



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

**EFFECTO DE LA VACUNACIÓN SOBRE LA VIRULENCIA DE DIVERSOS  
GENOTIPOS DE *Mycobacterium tuberculosis***

**T E S I S**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:**

**Maestro en Ciencias**

**PRESENTA:**

**ZYANYA LUCIA ZATARAIN BARRÓN**

**TUTOR PRINCIPAL**

**DR. ROGELIO ENRIQUE HERNÁNDEZ PANDO  
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN  
"SALVADOR ZUBIRÁN"**

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR**

**DRA. BERTHA GONZALEZ PEDRAJO  
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR  
UNAM**

**DR. ENRIQUE ORTEGA SOTO  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS  
UNAM**

**MÉXICO, D. F. Marzo, 2014**



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.

## RECONOCIMIENTOS

El presente trabajo de investigación fue realizado en el laboratorio de Patología Experimental del Departamento de Patología del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”, bajo la dirección del Dr. Rogelio Hernández Pando.

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por la Dra. Bertha González Pedrajo, del Instituto de Fisiología Celular, UNAM y el Dr. Enrique Ortega Soto, del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

Este proyecto fue apoyado por el National Institute of Public Health and the Environment, The Netherlands, con el número de convenio 037919, firmado entre la Commission of the European Communities y el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán” como parte del proyecto “Effect of genetic variation in Mycobacterium tuberculosis” on vaccine escape and the acquisition of drug resistance”.

La autora recibió apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) para la realización de sus estudios de Maestría en el Programa de maestría y doctorado en Ciencias Bioquímicas de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), con el número de becario 419043.

## **DEDICATORIAS**

A mis padres, de quienes he aprendido tanto, gracias por su amor, su apoyo, su paciencia y su sabiduría. Gracias también por enseñarme no sólo con palabras, sino con su impecable ejemplo a vivir mi vida y cumplir mis sueños.

A mis hermanitas Karina y Naomi, las amo con todo mi corazón.

A mi esposo, en ti he encontrado toda la fuerza para seguir mi camino, gracias por tu amor, tus palabras de aliento y todos los desvelos en los que me has acompañado.

María Lucia, todo lo que hago lo hago por ti y para ti, gracias por haber llegado a inundar de alegría tantas vidas.

A mis suegros, Carmen y Rey, y a mi cuñado Pepe, gracias por todo su apoyo y por haberme hecho parte de su familia.

A mis abuelos y tías, porque en mi familia tan hermosa he encontrado toda la felicidad que una persona puede desear.

## **AGRADECIMIENTOS**

Mi eterno agradecimiento al Dr. Rogelio Hernández Pando por haberme brindado la oportunidad de participar en su laboratorio con este proyecto. Gracias por todo el apoyo, por compartir su gran conocimiento, por ayudarnos a formarnos no solo como alumnos de posgrado, sino por incentivarnos día con día a crecer como personas.

De manera muy especial agradezco al Dr. José Pedraza Chaverri, por toda su ayuda, asesoría y enseñanza desde el inicio de mi formación.

Gracias a mi comité tutor, la Dra. Bertha González Pedrajo y el Dr. Enrique Ortega Soto, que guiaron este proyecto durante el transcurso de mis estudios.

Agradezco enormemente a los miembros de mi jurado: Dra. Yolanda López Vidal, Dra. Bertha Espinoza Gutiérrez, Dr. Eduardo García Zepeda, Dr. José Pedraza Chaverri y Dra. Clara Espitia Pinzón, cuyas observaciones de este trabajo lo mejoraron de manera inmensurable.

Se reconoce la colaboración del Dr. Dick van Soolingen y la Dra. Kristin Kremer del RIVM en Bilthoven, The Netherlands, quienes amablemente proporcionaron las bacterias del genotipo Beijing de *Mycobacterium tuberculosis* con las cuales se llevaron a cabo los experimentos de virulencia.

Gracias a la Dra. Dulce Mata, que me enseñó a trabajar con este modelo experimental y me alentó en tantas ocasiones. Gracias a la Dra. Brenda Marquina y al Dr. Jorge Barrios por su ayuda en el desarrollo de este trabajo.

Agradezco a Jaime Ayala por su asesoría en la preparación histológica del tejido pulmonar.

Por último, estoy inmensamente agradecida con mis compañeros del laboratorio de Patología Experimental. Gracias por todas sus contribuciones y por su amistad.

ÍNDICE.....	i
ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS.....	iv
ABREVIATURAS.....	v
RESUMEN.....	vii
INTRODUCCIÓN.....	1
I. TUBERCULOSIS.....	1
1. GENERALIDADES DE LA TUBERCULOSIS.....	1
1.1. Historia.....	1
1.2. Epidemiología.....	1
1.2.1. Distribución mundial de TB activa.....	1
1.2.2. Tuberculosis Latente.....	2
1.2.3. Coinfección VIH/TB.....	2
1.2.4. Problemática actual.....	2
2. PATOGÉNESIS.....	3
2.1. Historia.....	3
2.2. Agente causal y transmisión.....	3
2.3. Modelo multifactorial del desarrollo de la TB.....	3
2.3.1. Factores del huésped.....	3
2.3.2. Factores ambientales.....	4
2.3.3. Factores de la bacteria.....	4
2.4. Primoinfección.....	4
2.4.1. Panorama tradicional.....	4
2.4.2. Panorama ampliado.....	5
2.5. Tuberculosis primaria y secundaria.....	5
2.6. Patogenia de la TB pulmonar.....	6
2.6.1. Etapa temprana.....	6
2.6.2. Latencia y reactivación.....	6
2.6.3. Granulomas.....	7
3. TRATAMIENTO.....	8
3.1. Tratamiento de primera línea.....	8
3.2. Tratamiento en casos MDR y XDR.....	9

4.	RESPUESTA INMUNE A LA TUBERCULOSIS .....	10
4.1.	Sistema inmune innato.....	10
4.2.	Sistema inmune adaptativo.....	11
5.	Mycobacterium tuberculosis .....	14
5.1.	Origenes .....	14
5.2.	Características fenotípicas.....	14
5.2.1.	Clasificación y generalidades .....	14
5.2.2.	Morfología .....	15
5.2.3.	Envoltura celular.....	15
5.2.4.	Factor cordón .....	16
5.2.5.	Bioquímica.....	16
5.3.	Características genotípicas.....	16
6.	VACUNACIÓN CON BCG .....	17
6.1.	Surgimiento de la BCG .....	17
6.2.	Distribución y preparación.....	17
6.3.	Atenuación de las subcepas de BCG .....	18
6.3.1.	Consecuencias de la atenuación de las subcepas de BCG .....	18
6.4.	Eficacia de la BCG.....	19
6.4.1.	Divergencia en tasas de protección .....	19
6.4.2.	Uso actual de la BCG .....	19
7.	GENOTIPO BEIJING.....	20
7.1.	Características .....	20
7.2.	Origen .....	20
7.3.	Clasificación y prevalencia.....	20
7.4.	Virulencia y drogorresistencia.....	21
7.5.	Ventajas adaptativas del genotipo Beijing.....	21
7.6.	Metabolismo e inmunogenicidad.....	22
II.	MECANISMOS EVOLUTIVOS DE CAMBIOS EN VIRULENCIA.....	22
1.	VACUNACIÓN Y EVOLUCIÓN DE VIRULENCIA.....	22
1.1.	Vacunas perfectas vs. Vacunas imperfectas .....	23
1.2.	Efectos de la cobertura poblacional de vacunación .....	23
	<b>ANTECEDENTES</b> .....	<b>25</b>
I.	MODELO MURINO DE TB PULMONAR PROGRESIVA .....	25

## ÍNDICE

---

1. Validez de estudios hechos en ratones .....	26
2. Variabilidad de la enfermedad .....	26
II. Cambios en virulencia derivados de la vacunación previa.....	27
<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	29
<b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	29
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	29
<b>DISEÑO EXPERIMENTAL</b> .....	31
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	32
I. SELECCIÓN DE CEPAS DE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS Y CRECIMIENTO EN MEDIO DE CULTIVO .....	32
1. Recuperación de cepas bacterianas a partir de cultivos frescos.....	33
2. Conteo de bacterias para infección de ratones .....	33
II. VALORACIÓN DE VIRULENCIA DE LAS CEPAS EN EL MODELO EXPERIMENTAL DE TUBERCULOSIS PULMONAR PROGRESIVA EN RATONES BALB/c .....	34
1. Determinación de la carga bacilar mediante Unidades Formadoras de Colonias (UFC) .....	36
2. Preparación de tejido pulmonar para valoración del daño histopatológico 37	
3. Determinación de sobrevida.....	37
III. ESTADÍSTICA .....	38
<b>RESULTADOS</b> .....	39
I. CURVAS DE CRECIMIENTO DE LAS CEPAS PARENTALES Y SUS SUBCEPAS.....	39
II. MODELO EXPERIMENTAL DE TUBERCULOSIS PULMONAR PROGRESIVA EN RATONES BALB/c Y VALORACIÓN DE VIRULENCIA DE LAS CEPAS .....	41
1. CEPA 1 Y SUBCEPAS.....	41
2. CEPA 46 Y SUBCEPAS .....	45
3. CEPA 48 Y SUBCEPAS.....	52
<b>DISCUSIÓN</b> .....	57
<b>CONCLUSIONES</b> .....	65
<b>PERSPECTIVAS</b> .....	66
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	67



**Tabla 1.** Tratamiento de TBP drogo-sensible

**Tabla 2.** Cepas de *Mycobacterium tuberculosis* seleccionadas para experimentación

**Tabla 3.** Cálculos de concentración de bacterias

**Tabla 4.** Determinación de UFC

**Figura 1.** Estrategia experimental

**Figura 2.** Crecimiento in vitro

**Figura 3.** Carga bacilar de los pulmones obtenidos de ratones infectados con las cepas 1, 1P, 1V y 1S.

**Figura 4.** Porcentaje de superficie pulmonar afectada por neumonía en los ratones infectados con las cepas 1, 1P, 1V y 1S.

**Figura 5.** Histología

**Figura 6.** Sobrevida cepa 46 y subcepas

**Figura 7.** Carga bacilar cepa 46 y subcepas

**Figura 8.** Imagen Ziehl-Neelsen positiva

**Figura 9.** Neumonía cepa 46 y subcepas

**Figura 10.** Necrosis pulmonar cepa 46 y subcepas

**Figura 11.** Histología cepa 46 y subcepas

**Figura 12.** Sobrevida cepa 46P y 46PP

**Figura 13.** Carga bacilar cepa 46P vs 46PP

**Figura 14.** Histología cepa 46PP

**Figura 15.** Histología cepa 46PP

**Figura 16.** Sobrevida cepa 48 y subcepas

**Figura 17.** Carga bacilar cepa 48 y subcepas

**Figura 18.** Neumonía cepa 48 y subcepas

**Figura 19.** Necrosis pulmonar

**Figura 20.** Necrosis pulmonar

**Figura 21.** Histología cepa 48 y subcepas

**BCG:** Bacille Calmette-Guérin

**DC-SIGN:** Molécula no integrina de adhesión intercelular específica de células dendríticas

**DR:** Direct Repeat

**HSP-65:** Proteína de choque térmico de 65 kDa.

**IFN- $\gamma$ :** Interferón gamma

**IGRAS:** Pruebas de liberación de interferón gamma

**IL-1:** Interleucina 1

**IL-10:** Interleucina 10

**IL-13:** Interleucina 13

**IL-18:** Interleucina 18

**IL-2:** Interleucina 2

**IL-4:** Interleucina 4

**IL-5:** Interleucina 5

**IL-6:** Interleucina 6

**IL-8:** Interleucina 8

**iNOS:** Sintasa de óxido nítrico inducible

**MCH:** Complejo principal de histocompatibilidad

**MTB:** *Mycobacterium tuberculosis*

**NK:** Células natural killer

**NO:** Óxido nítrico

**OMS:** Organización Mundial de la Salud

**PDIM:** Phitocerol dimicoseratos

**PGL:** Glucolípidos fenólicos

**PPD:** Derivado de proteína purificada

**RD1:** Región de diferencia 1

**RNI:** Intermediarios reactivos de nitrógeno

**RPM:** Revoluciones por minuto

**SIDA:** Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida

**SSE:** Solución Salina Estéril

**T-CD4+:** Linfocitos T CD4+

**TB:** Tuberculosis

**TBP:** Tuberculosis pulmonar

## ABREVIATURAS

---

**TDM:** Dimicolato 6,6'-trealosa "factor cordón"

**Th1:** Respuesta T cooperadora tipo 1

**TNF- $\alpha$ :** Factor de necrosis tumoral alfa

**TST:** Prueba cutánea a la tuberculina

**UFC:** Unidades Formadoras de Colonias

**VIH:** Virus de Inmunodeficiencia Humana

**XDR:** Extensamente drogo-resistente

Diversas regiones del mundo se enfrentan a un problema de tuberculosis persistente; simultáneamente, la aplicación de la vacuna BCG se ha tornado controversial debido a inconsistencias en su tasa de eficacia. Varias teorías han intentado explicar la variación en la protección conferida por BCG; por ejemplo, el hecho de que la BCG podría proteger contra algunos, pero no todos los genotipos de *Mycobacterium tuberculosis*. Nuevas teorías sugieren que la inmunidad suscitada por BCG podría aumentar directamente la virulencia de *Mycobacterium tuberculosis* causando enfermedad en individuos vacunados. El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto directo de la vacunación con BCG sobre la virulencia de diversos genotipos de *Mycobacterium tuberculosis*.

Se seleccionaron tres cepas de *Mycobacterium tuberculosis* (cepas parentales), dos del genotipo Beijing y una del genotipo Euro-Americano. Estas cepas se inocularon en ratones previamente vacunados con BCG. Dos meses posteriores al inóculo los animales fueron sacrificados y sus pulmones se cultivaron en medio sólido para obtener las bacterias presentes. Dichas bacterias fueron infectadas a un lote nuevo de ratones y su virulencia comparada con su cepa parental mediante curvas de supervivencia, carga bacilar pulmonar y daño histopatológico pulmonar.

Las cepas del genotipo Beijing presentaron un aumento en su nivel de virulencia al ser pasadas por ratones vacunados, sin embargo la cepa del genotipo Euro-Americano no presentó dicho aumento de virulencia.

Los datos obtenidos sugieren que la vacunación con BCG podría aumentar la virulencia únicamente de algunos genotipos de *Mycobacterium tuberculosis*, en este caso, el genotipo Beijing.

### I. TUBERCULOSIS

#### 1. GENERALIDADES DE LA TUBERCULOSIS

##### 1.1. Historia

La tuberculosis (TB) es una enfermedad que ha afligido al hombre desde tiempos ancestrales, evadiendo los esfuerzos que se han hecho por intentar detenerla. Es muy probable que esta enfermedad haya matado a más personas que cualquier otra infección microbiana (Daniel, 2006) siendo la causante de grandes epidemias que han acompañado al ser humano desde sus inicios como especie.

##### 1.2. Epidemiología

Actualmente, después de más de 100 años del descubrimiento de su agente causal, seguimos ante una epidemia mundial y enfrentamos el reto por detenerla. Los integrantes de la especie *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) causan anualmente 1.3 millones de muertes (WHO, 2013) y, a pesar de que las tasas de incidencia globales disminuyen progresivamente desde el 2004, aun se reportan aproximadamente 8.6 millones de casos nuevos por año (WHO, 2013).

##### 1.2.1. Distribución mundial de TB activa

La carga mundial de tuberculosis es alarmante, pero más aun cuando se toma en cuenta que el 80% de los casos se encuentran conglomerados en 22 países de “carga elevada” (Russell *et al*, 2010), encabezados por India y China (Pang *et al*, 2012). De esta manera, mientras en países de Europa y Norteamérica las tasas de tuberculosis se encuentran en una baja histórica (Daniel, 2006), otras naciones en vías de desarrollo luchan por alcanzar las metas establecidas por la asociación STOP TB. Esta asociación propone como metas, entre otras, la eliminación de la TB como un problema de salud pública mundial para el año de 2050 (StopTB strategy sheet, 2011). En México se reportan aproximadamente 19,857 casos nuevos y de recidivas de tuberculosis

diagnosticados y tratados en programas nacionales de lucha contra la tuberculosis y notificados a la OMS (OMS, 2013).

### **1.2.2. Tuberculosis Latente**

Aunado a la tuberculosis activa, la Organización Mundial de la Salud (OMS) reconoce a dos billones de individuos con infección latente quienes, a pesar de no presentar síntomas de enfermedad, representan el mayor reservorio de la bacteria y tienen un riesgo de 10% de sufrir reactivación y pasar a enfermedad activa (Druszczynska *et al.*, 2012).

### **1.2.3. Coinfección VIH/TB**

Se estima que de las 1.3 millones de muertes anuales causadas por TB, 0.32 millones son en pacientes VIH(+). La tasa más alta de TB activa per cápita se encuentra en el África subsahariana, lo cual está altamente relacionado a la epidemia de VIH que se vive en esta zona (WHO, 2013). Es de suma importancia caracterizar la enfermedad en estos individuos, ya que al tener afectada la inmunidad mediada por células, particularmente los linfocitos T CD4+, son mucho más susceptibles a sufrir reactivación de enfermedad latente, progresión a enfermedad activa a partir de la primoinfección y también casos de BCGitis y BCGosis (formas localizada y diseminada de enfermedad por BCG, respectivamente) en niños VIH+ que sean vacunados con BCG (Hesseling *et al.*, 2009).

### **1.2.4. Problemática actual**

Es indiscutible que nuestros conocimientos de esta enfermedad han avanzado significativamente en el último siglo, a pesar de esto han aparecido cepas multidrogoresistentes (MDR-TB) y extensamente drogoresistentes (XDR-TB). Las cepas MDR presentan resistencia al menos a isoniazida y rifampicina, mientras que las cepas XDR son resistentes no solo a la isoniazida y rifampicina, sino a cualquiera de las fluoroquinolonas y cualquiera de los fármacos inyectables usados en el tratamiento de segunda línea (amikacina, capreomicina, kanamicina). Asimismo, la coinfección VIH/TB y la falta de

nuevos agentes profilácticos y terapéuticos nos recuerdan que estamos lejos de ganar esta batalla.

## **2. PATOGÉNESIS**

### **2.1. Historia**

La primera descripción sobre la patogenia de la TB se le atribuye a Hyacinthe Laennec en 1819, cuando tomó el líquido de un granuloma de la autopsia de un paciente fallecido por TB y lo inyectó en un conejo, encontrando al animal infestado de granulomas en la autopsia que le realizó 3 meses después (Daniel, 2006). A pesar de estos tempranos descubrimientos sobre la transmisibilidad de la enfermedad, no fue hasta 1882 que Robert Koch logró aislar el bacilo y reproducir sistemáticamente la enfermedad en un modelo animal, estableciendo así los postulados de Koch, cuyos principios siguen vigentes en la microbiología moderna (Kruif, 1926).

### **2.2. Agente causal y transmisión**

Actualmente sabemos que la tuberculosis es una enfermedad infecciosa ocasionada por el complejo MTB (WHO, 2011). La transmisión de dicho microorganismo ocurre de persona a persona mediante aerosoles producidos al toser, estornudar o hablar (Rubin, 2006). Se ha discutido que el inoculo necesario para producir infección en un individuo es realmente pequeño, incluso de un bacilo único (Kaufmann, 2001).

### **2.3. Modelo multifactorial del desarrollo de la TB**

#### **2.3.1. Factores del huésped**

A pesar de esta fácil transmisión, el desarrollo de la tuberculosis pulmonar depende también de otros factores tanto del huésped, del medio ambiente y de la bacteria como tal. Entre los factores del huésped se incluyen la edad del paciente, su estado inmunológico, dieta e incluso etnicidad (WHO, 2013). Recientemente, se han descrito individuos con susceptibilidad genética a desarrollar tuberculosis, en humanos se ha demostrado que dicha susceptibilidad puede ser producto de defectos en el gen que codifica el

receptor de IL-12 (Alcaïs *et al.*, 2005), mientras que en ratones el gen NRAMP1 se ha descrito como un factor de susceptibilidad (Di Pietrantonio *et al.*, 2011).

### **2.3.2. Factores ambientales**

El medio ambiente puede contribuir al desarrollo de la enfermedad en aquellas personas que se encuentren en condiciones de hacinamiento o quienes tengan un bajo nivel socioeconómico (Rubin, 2006).

### **2.3.3. Factores de la bacteria**

La historia natural de la enfermedad depende también en gran medida de propiedades intrínsecas de la bacteria. El complejo *Mycobacterium tuberculosis* dista mucho de ser homogéneo, con aproximadamente 39,295 cepas de MTB provenientes de 122 países (Palomino *et al.*, 2007). Todas estas cepas presentan variación en su nivel de virulencia, transmisibilidad y capacidad de permanecer en latencia, siendo la cepa infectante un factor de suma importancia para determinar el curso de la enfermedad. Esto se puede ejemplificar en el grupo de cepas Euro Americanas y las cepas del genotipo Beijing. Las primeras no producen en gran cantidad una molécula de Glucolípidos fenólicos, PGL, que se encuentra asociada con el fallo de la respuesta inmune y mayor mortalidad en modelos murinos (Di Pietrantonio *et al.*, 2011). En comparación, se ha informado que las cepas del genotipo Beijing expresan altos niveles de PGL, lo cual correlaciona con la elevada virulencia de este último genotipo en comparación con las cepas Euro Americanas (Reed *et al.*, 2004).

## **2.4. Primoinfección**

### **2.4.1. Panorama tradicional**

Tradicionalmente se distinguen dos cursos principales a seguir en pacientes que sufren primoinfección. La mayoría de los pacientes (90% aproximadamente) logran contener el proceso infeccioso y se mantienen asintomáticos. El 10% restante evoluciona hacia un proceso infeccioso progresivo con la concomitante destrucción del parénquima pulmonar y la



sintomatología clásica de la tuberculosis activa la cual incluye tos crónica, expectoración sanguinolenta y fiebre de predominio vespertino (Rubin, 2006).

### **2.4.2. Panorama ampliado**

En la actualidad, algunos autores sugieren ampliar el espectro de desenlaces posibles a partir de una primoinfección, incluyendo individuos expuestos al bacilo pero que nunca fueron infectados como tal, estos individuos presentan pruebas cutáneas a la tuberculina (TST) y pruebas de liberación de Interferón-gamma (IFN- $\gamma$ ) (IGRAS) negativas, presumiéndose que la dosis infectiva no fue suficiente o que las barreras mucosas y la inmunidad innata se encargaron de la depuración del patógeno, sin la necesidad de activar una respuesta inmune de memoria (O'Garra *et al.*, 2013). Otra posibilidad incluye aquellos individuos que se infectan pero logran la erradicación estéril de la infección, lo cual se propone comprobar mediante la reversión a la negatividad de pruebas TST e IGRA en individuos previamente expuestos a MTB y con resultados de dichas pruebas inicialmente positivos (Ewer *et al.*, 2006). Entre aquellos individuos expuestos a MTB que desarrollan una infección latente también se propone reconocer varios subgrupos; aquellos que logran contener la enfermedad, con TST e IGRA negativos, adjudicando dicha contención a una respuesta inmunológica localizada y no detectable a nivel sistémico y aquellos individuos que se encuentran con TB latente con respuestas de memoria sistémicas y detectables mediante TST e IGRA positivos. Estos grupos se pueden encontrar en constante recambio entre estos dos estados, pudiendo progresar de la contención a la latencia y revertir de la latencia a la contención constantemente (O'Garra *et al.*, 2013).

### **2.5. Tuberculosis primaria y secundaria**

En base a su patrón de aparición, la tuberculosis se divide en dos categorías. La tuberculosis primaria es aquella que se desarrolla posterior a la primera exposición al microorganismo. Por otra parte, la tuberculosis secundaria aparece en algún periodo de tiempo después de la primoinfección, estos casos en su mayoría son debidos a reactivaciones endógenas de la infección primaria, sin embargo la exposición a microorganismos exógenos puede

precipitar el desarrollo de la tuberculosis secundaria. Estos últimos casos siempre se manifiestan como enfermedad activa (Rubin, 2006).

### **2.6. Patogenia de la TB pulmonar**

#### **2.6.1. Etapa temprana**

La patogenia de la enfermedad inicia con la exposición del tracto respiratorio a los bacilos de MTB. Dicha exposición ocurre tradicionalmente mediante la expectoración por parte de un paciente enfermo de TB de pequeñas gotas que viajan en el aire conteniendo a los bacilos, hasta ser inhaladas por otra persona que puede o no estar infectada. El tamaño pequeño (2-10  $\mu\text{m}$ ) de estos bacilos facilita su depósito en los alvéolos del parénquima pulmonar (Rubin, 2006). Una vez albergado en el parénquima pulmonar se inicia la etapa temprana de la infección, caracterizada histológicamente por infiltrado inflamatorio, predominantemente macrófagos y linfocitos, en el intersticio alveolo-capilar, alrededor de vénulas y bronquios (Hernández-Pando *et al.*, 1996). Los macrófagos alveolares se encargan de fagocitar a los bacilos, procediendo a su eliminación mediante diversas vías (Stokes & Waddell 2009). Uno de los mecanismos más estudiados en función a los mecanismos micobactericidas de los macrófagos es la producción de RNI, intermediarios reactivos de nitrógeno, por medio de la vía dependiente de la sintasa de óxido nítrico 2 (Flynn & Chan 2003). El NO producido contribuye en la producción de peroxinitrilos, los cuales al asociarse a proteínas de la bacteria producen cambios conformacionales irreversibles que en última instancia llevan a la muerte de ésta. El papel del NO para la eliminación de MTB en macrófagos humanos continua siendo un tema controversial, sin embargo no puede aún descartarse por completo su participación (Stokes & Waddell 2009). Los macrófagos también logran eliminar a MTB mediante la fusión de los fagosomas que contienen a las bacterias con los lisosomas presentes en el macrófago donde se encuentran enzimas y un microambiente capaces de degradar a las bacterias (Abramovitch *et al.*, 2011).

#### **2.6.2. Latencia y reactivación**

A pesar de estos elegantes sistemas de defensa, muchas bacterias logran escapar la muerte mediante mecanismos tales como el arresto de la fusión

fago-lisosomal, o inhibiendo la activación de iNOS. De esta manera las bacterias permanecen vivas dentro de los macrófagos, por lo general en un estado metabólico alterado y una baja tasa replicativa (Flynn & Chan, 2003), creando de esta manera una infección latente que puede permanecer asintomática por largos periodos de tiempo. El término latencia fue acuñado por el Dr. Clemens von Pirquet, famoso pediatra creador de la prueba de tuberculina que observó que en algunos casos los pacientes presentaban reactividad a esta prueba, sin presentar sintomatología de tuberculosis activa (Druszczynska *et al.*, 2012). Entre los factores que inducen la latencia de los bacilos se encuentran: la hipoxia, la deficiencia de nutrientes o un pH ácido. Defectos en la inmunidad mediada por células, la desnutrición, la quimioterapia o la administración de esteroides pueden contribuir al proceso de reactivación (Druszczynska *et al.*, 2012). En estos casos, la reactivación de las bacterias en estado de latencia puede llevar a una enfermedad activa que despliega toda la sintomatología tradicional de la TB, la cual incluye tos crónica (más de 2 semanas de duración), expectoración, pérdida de apetito, pérdida de peso, fiebre, sudoración nocturna y hemoptisis (Zumla *et al.*, 2013).

### **2.6.3. Granulomas**

Los granulomas son estructuras generadas por un tipo de inflamación que suele ser característica, más no exclusiva, de las infecciones por bacterias del complejo de MTB (Harding *et al.*, 2011). Histopatológicamente, en los granulomas se observan un centro de macrófagos infectados, rodeados por macrófagos espumosos y células epiteloideas, así como células gigantes multinucleadas. Todas organizadas en estructuras ovoides con límites definidos (Kim *et al.*, 2010). Los centros de los granulomas generalmente se constituyen por restos necróticos de macrófagos que previamente fagocitaron a las micobacterias. La baja tensión de oxígeno, el pH ácido y la escasez de nutrientes son algunos de los aspectos muy característicos del microambiente que se encuentra en los granulomas formados para contener a las bacterias (Druszczynska *et al.*, 2012). Es así como los granulomas son, paradójicamente tanto estructuras de contención, como nichos que albergan bacterias que a pesar de estar en latencia, continúan siendo viables y capaces de producir

enfermedad activa en momentos de inmunocompromiso por parte del huésped (Harding *et al.*, 2011).

### 3. TRATAMIENTO

#### 3.1. Tratamiento de primera línea

En aquellos pacientes que progresan hacia una enfermedad activa se requiere la administración de múltiples fármacos para lograr la remisión de la enfermedad la cual, a pesar de no llegar a una erradicación estéril del microorganismo, si logra cuando es administrada de manera responsable y prolongada la mejoría del paciente y la erradicación de la sintomatología (Glickman & Jacobs, 2001). La intervención quimioterapéutica consiste, actualmente, en la Terapia Acortada Estrictamente Supervisada (DOTS por sus siglas en Inglés) durante la cual se administran cuatro fármacos de primera línea: Isoniazida, Rifampicina, Pirazinamida y Etambutol (**Tabla 1**). Durante la fase intensiva se administra diario de lunes a sábado por 10 semanas hasta completar 60 dosis: Rifampicina (600 mg), Isoniazida (300mg), Pirazinamida (1,500-2000 mg) y Etambutol (1,200 mg). Posteriormente, inicia la fase de sostén, durante la cual se administra una dosis 3 veces por semana (lunes, miércoles y viernes) durante 15 semanas hasta completar 45 dosis: Isoniazida (800 mg) y Rifampicina (600mg) (Guía de Práctica Clínica, 2009).

A pesar de la efectividad de estos fármacos en pacientes con primoinfección que llevan su terapia de manera oportuna y responsable, existen en la actualidad numerosos problemas que conllevan el fallo en el tratamiento. Entre los más importantes se encuentran el incumplimiento por parte del paciente, un seguimiento inadecuado por parte de los servicios de salud y el aumento en la proliferación de cepas que presentan resistencia a los fármacos de primera línea. También, en este rubro es importante mencionar que los fármacos que se utilizan comúnmente en contra de MTB atacan de manera preferencial a bacterias con un metabolismo activo y de esta forma las bacterias que logran entrar en latencia pueden escapar el curso de la farmacoterapia y reactivarse en otro momento durante la vida del individuo infectado (Russell *et al.*, 2010). La TB latente se puede diagnosticar mediante marcadores inmunológicos tales

como la PPD o las pruebas de IGRA. En pacientes con positividad en estas pruebas se puede administrar una monoterapia con isoniazida por 6-9 meses, o de manera alternativa rifampicina por 4 meses o rifampicina combinada con pirazinamida por 2 meses (Druszczynska *et al.*, 2012).

**Tabla 1. Tratamiento de TBP drogossensible.**

Fármacos	Presentación	Dosis diaria			Dosis intermitente		Reacciones adversas
		Niños mg/kg de peso	Adultos mg/kg de peso	Dosis máxima por día	Niños mg/kg de peso	Adultos mg/kg de peso	
Isoniazida	Comp. 100 mg	5-10	5-10	300	15-20 mg	600-800 mg	Neuropatía periférica hepática
Rifampicina	Caps. 300 mg Jarabe 100 mg/5mL	15	10	600	15-20 mg	600 mg	Hepatitis Hipersensibilidad
Pirazinamida	Comp. 500 mg	25-30	20-30	1.5-2 gr	50 mg	2.5 gr	Hepatitis
Estreptomina (a) (b) (c)	Fco. Ampolletas 1 gr	25-30	15	1 gr	20 mg	1 gr	Hipoacusia Vértigo Dermatosis
Etambutol (d)	Comp. 400 mg	20-30	15-25	1.2 gr	50 mg	2.4 gr	Alteraciones visuales

Esquema de administración de fármacos anti-tuberculosis de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana de tuberculosis NOM-066-SSA2-1993 "Para la prevención y control de la tuberculosis en la atención primaria a la salud"

- (a) 3 veces por semana según la tabla de referencia
- (b) Enfermos menores de 50 Kg de peso y mayores de 50 años, mitad de la dosis.
- (c) No utilizar durante el embarazo
- (d) En niños menores de 8 años debe ser usado con precaución, ocasionalmente se puede asociar a neuritis óptica.

### 3.2. Tratamiento en casos MDR y XDR

Se estima que en el 2012 existían 450,000 casos de TB MDR, de los cuales más del 50% se encontraban en India, China y Russia (OMS, 2013). De estos pacientes, tres cuartos no habían recibido tratamiento previo, por lo cual se asume que su cepa infectante ya había adquirido previamente la resistencia a los fármacos (Nathanson *et al.*, 2010). En estos casos el esquema de tratamiento se basa en el criterio del médico tratante, sin embargo la OMS recomienda que se usen 4 fármacos en conjunto, los cuales pueden incluir un agente de primera línea, un aminoglucósido, una fluoroquinolona, y por último algún fármaco oral que actúe como bacterioestático de segunda línea, por ejemplo la etionamida (WHO, 2009)

### 4. RESPUESTA INMUNE A LA TUBERCULOSIS

Por mucho tiempo los macrófagos alveolares han sido considerados como una de las principales líneas de defensa celular al interactuar con los bacilos, y sin lugar a duda su papel en la inmunopatología de la enfermedad es crucial. A pesar de esto cada día existe mayor evidencia con respecto a la importancia de otras poblaciones celulares en este proceso patológico, tales como los neutrófilos, las células cebadas y las células dendríticas, entre otras (Palomino *et al.*, 2007).

#### 4.1. Sistema inmune innato

El sistema inmune innato comprende las células y los mecanismos que actúan como la primera línea de defensa contra los patógenos. Entre sus características más destacadas se encuentra la ausencia de memoria a largo plazo en contra de microorganismos específicos. Las funciones desarrolladas por el sistema inmune innato incluyen el reclutamiento celular al sitio de infección, la eliminación de microorganismos patógenos, la producción de citocinas, activación del complemento, presentación antigénica y cooperación con el sistema inmune adaptativo, y el actuar como una barrera física y en ocasiones química ante el ingreso de microorganismos patógenos a nuestros sistemas. El estudio de estos mecanismos efectores en torno a la TB han llevado a la conclusión que el sistema inmune innato constituye un pilar elemental para la protección contra esta enfermedad. Las células epiteliales representan la primera barrera en contra de la infección por MTB, al ser anatómicamente las primeras en estar expuestas al bacilo en el tracto respiratorio. A pesar de que su papel en la inmunopatología de la enfermedad ha sido menos estudiado que en otras poblaciones celulares, se ha observado que estas son capaces de producir IL-8 así como NO, los cuales ayudan a establecer un ambiente proinflamatorio en el sitio de infección, crucial para la contención de la enfermedad. Los neutrófilos son de las primeras células atraídas al sitio de infección y además de tener mecanismos microbicidas, estas células son capaces de producir quimiocinas que aumentan el reclutamiento celular y contribuyen a la formación de los granulomas, además de transferir moléculas microbicidas a macrófagos vecinos, cooperando así en

la eliminación de las bacterias fagocitadas por estas células. Las células dendríticas, presentadoras profesionales, cumplen su papel mediante el reconocimiento, la captura y el procesamiento de antígenos para su presentación en el contexto del MHC. La endocitosis de MTB por parte de estas células se produce a través de receptores tales como el DC-SIGN (molécula no integrina de adhesión intercelular específica de células dendríticas), el cual interactúa con el Lipoarabinomano presente en la pared celular de la bacteria. Una vez internalizado y procesado, el antígeno se presenta en la superficie de la célula dendrítica, la cual puede ahora migrar a los nódulos linfáticos para activar células del sistema inmune adaptativo y generar una cascada de activación celular. Otra población celular crucial en la inmunidad innata contra MTB son los macrófagos alveolares, los cuales fagocitan y eliminan a las bacterias mediante diversos mecanismos expuestos previamente, incluyendo la producción de ROS, la degradación en lisosomas e incluso la muerte por apoptosis de la célula infectada. También sumamente importantes para la respuesta inmune innata son las células Natural Killer (NK). Estas producen IFN- $\gamma$  el cual ayuda a la activación de macrófagos, al mismo tiempo que por tener actividad citotóxica pueden por ellas mismas contribuir en la eliminación de las micobacterias mediante la eliminación de macrófagos infectados con MTB.

### **4.2. Sistema inmune adaptativo**

La respuesta inmune adaptativa es aquella que es capaz de reconocer y eliminar selectivamente moléculas y microorganismos específicos. La respuesta inmune adaptativa tiene cuatro atributos característicos: es inducible, específica, transferible y posee memoria la cual puede persistir en un individuo por largos periodos de tiempo. El estudio de la respuesta adaptativa en el contexto de infecciones por MTB ha sido amplio, en especial el papel de los linfocitos T, cuya contribución a la contención de la enfermedad es contundente, como se puede observar en individuos con deficiencias en dicha población celular, por ejemplo pacientes con Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), en quienes el riesgo de reactivación de tuberculosis latente y de muerte por dicha infección es mucho mayor. Es evidente, por lo tanto, la gran importancia de la inmunidad mediada por células en el control de la TB, la

cual inicia con la participación de los linfocitos T CD4+ tipo 1(Th1). Estas células se encargan de producir IFN- $\gamma$ , el cual es de crucial importancia para la activación de los macrófagos. A su vez, los macrófagos activados producen IL-1, la cual estimula la producción de IL-2 por parte de los linfocitos Th1. La IL-2 es una citocina importante en la inducción de la proliferación celular linfocitaria, creando así un círculo de retroalimentación en donde la mayor producción de IL-1 por parte de los macrófagos activados ayudará a generar una población linfocitaria más cuantiosa, la cual al producir IFN- $\gamma$  continuará activando a los macrófagos y así sucesivamente. La activación de macrófagos como se menciona en las secciones previas es fundamental para la eliminación de las bacterias por parte de esta población celular. Ligado a esta activación celular se encuentra la formación de granulomas, estructuras características, más no exclusivas, de tejido infectado por MTB. Los granulomas son realmente un tipo de inflamación crónica que es la consecuencia de la presencia de material poco biodegradable en tejidos del cuerpo, como es el caso de las paredes ricas en lipidos de las micobacterias. Al no tener la capacidad para eliminar este material, los linfocitos T y los macrófagos se agrupan alrededor del mismo, formando estructuras esféricas u ovoides que generalmente se caracterizan por tener una gran capa de linfocitos T rodeando un núcleo necrótico, estos linfocitos a su vez se encuentran contenidos mediante una última capa de macrófagos y fibroblastos, formando así un arreglo de tejido de contención para las micobacterias que se encuentran en el centro, el cual las priva de altas concentraciones de oxígeno y nutrientes, ambos necesarios para el óptimo funcionamiento de la célula bacteriana. Es de esta forma cómo muchos bacilos de MTB son inducidos a disminuir sus tasas metabólicas y entrar en periodos variables de latencia, caracterizados entre otras cosas, por una drástica disminución en la tasa de replicación de la bacteria, la cual es inducida a permanecer en este estado hasta que la integridad del granuloma se ve interrumpida, generalmente por procesos de inmunosupresión, causando la reactivación de las células bacterianas y en algunos casos, de la enfermedad.

A pesar de que en la mayoría de los individuos sanos el sistema inmune logra coordinar este fino balance entre células y citocinas para la contención de la enfermedad, existen casos en los cuales dicha función se ve alterada y da paso



a los procesos inmunopatológicos inducidos por la infección con MTB. En estos casos, puede existir un aumento de los linfocitos Th2, los cuales producen en gran cantidad citocinas tales como IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13, las cuales median procesos como la inducción de la diferenciación de linfocitos B productores de anticuerpos, además de antagonizar a las células Th1, interfiriendo de esta manera en la contención de la infección y facilitando la progresión a la enfermedad. A partir de lo anterior podemos concluir que la contención de la enfermedad por MTB depende de un exquisito balance mediado por el sistema inmunológico, donde la regulación de los procesos inflamatorios/antiinflamatorios marcará en gran parte la resolución de la infección. A pesar de esto, las interacciones entre diversos factores secretados por los linfocitos Th1 y Th2 aún no se conocen por completo y es frecuente ver que cambien su comportamiento en función de la inflamación, dependiendo de factores tales como su concentración o el microambiente en el que se encuentran. Tal es el caso del TNF- $\alpha$ , el cual al ser liberado en un microambiente de predominio Th1 actúa como un activador de macrófagos, colaborando así a la formación de granulomas y por lo tanto a la contención de la bacteria. Sin embargo, la liberación de TNF- $\alpha$  en un microambiente con una combinación de citocinas Th1 y Th2 produce daño tisular extenso caracterizado por necrosis y anergia de la respuesta mediada por células.

Como podemos observar el curso de la infección se encuentra determinado por un complejo arreglo multifactorial. Otro factor importante que puede alterar la respuesta del sistema inmune frente a la infección por MTB depende de las cepas infectantes, las cuales suelen presentar diferencias tanto en inmunogenicidad como en patogenicidad. En estudios previos se ha determinado que ambos factores juegan un papel de suma importancia tanto en la virulencia de la cepa como en su transmisibilidad a huéspedes vírgenes. Se ha encontrado que algunos fenotipos de MTB no logran inducir una respuesta inmune protectora, y presentan un retraso importante en la producción de IFN- $\gamma$  y una expresión rápida y elevada de IL-4. Este microambiente es favorable para el crecimiento bacteriano y de esta forma las bacterias presentan en el modelo murino de TB una elevada virulencia (Marquina-Castillo *et al.*, 2008).

### **5. *Mycobacterium tuberculosis***

#### **5.1. Orígenes**

El origen del género *Mycobacterium* data, presuntamente, de hace más de 150 millones de años y los progenitores más tempranos de MTB se hicieron presentes en el Este de África desde hace cerca de 3 millones de años (Daniel, 2006). La tuberculosis es una enfermedad ancestral, el origen de la infección en humanos se ha asociado previamente a la transición demográfica del periodo Neolítico, colocándola como una de las infecciones más tempranas conocidas en el hombre. Estudios recientes de genómica sugieren un surgimiento de este como patógeno en el hombre muy temprano, hace aproximadamente 70,000 años, acompañando al hombre en sus procesos de emigración desde África, y de esta manera expandiéndose de forma global (Comas *et al.*, 2013). Los primeros casos de tuberculosis fueron documentados desde hace más de 5,000 años en Egipto. Incluso, se han encontrado cuerpos momificados que presentan anomalías esqueléticas típicas de la tuberculosis ósea (Daniel, 2006).

#### **5.2. Características fenotípicas**

##### **5.2.1. Clasificación y generalidades**

Las bacterias del género *Mycobacterium* son bacilos aerobios, inmóviles y no esporulados que pertenecen a la familia Mycobacteriaceae, de la suborden Corynebacterineae, orden Actinomycetales, filo Actinobacterias del reino Monera (Palomino *et al.*, 2007). Entre las características de las micobacterias se encuentra el alto contenido en ácidos micólicos de la envoltura celular. Este alto contenido lipídico le confiere a la bacteria una alta resistencia para ser teñida con las técnicas tradicionales de tinción celular, como por ejemplo la tinción Gram. Estas bacterias, conocidas también como bacilos “ácido-alcohol resistentes”, se logran teñir mediante la técnica de Ziehl-Neelsen con colorantes de arilmetano, como la fuschina carbol, y una vez teñidas escapan la decoloración con soluciones de ácido-alcohol. Es también mediante esta densa capa de lípidos, los lípidos constituyen más de la mitad del peso seco de la bacteria, que ésta logra escapar gran parte del daño causado por

antibióticos, especialmente cuando estos se encuentran en concentraciones subóptimas (Palomino et al., 2007).

### **5.2.2. Morfología**

Respecto a su morfología, los bacilos se observan como rectos o ligeramente curvados al ser teñidos mediante la técnica de Ziehl-Neelsen y observados al microscopio de luz. Su longitud varía entre 1-10  $\mu\text{m}$ , mientras que su anchura va de 0.2-0.6  $\mu\text{m}$ . Usando un microscopio electrónico se pueden observar algunos gránulos dentro de las células, los cuales se piensa podrían ser el sitio donde ocurren las reacciones de óxido-reducción que le proporcionan a la célula la energía que requiere (Palomino et al., 2007).

### **5.2.3. Envoltura celular**

Como se comentó previamente, la característica anatómica más distintiva de las micobacterias es su envoltura celular, la cual consta de una membrana plasmática, una pared celular y una membrana capsular externa. La membrana citoplásmica provee protección osmótica y regula el tráfico de solutos entre el citoplasma y el medio ambiente. La pared celular que rodea la membrana protege los contenidos celulares y provee soporte mecánico, dando la forma característica de esta bacteria. Entre los procariontes, la pared celular de las micobacterias es única, al estar compuesta por una capa de peptidoglicanos que presenta una elevada cantidad de enlaces cruzados (70-80%). Un polisacárido ramificado, el arabinogalactano, se encuentra unido de manera covalente al peptidoglicano. Las ramificaciones exteriores de este polisacárido se encuentran esterificadas con ácidos micólicos, que son ácidos grasos de alto peso molecular específicos de MTB. La capa exterior de la pared celular presenta un arreglo de lípidos que incluyen glucolípidos fenólicos (PGL), sulfolípidos, phitocerol dimicoseratos (PDIM) y glucolípidos que contienen trehalosa. La importancia de estos numerosos lípidos se puede observar en bacterias que crecen en condiciones que interfieren con la síntesis de la pared celular, en estos casos Mtb se ve forzada a producir esferoblastos deficientes de pared celular que aparentemente no son patógenos, a menos que reviertan a ser bacterias normales con las características previamente mencionadas de su pared celular (Palomino et al., 2007).

### **5.2.4. Factor cordón**

Existen dos peculiaridades que distinguen a MTB de otras micobacterias avirulentas: la formación de grumos hidrofóbicos conocida como “acordonamiento” y la formación de colonias grumosas. Ambas características se le atribuyen al dimicolato 6,6`-trehalosa (TDM), también conocido como “factor cordón”, mediante el cual este microorganismo logra moldear una interfase hidrofóbica que le da las características previamente mencionadas de agrupamiento y formación de colonias. Además de esta interfase hidrofóbica, el empaquetamiento de los ácidos micólicos de la pared de las bacterias confiere a la célula bacteriana una impermeabilidad excepcional y su consecuente protección a las sustancias dañinas del medio ambiente. Aunado a esto, fuera de la capa lipídica se encuentra una capa de carbohidratos y proteínas que impiden la difusión de moléculas de gran tamaño (Palomino et al., 2007).

### **5.2.5. Bioquímica**

Los bacilos son células fototrófas y heterótrofas. Tienen la capacidad de metabolizar el glicerol para formar piruvato, el cual al ser oxidado provee a la célula con la energía necesaria para su metabolismo. Es dependiente del suministro de hierro y magnesio y requiere oxígeno como aceptor final de electrones en la cadena respiratoria. Su crecimiento óptimo se da a 37°C, en un pH neutral con 5-10% de CO<sub>2</sub>. Las células se dividen en un periodo de 12-24 horas, si se encuentran en condiciones óptimas de crecimiento. Esta tasa de crecimiento tan lenta, en comparación con otras bacterias, se ha adjudicado al hecho que la impermeabilidad relativa de la pared celular limita en gran medida la adquisición de nutrientes (Palomino et al., 2007).

### **5.3. Características genóticas**

En 1998 Cole y colaboradores publicaron la secuencia del genoma de la cepa H37Rv de MTB. En la descripción genética se observa un genoma de 4,411,532 pares de bases, con 3,959 genes que codifican para proteínas. Se han descrito 2441 genes con funciones conocidas y 912 que se conservan hipotéticos (Kaufmann, 2001). A partir de estos estudios se ha descubierto que

el 10% del genoma de MTB codifica proteínas ácidas ricas en glicina, las cuales comparten una secuencia amino termina, (Pro-Glu), pero presentan variación en el segmento carboxy-terminal. Estas familias de proteínas probablemente actúen para causar variación antigénica en este patógeno, ayudando de esta manera a evadir al sistema inmune. Otra probable función es la de imposibilitar el procesamiento antigénico, esto pensado a partir de la similitud de la familia de proteínas Pro-Glu con los antígenos nucleares del Virus Epstein-Barr, los cuales en este virus impiden la generación de péptidos por proteosomas, para el procesamiento del complejo principal de histocompatibilidad por parte de las células T (Glickman & Jacobs, 2001).

## **6. VACUNACIÓN CON BCG**

### **6.1. Surgimiento de la BCG**

La vacuna BCG, "*Bacille Calmette-Guérin*" se comenzó a emplear hace casi un siglo, en 1921. Fue desarrollada por Albert Calmette y Camille Guerin, quienes tomaron una cepa virulenta de *M. bovis* a partir de un caso de mastitis bovina, logrando atenuarla mediante pases consecutivos por medios de cultivo en el Instituto Pasteur. Su primer uso ocurrió en un recién nacido cuya madre había muerto de tuberculosis, el niño logró sobrevivir después de haber recibido la vacuna. A partir de este momento histórico y hasta la fecha, la BCG es la vacuna más empleada por la humanidad, con más de 3,000 millones de humanos inmunizados a la fecha (Liu *et al.*, 2009).

### **6.2. Distribución y preparación**

En 1924 comenzó la distribución de la vacuna BCG, conformada por microorganismos vivos atenuados, desde el Instituto Pasteur a diversos laboratorios alrededor del mundo. Para 1927 la vacuna se había distribuido a 50 países, sin embargo nunca se establecieron criterios estrictos para el crecimiento de la vacuna, ya que esta, al estar compuesta de microorganismos vivos, requería transferencia a medio fresco, siendo común que diversos laboratorios usaran medios distintos (medio Sauton, medio de papa) (Liu *et al.*, 2009). A pesar de los esfuerzos que se iniciaron para estandarizar el crecimiento y la preparación de la vacuna, cada laboratorio desarrolló sus

condiciones para realizar estos pases de medio, creando una gran heterogeneidad en el cuidado y crecimiento de la cepa parental (Liu *et al.*, 2009).

### **6.3. Atenuación de las subcepas de BCG**

Mucho dista la BCG que utilizamos en la actualidad de la cepa inicial que obtuvieron Calmette y Guérin. Esta cepa parental, denominada “lait Nocard”, correspondía a una cepa altamente virulenta que, al ser pasada por medio sufrió importantes cambios, uno de los más notorios fue la pérdida de la región RD1, región genética que es común de todas las micobacterias virulentas, pero que se encuentra ausente en todas las BCG. El proceso de atenuación de la BCG no se detuvo con este paso inicial. Es importante resaltar que la BCG engloba un gran número de subcepas, o cepas hijas, que se originaron a partir de los diferentes laboratorios a los cuales fueron inicialmente distribuidas, llevando, generalmente, el nombre del lugar del que provienen. Tal es el caso de la BCG Japon, BCG Danesa y la BCG Phipps (Philadelphia). Muchas de estas cepas hijas han ido perdiendo regiones inmunogénicas a través del tiempo, tales como la MPB64, un antígeno protéico, o diversos componentes de la pared celular bacteriana que son importantes para una estimulación adecuada del sistema inmunológico. En la década de 1970 la diferencia entre la protección conferida en diversas regiones del mundo era notoria a nivel epidemiológico, estudios subsecuentes realizados por la OMS comparando algunas características bioquímicas de 12 subcepas de BCG encontraron diferencias importantes entre ellas (Liu *et al.*, 2009).

#### **6.3.1. Consecuencias de la atenuación de las subcepas de BCG**

Las implicaciones de que una cepa vacunal perdiera su virulencia eran conocidas y se resumen en las conclusiones a las que llegó el científico, Rene Dubos: “no hay duda de que la inmunidad es una expresión de la capacidad de la BCG para multiplicarse en el cuerpo de un individuo vacunado. La inmunidad es confiable y duradera si el cultivo de BCG es altamente invasivo, mientras que esta inmunidad es débil y transitoria si el cultivo de BCG se ha vuelto muy atenuado”. Las implicaciones de esta observación a nivel epidemiológico son importantes, por ejemplo en las regiones que utilizan BCG que han sido sobre

atenuadas a través del tiempo podrían no estarse generando en la población respuestas inmunológicas lo suficientemente vigorosas para perdurar a través del tiempo por lo tanto esto podría explicar el hecho de que la BCG tenga tasas de protección tan divergentes alrededor del mundo (Liu *et al.*, 2009).

### **6.4. Eficacia de la BCG**

La eficacia de la vacunación con BCG para la protección contra la tuberculosis pulmonar (TBP), que representa la presentación más frecuente de la tuberculosis, varía entre el 0% en regiones como el sur de la India, y el 75% en Gran Bretaña (Druszczynska *et al.*, 2012). La tasa de protección global se estima en 50% (Zumla *et al.*, 2013).

#### **6.4.1. Divergencia en tasas de protección**

Diversas teorías han intentado explicar esta diferencia abismal entre las tasas de protección, entre las cuales se encuentran: diferencias en las vacunas usadas, la interacción de la BCG con micobacterias saprófitas, diferencias genéticas y nutricionales en las poblaciones estudiadas y diferencias en las metodologías usadas en los diversos ensayos. A pesar de esto, es imposible ignorar la falta de protección conferida por la BCG en algunas regiones del mundo donde la tuberculosis continua siendo endémica (Abebe & Bjune, 2006). Otra hipótesis que ha cobrado fuerza recientemente propone que la deficiencia en la protección con la BCG se debe a la combinación de un subgrupo poblacional que no logra montar una respuesta inmune protectora y al hecho de que la BCG confiere protección contra algunas, pero no todas las cepas de MTB (Abebe & Bjune, 2006). A pesar de esto, países como Turquía informan que la vacunación con BCG no solo protege contra la aparición de la enfermedad, sino también contra la infección por MTB (Soysal *et al.*, 2005).

#### **6.4.2. Uso actual de la BCG**

A pesar de sus deficiencias, la BCG continua siendo la única vacuna aprobada por la OMS (Organización Mundial de la Salud) como vacuna profiláctica contra la TB. Esto principalmente se debe a la gran protección que esta vacuna confiere contra las formas graves de tuberculosis en niños (Russell *et al.*,

2010). Aunado a esto, se ha observado que una respuesta inmune preexistente específica contra MTB logra que la progresión hacia la contención de la enfermedad sea más pronta y que la carga bacteriana sea menor (Russell *et al.*, 2010). Sin embargo, es imposible ignorar que la BCG tiene grandes deficiencias especialmente en regiones del mundo donde la TB aun continúa siendo un problema de salud pública, dando como consecuencia el panorama mundial de la TB como enfermedad reemergente que vivimos hoy en día.

### **7. GENOTIPO BEIJING**

#### **7.1. Características**

El linaje Beijing inicialmente fue descrito en 1995, por lo cual se conoce como parte del linaje moderno de MTB. Se caracteriza por su patrón de spoligotyping, que es la ausencia de espaciadores del 1-33 y la presencia de espaciadores del 34-43, además de contar con la presencia de una copia invertida de IS6110 dentro de la región DR, un elemento IS6110 en un sitio particular de inserción (dentro del origen de replicación) y una o dos copias de IS6110 en una región de DNA llamada NTF (Palomino *et al.*, 2007).

#### **7.2. Origen**

La familia de cepas Beijing se origina en China y posteriormente se distribuye a países vecinos. El hecho de que la vacunación masiva con BCG sea un factor común en los países del Sureste de Asia ha llevado a plantear la hipótesis de que la BCG podría actuar como una fuerza de selección que ha favorecido cambios genéticos y fenotípicos los cuales han contribuido a la propagación de estas cepas (Abebe & Bjune, 2006).

#### **7.3. Clasificación y prevalencia**

Las cepas que forman parte de este linaje se dividen en dos grupos principales, basados en la inserción específica de IS6110 en la región NTF, en base a esto se clasifican como típicas o atípicas. Las cepas típicas son también conocidas como cepas “modernas” debido a que se encuentran comúnmente en pacientes jóvenes, demostrando así su transmisión reciente y activa, mientras que las cepas atípicas también se conocen como cepas “ancestrales”, ya que



se encuentran más comúnmente en pacientes adultos mayores, implicando que la transmisión pudo haberse dado tiempo atrás. Las cepas del genotipo Beijing han tomado auge recientemente debido a su alta prevalencia a nivel mundial a pesar de ser cepas relativamente jóvenes, filogenéticamente hablando. En la cuarta base de datos internacional de spoligotyping se encontró que el clado Beijing representa el 50% de las cepas encontradas en el Este de Asia y 13% de los aislados a nivel mundial. Adicionalmente esta cepa continúa su propagación, como se sugiere por la edad promedio joven de los pacientes infectados con cepas Beijing (Parwati *et al.*, 2010b).

#### **7.4. Virulencia y drogorresistencia**

Los genotipos de la familia Beijing presentan, por lo general, elevada virulencia, multidrogorresistencia y alta capacidad de reinfección exógena, características que son el resultado del desarrollo de mecanismos que modulan/suprimen la respuesta inmunológica por parte del hospedero. Entre estos mecanismos se encuentran: la inhibición de la apoptosis de macrófagos infectados, así como la disminución en la producción de IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  y la elevación en niveles de IL-10 e IL-18 (Abebe & Bjune, 2006).

#### **7.5. Ventajas adaptativas del genotipo Beijing**

Mucho se ha debatido sobre los factores que pudieron haber contribuido al surgimiento mundial de este linaje de MTB. Entre los más aceptados se cree que estas cepas podrían tener ventajas intrínsecas sobre otros genotipos de MTB, tales como la evasión de la respuesta inmune suscitada por la vacunación previa con BCG (Kremer *et al.*, 2009). Algunos estudios en ratones BALB/c evidencian una menor protección de la BCG cuando los animales son infectados con cepas del genotipo Beijing (López *et al.*, 2003). Aunado a esto, en estudios de epidemiología molecular se ha demostrado una mayor proporción de aislados clínicos del genotipo Beijing típico a partir de individuos vacunados previamente con BCG en comparación con individuos sin este antecedente de vacunación. Las cepas Beijing exhiben una mayor cantidad de mutaciones en el gen KatG315, la cual confiere resistencia a isoniazida, de hecho, en general, las cepas Beijing muestran tasas de mutaciones elevadas originadas a partir de alteraciones en la maquinaria de reparación del DNA

(Parwati *et al.*, 2010b). Existen también características específicas de la estructura de la pared celular que conlleva a concentraciones intracelulares subóptimas de drogas anti-MTB, facilitando con esto la adquisición de drogoresistencia (Parwati *et al.*, 2010b). Por último la elevada virulencia que en muchas ocasiones acompaña a las cepas Beijing conlleva a infecciones más persistentes y fracaso en el tratamiento, esto a su vez prolonga la exposición del bacilo a drogas anti-MTB, aumentando así el riesgo de adquirir drogoresistencia (Parwati *et al.*, 2010b).

### **7.6. Metabolismo e inmunogenicidad**

Las cepas del genotipo Beijing también presentan importantes diferencias en su metabolismo bioquímico y su inmunogenicidad. Entre estos podemos mencionar una alta expresión de la proteína  $\alpha$ -cristalina, conocido factor de virulencia así como la disminución en la expresión de las proteínas inmunogénicas: HSP-65, proteína de 47 kDa y la proteína transportadora de fosfatos. Las cepas Beijing producen más ácido fenólico, el cual inhibe la liberación de mediadores pro-inflamatorios, y también tienen mayor expresión del gen *dosR*, regulón ligado a la capacidad de una cepa para sobrevivir dentro de los tejidos del hospedero (Parwati *et al.*, 2010b).

## **II. MECANISMOS EVOLUTIVOS DE CAMBIOS EN VIRULENCIA**

### **1. VACUNACIÓN Y EVOLUCIÓN DE VIRULENCIA**

Los efectos a largo plazo de la vacunación sobre la evolución de los microorganismos han sido ampliamente estudiados, especialmente en la evolución de su virulencia. Se ha analizado mediante complejos algoritmos matemáticos la evolución de parámetros tales como la tasa de replicación de los parásitos, demostrando matemáticamente que la vacunación puede promover la evolución de cepas que se replican de manera más rápida, y por lo tanto impactando de manera positiva sobre su virulencia (Gandon *et al.*, 2001)

### 1.1. Vacunas perfectas vs. Vacunas imperfectas

Una vacuna perfecta prevendría la infección de todos los individuos expuestos al patógeno (Ganusovi & Antia, 2006), sin embargo es ampliamente conocido que la vacunación raramente es exitosa en evitar completamente la infección y enfermedad de los organismos vacunados (Gandon *et al.*, 2001). A pesar de esto tenemos, actualmente, la posibilidad de alterar el curso natural de muchas enfermedades mediante el uso de vacunas parcialmente eficaces, o vacunas “imperfectas” (Gandon *et al.*, 2001). Éstas, a pesar de no prevenir la infección de un huésped expuesto a un patógeno, pueden resultar beneficiosas, ya sea disminuyendo la severidad de la infección o la transmisibilidad del patógeno (Ganusov & Antia, 2006). De cualquier manera, todos los tipos de vacunas promueven la evolución de una cepa con una tasa de replicación elevada en contraste con la cepa parental, la cual resulta en una elevada virulencia cuando infecta a un huésped virgen. En contraste, la infección de un huésped vacunado por parte de una cepa adaptada únicamente a huéspedes vírgenes resulta en una muy baja virulencia. Sin embargo, al observar la virulencia de una cepa surgida de la vacunación sobre un huésped ya vacunado, esta resulta más alta que la virulencia que tiene una cepa parental sobre un huésped virgen (Andre & Gandon, 2006).

### 1.2. Efectos de la cobertura poblacional de vacunación

Los estudios de modelos matemáticos han revelado que una cobertura baja de población vacunada reduce en términos generales la virulencia de los microorganismos infectantes, debido a que los huéspedes vacunados se encuentran altamente protegidos contra las cepas parentales. Por otra parte, una cobertura intermedia de población vacunada puede llevar a la existencia de dos estrategias por parte de un microorganismo: una cepa de baja virulencia adaptada a sus huéspedes vírgenes, y una cepa de elevada virulencia, más generalizada, y adaptada para infectar tanto a huéspedes vírgenes como inmunizados (Andre & Gandon, 2006). En los modelos epidemiológicos de vacunación de cobertura media surgen estas dos poblaciones: huéspedes vírgenes y huéspedes inmunizados. Las complicaciones que esto genera para huéspedes vírgenes es aparente, puesto que estos son candidatos a ser

infectados tanto por las cepas de baja virulencia inicialmente prevalentes en esta población, como por las cepas de alta virulencia que son el producto de la vacunación (Andre & Gandon, 2006). En este tipo de población, la virulencia de los microorganismos en general se eleva, debido a que la cepa proveniente de huéspedes vacunados aparece con elevada frecuencia (Andre & Gandon, 2006). En conclusión, las poblaciones que presentan cobertura media de vacunación pueden contrarrestar los beneficios obtenidos por la inmunización e incluso presentar tasas más altas de mortalidad debido a la infección de huéspedes vírgenes por parte de cepas provenientes de huéspedes vacunados.

### I. MODELO MURINO DE TB PULMONAR PROGRESIVA

Uno de los modelos que reproducen eficazmente la infección por MTB en humanos es el modelo murino. Esto se debe en gran parte a que ambos huéspedes dependen fuertemente del fino balance entre un microambiente Th1/Th2 para lograr la contención de la infección sin progresar a un daño pulmonar severo que produzca la muerte del huésped. En relación a esto desde 1996 se describió por Hernández-Pando *et al.* El modelo de infección murina por la cepa H37Rv para caracterizar el curso de la infección en cuestión a sobrevivida de los ratones, carga bacilar medida por Unidades Formadoras de Colonias (UFCs), daño histopatológico medido por porcentaje de superficie pulmonar dañada por neumonía y por último la correlación entre la cinética de citocinas Th1/Th2 con el curso de la enfermedad. En este modelo se realiza la infección por la ruta natural de transmisión en el humano al instilar vía la tráquea un número específico de bacilos vivos y virulentos de la cepa H37Rv. Mediante una cinética de sacrificio de los animales en los días 1, 3, 7, 14, 21, 28, 60 y 120 postinfección se logra dilucidar dos etapas. La primera corresponde a la etapa de protección, durante la cual la carga bacilar se mantiene baja y los animales no presentan daño por neumonía pulmonar ni eventos de mortalidad. Esta etapa se encuentra relacionada con una alta producción de citocinas de tipo Th1, principalmente IFN- $\gamma$ , las cuales producen mediante activación de diversas estirpes celulares la muerte de las bacterias. Esta etapa se observa desde el día 1 al día 21 postinfección. En segunda instancia se observa del día 28 al día 120 la etapa progresiva de la enfermedad, la cual se caracteriza por elevada carga bacilar pulmonar, intenso daño por neumonía al tejido lo cual se correlaciona con una elevada mortalidad de los ratones infectados. Esta etapa se relaciona con una disminución en la concentración de citocinas tipo Th1 para dar lugar a un aumento en la concentración de citocinas tipo Th2, las cuales en muchas instancias inactivan a las células encargadas de eliminar a las bacterias, progresando así hacia una enfermedad rápidamente progresiva y culminando en la muerte de los sujetos.

### **1. Validez de estudios hechos en ratones**

El MTB es un patógeno que infecta, preferentemente, huéspedes humanos. Es por lo tanto difícil, si no es que imposible, encontrar un modelo que reproduzca exactamente la enfermedad que se produce en humanos por parte de este microorganismo. A pesar de sus limitaciones, el modelo murino ha sido por mucho tiempo uno de los más utilizados y exitosos para ampliar nuestro conocimiento sobre la inmunopatología de esta enfermedad. En primer lugar, los humanos y ratones tienen similitudes importantes en las características principales de la respuesta inmune innata y adaptativa a las micobacterias. En este aspecto podemos citar el papel protector de los linfocitos T CD4+, y de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ . Por otra parte, el modelo murino tiene la ventaja de ser una fuente amplia de recursos genéticos, tales como varias cepas de ratones knockout para genes de interés y que tienen homología con genes en humanos. Adicionalmente existe una alta disponibilidad de reactivos inmunológicos y metodologías adaptadas al modelo murino, siendo estos por su tamaño y características de reproducción uno de los modelos de menor costo en comparación con otras especies animales. Por último, la estandarización genética en varias cepas de ratón disminuye la variación entre sujetos, obteniendo así resultados más precisos (Apt & Kramnik, 2009).

### **2. Variabilidad de la enfermedad**

Es evidente que los ratones raramente reproducirán la TB exactamente como la que se desarrolla en el humano. Esto sustentado por el hecho de que en los humanos el curso de la enfermedad por MTB es extremadamente variable, con un espectro que va desde individuos que se infectan y logran la erradicación estéril de la enfermedad (Nardell, 2006) hasta los individuos que desarrollan la patología clásica y mueren producto de la infección. Aunado a esto es importante aclarar que los conocimientos de patología de la TB pulmonar por lo general provienen de casos en los que la enfermedad ha causado el deceso de su huésped y por lo tanto se tiene acceso a realizar una autopsia en búsqueda de los procesos patológicos ocurridos en este individuo. En animales que son sacrificados previos a su deceso espontáneo no se corre el curso natural de la infección y por lo tanto raramente se logra observar la patología que en

humanos se observa a partir de autopsias. Por último, es sumamente importante señalar que como lo menciona la introducción en este mismo documento, uno de los factores determinantes del curso de la enfermedad es la cepa infectante. Es por esto que en ratones infectados con la cepa tipo de laboratorio H37Rv, raramente se reproducirán las tasas de mortalidad o complicaciones vistas en humanos, en quienes a nivel poblacional la infección se da por un sinnúmero de cepas, cada una con un determinado nivel de transmisibilidad y virulencia (Apt & Kramnik, 2009).

### **II. Cambios en virulencia derivados de la vacunación previa**

Los cambios de virulencia por vacunación en el caso específico de MTB nunca, hasta nuestro conocimiento, han sido documentados. A pesar de que existe cuantiosa evidencia tanto en modelos matemáticos como en epidemiología molecular de otros microorganismos, el efecto de la BCG sobre la virulencia de MTB continúa sin ser estudiado. El estudio que aquí presentamos surge a partir del caso de dos hermanas infectadas por una cepa de MTB del genotipo Beijing. Una de las hermanas había sido vacunada con BCG mientras que la otra no había recibido inmunización previa por esta vacuna. A partir del esputo obtenido de las hermanas, se crecieron colonias y se expandieron para infectar ratones vírgenes no inmunizados. Los resultados fueron sorprendentes en que el comportamiento de las cepas mostró diferencias importantes en cuestión de su virulencia. En este estudio se observó que la cepa que provenía de la hermana vacunada con BCG (BCG+) produjo en el modelo murino elevada mortalidad, intensa carga bacilar y extenso daño neumónico en comparación con aquellos animales que fueron infectados con la cepa proveniente de la hermana que no había sido vacunada previamente con BCG (BCG-), dicha cepa tuvo un comportamiento mucho más atenuado con una baja mortalidad, carga bacilar y daño por neumonía. A partir de este estudio (datos no publicados) se concluyó que la cepa que provenía de la hermana BCG+ sufrió cambios importantes que mediante mecanismos aún por investigar, lograron que esta elevara su virulencia de manera importante a partir de ser expuesta al sistema inmunológico altamente capacitado de la hermana vacunada. Ambas cepas (BCG + y BCG -) fueron estudiadas mediante técnicas de microarreglos

## ANTECEDENTES

---

genómicos, sin que se encontraran diferencias entre ellas, sin embargo es importante mencionar que actualmente existen técnicas de secuenciación mucho más poderosas con las cuales podrían detectarse diferencias previamente omitidas. Este estudio se realizó en el laboratorio de patología experimental del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”, utilizando el modelo murino de TB pulmonar progresiva descrito por Hernandez-Pando *et al.* 1996, sin embargo estos datos no han sido publicados.



### JUSTIFICACIÓN

La OMS continua recomendando la aplicación de la BCG de manera global en recién nacidos ya que, a pesar de existir una divergencia en las tasas de protección, esta se ha mantenido eficaz en la prevención de las formas diseminadas de tuberculosis en neonatos. En la actualidad, sin embargo, se ha vuelto imposible obviar la heterogeneidad en la eficacia de la BCG en la protección contra la tuberculosis pulmonar, su forma más frecuente.

Existen propuestas basadas en datos epidemiológicos que relacionan la vacunación global con BCG en países del sureste de Asia y el surgimiento de cepas capaces de evadir la respuesta inmunológica, como las cepas Beijing, originadas en estas regiones que aplican la BCG de manera global. A pesar de esto, no existen hasta nuestro conocimiento, estudios experimentales que evalúen de manera directa el efecto de la vacunación sobre la virulencia de *Mycobacterium tuberculosis*.

### HIPÓTESIS

La respuesta inmunológica capacitada que se produce por la vacunación con BCG ejerce una fuerza de presión adaptativa que selecciona cepas de MTB de mayor virulencia en un modelo murino de tuberculosis pulmonar progresiva.

### OBJETIVO GENERAL

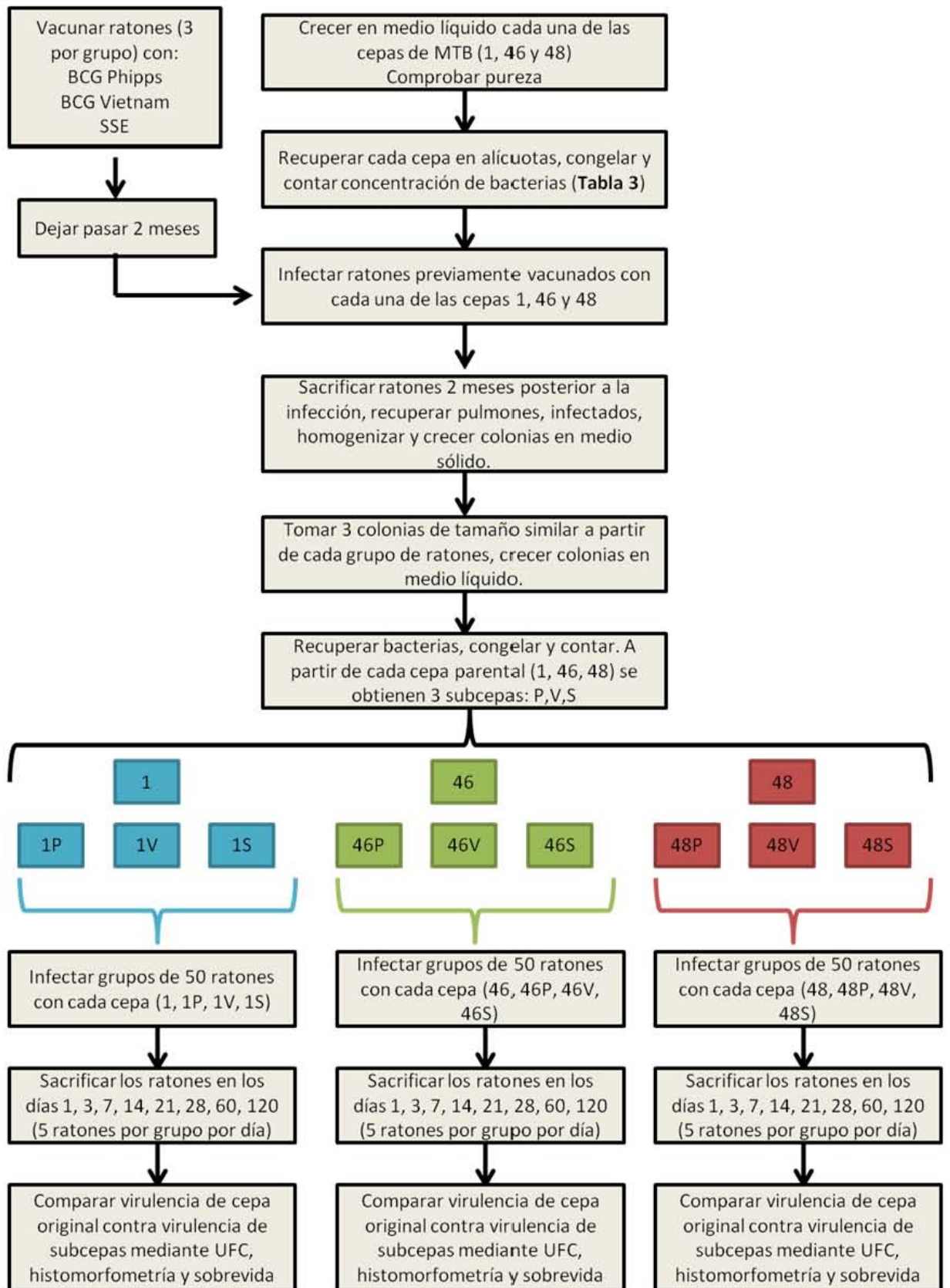
Valorar el efecto directo que ejerce la vacunación con BCG sobre la virulencia de cepas de diversos genotipos de *Mycobacterium tuberculosis*.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Obtener las subcepas de *Mycobacterium tuberculosis* resultantes de ratones vacunados con BCG y retados con aislados clínicos de *Mycobacterium tuberculosis*.
2. Comparar la virulencia de cada subcepa de *Mycobacterium tuberculosis* obtenida con su parental:
  - a. Carga bacteriana

- b. Histomorfometría
- c. Curva de sobrevida

## DISEÑO EXPERIMENTAL



## I. SELECCIÓN DE CEPAS DE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS Y CRECIMIENTO EN MEDIO DE CULTIVO

Se seleccionaron tres cepas a partir de una colección de aislados clínicos provenientes de diversas regiones del mundo. Diversos factores fueron tomados en cuenta para la selección de dichas cepas, la cepa 1 es una cepa tipo de laboratorio altamente caracterizada, mientras que las cepas 46 y 48 se seleccionaron por ser del genotipo Beijing, altamente prevalente en zonas geográficas que utilizan la vacunación global con BCG, como el Sureste de Asia. Aunado a esto, la virulencia de ambas cepas había sido previamente observada siguiendo el modelo murino de tuberculosis pulmonar progresiva. Al final del proceso se seleccionaron 3 cepas las cuales fueron asignadas los códigos que se listan en la **Tabla 2**, aunado a información relevante de cada cepa.

**Tabla 2. Cepas de *Mycobacterium tuberculosis* seleccionadas para experimentación.**

Código	Especie	Genotipo	Linaje*	País de origen	Individuos infectados
1	<i>M. tuberculosis</i>	Euro Americano	4	Estados Unidos	n/a
46	<i>M. tuberculosis</i>	Beijing	2	Vietnam	4
48	<i>M. tuberculosis</i>	Beijing	2	Sudáfrica	1

La cepa 1 corresponde a la cepa tipo de laboratorio H37Rv. \* Información sobre linajes obtenida a partir de Sarkar *et al.*, 2012.

Las cepas seleccionadas se crecieron en medio líquido Middlebrook 7H9 (Laboratorios Difco, Detroit, MI, USA) adicionado con glicerol, Tween-80 y enriquecido con ADC (albúmina, dextrosa y catalasa) a 37°C. Una botella del cultivo líquido se utilizó para determinar el crecimiento bacteriano mediante densidad óptica usando un espectrofotómetro y realizando lecturas seriadas del crecimiento bacteriano cada tercer día a 600 nm (DO<sub>600</sub>). A partir de estos datos se crearon curvas de crecimiento individuales para cada una de las cepas. Todos los cultivos se recuperaron en fase logarítmica de crecimiento bacteriano (modificado de Kremer *et al.*, 2001).

### 1. Recuperación de cepas bacterianas a partir de cultivos frescos

Brevemente, los cultivos se tomaron al alcanzar  $DO_{600}$  0.6. El líquido de cada botella de cultivo fue transferido a un tubo falcon de 50 mL y centrifugado a 3000 Revoluciones Por Minuto (RPM) durante 5 minutos. El sobrenadante se decantó y se le agregó 15 mL de PBS-Tween al 0.05% y 15 perlas de vidrio, cada tubo se agitó en el vórtex a velocidad máxima por un minuto, se dejó reposar por un minuto y se repitió la agitación por un total de 5 veces (modificado de Bergmann *et al.*, 2000). Cada tubo se centrifugó a 1500 RPM durante 5 minutos, se decantó el sobrenadante en un nuevo tubo falcon al cual se le agregó PBS hasta aforar a 45 mL. Se centrifugó este tubo a 2500 RPM, se decantó el sobrenadante dejando solo el botón de bacterias en el fondo del tubo, este botón se suspendió en 10 mL de solución salina estéril (SSE) y se agitó durante 1 minuto, posteriormente se distribuyó en alícuotas de 1 mL y se congeló a  $-80^{\circ}$  hasta su uso (modificado de Kremer *et al.*, 2001).

### 2. Conteo de bacterias para infección de ratones

Se tomó una alícuota al azar y se descongeló hasta que la muestra estaba completamente líquida. Se agitó el frasquito en el vórtex a velocidad máxima por un minuto, posteriormente se hicieron diluciones seriadas de la muestra hasta tener 6 diluciones progresivamente decrecientes. Cada dilución se sembró por triplicado en cajas de medio sólido agar 7H10 adicionado con OADC y se incubaron a  $37^{\circ}C$  con 5% de  $CO_2$  durante 21 días, al día 21 postincubación se contaron las colonias crecidas en cada dilución y se ajustó el número de bacterias presentes por mL de concentrado para realizar diluciones de 250,000 bacterias vivas por 100  $\mu L$  de SSE para administrar a ratones por vía intratraqueal (modificado de Hernández-Pando *et al.*, 1996).

**Tabla 3. Cálculos de concentración de bacterias.**

Dilución	Concentrado	-1	-2	-3	-4	-5	-6
Factor de multiplicación	10	100	1000	$1.0 \times 10^4$	$1.0 \times 10^5$	$1.0 \times 10^6$	$1.0 \times 10^7$

Factor de multiplicación para ajustar concentraciones de bacterias por 100  $\mu L$  dependiendo de cada dilución.

A partir del dato previo se conoce la cantidad de bacterias por cada 100  $\mu$ L de solución. Este valor se multiplica por 10 para conocer la cantidad de bacterias por mililitro de solución (representado por la letra “y”) y poder así obtener la cantidad deseada para la infección. A cada ratón se le administraron 250,000 bacterias, por lo tanto si se van a infectar grupos de 60 ratones se requieren  $(250,000 \times 60) = 15.0 \times 10^6$  bacterias diluidas en un volumen de 6 mL (para administrar 100  $\mu$ L de solución a cada ratón). El ajuste por lo tanto se hace mediante la siguiente operación matemática de productos cruzados:

$$\frac{1 \text{ ml}}{y} = \frac{x}{15 \cdot 10^6}$$

Donde “x” será igual a los mL de concentrado bacteriano que tendrán que ser aforados a 6 mL usando SSE, para dar una solución que contenga 250,000 bacterias por cada 100  $\mu$ L de SSE.

## **II. VALORACIÓN DE VIRULENCIA DE LAS CEPAS EN EL MODELO EXPERIMENTAL DE TUBERCULOSIS PULMONAR PROGRESIVA EN RATONES BALB/c**

Grupos de 3 ratones machos Balb/c entre 6-8 semanas de vida se inmunizaron de manera subcutánea con dos cepas de BCG: La BCG Phipps pues en este modelo se ha probado que es una vacuna de alta eficiencia en la protección de ratones BALB/c contra diversos genotipos de MTB (Castillo-Rodal *et al.*, 2006), y la BCG Vietnam que proviene de Asia y fue donada por la Dra. Tan Trao del Instituto Nacional de Salud Pública e Higiene en Hanoi, esta subcepa vacunal proviene de una región donde la TB es endémica a pesar de contar con un esquema de aplicación global de la vacuna BCG. Adicionalmente, es en esta región donde se cree se originaron las cepas de MTB del genotipo Beijing, cuya aparición podría estar ligada a la vacunación global con BCG. Se inyectaron grupos de tres animales control de manera subcutánea con el vehículo, SSE.

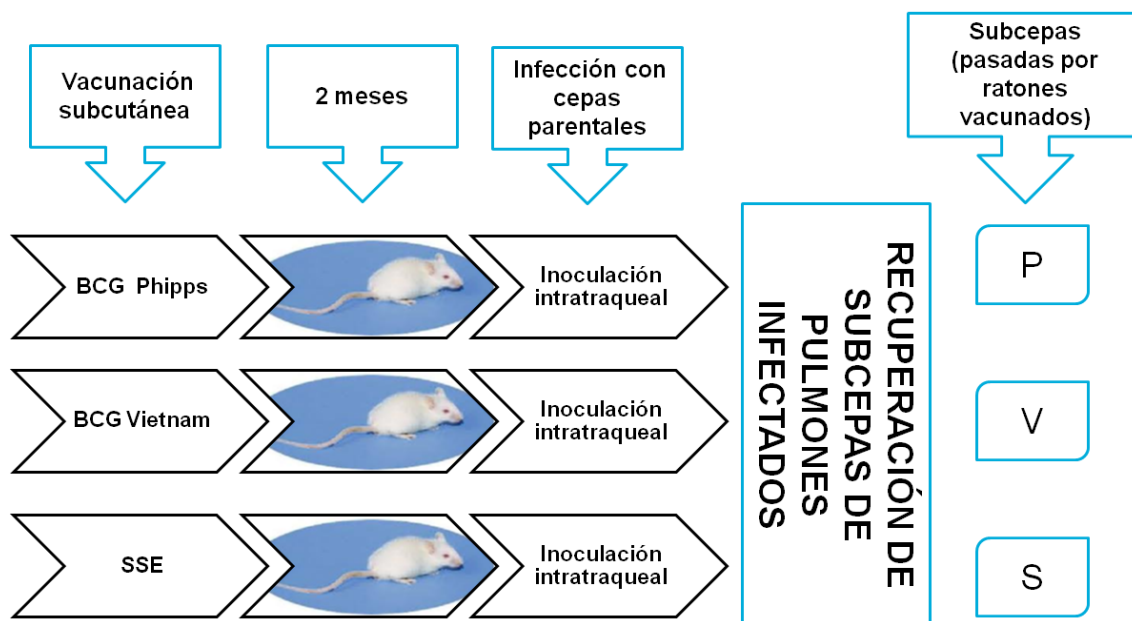
Dos meses posteriores a la vacunación, los ratones se retaron de manera intratraqueal con 250,00 bacterias de cada una de las cepas previamente seleccionadas (1, 46, 48). Los ratones se sacrificaron dos meses posteriores al reto mediante exanguinación por corte de la arteria axilar, su pulmón derecho

se congeló en nitrógeno líquido para cuenta bacilar, mientras que el pulmón izquierdo se fijó en etanol absoluto para su posterior análisis histopatológico. Todos los procedimientos hechos a los animales están en apego a las regulaciones establecidas por la Norma Oficial Mexicana (NOM 062-ZOO-1999) y aprobados por el Comité de Experimentación en Animales del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán” (modificado de Hernández-Pando *et al.*, 1996).

El pulmón izquierdo de cada animal se homogenizó en PBS-Tween 0.05% y se sembraron 4 diluciones en cajas de agar 7H10 adicionado con OADC (ácido oléico, albúmina, dextrosa y catalasa). Una vez crecidas las colonias en las placas de 7H10, tres colonias de tamaño similar fueron seleccionadas para su crecimiento en medio líquido a partir de cada uno de los grupos de ratones vacunados y los controles. A partir de este punto obtenemos tres subcepas de cada cepa parental:

- a. **Subcepa “P”**: Cepa parental pasada por un ratón vacunado con BCG Phipps.
- b. **Subcepa “V”**: Cepa parental pasada por un ratón vacunado con BCG Vietnam.
- c. **Subcepa “S”**: Cepa parental pasada por un ratón control que solo recibió el vehículo, SSE.

Cada una de estas cepas fue sembrada en medio líquido 7H9, se determinó su crecimiento a partir de la medición de densidad óptica como se describe previamente. A partir de que la  $DO_{600}$  del cultivo llegó a 0.6 las bacterias se recuperaron, contaron y almacenaron en alícuotas a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. En la **Figura 1** se puede observar el esquema de recuperación de bacterias.



**Figura 1. Estrategia experimental.** Esquema de la obtención de bacterias pasadas por ratones vacunados para obtener 3 subcepas a partir de cada cepa parental. El procedimiento se realizó para las cepas 1, 46 y 48.

Cada una de estas subcepas fue infectada a ratones sin inmunización previa de las características previamente descritas al mismo tiempo que la cepa parental de la cual se obtuvieron. Durante cada cinética se infectaron 50 ratones con 250,000 bacterias de cada cepa (parental, P, V, S) con un total de 200 ratones por experimento. Posterior al reto los ratones se sacrificaron mediante exanguinación. Brevemente, los ratones fueron anestesiados y se colocaron en posición horizontal, se localizó el plexo braquial izquierdo y se realizó un corte sobre la arteria axilar. La sangre se recuperó en tubos eppendorf de 1.5 mL y se centrifugó para obtener el suero y almacenarlo a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Una vez que el ratón se exanguinó por completo se extrajeron los pulmones y el bazo para estudios posteriores.

### 1. Determinación de la carga bacilar mediante Unidades Formadoras de Colonias (UFC)

El pulmón derecho de cada ratón (4 muestras por tiempo de sacrificio) se descongeló y homogenizó en 1 mL de PBS-Tween al 0.05% usando un politrón. A partir de este homogenizado se crearon diluciones progresivamente



decrecientes. De cada dilución se sembraron 10 µL en placas con medio 7H10 y se incubaron a 37°C con CO<sub>2</sub> al 5% durante 21 días. Posteriormente se observó el crecimiento de colonias en cada dilución, estas se contaron y el número total de bacterias por mL de pulmón se calculó mediante el siguiente factor de multiplicación (modificado de Hernández-Pando *et al.*, 1996).

**Tabla 4. Determinación de UFC**

Dilución	Concentrado	-1	-2	-3	-4
Factor de multiplicación	100	1000	1.0x10 <sup>4</sup>	1.0x10 <sup>5</sup>	1.0x10 <sup>6</sup>

$$Total\ de\ \frac{bacterias}{mL}\ de\ pulmón = (colonias\ en\ dilución) \times (factor\ de\ multiplicación)$$

Se ajusta el número de colonias obtenido en cada dilución y se multiplica por el factor de multiplicación correspondiente. El número obtenido corresponde a millones de bacterias/mL de pulmón homogenizado.

## 2. Preparación de tejido pulmonar para valoración del daño histopatológico

En preparación para el estudio histopatológico el pulmón izquierdo de tres ratones por tiempo de sacrificio fue instilado vía la tráquea con etanol absoluto, y posteriormente se sumergió en un tubo Falcon con 20 mL de etanol absoluto durante 24 horas. Los pulmones se cortaron de manera parasagital, se deshidrataron y se embebieron en parafina. Se realizaron cortes de 4 µM de grosor a partir de cada pulmón y estos se tiñeron con hematoxilina-eosina y se observaron al microscopio. Utilizando un analizador de imágenes (Leica) se determinó el área total de cada pulmón ocupada por neumonía y este fue expresado como porcentaje de la superficie pulmonar total (modificado de Hernández-Pando *et al.*, 1996).

## 3. Determinación de sobrevida

Para el estudio de virulencia, se infectaron 50 ratones con cada una de las cepas estudiadas. Los 50 ratones se tomaron como sujetos del estudio y se observaron periódicamente para documentar muerte espontánea de los

animales. Los animales usados para los tiempos de sacrificio, cuya muerte no fue espontánea, se tomaron como sujetos eliminados del estudio. La sobrevida de los animales se expresó como porcentaje de ratones sobrevivientes a través del tiempo (Mantel, 1966).

### **III. ESTADÍSTICA**

Para determinar significancia estadística en las pruebas de carga bacilar y de histopatología se realizó un ANOVA de dos vías seguida de una prueba de Bonferroni para determinar diferencias entre los grupos. Una  $P < 0.05$  fue considerada significativa. Las curvas de sobrevida se evaluaron a partir de la prueba de Log-Rank para encontrar significancia entre dos curvas a través del tiempo que dura el estudio. Todos los experimentos se realizaron por duplicado, exceptuando la valoración de las cepas 46PP y 48VV, cuyos datos provienen de un solo experimento (Spiegel et al., 2007; Mantel, 1966).

### RESULTADOS

#### I. CURVAS DE CRECIMIENTO DE LAS CEPAS PARENTALES Y SUS SUBCEPAS

Las curvas obtenidas por  $DO_{600}$  para el crecimiento bacteriano se pueden observar en la **Figura 2**.

Las cepas 1, 1P, y 1S (linaje Euro-Americano) no presentan diferencia significativa en su tasa de crecimiento medido por  $DO_{600}$ . La cepa 1 muestra diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) el día 17 de crecimiento en comparación con la cepa 1V, sin embargo esta diferencia solo se presenta en este día durante la curva de crecimiento. Estas 4 cepas alcanzan una  $DO_{600}$  de 0.6 en aproximadamente 13 días posteriores a ser inoculadas en botellas de medio líquido 7H9.

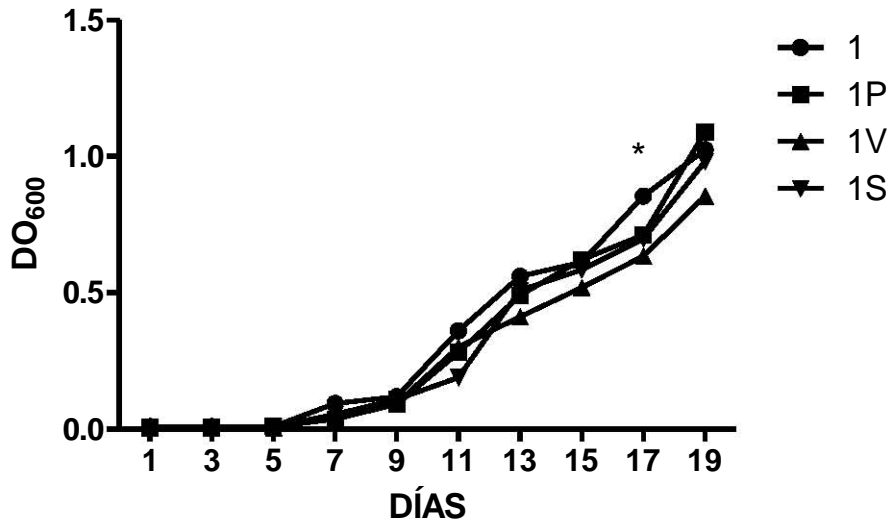
Las cepas 46, 46P, 46V y 46S (genotipo Beijing) presentan diferencias en su tasa de crecimiento, a pesar de que esta diferencia sólo es significativa entre las cepas 46 y 46V los días 15, 17, 19 y 21 de crecimiento ( $p < 0.05$ ). Mientras que la cepa 46 tarda aproximadamente 26 días en alcanzar 0.6 de DO, las subcepas 46P, 46V y 46S lo hacen en aproximadamente 5 días.

Las cepas 48, 48P, 48V y 48S (linaje Beijing) presentan diferencias en su tasa de crecimiento. Existe diferencia significativa entre las cepas 48 y 48P los días 11 y 13 de crecimiento ( $p < 0.05$ ). Las cepas 48 y 48V también muestran diferencias significativas en su crecimiento los días 11, 13 y 19 ( $p < 0.05$ ) de crecimiento, así como los días 21 y 30 ( $p < 0.01$ ). La cepa 48 tarda aproximadamente 30 días en alcanzar una  $DO_{600}$  de 0.481, estas bacterias se recolectaron en este punto debido a que los cultivos que se dejaron por más de 30 días sufrían contaminación por otros microorganismos. Las subcepas 48P, 48V y 48S alcanzaron una  $DO_{600}$  de 0.6 once días después de su inoculación en medio líquido.

Es importante notar que las cepas que provienen de los ratones control (no vacunados) también aumentan su velocidad de crecimiento in vitro en comparación con su cepa parental, pero solo en el caso de las cepas Beijing (46S y 48S), sin embargo los cambios no mostraron significancia durante el análisis estadístico.

A.

CRECIMIENTO IN VITRO



B.

CRECIMIENTO IN VITRO

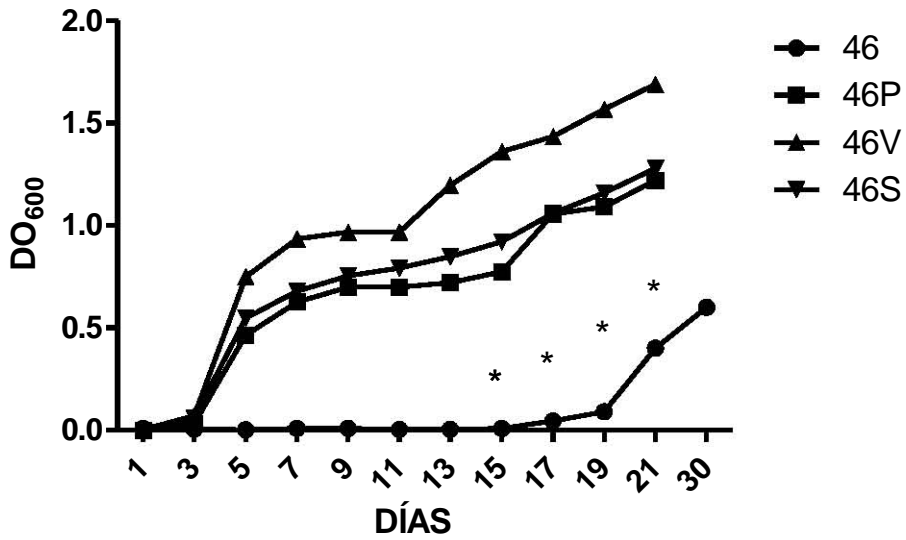
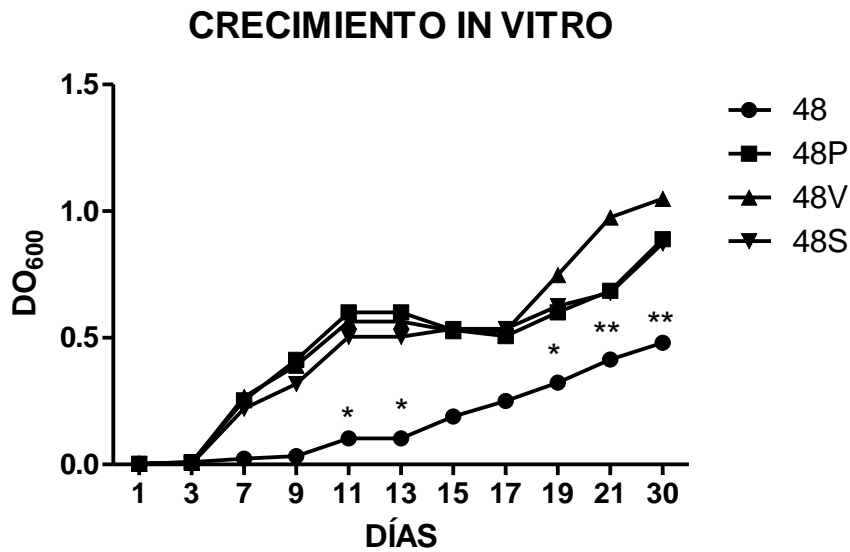


Figura 2 (continuación).

C.



**Figura 2. Crecimiento in vitro.** Se crecieron en medio líquido las colonias provenientes de ratones vacunados (sufijos P y V) y ratones control (sufijo S) y se compararon al crecimiento de su cepa parental mediante mediciones seriadas de la densidad óptica de los cultivos (DO<sub>600</sub>) (\* p<0.05) (\*\*p<0.01) (n= 3 colonias extraídas de 3 ratones por grupo de vacunación y 3 ratones control).

## II. MODELO EXPERIMENTAL DE TUBERCULOSIS PULMONAR PROGRESIVA EN RATONES BALB/c Y VALORACIÓN DE VIRULENCIA DE LAS CEPAS

Se valoró la virulencia de la cepa parental y sus tres subcepas mediante su infección por vía intratraqueal en ratones machos de la cepa BALB/c.

### 1. CEPA 1 Y SUBCEPAS

La cepa 1 (H37Rv) es una cepa tipo de laboratorio altamente caracterizada. Se obtuvieron a partir de esta 3 subcepas:

- a. **1P:** Cepa H37Rv pasada por ratones vacunados con BCG Phipps
- b. **1V:** Cepa H37Rv pasada por ratones vacunados con BCG Vietnam
- c. **1S:** Cepa H37Rv pasada por ratones control los cuales solo recibieron el vehículo, SSE.

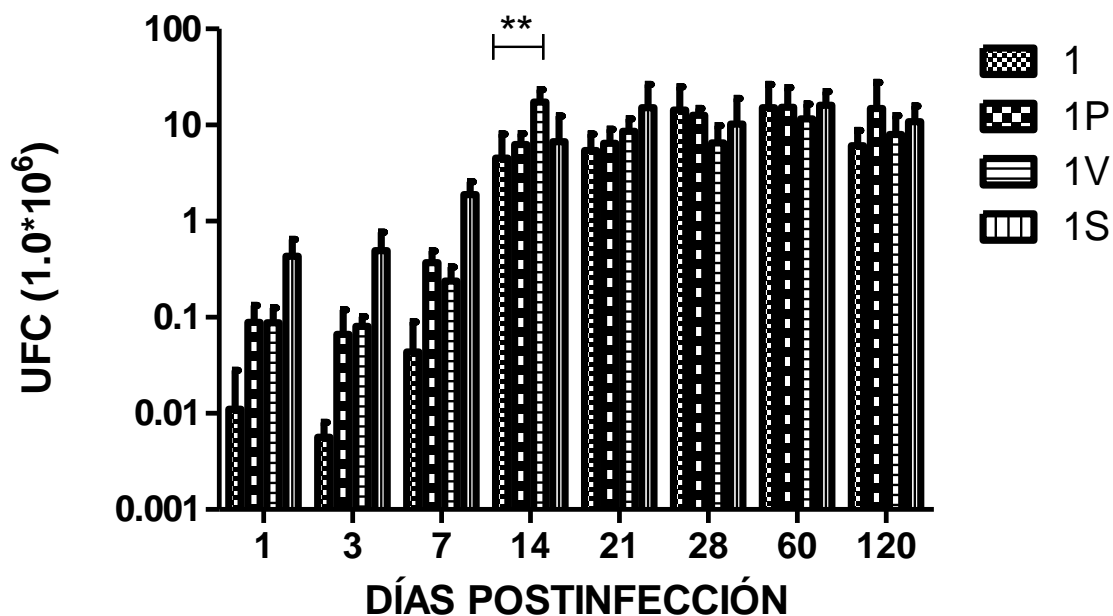
Para determinar la virulencia, estas cepas (1, 1P, 1V, 1S) se inocularon por vía intratraqueal a ratones no inmunizados y se compararon en cuestión a sobrevida, carga bacilar y porcentaje de superficie pulmonar afectada por neumonía.

## RESULTADOS

En cuestión a la sobrevida no se observó diferencia significativa entre las curvas de supervivencia obtenidas a partir de los animales infectados con las cepas 1, 1P, 1V y 1S, todos los ratones infectados sobrevivieron hasta el día 120 postinfección, sin presentarse en el transcurso del experimento eventos de muerte espontánea.

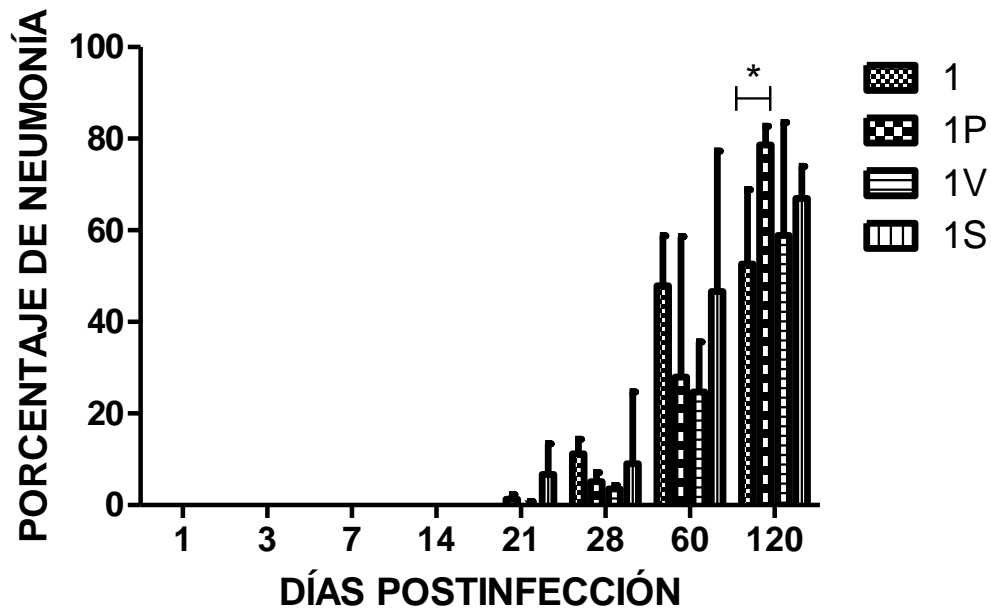
La carga bacilar obtenida de los pulmones de ratones infectados con las cepas 1, 1P, 1V y 1S (**Figura 3**) únicamente mostró diferencia significativa entre los ratones infectados con las cepas 1 y 1V en el día 14 postinfección, sin embargo no hubo diferencia entre estas cepas en los días posteriores de la cinética.

Por último se valoró el daño histológico expresado en porcentaje de superficie pulmonar afectada por neumonía (**Figuras 4 y 5**), en este parámetro sólo se encontró diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre las cepas 1 y 1P en el día 120 postinfección, sin embargo este evento no correlacionó con eventos de mortalidad ni con cambios significativos en la carga bacilar, por lo tanto no se puede concluir diferencia entre la virulencia de dichas cepas basado en los tres criterios presentados.



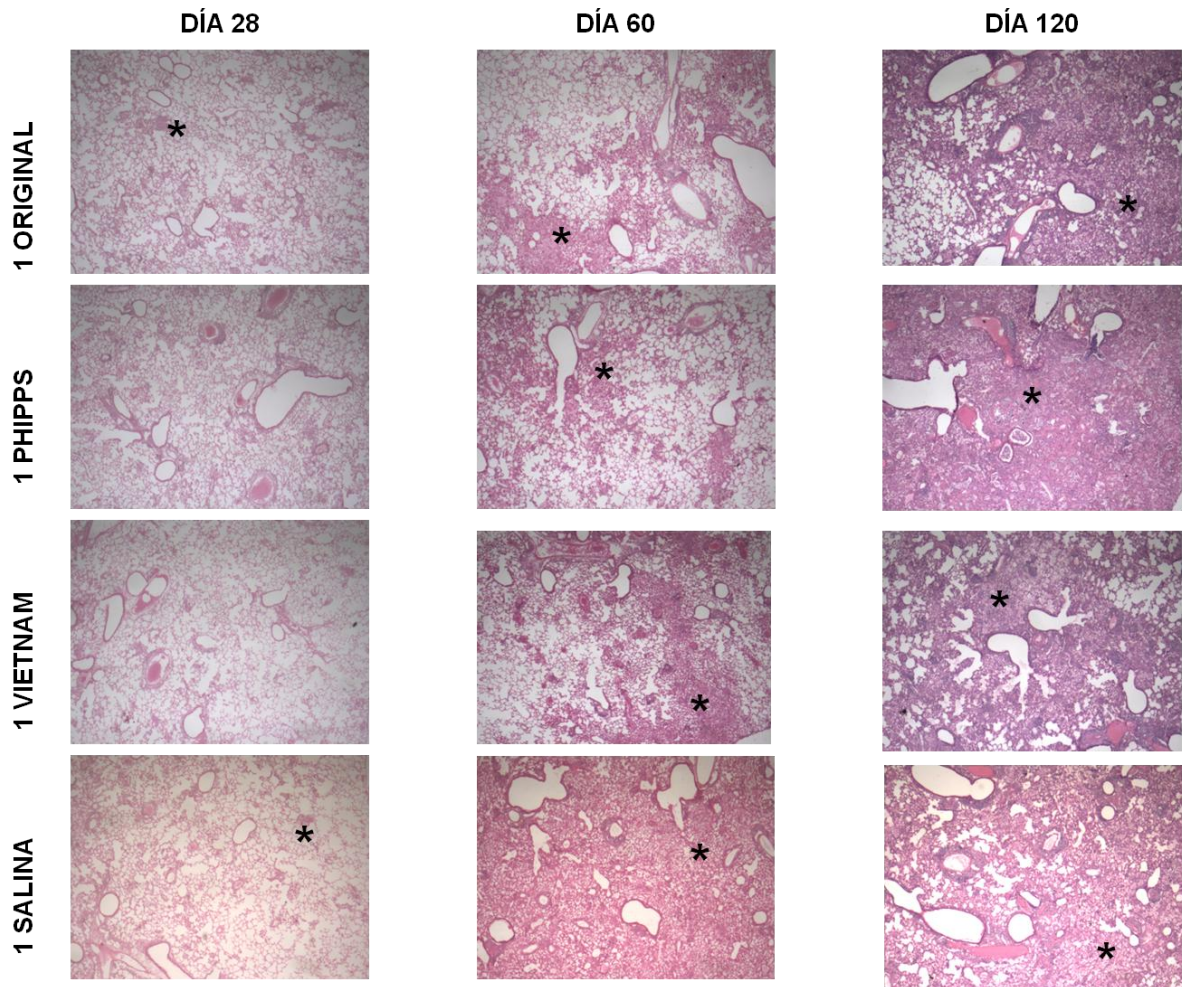
**Figura 3. Carga bacilar.** Pulmones obtenidos de ratones infectados con las cepas 1, 1P, 1V y 1S (n=4 ratones por grupo por tiempo de sacrificio) (\*\* $p < 0.01$ ).

## RESULTADOS



**Figura 4. Porcentaje de superficie pulmonar afectada por neumonía, Ratones infectados con las cepas 1, 1P, 1V y 1S (n= 3 ratones por grupo por tiempo de sacrificio) (\*p<0.05).**

## RESULTADOS



**Figura 5. Histología.** Imágenes representativas de cortes de pulmón de ratones infectados con las cepas 1, 1P, 1V y 1S y sacrificados en los días 28, 60 y 120 postinfección. Se observan áreas pequeñas de consolidación pulmonar (\*) que aparecen en el día 28 y crecen progresivamente hasta ocupar grandes áreas del parénquima pulmonar. Tinción con hematoxilina y eosina, aumento 25X.



### 2. CEPA 46 Y SUBCEPAS

La cepa 46 es un aislado clínico proveniente de Vietnam el cual fue obtenido en el año de 2002. Corresponde al genotipo Beijing. A partir de esta cepa se obtuvieron 3 subcepas:

- a. **46P**: Cepa 46 pasada por ratones vacunados con BCG Phipps.
- b. **46V**: Cepa 46 pasada por ratones vacunados con BCG Vietnam.
- c. **46S**: Cepa 46 pasada por ratones control los cuales sólo recibieron el vehículo, SSE.

Para comparar su virulencia, estas cepas se inocularon por vía intratraqueal a grupos de 50 ratones por cepa.

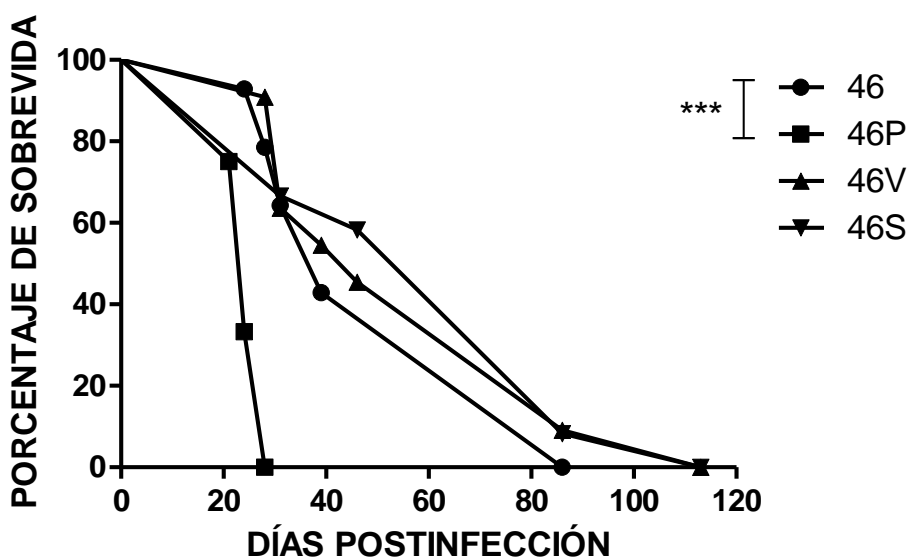
Se observa (**Figura 6**) una disminución significativa ( $p < 0.0001$ ) en la sobrevida de los ratones infectados con la cepa 46P (ratones comienzan a morir de manera espontánea al día 21 postinfección, con 100% mortalidad al día 28 postinfección) en comparación a la sobrevida de los ratones infectados con la cepa 46 parental (100% de mortalidad al día 86 postinfección).

En correlación, los pulmones de ratones infectados con la cepa 46P presentan al día 21 postinfección un promedio de 64.5 millones de UFC/mL de pulmón, mientras que en los pulmones de ratones infectados con la cepa 46 sólo se observan un promedio de 14.3 millones de UFC/mL de pulmón ( $p < 0.001$ ) (**Figura 7**). Al día 28 postinfección todos los ratones infectados con la cepa 46P murieron, por lo cual este es el último día de la cinética en cuestión a sobrevida para este grupo experimental, sin embargo, al encontrarse los sujetos en estado de descomposición, no se logró valorar mediante UFC la carga bacilar con la cual habían muerto, debido a que al procesar los pulmones estos se encontraban infectados con bacterias no MTB, imposibilitando la valoración de este criterio. Es importante mencionar que estas bacterias no MTB sólo se encontraron en los sujetos en proceso de descomposición, los animales que fueron sacrificados durante la cinética nunca mostraron en los tejidos homogenizados bacterias no MTB. Sin embargo, se realizaron tinciones Ziehl-Neelsen de los pulmones de estos sujetos observándose abundantes bacilos positivos en las zonas de necrosis pulmonar con el fin de corroborar que la muerte fue debida al proceso infeccioso

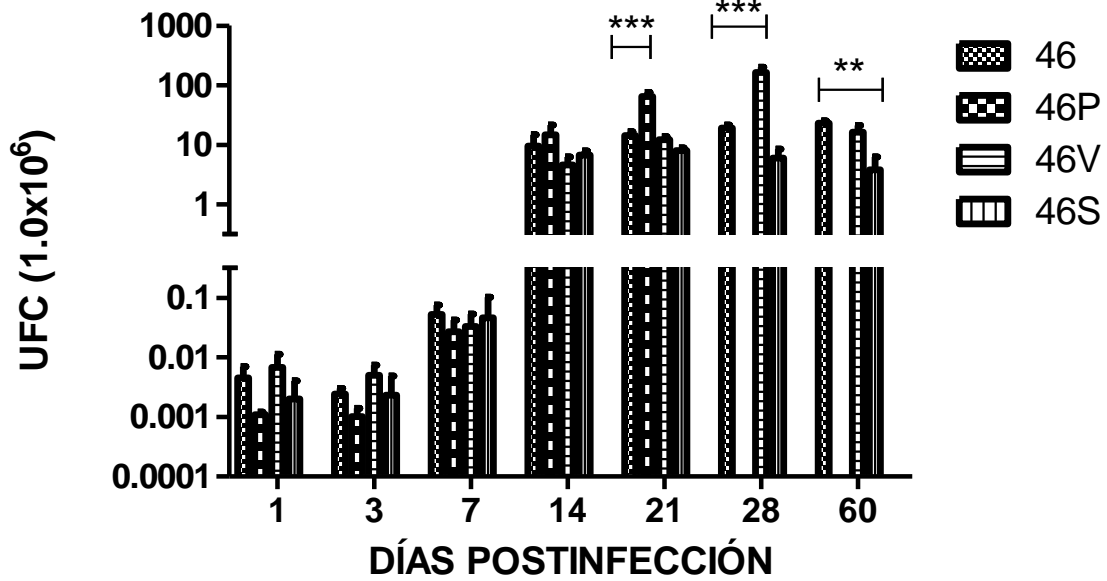
por MTB (**Figura 8**). Estos sujetos, por lo tanto, sólo fueron incluidos en los criterios de sobrevida y daño histopatológico.

Los ratones infectados con la cepa 46P no presentaron diferencia en el porcentaje de área pulmonar afectada por neumonía en comparación con los ratones infectados con la cepa 46 (**Figura 9**), sin embargo existe una diferencia significativa al día 21 en el área pulmonar afectada por necrosis en los ratones infectados con la cepa 46P en comparación con los ratones infectados con la cepa 46 ( $p < 0.001$ ) (**Figura 10**). A partir de estos datos se atribuye el aumento en la mortalidad de los ratones infectados con la cepa 46P a un crecimiento bacilar descontrolado aunado a necrosis pulmonar masiva. Resulta interesante que en los ratones infectados con la cepa 46 parental el daño pulmonar se manifiesta como neumonía, mientras que las áreas con necrosis son escasas o nulas (**Figura 11**).

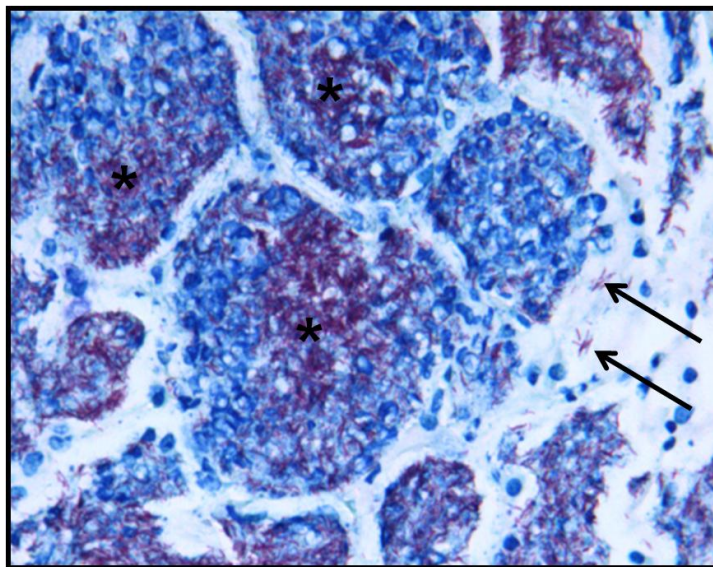
Adicionalmente, se valoró la virulencia de la cepa 46 pasada en dos ocasiones por ratones vacunados con BCG Phipps (cepa 46PP), para valorar si el aumento de la virulencia era progresivo. Los datos evidencian que los ratones infectados con la cepa 46PP tienen a lo largo de la cinética mayor sobrevida que los ratones infectados con la cepa 46P (9% al día 60 postinfección) (**Figura 12**), sin embargo los ratones tienen mayor carga bacilar (**Figura 13**) y el daño histopatológico es predominantemente neumonía (**Figuras 14,15**).



**Figura 6. Sobrevida cepa 46 y subcepas.** Grupos de 50 ratones fueron infectados con las cepas 46, 46P, 46V y 46S (\*\* $p < 0.0001$ ).

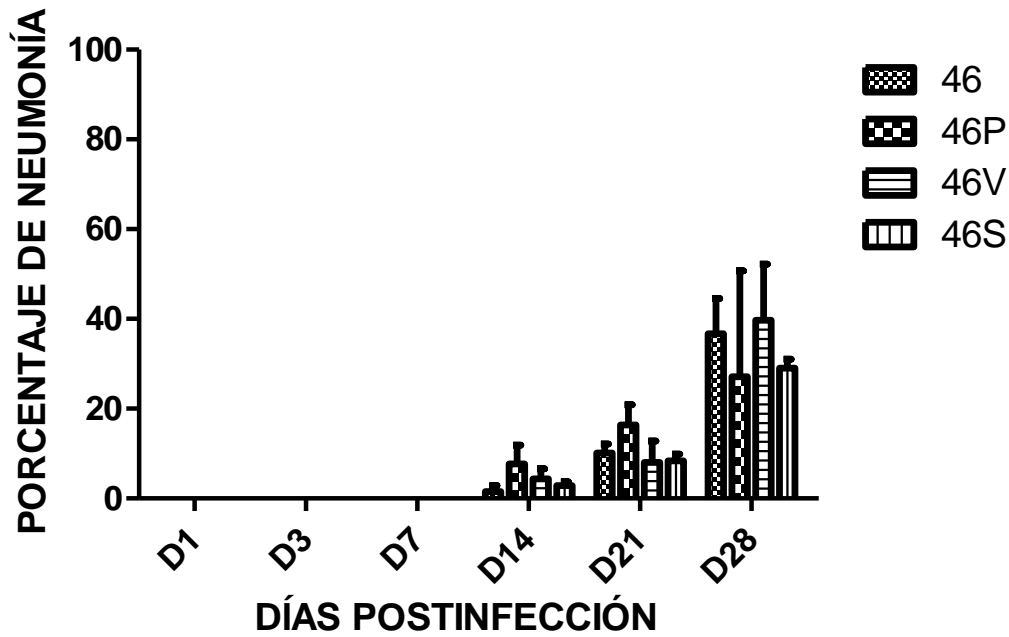


**Figura 7. Carga bacilar cepa 46 y subcepas.** Pulmones obtenidos de ratones infectados con las cepas 46, 46P, 46V y 46S (n=4 ratones por grupo por tiempo de sacrificio) (\*\*p<0.01) (\*\*p<0.001).

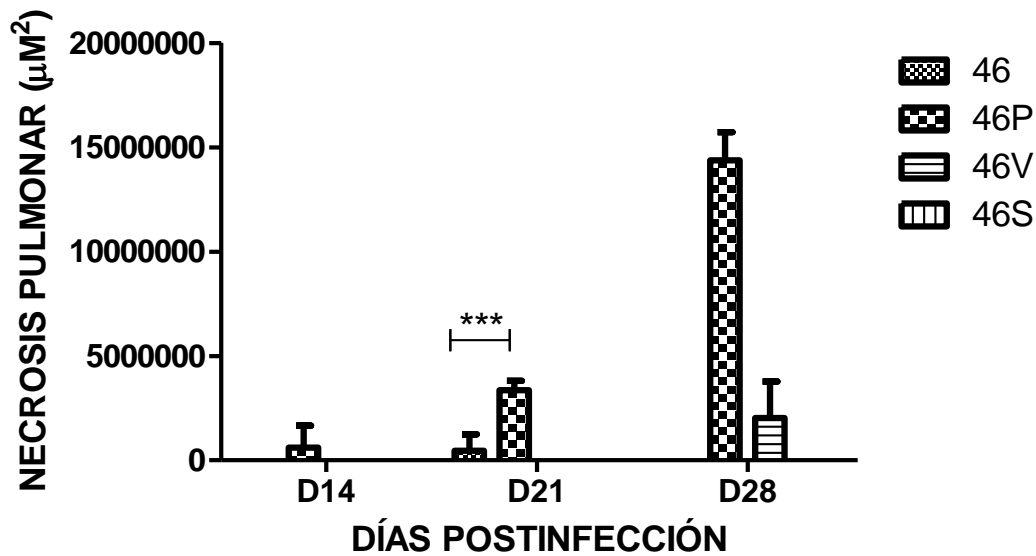


**Figura 8. Imagen Ziehl-Neelsen positiva.** Corte de pulmón de ratón infectado con la cepa 46P teñida con la técnica Ziehl-Neelsen. Se observan abundantes bacilos (color rosa) en el interior y alrededor de zonas necróticas (\*), así como bacilos libres en el intersticio pulmonar (flechas). Aumento 400X.

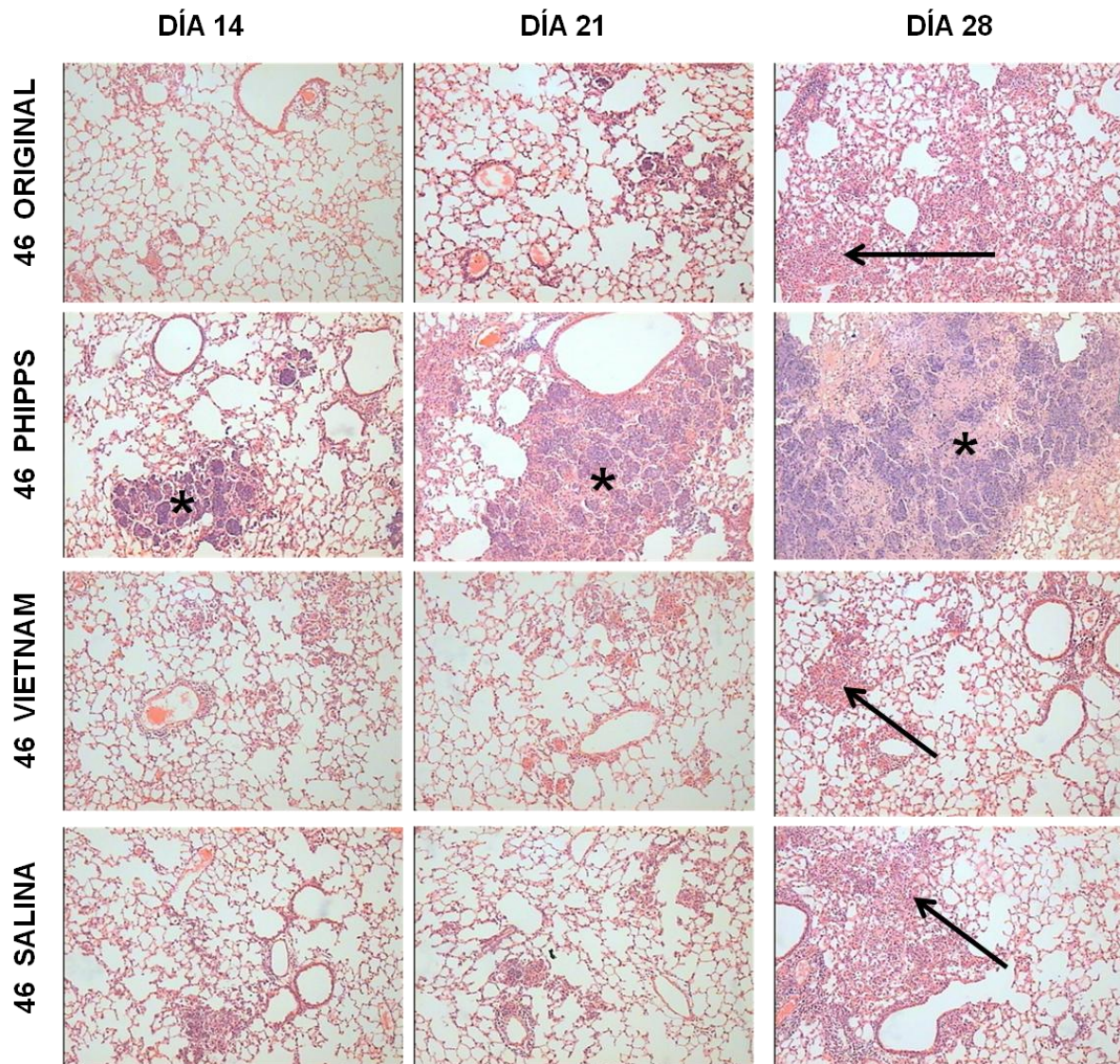
## RESULTADOS



**Figura 9. Neumonía cepa 46 y subcepas.** Porcentaje de superficie pulmonar afectada por neumonía en ratones infectados con las cepas 46, 46P, 46V y 46S (n=3 ratones por grupo por tiempo de sacrificio).



**Figura 10. Necrosis pulmonar cepa 46 y subcepas.** Superficie pulmonar ( $\mu\text{m}^2$ ) afectada por necrosis en ratones infectados con las cepas 46, 46P, 46V y 46S (n=3 ratones por grupo por tiempo de sacrificio, excepto el grupo 46P al día 28, donde solo hay la media de 2 ratones debido a que el resto habían muerto de manera espontánea) (\*\*\*) ( $p < 0.001$ ).



**Figura 11. Histología cepa 46 y subcepas.** Imágenes histológicas representativas de los pulmones obtenidos a los días 14, 21 y 28 postinfección. Se observa necrosis pulmonar (\*) en los ratones infectados con la cepa 46P, en comparación con los ratones infectados con las cepas 46 parental, 46V y 46S cuyo daño se manifiesta principalmente en forma de neumonía (flechas). Tinción con hematoxilina y eosina, aumento 25X.

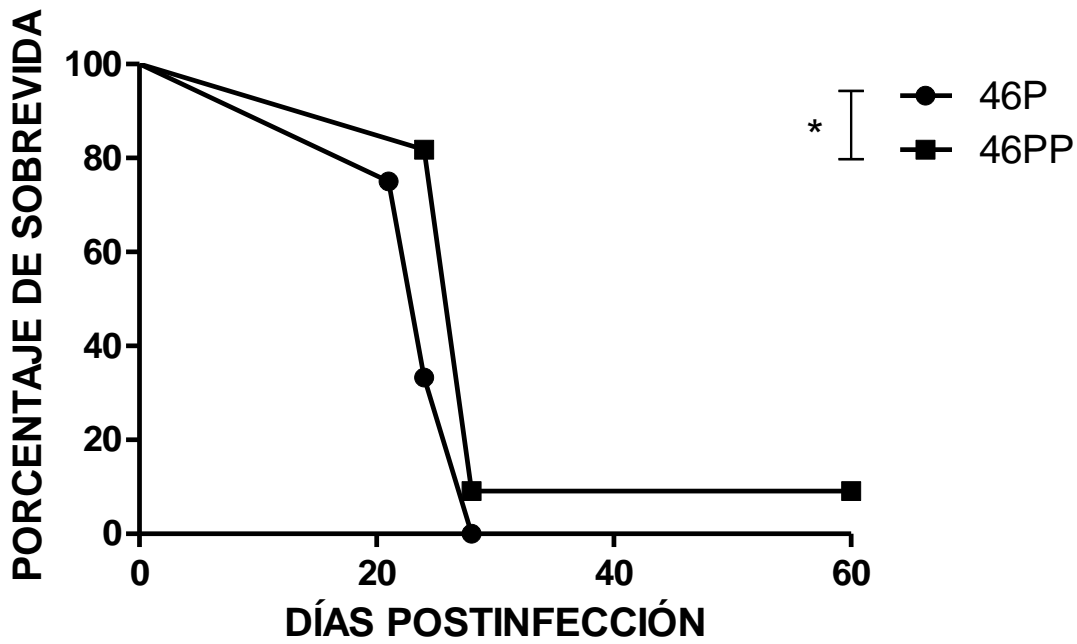


Figura 12. Sobrevida cepa 46P vs 46PP. Grupos de 50 ratones fueron infectados con la cepa 46P y la cepa 46PP (\* p<0.05).

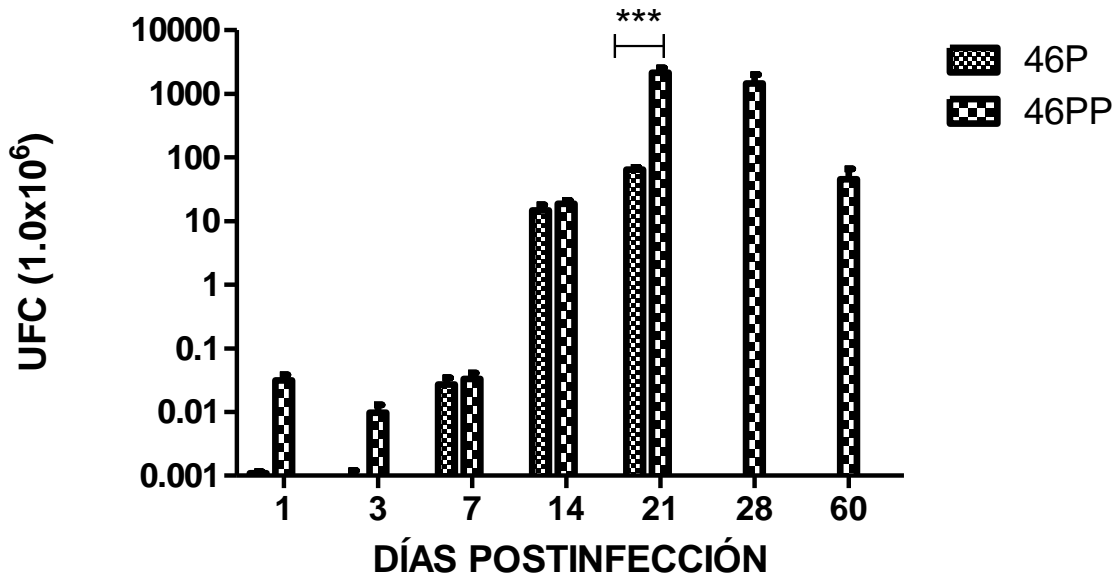
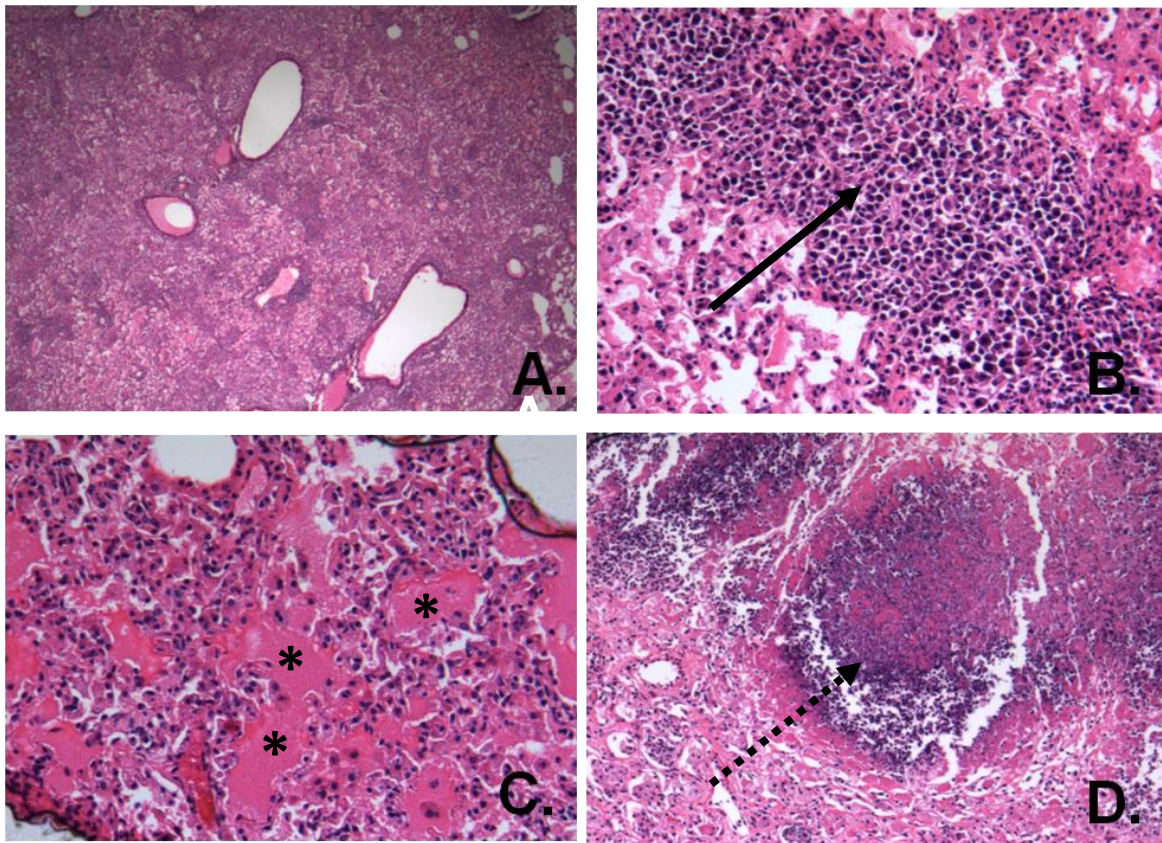
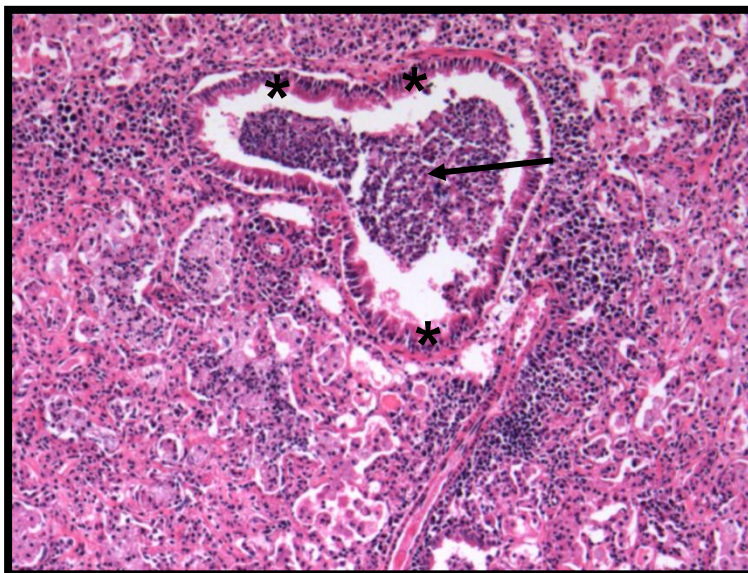


Figura 13. Carga bacilar cepa 46P vs 46PP. Carga bacilar de ratones infectados con la cepa 46P y la cepa 46PP (n= 4 ratones por grupo por tiempo de sacrificio) (p<0.001).





**Figura 14. Histología cepa 46PP.** Imágenes histológicas de pulmón de ratón infectado con la cepa 46PP y que sobrevive al día 60 postinfección. Se observa en el panel A (25X) una gran área de neumonía. En el panel B (200X) se observa intensa activación de células del sistema inmunológico con grandes núcleos basófilos (flecha). En el panel C (200X) se muestran zonas de necrosis focalizadas (\*). Por último, el panel D (100X) muestra una gran zona de tejido pulmonar con aspecto de cavitación (flecha punteada). Tinción con hematoxilina y eosina.



**Figura 15. Histología cepa 46PP.** Imagen de pulmón de ratón infectado con la cepa 46PP. Bronquio de gran calibre (epitelio columnar ciliado \*) ocupado en su totalidad por moco y detritus celular (flecha) (Aumento 100X).

### 3. CEPA 48 Y SUBCEPAS

La cepa 48 es un aislado clínico proveniente de Sudáfrica. La cepa corresponde al genotipo Beijing y fue obtenida de un paciente masculino con baciloscopia de (++) . A pesar de causar una enfermedad grave en este paciente, la transmisibilidad de la cepa se muestra baja, al reportarse únicamente un paciente enfermo con esta cepa en esta región. A partir de esta cepa parental se obtuvieron las siguientes subcepas:

- a. **48P**: Cepa 48 pasada por ratones vacunados con BCG Phipps.
- b. **48V**: Cepa 48 pasada por ratones vacunados con BCG Vietnam.
- c. **48S**: Cepa 48 pasada por ratones control los cuales solo recibieron el vehículo, SSE.

Las cepas 48, 48P, 48V y 48S se inocularon por vía intratraqueal a lotes de ratones no vacunados para comparar su virulencia. Durante la cinética de infección se observa un aumento significativo ( $p < 0.0001$ ) en la mortalidad de los ratones infectados con la cepa 48V (todos los sujetos muertos al día 26 postinfección) en comparación con aquellos infectados con la cepa 48 parental (sujetos sobreviven hasta el día 48 postinfección) (**Figura 16**).

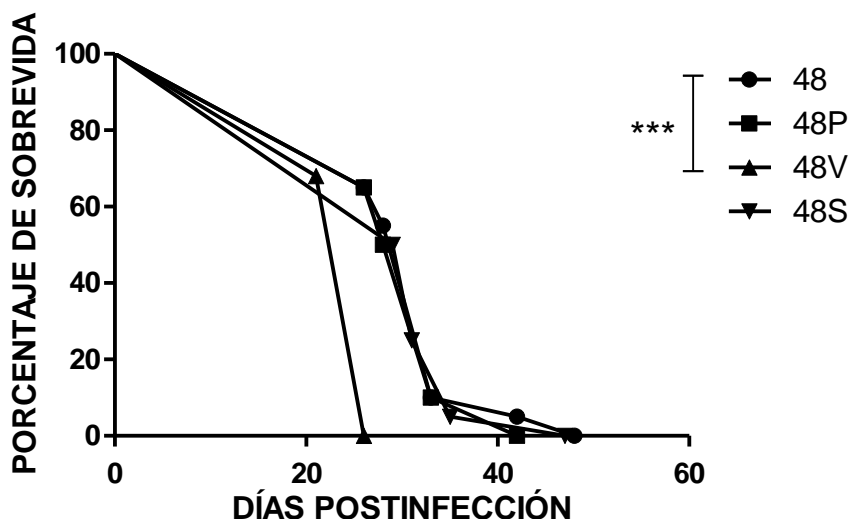
Este aumento en la mortalidad se ve correlacionado con un aumento en la carga bacilar pulmonar al día 21 de los ratones infectados con la cepa 48V, cuyo promedio es de 2691.11 millones de UFC/mL de pulmón en este día de infección en comparación con los ratones infectados con la cepa 48, cuya carga bacilar al día 21 es de 273 millones de UFC/mL de pulmón. La cepa 48P también muestra un aumento en la carga bacilar al día 21 postinfección, sin embargo este aumento no es estadísticamente significativo (**Figura 17**).

A pesar de esto, no se observa diferencia significativa en el porcentaje ocupado por neumonía entre las cepas 48 y 48V (**Figura 18**). A partir de observaciones de la histología que mostraron grandes áreas de tejido pulmonar ocupado por necrosis, se decidió cuantificar el área pulmonar afectada por necrosis, encontrándose diferencia significativa al día 21 postinfección entre los ratones infectados con la cepa 48 parental y 48V, produciendo esta última una gran cantidad de necrosis en los pulmones de dichos ratones (**Figura 19, 20, 21**). El último ratón infectado con la cepa 48V falleció al día 26 postinfección, de este ratón se realizó autopsia para

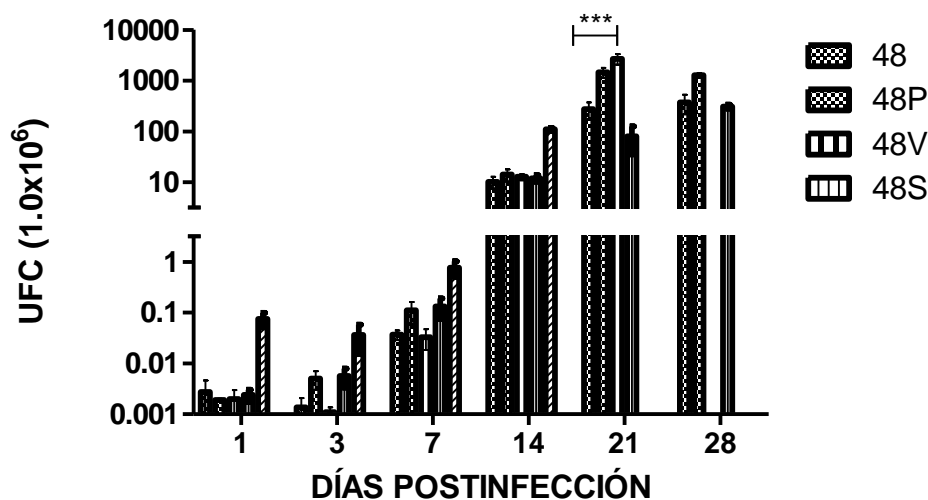


## RESULTADOS

corroborar el daño pulmonar, encontrándose gran cantidad de neumonía y necrosis pulmonar masiva, la cual se concluye es la causa de muerte de los animales infectados con esta cepa. Las cuantificaciones obtenidas a partir de este sujeto se muestran en las gráficas de porcentaje de neumonía y de área pulmonar necrótica, sin embargo como los datos provienen de un sólo sujeto no se observan barras de desviación estándar ni datos de estadística.

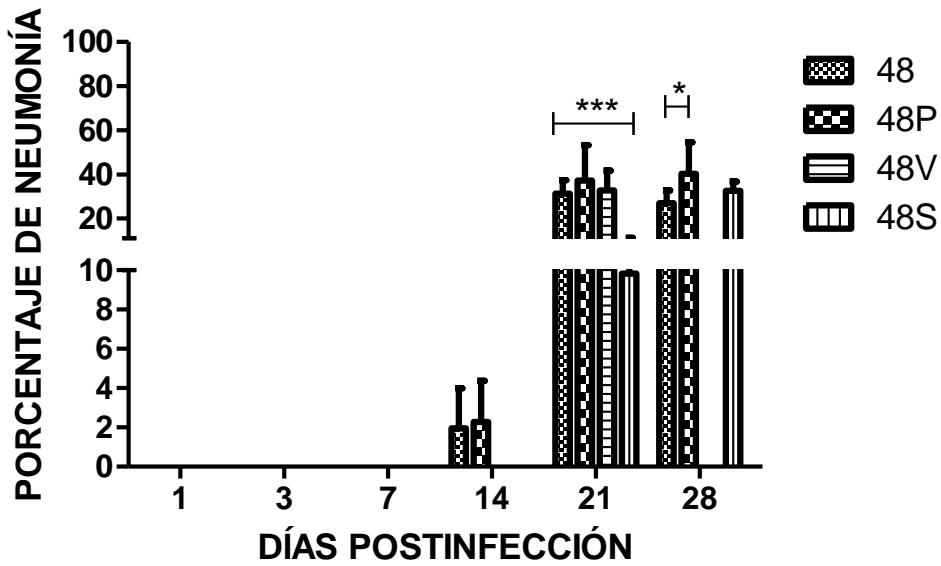


**Figura 16.** Grupos de 50 ratones fueron infectados con las cepas 48, 48P, 48V y 48S (n=50 ratones por grupo)



**Figura 17.** Carga bacilar de pulmones de ratones infectados con las cepas 48, 48P, 48V y 48S. (n= 4 ratones por grupo, por tiempo de sacrificio).

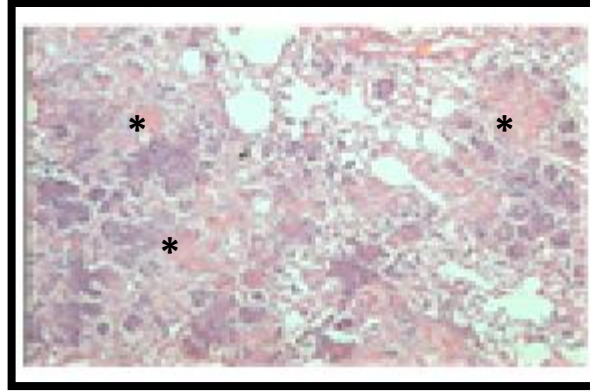
## RESULTADOS



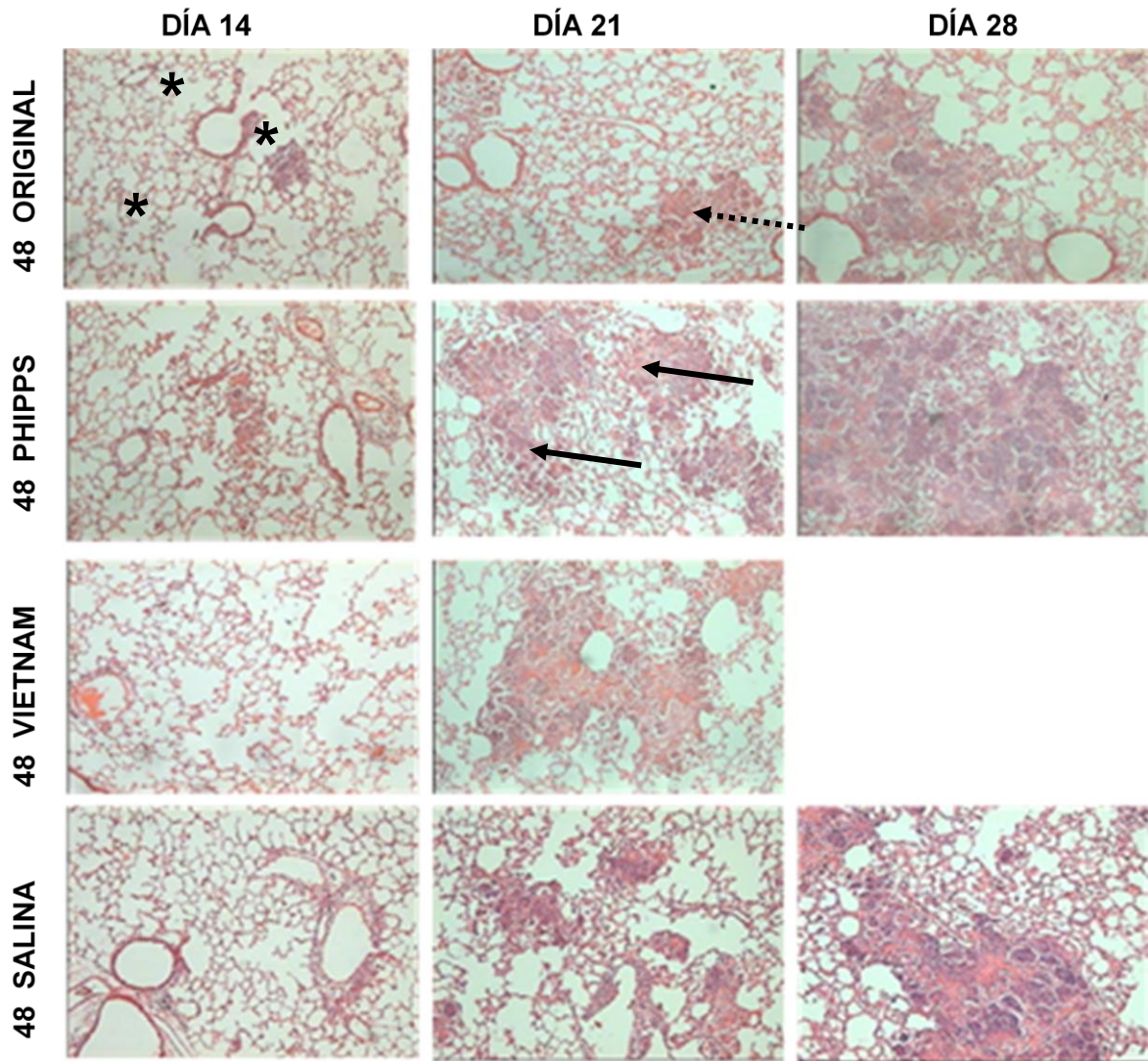
**Figura 18.** Porcentaje de área pulmonar afectada por neumonía (n=3 ratones por grupo, por tiempo de sacrificio).



**Figura 19. Necrosis pulmonar.** Se midió el área pulmonar afectada por necrosis (n= 3 ratones por grupo, por tiempo de sacrificio):



**Figura 20. Necrosis pulmonar.** Imagen representativa de la histología observada en la necropsia de un ratón infectado con la cepa 48V y muerto de manera espontánea al día 26 postinfección. Se observan grandes áreas de consolidación pulmonar, pérdida del espacio funcional así como múltiples zonas con necrosis pulmonar (\*). Tinción con hematoxilina y eosina, aumento 100X.



**Figura 21. Histología cepa 48 y subcepas.** Imágenes histológicas representativas obtenidas a partir de los ratones infectados con las cepas 48, 48P, 48V, 48S. Se observa al día 14 un aumento en el infiltrado inflamatorio intersticial, peribronquial y perivascular (\*) en pulmones infectados con la cepa 48 parental, mientras que los pulmones infectados con la cepa 48V muestran muy escaso infiltrado inflamatorio en este día. Posteriormente los pulmones obtenidos al día 21 de la cepa 48V muestran áreas neumónicas y áreas de necrosis pulmonar (flechas) a comparación de la cepa 48 parental, en la cual solo se muestran áreas con neumonía (flecha punteada), siendo la necrosis muy escasa o nula en las muestras obtenidas en este día de la cinética. Tinción con hematoxilina y eosina, aumento 25X.

### DISCUSIÓN

Los microorganismos, al igual que el resto de los seres vivos, están sujetos a su entorno, y deben adaptarse constantemente a las presiones que el medio ambiente ejerce sobre ellos en su lucha por reproducirse.

Los experimentos presentados en este estudio son un ejemplo del proceso de selección que ocurre en los microorganismos que infectan individuos vacunados. Al ser vacunados con BCG, los ratones capacitan a su sistema inmunológico, conduciendo a la liberación de citocinas por parte de las células T estimuladas con el antígeno, activación de macrófagos y aniquilamiento intracelular del microorganismo (Zambrano-Villa, 2007). En el caso de MTB se ha observado que la bacteria tiene la capacidad de adaptarse a medios ambientes hostiles tales como la deficiencia de nutrientes, incremento en la acidez del medio o incluso la hipoxia (Stokes & Waddell, 2009). A pesar de este microambiente hostil, como se comentó previamente, la vacunación raramente es exitosa en prevenir completamente la enfermedad o la infección por el microorganismo contra el cual está diseñada (Gandon *et al.*, 2001). Esto se debe en gran medida a que las poblaciones de microorganismos no son homogéneas y mucho menos estáticas, como es el caso de *Mycobacterium tuberculosis*. Las más de 39,000 cepas varían enormemente en su inmunogenicidad, virulencia, tasa de replicación y tasa de mutagénesis (Palomino *et al.*, 2007), contribuyendo esto a las diferencias observadas en la tasa de protección por la vacuna BCG. Dentro de las familias de MTB, se reconocen integrantes especialmente capaces de evadir la respuesta inmune, tal como el genotipo Beijing (López *et al.*, 2003). Algunas de estas cepas han logrado, mediante múltiples determinantes, causar enfermedad grave en individuos tanto vírgenes como previamente inmunizados, creando un nuevo riesgo en regiones donde la tuberculosis ya no se consideraba un problema de salud pública, como fue el brote de la cepa W en Estados Unidos (Agerton *et al.*, 1999).

El efecto de la vacunación sobre la virulencia de MTB fue valorado directamente mediante los ensayos presentados en este trabajo. En el caso de las cepas de genotipo Beijing 46 y 48 se observó un aumento significativo en su virulencia al ser pasadas por ratones vacunados con subcepas de la BCG,

sin embargo este efecto no se observó en la cepa 1 del genotipo Euro-Americano, que no presentó aumento de virulencia al ser pasada por ratones vacunados con BCG.

La cepa 46 presentó mayor virulencia al ser pasada por ratones vacunados con BCG Phipps, siendo la cepa 46P mucho más virulenta que la cepa 46 parental en los criterios de sobrevivencia, carga bacilar y daño histopatológico. La sobrevivencia de los animales infectados con la cepa 46P disminuyó drásticamente a 28 días, mientras que los infectados con la cepa 46 parental sobreviven hasta 3 veces más tiempo. La carga bacilar encontrada en los pulmones de los ratones infectados con la cepa 46P y sacrificados al día 21 fue 4.5 veces mayor que en los ratones infectados con la cepa 46 parental. Entre los datos más interesantes generados a partir de este estudio podemos nombrar el hallazgo del cambio en el tipo de daño histopatológico encontrado en los ratones infectados con la cepa 46P, en quienes el porcentaje de neumonía no se alteró y en su lugar el área de parénquima pulmonar fue ocupada casi en su totalidad por un proceso necrótico que en última instancia fue el causante de la muerte de los ratones. A estos resultados se les suma importancia por el hecho de estar directamente relacionados con la presencia de bacilos Ziehl-Neelsen positivos dentro y alrededor de todo el tejido necrótico de pulmón (**Figura 9**) lo cual no había sido, hasta nuestro conocimiento, previamente observado en esta cantidad utilizando esta cepa de ratón (BALB/c). De hecho, los ratones de la cepa BALB/c y de otras cepas como C57Bl han sido por mucho tiempo cuestionados en su utilidad como modelos de TB debido a que generalmente, usando cepas tipo de laboratorio como H37Rv, no reproducen el proceso necrótico/licuefactivo como sucede en la TB humana (Cardona, 2011). Los resultados obtenidos en este estudio demuestran que en ciertas ocasiones si es posible obtener la patología clásica de la TB humana usando un modelo murino con la cepa BALB/c, sin embargo, al igual que en las poblaciones humanas, es de suma importancia tanto la cepa infectante, como el estatus de inmunización del huésped.

Aunado a esto, un hallazgo relevante de este experimento es el proceso de interacción entre el huésped y el patógeno y la selección de clones más adaptados que se podría estar generando. La hipótesis del “intercambio” o

“trade-off” nos dicta que la virulencia de un microorganismo resulta directamente como un producto de la explotación del hospedero, el cual es necesario para maximizar la adecuación del microorganismo (Mackinnon *et al.*, 2008). De esta manera, la virulencia de un microorganismo es limitada directamente por la tasa de explotación que este provoque a su hospedero, ya que un hospedero “sobre-explotado” morirá como resultado directo de esta explotación y así el microorganismo dejará de tener un hospedero de donde obtener sus nutrientes y el medio ambiente para continuar con su reproducción (Long & Graham, 2011). Es por lo tanto imperativo que el microorganismo infectante logre la tasa de explotación más elevada posible sin que esta conlleve la muerte de su hospedero. Es así como las bacterias más adaptadas, en términos de adecuación, serían aquellas que no eliminen a su hospedero y de esta manera continúen con un nicho de infección donde producir su descendencia para lograr propagarse a hospederos nuevos y así sucesivamente (Long & Graham, 2011). Este proceso podría explicar en parte el comportamiento de la cepa 46PP en el presente trabajo, la cual a pesar de continuar con una elevada virulencia, no produce el 100% de mortalidad en los ratones, como lo hace la cepa 46P. La cepa 46PP al haber sido pasada dos veces por ratones vacunados con BCG Phipps podría mostrar un proceso de adaptación con su hospedero, en el cual los ratones se mantienen sumamente enfermos y con elevada carga bacilar, pero el 9% logra sobrevivir el doble que los ratones infectados con la cepa 46P. El estudio histopatológico de los ratones infectados con la cepa 46PP que sobrevivieron los dos meses de duración del experimento muestra un proceso patológico muy diferente del observado con la cepa 46P, ya que los ratones infectados con la cepa 46PP presentan bronquios principales ocupados por moco y detritus celular mediante el cual se podría producir la infección de convivientes, tal como pasa en el caso de los humanos enfermos de TB, sin embargo se requieren estudios posteriores de virulencia y convivencia para corroborar estos datos. Aunado a esto, se observa en los pulmones de estos animales grandes zonas de parénquima necrótico a punto de formar cavernas, como sucede en los casos de tuberculosis en humanos. Es a partir de estos datos que se observa que los cambios en la virulencia de la cepa 46P podrían producir un fenotipo bacteriano que logre, como sugiere la hipótesis del intercambio producir la máxima

explotación de su huésped sin que este muera, logrando así reproducirse para continuar infectando hospederos vírgenes y continuar su especie.

En el caso de la cepa 48, la vacunación con BCG Vietnam produjo la cepa de mayor virulencia. La cepa 48V produce la muerte del 100% de los ratones infectados casi dos veces más rápido que la cepa 48 parental. Adicionalmente, se observa que los ratones infectados con la cepa 48V y sacrificados al día 21 tienen 10 veces más UFC en pulmón que los ratones infectados con la cepa 48 parental.

Los ratones infectados con la cepa 48V presentan un patrón histológico muy particular. Los pulmones extraídos de los ratones infectados con la cepa 48V en los días iniciales de la cinética (día 1, 3, 7 y 14) presentan edema en lugar de infiltrado celular en zonas peribronquiales, perivenulares e intersticiales. López *et al.* Ha descrito este tipo de respuesta histológica a la infección por cepas del genotipo Beijing, sin embargo a diferencia de los hallazgos de López *et al.*, 2003, en los pulmones de los ratones infectados con la cepa 48V no hay formación de granulomas al día 14 postinfección, ni áreas neumónicas. La histología pasa de no tener daño importante al día 14, a tener necrosis pulmonar masiva al día 21. Es probable que la cepa, mediante mecanismos aún por estudiar, logre evadir el sistema inmune mientras se replica durante estas dos primeras semanas. Este mecanismo de evasión del sistema inmune se ha documentado previamente para el caso de las cepas Beijing, debido a que estas presentan diferencias en las estructuras lipídicas asociadas a la pared celular (Parwati *et al.*, 2010b). Entre estas diferencias cabe notar que las cepas Beijing producen un lípido biológicamente activo (glucolípidio fenólico derivado de la sintasa de policétidos), se ha descubierto que este lípido logra inhibir la liberación de mediadores proinflamatorios y su presencia se ha asociado con la infección letal en animales (Reed *et al.*, 2004). Es a partir de este momento de la cinética (día 21 postinfección) que los ratones comienzan a morir en grandes cantidades (100% de la mortalidad al día 26 postinfección) y al observar la carga bacilar encontramos grandes cantidades de bacterias, en promedio 2,691 millones de UFC/mL de pulmón infectado. Es importante notar que en el caso de la cepa 46P los ratones también comienzan a morir al día 21, logrando el 100% de mortalidad al día 28 postinfección, sin embargo la carga



bacilar máxima que se logra encontrar en los pulmones de estos animales es de 64.5 millones de UFC/mL de pulmón. Por lo que aún cuando la mortalidad entre estos dos grupos, ratones infectados con la cepa 46P y ratones infectados con la cepa 48V, es similar, los ratones infectados con la cepa 48V tienen casi 42 veces más UFC.

Sin embargo, el proceso patológico que se desarrolla en los pulmones de ambos grupos de ratones es necrosis pulmonar masiva. Es importante recalcar que la necrosis de tejidos infectados por MTB podría estar asociada tanto a la carga bacilar (Cardona, 2011), como al proceso inmunopatológico producido por la cepa infectante (Cruz *et al.*, 2010). Hasta qué extensión la necrosis pulmonar vista en los ratones infectados con las cepas 46P y 48V se debe a las dos causas anteriormente mencionadas es, hasta el momento, desconocido, sin embargo su estudio es de suma importancia para dilucidar en parte el mecanismo de daño promovido por cada cepa bacteriana. En relación a esto, estudios previos han intentado diferenciar entre el daño patológico infligido por la carga bacilar y el daño por el sistema inmune, encontrando que a pesar de neutralizar mediante el uso de anticuerpos a ciertos participantes relevantes de la respuesta inmune, es la carga bacilar lo que al final dictamina la formación de necrosis y su extensión en el parénquima pulmonar (Cardona, 2011).

A pesar de los cambios de virulencia tan aparentes que se observaron en las cepas Beijing pasadas por ratones vacunados, la cepa 1 del genotipo Euro-Americano no presentó cambio en su virulencia al ser pasada por ratones vacunados con BCG Phipps, ni BCG Vietnam. Los ratones infectados con las cepas 1, 1P, 1V y 1S que corresponden a la cepa tipo H37Rv presentaron carga bacilar moderada, las UFC nunca superaron los 17 millones a lo largo de la cinética y el daño pulmonar característico fue neumonía que comenzó a desarrollarse al día 28 postinfección para concluir en el día 120 con un promedio de 64% de la superficie pulmonar con ocupación neumónica. La cinética que describimos es la cinética clásica de infección que se observa con esta cepa tipo de laboratorio, H37Rv, en experimentos previos realizados usando este modelo murino.

A partir de los datos presentados se observa que en el caso de estas 3 cepas estudiadas, únicamente las cepas del genotipo Beijing logran adquirir este

cambio en su virulencia a partir de la exposición a un sistema inmune capacitado de un ratón vacunado con BCG. Esto podría relacionarse con estudios previos en los que se ha descrito que las cepas del genotipo Beijing presentan tasas de mutaciones más altas en genes susceptibles conllevando a una mayor facilidad para adquirir mutaciones que en algunos casos pueden resultar beneficiosas para la bacteria (Parwati *et al.*, 2010), sin embargo se requieren otros estudios de perfiles genéticos para estudiar esta posibilidad en el caso de las cepas 46P y 48V.

Este cambio en la virulencia, aunado con la capacidad del genotipo Beijing para evadir el sistema inmune (Reed *et al.*, 2004) resulta en cepas altamente eficaces para producir infección y enfermedad. Sin embargo, en el caso de la cepa 48V existe la posibilidad que las altas tasas de explotación que conllevan a la replicación tan eficiente de la bacteria (2,691 millones de UFC/mL de pulmón al día 21 postinfección) afecten la transmisibilidad de la cepa e impidan que esta logre propagarse a otros hospederos. Lo anterior concuerda con los datos que recibimos de esta cepa que dictan que el paciente del que fue aislada sufría enfermedad grave con una alta carga bacilar, como se indica por la baciloscopía (++) , y sin embargo este fue el único paciente infectado por dicha cepa en esa región (tamaño de cluster: 1). En nuestro estudio, la cepa de menor transmisibilidad (48 parental) resultó de mayor virulencia en comparación con la de mayor transmisibilidad (46 parental). En estudios previos se describen resultados divergentes, debido a que generalmente se considera una relación directa entre el nivel de transmisibilidad y la virulencia de la cepa estudiada (Aguilar *et al.*, 2010). A pesar de estos datos, la cepa 48 es extremadamente virulenta, y existe la posibilidad de que al causarle la muerte a su huésped frene la cadena de transmisión, siendo esto algo que previamente se ha descrito para la virulencia de los patógenos en general (Long & Graham, 2010).

En el caso de la cepa 46P, esta difiere en su tasa de explotación, ya que a pesar de causar la muerte de los animales al día 28 postinfección, únicamente se replica hasta producir 64.5 millones de UFC/mL de pulmón. Este dato cobra relevancia cuando se observa el proceso infeccioso propiciado por la cepa 46PP, en el cual el 9% de los huéspedes sobrevive a la infección por periodos

prolongados y muestra en su histología datos que sugieren transmisibilidad del patógeno (vías aéreas principales ocupadas por moco y detritus celular, cavitaciones pulmonares). Es importante mencionar que la cepa 46 parental ya presentaba mayor transmisibilidad que la cepa 48 en sus datos epidemiológicos, debido a que infectó a 4 individuos en la región estudiada (**Tabla 2**).

Existe poca información que puntualice los factores inmunológicos que podrían estar involucrados de manera directa en el aumento de la virulencia producido por la vacunación. Long & Graham, 2010 describen que teorías como la del “intercambio” predicen que poblaciones hospederas altamente inmunes pueden mantener parásitos más virulentos relativo a poblaciones inmunológicamente vírgenes. Esto sustentado en que en una población inmunológicamente vírgen, un parásito de alta virulencia probablemente mataría a su hospedero, frenando de esta manera la cadena de transmisión. Sin embargo en hospederos con sistemas inmunes capacitados por intervenciones como la vacunación, los parásitos altamente virulentos en ocasiones logran sobrevivir y continuar su transmisión a nuevos hospederos. En experimentos para observar el efecto de la respuesta inmune sobre la virulencia mediante la neutralización de TNF- $\alpha$  se observó que dicha intervención disminuía la virulencia de *P. chaubadi* en un modelo murino de malaria. Estos resultados podrían indicar que aquellas cepas que induzcan respuestas inmunes muy vigorosas, como podría lograrse en hospederos vacunados, podrían producir daño inmunopatológico y mediar así un aumento en su virulencia en relación directa con el sistema inmunológico del hospedero. En el caso de *Mycobacterium tuberculosis* no encontramos en la literatura estudios similares a los descritos para *P. chaubadi*.

Las interacciones huésped-patógeno se han estudiado previamente en el caso de MTB (Al-Hajoj *et al.*, 2010). No existen, sin embargo, estudios que evidencien el efecto directo de la vacunación sobre la virulencia de este microorganismo. Otros estudios han abordado este tema con microorganismos tales como *Bordetella pertussis*, en los cuales se concluye que la introducción de la vacuna celular completa ha seleccionado cepas de *B. pertussis* con factores de virulencia diferentes a los encontrados en la vacuna. Estas cepas de *B. pertussis* tienen la capacidad de evadir la respuesta inmunológica

suscitada por la vacunación y por lo tanto son capaces de infectar tanto huéspedes vírgenes como huéspedes vacunados, implicando esto una mayor transmisión y prevalencia de estas cepas en las poblaciones estudiadas (Mooi *et al.*, 1998), así como un aumento en la severidad de la enfermedad que estas cepas pueden infligir en huéspedes no inmunizados (Andre & Gandon, 2006). En los datos que presentamos se observa una tendencia similar en el caso de las cepas del genotipo Beijing de MTB, siendo estas capaces de evadir la respuesta inmunológica de hospederos vacunados y producir infección severa al ser infectadas en huéspedes no inmunizados.

La importancia de las cepas del genotipo Beijing en el panorama actual de TB es evidente. Existen estudios que proponen que estar vacunado con BCG podría representar un riesgo para ser infectado por una cepa del genotipo Beijing típico (Kremer *et al.*, 2009). Esto, en conjunto con otras características del genotipo Beijing tales como su alta capacidad de permanecer en tejidos del huésped y su facilidad para adquirir drogoresistencia (Ford *et al.*, 2013), podrían explicar en gran parte el panorama actual de TB, donde las cepas del genotipo Beijing se han colocado como la cepa infectante en más de la mitad de la población enferma con TB en Asia, y 13% de la población enferma con TB a nivel mundial (Chongzhen *et al.*, 2010).

### CONCLUSIONES

A partir de los resultados presentados se concluye que existe una asociación directa de causa-efecto entre la vacunación y el aumento de la virulencia en las cepas del genotipo Beijing (cepas 46 y 48), más no se produce dicho aumento de virulencia en el caso de la cepa del genotipo Euro-Americano (cepa 1).

Aunado a esto se concluye que el aumento en la virulencia de las cepas no depende directamente de la eficacia de la vacuna, debido a que en el caso de la cepa 46 la vacunación con BCG Phipps (de alta protección) produjo la cepa 46P, que resultó hipervirulenta, pero la vacunación con BCG Vietnam (de baja protección) no produjo cambios en la virulencia como se pudo observar en la cepa 46V. A diferencia del caso de la cepa 48, donde fue la vacunación previa con BCG Vietnam la que produjo la cepa 48V, que resultó hipervirulenta en comparación a la cepa 48 parental. Mientras que la cepa 48P, resultante de la vacunación previa con BCG Phipps, no resultó hipervirulenta mediante los tres criterios evaluados.

### **PERSPECTIVAS**

Estudiar la composición genética de las cepas que resultaron hipervirulentas y compararlas con las cepas parentales de las cuales provienen en busca de mutaciones que pudieran ser la causa de los cambios de virulencia observados.

Realizar estudios de proteómica en busca de cambios en la concentración de proteínas relevantes que pudieran ser la causa de los cambios de virulencia observados.

Realizar extracciones de RNA del tejido pulmonar infectado, separarlo en RNA del huésped (ratón) y RNA de la bacteria para realizar estudios de expresión genética y así observar las interacciones hospedero-patógeno durante el proceso de la infección.

Caracterizar la respuesta inmunológica mediante la determinación de citocinas expresadas en pulmón de ratones infectados con las cepas hipervirulentas resultantes de la vacunación previa, y compararlo con la respuesta inmunológica de ratones infectados con las cepas parentales.

**Abebe F, Bjune G** (2006) The emergence of Beijing family genotypes of *Mycobacterium tuberculosis* and low-level protection by bacille Calmette-Guérin (BCG) vaccines: is there a link? *CLIN EXP IMMUNOL* 145:389-397.

**Abramovitch RB, Rohde KH, Hsu FF, Russell DG** (2011) aprABC: A *Mycobacterium tuberculosis* complex-specific locus that modulates pH-driven adaptation to the macrophage *MOL MICROBIOL* 80: 678-694.

**Agerton TB, Valway SE, Blinkhorn RJ, Shilkret KL, Reves R, Schluter W W, Gore B, Pozsik CJ, Plikaytis BB, Woodley C, Onorato IM** (1999) Spread of strain W, a highly drug-resistant strain of *Mycobacterium tuberculosis*, across the United States *CLIN INFECT DIS* 29: 85-92.

**Alcaïs A, Fieschi C, Abel L, Casanova JL** (2005) Tuberculosis in children and adults: two distinct genetic diseases *J EXP MED* 202: 1617-1621.

**Al-Hajoj S, Akkerman O, Parwati I, al-Gamdi S, Rahim Z, van Soolingen D, van Ingen J, Supply P, van der Zanden A** (2010) Microevolution of *Mycobacterium tuberculosis* in a tuberculosis patient *J CLIN MICROBIOL* 48:3813-3816.

**Andre JB, Gandon S** (2006) Vaccination, within-host dynamics, and virulence evolution *EVOLUTION* 60: 13-23.

**Apt A, Kramnik I** (2009) Man and mouse TB: contradictions and solutions *TUBERCULOSIS* 89: 195-198.

**Bergmann JS, Fish G, Woods GL** (2000) Evaluation of the BBL MGIT (Mycobacterial Growth Indicator Tube) AST SIRE system for antimycobacterial susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* to 4 primary antituberculous drugs *ARCH PATHOL LAB MED* 124: 82-86.

**Cardona PJ** (2011) A spotlight on liquefaction: evidence from clinical settings and experimental models in tuberculosis *CLIN DEV IMMUNOL* 2011: 1-9.

**Castillo-Rodal AI, Castañón-Arreola M, Hernández-Pando R, Calva JJ, Sada-Díaz E, López-Vidal Y** (2006) *Mycobacterium bovis* BCG substrains confer different levels of protection against *Mycobacterium tuberculosis* infection in a BALB/c model of progressive pulmonary tuberculosis *INFECT IMMUN* 74: 1718-1724.

**Chongzhen W, Peyron P, Mestre O, Kaplan G, van Soolingen D, Gao Q, Gicquel B, Neyrolles O** (2010) Innate immune responses to *Mycobacterium tuberculosis* Beijing and other genotypes *PLoS ONE* 5:e13594.

**Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, Gordon SV, Eiglmeier K, Gas S, Barry CE 3<sup>rd</sup>, Tekaia F, Badcock K, Basham D, Brown D, Chillingworth T, Connor R, Davies R, Devlin K, Feltwell T, Gentles S, Hamlin N, Holroyd S, Hornsby T, Jagels K, Krogh A, McLean J, Moule S, Murphy L, Oliver K, Osborne J, Quail MA, Rajandream MA, Rogers J, Rutter S, Seeger K, Skelton J, Squares R, Squares S, Sulston JE, Taylor K, Whitehead S, Barrell BG** (1998) Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence *NATURE* 393: 537-544.

**Comas I, Coscolla M, Luo T, Borrell S, Holt KE, Kato-Maeda M, Parkhill J, Malla B, Berg S, Thwaites G, Yeboah-Manu D, Bothamiev G, Mei J, Wei L, Bentley S, Harris SR, Niemans S, Diel R, Aseffa A, Gao Q, Young D, Gagneux S** (2013) Out-of-Africa migration and neolithic coexpansion of *Mycobacterium tuberculosis* with modern humans *NAT GENET* 45:1176-1182.

**Cruz A, Fraga AG, Fountain JJ, Rangel-Moreno J, Torrado E, Saraiva M, Pereira DR, Randall TD, Pedrosa J, Cooper AM, Castro AG** Pathological role of interleukin 17 in mice subjected to repeated BCG vaccination after infection with *Mycobacterium tuberculosis* *J EXP MED* 207: 1609-1616.

**Daniel TM** (2006) The history of tuberculosis *RESPIR MED* 100: 1862-1870.



**Di Pietrantonio T, Correa JA, Orlova M, Behr MA, Schurr E** (2011) Joint effects of host genetic background and mycobacterial pathogen on susceptibility to infection *INFECT IMMUN* 79: 2372-8.

**Druszczynska M, Kowalewicz M, Fol M, Wlodarczyk M, Rudnicka W** (2012) Latent *Mycobacterium tuberculosis* infection- pathogenesis, diagnosis, treatment and prevention strategies *POL J MICROBIOL* 61: 3-10.

**Ewer K, Millington KA, Deeks JJ, Alvarez L, Bryant G, Lalvani A** (2006) Dynamic antigen-specific T-cell responses after point-source exposure to *Mycobacterium tuberculosis*. *AM J RESPIR CRIT CARE MED* 174: 831-839.

**Flynn JL, Chan J** (2003) Immune evasion by *Mycobacterium tuberculosis*: living with the enemy *CURR OPIN IMMUNOL* 15: 450-455.

**Ford CB, Shah RR, Maeda MK, Gagneux S, Murray MB, Cohen T, Johnston JC, Gardy J, Lipsitch M, Fortune SM** (2013) *Mycobacterium tuberculosis* mutation rate estimates from different lineages predict substantial differences in the emergence of drug-resistant tuberculosis *NAT GENET* 45: 784-790.

**Gandon S, Mackinnon MJ, Nee S, Read AF** (2001) Imperfect vaccines and the evolution of pathogen virulence *NATURE* 414: 751-756.

**Ganusov VV, Antia R** (2006) Imperfect vaccines and the evolution of pathogens causing acute infections in vertebrates *EVOLUTION* 60: 957-969.

**Glickman MS, Jacobs WR** (2001) Microbial pathogenesis of *Mycobacterium tuberculosis*: dawn of a discipline *CELL* 104:477-85.

**Guía de Práctica Clínica** (2009) Diagnóstico y tratamiento de casos nuevos de tuberculosis pulmonar México, Secretaria de Salud.

**Harding JS, Schreiber HA, Sandor M** (2011) Granuloma transplantation: an approach to study *Mycobacterium*-host interactions *FRONT MICROBIOL* 2: 1-10.

**Hernández-Pando R, Orozco H, Sampieri A, Pavon L, Velasquillo C, Larriva-Sahd J, Alcocer JM, Madrid MV** (1996) Correlation between the kinetics of Th1/Th2 cells and pathology in a murine model of experimental pulmonary tuberculosis *IMMUNOLOGY* 89: 26-33.

**Hesseling AC, Johnson LF, Jaspan H, Cotton MF, Whitelaw A, Schaaf HS, Fine PEM, Eley BS, Marais BJ, Nuttal J, Beyers N, Godfrey-Faussett P** (2009) Disseminated bacilli Calmette-Guérin disease in HIV-infected South African infants *B WORLD HEALTH ORGAN* 87: 505-511.

**Kaufmann S** (2001) How can Immunology contribute to the control of tuberculosis? *NAT REV IMMUNOL* 1: 20-30.

**Kremer K, van der Laan T, van Soolingen D** (2001) Storage of mycobacterial strains. *Mycobacterium tuberculosis* protocols. Humana press 359-365.

**Kremer K, van der Werf MJ, Au B, Anh DD, Kam KM, van Doorn HR, Borgdorff MW, van Soolingen D** (2009) Vaccine-induced immunity circumvented by typical *Mycobacterium tuberculosis* Beijing strains. *EMERG INFECT DIS* 15: 335-339.

**Kim MJ, Wainwright HC, Locketz M, Bekker LG, Walther GB, Dittrich C, Visser A, Wang W, Hsu FF, Wiehart U, Tsenova L, Kaplan G, Russell DG** (2010) Caseation of human tuberculosis granulomas correlates with elevated host lipid metabolism. *EMBO MOL MED* 2: 258-274.

**Kruif P** (2007) Los cazadores de microbios. Ediciones Leyenda, México.

**Liu J, Tran V, Leung AS, Alexander DC, Zhu B** (2009) BCG vaccines their mechanisms of attenuation and impact on safety and protective efficacy. *HUM VACCINES* 5: 70-78.

**Long GH, Graham AL** (2011) Consequences of immunopathology for pathogen virulence evolution and public health: malaria as a case study *EVOL APPL* 4: 278-291.

**López B, Aguilar D, Orozco H, Burger M, Espitia C, Ritacco V, Barrera L, Kremer K, Hernández-Pando R, Huygen K, van Soolingen D** (2003) A marked difference in pathogenesis and immune response induced by different *Mycobacterium tuberculosis* genotypes. *CLIN EXP IMMUNOL* 133: 30-37.

**Mackinnon MJ, Gandon S, Read AF** (2008) Virulence evolution in response to vaccination: The case of malaria. *VACCINE* 26s: C42-C52.

**Mantel N** (1966) Evaluation of survival data and two new rank order statistics arising in its consideration *CANCER CHEMOTHER REP* 50: 163-170.

**Marquina-Castillo B, García-García L, Ponce-de-León A, Jimenez-Corona ME, Bobadilla-del-Valle M, Cano-Arellano B, Canizales-Quintero S, Martinez-Gamboa A, Kato-Maeda M, Robertson B, Young D, Small P, Schoolnik G, Sifuentes-Osorios J, Hernández-Pando R** (2008) Virulence, immunopathology and transmissibility of selected strains of *Mycobacterium tuberculosis* in a murine model *IMMUNOLOGY* 128:123-133.

**Mooi FR, van Oirschot H, Huevelman K, van der Heide HGJ., Gaastra W, Willems RJL** (1998) Polymorphism in the *Bordetella pertussis* virulence factors P69/pertactin and pertussis toxin in The Netherlands: temporal trends and evidence for vaccine-driven evolution. *INFECT IMMUN* 66: 670-675.

**Nardell EA** (2006) Here today-gone tomorrow: the case for transient acute tuberculosis infection *AM J RESP CRIT CARE* 174: 734-735.

**Nathanson E, Nunn P, Uplekar M, Floyd K, Jaramillo E, Lonroth K, Weil D, Raviglione M** (2010) MDR tuberculosis- critical steps for prevention and control. *N ENGL J MED* 363: 1050-1058.

**O'Garra A, Redford PS, McNab FW, Bloom CI, Wilkinson RJ, Berry MPR** (2013) The immune response in tuberculosis. *ANNU REV IMMUNOL*; 31: 475-527.

**Organización Mundial de la Salud** (2013) Estadísticas sanitarias mundiales [www.who.int](http://www.who.int)

**Palomino JC, Leao SC, Ritacco V** (2007) Tuberculosis 2007. From basic science to patient care. First edition. [www.tuberculosis textbook.com](http://www.tuberculosis textbook.com)

**Pang Y, Song Y, Xia H, Zhou Y, Zhao B, Zhao Y** (2012) Risk factors and clinical phenotypes of Beijing genotype strains in tuberculosis patients in China *BMC INFECT DIS* 12: 1-7.

**Parwati I, Bacht A, Lika A, Rista DS, Tom HO, Adri GM, Van der Meer J, Van Soolingen D, Van Crevel R** (2010a) *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype is an independent risk factor for tuberculosis treatment failure in Indonesia *J INFECT DIS* 201:553-557.

**Parwati I, van Crevel R, van Soolingen D** (2010b) Possible underlying mechanisms for successful emergence of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype strains. *LANCET INFECT DIS* 10: 103-111.

**Reed MB, Domenech P, Manca C, Su H, Barczak AK, Kreiswirth BN, Kaplan G, Barry CE 3<sup>rd</sup>** (2004) A glycolipid of hypervirulent tuberculosis strains that inhibits the innate immune response. *NATURE* 431: 84-87.

**Rubin E** (2006) Patología Estructural. Fundamentos clinicopatológicos en Medicina. McGraw Hill International, España. Cuarta edición. 387-389, 547-549.

**Russell DG** (2007) Who puts the tubercle in tuberculosis? *NAT REV MICROBIOL* 5: 39-47.

**Russell DG, Cardona PJ, Kim MJ, Allain S, Altare F** (2009) Foamy macrophages and the progression of the human TB granuloma *NAT IMMUNOL* 10: 943-948.

**Russell DG, Barry CE, Flynn JL** (2010) Tuberculosis: What we don't know can, and does, hurt us *SCIENCE* 328: 852-856.

**Soysal A, Millington KA, Bakir M, Dosanjh D, Aslan Y, Deeks JJ, Efe S, Staveley I, Ewer K, Lalvani A** (2005) Effect of BCG vaccination on risk of *Mycobacterium tuberculosis* infection in children with household tuberculosis contact: a prospective community-based study *LANCET* 366: 1443-51.

**Spiegel MR, Schiller RA** (2007) Análisis de la varianza Probabilidad y Estadística 2ª edición McGraw-Hill, México D.F. 335-371.

**Stokes RW, Waddell SJ** (2009) Adjusting to a new home: *Mycobacterium tuberculosis* gene expression in response to an intracellular lifestyle. *FUTURE MICROBIOL* 4: 1317-1335.

**STOP TB Partnership** (2012) [www.stoptb.org](http://www.stoptb.org)

**World Health Organization** (2009) Treatment of Tuberculosis Guidelines. Geneva, Switzerland.

**World Health Organization** (2011) Global Tuberculosis Control. Geneva, Switzerland.

**World Health Organization** (2013) Global tuberculosis report 2013. Geneva, Switzerland.

**Zambrano-Villa S** (2007) Inmunología Básica y Clínica 1ª edición McGraw-Hill Interamericana 380.

**Zumla A, Raviglione M, Hafner R, von Reyn CF** (2013) Tuberculosis *N ENGL J MED* 368: 745-755.