , TNF- α e iNOS.

Al determinar la expresión génica de IL-17 durante el experimento, se obtuvieron dos momentos de máxima expresión al día 1 y al día 21 pos-infección, mientras que a nivel de proteína la expresión se vio disminuida al día 21. Esto sugiere un mecanismo de regulación pos-traducciona, donde quizás estén involucradas citocinas de perfil regulatorio como IL-10 o IL-27, las cuales se han relacionado con la inhibición de la diferenciación de células Th17 que a su vez son fuente productora de IL-17 [51]. Existe un reporte más en donde asocian el microambiente externo y la expresión de HIF con la regulación a la baja de las células Treg a través de la destrucción de su factor de transcripción (Foxp3) y activando directamente el factor ROR γ t (factor de transcripción de células Th17) y por consecuencia células productoras de IL-17 [57].

Al comparar los niveles de IL-17 tras la infección con ambas cepas de *M. bovis*, se observó que en los pulmones de los ratones infectados con la cepa de

alta virulencia, los niveles de ARNm de IL-17 fueron mayores y a nivel de proteína la expresión se mantuvo similar durante casi todo el experimento. De forma contraria, la expresión de IL-17 durante la infección con la cepa de alta virulencia fue mayor en etapas tempranas para luego decaer tanto a nivel génico como proteico para el día 21 pos-infección.

Por otra parte, a nivel pulmonar se encontró marcaje positivo basal tanto de IL-23 como de IL-17 en epitelio bronquial y en células de infiltrado intersticial. El sistema de señalización de IL-17 ha sido previamente reportado en pulmón, al igual que en un número importante de tejidos como cartílago articular, huesos, cerebro, tejido hematopoyético, riñón, piel e intestino [65]. Su presencia en forma constitutiva podría reflejar su actividad sobre células de la respuesta inmune innata, mediante la estimulación de la producción de péptidos antimicrobianos.

Específicamente IL-23 se encontró en células epiteliales, endoteliales y macrófagos, siendo éstos actores de la inmunidad innata previamente reportados tanto en TB [51] como durante la infección con otros patógenos [60]. Su presencia en etapas tempranas podría reflejar su actividad sobre células de la respuesta inmune innata, mediante la estimulación de la producción de citocinas inflamatorias como IL-17, IL-1, TNF- α e IL-6 [42]. En cambio, IL-17 se encontró en células tanto de respuesta innata como adaptativa. Durante la fase temprana tras el estímulo de las cepas 303 y 534 se manifestaron positivos a nivel pulmonar macrófagos, células epiteliales y endoteliales, así como algunos PMN; estos tipos celulares han sido previamente reportados como productores de IL-17 por diversos autores [42, 47, 53, 54, 60, 62, 65, 66].

La cepa prototipo de *M. tuberculosis* H37Rv se caracterizó por tener una virulencia intermedia, basada en sobrevivencia del 85% de los ratones al final del experimento, una disminución de bacterias en pulmón durante los primeros días de la infección, para después aumentar y mantenerse tras el curso de la enfermedad. Histológicamente observamos lo previamente reportado por

Hernández-Pando y colaboradores [33, 34, 87]. Durante los primeros días la estructura pulmonar se caracterizó por presencia de infiltrado inflamatorio en intersticio y espacio perivascular, así como la formación de granulomas desde el día 14; en cambio para la fase progresiva se detectaron parches neumónicos y fibrosis intersticial. La expresión génica pulmonar de IL-23 e IL-17 durante la infección con la cepa H37Rv nos muestra niveles sostenidos durante la fase temprana para decaer al día 60 pos-infección; los datos anteriores corresponden con lo previamente reportado por Umemura y colaboradores [77]. A nivel de proteína la expresión de IL-17 en la fase temprana fue positiva en infiltrado intersticial al igual que células que conformaron granulomas, principalmente macrófagos y linfocitos, para decaer en la fase progresiva. Esto sugiere que IL-17 está colaborando en la formación y mantenimiento de los granulomas como lo ha sugerido Okamoto y colaboradores [74]. En este estudio, ratones C57BL/6 deficientes de IL-17 mostraron una disminución en la formación de granulomas tras la infección con *M. bovis* y *M. tuberculosis*, relacionando a dicha citocina con el mantenimiento y reclutamiento celular para el desarrollo de granulomas que contengan a la micobacteria.

En comparación *M. tuberculosis* 48p se comportó como una cepa de alta virulencia, produciendo el 100% de mortalidad de los ratones en el día 29 pos-infección, mismos que presentaron incremento significativo y exacerbado de bacterias desde el día 14 hasta el día 28 pos-infección. Los cortes histológicos de pulmón mostraron lesiones inflamatorias abundantes a partir del día 21, caracterizadas por zonas extensas de necrosis y parches neumónicos, que conllevaron a la pérdida de la estructura pulmonar y por consiguiente a la falla pulmonar y muerte del animal por insuficiencia respiratoria. En estudios experimentales con ratones BALB/c utilizando el mismo modelo, se ha observado que algunas bacterias del genotipo Beijing (como la 48p utilizada durante la realización de este trabajo) están asociadas a un fenotipo altamente virulento, caracterizado por extenso daño tisular y muerte temprana de los animales [36, 37].

Por otra parte, algunos trabajos han reportado *in vivo* que IL-17 está relacionada con el desarrollo de inmunopatología por el exceso de reclutamiento celular especialmente de PMN en enfermedades autoinmunes [62, 63, 69]. En un estudio de Cruz y colaboradores se demostró que una vacunación repetitiva por vía subcutánea con BCG en ratones C57BL/6 infectados con *M. tuberculosis* H37Rv, resultó en una elevada respuesta de tipo Th17 caracterizada por un elevado número de células productoras de IL-17 dependientes de la expresión local de IL-23; dicha respuesta se relacionó con reclutamiento celular masivo que produjo daño tisular extenso [78].

La infección con la cepa 48p provocó un aumento sostenido de la expresión génica de IL-23 e IL-17 durante el transcurso de la enfermedad. A nivel de proteína se observó un cambio en la positividad del día 21 al día 28 pos-infección con menor intensidad de marca en este último día de sacrificio, durante el cual la inmunotinción de esta citocina disminuyó considerablemente en el infiltrado intersticial y perivascular. Cabe mencionar que los macrófagos vacuolados fueron negativos en la fase final de la infección, de la misma forma que el epitelio bronquial. Quizás se podría correlacionar el número elevado de UFC en pulmón de ratones infectados con la cepa 48p con una exposición repetida de antígenos, debido a la cantidad excesiva de microorganismos en la fase progresiva de la enfermedad y que de cierta forma podría corresponder con lo reportado por Cruz y colaboradores [78]. En este estudio se propone que una exposición repetida del antígeno desencadena una respuesta Th17 exacerbada que conlleva al daño inmunopatológico. Debido a que encontramos lo opuesto, es decir niveles elevados de IL-17 a nivel génico pero baja en la positividad proteica durante la última fase de la infección, se podría sugerir que quizás exista un mecanismo alternativo relacionado con la regulación de la producción de IL-17 y no de otras citocinas proinflamatorias y quimiocinas, y que sean estas últimas y no IL-17 las encargadas del reclutamiento celular masivo y del desarrollo de necrosis que ocasione el daño tisular extenso.

Cuando se comparó la cinética de expresión de IL-17 e IL-23 tras la infección con ambas cepas de *M. tuberculosis*, se observó una tendencia totalmente diferente. La cepa de alta virulencia indujo niveles de IL-23 e IL-17 mucho menores que la cepa prototipo tanto a nivel de ARNm como de proteína durante el experimento, además de que durante la fase progresiva de la infección con H37Rv se mostraron positivos para IL-17 algunos macrófagos vacuolados, mientras que para el día 28 pos-infección, último día de sacrificio de los ratones infectados con la cepa 48p, este tipo celular fue completamente negativo para IL-17. Lo anterior nos muestra que variaciones mínimas del nivel de virulencia entre cepas de la misma especie pueden delimitar y/o dirigir la respuesta inmune del hospedador.

Trabajos previos en este modelo murino de tuberculosis pulmonar progresiva han relacionado la virulencia de aislados clínicos con el tipo de respuesta inmune desarrollada en los ratones. En el 2009 Marquina-Castillo y colaboradores reportaron fenotipos distintos de virulencia dentro de un grupo de aislados de *M. tuberculosis* de la familia LAM, considerando virulencia, respuesta inmune y transmisibilidad dentro del modelo; el fenotipo 1 correspondía a cepas hipervirulentas que proveían al hospedero una respuesta no protectora, daño pulmonar extenso y una alta tasa de transmisibilidad. El fenotipo 2 por otra parte, se caracterizaba por bacterias altamente virulentas pero productoras de niveles elevados de citocinas pro-inflamatorias, que provocaban la muerte de los animales por exceso de inflamación. El fenotipo 1 del trabajo previamente descrito se relaciona con lo encontrado durante la realización de este trabajo con la cepa de *M. tuberculosis* 48p, la cual muestra ser una cepa de alta virulencia productora de bajos niveles de IL-17, IL-23 y TNF- α y daño pulmonar caracterizado por el desarrollo de parches necróticos que causan la muerte de los animales, en comparación con lo observado tras la infección con H37Rv.

En general se podría sugerir que la expresión de IL-23 e IL-17 durante la fase temprana de la infección corresponde con lo previamente reportado en la

literatura donde principalmente se relaciona con la inducción de factores pro-inflamatorios, además de que se conoce que tienen efectos directos sobre la expresión génica de factores de transcripción pro-inflamatorios como NF- κ B en células de respuesta innata, tales como células epiteliales y endoteliales, las cuales producen a su vez citocinas inflamatorias y factores estimulantes de colonias para la atracción de las primeras células de defensa, así como la formación de péptidos antimicrobianos principalmente defensinas [90], que desempeñan un papel importante en la primera línea de defensa durante el montaje de la respuesta innata para la eliminación del bacilo y así dar tiempo a que se active y desarrolle la inmunidad adaptativa.

En el mismo modelo de tuberculosis pulmonar con ratones BALB/c Rivas-Santiago y colaboradores demostraron que existe una rápida expresión de β -defensinas en las células epiteliales del tracto respiratorio y que además correlacionaba con el control bacteriano; pero en cuanto la enfermedad progresaba la expresión disminuía [91]. Por otra parte, se sabe que IL-17 promueve el reclutamiento y la sobrevivencia de neutrófilos [49], los cuales son elementos importantes durante la fase protectora de la infección, puesto que al eliminarlos durante la fase temprana se produce una deficiente activación de la respuesta inmune innata y adquirida con falla en el control de la enfermedad [92].

Basado en lo anterior, IL-17 podría tener efectos benéficos en etapas tempranas de la infección, quizás a través del reclutamiento de PMN y la estimulación de la secreción de quimiocinas específicas de tejido.

8. Conclusiones

Los niveles de expresión génica de IL-23 e IL-17 inducidos por la infección con cepas de la misma especie difieren, siendo mayor en la infección con cepas de virulencia baja o intermedia. De manera similar durante el transcurso de la infección, la expresión de IL-17 a nivel de proteína es menor durante la etapa progresiva en los animales infectados con cepas altamente virulentas, lo cual sugiere que esos niveles podrían correlacionar con una respuesta protectora temprana vinculada con el reclutamiento celular y control de crecimiento bacteriano, dirigido quizás con el inicio de una respuesta innata y una posterior inducción de la respuesta adaptativa.

9. Perspectivas

Para corroborar la función sugerida en etapas tempranas de IL-17 e IL-23 es esencial la supresión de las mismas y así caracterizar con más detalle su participación en el modelo murino de tuberculosis pulmonar progresiva, tras la infección con cepas de *M. tuberculosis* y *M. bovis* de diferente virulencia.

10. Bibliografía

1. Guevara, A.J., Aníbal; Zenteno, Roberto, *Tuberculosis y la importancia de incorporar nuevas metodologías diagnósticas*. MedUNAB, 2003. **6**(16): p. 46-51.
2. WHO, *Global Tuberculosis Report 2012*, in WHO2012.
3. Russell D.G., B.C.E., and Flynn J.L. , *Tuberculosis: what we don't know can, and does, hurt us*. Science, 2010. **328**(5980): p. 852-856.
4. Lobuep, A., et al., *Identification of a familial cluster of pulmonary Mycobacterium bovis disease Case Study*. The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease, 2004. **8**(9): p. 1142-1146.
5. Abalos, P.R.y.P., *Tuberculosis: ¿una zoonosis re-emergente?* Rev. sci. tech. Off. int. Epiz, 2004. **23**(2): p. 583-594.
6. Zendejas Martínez Horacio, M.S.F., Cuador Gil José Quintín, Cruz Bello Gustavo , Anaya Escalera Ana María, Huitròn Márquez Gabriel y García Casanova Leticia, *Spatial epidemiology of bovine tuberculosis in Mexico*. Veterinaria Italiana, 2007. **43** (3): p. 629-634.
7. Kantor, F.P., A.Bernardelli, P.M. Torres, A.Canal, J.R.Lobo, M.A.Zollin de Almeida, L.A.Paredes Noack, J.F.López, A.Garín, A.López Insaurrealde, M.L.Boschiroli-Cara, A.Cataldi, M.Ambroggi, *La Tuberculosis Bovina en América Latina. Situación actual y recomendaciones*, in *Taller patrocinado por OIE, III Congreso Latino Americano de Zoonosis2008*, OIE: Buenos Aires, Argentina.
8. OIE, *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*, in *BOVINE TUBERCULOSIS*, OIE, Editor 2009.
9. OIE. *Oficina Internacional de Epizootias*. 2013 3/05/2013]; Disponible en: http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/Diseasedistributionmap/index/newlang/es.

10. Gallegos, M., *La vacunación con M. bovis BCG, posible alternativa para el control de la tuberculosis bovina en México*, in *Memorias 20 congreso internacional de epidemiología*, A.m.d.e.v. A.C, Editor 2001. p. 63-69.
11. Une, Y. and T. Mori, *Tuberculosis as a zoonosis from a veterinary perspective*. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 2007. **30**(5–6): p. 415-425.
12. Pérez-Guerrero, L., et al., *Epidemiología molecular de las tuberculosis bovina y humana en una zona endémica de Querétaro, México*. *Salud Pública de México*, 2008. **50**: p. 286-291.
13. SENASICA. *Norma Oficial Mexicana NOM-031-ZOO-1995, Campaña Nacional Contra la Tuberculosis Bovina (Mycobacterium bovis)*. 2013 [citado 2013 9/4/13]; Disponible en: <http://www.senasica.gob.mx/?id=4369>.
14. Zuñiga, J., et al., *Cellular and Humoral Mechanisms Involved in the Control of Tuberculosis*. *Clinical and Developmental Immunology*, 2012. **2012**: p. 18.
15. Gorocica, P., et al., *Componentes glicosilados de la envoltura de Mycobacterium tuberculosis que intervienen en la patogénesis de la tuberculosis*. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias*, 2005. **18**: p. 142-153.
16. Palomino Juan Carlos, C.L.S., Ritacco Viviana . *In Tuberculosis 2007-From basic science to patient care* I.T. 2007, Editor 2007. p. 687.
17. Garnier, T., et al., *The complete genome sequence of Mycobacterium bovis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2003. **100**(13): p. 7877-7882.
18. Neyrolles, O., et al., *Is Adipose Tissue a Place for Mycobacterium tuberculosis Persistence?* *PLoS ONE*, 2006. **1**(1): p. e43.
19. Niemann, S., E. Richter, and S. Rüsç-Gerdes, *Differentiation among Members of the Mycobacterium tuberculosis Complex by Molecular and Biochemical Features: Evidence for Two Pyrazinamide-Susceptible Subtypes of M. bovis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 2000. **38**(1): p. 152-157.

20. Flynn, J.L. and J. Chan, *Tuberculosis: Latency and Reactivation*. Infection and Immunity, 2001. **69**(7): p. 4195-4201.
21. Smith, I., *Mycobacterium tuberculosis Pathogenesis and Molecular Determinants of Virulence*. Clinical Microbiology Reviews, 2003. **16**(3): p. 463-496.
22. Cooper, A.M., K.D. Mayer-Barber, and A. Sher, *Role of innate cytokines in mycobacterial infection*. Mucosal Immunol, 2011. **4**(3): p. 252-260.
23. Shevach, E.M., *Mechanisms of Foxp3+ T Regulatory Cell-Mediated Suppression*. Immunity, 2009. **30**(5): p. 636-645.
24. van Crevel, R., T.H.M. Ottenhoff, and J.W.M. van der Meer, *Innate Immunity to Mycobacterium tuberculosis*. Clinical Microbiology Reviews, 2002. **15**(2): p. 294-309.
25. Ahmad, S., *Pathogenesis, Immunology, and Diagnosis of Latent Mycobacterium tuberculosis Infection*. Clinical and Developmental Immunology, 2011. **2011**.
26. Herrera Barrios, M.T., et al., *Mecanismos moleculares de la respuesta inmune en la tuberculosis pulmonar humana*. Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, 2005. **18**: p. 327-336.
27. García-Sancho, M.C.F., *Respuesta inmune a la infección por Mycobacterium tuberculosis Una revisión de la literatura*. Rev Inst Nal Enf Resp Mex, 2001. **14**(2): p. 114-128.
28. Russell, D.G., *Mycobacterium tuberculosis: here today, and here tomorrow*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2001. **2**(8): p. 569-586.
29. Ramakrishnan, L., *Revisiting the role of the granuloma in tuberculosis*. Nat Rev Immunol, 2012. **12**(5): p. 352-366.
30. Kaufmann, S.H.E., *How can immunology contribute to the control of tuberculosis?* Nat Rev Immunol, 2001. **1**(1): p. 20-30.
31. Flynn, J.L., J. Chan, and P.L. Lin, *Macrophages and control of granulomatous inflammation in tuberculosis*. Mucosal Immunol, 2011. **4**(3): p. 271-278.

32. Pollock, J.M., M.D. Welsh, and J. McNair, *Immune responses in bovine tuberculosis: Towards new strategies for the diagnosis and control of disease*. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2005. **108**(1–2): p. 37-43.
33. Hernández-Pando R, O.H., Sampieri A, Pavón L, Velasquillo C, Larriva-Sahd J, Alcocer J M, and Madrid M V., *Correlation between the kinetics of Th1/Th2 cells and pathology in a murine model of experimental pulmonary tuberculosis*. *Immunology*, 1996. **89**(1): p. 26–33.
34. Hernández Pando Rogelio, O., L Diana Aguilar, López Casillas Fernando, Rook Graham *INMUNOPATOLOGIA DE LA TUBERCULOSIS PULMONAR EXPERIMENTAL*. *Mensaje Bioquímico.*, 2004. **XXVIII**.
35. Aguilar L, D., et al., *Mycobacterium tuberculosis strains with the Beijing genotype demonstrate variability in virulence associated with transmission*. *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)*, 2010. **90**(5): p. 319-325.
36. López, B., et al., *A marked difference in pathogenesis and immune response induced by different Mycobacterium tuberculosis genotypes*. *Clinical & Experimental Immunology*, 2003. **133**(1): p. 30-37.
37. Marquina-Castillo, B., et al., *Virulence, immunopathology and transmissibility of selected strains of Mycobacterium tuberculosis in a murine model*. *Immunology*, 2009. **128**(1): p. 123-133.
38. Quintero-Macías, L., et al., *Reduced in vivo Cytotoxicity and Increased Mycobacterial Burden Are Associated with Virulent Mycobacterium tuberculosis Strains During Lung Infection*. *Immunological Investigations*, 2012. **41**(1): p. 51-60.
39. Aguilar León, D., et al., *Mycobacterium bovis with different genotypes and from different hosts induce dissimilar immunopathological lesions in a mouse model of tuberculosis*. *Clinical & Experimental Immunology*, 2009. **157**(1): p. 139-147.

40. Szabo, S.J., et al., *MOLECULAR MECHANISMS REGULATING TH1 IMMUNE RESPONSES*. Annual Review of Immunology, 2003. **21**(1): p. 713-758.
41. Zhu, J.P., William E., *Heterogeneity and plasticity of T helper cells*. Cell Re, 2009. **20**(1): p. 4-12.
42. Korn, T., et al., *IL-17 and Th17 Cells*, in *Annual Review of Immunology* 2009, Annual Reviews: Palo Alto. p. 485-517.
43. Vélez Marín, V.M.P.Á., Sara Claudia y García Moreno, Luis Fernando. *Interleuquina-17: características, vías de diferenciación, señalización y funciones biológicas*. Iatreia., 2007. **20**.
44. Akdis, C.A. and M. Akdis, *Mechanisms and treatment of allergic disease in the big picture of regulatory T cells*. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2009. **123**(4): p. 735-746.
45. Bettelli, E., T. Korn, and V.K. Kuchroo, *Th17: the third member of the effector T cell trilogy*. Current Opinion in Immunology, 2007. **19**(6): p. 652-657.
46. Jutel, M. and C. Akdis, *T-cell Subset Regulation in Atopy*. Current Allergy and Asthma Reports, 2011. **11**(2): p. 139-145.
47. Khader, S.A. and A.M. Cooper, *IL-23 and IL-17 in tuberculosis*. Cytokine, 2008. **41**(2): p. 79-83.
48. Nowak, E.C. and R.J. Noelle, *Interleukin-9 as a T helper type 17 cytokine*. Immunology, 2010. **131**(2): p. 169-173.
49. Zelante, T., et al., *IL-22 in antifungal immunity*. European Journal of Immunology, 2011. **41**(2): p. 270-275.
50. Curtis, M.M. and S.S. Way, *Interleukin-17 in host defence against bacterial, mycobacterial and fungal pathogens*. Immunology, 2009. **126**(2): p. 177-185.
51. Torrado, E. and A.M. Cooper, *IL-17 and Th17 cells in tuberculosis*. Cytokine & Growth Factor Reviews, 2010. **21**(6): p. 455-462.

52. Damsker, J.M., A.M. Hansen, and R.R. Caspi, *Th1 and Th17 cells*. Annals of the New York Academy of Sciences, 2010. **1183**(1): p. 211-221.
53. Eyerich, S., et al., *IL-17 and IL-22: siblings, not twins*. Trends in Immunology, 2010. **31**(9): p. 354-361.
54. Louten, J., K. Boniface, and R. de Waal Malefyt, *Development and function of TH17 cells in health and disease*. Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2009. **123**(5): p. 1004-1011.
55. Lee, J., et al., *Mycobacteria-Induced Suppression of Autoimmunity in the Central Nervous System*. Journal of Neuroimmune Pharmacology, 2010. **5**(2): p. 210-219.
56. Ivanov, I.I., et al., *The Orphan Nuclear Receptor ROR γ t Directs the Differentiation Program of Proinflammatory IL-17+ T Helper Cells*. Cell, 2006. **126**(6): p. 1121-1133.
57. Dang, Eric V., et al., *Control of TH17/Treg Balance by Hypoxia-Inducible Factor 1*. Cell, 2011. **146**(5): p. 772-784.
58. Steinman, L., *A brief history of TH17, the first major revision in the TH1/TH2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage*. Nat Med, 2007. **13**(2): p. 139-145.
59. Oppmann, B., et al., *Novel p19 Protein Engages IL-12p40 to Form a Cytokine, IL-23, with Biological Activities Similar as Well as Distinct from IL-12*. Immunity, 2000. **13**(5): p. 715-725.
60. Lankford, C.S.R. and D.M. Frucht, *A unique role for IL-23 in promoting cellular immunity*. Journal of Leukocyte Biology, 2003. **73**(1): p. 49-56.
61. Khader, S. and J. Kolls, *IL-17 and mucosal host defense*, in *Th 17 Cells: Role in Inflammation and Autoimmune Disease*, V. Quesniaux, B. Ryffel, and F. Padova, Editors. 2009, Birkhäuser Basel. p. 149-159.
62. Lalor, S.J., et al., *Caspase-1–Processed Cytokines IL-1 β and IL-18 Promote IL-17 Production by $\gamma\delta$ and CD4 T Cells That Mediate Autoimmunity*. The Journal of Immunology, 2011. **186**(10): p. 5738-5748.

63. Coury, F., et al., *Langerhans cell histiocytosis reveals a new IL-17A-dependent pathway of dendritic cell fusion*. *Nat Med*, 2008. **14**(1): p. 81-87.
64. Khader, S.A. and R. Gopal, *IL-17 in protective immunity to intracellular pathogens*. *Virulence*, 2010. **1**(5): p. 423-427.
65. Moseley, T.A., et al., *Interleukin-17 family and IL-17 receptors*. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 2003. **14**(2): p. 155-174.
66. Cooper, A., *Is IL-17 required to control tuberculosis?*, in *Th 17 Cells: Role in Inflammation and Autoimmune Disease*, V. Quesniaux, B. Ryffel, and F. Padova, Editors. 2009, Birkhäuser Basel. p. 135-147.
67. Bai, H., et al., *IL-17/Th17 Promotes Type 1 T Cell Immunity against Pulmonary Intracellular Bacterial Infection through Modulating Dendritic Cell Function*. *The Journal of Immunology*, 2009. **183**(9): p. 5886-5895.
68. O'Connor, W., L.A. Zenewicz, and R.A. Flavell, *The dual nature of TH17 cells: shifting the focus to function*. *Nat Immunol*, 2010. **11**(6): p. 471-476.
69. Wang, C.Q.F., et al., *Th17 Cells and Activated Dendritic Cells Are Increased in Vitiligo Lesions*. *PLoS ONE*, 2011. **6**(4): p. e18907.
70. Hamada, S., et al., *IL-17A Produced by $\gamma\delta$ T Cells Plays a Critical Role in Innate Immunity against *Listeria monocytogenes* Infection in the Liver*. *The Journal of Immunology*, 2008. **181**(5): p. 3456-3463.
71. Schulz, S.M., et al., *IL-17A is produced by Th17, $\gamma\delta$ T cells and other CD4-lymphocytes during infection with *Salmonella enterica* serovar *Enteritidis* and has a mild effect in bacterial clearance*. *International Immunology*, 2008. **20**(9): p. 1129-1138.
72. Chabaud, M., et al., *Human interleukin-17: A T cell-derived proinflammatory cytokine produced by the rheumatoid synovium*. *Arthritis & Rheumatism*, 1999. **42**(5): p. 963-970.
73. Khader, S.A.B., Guy K; Pearl, John E; Fountain, Jeffrey J; Rangel-Moreno, Javier; Cilley, Garth E, Shen, Fang; Eaton, Sheri M; Gaffen, Sarah L; Swain, Susan L; Locksley, Richard M; Haynes, Laura; Randall, Troy D and Cooper, Andrea M, *IL-23 and IL-17 in the establishment of protective pulmonary*

- CD4+ T cell responses after vaccination and during Mycobacterium tuberculosis challenge.* Nat Immunol, 2007. **8**(4): p. 369-377.
74. Okamoto Yoshida, Y., et al., *Essential Role of IL-17A in the Formation of a Mycobacterial Infection-Induced Granuloma in the Lung.* The Journal of Immunology, 2010. **184**(8): p. 4414-4422.
75. Lockhart, E., A.M. Green, and J.L. Flynn, *IL-17 Production Is Dominated by $\gamma\delta$ T Cells rather than CD4 T Cells during Mycobacterium tuberculosis Infection.* The Journal of Immunology, 2006. **177**(7): p. 4662-4669.
76. Sutton, C.E., et al., *Interleukin-1 and IL-23 Induce Innate IL-17 Production from $\gamma\delta$ T Cells, Amplifying Th17 Responses and Autoimmunity.* Immunity, 2009. **31**(2): p. 331-341.
77. Umemura, M., et al., *IL-17-Mediated Regulation of Innate and Acquired Immune Response against Pulmonary Mycobacterium bovis Bacille Calmette-Guérin Infection.* The Journal of Immunology, 2007. **178**(6): p. 3786-3796.
78. Cruz, A., et al., *Pathological role of interleukin 17 in mice subjected to repeated BCG vaccination after infection with Mycobacterium tuberculosis.* The Journal of Experimental Medicine, 2010. **207**(8): p. 1609-1616.
79. Wozniak, T.M., A.A. Ryan, and W.J. Britton, *Interleukin-23 Restores Immunity to Mycobacterium tuberculosis Infection in IL-12p40-Deficient Mice and Is Not Required for the Development of IL-17-Secreting T Cell Responses.* The Journal of Immunology, 2006. **177**(12): p. 8684-8692.
80. Wozniak, T.M., et al., *Mycobacterium bovis BCG-Specific Th17 Cells Confer Partial Protection against Mycobacterium tuberculosis Infection in the Absence of Gamma Interferon.* Infection and Immunity, 2010. **78**(10): p. 4187-4194.
81. van de Veerdonk, F.L., et al., *Mycobacterium tuberculosis induces IL-17A responses through TLR4 and dectin-1 and is critically dependent on endogenous IL-1.* Journal of Leukocyte Biology, 2010. **88**(2): p. 227-232.

82. Scriba, T.J., et al., *Distinct, Specific IL-17- and IL-22-Producing CD4+ T Cell Subsets Contribute to the Human Anti-Mycobacterial Immune Response*. *The Journal of Immunology*, 2008. **180**(3): p. 1962-1970.
83. Dias, A.T., et al., *Lower production of IL-17A and increased susceptibility to Mycobacterium bovis in mice coinfecting with Strongyloides venezuelensis*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 2011. **106**: p. 617-619.
84. Chen, X., et al., *Reduced Th17 Response in Patients with Tuberculosis Correlates with IL-6R Expression on CD4+ T Cells*. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 2010. **181**(7): p. 734-742.
85. Basile, J.I., et al., *Outbreaks of Mycobacterium Tuberculosis MDR Strains Induce High IL-17 T-Cell Response in Patients With MDR Tuberculosis That Is Closely Associated With High Antigen Load*. *Journal of Infectious Diseases*, 2011. **204**(7): p. 1054-1064.
86. Jarnagin, J.L. and D.W. Luchsinger, *The Use of Fluorescein Diacetate and Ethidium Bromide as a Stain for Evaluating Viability of Mycobacteria*. *Biotechnic & Histochemistry*, 1980. **55**(4): p. 253-258.
87. Hernandez-Pando, R., et al., *Pathogenesis of tuberculosis in mice exposed to low and high doses of an environmental mycobacterial saprophyte before infection*. *Infection and Immunity*, 1997. **65**(8): p. 3317-27.
88. SB, B. and B.S.F.T. WORLD. *Rabbit PolyDetector HRP con DAB Detection System* 2011 [citado 2011 Enero 2011]; Disponible en: <http://www.biosb.com/rabbit-polydetector-hrp-with-dab/>.
89. Annunziato, F., et al., *The phenotype of human Th17 cells and their precursors, the cytokines that mediate their differentiation and the role of Th17 cells in inflammation*. *International Immunology*, 2008. **20**(11): p. 1361-1368.
90. Ouyang, W., J.K. Kolls, and Y. Zheng, *The Biological Functions of T Helper 17 Cell Effector Cytokines in Inflammation*. *Immunity*, 2008. **28**(4): p. 454-467.

91. Rivas-Santiago, B., et al., *β -Defensin Gene Expression during the Course of Experimental Tuberculosis Infection*. *Journal of Infectious Diseases*, 2006. **194**(5): p. 697-701.
92. Barrios-Payán, J., et al., *Neutrophil participation in early control and immune activation during experimental pulmonary tuberculosis*. Vol. 142. 2006. 273-81.