



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**VIRULENCIA, INMUNOPATOLOGÍA Y TRANSMISIBILIDAD
ESTUDIADAS EN UN MODELO MURINO CON CEPAS
SELECCIONADAS DE *M. tuberculosis* DE ESTUDIOS
EPIDEMIOLÓGICOS EN COLOMBIA.**

T E S I S

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias**

PRESENTA:

MARÍA FERNANDA CORNEJO GRANADOS

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Rogelio E. Hernández Pando
Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

COMITÉ TUTOR

Dr. Raúl Mancilla
Instituto de Investigaciones Biomédicas (UNAM)

Dra. Bertha Espinosa
Instituto de Investigaciones Biomédicas (UNAM)

MÉXICO, D. F. mayo, 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

Este trabajo de tesis se realizó bajo la dirección del Dr. Rogelio Hernández Pando en el laboratorio del departamento de Patología Experimental del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”.

El comité tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por la Dra. Bertha Espinoza Gutiérrez y Dr. Raúl Mancilla Jiménez del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

Este proyecto fue apoyado por el convenio número 037919 entre la Comisión 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 de esta tesis recibió el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) con el número de becario 443238 para realizar los 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.

Se agradece también el apoyo del grupo del Dr. Luis F. García del Instituto de Investigaciones Médicas de la Universidad de Antioquía en Medellín, Colombia por proporcionarnos los seis aislados clínicos de *M. tuberculosis* utilizados para este trabajo.

A mis padres por todo el apoyo y la confianza para seguir mis sueños.

A mi hermana, eres de las personas más importantes en mi vida.

*A todos mis compañeros de laboratorio, sin duda hicieron este proceso
más divertido.*

*A mi mejor amigo, por cambiar mi visión de las cosas y ayudarme a ser
una mejor persona.*

*Al Dr. Rogelio Hernández por permitirme ser parte de su equipo de
trabajo.*

A todas las personas que me acompañaron durante estos dos años.

Los quiero.

ÍNDICE

I. ABREVIATURAS	1
II. RESUMEN	3
III. INTRODUCCIÓN	4
1. Generalidades de la tuberculosis	4
2. Características de las micobacterias.....	5
a) Clasificación.....	6
b) Fisiología y crecimiento.....	7
c) Características de la pared celular.....	7
3. Transmisión y diagnóstico.....	13
4. Respuesta inmune	14
5. Modelo experimental murino de tuberculosis pulmonar progresiva.....	17
6. Tratamiento	19
7. Influencia de la variación genética entre cepas	21
8. Distribución geográfica e importancia de los contactos	23
IV. ANTECEDENTES	27
V. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	29
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	31
VII. RESULTADOS	42
1. Curvas de crecimiento de las cepas de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	42
2. Carga bacilar y sobrevida en los ratones del experimento de virulencia	43
3. Carga bacilar y sobrevida en los ratones del experimento de convivencia.....	48
4. Análisis histológico y morfométrico de los pulmones en el experimento de virulencia	51
5. Análisis histológico de los pulmones en el experimento de convivencia	62
6. Cuantificación de citocinas.....	64
VIII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	70
1. Experimento de virulencia	71

2. Experimento de convivencia	76
IX. CONCLUSIONES	80
X. PERSPECTIVAS	81
XI. APÉNDICE	82
XII. REFERENCIAS	85

I. ABREVIATURAS

ARN	Ácido ribonucléico
ARNm	Ácido ribonucléico mensajero
BALB/c	Cepa de la especie <i>Mus musculus</i> utilizada en investigación
BCG	<i>M. bovis</i> cepa BCG (Bacilo de Calmette y Guérin)
CD	Células dendríticas
cDNA	Ácido desoxirribonucléico codificante
CFP-10	Filtrado de cultivo antigénico 10 kDa
D.O.	Densidad óptica
EDTA	Ácido etilén-diamino-tetra-acético
ESAT-6	Antígeno de secreción temprana 6 kDa
Fc	Fracción cristalizable
GAPDH	Gliceraldehído 3 fostafo deshidrogenasa
GMM	Monomicolato de glucosa
IGRA	Ensayo de liberación de IFN γ
IL	Interleucina
IFN γ	Interferón gamma
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
LAM	Familia de <i>M. tuberculosis</i> Latinoamericano-Mediterráneo
LAM	Lipoarabinomanano

MDR	Multidrogorresistente
MHC I	Complejo principal de hitocompatibilidad tipo I
MHC II	Complejo principal de histocompatibilidad tipo II
Mtb	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
mRNA	Ácido ribonucléico mensajero
rRNA	Ácido ribonucléico ribosomal
tRNA	Ácido ribonucléico de transferencia
NOS	Especies reactivas de nitrógeno
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos y salina
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PAMPs	Patrones Molecular Asociado a Patógenos
PMN	Polimorfonucleares
PPD	Derivado protéico purificado de <i>M. tuberculosis</i>
PRRs	Receptores de reconocimiento de patrones
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
RD1	Región de difereciación 1
ROS	Especies reactivas del oxígeno
rpm	Revoluciones por minuto
RPMI	Medio Roswell Park Memorial Institute
RT-PCR	Reacción de transcripción acoplada a la PCR

Tb	Tuberculosis
TCD4+	Linfocitos T cooperadores
TCD8+	Linfocitos T citotóxicos
TDM	Dimicolato de trehalosa
TGF β	Factor de crecimiento transformante tipo beta
Th1	Linfocitos T cooperadores tipo 1
Th17	Linfocitos T cooperadores tipo 17
Th2	Linfocitos T cooperadores tipo 2
TLR	Receptor tipo toll
TMM	Monomicolato de trehalosa
TNF α	Factor de necrosis tumoral alfa
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana

II. RESUMEN

El complejo *Mycobacterium tuberculosis* era considerado un grupo de bacterias altamente conservado genéticamente, sin embargo, en la última década, gracias al desarrollo de técnicas moleculares se ha descubierto que existe una amplia variabilidad en los genotipos de los diferentes miembros del complejo. Además, datos epidemiológicos sugieren que las diferencias entre la virulencia y transmisibilidad de las diversas cepas pueden estar influenciados por el fondo genético no solo de los microorganismos, sino también del hospedero.

Para este estudio, se seleccionaron 6 cepas de *Mycobacterium tuberculosis* basados en estudios clínicos/epidemiológicos de pacientes con tuberculosis pulmonar en Colombia y se probaron en un modelo murino de tuberculosis pulmonar progresiva con ratones BALB/c, con el fin de examinar el curso de la infección en términos de virulencia (sobrevida, carga bacilar, daño histopatológico), respuesta inmunológica (expresión de citocinas) y transmisibilidad (carga bacilar y daño histopatológico en ratones sanos que convivieron con ratones infectados).

Los resultados mostraron que a pesar de que todas las cepas pertenecen al mismo linaje (latinoamericano mediterráneo), se desarrollaron distintos patrones de la enfermedad: 1) con dos de las cepas se observó baja supervivencia, alta carga bacilar y daño tisular importante (necrosis); 2) con el resto de las cepas se presentó un mayor tiempo de supervivencia, menor carga bacilar y la formación de granulomas y neumonía; 3) el perfil de citocinas que se observó en las cepas capaces de desarrollar necrosis corresponde con una respuesta inflamatoria de aparición temprana, rápida y poco sostenida; 4) las 6 cepas fueron capaces de transmitirse a animales sanos desde los primeros 30 días de convivencia.

Por lo tanto, podemos decir que, tanto el fondo genético del organismo como del hospedero, así como diferencias sutiles entre los diferentes linajes de bacterias pueden afectar la progresión de la enfermedad.

III. INTRODUCCIÓN

1. Generalidades de la tuberculosis

Actualmente, la tuberculosis (Tb) sigue siendo considerada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como la segunda causa de muerte alrededor del mundo causada por un sólo agente infeccioso. Desde 1993, fue declarada situación de emergencia global en salud pública y ha sido asociada a países en desarrollo con condiciones sociales de pobreza y desnutrición, mientras que en países desarrollados, representa una enfermedad reemergente (WHO, 2013).

Para el 2012, la OMS reportó cerca de 8.6 millones de casos de Tb alrededor del mundo, la mayoría de los cuales se encontraron en el sureste de Asia (29%), África (27%) y en el Pacífico Oeste (19%). De los casos mundiales reportados, aproximadamente entre 12-14% corresponden a personas co-infectadas con VIH (Virus de Inmunodeficiencia Humana) (WHO, 2013) (Figura 1).

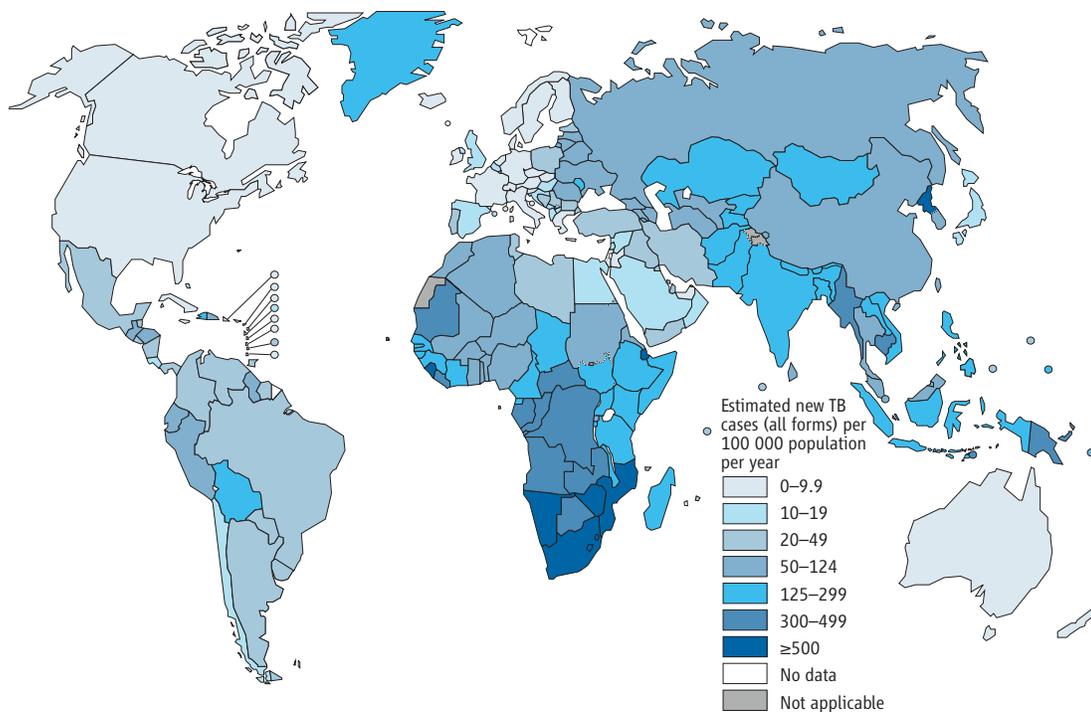


Figura 1. Incidencia estimada de casos nuevos de Tb en el 2012 alrededor del mundo (WHO, 2013)

El aumento en la incidencia de Tb en regiones de África subsahariana y algunas regiones de Asia en las últimas dos décadas se ha atribuido a factores como la pandemia de VIH, la pobreza y al surgimiento de cepas multidrogoresistentes (MDR) (Santos *et al*, 2012). Además, se estima que del total de casos reportados alrededor del mundo 3.7% son diagnósticos recientes (aproximadamente 5.8 millones de casos) y un 20% (0.4 millones) son casos tratados previamente que se estima corresponden a cepas MDR. Por otro lado, la presencia de Tb extensamente drogorresistente (XDR) se ha reportado hasta el momento en 92 países y se calcula que corresponde al 9.6% de los casos con cepas MDR (WHO, 2012).

- Incidencia en América Latina.

Para el año 2012 la OMS reportó en América Latina 19 mil muertes causadas por Tb en todas sus formas y una incidencia de 29 casos por cada 100 000 habitantes, (incluyendo las co-infecciones con VIH).

En México, para el mismo año, se estimó una incidencia de 23 casos por cada 100 000 habitantes, incluyendo las co-infecciones con VIH, donde el 90 % de los casos totales se calculó que corresponden a casos de Tb pulmonar y 2.4% a casos nuevos con cepas MDR (WHO, 2013).

Por otro lado, en Colombia, se reportó una incidencia de 33 casos de Tb en todas sus formas por cada 100 000 habitantes, incluyendo las co-infecciones con VIH y de estos aproximadamente el 80% corresponden a casos de Tb pulmonar (WHO, 2013)

2. Características de las micobacterias.

El agente etiológico de la Tb es *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), el cual se ha caracterizado de la siguiente manera:

a) Clasificación

Filogenéticamente, las micobacterias están clasificadas dentro del reino Monera, filo Actinobacterias, orden Actinomycetales, suborden Corynebacterineae, familia Mycobacteriaceae, del género *Mycobacterium*. Tradicionalmente, el complejo *Mycobacterium tuberculosis* comprende 8 subgrupos: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. canetti*, *M. caprae*, *M. pinnipedii* y *M. mungi* (Brosh et al., 2002). Y actualmente, se propuso incluir al subgrupo *M. orygis*, aunque no se han reportado casos de enfermedad en humanos por esta especie (van Ingen et al., 2012) Todas, con la capacidad de reproducirse *in vitro* (Pérez-Martínez et al., 2008; Murray et al., 2006).

De todas estas especies, *M. tuberculosis*, *M. africanum* y *M. canetti* tienen como hospedero natural exclusivamente al ser humano, además que *M. bovis* causa Tb en bovinos y puede transmitir la enfermedad a los humanos (Brooks et al., 2002; Brosh et al., 2002).

La clasificación de estas bacterias en el género *Mycobacterium* se da en función de: 1) su capacidad de ácido-resistencia (Figura 2); 2) la presencia de ácidos micólicos con 60 a 90 átomos de carbono y 3) un elevado contenido (61%-71%) de guanosina-citosina (G-C) en su DNA (Brooks et al., 2002).

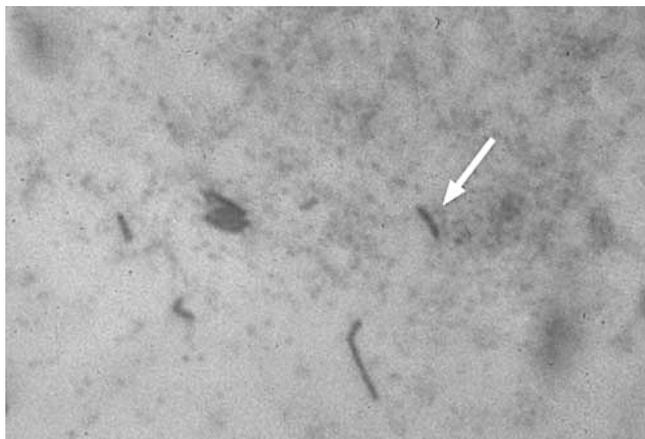


Figura 2. Tinción Ziehl-Neelsen del bacilo *M. tuberculosis* (Williams, 2007).

b) Fisiología y crecimiento

Las micobacterias son bacilos aerobios obligados, inmóviles y no esporulados que al microscopio se observan con un tamaño aproximado de 0.2 a 0.6 μm x 1 a 10 μm , son de crecimiento lento y fueron descritos inicialmente por Roberto Koch en 1882 (Murray *et al.*, 2006).

El crecimiento de estas bacterias se logra sembrando en agar semisintético (ej. Middlebrook 7H10 con OADC) que contiene sales de amonio, ácido oléico, albúmina, catalasa, biotina, glicerol y glucosa, además de verde de malaquita como inhibidor de hongos y otras bacterias. Si se trata de un cultivo líquido, se agrega el detergente Tween₈₀ al 0.05% lo que permite un crecimiento más rápido y de forma dispersa al disminuir la tensión superficial disgregando a los bacilos tuberculosos. Estos sobreviven por períodos prolongados en esputo seco y en especial, Mtb tolera las bajas presiones de oxígeno. Por otro lado, son sensibles al calor, rayos UV y al fenol (Sherris, 2005).

c) Características de la pared celular

Una de las características más sobresalientes del género es su pared celular, la cual es responsable de la integridad estructural de las bacterias, además, influye en características como la resistencia a la decoloración ácida, lo que implica que para ser observadas al microscopio de campo claro se necesitan tinciones diferenciales como la de Ziehl-Neelsen (Figura 2). Otras características que surgen por la naturaleza de la pared celular, son: el crecimiento lento, la formación de agregados, la resistencia a detergentes e incluso la resistencia a algunos antibióticos (Murray *et al.*, 2006; Brooks *et al.*, 2002)

Se trata de estructura compleja y rica en lípidos, los cuales representan hasta el 60% del peso seco de la bacteria y a lo largo de sus capas se intercalan proteínas que constituyen el 15% de su peso (Barrera, 2007; Murray *et al.*, 2006).

La capa más interna es la membrana plasmática, constituida por lípidos como dimicoserosato, glicolípidos fenólicos, trehalosa, sulfolípidos, manósido de fosfatidilinositol y lipoarabinomanano (LAM). La proporción de cada uno de ellos varía dependiendo de cada especie y puede variar también a lo largo del ciclo de vida de la bacteria, dependiendo de la disponibilidad de lípidos en el medio (Barrera, 2007). Después, se encuentra una capa de peptidoglicano que forma el esqueleto básico de la pared, donde se unen los arabinogalactanos que son polisacáridos ramificados formados de D-arabinosa y D-galactosa. El residuo terminal de D-arabinosa se esterifica para dar lugar a ácidos micólicos hidrofóbicos de alto peso molecular, donde se anclan moléculas de glucolípidos de superficie (Murray *et al.*, 2006) (Figura 3).

En las etapas tempranas de la infección, las moléculas presentes en la parte más expuesta de la pared celular de la micobacteria interactúan con las células del sistema inmune como macrófagos y células dendríticas, siendo capaces de modificar el patrón de producción de citocinas, la frecuencia de presentación de antígenos y la activación de linfocitos T, también, pueden inhibir diferentes mecanismos microbicidas (Barrera, 2007).

Esta riqueza de lípidos en su pared celular, ocasiona que la captación de nutrimentos se vea restringida y esto contribuye a que el crecimiento de las bacterias sea lento (tiempo de duplicación aproximado de 18h) además que las hace resistentes a agentes químicos como los ácidos, los álcalis y al acetil-piridino de sodio (reactivo utilizado para preservar las muestras de esputo) (Murray *et al.*, 2006).

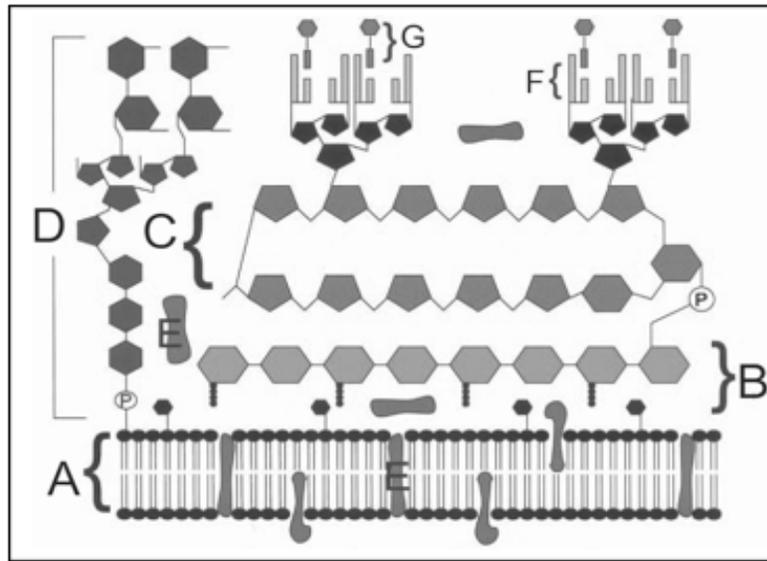


Figura 3. Estructura de la pared celular micobacteriana. Consta de (A) membrana plasmática, (B) peptidoglicano, (C) arabinogalactano, (D) lipoarabinomano con cabezas de manosa, (E) proteínas asociadas a la membrana plasmática y la pared celular, (F) ácidos micólicos y (G) moléculas de glucolípidos de superficie asociados a los ácidos micólicos (Murray *et al.*, 2006)

De manera un poco más profunda, los principales componentes de la pared celular de la micobacteria, son:

Lipoarabinomano (LAM)

El LAM es el glicolípido más abundante y exclusivo del género *Mycobacterium*. Se han descrito tres clases diferentes de este glicolípido, cuyas variantes estructurales han demostrado producir patrones diferentes de modulación inmune: 1) El LAM con cabeza de manosa (ManLAM) está presente en las cepas virulentas Erdman y H37Rv y en las cepas avirulentas H37Ra y BCG. Se caracteriza por una extensa cabeza de manosa en el extremo de arabino terminal del LAM. Este lípido es el más abundante en el complejo Mtb; 2) LAM con cabeza de fosfoinositol (PILAM)

que se encuentra en micobacterias de crecimiento rápido como *M. smegmatis* y *M. fortuitum* y 3) AraLAM el cual carece de manosa en el extremo arábino terminal y fue descrito en la especie de crecimiento rápido *M. chelonae* (Petros *et al.*, 2004).

Se ha observado que estos lípidos tienen efecto en la regulación del sistema inmune, por ejemplo, AraLAM pero no ManLAM induce quimiotaxis de macrófagos derivados de monocitos y monocitos de sangre periférica (Bernardo *et al.*, 1998), además, en un modelo de ratón, la administración intratraqueal de AraLAM o BCG LAM induce reclutamiento de neutrófilos a los pulmones, mientras que ManLAM administrado intratraquealmente no es capaz de inducir esta migración (Petros, *et al.*, 2004). Otro dato interesante es que mientras que el ManLAM proveniente de *M. leprae* estimula la proliferación de clonas de células T α/β , este efecto no se observa con la estimulación con ManLAM de Mtb, sugiriendo de manera importante que las diferencias estructurales de esta familia de lípidos tiene un impacto en las diferencias de actividad inmune y funcionan como una estrategia para las cepas de Mtb. (Petros *et al.*, 2004). Por otro lado, en cuanto a la secreción de citocinas, AraLAM es un potente inductor de TNF α , mientras que ManLAM de cepas virulentas induce poco o nada TNF α en macrófagos (Emoto *et al.*, 1999); PILAM también se ha reportado que dispara la producción de IL-8, TNF α e IL-12 e induce la apoptosis en las células del hospedero infectado, mientras que AraLAM no es capaz de desencadenar este tipo de respuesta (Emoto *et al.*, 1999).

Ácidos micólicos

Los ácidos micólicos están presentes en otros géneros de bacterias gram-positivas como *Corynebacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus* que contienen tanto ácidos micólicos largos y complejos como cortos y simples. Sin embargo, los miembros del género *Mycobacterium* son completamente

dependientes de ellos para su crecimiento y sobrevivencia tanto *in vitro* como *in vivo*, además de que son los ácidos más largos en la naturaleza (C60-C90) (Petros *et al.*, 2004).

Estructuralmente son ácidos grasos de cadena larga β -hidroxilados que de manera general se pueden representar como en la Figura 4, donde el “motivo micólico” contiene cadenas alquílicas largas no funcionales y la “cadena de meromicolato” que generalmente contiene hasta dos grupos funcionales (X y Y). Generalmente están unidos a la pared celular a través de ésteres formados entre el grupo ácido y el alcohol del azúcar que son frecuentemente pentarabinosa tetramicolatos. También están presentes en forma de ésteres solventes como mono- y di- mocolatos de trehalosa (TMM y TDM), monomicolato de glucosa (GMM), glicerol monomicolato y como ácidos micólicos libres. (Verscoor *et al.*, 2012, Beket *et al.*, 2011).

En particular la trehalosa 6,6'-dimicolato (TDM), también conocida como “factor cordón”, es la más prominente y mejor estudiada de estas moléculas, muestra una amplia variedad de propiedades inmunomodificadoras, sirve como adyuvante cuando se co-administra con una proteína antigénica y tiene actividad antitumoral y proangiogénica. (Petros *et al.*, 2004), también, se ha relacionado directamente con la inhibición de la fusión del fagolisosoma ya que inhibe la unión entre vesículas de fosfolípidos *in vitro* (Petros *et al.*, 2004)

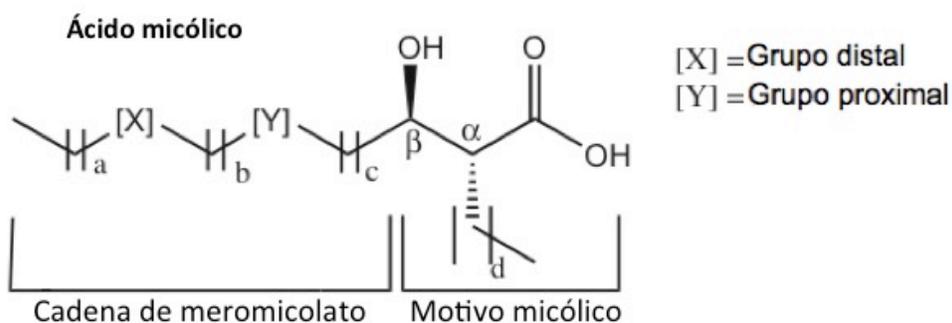


Figura 4. Estructura general del ácido micólico. Las cadenas de metileno de diferente longitud se indican con las letras de la a-d (Verschoor *et al.*, 2011).

Esta compleja mezcla de ácidos micólicos, peptidoglicanos y arabinolactanos en la pared celular de la micobacteria media la respuesta inflamatoria de activación de macrófagos y células dendríticas a través de TLR2 y TLR4. (Verschoor *et al.*, 2011). También, hay otros componentes de la pared celular que funcionan como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) y que pueden activar y/o modular la actividad de la respuesta inmune, estos incluyen los lipoglicanos (ej. LAM), el TDM, la lipoproteína de 19kDa, que estimula TLR2, sulfolípidos y el fitocerol dimicoserato (Verschoor *et al.*, 2011)

Con el fin de establecer una mejor relación entre la presencia de los diferentes lípidos y la respuesta que se obtiene del sistema inmune han surgido diferentes estudios, por ejemplo Beken *et al.* (2011) demostró que los ácidos micólicos libres son capaces de despertar una respuesta similar a la que se observa cuando hay una infección con Mtb, como la liberación de citocinas pro-inflamatorias por macrófagos y la acumulación de células espumosas, también Verschoor *et al.*, (2011) reportó que la posición en que se encuentran los grupos funcionales de los ácidos micólicos, es importante para determinar el impacto que tendrán en el sistema inmune. Por otro lado, Korf *et al.* (2005) examinó esta relación utilizando macrófagos y ácidos micólicos aislados y observó que después de la fagocitosis por macrófagos murinos, los ácidos micólicos podían ser localizados dentro de los fagosomas. La falta de inhibición en la maduración del fagosoma y su acidificación contrasta con lo que sucede cuando la micobacteria completa se encuentra presente, ya que esta es capaz de inhibir la respuesta de fagocitosis como una estrategia de sobrevivencia. Por otro lado, la administración de ácidos micólicos directamente en las vías aéreas imita otros aspectos de la infección con Mtb. Así, similar al reclutamiento de neutrófilos, monocitos y linfocitos que se observa en pacientes, los ácidos micólicos desencadenan una inflamación aguda por neutrófilos en la vía aérea acompañado por una producción moderada y crónica de IL-12 (Korf *et al.*, 2005).

Además de estos lípidos, se han descrito otros componentes de las micobacterias que tienen un efecto inmunomodulador en células *in vitro*, por ejemplo, las

proteínas secretadas ESAT-6, la lipoproteína de 19kDa, hsp65 y hsp70, los glicolípidos asociados a la pared como glicolípido fenólico, el glicerol mononicolato y los precursores de LAM (fosfatidilinositol manósidos). Se ha reportado que todas estas moléculas pueden actuar señalizando a través de su unión con receptores tipo Toll (2 y/o 4) o por medio de lectinas tipo C (DC-SIGN o receptores de manosa) (Petros *et al.*, 2004; Emoto *et al.*, 1999).

3. Transmisión y diagnóstico

Aunque la Tb se puede presentar en primates y en animales de laboratorio, el ser humano constituye el único reservorio natural de Mtb. La infección se transmite principalmente por vía aérea, por la inhalación del microorganismo que se encuentra en las gotitas expulsadas al toser o estornudar por una persona con una infección activa. La bacteria se establece principalmente en los pulmones, sin embargo, es capaz de diseminarse por vía hematogena a diferentes órganos del cuerpo (Hernández-Pando *et al.*, 2007).

Se estima que alrededor del 5% de los pacientes expuestos a Mtb evoluciona hasta desarrollar la enfermedad activa a lo largo de los 2 años siguientes y entre un 5 -10% desarrolla la enfermedad en una fase posterior (Gagneux *et al.*, 2005).

La sintomatología de la enfermedad suele comenzar con síntomas inespecíficos como malestar general, adelgazamiento, tos y sudoración nocturna, mientras que el esputo puede ser escaso o hemoptísico y purulento. Actualmente, el diagnóstico clínico se apoya de: 1) indicios radiológicos de enfermedad pulmonar, 2) resultados positivos en la prueba de reactividad cutánea (PPD) y 3) detección de micobacterias al microscopio o en cultivos (Murray *et al.*, 2006)

A pesar de los esfuerzos por décadas para desarrollar métodos que hagan el diagnóstico de la enfermedad más eficiente, se siguen utilizando métodos con baja sensibilidad y especificidad. La baciloscopía se sigue utilizando como método

rutinario de diagnóstico a pesar de que tiene 125 años desde su aparición y se estima que falla en detectar hasta la mitad de los casos (Small *et al.*, 2010).

Actualmente, se han desarrollado algunos métodos de diagnóstico molecular que permiten detectar la infección y los casos con resistencia a algunos antibióticos en tiempos cortos. Algunos de estos métodos han conseguido el apoyo de la OMS para su distribución en el mundo, sin embargo, su costo las hace inaccesibles para la mayoría de los laboratorios que se encuentran en países en desarrollo con alta incidencia de la enfermedad (Small *et al.*, 2010). Como ejemplos de estos ensayos aprobados para su uso comercial al menos en EEUU están los que se basan en la liberación de interferón gama (IFN γ) para el diagnóstico, como Quantiferon-Tb Gold y el T-spot Tb test.

Por otro lado, en estudios que comparan la capacidad de transmisión de cepas tanto sensibles y resistentes a fármacos, no se han encontrado diferencias entre la probabilidad de contagio si el caso índice está infectado con uno u otro tipo de cepa. Y se ha observado que la carga bacilar del esputo, la ventilación de la vivienda, el hacinamiento o el compartir recámara con el caso índice son factores que están más asociados con la capacidad de transmisión de la enfermedad que la sensibilidad de la bacteria a ciertos medicamentos (Teixeira *et al.*, 2001).

4. Respuesta inmune

A la enfermedad que se desarrolla como resultado de la infección inicial de una persona que no ha estado en contacto previo con el microorganismo se le llama Tb primaria. Este primer contacto desencadena una serie de mecanismos en la respuesta inmune que definen el curso de la infección, sin embargo, la intensidad y eficiencia de estos mecanismos no se presenta de forma homogénea en todas las personas, ya que la mayoría no desarrolla la enfermedad a pesar de estar infectados durante muchos años. (Hernández-Pando *et al.*, 2012)

La respuesta inmune del hospedero contra la infección por Mtb, tanto en humanos como en ratones, está controlada principalmente por la activación de macrófagos

inducida por citocinas tipo Th1. El IFN γ y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) juegan un papel importante en este mecanismo induciendo esta activación y la expresión de la óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS). La presencia de óxido nítrico, al menos en ratones, es importante para matar a las micobacterias intracelulares, también, el IFN γ junto con la IL-12 han mostrado ser citocinas esenciales en el control de la infección por Mtb tanto en ratones como en humanos (Verschoor *et al.*, 2011), sin embargo, toda esta actividad protectora falla cuando hay liberación de citocinas tipo Th2 en mayor concentración a las Th1 (López *et al.*, 2003)

Dentro de los mecanismos de respuesta inmune contra las micobacterias, se consideran importantes el papel de los granulomas y de los macrófagos alveolares para la contención inicial de la infección, ambos se han descrito de la siguiente manera:

- Un granuloma se considera una estructura característica, mas no exclusiva, de la tuberculosis (Rubin EJ, 2009). Se define como un agregado compacto de células inmunes, generalmente macrófagos activados, neutrófilos, células dendríticas y linfocitos T CD4+ productores de citocinas como IFN γ e IL-2 que surgen por la presencia persistente de un estímulo (Ramakrishnan L, 2012). En el modelo murino de Tb descrito por Hernández-Pando *et al* (1996), se considera que el clímax de esta respuesta es al día 21, cuando los granulomas alcanzan su plena madurez.

Muchas hipótesis que sugieren que los granulomas limitan el crecimiento de las bacterias dominaban la literatura hasta hace poco tiempo, ya que muchas personas que nunca mostraron signos de una enfermedad activa tienen evidencias de granulomas curados e incluso estériles, sin embargo, el uso de nuevos modelos animales como el pez cebra permiten una visualización de la interacción entre el hospedero y las bacterias vivas de manera más directa y ha dado algunos indicios de que la formación de

granulomas podría ayudar a la proliferación bacteriana (Broussard y Ennis, 2009).

- Los macrófagos activados, fagocitan a las bacterias opsonizándolas por medio de moléculas C3b del complemento, inmunoglobulinas (IgG), proteínas de unión a manosa, así como por el factor surfactante A (Gorocica, 2005). Estas células activadas, se caracterizan morfológicamente por el aumento de tamaño del citoplasma y por una membrana rugosa, así como por una gran actividad fagocítica y microbicida. Posteriormente, estos macrófagos pueden sufrir cambios adicionales, se pueden fusionar en células gigantes o diferenciarse a células espumosas que se caracterizan por la acumulación de lípidos. Estudios *in vitro* sugieren que la respuesta de los macrófagos depende del tipo de receptor que la bacteria utilizó para entrar (Zuñiga *et al.*, 2011), por ejemplo, la fagocitosis a través de IgG o receptores Fc aumenta la producción de los intermediarios reactivos de oxígeno y promueve la fusión de los fagosomas que contienen a las bacterias con los lisosomas. En contraste, la interacción con el receptor 3 del complemento (CR3) impide el estallido respiratorio y bloquea la maduración de los fagosomas previniendo su fusión con los lisosomas, este mismo efecto se ha observado por la retención de la proteína TACO (tryptophan aspartate-containing coat) presente en los fagosomas, los cuales, al tener limitada la acidificación evitan la asociación física con iNOS y así la bacteria evita ser eliminada (Hernández-Pando, 2007).

Si la bacteria es destruida, se generan antígenos que pueden ser presentados en el contexto de MHCI o MHCII, o en el caso de los antígenos de naturaleza glicolipídica, son acoplados a moléculas CD1 y presentados a linfocitos CD8+ para poder continuar con la producción de citocinas. Por otro lado, dentro de los receptores TLR, que pertenecen a la respuesta inmune innata, el TLR-2 y TLR-4 son activados por varios componentes de Mtb. Por ejemplo, el TLR-4 reconoce a la glicoproteína de 38 kDa y su

activación induce un perfil de citocinas protectoras y óxido nítrico, mientras que el TLR-2 reconoce al LAM y a la lipoproteína de 19 kDa (Hernández-Pando, 2007). Una vez infectados, los macrófagos se transportan por los vasos linfáticos hacia los ganglios linfáticos hiliares, de donde se pueden diseminar por la sangre y la linfa hacia el hígado, bazo, hueso, riñón, cerebro y meninges y así diseminarse por todo el cuerpo (Hernández-Pando, 2007).

Se calcula que cerca del 90% de las personas, son capaces de hacer frente a la primoinfección de manera adecuada, deteniendo la replicación bacteriana y evitando la progresión a la enfermedad, sin embargo, las bacterias en éstas personas pueden permanecer latentes dentro de los granulomas, con un estado no replicativo y un ritmo metabólico bajo, representando un riesgo de reactivación si las defensas del hospedero llegan a disminuir (Hernández-Pando, 2007; Sherris, 2005). Este resurgimiento de la enfermedad cuando hay un desequilibrio en el sistema inmunológico es un caso común en pacientes con VIH, pacientes bajo tratamiento con corticoesteroides o en personas con edad avanzada (Rubin EJ, 2009; Sherris, 2005).

5. Modelo experimental murino de tuberculosis pulmonar progresiva

Debido a que en esta enfermedad se involucran una gran cantidad de factores, se han desarrollado modelos animales que faciliten su estudio. Uno de estos modelos es el desarrollado por el Dr. Hernández-Pando (1996) que presenta la evolución de la enfermedad en dos fases discernibles, la fase temprana (aguda) y la fase tardía (progresiva) (Hernández-Pando *et al.*, 1996)

Este modelo se basa en el uso de ratones macho BALB/c de 6 a 8 semanas de edad, a los cuales se les introduce la cepa H37Rv de Mtb vía intratraqueal a una

dosis aproximada de 2.5×10^5 bacterias vivas suspendidas en 100 μ L de solución salina.

En las primeras semanas post infección, la fase temprana está controlada por una alta producción de citocinas tipo Th1 (Tabla I) que junto con los altos niveles de iNOS y TNF α limitan la infección. Histológicamente se llega a observar infiltrado inflamatorio en el pulmón constituido principalmente por macrófagos y linfocitos en el intersticio alveolo-capilar, alrededor de vénulas y bronquios, además de la formación de granulomas descritos previamente que son la estructura característica de la enfermedad (Figura 6-A) (Hernández-Pando *et al.*, 1996)

Aproximadamente 3 semanas después del inicio de la infección, la expresión de las citocinas tipo Th1 decae y aumenta la cantidad de IL-4 y de factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), además, gradualmente las áreas neumónicas comienzan a dominar sobre los granulomas. La neumonía junto con la alta carga bacteriana son lo que eventualmente llevan a la muerte de los animales (Figura 5) (Hernández-Pando, *et al.* 1996, 2012; Aguilar *et al.*, 2010; López *et al.*, 2003)

Como se observa en la Figura 6, el modelo muestra una correlación entre el aumento de la carga bacilar, el aumento del daño tisular y la disminución de la sobrevivencia de los animales. Esto nos permite caracterizar de manera más amplia la manera en que se desarrolla la enfermedad cuando se utiliza una cepa distinta a H47Rv.

Tabla I. Lista de citocinas que participan en la etapa temprana y progresiva de la enfermedad.

Citocinas presentes en la fase temprana	Citocinas presentes en la fase progresiva.
IL-2	IL-4
IFN γ	IL-5
IL-12	IL-6
IL-8 (CXCL8)	IL-10
TNF α	IL-13
Quimiocinas CCL2 (MCP1)	TGF- β

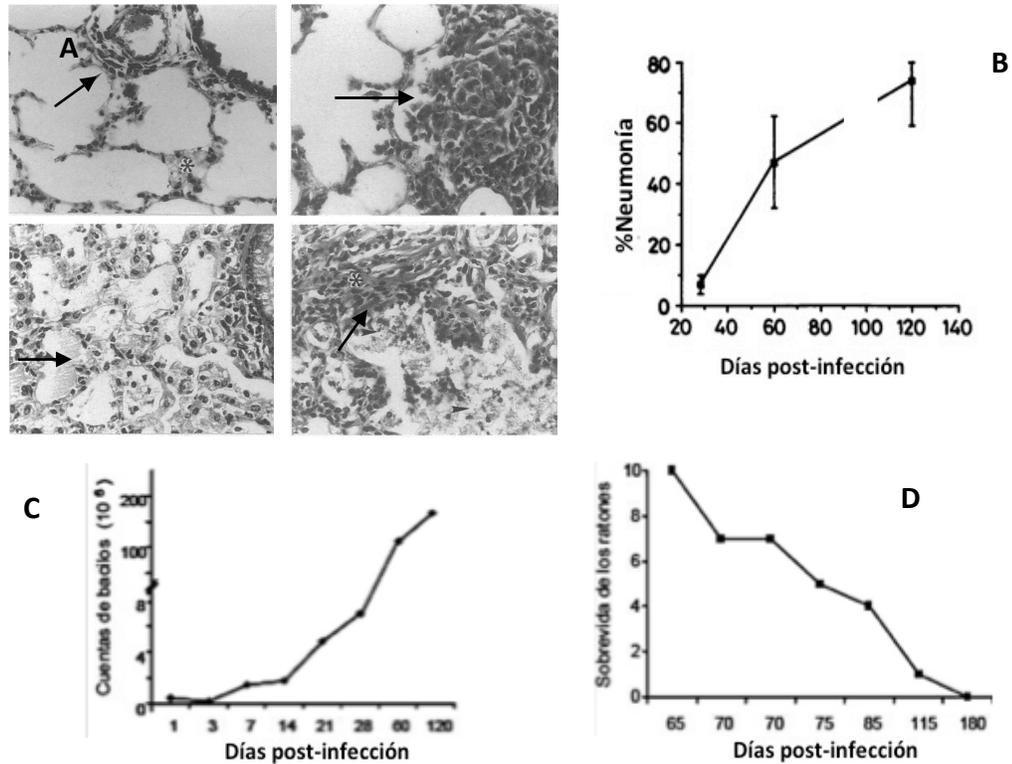


Figura 5. Características de la respuesta que se observa en el modelo murino de tuberculosis progresiva. Se muestran imágenes representativas de los diferentes parámetros que describen el comportamiento del modelo. En este caso, los ratones fueron infectados con la cepa de referencia H37Rv. **A.** Imágenes representativas del análisis histológico de los pulmones en la fase temprana (imágenes superiores) y la fase progresiva (imágenes inferiores) de la enfermedad. **B.** Gráficas de la medición del porcentaje de neumonía a lo largo del experimento. **C.** Gráfica del crecimiento de la carga bacilar presente en los pulmones. **D.** Gráfica de sobrevida de los ratones infectados a lo largo del experimento (Hernández-Pando, *et al.* 1996).

6. Tratamiento

Actualmente se cuenta con fármacos eficaces contra Mtb. Los fármacos de primera línea son isoniazida, pirazinamida, etambutol, rifampicina y estreptomycin, los cuales se pueden administrar en diversas combinaciones dependiendo de la gravedad de la enfermedad. También existen fármacos de segunda línea como las fluoroquinolonas, las cuales se utilizan en casos de

multidrogoresistencia. Debido a que el tratamiento con estos fármacos es durante tiempos muy largos, es muy común que se presenten efectos secundarios como náuseas, vómitos y en casos extremos, hepatotoxicidad.

Sin embargo, a pesar de la existencia de un tratamiento, el fracaso de la quimioterapia y la aparición de cepas resistentes se debe en gran parte a la falta de apego de los pacientes al tratamiento (Sherris, 2005).

De acuerdo con la OMS, aproximadamente el 3.3% de los casos nuevos de Tb son considerados como MDR (resistentes tanto a isoniazida como a rifampicina), mientras que el 17% de los casos de Tb no tratados previamente, son resistentes a al menos a un fármaco. Además, la frecuencia de casos MDR es mayor al 60% en casos previamente tratados y alrededor del 5% de los casos de MDR son también resistentes a fluoroquinolonas y a fármacos inyectables (XDR) (Sherris, 2005)

Más de cuatro décadas después de la introducción del tratamiento farmacológico contra la Tb, surgen nuevos medicamentos destinados al tratamiento de cepas multidrogoresistentes, por ejemplo, el delamanid, un nitroimidazol que inhibe la síntesis de ácidos micólicos desarrollado por la compañía farmacéutica Otsuka y que aún se encuentra en fase de prueba pero muestra resultados prometedores (Gler *et al.*, 2012) y el bedaquiline, una quinolona propiedad de Janssen Pharmaceuticals que funciona inhibiendo la bomba de protones de la ATP sintasa en la micobacteria y que fue aprobado por la FDA a finales de 2012 para su uso en pacientes (Zhenkun *et al.*, 2010).

Por otro lado, de todos los medicamentos disponibles, sólo la monoterapia con isoniazida ha sido recomendada para el tratamiento de Mtb latente (Ma *et al.*, 2010).

7. Influencia de la variación genética entre cepas

La gran variabilidad de pronósticos en la Tb, que van desde infecciones asintomáticas de por vida hasta enfermedades extrapulmonares severas que afectan diferentes órganos se habían atribuido principalmente a factores ambientales y del hospedador, además que se creía que el complejo *M. tuberculosis* estaba formado por un grupo de bacterias muy conservadas genéticamente con características fenotípicas limitadas que influían en el desarrollo de la infección (Gagneux, 2013; Malik y Godfrey-Faussett, 2005; Barnes *et al.*, 2003). Esto se debía en parte a que las investigaciones desarrolladas en ese momento, se basaban en el uso de cepas canónicas como H37Rv, H37Ra, Erdman y la cepa vacunal BCG (Aguilar *et al.*, 2010; Marquina-Castillo, 2008; Palanisamy *et al.*, 2008)

Posteriormente se comenzaron a realizar estudios utilizando cepas obtenidas de brotes epidemiológicos bien definidos, por ejemplo, las cepas CDC1551 y HN878. Estos trabajos indicaron que la diversidad de las cepas tenía influencia en la patogenicidad de la enfermedad al probarlas en modelos animales, por ejemplo, la cepa CDC1551 mostró una alta transmisibilidad (el 72% de los contactos fueron PPD positivos) sin que esto significara un mayor número de casos activos, además de inducir granulomas más temprano que la cepa tipo H37Rv. Por otro lado, los lípidos extraídos de esta cepa estimulan a los monocitos para producir grandes concentraciones de citocinas proinflamatorias tal vez explicando la gran reacción a la prueba de la tuberculina (Hernández-Pando *et al.*, 2012).

Después, con el desarrollo de técnicas moleculares de tipificación de DNA a principios de 190 y con la secuenciación del genoma completo de Mtb y de varias de las cepas canónicas, se reveló la subestimación de la diversidad dentro de la especie. Fue entonces que basados en la tipificación de diferentes cepas utilizando la técnica RFLP de la secuencia de inserción IS6110 se estableció la primera clasificación de Mtb en diferentes familias: LAM, Haarlem, Beijing, Canetti,

etc, las cuales se nombraron de acuerdo al lugar donde fueron aisladas originalmente (Kato-Maeda *et al.*, 2012) (Figura 6).

Estudios posteriores, tanto epidemiológicos como en modelos animales empezaron a relacionar las diferencias en el genoma entre las cepas de *M. tuberculosis* y las variaciones en los patrones de virulencia y transmisibilidad (Aguilar *et al.*, 2010). Estos datos, aumentaron el interés en la investigación de las diferencias entre los patrones de patogenicidad e inmunogenicidad que se presentaban entre el amplio espectro de cepas.

Una de las familias que más se ha estudiado es la familia Beijing, el genotipo predominante en Asia. Una infección con esta cepa induce en el modelo murino una acelerada multiplicación bacilar, neumonía masiva y muerte temprana; mientras que la familia Canetti contrasta con este comportamiento, induce una enfermedad progresiva lenta con una tasa de multiplicación bacilar baja, neumonía limitada y baja mortalidad (López *et al.*, 2003). Estos estudios junto con los que han explorado cepas de genotipos como Somali y Haarlem (Barnes *et al.*, 2003) sugieren que las diversas cepas presentan diferentes interacciones con el hospedero y por lo tanto tienen distintos potenciales de transmisión y virulencia.

Es importante mencionar que la idea de que la variación genética es un factor importante en la infección, no es exclusiva de *Mtb*, hay varias infecciones donde las características del patógeno a nivel genético son determinantes para el desarrollo de la infección, por ejemplo: la presencia de genes que codifican para toxinas en estafilococos (Scholl *et al.*, 1989) y estreptococos (Mollick *et al.*, 1993); la existencia de islas de patogenicidad en bacterias entéricas (Karaolis *et al.*, 1998) y variaciones capsulares en *Haemophilus influenzae* (Kapogiannis *et al.*, 2005) o *Streptococcus pneumoniae* (Brueggemann *et al.*, 2003). Específicamente para *Mtb* existen pocos estudios que relacionen directamente una característica fenotípica con el grado de virulencia de las cepas. Una de las moléculas más estudiadas al respecto, es el glicolípido fenólico, al cual se le atribuye la hipervirulencia de la familia Beijing. Se ha observado que al inhibir la síntesis de

este lípido, aumenta la producción de citocinas proinflamatorias *in vitro* este efecto se revierte al adicionar glicolípido purificado a los macrófagos (Reed et al., 2004).

8. Distribución geográfica e importancia de estudio de los contactos

La gran incidencia de esta enfermedad, sobretodo en personas en edad económicamente productiva ha obligado a explorar factores epidemiológicos que antes eran ignorados, como la diferencia de incidencia entre géneros o la capacidad de transmisión de las diferentes cepas entre los contactos cercanos de pacientes, con el fin de desarrollar mejores políticas de control y prevención. (Holmes *et al.*, 1998). En este aspecto, los ensayos de genotipificación han jugado un papel importante al permitir establecer la asociación entre la presencia de cepas específicas de Mtb y las características demográficas de su transmisión. (Ritacco *et al.*, 2008)

Estudios de epidemiología molecular han mostrado que ciertos genotipos de Mtb se encuentran sobrerrepresentados en zonas geográficas definidas (Figura 7), sugiriendo ya sea una compatibilidad hospedero-patógeno o que ciertos genotipos de Mtb han desarrollado propiedades únicas de virulencia y patogenicidad, lo que puede: 1) favorecer la evasión de la respuesta inmune inducida por la vacuna BCG, 2) favorecer una transmisión eficiente y 3) aumentar la habilidad para desarrollar la resistencia a medicamentos (Herhberg *et al.*, 2008, Filliol *et al.*, 2006).

Por otro lado, hay evidencia de que el fondo genético del paciente juega un papel importante en la distribución de la infección. Por ejemplo, existen estudios donde se analiza el genotipo de las cepas que infectan a personas de regiones geográficas específicas, estos sugieren que el proceso de infección por un cierto genotipo de Mtb esta mayormente relacionado con el origen geográfico de la persona infectada que con el lugar donde se haya dado la infección. Por ejemplo, si un chino adquiere una infección con Mtb, es más probable que sea con una

cepa endémica de China, aunque la infección haya ocurrido en San Francisco. (Hirsh *et al*, 2004)

Otro aspecto importante que se ha estudiado recientemente es el riesgo de infección que se presenta en las personas en contacto cercano con pacientes que presentan una enfermedad activa. A este respecto, estudios de epidemiología molecular en los países bajos y en San Francisco mostraron que aislados resistentes a isoniazida tenían de 30-80% menos de probabilidad de presentarse en casos agrupados que los aislados susceptibles a medicamentos (Rhee *et al.*,1999). Esto sugiere que las cepas MDR causan menos casos secundarios que las cepas susceptibles a drogas, lo cual podría implicar que algunos genes de resistencia a drogas reducen la virulencia de la bacteria.

Con el fin de establecer un método para monitorear y controlar a los contactos de pacientes con infección activa, se han desarrollado ensayos de liberación de IFN γ para tratar de pronosticar el riesgo que existe de desarrollar la enfermedad en un tiempo determinado. Algunos de estos estudios se mencionan más adelante.

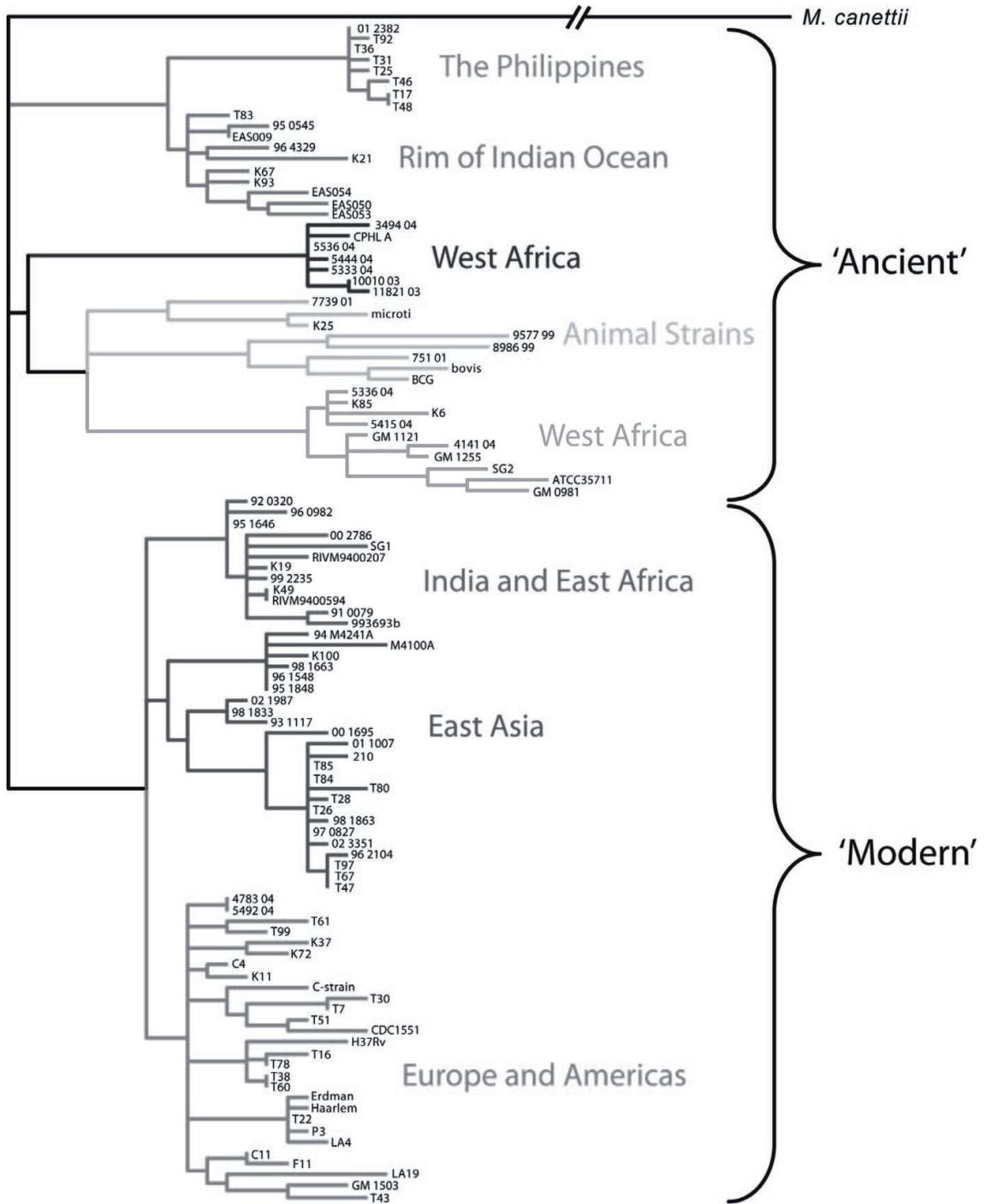


Figura 6. Clasificación filogenética de las cepas de Mtb. (Modificado Herhberg *et al.*, 2008)

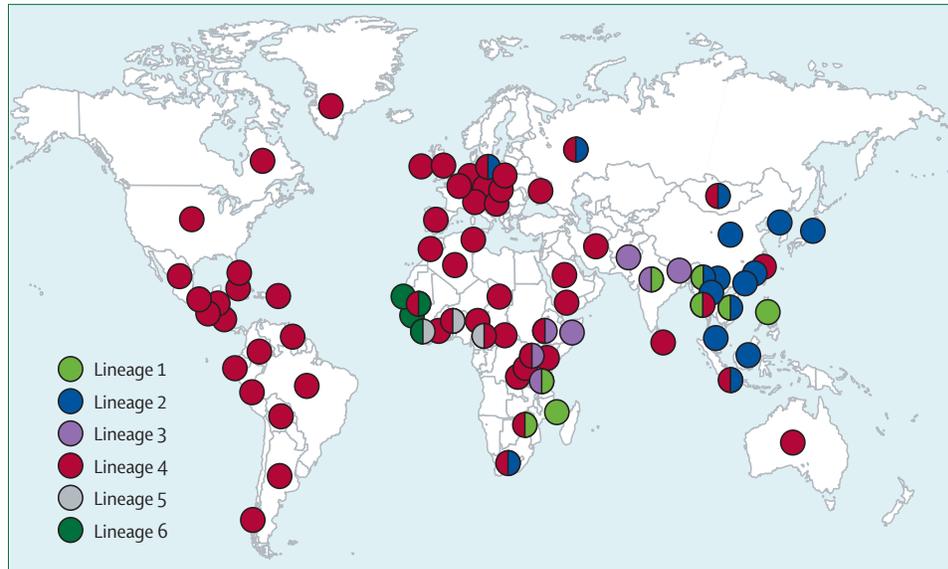


Figura 7. Distribución geográfica de las principales familias de Mtb alrededor del mundo. (Gagneux y Small, 2007)

9. Definiciones importantes

Aislado clínico: Conjunto de microorganismos obtenidos directamente de un paciente (Merriam-Webster Dictionary).

Cepa: Conjunto de microorganismos dentro de una especie caracterizados por una característica común (Merriam-Webster Dictionary)

Transmisibilidad: Capacidad de un microorganismo para propagarse directa o indirectamente desde el individuo infectado a nuevos individuos (Merriam-Webster Dictionary)

Virulencia: La capacidad de un microorganismo de multiplicarse y causar daño al hospedero (Poulin y Combes, 1999)

IV. ANTECEDENTES

A qué grado la patogenia y transmisibilidad de la tuberculosis dependen de la cepa infecciosa y es independiente de factores del hospedero es una pregunta esencial en la investigación sobre la Tb.

Algunos estudios que han explorado esta pregunta son, por ejemplo, el estudio de Hernández-Pando *et al.* del 2010 que cepas aisladas de fluido cerebroespinal asociadas con el desarrollo de Tb meníngea muestran una mayor facilidad para diseminarse por vía hematógena hacia el cerebro, a diferencia de cepas provenientes de aislados pulmonares, como la cepa tipo H37Rv.

Por otro lado, en el estudio de Marquina-Castillo *et al.* en 2010 a partir de un estudio epidemiológico de Tb pulmonar en el sur de México, se obtuvieron aislados clínicos que en su mayoría fueron tipificados utilizando la técnica de fingerprinting y se utilizaron para evaluar los patrones de virulencia, la respuesta inmune en términos de expresión de citocinas en los pulmones infectados y su capacidad de transmisión al analizar los pulmones de ratones sanos que convivieron durante dos meses con ratones infectados. Como resultado de estos estudios se pudieron definir 4 fenotipos basados en los perfiles de virulencia e inmunopatología de la infección desarrollada por cada una de las cepas, estos perfiles correlacionan directamente la virulencia con la transmisibilidad (a una mayor virulencia, se observa una mayor transmisibilidad), sin embargo, al comparar con los registros epidemiológicos, no se observa una completa correlación. Las cepas que muestran una relación con los casos reportados son las que ocasionan una alta mortalidad, alta carga bacilar y daño al tejido así como una alta transmisibilidad, mientras que al analizar las cepas con perfiles menos virulentos, sólo algunas cepas mostraron datos consistentes.

Ahora, en este estudio se utilizó el modelo murino BALB/c de tuberculosis pulmonar progresiva con infección por vía intratraqueal para examinar el curso de

la infección en términos de la virulencia (sobrevida, carga bacilar, histopatología) y transmisibilidad de 6 cepas pertenecientes al mismo linaje de Mtb (LAM). Las cepas fueron seleccionadas a partir de un estudio epidemiológico realizado en Colombia en la Universidad de Medellín por el equipo del Dr. Luis F García (Tabla II), cada caso cuenta con una historia clínica detallada del paciente, sus contactos y el curso de la enfermedad.

Este modelo es útil para explorar esta pregunta ya que: 1) se aprovecha la respuesta inmune homogénea del hospedero; 2) el modelo está basado en una infección por vía aérea, que es la vía de entrada natural del microorganismo y 3) la frecuencia de multiplicación bacilar correlaciona con la extensión del daño tisular y la mortalidad.

Tabla II. Datos epidemiológicos, proporcionados por el Dr. Luis García, de los pacientes a partir de los cuales se obtuvieron las cepas de *M. tuberculosis* utilizados en este trabajo

CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES CON TUBERCULOSIS						
Nombre de laboratorio	C1	C2	C3	C4	C5	C6
No. de aislado	98	490	127	365	379	410
Género	femenino	femenino	masculino	masculino	femenino	masculino
Edad	22 años	39 años	42 años	20 años	29 años	57 años
Carga Bacilar	++	+++	+++	+++	+++	+
Duración de tos	2 meses	13 meses	2 1/2 meses	4 meses	3 meses	5 1/2 meses
Estado VIH	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo
Cultivo	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo
Antibiograma	sensible	sensible	sensible	sensible	sensible	sensible
Consumo de drogas y alcohol	Sin datos	Sin datos	Sin datos	alcohol cocaína, marihuana	Sin datos	alcohol tabaquismo
Hacinamiento (m ² /persona)	4	4	18	7	11	10
Personas por habitación	4	4	2	2	3	2
No. convivientes	9	17	4	13	4	9
Edad promedio de convivientes	19	19	30	23	24	24
No. de convivientes menores a 6 años	1	3	1	2	1	1
Infección de contactos menores de 6 años	X	X	X			
Familia del aislado	-	LAM-09	LAM-09	LAM-09	LAM-09	LAM-09

V. JUSTIFICACIÓN

Con el surgimiento de nueva información sobre la diversidad genética entre los diferentes linajes de Mtb y el impacto que esta tiene en la presentación clínica de la enfermedad, el estudio sistemático del comportamiento de las diferentes cepas es clave para tener un mejor entendimiento de la patogenicidad y la epidemiología global de la tuberculosis así como de su compleja relación con el hospedero.

Por otro lado, en países con una prevalencia de tuberculosis de media a alta, donde un alto porcentaje de los casos son por transmisión reciente, los contactos cercanos de los pacientes de Tb pulmonar están particularmente en alto riesgo y constituyen un blanco importante para estrategias de control de la enfermedad.

VI. HIPÓTESIS

A pesar de pertenecer a la misma familia y que los reportes epidemiológicos de los pacientes muestran un comportamiento similar, las 6 cepas colombianas de Mtb estudiadas mostrarán perfiles de virulencia y transmisibilidad diferentes entre sí al probarlas en el modelo murino.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Describir y comparar los patrones de virulencia y transmisibilidad que presentan las 6 cepas colombianas.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Describir y analizar los patrones de virulencia (sobrevida, carga bacilar, daño histológico) de cada una de las cepas colombianas seleccionadas de Mtb.
2. Describir y analizar la capacidad de transmisión (modelo murino de convivencia) de cada una de las 6 cepas seleccionadas. Y en caso de que exista transmisión, evaluar si hay manifestación de la enfermedad activa.
3. Evaluar si se produce una manifestación activa de la enfermedad en los ratones con las cepas que fueron capaces de transmitirse.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

- Cepas de *Mycobacterium tuberculosis* provenientes de aislados clínicos seleccionadas a partir de estudios epidemiológicos en Colombia (Tabla II y III). Las cepas fueron proporcionados por el Dr. Luis F. García del Instituto de Investigaciones Médicas de la Universidad de Antioquía en Medellín, Colombia.
- Ratones BALB/c machos de 6 a 8 semanas de edad (aprox. 22 g de peso).

Tabla III. Cepas utilizadas en este estudio. Cada cepa tiene asignado un código propio además de una clave para su manejo dentro del laboratorio.

Código completo	Clave del laboratorio	Familia de la cepa
-	C1	LAM09
UT490	C2	LAM09-42
UT127	C3	LAM09-42
UT379	C4	LAM09-42
UT365	C5	LAM09-42
UT410	C6	LAM09-42

Reactivos

- Rneasy® Mini Kit (Cat. 74104) (Qiagen, US) kit para extracción de RNA a partir de tejido animal.
- Omniscript® Reverse Transcription (Cat. 20511) (Qiagen, US) kit para RT-PCR
- QuantiTect™ SYBR® Green PCR (Cat. 204143) (Qiagen, US) kit para PCR tiempo real

La descripción del contenido de las soluciones utilizadas en este trabajo se encuentran en el Apéndice.

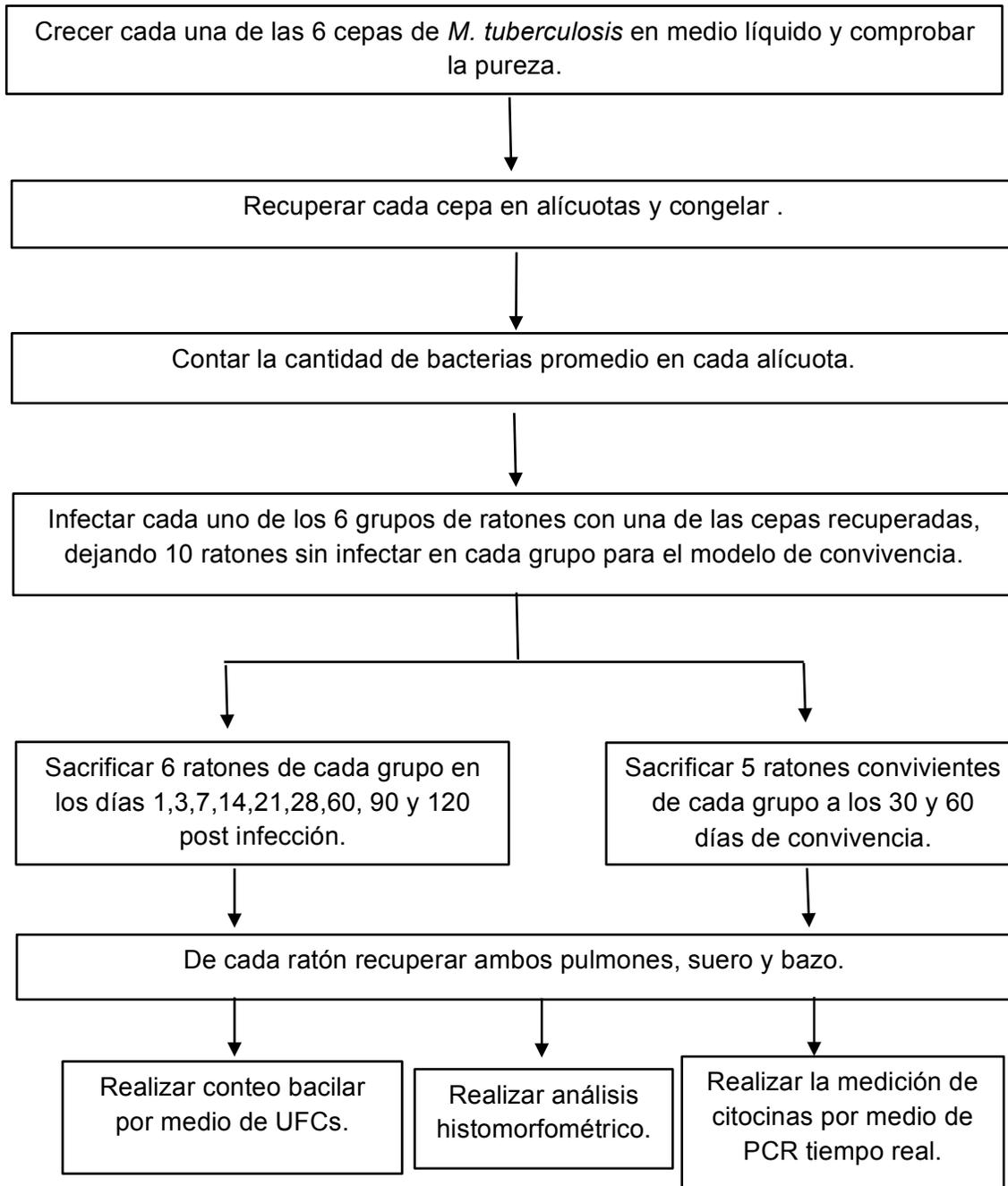


Figura 8. Diagrama de diseño experimental seguido en este trabajo. Los detalles de la metodología se describen en el texto.

A) Crecimiento de las cepas de *M. tuberculosis*

Cada uno de las cepas se crecieron en medio Middlebrook 7H9 (Difco) con glicerol y enriquecido con ADC (albúmina, dextrosa y catalasa; Becton Dickinson) a 37° C en agitación constante.

Durante el crecimiento, se realizó una tinción de Zihel-Nielsen de cada cepa para comprobar la pureza y se mantuvo un monitoreo de la densidad óptica (D.O.) de cada cultivo a lo largo de 10 días para conocer las curvas de crecimiento.

Todo el procedimiento se realiza en campana de bioseguridad clase III.

B) Recuperación y cuantificación de las cepas de *M. tuberculosis* para infección de ratones.

Una vez que los cultivos alcanzaron una D.O entre 0.6-0.8, correspondiente a la fase logarítmica de crecimiento bacteriano, se recuperaron las bacterias de cada cultivo.

De manera general, cada cepa se sometió a varios ciclos de lavado y centrifugado con PBS-Tween con el fin de deshacerse de las bacterias muertas. Las bacterias lavadas se resuspendieron con solución salina estéril y se almacenaron en alícuotas de 1.5 mL a -70°C hasta antes de realizar la cuantificación.

Cuantificación de las bacterias presentes en las alícuotas por Unidades Formadoras de Colonias (UFCs)

A partir de las alícuotas congeladas, se realizaron diluciones seriadas 1:10 en PBS. De cada dilución, se sembraron 10 μ L por duplicado en cajas con medio 7H10 adicionado con OADC. Las cajas sembradas se incubaron a 37°C y 5% CO₂.

Después de 14 y 21 días de la siembra, se realizó la cuenta de las colonias que crecieron en cada dilución y a partir de esta cuenta, se realizaron los cálculos para estimar el número de bacterias presentes en cada alícuota. Con base en estos resultados se preparó el inóculo de 2.5×10^5 bacterias/100 μ L solución salina estéril para infectar a los ratones.

C) Infección de ratones con las cepas de *M. tuberculosis*.

Se hicieron 6 grupos de 50 ratones machos BALB/c de 8 semanas de edad aproximadamente y cada uno fue infectado con una de las 6 cepas de *M. tuberculosis* seleccionadas.

Brevemente el procedimiento fue el siguiente: cada ratón se anestesió con sevofluorano (Sevorane) y se le inocularon, vía intratraqueal, aproximadamente 2.5×10^5 bacterias suspendidas en 100 μ L de solución salina estéril, posteriormente, los animales se mantuvieron en posición vertical hasta su recuperación.

Los ratones infectados fueron repartidos al azar en grupos de 10 y mantenidos en cajas de policarbonato (microaisladores) almacenadas dentro de un sistema de micro-ventilación individual positiva (Allentown).

En dos cajas de cada grupo, se colocaron 5 ratones infectados junto con 5 ratones sanos con el propósito de evaluar la transmisibilidad de cada cepa. (Figura 9).

El mismo día de la infección, se realizaron diluciones seriadas de una muestra del inóculo que se usó para infectar y se sembró en cajas con medio, con el fin de contar las colonias que crecían para conocer el número de bacterias real con el que se infectaron los ratones

D) Sacrificio y recolección de muestras a partir de ratones infectados.

En los días señalados en la Tabla IV, se sacrificaron 6 ratones de cada grupo por exanguinación, recuperándose de cada ratón, el suero, bazo y ambos pulmones. El pulmón derecho y 3 pulmones izquierdos se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido después de la extracción para determinar la carga bacilar (UFCs) y cuantificar las citocinas (RT-PCR tiempo real), además, los 3 pulmones izquierdos restantes del grupo, se perfundieron con etanol absoluto a través de la tráquea y se almacenaron en etanol absoluto hasta el momento de su inclusión en parafina para realizar el análisis morfométrico.

Todos los procedimientos de infección y sacrificio se realizaron en una campana de seguridad biológica clase III.

El uso de animales fue aprobado por el comité de ética del INCMNZS y por el Subcomité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales Experimentales del Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal (SICUAE).

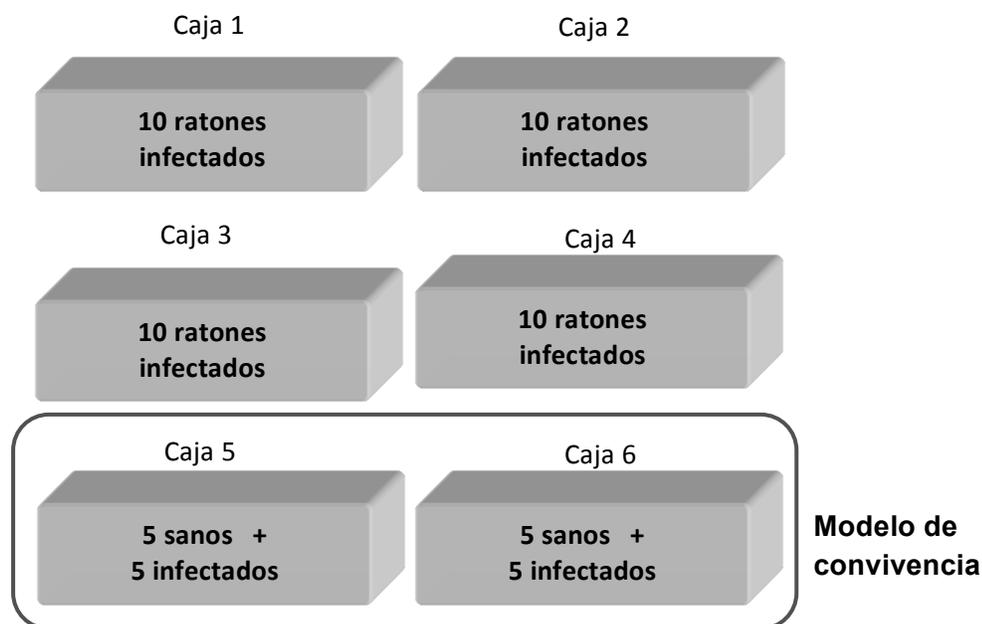


Figura 9. Distribución de los ratones infectados para el estudio de virulencia y transmisibilidad. Seis grupos de 50 ratones fueron infectados con cada una de las 6 cepas colombianas, los 50 ratones se repartieron en grupos de 10 en las cajas 1-4 y los últimos 10 ratones se colocaron 5 en cada una de las cajas (caja 5 y 6) junto con 5 ratones sanos. Todos los ratones infectados forman parte del experimento de virulencia y los ratones sanos de las cajas 5 y 6 forman parte del experimento de transmisibilidad. Se siguió la misma distribución para todos los grupos de ratones.

E) Unidades Formadoras de Colonias (UFCs)

Los pulmones que se congelaron en cada tiempo de sacrificio para este propósito se utilizaron para determinar la carga bacilar a lo largo de la enfermedad de la siguiente manera:

Pulmones de ratones infectados

Los pulmones se descongelaron a 4° C y se suspendieron en PBS-Tween 0.05%, después se homogenizaron con ayuda de un politrón (Kinematica, Luzern).

A partir de cada homogenizado se realizaron cuatro diluciones seriadas

1:10 en PBS-Tween y se sembraron 10 μ L por duplicado en cajas con agar Middlebrook 7H10 (Difco) enriquecido con OADC.

Las cajas sembradas se incubaron a 37 °C y 5% CO₂. Después de 14 y 21 días de incubación, se realizó la cuenta de colonias en cada dilución.

A partir de estos datos, se realizaron los cálculos para conocer el número de bacterias presentes en los pulmones de los diferentes días de sacrificio.

Tabla IV. Esquema de sacrificio para los ratones de cada uno de los grupos.

Día	# de ratones sacrificados
1	6 ratones infectados
3	6 ratones infectados
7	6 ratones infectados
14	6 ratones infectados
21	6 ratones infectados
28	6 ratones infectados
30	5 ratones sanos
60	6 ratones infectados + 5 ratones sanos*
120	6 ratones infectados

*Para la segunda repetición del experimento, el segundo grupo de 5 ratones sanos se sacrificó hasta el día 120

Ratones del modelo de convivencia

Los pulmones recolectados en el sacrificio de los ratones convivientes se trataron de la misma manera que los pulmones de los ratones infectados, excepto que a partir del concentrado se preparó una sola dilución 1:5 en PBS-Tween y se sembraron 100 μ L estriándolos en toda la caja con agar.

Las cajas sembradas se incubaron a 37° C y 5 % CO₂. Después de 14 y 21 de incubación, se realizó la cuenta de las colonias.

A partir de estos datos se realizaron los cálculos para conocer el número de bacterias presentes en los pulmones de los diferentes días de sacrificio.

F) Histología e histomorfometría

Para el análisis histopatológico, los pulmones perfundidos con etanol absoluto fueron tratados de la siguiente manera:

Cada pulmón se cortó de manera sagital y se colocó en un cassette para histología. Posteriormente, los cassettes se pasaron por un tren de deshidratación de etanol-xilol y después, un tren de parafina.

Una vez deshidratados, los cassttes fueron incluidos en parafina. Cada bloque obtenido se cortó en secciones de 4 mm con un microtomo Leica RM2135. Los cortes obtenidos fueron teñidos con hematoxilina-eosina.

Los cortes teñidos se observaron al microscopio para determinar las áreas de neumonía, necrosis y tamaño de granulomas con ayuda del analizador de imágenes Leica Q500/W (Milton Keynes; UK)

G) Cuantificación de citocinas por PCR-tiempo real

Los pulmones congelados en los diferentes tiempos de sacrificio para este propósito se utilizaron para cuantificar las citocinas a lo largo de la enfermedad de la siguiente manera:

Obtención de células mononucleares de pulmón

Primero, los tejidos congelados se incubaron durante 1 hr a 37 °C con medio RPMI con colagenasa. Después, los tejidos se pasaron por una coladera de nylon de 70 mm (Beckton-Dickinson, Cat. 352350) macerando con ayuda del émbolo de una jeringa. Las células obtenidas se centrifugaron y lavaron con el buffer de lisis para eliminar a los eritrocitos.

Posteriormente, se continuó con la extracción de acuerdo al kit RNeasy® Mini (Qiagen). Este kit se utilizan buffers con alta concentración de sales y etanol para que RNA de las muestras se adhiera de una mejor manera a la columna de sílica de las columnas. Al final, el RNA es diluído con agua. Este procedimiento permite un enriquecimiento de mRNA, ya que los fragmentos menores a 200 pb como el rRNA y el tRNA, son excluidos.

Al final el RNA se cuantificó por espectrofotometría (260/280 nm) en un nanodrop.

Síntesis de cDNA

Se utilizó el kit Omniscript Reverse Transcription para obtener el cDNA a partir del mRNA obtenido de cada muestra.

Después, con el cDNA obtenido se corrió un PCR de punto final con el sistema de PCR 7500 (Applied Biosystems) para amplificar el gen gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (3-GAPDH). Con el producto amplificado resultante, se corrió un gel de agarosa al 2 % y se tiñió con SYBR green para así revisar la integridad del cDNA obtenido.

PCR tiempo-real

Con el cDNA obtenido de cada muestra, se realizó una corrida de qPCR con el sistema QuantiTect™. En la corrida de cada citocina analizada se incluyeron una curva estándar y los controles correspondientes.

A partir de los resultados obtenidos, se realizaron los cálculos para determinar las cantidades de mRNA específicas para cada citocina presentes en las muestras.

El número de copias calculado se normalizó a un millón de copias de mRNA codificados por el gen constitutivo Rplo.

Los cebadores para cada citocina se diseñaron con el programa BLAST (Pubmed) (Tabla V) y fabricados por Invitrogen.

H) Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó mediante el programa GraphPad Prism versión 5.0. Para la supervivencia se realizaron curvas Kaplan-Meier y la prueba Log Rank. El análisis de UFCs y de histomorfometría se realizó por medio de un ANOVA de dos vías seguida de una comparación de Bonferroni. Las diferencias se consideraron significativas con un valor de $p < 0.05$. Todos los experimentos se realizaron por duplicado.

Las muestras de los ratones del modelo de convivencia se sometieron a las mismas pruebas y análisis que las muestras de los ratones infectados.

Tabla V. Secuencia de los primers utilizados para la cuantificación de citocinas por PCR tiempo real

Citocina	Primer Sentido (forward)	Primer Antisentido (reverse)
Rp18	5'-CTC TCG CTT TCT GGA GGG TG-3'	5'-ACG CGC TTG TAC CCA TTG AT-3'
iNOS	5'-TGG CTC GCT TTG CCA CGG AC-3'	5'-GCT GCG ACA GCA GGA AGG CA-3'
IFN γ	5'-CCT CAA CTT GGC AAT CTC ATG A-3'	5'-GGT GAC ATG AAA ATC CTG CAG- 3'
TNF α	5'-GCC GAG AAA GGC TGC TTG-3'	5'-TGT GGC TTC GAC CTC TAC CTC-3'
IL-4	5'-GCT CTT TAG GCT TTC CAG GAA G-3'	5'-CAG GAG AAG GGA ACA CCA C-3'
IL-17	5'-CAC CAG CTG ATC AGG ACG CGC-3'	5'-GGA CCC CAA CAG CTG GAA TAG AGC-3'

VIII. RESULTADOS

1. Curvas de crecimiento de las cepas de *M. tuberculosis*.

En este trabajo se utilizaron 6 cepas de *M. tuberculosis* obtenidas a partir de aislados de pacientes colombianos seleccionados por medio de estudios epidemiológicos y caracterizadas genéticamente por el equipo de trabajo del Dr. Luis F. García de la Universidad de Antioquía en Medellín, Colombia.

Las cepas originales fueron recibidas en nuestro laboratorio como una suspensión en glicerol, a partir de las cuales se realizaron cultivos en medio Middlebrook 7H9 para obtener la cantidad de bacterias suficientes para infectar a los ratones como se indica en la metodología.

Una vez iniciados los cultivos se monitoreó la D.O de cada uno con el fin de obtener las curvas de crecimiento que se muestran en la Figura 10.

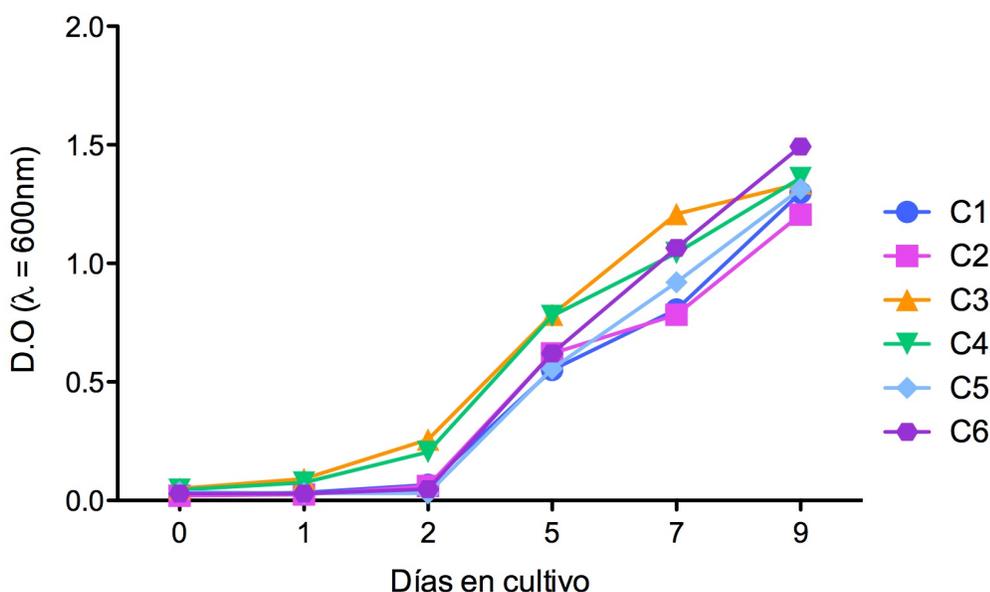


Figura 10. Curvas de crecimiento en medio líquido de las seis cepas colombianas. Se determinaron las curvas de crecimiento de cada una de las cepas, midiendo la densidad óptica (D.O. $\lambda=600\text{ nm}$) a tiempos consecutivos de cultivo en medio líquido Middlebrook 7H9 y comparando contra un blanco. Se presentan los resultados de cada lectura de D.O. a los diferentes días de cultivo. En análisis estadístico no muestra diferencia estadística entre las curvas.

Como se observa, todas las cepas mostraron un ritmo de crecimiento similar en medio líquido a lo largo del tiempo, alcanzando una D.O de 0.6 alrededor del día 6 de incubación. Alrededor de este valor de D.O, que corresponde a la fase logarítmica de crecimiento, se recuperaron y cuantificaron todas las cepas para posteriormente infectar a los ratones.

Mediante este modelo de crecimiento y obtención de las cepas en fase logarítmica se logra infectar a los ratones con suspensiones de bacterias vivas , evitando incluir bacterias muertas, las cuales podrían sesgar los resultados de los experimentos.

2. Carga bacilar determinada por medio de UFCs y sobrevida en los ratones en el experimento de virulencia.

Una vez que se infectaron los ratones, se comenzaron a recuperar muestras a diferentes días post-infección. Seis de los pulmones recuperados de cada tiempo fueron utilizados para determinar la cantidad de bacterias presentes a lo largo del experimento por medio de UFCs, además, se llevó un registro de la sobrevida en los diferentes grupos de ratones.

Las gráficas completas con los resultados de de ambos ensayos para las seis cepas se muestran en las Figura 11.

De manera general, se puede observar que tanto para el número de UFCs y la sobrevida, los ratones infectados con las cepas C2 y C4 tuvieron un comportamiento diferente. Ambos presentaron un crecimiento más rápido de UFCs en pulmón y un menor tiempo de sobrevida a comparación de los ratones infectados con el resto de las cepas (C1, C3, C5 y C6).

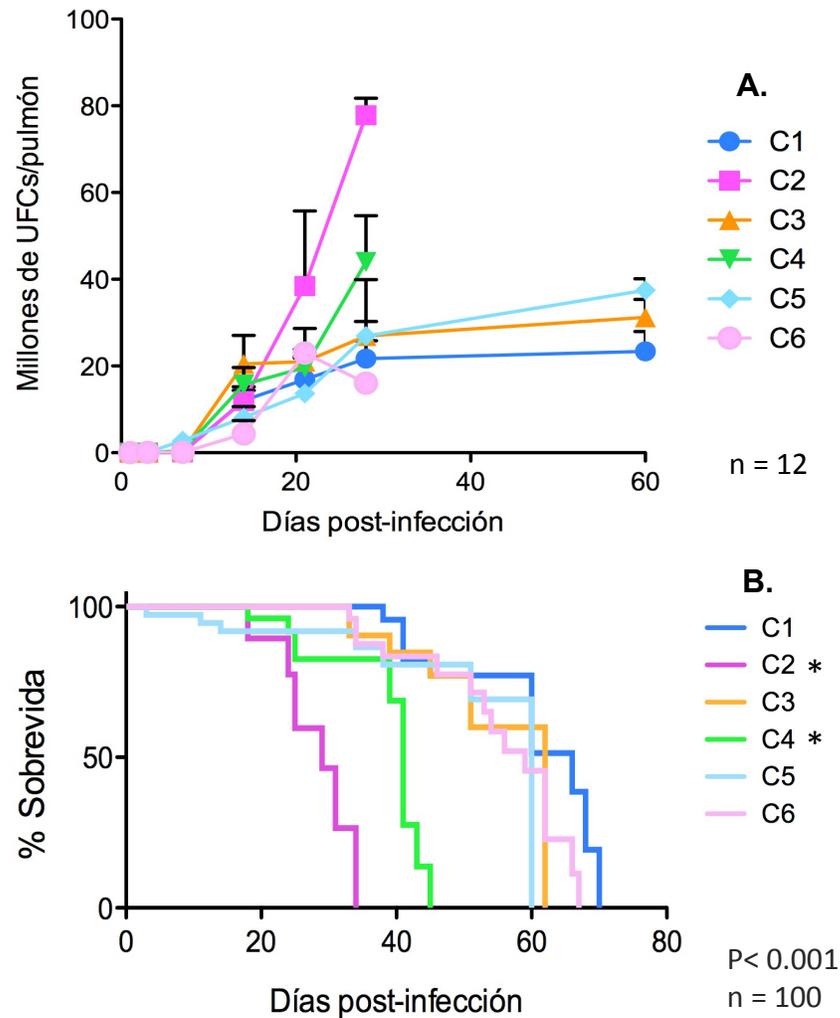


Figura 11. Determinación de las Unidades Formadoras de Colonia (UFCs) y sobrevida registrada en el experimento de virulencia. Dos de los parámetros para describir la virulencia de cada uno de las cepas utilizadas fueron el número de bacterias (UFCs) presentes en los pulmones y la sobrevida de los ratones infectados. **A.** Los datos de UFCs se muestran como el número de bacterias presentes en los pulmones de los ratones infectados con las cepas C1- C6 en términos del promedio de millones de UFCs por pulmón \pm DE. **B.** Gráfica de la sobrevida de los ratones infectados con las diferentes cepas a lo largo del tiempo. Cada escalón representa una muerte fuera de tiempo de sacrificio. Los asteriscos indican las cepas que tuvieron un comportamiento estadísticamente diferente. Los experimentos se realizaron por duplicado.

Para tener una mejor visualización de los datos y una descripción más detallada, se muestran los resultados en dos bloques, uno para los datos obtenidos con las cepas C1, C2 y C3 (Figura 12) y el segundo bloque para las cepas C4, C5 y C6 (Figura 13). Aún así, el análisis estadístico se realizó comparando las seis cepas entre sí.

En los resultados de la cantidad de UFCs y la sobrevida de las cepas C1, C2 y C3 (Figura 12), se observa que mientras las cepas C1 y C3 mantienen un crecimiento similar que llega alrededor de los 30 millones de UFCs y una sobrevida que sobrepasa el día 60 post-infección, los pulmones de los ratones infectados con la cepa C2 muestran un crecimiento bacilar estadísticamente diferente, llegando a cerca de 80 millones de UFCs con una sobrevida de aproximadamente un mes.

En este caso, se observa que existe una correlación indirecta entre la sobrevida y el ritmo de crecimiento de la bacteria, es decir, mientras menor es el tiempo de sobrevida, mayor es la cantidad de bacterias presentes en el pulmón.

Si se toma en cuenta que en el día 1 no existe una diferencia significativa sobre el número de bacterias con el que cada uno de los grupos de ratones inició la infección y se hace una relación del número de bacterias que se encuentran en los pulmones al día 28 de cada una de las cepas comparando con la cepa C1 que fue la que mostró un menor crecimiento a lo largo del experimento, se observa de manera más clara que la cepa C2 llegó a un número de bacterias casi 4 veces mayor que la cepa C1, mientras que la cepa C4 llegó a un crecimiento sólo 2 veces mayor que C1 (Tabla VI). Estos datos, sin embargo, no correlacionan del todo con los resultados de daño histológico que se muestran más adelante.

Tabla VI. Relación de la tasa de replicación de las bacterias en relación con la cepa C1.

Cepa	Promedio de UFCs al día 28 post-infección (millones de UFCs/pulmón)	Relación con C1 (número de veces)
C1	21.6917	1
C2	77.8333	3.58816
C3	26.9000	1.2401
C4	44.000	2.0284
C5	26.9454	1.2422
C6	16.0528	0.7400

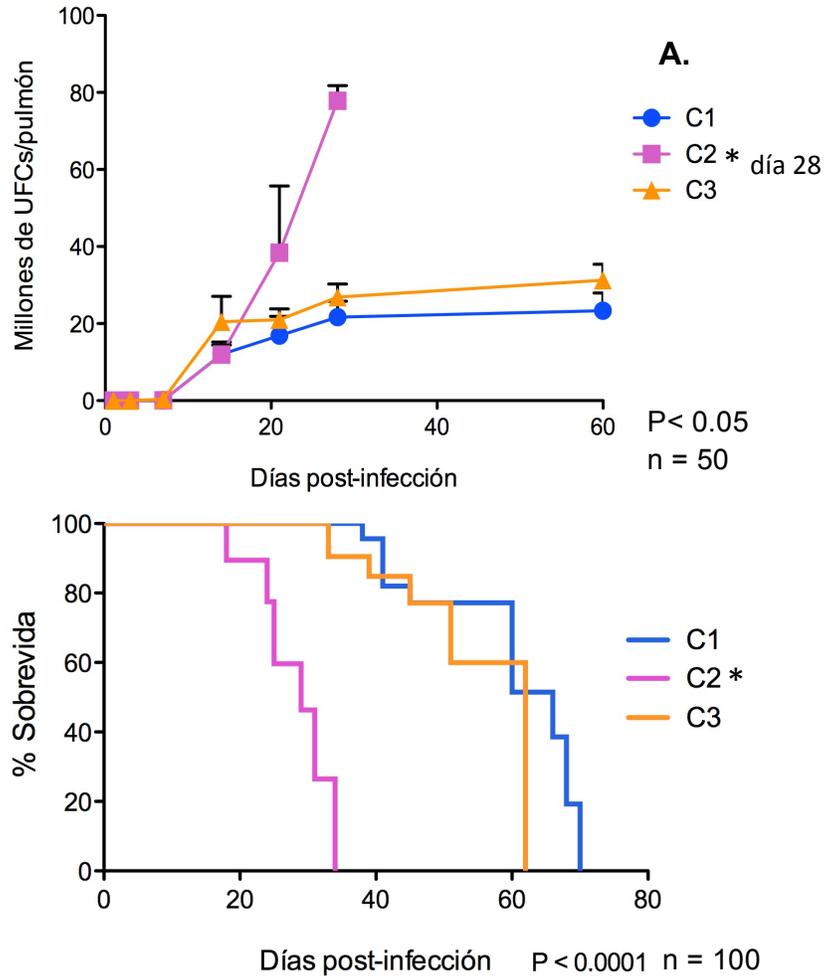


Figura 13. Determinación de las Unidades Formadoras de Colonia (UFCs) y sobrevida obtenidas en el experimento de virulencia con las cepas C1, C2 y C3. A. Se determinaron la cantidad de bacterias presentes en los pulmones de los ratones por medio de UFCs en cada tiempo de sacrificio. En la gráfica se muestran el promedio de millones de UFCs por pulmón \pm DE que produjo cada una de las cepas a lo largo de la infección. **B.** En la gráfica se presenta la sobrevida de los grupos de ratones infectados a lo largo del tiempo. Cada escalón representa una muerte fuera de tiempo de sacrificio. Los promedios graficados corresponden a datos de dos experimentos independientes.

Al observar la gráfica que corresponde a las cepas C4-C6, se observa un patrón similar, donde la cepa C4 tiene un comportamiento estadísticamente diferente a las cepas C5 y C6. En este caso, la cepa C4 alcanza un crecimiento de hasta 40 millones de UFCs para el día 28, y una sobrevida de 40 días, mientras que las otras dos cepas sólo llegan cerca de los 20 millones con una sobrevida de hasta 60 días. Este crecimiento en relación a la que presenta C1, es de 2 veces más para la cepa C4 y de sólo 1 vez más para las cepas C5 y C6 (Tabla VI).

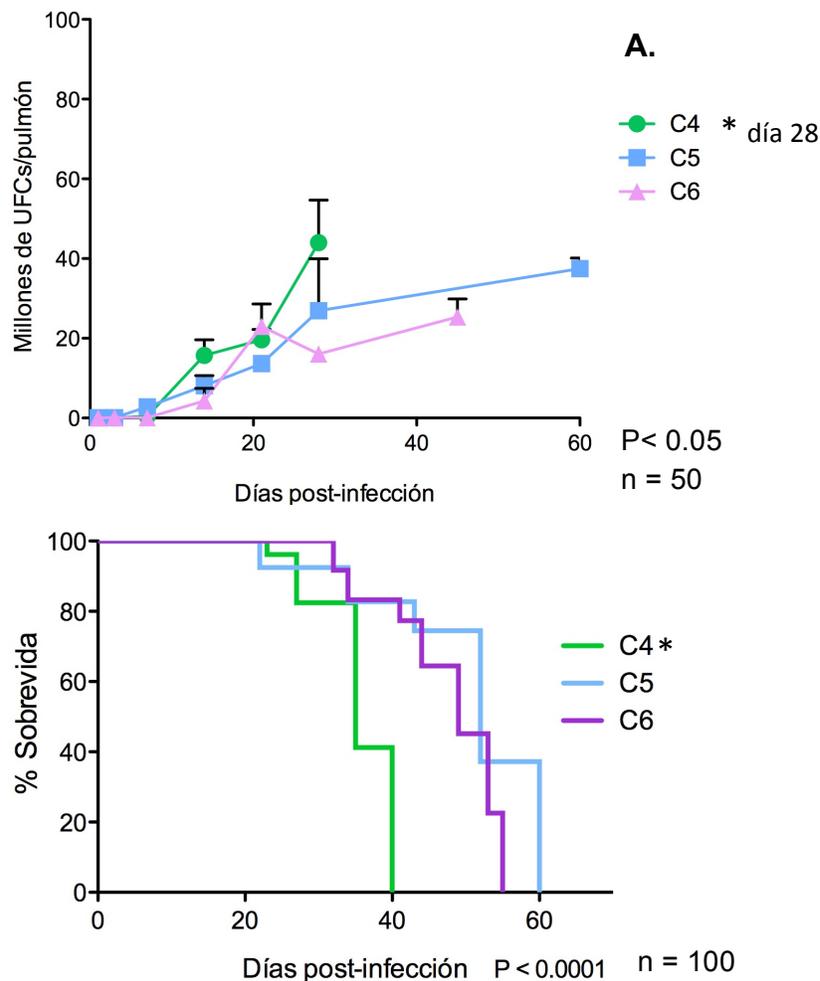


Figura 14. Determinación de las Unidades Formadoras de Colonias (UFCs) y sobrevida obtenidas en el experimento de virulencia con las cepas C4, C5 y C6. **A.** Se determinaron la cantidad de bacterias presentes en los pulmones de los ratones por medio de UFCs en cada tiempo de sacrificio. En la gráfica se muestran el promedio de millones de UFCs por pulmón \pm DE que produjo cada una de las cepas a lo largo de la infección. **B.** En la gráfica se presenta el registro de la sobrevida de los grupos de ratones infectados a lo largo del tiempo. Cada escalón representa una muerte fuera de tiempo de sacrificio. Los promedios graficados corresponden a datos de dos experimentos independientes.

3. Carga bacilar (UFCs) y sobrevida en los ratones del experimento de convivencia.

A la par del experimento de virulencia, después de infectar a cada uno de los grupos de ratones con cada una de las cepas se destinaron 10 ratones infectados de cada grupo para convivir dentro de la misma caja de microaislamiento con 10 ratones sanos como se indica en la Figura 9. Estos ratones sanos se sacrificaron en dos tiempos, a los 30 y 60 días de convivencia en la primera corrida del experimento y a los 30 y 120 días de convivencia en la segunda corrida del experimento. Al igual que en el apartado anterior, los resultados se dividieron en dos bloques, el primero para los datos de los grupos de las cepas C1, C2 y C3 (Figura 15) y el segundo para las cepas C4, C5 y C6 (Figura 16).

En ambas figuras se muestra que todas las cepas fueron capaces de transmitirse a los ratones sanos desde los primeros 30 días de convivencia, sin embargo, este número de bacterias no aumentó conforme pasaba más tiempo de convivencia, al contrario, el número de bacterias encontradas al día 60 de convivencia en general es menor para todas las cepas.

Un dato importante, es que aún las cepas C2 y C4 que mostraron un mayor crecimiento en los pulmones de los ratones del experimento de virulencia no se transmitieron en mayor cantidad a los ratones sanos.

Es importante mencionar que si bien el tiempo de convivencia total varió para los ratones convivientes con las cepas C2 y C4, a pesar de haber una infección, en ninguno de los casos hubo una progresión de la enfermedad, ya que la sobrevida fue del 100% para todos los grupos en ambos experimentos y los cortes histológicos de los pulmones que se muestran más adelante no tienen ningún daño visible.

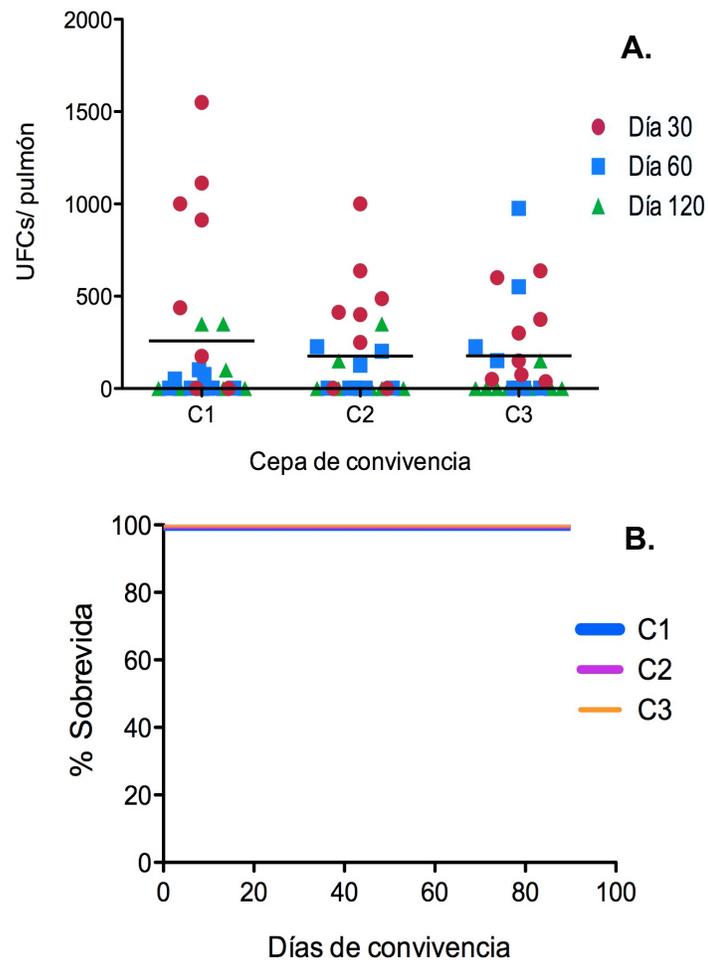


Figura 15. Determinación de las Unidades Formadoras de Colonias (UFCs) y sobrevida obtenidas en el experimento de convivencia con las cepas C1, C2 y C3. En el experimento de convivencia se sacrificaron 5 al azar después de 30 (●), 60 (■) y 120 (▲) días de convivencia. **A.** Se determinaron la cantidad de bacterias presentes en los pulmones de los ratones convivientes en cada tiempo de sacrificio por medio de UFCs. En la gráfica se muestra la cantidad de UFCs por pulmón que produjo la convivencia con los ratones infectados con cada una de las cepas, cada punto representa la cantidad de UFCs encontradas en los pulmones de cada uno de los 4 ratones analizados por tiempo **B.** La gráfica muestra el resigro de la sobrevida de los grupos de ratones convivientes a lo largo del tiempo. Los datos graficados corresponden dos experimentos independientes.

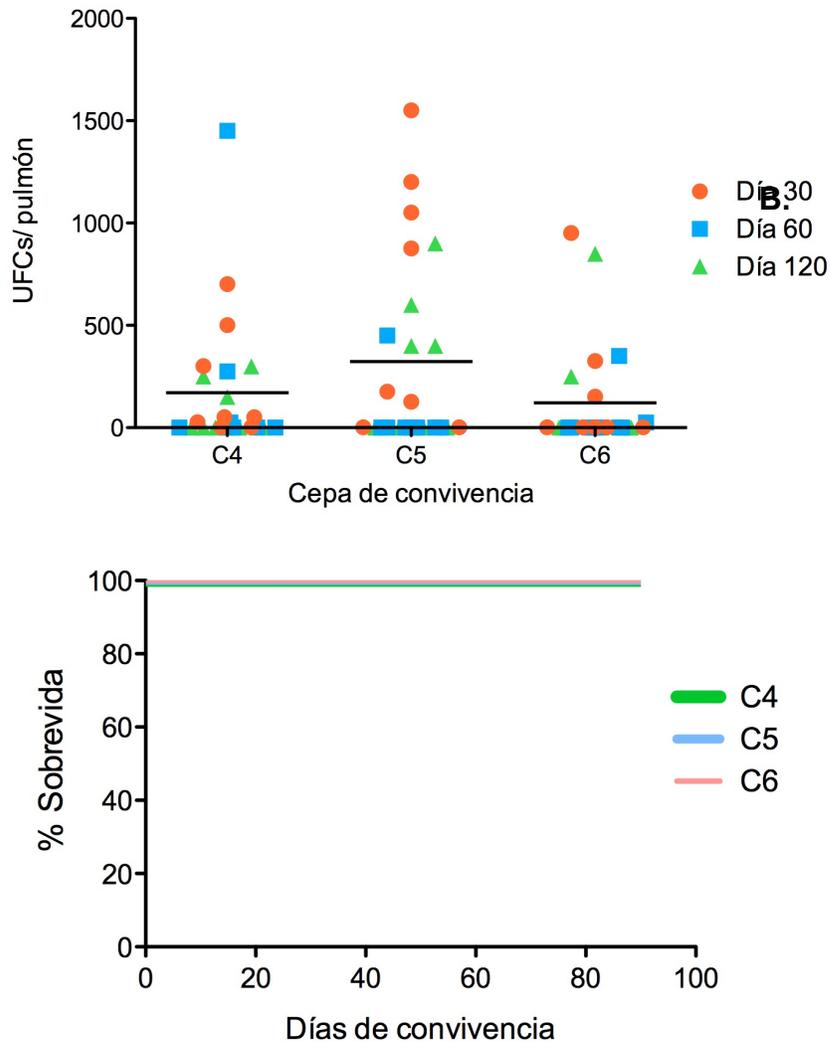


Figura 16. Determinación de las Unidades Formadoras de Colonias (UFCs) y sobrevida obtenidas en el experimento de convivencia con las cepas (■) C4, (■) C5 y (■) C6. De los ratones sanos del experimento de convivencia se sacrificaron 5 al azar después de 30 (●), 60 (■) y 120 (▲) días de convivencia, en cada caso se obtuvieron ambos pulmones, suero y bazo para los diferentes ensayos. **A.** Se determinaron la cantidad de bacterias presentes en los pulmones de los ratones convivientes en cada tiempo de sacrificio por medio de UFCs. En la gráfica se muestra la cantidad de UFCs por pulmón que produjo la convivencia con los ratones infectados con cada una de las cepas. **B.** La gráfica muestra el registro de la sobrevida de los grupos de ratones convivientes a lo largo del tiempo.

4. Análisis histológico y morfométrico de los pulmones en el experimento de virulencia.

Otro parámetro utilizado para establecer la virulencia de las cepas estudiadas es el daño que producen a nivel histológico en los pulmones infectados. Para este fin, en los diferentes tiempos de sacrificio se recolectaron 3 pulmones observar el daño. En la Figura 17 se presentan imágenes representativas de los cortes histológicos de los pulmones de ratones infectados con las cepas C1, C2 y C3 hasta la primera semana post-infección.

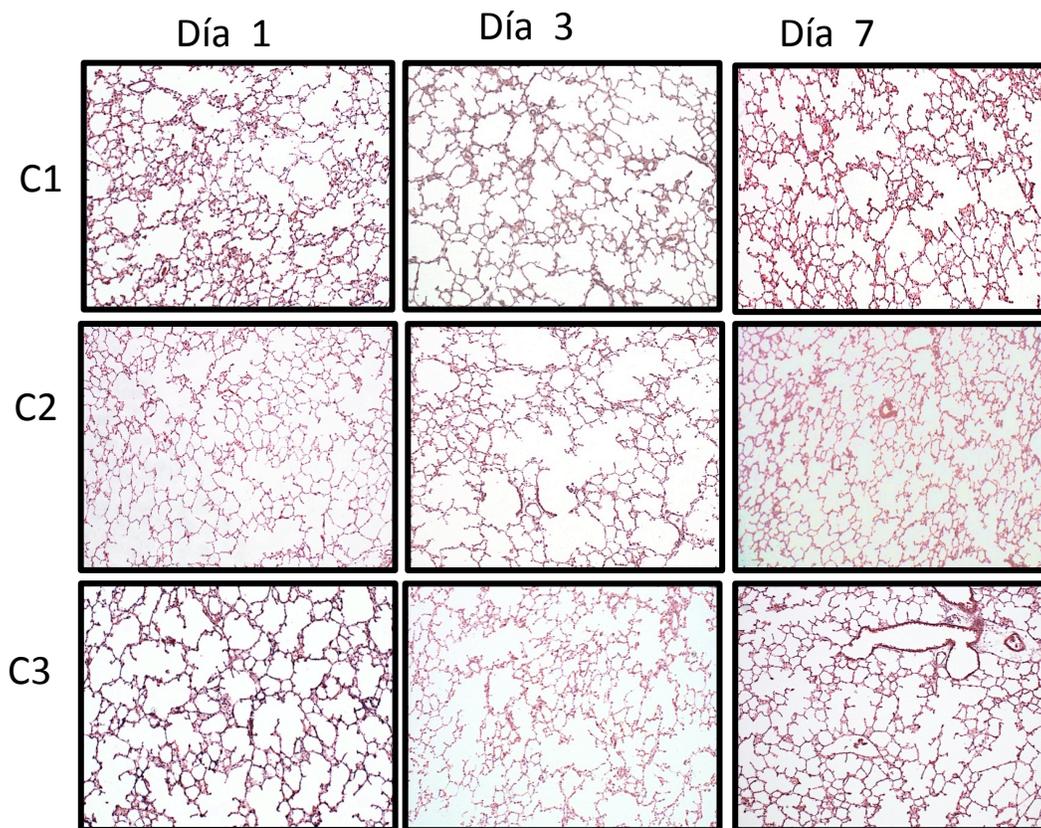


Figura 17. Análisis histológico de los pulmones de los ratones infectados con las cepas C1, C2 y C3 en los días 1, 3 y 7 post- infección. En las imágenes se muestran los cortes de los pulmones recuperados en la primer semana post-infección con las cepas C1, C2 y C3. Se muestran las imágenes representativas de dos experimentos independientes. Aumento 10x. Tinción H&E

En general, no se observó ningún tipo de daño ni infiltrado celular en los pulmones de ninguno de los grupos.

Ahora en la Figura 18 se muestran los cortes de los pulmones a los días 14 y 21 post infección.

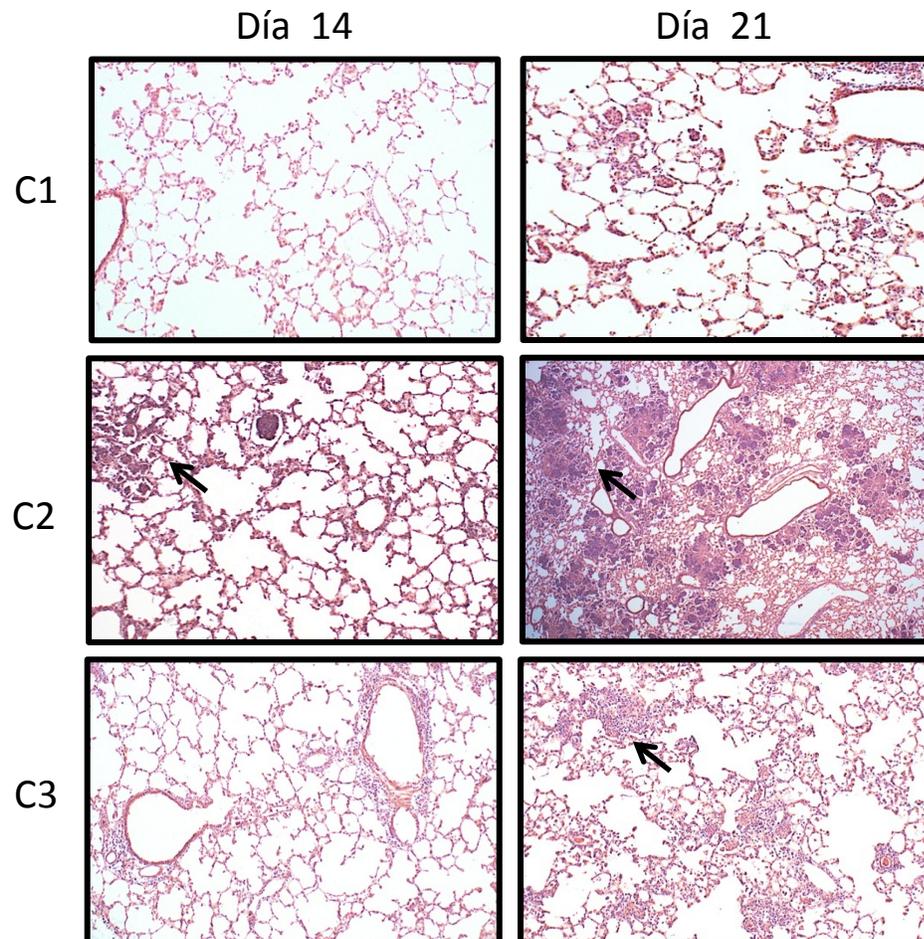


Figura 18. Análisis histológico de los pulmones de los ratones infectados con las cepas C1, C2 y C3 en los días 14 y 21 post- infección. En las imágenes se muestran los cortes histológicos de los pulmones recuperados en la segunda y tercer semana post-infección con las cepas C1, C2 y C3. Se muestran las imágenes representativas de dos experimentos independientes. Las flechas negras señalan las zonas de necrosis en C2 (día 14 y 21) y los granulomas en C1 y C3 (día 21). Aumento 10x; tinción H&E

Mientras que en las cepas C1 y C3 para el día 14 sólo se observó un infiltrado celular esperado para esta etapa de la enfermedad, en la cepa C2 se empiezan a observar focos pequeños con células necróticas (zonas morado intenso). Es importante notar que es en este día donde el número de UFCs en los pulmones empezó a aumentar a un ritmo mayor que las cepas C1 y C3.

Para el día 21 (Figura 18), se observaron diferencias aún más marcadas en los cortes histológicos. En las cepas C1 y C3 se observa la formación de granulomas definidos y en algunos ratones, zonas muy pequeñas de neumonía. Por otro lado, en la cepa C2 aumenta el número de zonas de necrosis y comienzan a aparecer zonas más grandes y definidas de neumonía, para este momento, el número de UFCs (Figura 13) de esta cepa se encontraba alrededor de los 40 millones con una sobrevida del 50%, mientras que para las cepas C1 y C3 el número de UFCs no sobrepasa los 20 millones y la sobrevida está alrededor del 60%.

Posteriormente, en el día 28 (Figura 19), en las cepas C1 y C3 comenzaron a aumentar las zonas de neumonía, mientras que en la cepa C2, los pocos ratones que llegan a este día presentaron zonas de neumonía más grandes y zonas de necrosis definidas similares a las que se observaron para el día 21. Hay que recordar que en el día 28, el número de UFCs para la cepa C2 alcanzó su máximo, alrededor de las 80. En contraste, el número de UFCs de las cepas C1 y C3 está alrededor de los 40 millones.

Por último, para el día 60 (Figura 19), sólo se obtuvieron muestras de las cepas C1 y C3, que presentaban zonas de neumonía más extensas y no presentaron signos de necrosis.

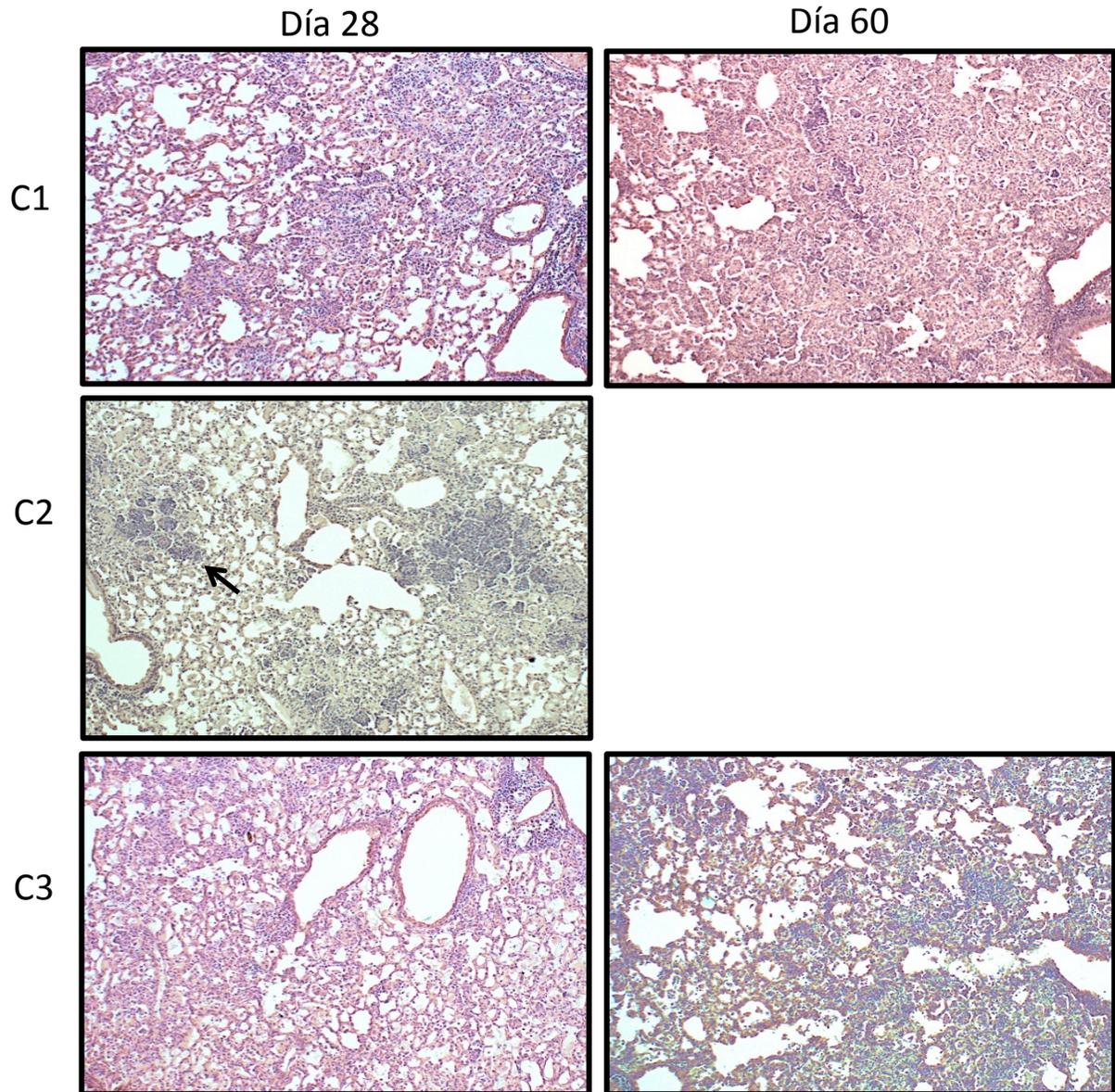


Figura 19. Análisis histológico de los pulmones de los ratones infectados con las cepas C1, C2 y C3 en los días 28 y 60 post-infección. En las imágenes se muestran los cortes histológicos de los pulmones recuperados en los días 28 y 60 post-infección con las cepas C1, C2 y C3. Las imágenes faltantes son porque los ratones no sobrevivieron hasta esos días. Se muestran las imágenes representativas de dos experimentos independientes. La flecha negra muestra las zonas de necrosis para C2 al día 28. Aumento 10x; tinción H&E

En el caso de los cortes de las cepas C4, C5 y C6 (Figura 20-22), se presentó un fenómeno similar al primer grupo de cepas. Hasta la primera semana post-infección (día 7) (Figura 20), no se observó ningún tipo de daño ni infiltrado celular en los pulmones de ninguno de los grupos.

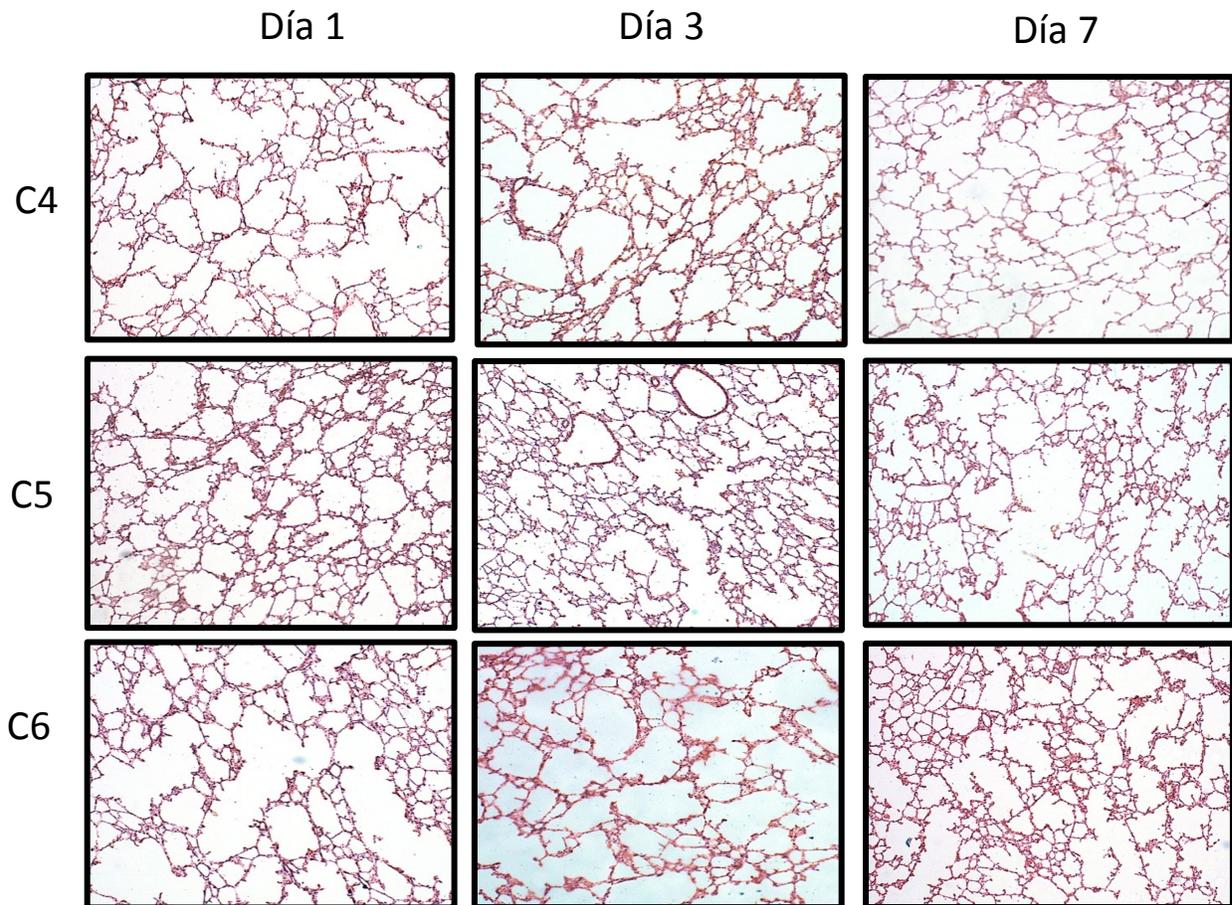


Figura 20. Análisis histológico de los pulmones de los ratones infectados con las cepas C4, C5 y C6 en los días 1, 3 y 7 post- infección. En las imágenes se muestran los cortes de los pulmones recuperados en la primer semana post-infección con las cepas C4, C5 y C6. Se muestran las imágenes representativas de dos experimentos independientes. Aumento 10x; tinción H&E

Para el día 14 (Figura 21), en la cepa C4 se comenzaron a observar zonas definidas de necrosis, mientras que en los cortes de la cepa C5 sólo se observó la presencia de infiltrado celular y en la cepa C6 observó la formación de pequeños granulomas. En relación con el número de UFCs para estas cepas Figura 14 para el día 14, la cepa C4 presentó alrededor de 15 millones de UFCs, pero C5 y C6 presentan sólo alrededor de 8 y 4 millones respectivamente.

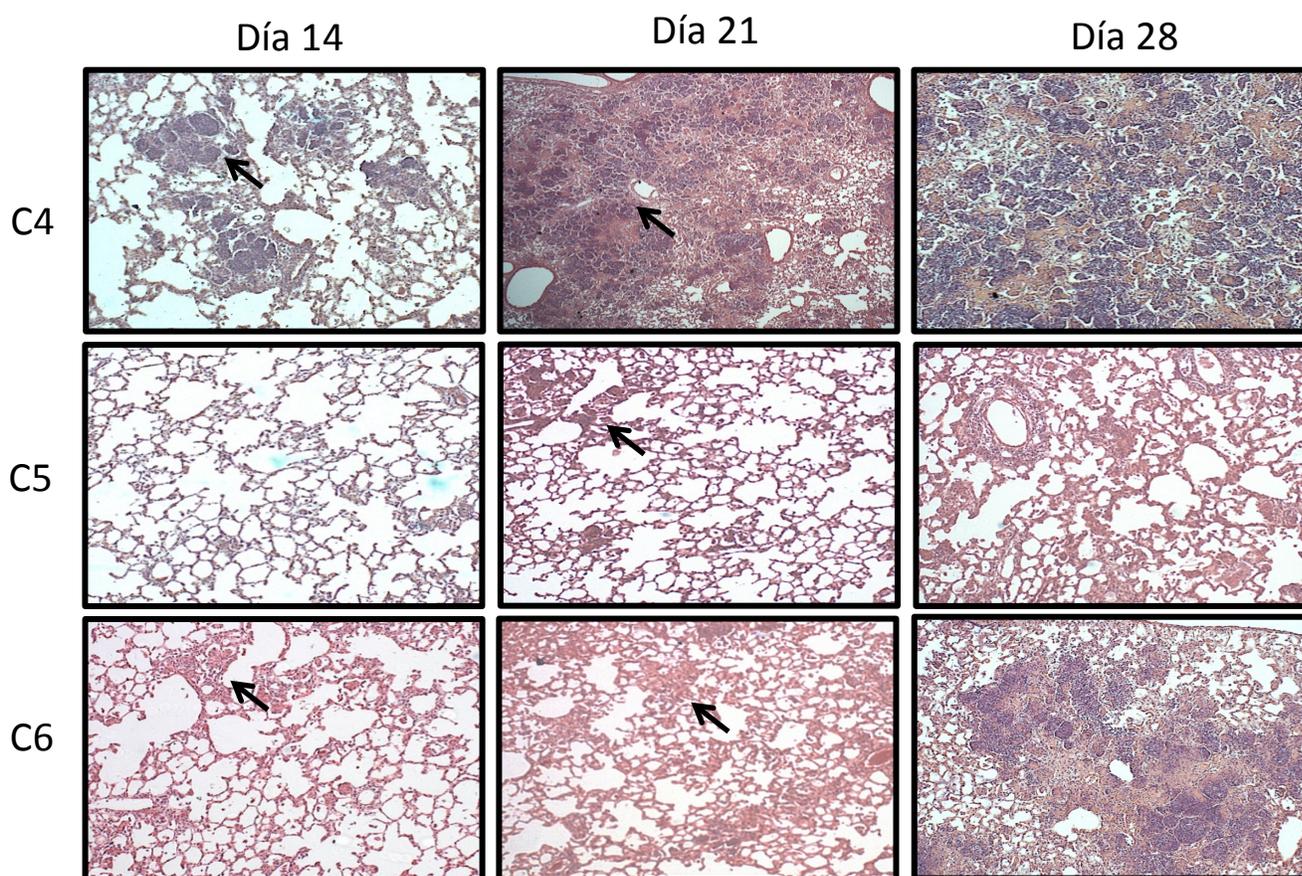


Figura 21. Análisis histológico de los pulmones de los ratones infectados con las cepas C4, C5 y C6 en los días 14, 21 y 28 post- infección. En las imágenes se muestran los cortes histológicos de los pulmones recuperados hasta la cuarta semana post-infección con las cepas C4, C5 y C6. Se muestran las imágenes representativas de dos experimentos independientes. Las flechas negras indican las zonas de necrosis en C4 y los granulomas en C5 y C6. Aumento 10x; tinción H&E

Para el día 21 (Figura 21), las áreas de neumonía en los pulmones infectados con la cepa C4 aumentaron dramáticamente, mientras que la cantidad de las zonas de necrosis sólo aumentan ligeramente en relación a las que se observó al día 14. Por otro lado, en las cepas C5 y C6 se observó la presencia de granulomas y algunas zonas pequeñas de neumonía, lo cual es lo esperado para esta etapa de la enfermedad. En relación al número de UFCs (Figura 14) tanto la cepa C4 como la cepa C6 tienen alrededor de 20 millones de UFCs, mientras que la cepa C5 presenta alrededor de 15 millones.

En el día 28 (Figura 21), la mayoría de los ratones de la cepa C4 habían muerto y en los cortes recuperados se observó que aún prevalecen las zonas de necrosis y neumonía en niveles similares a los que se observaron en el día 21. Por otro lado, en la cepa C6, también se pueden apreciar zonas de concentración celular similares a la necrosis que presenta C4, sin embargo, al observar con un mayor aumento, la mayoría de las células aún se observaban con el núcleo íntegro, a diferencia de las células en la cepa C4, donde las células ya no presentaban un núcleo definido. Es en este punto, donde las dos cepas alcanzaron su máximo crecimiento dentro de los pulmones, la cepa C4 llega alrededor de los 40 millones de UFCs, mientras que la cepa C5 llega a alrededor de 30 millones y C6 a 20 millones de bacterias.

Por último se analizaron muestras de la cepa C5 al día 60 post infección (Figura 22), en este punto, todos los ratones de los otros dos grupos ya habían muerto. En los cortes histológicos, los pulmones mostraron zonas extensas de neumonía pero sin signos de necrosis, para este día, el número de UFCs para C5 es alrededor de 40 millones, número que se acerca para el número que se encontró para la cepa C4 en el día 28.

Para poder tener una mejor idea de las diferencias en el daño histológico que causaron las diferentes cepas, se realizó una medición de cada uno de los parámetros descritos anteriormente (área de granuloma, porcentaje de área neumónica y porcentaje de área con necrosis) para los cortes de pulmón obtenidos de cada tiempo de sacrificio (Figura 23 y 24).

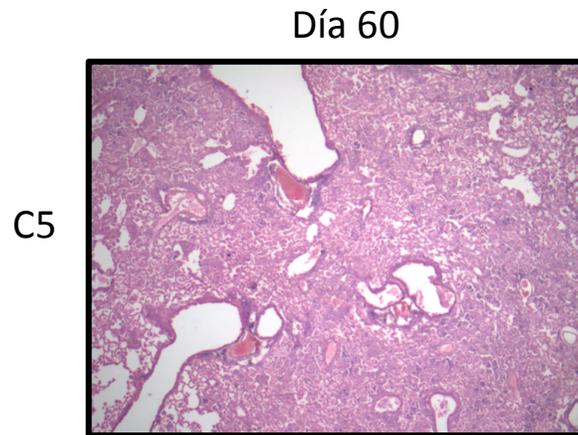


Figura 22. Análisis histológico de los pulmones de los ratones infectados con la cepa C5 en el día 60 post-infección. La imagen muestra el corte histológico de los pulmones recuperados hasta el día 60 post-infección con la cepa C5. Se muestra la imagen representativa de dos experimentos independientes. Aumento 10x; tinción H&E

En la Figura 23. se muestra la gráfica con el área de granuloma encontrada en cada tiempo de sacrificio para cada una de las cepas. En esta se observa que para todas las cepas es posible encontrar formación de granulomas a partir del día 14 post-infección.

Para la cepa C1 el tamaño de los granulomas aumentó conforme pasaban los días post infección, hasta alcanzar su máximo en el día 28. No se cuenta con datos del día 60 porque para este día la presencia de neumonía limitaba la distinción de los granulomas.

Para el resto de las cepas (C2, C3, C4, C5 y C6), el aumento de tamaño de los granulomas conforme pasa el tiempo es menos consistente. En particular, para las cepas C2 y C4 que fueron capaces de desarrollar necrosis, fue más difícil observar granulomas en los cortes de los días avanzados. Para la cepa C2, sólo fue posible observar granulomas en el día 14 post infección y con un área que no fue significativamente diferente a la que se observó para las demás cepas. Por último, para la cepa C4 se observaron granulomas hasta el día 21, sin embargo, en ninguno de los casos el tamaño fue significativamente diferente al que se presentó en las demás cepas en los mismos días.

En el caso de la neumonía (Figura 24 A), se comenzaron a observar pequeños parches en las cepas C1, C2 y C5 desde el día 14. Después, se observó aumento importante al día 21 para las cepas C2 y C4, las cuales llegaron alrededor del 30% de neumonía, mientras que las demás cepas presentaron niveles menores al 10%.

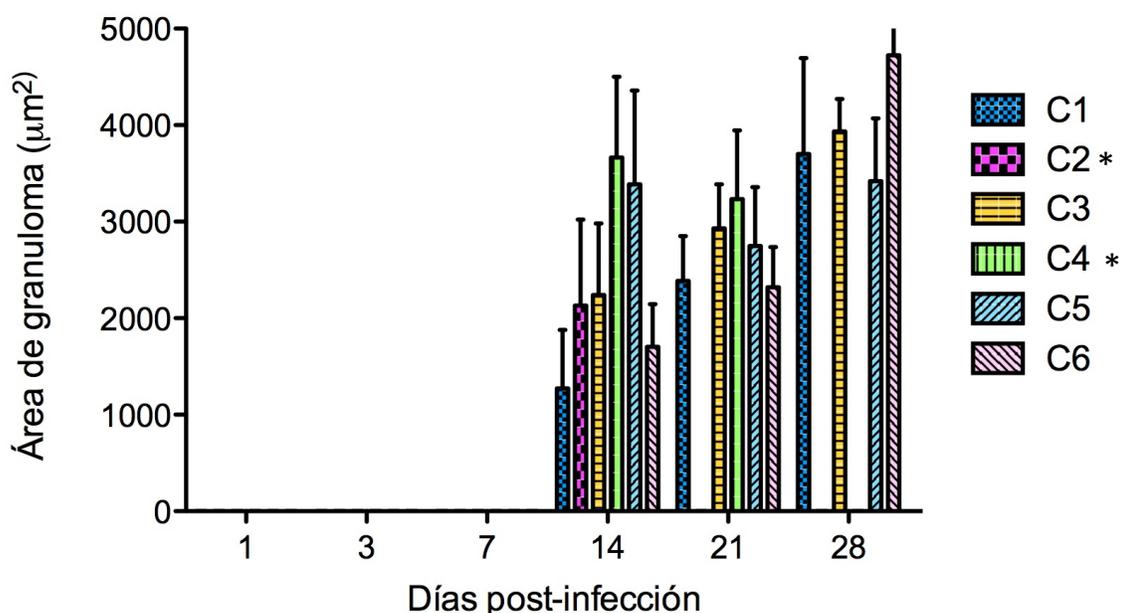


Figura 23. Análisis morfométrico de los pulmones de los ratones infectados con las cepas C1-C6. Los diferentes cortes obtenidos de los pulmones a los diferentes tiempos de sacrificio fueron analizados con el software Leica Q500/W (Milton Keynes; UK). En cada corte se determinó el área de mínimo 10 granulomas. En la gráfica se muestra el área promedio de los granulomas encontrados en cada tiempo de sacrificio para cada cepa \pm DE. Las cepas C2 y C4 mostraron diferencia significativa entre ellas el día 21, y con las demás cepas, los días 21 y 28 post-infección.

Para el día 28, el porcentaje de neumonía de todas las cepas comenzó a aumentar siendo significativamente diferente para las cepas C2 y C4, es importante recordar que para este momento estas dos cepas ya presentaban también zonas de necrosis. Por último para el día 60 sólo se muestran en la gráfica los niveles de neumonía para las cepas C1, C3 y C5, ya que no se contaban con ratones vivos remanentes de las demás cepas. En este caso, los niveles

de neumonía están entre el 80-90% y aún así tuvieron tiempos de sobrevida más altos que las cepas C2, C4 que sólo alcanzaron niveles de neumonía alrededor del 40%.

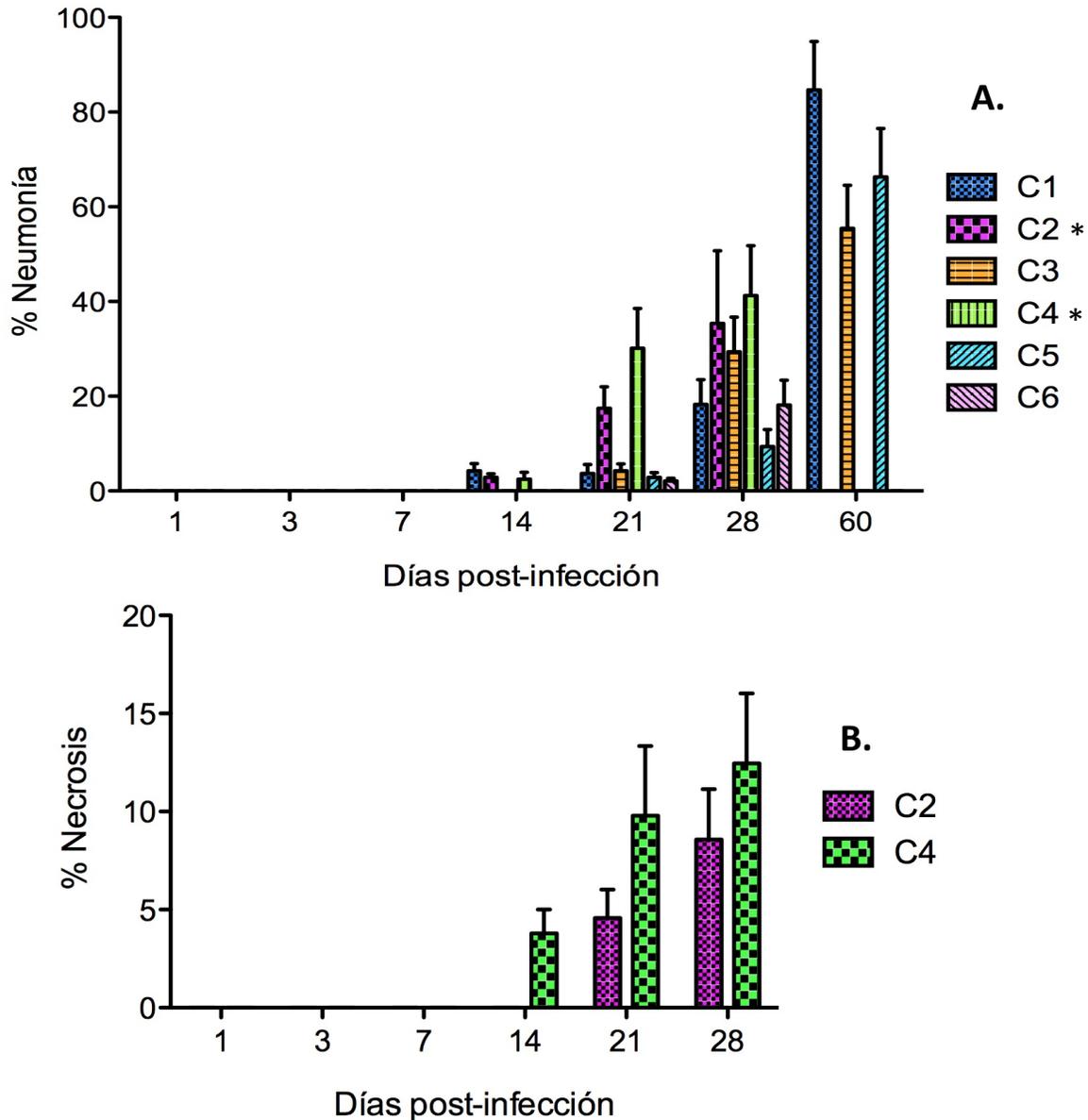


Figura 24. Análisis morfométrico de los pulmones de los ratones infectados con las cepas C1-C6. Utilizando el mismo software de análisis Leica Q500/W (Milton Keynes;UK) se midieron las áreas de neumonía y necrosis, así como el área total de los pulmones en cada uno de los cortes obtenidos. En la gráfica se muestra el porcentaje promedio del área pulmonar ocupado por **A.** Neumonía. En estos datos, las cepas C2 y C4 no mostraron diferencia significativa entre ellas, pero si con las demás cepas a los días 14, 21 y 28. **B.** necrosis encontrados en cada tiempo de sacrificio para cada cepa \pm DE. Estos datos no muestran diferencia significativa.

Por último, al analizar los niveles de necrosis (Figura 24 B), se observó que la cepa C4 comenzó a mostrar pequeños focos de necrosis desde el día 14 post-infección. Sin embargo, para los días 21 y 28 la necrosis comenzó a aumentar tanto para la cepa C2 como para C4, llegando a un máximo alrededor de 20% sin ser significativamente diferente entre ellas.

En la Figura 25 se muestran imágenes representativas del estado de los pulmones completos al momento del último sacrificio (día 28). En este momento el porcentaje de neumonía en ambas cepas no sobrepasa el 40% sin embargo, la necrosis está en su nivel máximo de alrededor 20%.

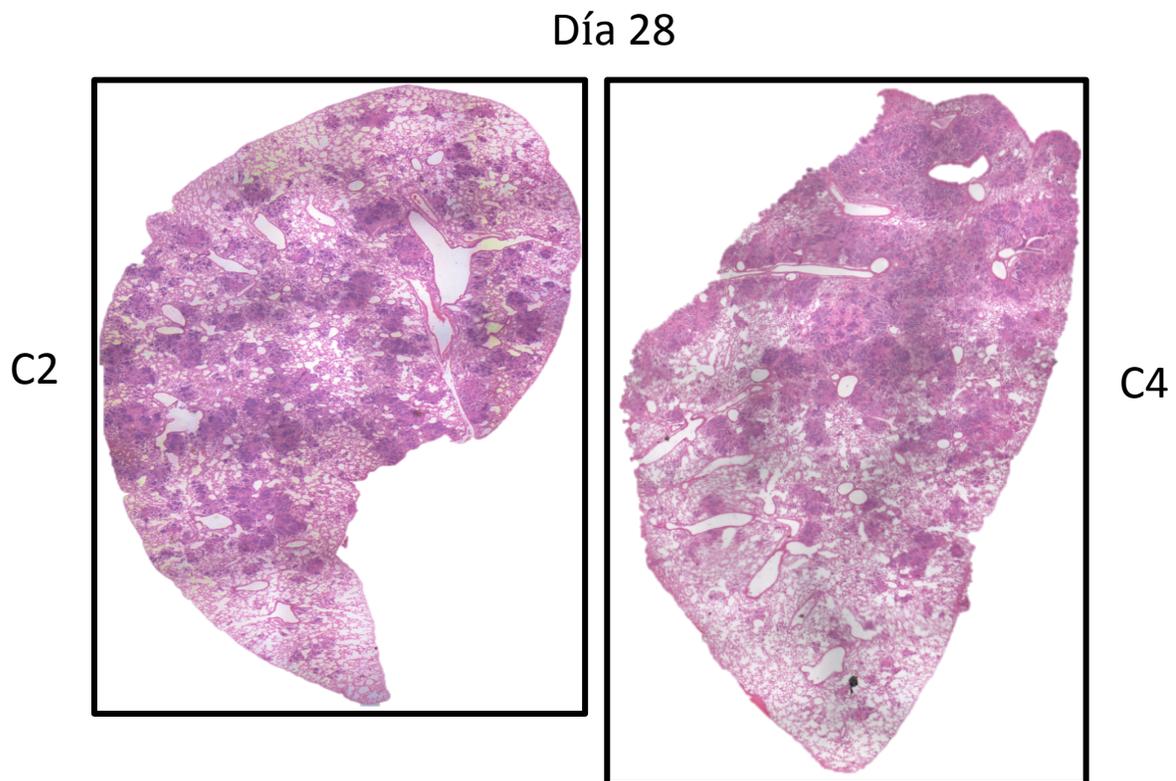


Figura 25. Análisis histológico de los pulmones de los ratones infectados con las cepas C2 y C4 a los 28 días post-infección. Las imágenes muestran el corte histológico completo de los pulmones recuperados en el día 28 post-infección con las cepas C2 y C4 . Se muestra un corte representativo de dos experimentos independientes. Aumento 2.5x; tinción H&E

5. Análisis histológico de los pulmones en el experimento de convivencia.

De la misma manera, se hizo el análisis histológico de los pulmones obtenidos de los ratones del modelo de convivencia (Figura 26 y 27).

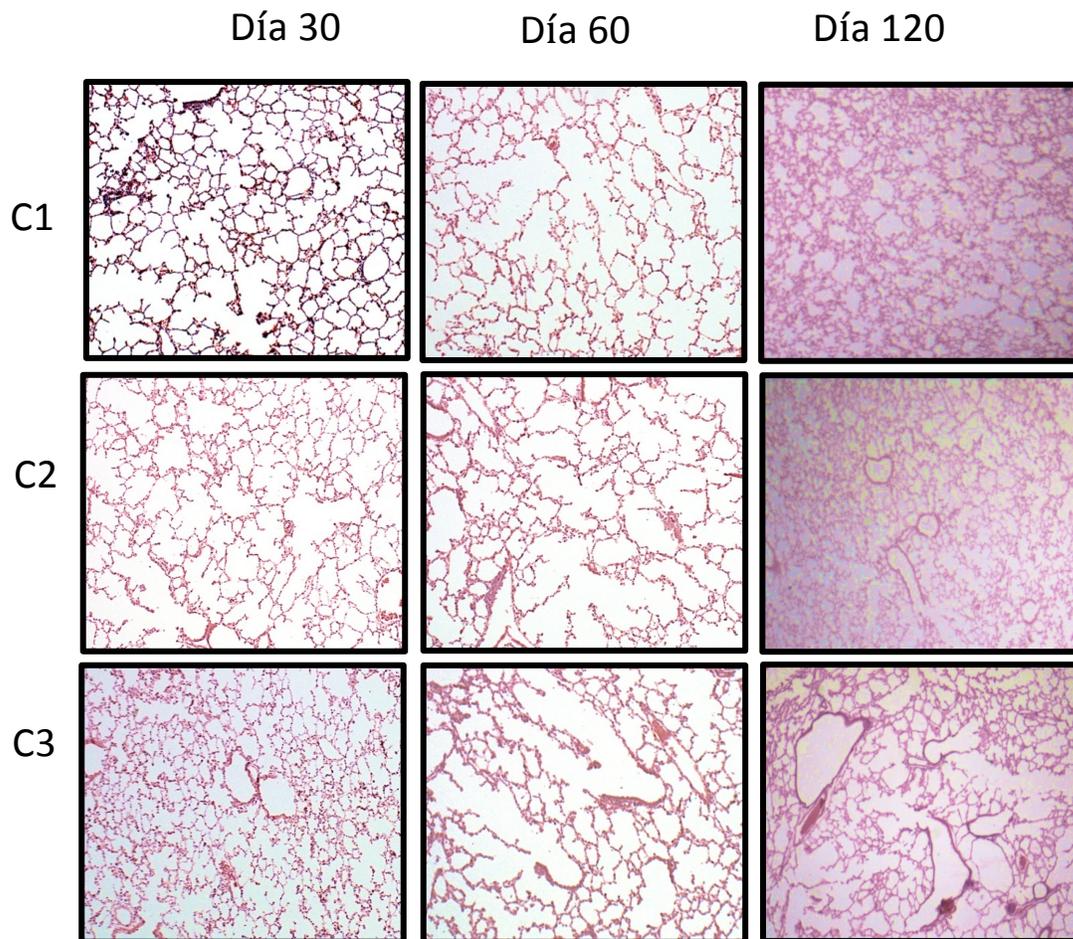


Figura 26. Análisis histológico de los pulmones de los ratones convivientes con las cepas C1, C2 y C3 a los días 30, 60 y 120 de convivencia. En las imágenes se muestran los cortes de los pulmones recuperados de los ratones convivientes con los ratones infectados con las cepas C1, C2 y C3 después de 30, 60 y 120 días de convivencia. Se muestran las imágenes representativas de dos experimentos independientes. Aumento 10x; tinción H&E

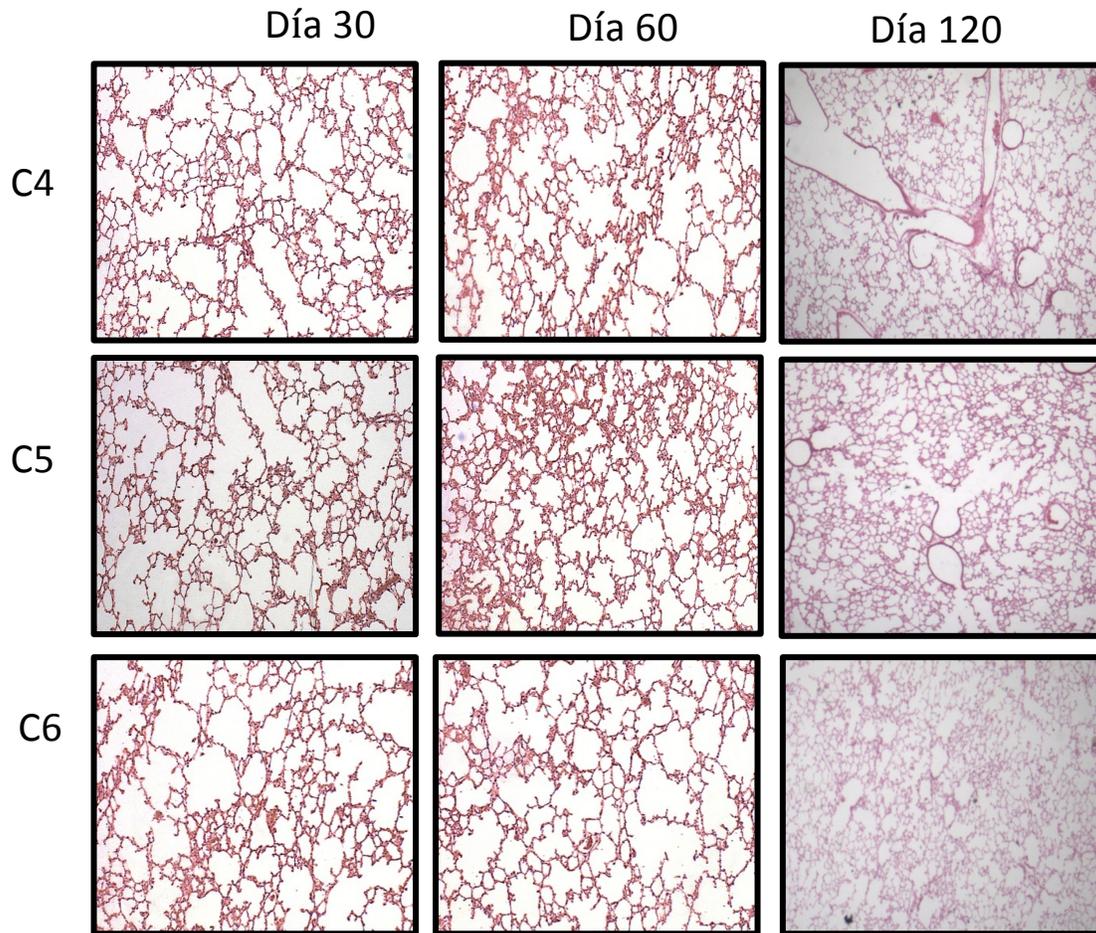


Figura 27. Análisis histológico de los pulmones de los ratones convivientes con las cepas C4, C5 y C6 a los días 30, 60 y 120 de convivencia. En las imágenes se muestran los cortes de los pulmones recuperados de los ratones convivientes con los ratones infectados con las cepas C4, C5 y C6 después de 30, 60 y 120 días de convivencia. Se muestran las imágenes representativas de dos experimentos independientes. Aumento 10x; tinción H&E

En este caso, en los pulmones no se encuentra ningún tipo de daño ni infiltrado celular a ninguno de los tiempos de sacrificio (30, 60 y 120 días). Es importante recordar que aunque no se muestra daño, había presencia de bacterias en los pulmones en los ratones convivientes con todas las cepas, siendo mayor su presencia al día 30 de convivencia (Figuras 15 y 16).

6. Cuantificación de citocinas

Por último, para tener una caracterización más amplia del efecto que tenían cada una de las cepas de *M. tuberculosis* al establecer una infección, se determinó el nivel de expresión en el ratón de diferentes citocinas a lo largo de tiempo. Esto se realizó por medio de ensayos de PCR cuantitativo (qPCR) con material genético extraído de los pulmones recuperados en cada tiempo de sacrificio y estandarizando con el gen constitutivo Rplo. En este caso, se eligió medir citocinas cuya presencia es importante para el desarrollo de las dos etapas (aguda y progresiva) de la enfermedad: IFN γ , iNOS, TNF α , IL-4, IL-17, IL-12 y TGF- β . Esta determinación sólo se realizó con muestras de las cepas C1, C2 y C4, ya que se decidió comparar el comportamiento de las dos cepas que desarrollaron una mayor carga bacilar y provocaron un mayor daño histológico con la cepa que tuvo el menor crecimiento en los pulmones, los mayores tiempos de sobrevida y un daño histológico más controlado.

En primer lugar, se presentan los niveles de IFN γ (Figura 28). Se observa que en el día 1 post-infección las tres cepas colombianas presentaron niveles bajos de expresión, siendo C1 la más baja. Después, en el día 3 las tres cepas tuvieron un pico en la expresión, el cual disminuyó una semana después en la cepa C1, mientras que las cepas C2 y C4 lo mantuvieron hasta el día 14. A partir de este momento, los niveles de IFN γ se mantuvieron bajos en las tres cepas hasta el final del experimento.

Posteriormente, en la determinación de iNOS (Figura 29), se observaron las siguientes tendencias: la cepa C1 comenzó con niveles bajos de expresión para ir aumentando ligeramente hasta que alcanzó un pico en el día 14 y volvió a descender hasta el final del experimento. Por otro lado, las cepas C2 y C4 tuvieron niveles más altos de expresión el día 1 post infección que aunque no llegaron a los niveles del pico de expresión que presentó C1, si se mantuvieron hasta el día 7, para después disminuir por debajo de los niveles de C1 hasta el final del experimento.

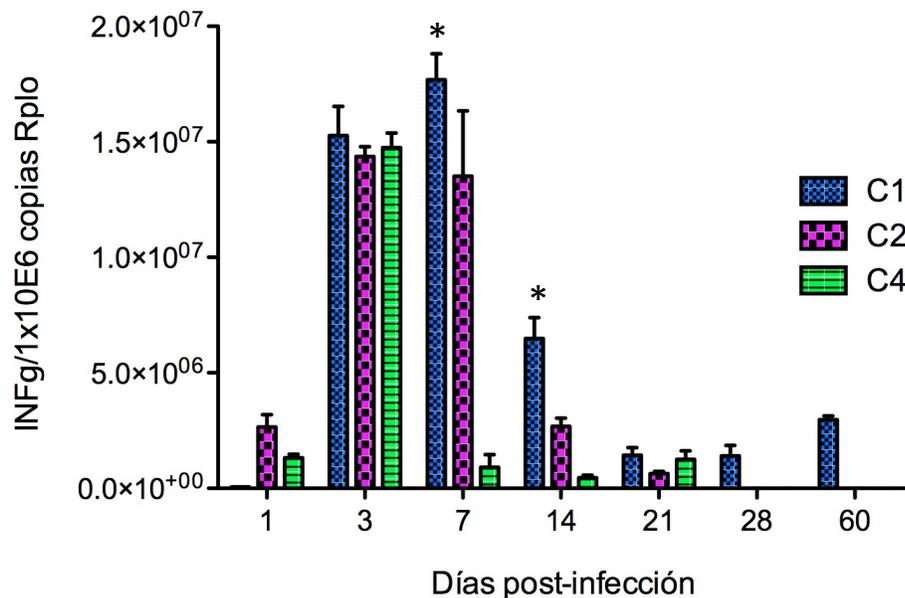


Figura 28. Cuantificación de mRNA codificante para citocinas por medio de qPCR. Se muestra la cantidad de copias promedio de mRNA correspondientes a INF- γ producido en ratones infectados con las cepas C1, C2 y C4 \pm DE en los diferentes días de sacrificio. La cepa C1 mostró diferencia significativa con las cepas C2 y C4 en los días 7 y 14, mientras que las cepas C2 y C4 mostraron diferencia significativa entre ellas sólo en el día 7 post-infección.

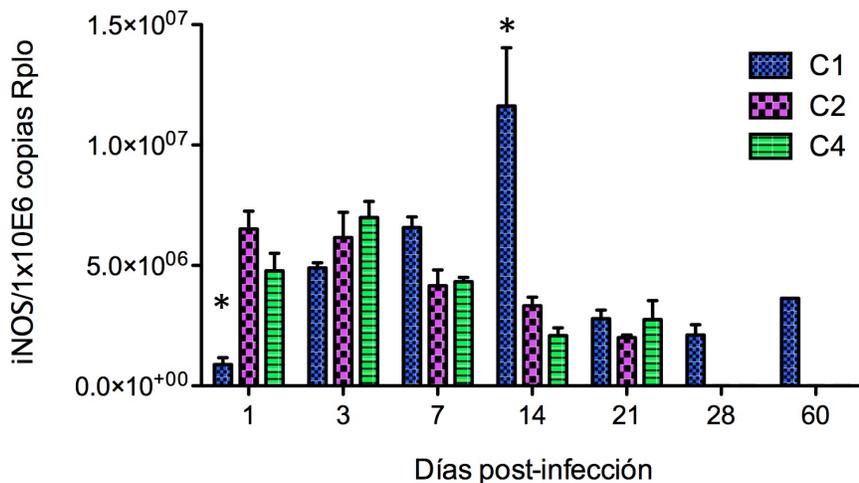


Figura 29. Cuantificación de mRNA codificante para citocinas por medio de qPCR. Se muestra la cantidad de copias promedio de mRNA correspondientes a iNOS producido en ratones infectados con las cepas C1, C2 y C4 \pm DE en los diferentes días de sacrificio. La cepa C1 mostró diferencia significativa con las cepas C2 y C4 los días 1 y 14, mientras que entre las cepas C2 y C4 no se mostró diferencia significativa.

En la determinación de TNF α (Figura 30) el comportamiento de la cepa C1 es similar a su comportamiento para inducir la expresión de IFN γ , inició con niveles muy bajos el día 1 post infección y después mostró un disparo en los niveles de expresión en el día 3 que se mantuvieron hasta el día 14. Posteriormente, a los se mostró una disminución días 21 y 28 y al final, un ligero aumento para el día 60.

El comportamiento de las cepas C2 y C4 fue ligeramente diferente, comenzó con niveles ligeramente más altos que los que mostró la cepa C1 y aumentó a niveles similares que C1 para los días 3 y 7, sin embargo, en este caso hubo una disminución para el día 14 y se mantuvo en niveles más bajos que C1 hasta el final del experimento.

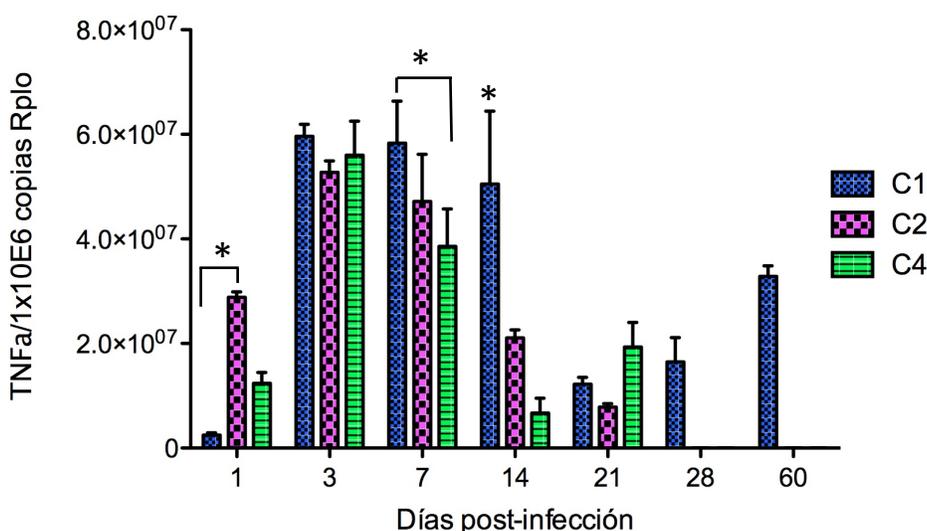


Figura 30. Cuantificación de mRNA codificante para citocinas por medio de qPCR. Se muestra la cantidad de copias promedio de mRNA correspondientes a TNF- α producido en ratones infectados con las cepas C1, C2 y C4 \pm DE en los diferentes días de sacrificio. La cepa C1 mostró diferencia significativa con la cepa C2 en los días 1 y 14, y con la cepa C4, los días 7 y 14. Entre las cepas C2 y C4 no se mostraron diferencias.

En las gráficas de la Figura 31, se muestran los niveles e expresión de IL-4, los cuales mostraron un comportamiento diferente entre las tres cepas. Todas las cepas comenzaron con niveles bajos y similares en el día 1 post-infección, pero mientras que al día 3 la cepa C4 presentó un pico en la expresión, las cepas C1 y C2 continuaron con niveles muy bajos que se mantuvieron a lo largo de todo el experimento. La cepa C4, sólo presentó un aumento de

expresión en el día 3, ya que al día 7 disminuyó hasta los niveles iniciales y los mantuvo durante el resto de la infección.

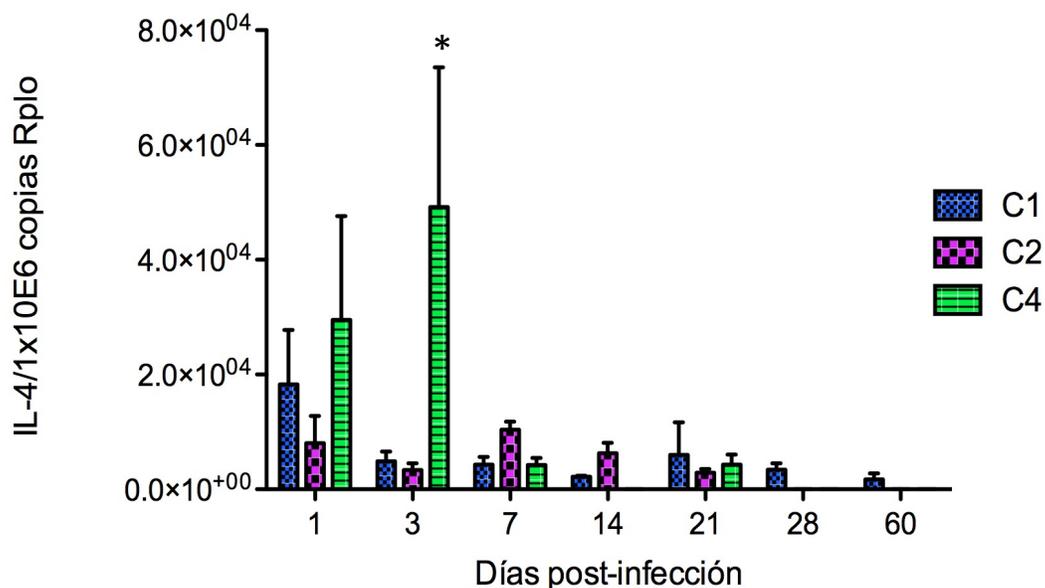


Figura 31. Cuantificación de mRNA codificante para citocinas por medio de qPCR. En las gráficas se muestra la cantidad de copias promedio de mRNA correspondientes a IL-4 producida en ratones infectados con las cepas C1, C2 y C4 \pm DE en los diferentes días de sacrificio. La cepa C4 muestra diferencia significativa con las cepas C1 y C2 sólo en el día 3.

Posteriormente en la Figura 32, se muestra la determinación de IL-12, la cual, mostró un comportamiento similar al de IFN γ . Una diferencia importante entre las tres cepas es que mientras que C2 y C4 mostraron una producción alta de la citocina desde el día 1 post-infección, la cepa C1 alcanzó niveles altos dos días después (día 3 post-infección). Por otro lado, esta alta producción cayó hacia la segunda semana post infección, manteniéndose en niveles muy bajos hasta el final del experimento.

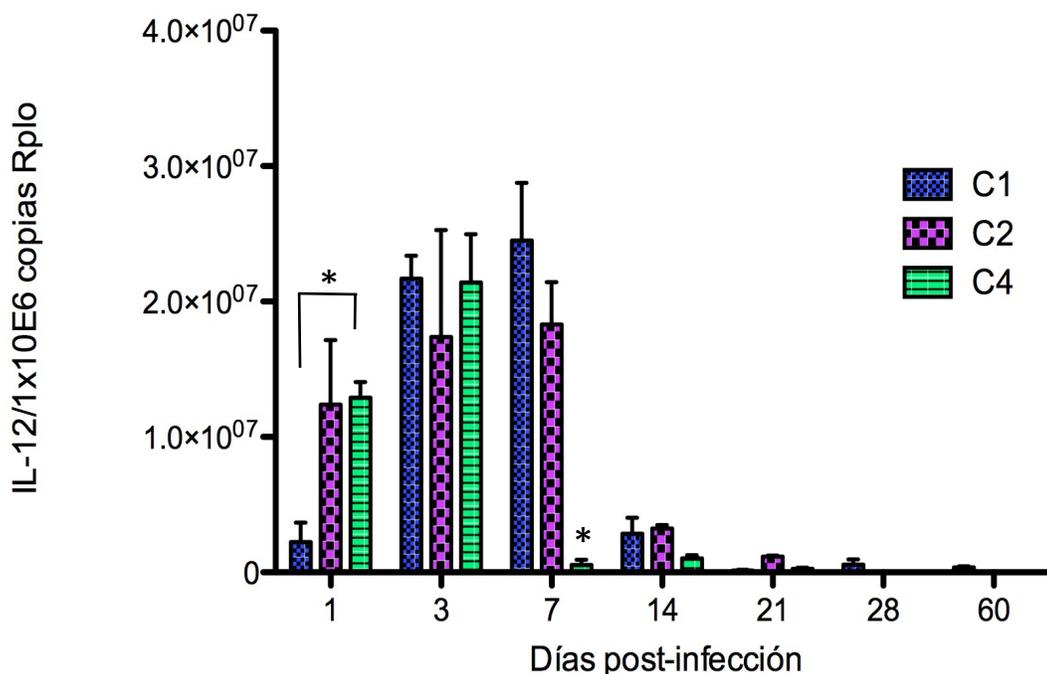


Figura 32. Cuantificación de mRNA codificante para citocinas por medio de qPCR. En la gráfica se muestra la cantidad de copias promedio de mRNA correspondientes a IL-12 producida en ratones infectados con las cepas C1, C2 y C4 \pm DE en los diferentes días de sacrificio. La cepa C2 mostró una diferencia significativa con la cepa 2 el día 1 y la cepa C4 con las cepas C1 y C2 en el día 7 post-infección.

En el caso de TGF β (Figura 33), su producción se observó de manera importante hasta el día 7 post infección para la cepa C1 y hasta el día 14 para las cepas C2 y C4. En general, después de este día, la producción se mantuvo alta y constante para las tres cepas a partir de este día y hasta el final del experimento, lo que contrasta con las demás citocinas, cuya producción se observó principalmente en los primeros días de la infección.

Por último, se muestran las gráficas con los niveles de expresión de IL-17 (Figura 34), donde se observó una tendencia diferente en el comportamiento de la cepa C1 y de las cepas C2 y C4. La cepa C1 comenzó con niveles muy bajos de expresión que aumentaron gradualmente hasta que alcanzaron un pico en el día 14. Una semana después, disminuyeron hasta niveles similares a los iniciales y se mantuvieron así hasta el final del experimento. Por otro lado, las cepas C2 y C4 comenzaron con niveles más altos de expresión el día 1 post-infección, siendo más altos los niveles que alcanzaron la cepa C2 a los que alcanzó la cepa C4.

Para el día 3 post-infección, los niveles de expresión de C2 disminuyeron ligeramente mientras que los de C4 aumentaron; a partir de este día, ambas cepas mostraron una disminución gradual hacia el final de experimento.

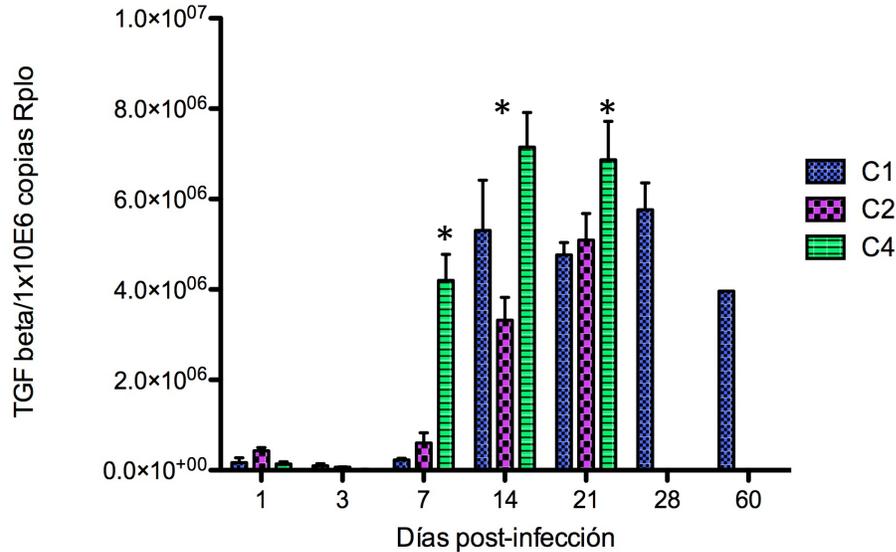


Figura 33. Cuantificación de mRNA codificante para citocinas por medio de qPCR. En la gráficas se muestra la cantidad de copias promedio de mRNA correspondientes a TGF- β producida en ratones infectados con las cepas C1, C2 y C4 \pm DE en los diferentes días de sacrificio. La cepa C4 mostró diferencia significativa con ambas cepas (C1 y C2) en los días 14 y 21; para el día 14, todas las cepas mostraron diferencias significativas entre si.

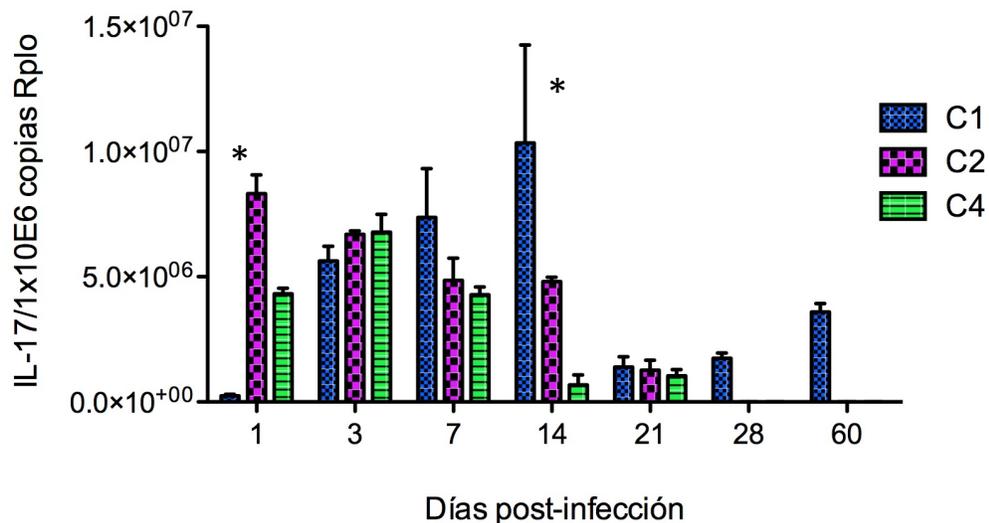


Figura 34. Cuantificación de mRNA codificante para citocinas por medio de qPCR. Se muestra la cantidad de copias promedio de mRNA correspondientes a IL-17 producido en ratones infectados con las cepas C1, C2 y C4 \pm DE en los diferentes días de sacrificio. Tanto en el día 1 como en el día 14 se mostró una diferencia significativa entre todas las cepas

IX. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Existen múltiples factores que influyen en el curso de la infección con Mtb y en sus consecuencias epidemiológicas, estos factores son tanto del hospedero, como ambientales e incluso de la cepa infectante. A este respecto, existe mucha información sobre el impacto del medio ambiente y el estado del hospedero en el desarrollo de la enfermedad, sin embargo, la influencia de la variabilidad genética de la bacteria ha sido poco estudiada de manera sistemática.

Hasta ahora, la mayoría de los estudios experimentales que intentan describir los mecanismos de la enfermedad se han realizado con cepas de referencia como H37Rv, sin embargo estos estudios se han tornado controversiales a la luz de nueva información, ya que algunas muestras de la misma cepa que pertenecen a diferentes laboratorios, muestran comportamientos distintos cuando se prueban en modelos animales (Ioreger *et al.*, 2010). Se considera que este fenómeno puede ser consecuencia de la adaptación de las cepas a las condiciones de cada laboratorio y eso implicaría que las diferentes muestras, por ejemplo de la cepa H37Rv, que se han utilizado en diferentes laboratorios, han evolucionado independientemente y por lo tanto su comportamiento varía en los modelos animales en los cuales se emplea (Ioreger *et al.*, 2010). Este comportamiento, también se ha observado con la cepa vacunal BCG, la cual, después de su exportación a diferentes partes del mundo y debido a que sufrió diferentes procedimientos para su crecimiento y conservación ahora presenta cambios tanto filogenética como genotípicamente (Behr y Small, 1998).

Tal vez uno de los primeros estudios que sugerían la existencia de diferencias en los patrones de virulencia de cepas de los diferentes linajes es el de Mitchison *et al.*, 1960, que comparó varios aislados de pacientes del sur de India y de Reino Unido en un modelo de cobayo. En general, los aislados de la India mostraron un comportamiento atenuado en mediciones de mortalidad y carga bacilar, por otro lado, un tercio de los aislados de Reino Unido fueron igual de virulentos que los aislados de India, mientras que la otra parte de los aislados eran mucho más atenuados. Sin embargo, ya que las técnicas de genotipificación no estaban disponibles en esos momentos, no se pudo asegurar que estas diferencias en la virulencia se debían a diferencias de linajes específicos.

Con esta creciente información sobre las variaciones genéticas que existen entre las diferentes cepas de Mtb, los estudios actuales buscan observaciones más objetivas realizando experimentos con cepas provenientes de aislados clínicos que muestran un comportamiento silvestre (wild type) en lugar de cepas canónicas crecidas adaptadas a las condiciones del laboratorio (Coscolla *et al.*, 2010, Malik *et al.*, 2005).

En este contexto, este trabajo intenta describir y comparar el comportamiento en un modelo murino de tuberculosis pulmonar progresiva con ratones BALB/c de 6 cepas colombianas provenientes de pacientes con Tb pulmonar y seleccionadas en base a su relevancia en estudios epidemiológicos.

De acuerdo con los datos epidemiológicos con los que se cuenta hasta este momento (Tabla II), todas las cepas fueron aisladas de pacientes VIH negativos, eran sensibles a fármacos, y presentaron una carga bacilar de intensidad similar. La caracterización genotípica indica que todas las cepas pertenecen a la misma familia y subfamilia (LAM-09).

Con el fin de poder establecer si había diferencias en el comportamiento de estas cepas dentro del hospedero y/o en su capacidad de transmisión, se realizaron experimentos de virulencia y transmisibilidad y se evaluó la progresión de la enfermedad en términos de la sobrevida, el crecimiento bacilar, el daño histológico y la respuesta inmune producida.

1. Experimento de virulencia.

Algunos autores definen la virulencia como la severidad de los síntomas que resultan en la muerte del hospedero o como la capacidad del microorganismo para multiplicarse y causar daño dentro del hospedero (Weiss, 2002; Orme, 1999; Poulin y Combres, 1999). En estudios con Mtb, éstas característica generalmente se ha determinado con el tiempo de sobrevida de los animales y con el número de bacilos cultivables, sin embargo, agregar a esta caracterización factores como el daño tisular tanto en pulmones como en otros órganos, es importante para tener una mejor descripción de la virulencia. (Palanisamy *et al.*, 2008).

Tomando en cuenta todos los parámetros medidos en este trabajo, se pudo observar que de las 6 cepas estudiadas, las cepas C2 y C4 tuvieron un comportamiento marcadamente distinto al resto de las cepas, esto a pesar de que cuando se realizan los cultivos en medio líquido, todas las cepas mostraron un ritmo de crecimiento similar a las mismas condiciones.

Aproximadamente a partir del día 14 postinfección, tanto los ratones infectados con la cepa C2 como la C4 presentaron un aumento marcado en el número de UFCs, el cual llegó a ser alrededor de 3 y 2 veces respectivamente mayor al que desarrolló C1, la cual fue la cepa que en general mostró desarrollar una enfermedad menos agresiva, es decir, mostró características menos virulentas. Además, en el día 14 postinfección se comenzaron a observar los daños causados en el tejido. Ambas cepas (C2 y C4) comenzaron a mostrar focos de necrosis, los cuales son ligeramente mayores para C4, aunque la diferencia no fue significativa.

Todos estos parámetros nos indican que a pesar de pertenecer a la misma familia, hay cepas que muestran no sólo un comportamiento diferente en el mismo modelo animal, sino que las diferencias hacen a la infección más agresiva y explotan al hospedero de manera más rápida.

Un aspecto importante que se observó en este trabajo fue la producción de necrosis en los pulmones de los ratones infectados con las cepas C2 y C4, la cual podría estar asociada tanto a la carga bacilar (Cardona, 2011), como al proceso inmunopatológico producido por la cepa infectante (Cruz A. *et al.*, 2010). Por otro lado, algunos estudios muestran que en Tb se ha demostrado que la muerte por apoptosis está asociada a la eliminación de las bacterias y estimula la respuesta de células T; mientras que la muerte por necrosis permite la liberación de bacterias viables para una subsecuente reinfección (Malik y Godfrey-Faussett, 2005), el tipo de respuesta celular que se presente, es un factor determinante en la formación de los granulomas, el daño tisular y la capacidad de transmisión de la bacteria. Algunos trabajos sugieren que Mtb es capaz de inhibir la muerte celular por apoptosis como un mecanismo de virulencia y que la capacidad de activar la cascada de caspasas depende en gran medida de la cantidad de bacterias presentes (Cardona, 2011). Kane *et al* en 1999 observaron de manera consistente una reducción en la apoptosis y la toxicidad de los macrófagos alveolares

después de la infección con cepas virulentas de Mtb en comparación con cepas isogénicas pero atenuadas o avirulentas, sin embargo, una alta tasa de replicación resulta en muerte por necrosis por un mecanismo independiente de caspasas, lo cual podría explicar por qué sólo las cepas que alcanzaron niveles altos de replicación, fueron capaces de producir este tipo de muerte celular. Sin embargo, hay estudios que contradicen estos modelos de inhibición de apoptosis, ya que cepas virulentas que contienen genes putativos antiapoptóticos como *nuoG* y *secA2* han mostrado estimular la muerte del macrófago por apoptosis aún a tasas bajas de replicación y algunas veces, en un mayor grado que las cepas avirulentas (Butler *et al.*, 2012).

Por otro lado, estudios similares de caracterización de diferentes cepas de Mtb en modelos animales, encontraron que al infectar con *M. canetti*, se inducen lesiones en el tejido mínimas aunque el crecimiento de las bacterias es relativamente alto a lo largo del tiempo (Dormans *et al.*, 2004). La discrepancia en estos datos sugiere que no es únicamente la carga bacilar *per se* la que induce el daño, sino también la intensidad de la respuesta inmune del hospedero lo que determina las manifestaciones clínicas de la enfermedad y que si bien la virulencia puede considerarse un factor determinante en el nivel de citotoxicidad no es determinante para el mecanismo de muerte celular.

Otro parámetro que se determinó en estos experimentos fue el nivel de expresión de diferentes citocinas presente en los pulmones de ratones infectados con las diversas cepas. En este caso se observó que tanto la cepa C2 como la cepa C4 despertaron una respuesta inflamatoria temprana y poco sostenida, que comenzó a decaer alrededor del día 7 ó 14 post infección, a comparación de la cepa C1, cuya respuesta inflamatoria en general se encontró en niveles altos por lo menos una semana después que las cepas C2 y C4.

A este respecto, se ha estudiado con gran detalle el papel que juega la respuesta inmune en la presentación de la enfermedad, encontrándose que las citocinas tipo Th1 como TNF α o IFN γ son responsables de la respuesta inflamatoria que contribuye con la formación de granulomas (Dormans *et al.*, 2004, Portevin *et al.*, 2011). Es precisamente este tipo de respuesta inflamatoria la que se observó que despiertan las cepas colombianas C2 y C4, que al ser tan exacerbada en un intervalo de tiempo tan corto podría ser una de las causas para la producción de necrosis. Otro punto importante es que la expresión de iNOS en estas cepas no

alcanzó niveles tan altos como C1, lo que puede impactar en la falta de contención de la infección y la eliminación intracelular de la micobacteria y/o la supresión de su crecimiento hacia un estado de latencia, además, se sabe que el exceso de TNF α induce la producción de ROS en la mitocondria de macrófagos infectados a través de las rutas dependientes de RIP1-RIP3 (receptor serina-treonina cinasas 1 -3) lo que en un inicio puede tener un efecto microbicida, pero también, si se trata de una producción rápida, puede llevar a la inducción de necrosis programada (necroptosis) y permitir así la liberación de la micobacteria para su crecimiento en el medio extracelular (Roca *et al.*, 2013). Es decir, el exceso de TNF α causa la muerte, no sólo de la bacteria, sino también de los macrófagos, permitiendo que las bacterias que sobreviven se diseminen hacia células adyacentes. En los ratones, estos mecanismo de contención dependen de la producción de ROS y NOS, mientras que en humanos se considera que la producción de granulosa y perforina es un importante factor bactericida (Dormans *et al.*, 2004; García de Viedma *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2005).

Por otro lado, algunos estudios muestran que la ausencia de IL-23 e IL17 en el pulmón lleva a un aumento en la severidad de la inflamación y daño tisular (Shabaana *et al.*, 2008). Sin embargo, esto no es necesariamente lo que se observó con nuestras cepas, ya que las tres cepas (C1, C2 y C4) mostraron niveles significativos de IL-17 sobre todo en el inicio de la infección.

Además de análisis de la expresión de citocinas, estudios de proteómica en diferentes sublinajes de la familia Beijing sugieren que diferencias en las proteínas involucradas en la organización de la pared celular y la regulación de la transcripción de DNA pueden tener una influencia crítica para definir el nivel de virulencia de la cepa (Hernández-Pando *et al.*, 2012, Kato-Maeda *et al.*, 2012). Como se mencionó en la introducción, la organización de la pared celular de la bacteria es un factor importante que impacta en la atigenicidad de la cepa y en la respuesta inmune del hospedero. Por lo tanto, a pesar de que las cepas que se estudiaron pertenezcan a la misma familia, pueden existir diferencias pequeñas a nivel genómico o incluso diferencias a nivel postraduccional de proteínas membranales, lo que tendría como consecuencia una respuesta diferente del sistema inmune. Un estudio que ejemplifica esto son los de Mazurek *et al.*, (2010) y Karakousis *et al.*, (2014) que observaron diferencias en la captación de LAM por los receptores de manosa de las cepas H37Rv y H37Ra, las cuales se

atribuyeron a diferencias en la estructura terciaria del LAM, la longitud de la cadena de azúcar en su cabeza o incluso su localización en la pared.

Otros estudios mostraron que la cepa H37Ra no es capaz de sintetizar varios antígenos de superficie, incluyendo sulfolípidos-1, micolatos de trehalosa y fitoceroles dimicoserato (PDMI) y que esto se puede deber a la falta de algunos SNPs a nivel genómico a comparación de la cepa H37Rv (Coscolla y Gagneux, 2010; Ioerger *et al.*, 2010)

Otra posibilidad que puede explicar el comportamiento tan diferente entre cepas que pertenecen a la misma familia filogenética es la alta tasa de mutación que poseen las bacterias. Por ejemplo, un estudio que analizó la variación genética que presentaban las bacterias de aislados obtenidos de diferentes partes del cuerpo de una sola paciente, los cuales fueron analizados por 5 técnicas distintas de genotipificación. Este sugiere que la microevolución puede tener un mayor impacto que lo asumido previamente, al menos en algunos casos (Al-Hajj *et al.*, 2010). Este fenómeno se puede deber a la deriva génica (cambio de las frecuencias alélicas en las especies a lo largo del tiempo), favorecido por un periodo largo de incubación de la enfermedad que produjo una población infecciosa amplia y por un muestreo azaroso, compartimentalización de la enfermedad y una diseminación extrapulmonar del microorganismo.

Otros estudios han demostrado que cepas del linaje 2 (Este Asiático y Beijing) adquieren resistencia a fármacos más rápido que las cepas del linaje 4 (Euro-Americano) y que esto se puede atribuir a una tasa de mutación más grande. Esto sugiere que hay altas posibilidades que un paciente muestre una cepa drogoresistente al momento del diagnóstico, cuando la infección fue adquirida inicialmente con una cepa drogosenible (Ford *et al.*, 2013, Yeh *et al.*, 1997)

Ya que el intercambio de material genético de manera horizontal parece no existir en *Mtb*, se piensa que esta bacteria ha evolucionado principalmente a causa de SNPs, deleciones, duplicaciones e inserciones. (Nicol y Wilkinson, 2008; Filliol *et al.*, 2006). Por ejemplo, la secuencia de inserción IS6110 se puede introducir en los genes interrumpiendo la secuencia codificante esto genera deleciones por eventos de recombinación y afecta la expresión de

genes por su actividad de promotor intrínseco. (Nicol y Wilkinson, 2008). Y una consecuencia importante de esta evolución independiente es el surgimiento de linajes clonales, cada uno descendiente de un ancestro común y posiblemente con características patógenas propias.

De manera general, se puede observar que en todos estos estudios, la capacidad de las diferentes cepas para producir una respuesta inflamatoria en el hospedero es crucial para la progresión de la enfermedad. La capacidad de suprimir la respuesta tipo Th1 parece ser determinante en modelos animales e *in vitro*, sin embargo, la medida en que este mecanismo se ve reflejado en humanos es aún desconocida. Por otro lado, es importante desarrollar más trabajos que exploren si estas características son propias de cepas individuales o si operan de manera más amplia en todo el linaje.

2. Experimento de convivencia

Un punto importante para el control de la Tb que empezó a ser considerado hasta hace poco tiempo, es el monitoreo y tratamiento de los contactos de pacientes que tienen una enfermedad activa. Hasta ahora se ha considerado que las diferencias en la transmisión y la progresión de la enfermedad están sobretodo influenciadas por la supresión del sistema inmune, como en pacientes con infección por VIH, sin embargo, es posible que también haya factores en el patógeno que influyan en este fenómeno (Gagneux *et al.*, 2013).

Nuestro modelo de convivencia probó ser efectivo para promover la transmisión de la bacteria entre los ratones ya que se pudieron obtener bacterias en cultivo a partir de los pulmones de los ratones sanos después de sólo 30 días de convivencia. Sin embargo, esto no fue suficiente para que se desarrollara una enfermedad activa, ya sea porque el tiempo de contacto fue muy corto o porque la cantidad de bacterias transmitidas por los animales enfermos no fue suficiente.

El hecho de que no todas las personas que entran en contacto con el patógeno manifiesten una enfermedad activa puede deberse a factores como la duración e intensidad de la exposición, la carga bacilar de la fuente infecciosa y la posibilidad de que el sistema inmune de la persona limpie al hospedero.

Existen algunos factores del sistema inmune que se han estudiado en este contexto, como: defectos en los genes que afectan el eje IFN γ /IL-12 que predisponen a infecciones severas tanto tuberculosas como no tuberculosas, también la reactivación de Tb latente por el bloqueo de TNF α con anticuerpos monoclonales usados para el tratamiento de artritis reumatoide y enfermedad de Crohn (Nicol *et al.*, 2008, Reiling *et al.*, 2013)

Además, existen diferentes estudios que han explorado el riesgo que enfrentan personas que están en contacto con pacientes de Tb activa infectados tanto con cepas fármaco sensibles como con cepas MDR. Sin embargo, se ha encontrado que la frecuencia de transmisión está más relacionada con las condiciones de vida de los pacientes y contactos (ej. si se comparte la misma cama, el hacinamiento, nutrición, etc.) que con las características de resistencia de las cepas (Teixeira *et al.*, 2001)

Por otro lado, hay estudios que comparan las diferencias entre el desarrollo de la enfermedad y la capacidad de transmisión, reportando que no hay una diferencia entre el número de contactos que se presentan como PPD positivos o se convierten a positivos después de estar en contacto con pacientes infectados con las cepas *M. africanum* y *Mtb* en particular del genotipo Beijing, aún si se agregan factores como si los contactos dormían o no en la misma cama o la edad, sin embargo, si hay una diferencia en el número de casos secundarios que se generan en los contactos de *M. africanum* y los de *Mtb*. En este caso, la diferencia llega a ser de hasta 5 veces más casos secundarios que se presentan con *Mtb* a los que se presentan con *M. africanum* (de Jong *et al.*, 2008). Esta diferencia entre progresión a la enfermedad activa entre especies indica que hay factores específicos en el patógeno que determinan tanto la transmisión y la infección inicial como la progresión de la enfermedad activa. Estos datos correlacionan con otras características moleculares de las cepas, como la capacidad de liberar IFN γ en respuesta al estímulo con ESAT-6 que se produce al exponer al sistema inmune a *Mtb*, pero no al exponerlo a *M. africanum*. (de Jong *et al.*, 2008).

Una teoría a este respecto es que la capacidad de montar una latencia prolongada, puede ser una adaptación evolutiva del microorganismo a una baja densidad de población. Sin embargo, una alta capacidad de progresión a una enfermedad activa es un ingrediente indispensable para que haya una mayor diseminación de la bacteria dentro de la población. En el caso de nuestro trabajo, todas las cepas estudiadas mostraron tener la capacidad de transmitirse a

ratones sanos, sin que esto significara que la cantidad de bacterias transmitida fuera suficiente para desarrollar la enfermedad activa. Esto también se puede explicar si tomamos en cuenta que la cantidad de bacterias que se encontraron en los pulmones de los ratones convivientes fue cerca de cien veces menor a la cantidad de bacterias que están presentes en los ratones inoculados los primeros días de la infección.

Como se mencionó anteriormente, recientemente se han utilizado métodos de genotipificación con el fin de establecer relaciones epidemiológicas sobre la infección con *Mtb*, sin embargo, estos métodos dependen de dos suposiciones que pueden parecer contradictorias: que el genotipo de la cepa infecciosa permanece constante a lo largo de la infección y que al mismo tiempo, los cambios en el genotipo a través del tiempo es lo que genera la diversidad del microorganismo.

Algunos estudios han explorado la estabilidad del genoma de las micobacterias analizando aislados de pacientes que fueron recolectados en diferentes momentos de la infección y encontraron que el genotipo de *Mtb* cambia relativamente rápido, este estudio se realizó en una zona de EEUU donde la incidencia de Tb es baja y los cambios que se encontraron fueron mínimos, reduciendo las probabilidades de que los cultivos analizados fueran resultado de reinfecciones con cepas diferentes (Nicol *et al.*, 2008).

En el estudio de Manca *et al.* de 1999 se observó que algunas cepas causaban una respuesta inmune alta y sostenida de tipo pro-inflamatoria en fagocitos mononucleares lo que puede estar relacionado con la alta frecuencia de conversión positiva a la prueba de tuberculina. Por otro lado, también se han identificado cepas que causan clusters más grandes (sugiriendo transmisión reciente) y crecen más rápido que otras cepas en un modelo *in vitro* de macrófagos (Theus *et al.*, 2005), también cepas responsables de casos extrapulmonares tienen esta misma capacidad de crecimiento (García de Viedma *et al.*, 2005)

Durante mucho tiempo, uno de los retos principales en este campo de investigación ha sido establecer una relación entre los fenotipos de las cepas definidas en un laboratorio con fenotipos clínicamente relevantes. Ahora, gracias al desarrollo de nuevas tecnologías como los microarreglos y secuenciación de DNA, se sabe que el complejo MTb presenta mayor variabilidad genética de lo que se pensaba anteriormente, que estas variaciones impactan de

manera importante en el fenotipo de la bacteria y que deben ser tomadas en cuenta para el desarrollo de estrategias de control y para el mejor entendimiento de la biología y epidemiología de uno de los problemas de salud más importantes.

Hay que recordar también que las diferencias en la progresión de la enfermedad también se pueden deber en gran medida a que las poblaciones de microorganismos no son homogéneas y mucho menos estáticas y que la evolución de la virulencia de un microorganismo es resultado y se ve limitada por la interacción que establece con su hospedero (Long y Graham, 2011).

Hasta ahora toda la información que trata de relacionar el fenotipo con variaciones genotípicas ha sido fragmentada y poco concluyente. Para tener un mejor entendimiento de las consecuencias de la gran diversidad de Mtb, hace falta primero contar con una clara definición de cuáles son estas cepas y linajes para entonces comparar su comportamiento.

Todos estos estudios proveen de una plataforma para tener una mejor apreciación de la evolución de la relación entre Mtb y el hospedero.

X. CONCLUSIONES

- Existen diferencias fenotípicas dentro de los miembros de un mismo linaje genotípico que impactan en la progresión de la enfermedad.
- El rápido crecimiento de estas cepas en el hospedero, así como el daño histológico a los pulmones que lograron causar, correlaciona con una respuesta inmune inflamatoria elevada, de rápida aparición pero poco sostenida, en la cual puede ser responsable por la rápida progresión de la enfermedad y por la extensión del daño producido.
- El modelo de convivencia establecido es suficiente para permitir una infección natural.
- La transmisión de las cepas a los ratones convivientes sanos no fue suficiente para el desarrollo de una enfermedad activa. Puede ser que las bacterias hayan entrado en estado de latencia.
- Los resultados observados en el trabajo no correlacionan completamente con los datos epidemiológicos obtenidos hasta el momento, ya que en estos se reportó una progresión de la enfermedad similar en todos los pacientes.

XI. PERSPECTIVAS

1. Analizar por inmunohistoquímica en los pulmones infectados si la alta expresión de mRNA de citocinas pro-inflamatorias corresponde también a una alta traducción de las proteínas.
2. Analizar si existen patrones diferenciales en la expresión de genes de las diferentes cepas utilizando técnicas de secuenciación masiva del mRNA de la bacteria.
3. Analizar si existen diferencias de expresión genética en los pulmones de los ratones que fueron infectados por las diferentes cepas aislando el mRNA del hospedero en los pulmones infectados.
4. Cuantificar por qPCR la expresión de genes asociados con latencia como hspX o isocitrato liasa para establecer la posibilidad de este estado en los ratones convivientes.
5. Analizar la capacidad de los ratones con enfermedad latente para reactivar la enfermedad inmunosuprimiendo a los ratones con corticoesteroides o dejándolos envejecer.

XII. APÉNDICE**1. REACTIVOS Y SOLUCIONES****A) Crecimiento de cepas de *M. tuberculosis***

Medio Middlebrook 7H9 (Beckton-Dickinson; Difco™, USA, Cat.271310) con glicerol

Para preparar 1L pesar:

4.7 g de medio

Disolver en 900 mL de H₂O bidestilada

Agregar 5 mL de glicerol anhidro

Agregar 500 µL de Tween 80 y disolver perfectamente calentando.

Seguir agitando hasta que el medio se observe traslúcido. Esterilizar.

Una vez estéril dejar atemperar y en campana de flujo laminar agregar 100 mL de ADC (Beckton-Dickinson; BBL™, USA, Cat. 211887)

Incubar a 37°C durante 24 hrs para prueba de esterilidad.

B) Recuperación y cuantificación de las cepas de *M. tuberculosis* para infección de ratones.

Buffer de Fosfatos (PBS) 20x

Para preparar 1 L pesar:

4 g KCl

5.4 g KH₂PO₄

28.2 g Na₂HPO₄ anhidro

159 NaCl

Disolver en 800 mL H₂O bidestilada

Ajustar el pH a 7.4 y aforar a 1 L. Esterilizar

PBS 1x

Para preparar PBS 1x, diluir 50 mL de PBS 20x en 950 mL de H₂O bidestilada

PBS-Tween 0.05%

Para preparar 1 L

Diluir 50 mL de PBS 20x en 950 mL de H₂O bidestilada (concentración final 1x)

Agregar 500 µL de Tween 80 y disolver perfectamente. Esterilizar

C) Infección de ratones con las cepas de *M. tuberculosis*

Solución salina estéril

Sevoflurano (Sevorane) Pisa Farmacéutica

D) Sacrificio y recolección de muestras a partir de ratones infectados

Éter etílico

Etanol absoluto

Solución esterilizante a base de dióxido de cloro (Clidox®, Pharmacal Research laboratories)

E) Unidades Formadoras de Colonias (UFCs)

PBS-Tween 0.05%

PBS 1x

Medio Middlebrook 7H10 (Beckton-Dickinson; Difco™, USA, Cat. 262710) agar con glicerol

Para preparar 1L pesar:

19 g de medio

Disolver en 900 mL de H₂O bidestilada

Agregar 5 mL de glicerol anhidro

Seguir agitando hasta que el medio se observe traslúcido. Esterilizar.

Una vez estéril dejar atemperar y en campana de flujo laminar agregar 100 mL de OADC (Beckton-Dickinson; BBL™, USA, Cat. 211886)

Repartir el medio en placas de Petri estériles y dejar secar. Incubar a 37° C durante 24 hrs para prueba de esterilidad

F) Histología e histomorfometría

Etanol absoluto

Xilol

Parafina

Soluciones de hematoxilina-eosina

G) Cuantificación de citocinas por PCR tiempo-real

Obtención de células mononucleares

Medio RPMI (Gibco®, Cat. 11875-093)

Por 1 mL de medio RPMI agregar 4 µL de colagenasa II (SIGMA)

Preparar 1 mL de la mezcla por cada muestra a procesar

Buffer de lisis

Para preparar 500 mL pesar:

4.145 g NH₄Cl

1.85 g EDTA

Disolver en 450 mL de H₂O bidestilada

Ajustar el pH a 7.2

Aforar a 500 mL

PBS 1x**Obtención de cDNA****Kit Omniscript Reverse Transcription**

Vol final de la reacción 50 µL mezclar:

Buffer 5 µL

dNTP 5 µL

oligo dT 5 µL

inhibidor Rnasas 2 µL

RT Omniscript 2 µL

H₂O libre de Rnasas 30 µL

Muestra de RNA 1 µL

PCR punto final 7500

Vol final 15 µL

HotStarTaq® 7.5 µL

Primers (sentido, antisentido) 0.5 µL

H₂O para PCR 5.5 µL

Muestra de cDNA 1 µL

XIII. REFERENCIAS

- **Aguilar L, Hanekom M, Mata D, Gey van Pittus NC, van Helden PD, Warren RM, Hernandez-Pando R** (2010) *Mycobacterium tuberculosis* strains with Beijing genotype demonstrate variability in virulence associated with transmission. *Tuberculosis* 90: 319-325
- **Al-Hajoj AS, 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
- **Andersen P, Doherty MT, Pai M, Weldingh K** (2007) The prognosis of latent tuberculosis: can disease be predicted? *TRENDS Mol Med* 13: 1471-4914
- **Barnes PF, Cave D** (2003) Molecular epidemiology of tuberculosis. Review *N Engl J Med* 349:1149-56
- **Barrera L** (2007) The Basis of Clinical Bacteriology. El libro de Tuberculosis. From basic science to patient care
- **Bashai WR, Dannenberg Jr AM, Parrish N, Ruiz R, Chen P, Zook BC, Johnson W, Boles JW, Pitt ML** (1999) Virulence of *Mycobacterium tuberculosis* CDC1551 and H37Rv in rabbits evaluated by Lurie's pulmonary tubercle count method *Infect Immun* 67:49311-4934
- **Barnes FP y Cave DM** (2003) Molecular epidemiology of tuberculosis *New Engl J Med* 349:1149-1156
- **Behr MA and Small PM** (1998) A historical and molecular phylogeny of BCG strains *Vaccine* 17: 915-922
- **Beken VS, Al Dulayymi RJ, Naessens T, Koza G, Maza-Iglesias M, Rowels R, Theunissen C, De Medts J, Lanckacker E, Baird SM, Grooten K** (2011) Molecular structure of the *Mycobacterium tuberculosis* virulence factor, mycolic acid, determines the elicited inflammatory pattern *Eur J Immunol* 41:450-460
- **Bernardo J, Billingsela AM, Blumenthal RL, Seetoo KF, Simons ER, Fenton MJ** (1998) Differential responses of human mononuclear phagocytes to mycobacterial lipoarabinomannans: role of CD14 and the mannose receptor *Infect Immun* 66:28-35
- **Brooks GF, Butel SJ, Morse AS** (2002) *Microbiología Médica de Jawetz, Melnick y Adelberg*. Ed. El Manual Moderno 17ª ed. México D.F. pp 451-456

- **Brosch R, Gordon V, Marmiesse M, Brodin P, Buchrieser C, Eiglmeier K, Garnier T, Gutierrez C, Hewinson G, Kremer K, Parsons ML, Pym SA, Samper S, van Soolingen D, Cole ST** (2002) A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex PNAS 99:3685-3689
- **Broussard WG y Ennis GD b** (2006) *Mycobacterium marinum* produces long-term chronic infections in Medaka: A new animal model for studying human tuberculosis *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 145:45-54
- **Butler ER, Brodin P, Jang J, Jang SM, Robertson DB, Gicquel B, Stewart RG** (2012) The balance of apoptotic and necrotic cell death in *Mycobacterium tuberculosis* infected macrophages is not dependent on bacterial virulence Plos One 7:e47573
- **Coscolla M, Gagneux S** (2010) Does *Mycobacterium tuberculosis* genomic diversity explain disease diversity? *Drug Discov Today Dis Mech* 7:e43-e59
- **De Jong CB, Hill CP, Aiken A, Awine T, Antonio M, Adetifa MI, Jackson-Sillah JD, Fox A, DeRiemer K, Gagneux S, Borgdorff WM, McAdam PK, Corrah T, Small MP, Adegbola AR** (2008) Progression to active tuberculosis, but transmission, varies by *M. tuberculosis* lineage in The Gambia *J Infect Dis* 198:1037-1043
- **Del Corral H, París SC, Marín DN, Marín MD, López L, Henao M H, Martínez T, Villa L, Barrera LF, Ortiz LB, Ramírez EM, Montes JC, Oquendo MC, Arango ML, Riaño F, Aguirre C, Bustamante A, Belisle TJ, Dobos K, Mejía IG, Giraldo RM, Brennan JP, Robledo J, Arbeláez PM, Rojas AC, García FL** (2009) IFN γ response to *Mycobacterium tuberculosis*, risk of infection and disease in household contacts of tuberculosis patients in Colombia Plos One 4:e8257
- **Dormans J, Burger M, Aguilar D, Hernández-Pando R, Kremer K, Roholl P, Arend MS, van Soolingen D** (2004) Correlation of virulence, lung pathology, bacterial load and delayed type hypersensitivity responses after infection with different *Mycobacterium tuberculosis* genotypes in a BALB/c mouse model *Clin Exp Immunol* 137:460-468
- **Dunn PL, North RJ** (1995) Virulence ranking of some *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* strains according to their ability to multiply in the lungs, induce lung pathology and cause mortality in mice *Infect Immun* 63:3428-3437
- **Emoto M, Emoto Y, Buchwalow IB, Kaufmann SH** (1999) Induction of IFN γ producing CD4+ natural killer T cells by *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette Guerin *Eur J Immunol* 29:650-659

- **Fauci SA, Morens MD** (2012) The perpetual challenge of infectious disease *N Engl J Med* 366:5 454-461
- **Ferro EB, Nieto ML, Rozo JC, Forero L, van Soolingen D** (2011) Multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*, southwestern Colombia *Emerging Infectious Diseases* 17: 1259-1262
- **Filliol I, Motiwala SA, Cavatore M, Qi W, Hazbón HM, del Valle BM, Fyfe J, García-García L, Rastogi N, Sola C, Zozio T, Guerrero IM, León CI, Crabtree J, Angiuoli S, Eisenach KD, Durmaz R, Joloba LM, Rendón A, Sifuentes-Osornio J, Ponce de León A, Cave DM, Fleischmann R, Whittam ST, Alland D** (2006) Global phylogeny of *Mycobacterium tuberculosis* based on single nucleotide polymorphism (SNP) analysis: Insights into tuberculosis evolution, phylogenetic accuracy of other DNA fingerprinting systems, and recommendations for a minimal standard SNP set *J Bacteriol* 188:759-772
- **Ford C, Shah R, Maeda KM, Gagneux S, Murray BM, Cohen T, Johnston J, Gardy J, Lipstich M, Fortune S** (2013) *Mycobacterium tuberculosis* mutation rate estimates from different lineages predict substantial differences in the emergence of drug-resistant tuberculosis *Nat Genet* 45: 784-790
- **Gagneux S** (2013) Genetic diversity in *Mycobacterium tuberculosis* *Curr Top Microbiol Immunol* 374:1-25
- **Gagneux S, Small PM** (2007) Global phylogeography of *Mycobacterium tuberculosis* and implications for tuberculosis product development *Lancet Infect Dis* 7:328-337
- **Gagneux S, DeRiemer K, Van T, Kato-Maeda M, de Jong CB, Narayanan S, Nicol M, Niemann S, Kremer K, Gutierrez MC, Hilty M, Hopewell CP, Small MP** (2005) Variable host-pathogen compatibility in *Mycobacterium tuberculosis* *PNAS* 103: 2869-2873
- **García de Viedma D, Lorenzo G, Cardona PJ, Rodríguez NA, Gordillo S, Serrano MJ, Bouza E** (2005) Association between the infectivity of *Mycobacterium tuberculosis* strains and their efficiency for extrapulmonary infection *J Infect Dis* 192:2059-2065
- **Gler TM, Skripconoka V, Sánchez-Garavito E, Xiao H, Cabrera-Rivero J** (2012) Delamanid for multidrug-resistant pulmonary tuberculosis *N Engl J Med* 366:2151-2160
- **Gorocica P, Jiménez-Martínez M, Garfias Y, Sada I, Lascurain R** (2005) Componentes glicosilados de la envoltura de *Mycobacterium tuberculosis* que intervienen en la patogénesis de la tuberculosis. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex* 18: 142-153

- **Herhberg R, Lipatov M, Small MP, Sheffer H, Niemann S, Homolka S, Roach CJ, Kremer K, Petrov AD, Feldman WM, Gagneux S** (2008) High functional diversity in *Mycobacterium tuberculosis* driven by genetic drift and human demography *Plos Biology* 6:2658-2671
- **Hernández-Pando R, Aguilar D, Cohen I, Guerrero M, Ribon W, Acosta P, Orozco H, Marquina B, Salinas C, Rembao D, Espitia C** (2010) Specific bacterial genotypes of *Mycobacterium tuberculosis* cause extensive dissemination and brain infection in an experimental model *Tuberculosis* 90: 268-277
- **Hernández-Pando R, Chacón-Salinas T, Serafin-López J, Estrada I** (2007) Immunology, pathogenesis, virulence. En el libro de Tuberculosis 2007. From basic science to patient care. 1ªed Editorial Bourcillier Kamps pp 157-206
- **Hernández-Pando R, Marquina-Castillo B, Barrios-Payán J, Mata-Espinosa D** (2012) Use of mouse models to study the variability in virulence associated with specific genotypic lineages of *Mycobacterium tuberculosis* *Infect Genet Evol* 12:725-731
- **Hernández-Pando R, Orozco H, Samperi A, Pavón 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
- **Hirsh AE, Tsolaki AG, DeRiemer K, Feldman WM, Small MP** (2004) Stable association between strains of *Mycobacterium tuberculosis* and their human host populations *PNAS* 101:4871:4876)
- **Huang SF, Su JW, Dou HY, Feng JY, Lee CY, Huang MR, Lin HC, Hwang JJ, Lee JJ, Yu CM** (2012) Association of *Mycobacterium tuberculosis* genotypes and clinical and epidemiological features a multi center study in Taiwan *Infect Genet Evol* 12:28-37
- **Ioreger RT, Feng Y, Ganesula K, Chen X, Dobos KM, Fortune S, Jacobs RW, Jr, Mizrahi V, Parish T, Rubin E, Sasseti C, Sacchetti CJ** (2010) Variation among genome sequences of H37Rv strains of *Mycobacterium tuberculosis* from multiple laboratories *J Bacteriol* 192:3645-3653
- **Kane J, Remold GH, Kornfeld H** (1999) Virulent *Mycobacterium tuberculosis* strains evade apoptosis of infected alveolar macrophages *J Immunol* 164:2016-2020
- **Karakousis P, Bishai RW, Dorman ES** (2004) Microreview. *Mycobacterium tuberculosis* cell envelope lipids and the immune response *Cell Microbiol* 6: 105-116

- **Kato-Maeda M, Shanley AC, Ackart D, Jarlsberg GL, Shang S, Obregon-Henao A, Harton M, Basaraba JR, Henao-Tamayo M, Barrozo JC, Rose J, Kawamura LM, Coscolla M, Fofanov YV, Koshinsky H, Gagneux S, Hopewell CP, Ordway JD, Orme IM** (2012) Beijing sublineages of *Mycobacterium tuberculosis* differ in pathogenicity in the guinea pig *Clin Vaccine Immunol* 19:1227-1237
- **Korf J, Stoltz A, Verschoor J, De Baetselier P, Grooten J** (2005) *Mycobacterium tuberculosis* cell wall component mycolic acid elicits pathogens-associated host innate immune responses *Eur J Immunol* 35:890-900
- **Lamrabet O y Drancourt M** (2012) Genetic engineering of *Mycobacterium tuberculosis*: A review *Tuberculosis* 92: 365-376
- **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
- **López-Álvarez R, Badillo-López C, Cerna-Cortes JF, Castillo-Ramírez I, Rivera-Gutierrez S, Helguera-Repetto AC, Aguilar D, Hernández-Pando R, Samper S, González-y-Merchand JA** (2010) First insights into the genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from HIV-infected mexican patients and mutations causing multidrug resistance *BMC Microbiology* 10:82
- **Ma Z, Lienhardt C, McIleron H, Nunn JA, Wang X** (2010) Global tuberculosis drug development pipeline: the need and the reality *Lancet* 375: 2100-09
- **Malik NA y Godfrey-Faussett P** (2005) Effects of genetic variability of *Mycobacterium tuberculosis* strains on the presentation of disease *Lancet Infect Dis* 5:174-183
- **Manca C, Tsenova L, Barry CE 3rd, Bergtold A, Freeman S, Haslett PA, Musser JM, Freedman VH, Kaplan G** (1999) *Mycobacterium tuberculosis* CDC1551 induces a more vigorous host response in vivo and in vitro, but is not more virulent than other clinical isolates. *J Immunol* 162:6740–6746
- **Manca C, Tsenova L, Bergtold A, Freeman S, Tovey M, Musser JM, Barry III CE, Freedman VH, Kaplan G** (2001) Virulence of a *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolate in mice is determined by failure to induce Th1 type immunity and is associated with induction of IFN alfa/beta *Proc Natl Acad Sci* 98:5752-5757

- **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-Osrnio J, Hernandez-Pando R** (2008) Virulence, immunopathology and transmissibility of selected Straits of *Mycobacterium tuberculosis* in a murine model *Immunology* 128:123-133
- **Mazurek J, Ignatowicz L, Kallenius G, Svenson BS, Pawlowski A, Hamasur B** (2012) Divergent effects of Mycobacterial cell wall glycolipids on maturation and function of human monocyte-derived dendritic cells *Plos One* 7:e42515
- **Mitchison DA, Wallace JG, Bhatia AL, Selkon JB, Subbaiah TV, Lancaster MC**, (1960) A comparison of the virulence in guinea pigs of South Indian and British tubercle bacilli *Tubercle* 41:1-22
- **Murray RP, Rosenthal SK, Pfaller AM** (2006) *Microbiología Médica El Sevier Mosby 5ª ed* Madrid Pp 297- 301, 307-310
- **Nicol MP, Wilkinson RJ** (2008) The clinical consequences of strain diversity in *Mycobacterium tuberculosis* *Trans R Soc Trop Med Hyg* 102:955-965
- **Orme MI** (1999) Virulence of recent notorious *Mycobacterium tuberculosis* isolates *Tubercle Lung Dis* 79: 379-381
- **Palanisamy SG, DuTeau N, Eisenach DK, Cave MD, Theus AS, Kreiswirth NB, Basaraba JR, Orme MI** (2009) Clinical strains of *Mycobacterium tuberculosis* display a wide range of virulence in guinea pigs *Tuberculosis* 89:203-209
- **Palanisamy SG, Smith EE, Shanley AC, Ordway JD, Orme MI, Basaraba JR** (2008) Disseminated disease severity as measure of virulence of *Mycobacterium tuberculosis* in the guinea pig model *Tuberculosis* 88:295-306
- **Pérez-Martínez I, Ponce-De-León A, Bobadilla M, Villegas-Sepúlveda N, Pérez-García M, Sifuentes-Osornio J, González-y-Merchand JA, Estrada-García T** (2008) A novel identification scheme for genus *Mycobacterium*, *M. tuberculosis* complex, and seven mycobacteria species of human clinical impact *Eur J Clin Microbio Infect Dis* 27: 451-459
- **Petrelli D, Kaushal SM, Wolfe J, Al-Azem A, Hershfield E, Kabani A** (2004) Strain-related virulence of the dominant *Mycobacterium tuberculosis* strain in the Canadian province of Manitoba *Tuberculosis (Edinb.)* 84:317-326

- **Petros CK, Bishai WR, Dorman ES** (2004) Mycobacterium tuberculosis cell envelope lipids and the host immune response *Cell Microbiol* 6:105-116
- **Plan Estratégico Colombia libre de tuberculosis 2010-2015** (2009) Colombia
- **Portevin D, Gagneux S, Comas I, Young D** (2011) Human macrophage responses to clinical isolates from the Mycobacterium tuberculosis complex discriminate between ancient and modern lineages. *PLoS Pathog* 7:e1001307
- **Poulin R y Combes C** (1999) The concept of virulence: interpretations and implications *Parasitol today* 15: 474-475
- **Ramakrishnan L** (2012) Revisiting the role of the granuloma in tuberculosis. Review. *Nature* 12: 352-366
- **Reed MB, Domenech P, Manca C, Su H, Barczak AK, Kreiswirth BN, Kaplan G, Barry CE** (2004) A glycolipid of hypervirulent tuberculosis strains that inhibits the innate immune response. *Nature* 431:84–87
- **Reed MB, Domenech P, Manca C, Su H, Barczak AK, Kreisworth BN, Kaplan G, Barry III CE** (2004) A glycolipid of hypervirulent tuberculosis strains that inhibits the innate immune response *Nature* 431:84-87
- **Reiling N, Homolka S, Walter K, Brandenburg J, Niwinski L, Martin E, Herzmann C, Lange C, Diel R, Ehlers S, Niemann S** (2013) Clade-specific virulence patterns of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains in human primary macrophages and aerogenically infected mice *mBio* 4:e00250-13
- **Ritacco V, López B, Cafrune PI, Ferrazoli L, Suffys NP, Candia N, Vásquez L, Realpe T, Fernández J, Lima VK, Zurita J, Robledo J, Rossetti LM, Kritski LA, Telles AM, Palomino CJ, Heersma H, van Soolingen D, Kremer K, Barrera L** (2008) *Mycobacterium tuberculosis* strains of the Beijing genotype are rarely observed in tuberculosis patients in South America *Mem Inst Oswaldo Cruz* 103:489-492
- **Roca JF, Ramakrishnan L** (2013) TNF dually mediates resistance and susceptibility to mycobacteria via mitochondrial reactive oxygen species *Cell* 153:521-534
- **Rubin JE** (2009) The granuloma in tuberculosis- Friend or foe? *N Engl J Med* 360: 2471-2473
- **Santos GL, Pires NG, Bittencourt ARL, Tufik S, Andersen LM** (2012) Chronobiology: relevance for tuberculosis. Review. *Tuberculosis* 92: 293-300

- **Shabaana AK, Cooper MA** (2008) IL-23 and IL-17 in tuberculosis Cytokine 41:79-83
- **Sherris JC, Kenneth J.R. Ray CG** (2005) Microbiología Médica. Una introducción a las enfermedades infecciosas. Ed.Mc Graw Hill Interamericana.1ª ed. México, 2005.Pp 477- 489.
- **Small P and Madhukar P** (2010) Tuberculosis diagnosis-time for a game change N Engl J Med 363:1070-1071
- **Teixeira L, Perkins MD, Johns JL, Keller R, Palaci M, Dettoni do Valle V, Rocha Canedo LM, Debanne S, Talbot E, Dietze R** (2001) Infection and disease among household contacts of patients with multidrug-resistant tuberculosis Int J Tuberc Lung 5: 321-328
- **Theus SA, Cave MD, Eisenach K, Walrath J, Lee H, Mackay W, Whalen C, Silver RF** (2006) Differences in the growth of paired Ugandan isolates of *Mycobacterium tuberculosis* within human mononuclear phagocytes correlate with epidemiological evidence strain virulence Infect Immun 74:6865-6876
- **Tsenova L, Ellison E, Harbacheuski R, Moreira AL, Kurepina N, Reed MB, Mathema B, Barry III CE, Kaplan G** (2005) Virulence of selected *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates in the rabbit model of meningitis is dependent on phenolic glycolipid produced by the bacilli J Infect Dis 192:98-106
- **Van Ingen J, Rahim Z, Mulder A, Boeree JM, Simeone R, Brosh R, van Soolingen D** (2012) Characterization of *Mycobacterium orygis* as *M. tuberculosis* complex subspecies Emerg Infect Dis 18: 653-655
- **Verschoor AJ, Baird SM, Grooten J** (2012) Towards understanding the functional diversity of cell wall mycolic acids of *Mycobacterium tuberculosis* Prog Lipid Res 51: 325-339
- **Weiss AR** (2002) Virulence and pathogenesis Trends Microbiol 10:314-317
- **WHO** (2012) Global tuberculosis report
- **WHO** (2013) Global tuberculosis report
- **Williams AE** (2011) Immunology. Mucosal and body surface defences. Wiley-Black 1ª ed. USA
- **Yeh WR, de Leon P, Agasino BC, Hahn AJ, Daley LC, Hopewell CP, Small MP** (1997) Stability of *Mycobacterium tuberculosis* DNA Genotypes The Journal of Infectious Diseases 177:1107-1111
- **Young DB y Garbe TR** (1991) Lipoprotein antigens of *Mycobacterium tuberculosis* Res Microbiol 142:55-65

- **Zhenkun M, Lienhardt C, McIleron H, Nunn JA, Wang X** (2010) Global tuberculosis drug development pipeline: the need and the reality *Lancet* 375:2100-2109
- **Zuñiga J, Torres-García D, Santos-Mendoza T, Rodriguez-Reyna ST, Granados J, Yunis JE** (2011) Cellular and humoral mechanisms involved in the control of tuberculosis *Clin Dev Immunol* 2012:193923