



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA**

**Estrategia de vacunación utilizando la cepa BCG-Phipps con fagos recombinantes que expresan antígenos de *Mycobacterium tuberculosis* en un modelo murino de tuberculosis.**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA:**

**Ángel Elías Ortiz Cabrera.**

**Director de tesis: Dra. Brenda Noemí Marquina Castillo.**

**Asesor de tesis: Dr. Rubén Marroquín Segura.**

**Lugar de desarrollo:  
SECCIÓN DE PATOLOGÍA EXPERIMENTAL. DEPARTAMENTO DE  
PATOLOGÍA. INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS  
MÉDICAS Y NUTRICIÓN "SALVADOR ZUBIRÁN".**

**MÉXICO, DF. 2015**



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.

---

*“Ni las derrotas ni las victorias son definitivas. Eso les da una esperanza a los derrotados y debería darles una lección de humildad a los victoriosos.”*

*José Saramago.*

---

---

## DEDICATORIAS.

A mi madre Martha, a mis tíos Carmen y José, a mi hermano Gustavo y esposa Yutzil, a mi hermana Nuvia ,mi prima Sowe y mi abuelo Melin, por su apoyarme todo el tiempo y sobre todo por estar siempre en las buenas y en las malas conmigo los amo.

A Irene gracias por su paciencia, por su comprensión, por su fuerza, por su amor y por ser tal y como es, porque la amo. En realidad pienso que todo el mundo debería tener en su vida a alguien como ella.

---

---

## AGRADECIMIENTOS.

Agradezco a la Dr. Brenda Noemí Marquina Castillo por su apoyo, su paciencia, por sus todas sus enseñanzas.

Al Dr. Jorge Barrios y a al Dr. Dulce Mata por todo el tiempo dedicado que me brindaron y sus asesorías.

Al Dr. Rogelio Hernández Pando por su confianza y su asesoría.

---

---

**INDICE:**

**INTRODUCCION.....1**

**I) MARCO TEORICO:**

**1) TUBERCULOSIS.**

1.1) ASPECTOS GENERALES DE LA TUBERCULOSIS.....4

1.2) AGENTE ETIOLOGICO.....6

1.3) EPIDEMIOLOGIA.....7

1.4) PATOGENIA.....8

1.5) PAPEL DE LOS ANTICUERPOS EN LA TUBERCULOSIS.....12

**2) BCG.**

2.1) HISTORIA.....15

2.2) CEPAS DE BCG.....16

2.3) EFICACIA DE BCG.....17

2.4) REACCIONES SECUNDARIAS.....18

**3) BACTERIOFAGOS.**

3.1) LOS BACTERIOFAGOS EN BIOLOGIA MOLECULAR.....18

3.2) TECNOLOGIA DE PRESENTACION DE PEPTIDOS O PROTEINAS EN LA SUPERFICIE DEL BACTERIOFAGO.....19

---

3.21.1) ANTÍGENO LIPOPROTEINA DE 19 KDa DE <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	20
3.2.2) ANTÍGENO OXIDO REDUCTASA DE <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	21
3.2.3) ANTÍGENO ACIL CoA LIGASA DE <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	22
3.2.4) BIBLIOTECA GENOMICA.....	22
<b>4) MODELO DE TUBERCULOSIS PULMONAR PROGRESIVA.....</b>	<b>25</b>
<b>II) PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....</b>	<b>27</b>
<b>III) HIPOTESIS.....</b>	<b>28</b>
<b>IV) OBJETIVOS.</b>	
OBJETIVO GENERAL.....	29
OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	29
<b>V) MATERIAL Y METODOS.</b>	
<b>A) DISEÑO.....</b>	<b>30</b>
<b>B) UNIVERSO.....</b>	<b>30</b>
<b>C) VARIABLES.....</b>	<b>30</b>
<b>D) TECNICAS.....</b>	<b>30</b>

---

---

Preparación de la vacuna BCG-Ph y preparación de la cepa de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv.....	30
Vacunación de ratones.....	33
Aplicación de los fagos recombinantes.....	33
Reto con la cepa de <i>M.tuberculosis</i> H37Rv.....	35
Sacrificio.....	35
Determinación de la carga bacteria por UFC´s.....	36
Preparación del tejido pulmonar para el estudio histológico y morfometrico.....	36
<b>E) DISEÑO ESTADISTICO.....</b>	<b>37</b>
<b>VI) RESULTADOS.....</b>	<b>38</b>
<b>VII) DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....</b>	<b>47</b>
<b>VIII) CONCLUSIONES.....</b>	<b>55</b>
<b>IX) PERSPECTIVAS.....</b>	<b>56</b>
<b>X) REFERENCIAS .....</b>	<b>57</b>

---



---

## INTRODUCCION.

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa crónica que afecta principalmente a los pulmones y es causada por un conjunto de bacterias (*M.bovis*, *M.africanum*, *M. tuberculosis*, *M. microti*, *M. canettii*, *M. caprae* y *M. pinnipedi*). La infección se transmite de persona a persona a través del aire cuando un enfermo de tuberculosis pulmonar tose, estornuda o escupe, expulsando los bacilos tuberculosos al aire. Se calcula que una tercera parte de la población mundial tiene tuberculosis latente; es decir, están infectadas por el bacilo pero aún no han enfermado ni pueden transmitir la infección.

La tuberculosis es la segunda causa de mortalidad, después del SIDA, a nivel mundial, causada por un agente infeccioso. En 2013, 9 millones de personas enfermaron de tuberculosis y 1,5 millones murieron por esta enfermedad.

En los últimos años, el surgimiento de *M. tuberculosis* fármaco resistente ha complicado aún más los de por sí complejos regímenes de tratamiento, y en la mayoría de los países pobres pocas personas pueden pagar el tratamiento de la infección por bacilos multirresistentes. Aunque la tuberculosis es una enfermedad potenciada por la pobreza, y la mejora de las condiciones socioeconómicas frena de forma sistemática la transmisión de la enfermedad, la transición de la pobreza a la prosperidad requiere a menudo que transcurran varias generaciones

En la actualidad, la única vacuna disponible para prevenir la tuberculosis en la población humana es *Mycobacterium bovis* BCG (bacilo de Calmette-Guerin), la cual se produjo al principio a partir de varios subcultivos de una cepa de *M .bovis* virulenta proveniente de mastitis bovina en 1908. La BCG se ha utilizado desde 1921 y se calcula que se han administrado desde entonces más de 2.5 billones de dosis, lo cual la convierte en la vacuna más utilizada en la población humana hasta el momento.

---

BCG tiene la ventaja de ser barata y segura, pues son muy raras complicaciones como la diseminación sistémica post-vacunal en niños, incluso en los infectados con el VIH. Por lo regular, la BCG se aplica poco después del nacimiento en una sola dosis, lo cual induce repuesta protectora durante largo tiempo.

Sin embargo, a pesar de todas las ventajas mencionadas de la BCG, esta vacuna tiene también la enorme desventaja de que el grado de protección que confiere es extremadamente variable. Por ejemplo, en Inglaterra, la protección que proporciona la BCG es de 50 a 80%, en tanto que en Malawi, África, o en el sur de la India la protección es cero.

Debido a esta amplia variabilidad en la protección que confiere la vacuna BCG, hay un interés mundial, en el desarrollo de nuevas y más efectivas vacunas para evitar la tuberculosis con el fin de controlar en forma eficaz a esta grave enfermedad infecciosa.

Los avances recientes en las características inmunológicas y en el conocimiento sobre los genes de *M. tuberculosis*, así como el desarrollo de nuevas tecnologías en biología molecular han contribuido a producir nuevos candidatos vacúnales diseñados de manera más dirigida como por ejemplo proteínas específicas.

Gracias a la colaboración del Dr. Karen Manoutcharian del Departamento de Biología Moléculas y Biotecnología Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM se han construido 4 tipos de bacteriófagos recombinantes los cuales expresan de manera independiente una biblioteca genómica de *M. tuberculosis*, una enzima oxidoreductasa, una lipoproteína de 19 KDa y un enzima Acil CoA ligasa. Con los cuales se podrán evaluar su protección y efecto sinérgico con la vacunación de BCG-Phipps en un modelo murino de tuberculosis pulmonar.

Estos bacteriófagos contiene antígenos relacionados con la patogenicidad de la micobacteria, la lipoproteína de 19 KDa inhibe la expresión del complejo principal de histocompatibilidad tipo II en macrófagos imposibilitando así la presentación de antígenos a las células T CD4. Una enzima que ha sido aislada por el grupo de

---

trabajo del Dr. Karen Manoutcharian de la cual solo se conoce que podría tener actividad oxidoreductasa pero aun se desconoce la reacción específica que cataliza. La enzima Acil CoA ligasa, es necesaria para la síntesis de acil CoA, este es degradado mediante la  $\beta$ -oxidación, produciendo acetil CoA la cual tendría dos destinos principales dentro del metabolismo de la micobacteria. El primero sería la oxidación a través del ciclo de Krebs y el segundo la biosíntesis de ácidos grasos. Por último los fagos que contienen la biblioteca genómica de *M. tuberculosis* los cuales tienen todo el genoma o la mayor parte del patógeno pudiendo expresar uno o varios antígenos diferentes en la cápside de dicho fago.

En este estudio se evaluará la capacidad protectora de los fagos recombinantes como agentes profilácticos, también se evalúa el efecto de los fagos como refuerzos de la vacunación con BCG- Phipps a través de la sobrevivencia, carga bacilar y % de neumonía en un modelo murino de tuberculosis vacunando con BCG-Phipps, aplicando los refuerzos con los fagos recombinantes y retando con la cepa *M.tuberculosis* H37Rv.

---

## I) MARCO TEORICO:

### 1) TUBERCULOSIS.

#### 1.1) ASPECTOS GENERALES:

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa, causada por un grupo de bacterias del orden Actinomicetales de la familia *Mycobacteriaceae*. En la práctica se acostumbra a señalar como sinónimos a *M. tuberculosis* y al bacilo tuberculoso, pero conviene recordar que taxonómicamente existen especies emparentadas genéticamente y, que a la vez, aunque poco frecuentes, agentes causales de la tuberculosis, son *M.bovis*, *M.africanum* (complejo *M. tuberculosis*), *M. microti*, *M. canettii*, *M. caprae* y *M. pinnipedii*.<sup>(1)</sup> Se transmite de persona a persona por inhalación de aerosoles contaminados por el bacilo, que han sido eliminados por los individuos enfermos al toser, hablar o estornudar <sup>(2)</sup>.

Como consecuencia del mecanismo de transmisión la enfermedad es generalmente pulmonar aunque puede afectar a otros órganos (tuberculosis extra-pulmonar) producto de la diseminación por vía linfática, por continuidad o hematogena, causando tuberculosis meníngea, digestiva, genital, oftálmica, renal entre otras.<sup>(3)</sup>

Es interesante que más de 90% de los casos de quienes se infectan por primera vez, el sistema inmunológico contiene a las bacterias, y tan solo 5 al 10% desarrollan la enfermedad progresiva. Más interesante es el hecho de que en el 30% de los individuos infectados que no se enferman, las bacterias se albergan dentro de las células del huésped sin producir daño en un estado que se conoce como infección latente la cual es clínicamente asintomática y no transmisible (figura 1). Sin embargo cuando la actividad de la respuesta inmunológica disminuye como consecuencia del envejecimiento o de la presencia de enfermedades debilitantes como el cáncer, la diabetes o el SIDA, las bacterias en estado de latencia se reactivan y producen una enfermedad activa. <sup>(4)</sup>

A través de la historia la tuberculosis ha sido un problema de salud para la humanidad. Posiblemente en los albores de la civilización esta enfermedad fue esporádica, pero con el incremento de las densidades de población, en los siglos XVII, XVIII y XIX, esta tomó proporciones epidémicas. Como consecuencia de la revolución industrial muchos países sufrieron cambios en la localización de su población, que se movía de zonas agrarias dispersas a núcleos urbanos concentrados (5). Estos cambios conllevaron al empeoramiento de las condiciones de vida, pobre sanidad y malnutrición, todo lo cual potenció la susceptibilidad de las personas y el esparcimiento de la enfermedad.

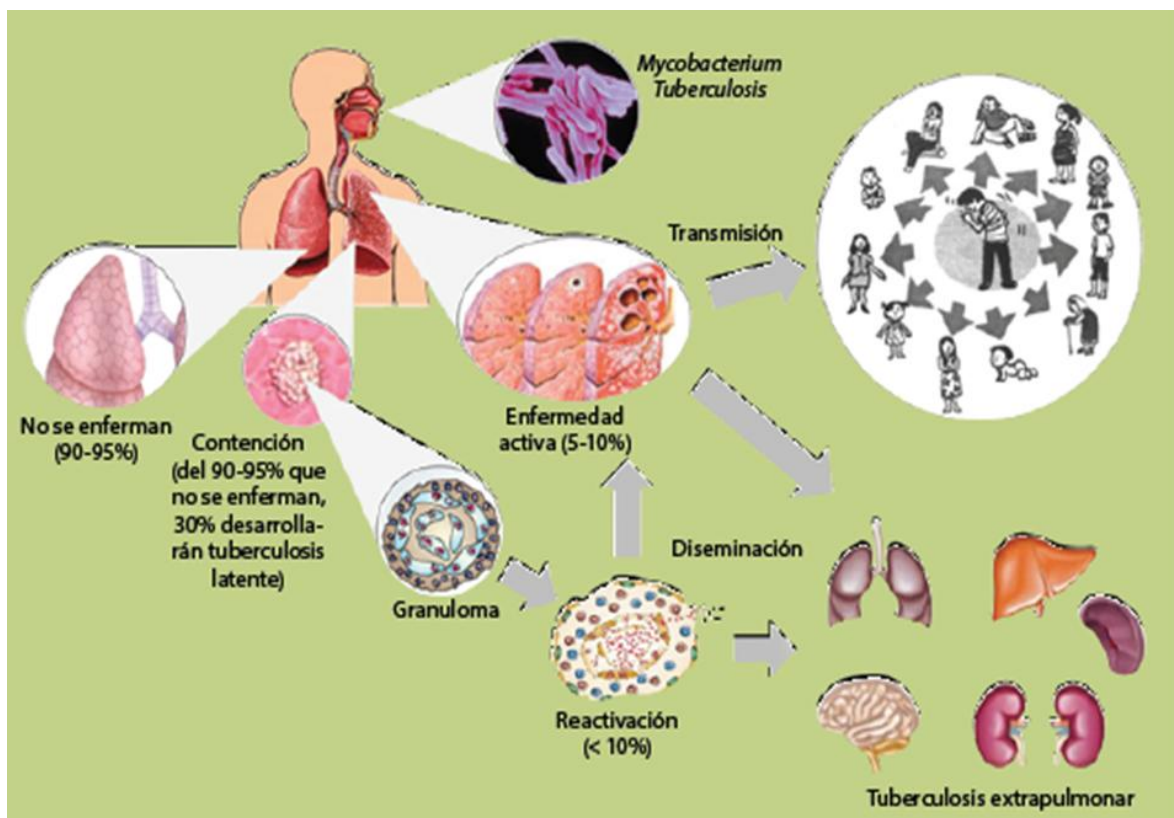


Figura 1.- Esquema de las diferentes rutas clínicas después de la infección primaria con *M. tuberculosis*

---

## 1.2) AGENTE ETIOLOGICO:

En los tejidos *M. tuberculosis* es un bacilo recto, inmóvil y no esporulado. En medios artificiales se observan formas cocoides y filamentosa. (6).

Hay una marcada similitud tanto química como estructural en la envoltura de la mayoría de las bacterias de *M. tuberculosis* y otras micobacterias son biológicamente similares a las bacterias gram positivas (aunque en la tinción de gram las micobacterias son débilmente positivas o no se tiñen), los bacilos tampoco se pueden decolorar con alcohol ni con soluciones ácidas, motivo por el que reciben el nombre de bacilos ácido-alcohol-resistentes. pero tienen aspectos distintos. En especial se debe destacar que aunque ambos poseen peptidoglicanos las moléculas unidas o asociadas a este polímero son en las micobacterias fundamentalmente de naturaleza lipídica en vez de proteínas y lipopolisacáridos. (6).

La envoltura consiste en dos partes principales: la membrana plasmática y, alrededor de ella la pared celular, la primera le otorga a la célula protección osmótica y transporte de iones y moléculas, en tanto que la segunda le brinda soporte mecánico y protección. La membrana plasmática está cubierta por una capa extensa de peptidoglicanos unidos a polisacáridos, los cuales se encuentran esterificados con los ácidos micólicos (60% del peso de la pared celular), formados por lípidos libres, glucolípidos y peptidoglucolípidos (figura 2); esta estructura, le brinda una apariencia cerosa, le confiere una alta hidrofobicidad, resistencia a detergentes, a un buen número de antibióticos, y frente a las tinciones habituales de laboratorio.(6)

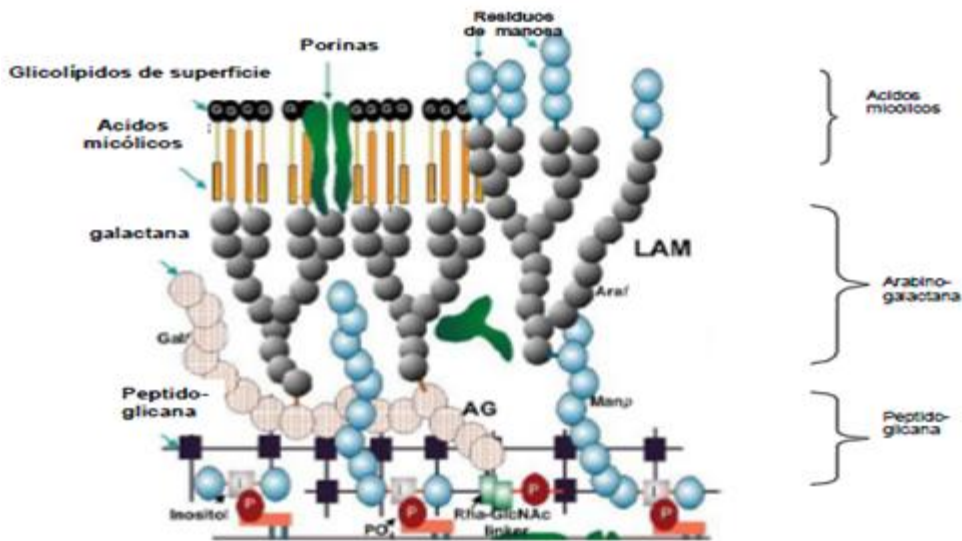


Figura 2.- Estructura de la envoltura de *M.tuberculosis*.

El metabolismo de *M. tuberculosis* es variable, el tiempo de duplicación es de casi 18 horas, la bacteria puede cultivarse en medio Middlebrook que es un agar selectivo y específico para micobacterias y en medio Lowestein-Jensen, que es un medio a base de huevo. En ambos medios las colonias sembradas a 35-37 ° C pueden observarse dentro de 3-6 semanas. Las colonias se observan color beige y tiene una apariencia granular seca y áspera. (6)

Desde el punto de vista de requerimientos atmosféricos aunque *M. tuberculosis* y la mayoría de las micobacterias son aerobios estrictos, el crecimiento es favorecido con una atmosfera de 5-10% de CO<sub>2</sub>. (6)

### 1.3) EPIDEMIOLOGIA:

La tuberculosis es la segunda causa de mortalidad, después del SIDA, a nivel mundial, causada por un agente infeccioso. (1)

---

En 2013, 9 millones de personas enfermaron de tuberculosis y 1,5 millones murieron por esta enfermedad. En México se presentaron en ese año 13 239 casos bacteriológicamente confirmados, 2 841 casos clínicamente diagnosticados, 3623 casos extra pulmonares y 598 casos que ya habían sido tratados para un total 21 306 casos notificados. (1)

Más del 95% de las muertes por tuberculosis ocurrieron en países de escasos recursos, ya que esta enfermedad es una de las cinco causas principales de muerte en las mujeres entre los 15 y los 44 años. (1)

En 2013, se estima que 550 000 niños enfermaron de tuberculosis y 80 000 niños cero negativos murieron de esta enfermedad. (1)

La tuberculosis es la causa principal de muerte en las personas infectadas por el VIH, pues causa una cuarta parte de las defunciones en este grupo. (1)

El número aproximado de personas que enferman de tuberculosis cada año está disminuyendo aunque muy lentamente; ello quiere decir que el mundo está en camino de cumplir el objetivo de desarrollo del milenio consistente en detener la propagación de esta enfermedad de aquí al año 2015. (1)

La tasa de mortalidad por tuberculosis disminuyó un 45% entre 1990 y 2013. Se calcula que entre 2000 y 2013 se salvaron 37 millones de vidas mediante el diagnóstico y el tratamiento de la tuberculosis. (1)

#### **1.4) PATOGENIA DE LA TUBERCULOSIS.**

*M.tuberculosis* es una bacteria intracelular facultativa que generalmente infecta a los pulmones por vía aerogénica. En consecuencia, son los macrófagos alveolares y las células epiteliales bronquiales y alveolares las primeras que confrontan y son infectadas por el agente infeccioso. Los macrófagos han sido reclutados por las citocinas pro-inflamatorias como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa), la interleucina 1 (IL-1), la interleucina 69 (IL-69), y por las quimiocinas. Estas



---

moléculas son producidas en conjunto por las células epiteliales, las endoteliales y los macrófagos alveolares. Las citocinas pro-inflamatorias regulan positivamente la expresión de las moléculas de adhesión como la CD54 (ICAM-1), la CD106 (VCAM-1) y la CD62-E (selectina E) en el endotelio y en los leucocitos; de esta forma, los leucocitos circulantes pueden migrar al sitio de lesión mediante un proceso inflamatorio finamente regulado. (7)

Durante la fase temprana de la infección, algunas quimiocinas como la IL-8 atraen a los neutrófilos, los cuales pueden fagocitar a la micobacteria, sin la capacidad suficiente para eliminarla. La función de los neutrófilos es contener a las micobacterias evitando su diseminación, mientras son sustituidos gradualmente por macrófagos activados. Las quimiocinas también pueden dirigir a los linfocitos T cooperadores (CD4+) hacia los sitios donde se está iniciando una respuesta de hipersensibilidad retardada; el factor de transformación tumoral beta (TGF-beta) producido por los macrófagos activados promueve el depósito de colágeno y favorece la quimiotaxis de otros macrófagos, favoreciendo la formación del granuloma (estructura histopatología distintiva de la enfermedad está constituido por la acumulación de linfocitos y macrófagos organizados en estructuras ovoides de límites precisos y se le considera como estructuras fundamentales para contener a las bacterias) ; esto se logra mediante la expresión selectiva de los receptores de quimiocinas en los linfocitos, durante las diferentes fases de la respuesta inmunitaria. (7)

Las quimiocinas participan en la prevención de la diseminación del bacilo tuberculoso, lo cual favorece la migración y la activación de las células fagocíticas circulantes dirigiendo, además, la migración de los linfocitos T cooperadores tipo 1 (Th1, T helper), proceso que se conoce como hipersensibilidad de tipo IV. La acción efectora de los linfocitos Th1 depende del reconocimiento del antígeno a través de su receptor de células T (TCR) y de la activación posterior con producción de citocinas (IL-2, TNF-beta e interferón gamma (IFN-gamma)), lo cual genera la inmunidad celular necesaria para la eficaz eliminación del bacilo. (7)

---

Se ha demostrado que los macrófagos activados y los linfocitos Th1 son los principales elementos inmunológicos que protegen contra el bacilo tuberculoso, ya que los granulomas están constituidos de linfocitos Th1 y macrófagos hay una elevada producción de IFN-gamma el cual activa a los macrófagos estimulándolos a producir una gran cantidad de la enzima oxido nítrico sintetasa inducible (iNOs), la cual genera la producción de oxido nítrico, el cual reacciona con radicales libres de oxígeno que también son generados en gran cantidad y al mismo tiempo generando así la producción de peroxinitrilos compuestos muy inestables que se asocian rápidamente a diferentes constituyentes bioquímicos celulares, entre estos uno de los blancos principales son las proteínas, dichas proteínas experimentan cambios conformacionales con pérdida irreversible de sus funciones lo que contribuye a la muerte celular. (8)

Existen otras citocinas que favorecen la respuesta de los linfocitos T CD4+ Th1, tales como la interleucina 12 (IL-12), y la interleucina 18 (IL-18), producidas por los macrófagos reclutados y activados; ambas inducen la producción de IFN-gamma en las células asesinas naturales (NK) que, a su vez, activará a más macrófagos. (7)

La IL-12 y la IL-18 incrementan la actividad citotóxica de las células NK, favoreciendo la eliminación de los patógenos intracelulares. La actividad citotóxica de las células NK difiere de aquella de los linfocitos T citotóxicos (CD8+), debido a que estos últimos reconocen específicamente los antígenos existentes en el contexto del complejo principal de histocompatibilidad de tipo I (MHC-I, major histocompatibility complex class I). Sin embargo, las células NK comparten con los linfocitos T CD8+ enzimas como granulicina, las granzimas y las perforinas, que al ser liberadas inducen la lisis tanto de la célula blanco como de *M. tuberculosis*. (figura 3) Además, las células NK producen grandes cantidades de IFN-gamma, lo que produce un efecto redundante en el sistema; así, junto con la IL-12 y la IL-18 se promueve la respuesta inmunitaria hacia una respuesta Th1. (7)

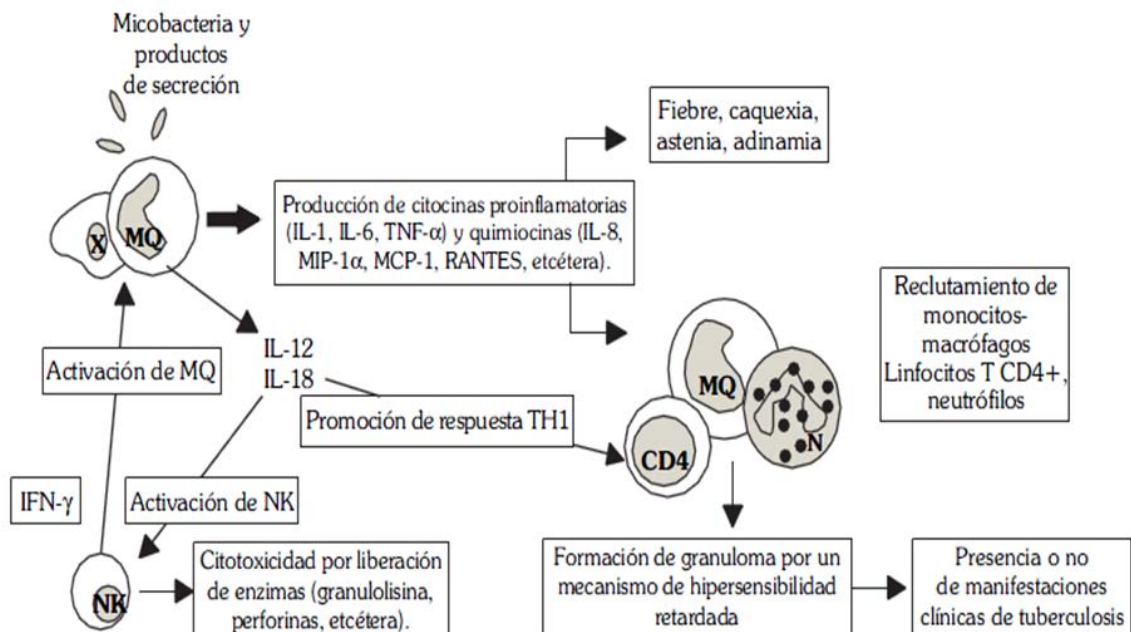


Figura3.- Esquema de la regulación de la respuesta Th1 durante la infección con *M. tuberculosis*.

La respuesta de protección inmunitaria específica contra la *M. tuberculosis* se inicia tras la activación de los linfocitos T CD4+ capaces de secretar IFN-gamma. La respuesta inmunitaria contra la tuberculosis depende del balance entre la inmunidad inespecífica y la específica y esta última del predominio de la respuesta de Th1 con producción de IFN-gamma sobre la respuesta de Th2.

Diversos factores pueden cambiar el curso de la respuesta inmunitaria, desde la alteración en la producción de citocinas hasta la expresión de las moléculas de membrana que participan en la coestimulación celular, incluyendo a los receptores de las citocinas regulatorias. (7)

Se ha observado una fase efectora, que consiste en la secreción de un patrón específico de citocina, en el que la subpoblación de Th1 produce grandes cantidades de IL-2, TNF-beta (linfotóxica) e IFN-gamma, lo cual promueve la respuesta inmune celular y la activación de los macrófagos. Además, esta respuesta induce a la activación y la proliferación de linfocitos T, los cuales han sido asociados al reconocimiento de antígenos micobacterianos no peptídicos a

---

través del sistema CD1. Asimismo, el IFN-gamma modula negativamente la respuesta de tipo humoral. (8)

En contraste, la subpoblación de Th2 producirá grandes cantidades de IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13, que favorecen la respuesta inmunitaria contra los patógenos extracelulares. Las IL-4, IL-10 e IL-13 modulan negativamente la respuesta de las Th1. (8)

### **1.5) PAPEL DE LOS ANTICUERPOS EN LA TUBERCULOSIS.**

*M. tuberculosis* es una bacteria intracelular facultativa y la idea de que los anticuerpos puedan tener un papel protector es generalmente rechazada. Se cree que cuando el bacilo se encuentra dentro de la célula, al no ocurrir el contacto físico de éste y los anticuerpos, estos últimos no pueden ejercer su acción y por lo tanto su impacto en el establecimiento de la inmunidad protectora es poco o nulo. Igualmente es rechazado el hecho de considerar que los anticuerpos puedan evitar o modificar a favor del hospedero la infección por *M. tuberculosis* a nivel de mucosa. (9)

La posibilidad de que la inmunidad mediada por anticuerpos juegue un papel en la defensa frente a *M. tuberculosis* es una hipótesis de trabajo muy poco explorada, cuyos resultados positivos serían aplicables en la profilaxis y en la terapia de la tuberculosis. Quizás, hasta hoy, en las investigaciones de tuberculosis sólo se ha considerado una arista del problema, la inmunidad mediada por células. (9)

La IgA es la clase de anticuerpo predominante en las secreciones que bañan las superficies de la mucosa. Esta inmunoglobulina posee numerosas funciones, tanto directas como indirectas, que contribuyen a prevenir que agentes infecciosos como bacterias o virus, no sobrepasen la barrera mucosal. (10)

Ivanyi y colaboradores han investigado acerca de las potencialidades de la IgA en la protección frente al bacilo tuberculoso. Ellos reportaron resultados experimentales sobre la cinética de distribución de anticuerpos monoclonales de

---

clase IgA administrados por diferentes vías en ratones Balb/c y posteriormente evaluaron estos anticuerpos en modelos murinos de infección con *M. tuberculosis*, donde se observó un efecto protector de corta duración (nueve días). Más recientemente exploraron si este efecto protector podría incrementarse e mediante la administración conjunta de IFN-gamma, y sus resultados mostraron reducción en la infección pulmonar a las cuatro semanas de realizado el reto y poco infiltrado granulomatoso en los pulmones de los ratones tratados. Estos datos podrían interpretarse como muestra de un sinergismo entre el anticuerpo monoclonal IgA y el IFN  $\gamma$ , lo que habla a favor de la interrelación entre la inmunidad mediada por anticuerpos (IMA) y la inmunidad mediada por células (IMC) con límites difusos en su dicotomía.<sup>(11)</sup>

La obtención de los anticuerpos monoclonales resultó una ventaja tecnológica para el estudio de la inmunidad humoral. En 1998 se presentó el primer trabajo de evaluación de un Ac monoclonal hacia el Lipoarabinomannan (LAM) en ratones infectados con *M. tuberculosis*, los resultados sugirieron un efecto protector y estimulación de la respuesta inmune celular.<sup>(12)</sup>

Glatman-Freeman y Casadeval en una revisión sobre el papel de la IMA frente a *M. tuberculosis* consideraron que las dificultades históricas encontradas para definirlo eran consecuencia de la complejidad de la respuesta hacia los antígenos de micobacterias y supusieron que existían anticuerpos protectores, no protectores y exacerbadores de la enfermedad.<sup>(13)</sup>

Los estudios in vitro, intentan dilucidar los mecanismos potenciales mediante los cuales los anticuerpos podrían ejercer su efecto protector contra *M. tuberculosis* y uno de los hallazgos experimentales más conocido es el de Armstrong, que sugiere el efecto de los anticuerpos incrementan la fusión fagosomalisosoma durante la fagocitosis de la micobacteria.<sup>(14)</sup>

En su estudio Armstrong observó que *Mycobacterium tuberculosis*, después de la ingestión por macrófagos cultivados, se puede dividir, con base en su apariencia

---

bajo el microscopio electrónico, en dos categorías designadas como "dañado" o "intacto" (14)

Ya que al observarlos al microscopio se veía la fusión de lisosomas secundarios pre-marcados con ferritina con los fagosomas que encierran a la micobacteria "dañada", que se podría presumir que eran bacilos no viables, y conforme al destino habitual de los grandes cuerpos extraños dentro de los fagocitos hay una exposición de los organismos ingeridos a las enzimas digestivas lisosomales que conlleva a la muerte del microorganismo. (14)

En contraste, la mayoría de los fagosomas de los macrófagos que encierra a la micobacteria "intacta", y probablemente viable, eran bacilos tuberculosos virulentos (por ejemplo, la cepa H37Rv) que no presentan ningún signo de fusión con los lisosomas durante los primeros días de la infección. Con lo cual Armstrong sugirió que esta aparente evasión por los bacilos de la exposición directa a la acción de los contenidos lisosomales puede estar asociada con la capacidad de virulencia de *M. tuberculosis* para sobrevivir y multiplicarse en los macrófagos cultivados. (14)

Con lo cual en su experimento se realizó una exposición de la micobacteria con distintos sueros de conejos previamente inmunizados y posteriormente se incubaron con macrófagos cultivados observando que la presencia o ausencia de anticuerpos en la superficie durante la infección micobacteriana afectaban la fusión fagosoma-lisosoma (fagolisosoma) después de la fagocitosis, ya que el apego de anticuerpo específico para el bacilo de la tuberculosis *in vitro* ofreció un medio práctico que podría asegurar la inclusión de la proteína bacteriana dentro del fagosoma. (14)

En el 2005 se reportaron dos experimentos donde se utilizaron formulaciones policlonales de anticuerpos específicos humanos, el primero realizado por Valliere donde observaron de manera *in vitro* que los anticuerpos aumentaban la

---

internalización de BCG por las células fagocíticas y que, además, estimulaban las células CD4+ y CD8+ (15).

El segundo reporte corresponde al grupo de Stephen Jolles, en este estudio se le administran a los ratones varias dosis de gammaglobulina humana después de la infección con *M. tuberculosis* y se constató disminución de las unidades formadoras de colonias (UFC) en pulmones y bazo, así como un ligero incremento de las células CD8+ en los animales tratados. Finalmente, sugirieron el uso de la terapia con inmunoglobulinas como una alternativa para combinarla con el tratamiento farmacológico en la tuberculosis (16).

## **2) BCG.**

### **2.1) HISTORIA.**

Albert Calmette y Camille Guérin, médico y veterinario, trabajaron juntos de 1907 a 1919 en la atenuación de bacilos de *M. bovis* realizando 230 cultivos sucesivos en un medio de glicerina, patata y bilis hasta conseguir la pérdida de su patogenicidad, manteniendo la antigenicidad. La vacuna de BCG se llama así por estar compuesta por el bacilo de Calmette y Guérin (17).

Calmette y Guérin obtuvieron su vacuna de forma empírica desconociendo en qué radicaba el diferente comportamiento entre el patógeno, y su vacuna. Sólo ahora, con los avances genéticos y el descubrimiento del genoma de *M. bovis*, se sabe que en los sucesivos pases se iban perdiendo genes y que en ello radica la atenuación de su patogenicidad. Sin embargo, la BCG aún comparte más del 90% de su ADN con el de *M. tuberculosis* (17).

Se cree que la aplicación en seres humanos de la vacuna BCG se inició a partir de 1921; al comienzo su administración fue vía oral por Weil Halle, en París, para vacunar a un recién nacido cuya madre falleció por tuberculosis. Luego se utilizó la vía subcutánea; posteriormente, en 1923, Wollgren, en Suecia, inició su aplicación

---

intradérmica, como consecuencia de la gran variabilidad en los resultados y por las reacciones adversas derivadas de su administración oral. (18).

Posteriormente, centenares de niños fueron vacunados y se observó que la cifra de mortalidad en ellos era significativamente menor que la de los no vacunados. En 1928, la Liga de las Naciones recomendó la vacunación con BCG; desde entonces, más de tres mil millones de humanos han sido inmunizados con la vacuna en todo el mundo. En 1974 se introdujo en el programa de inmunización de la Organización Mundial de la Salud (OMS). (18).

## **2.2) CEPAS DE BCG.**

En 1960, la OMS recomendó liofilizar las cepas de BCG para preservar su estabilidad, pero hasta ese momento, al no poder congelarse, las cepas eran mantenidas vivas por medio de cultivos permanentes, lo que facilitó su variabilidad genética. (17)

Las modificaciones genéticas se produjeron incluso en la BCG vigilada en el Instituto Pasteur, siendo probable que algunas hayan perdido potencial protector desde la vacuna original de Calmette y Guerin. No obstante, aquel preparado se perdió en la I Guerra Mundial por lo que hablamos de comparaciones aproximadas. (19)

Una reciente reconstrucción de la situación genética ha comprobado que en la BCG hay varias regiones deletadas (RD3, RD4, RD5, RD6, RD7, RD9, RD10, RD11, RD12, RD13, y RD15). Además, en el propio Instituto Pasteur, en los primeros años, también se perdió la RD1. Luego, entre 1927- 1931 se perdió la RD2, que codifica el gen MPT-64, que estaba en la cepa primitiva y que falta en las de 1927 y persiste en otras (Moreau, Tokio y Rusia). La RD8 se perdió en Montreal (1937-1948) y falta en la cepa Connaught-Frappier, la RD14 falta en la Pasteur 1961 y la RD16, ausente en la Moreau, se perdió en Brasil o Uruguay después de 1925. La falta de RD1+RD2 es la situación que presenta la cepa



---

danesa empleada en España, y que se supone se mantuvo invariable desde 1931.

(19)

Hay genes importantes ausentes en todas las cepas de BCG, como la delección de 16 fragmentos ORF (*Open ReadingFrames*), que incluyen la codificación de las moléculas ESAT- 6 (*Early Secretory Antigenic Target*) y CFP10, que se expresan juntas en la superficie de la micobacteria, en forma de doble hélice y cuyo papel patogénico no está claro. (19).

### **2.3) EFICACIA DE LA BCG.**

La eficacia que la BCG tiene es variable en humanos. Está aceptado que protege más de la diseminación, meningitis y miliar (46-100%), que de la enfermedad pulmonar (0-80%) y más de la enfermedad que de la infección, si es que realmente protege de la infección porque es muy discutido. Además, hay claras diferencias poblacionales o geográficas. (20)

Con independencia de posibles errores técnicos o estadísticos, cada vez es más firme que las infecciones latentes por la micobacteria, o por micobacterias atípicas, interfieren con la respuesta de la vacuna. Con base en ello, la eficacia será menor en los países con mayor índice de infección por micobacterias. El mecanismo de esta interferencia no se conoce bien, pero se han planteado hipótesis. Durante la infección por micobacterias atípicas podrían liberarse citoquinas Th2, que interfieren la respuesta a la BCG o, quizás, puede que todos los importante mecanismos evasivos de la respuesta inmunitaria que las micobacterias desarrollaron en su evolución, los apliquen también a la vacuna. Parece comprobado que la variable inhibición depende del número y tipo de antígenos que compartan las micobacterias atípicas con la BCG. (21)

A nivel individual, en un estudio realizado en 230 niños vacunados con BCG, se observó, que, además de la convivencia con enfermos, las siguientes causas de fracaso vacunal eran el hacinamiento y el tabaquismo pasivo éste último menos valorado y que eleva 9,3 veces el riesgo de contraer la enfermedad. (21)

---

De todas formas, cualquiera que sea su eficacia, la protección obtenida por la BCG es transitoria. Está comprobado que no dura más allá de 10-20 años, aunque haya situaciones particulares, en un estudio hecho en Alaska, la protección en indios navajos vacunados entre 1935-38 se mantenía 60 años más tarde. (22)

## **2.4) REACCIONES SECUNDARIAS.**

La BCG es bien tolerada por la mayoría de los vacunados, incluso recién nacidos. Sin embargo, tienen efectos secundarios, generalmente locales y leves, pero que pueden llegar a ser mortales al ser una vacuna de microorganismos vivos. (23)

Las reacciones más comunes son inflamaciones en el lugar de la inyección, o en algún ganglio axilar que son adenopatías blandas, adherentes y con tendencia a la supuración, parecidas a las halladas en la tuberculosis natural. A veces se cronifican y precisan limpieza quirúrgica. Mucho más raras, pero gravísimas, son las diseminaciones vacúnales o becegeftis. Con frecuencia son mortales y cuando se superan pueden persistir secuelas en SNC, huesos, pulmón u otros órganos. La causa de la diseminación vacunal, como la de la tuberculosis natural, es mal conocida. (23)

## **3) BACTERIÓFAGOS.**

### **3.1) LOS BACTERIÓFAGOS EN BIOLOGÍA MOLECULAR.**

Los fagos filamentosos pertenecen a una familia de los Inovirus que infectan las bacterias gram negativas. Están constituidos por una envoltura proteica tubular en cuyo interior se encuentra una molécula de ADN circular de cadena simple de 6,4 Kb. La partícula viral tiene 900 nm de largo y 6,5 nm de diámetro y está integrada por cinco proteínas: pIII, pVI, pVII, pVIII y pIX. El cuerpo de la partícula está formado por 2 700 copias de pVIII. Los extremos son cerrados por cinco copias de las proteínas pVII y pIX en un lado, pVI y pIII en el otro (figura 4). Estos virus infectan solamente bacterias que expresan las fimbrias sexuales, codificadas por el factor F. La unión del fago a esta estructura ocurre a través de pIII. (24)

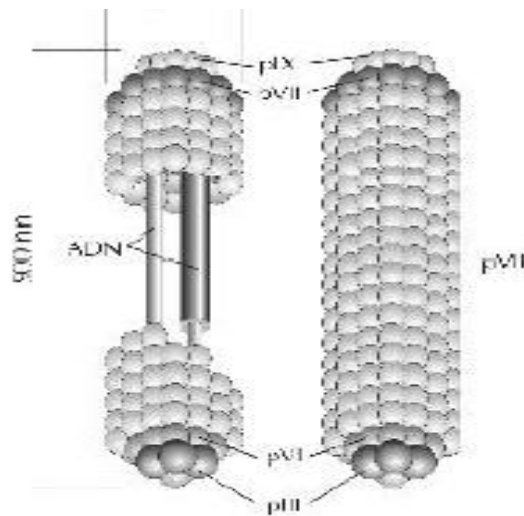


Figura 4.- Representación esquemática de la estructura de los bacteriófagos filamentosos con las proteínas que conforman la cápside.

En 1982, Dulbecco sugirió que péptidos inmunogénicos derivados de epítomos bien caracterizados de agentes patógenos, podían ser fusionados a las proteínas de la cápside del fago lambda u otros virus. La partícula viral resultante que presenta el péptido foráneo en su superficie, podía ser utilizada como componente principal de vacunas libres de células. (24)

En 1985, George Smith demostró que el genoma de los fagos filamentosos o fd podía ser manipulado con facilidad para obtener partículas fágicas que presentaran péptidos fusionados a proteínas de su superficie y estos péptidos expuestos podían ser reconocidos por el anticuerpo correspondiente. Estas observaciones estimularon las investigaciones posteriores en este campo y favorecieron el establecimiento de la tecnología de presentación de péptidos y proteínas.(24)

### 3.2) TECNOLOGIA DE PRESENTACION DE PEPTIDOS O PROTEINAS EN LA SUPERFICIE DEL BACTERIOFAGO.

La tecnología de presentación en la superficie de fagos se basa en la capacidad de exponer un péptido o una proteína de interés en la cápside de un bacteriófago.

---

Comienza con la fusión de un polipéptido X a una proteína de la cápsida del fago para estudiar sus propiedades de unión a una molécula blanco Y. Con este objetivo es necesario clonar la secuencia nucleotídica del polipéptido X fusionada al gen de la proteína de la cápsida. El segundo paso consiste en la construcción de una gran colección de clones, cada uno de los cuales sintetiza una variante diferente de la secuencia del polipéptido originalmente fusionado. La molécula blanco Y unida a una fase sólida puede ser usada para separar por afinidad aquellos fagos que presenten un polipéptido X con propiedades de unión a dicha molécula. La unión física entre el polipéptido X y su gen, mediada por la fusión a la proteína de la cápsida, permite la clonación y determinación de las secuencias nucleotídicas que codifican las variantes del polipéptido X que se unen a la molécula blanco Y.<sup>(24)</sup>

### **3.2.1) Antígeno lipoproteína de 19 KDa.**

Las proteínas del *M. tuberculosis* son las que le confieren la propiedad antigénica. Para su estudio se han agrupado en cuatro grupos de acuerdo a su función, secuencia y características físico químicas:

**A)** El primer grupo formado por proteínas de choque térmico (hsp, del inglés heat shock protein), son polipéptidos esencialmente citoplasmáticos, que incrementan su síntesis frente a estímulos estresantes como los cambios de temperatura, el incremento de daño oxidativo y la disminución de nutrientes; esta respuesta probablemente protege a la micobacteria durante situaciones adversas. Se agrupan en familias dependiendo del peso molecular: hsp65 kDa o GroEL, hsp 10 kDa o GroES, hsp 70 kDa o DnaK, hsp 90 kDa, hsp 16 kDa entre otras.<sup>(25)</sup>

**B)** El segundo grupo son las lipoproteínas, incluye a las de 19 kDa, 26 kDa, 27 kDa y 38 kDa, fundamentalmente constitutivas de la pared celular pero pueden ser encontradas en el citoplasma, las de 19 y 38 kDa son las más importantes. Se considera que estas lipoproteínas están involucradas en la inducción de respuestas humoral y celular, en especial de la respuesta de las células T de

---

memoria *in vitro*, y tienen un papel funcional en el transporte de nutrientes a través de la pared celular. (25)

**C)** Un tercer grupo son las proteínas secretoras, están constituidas principalmente por proteínas de 15, 18, 23, 26, 27, 30, 31, 31.5 y 41 kDa, algunas de éstas forman el complejo 85 que es uno de los mayores constituyente del sobrenadante de los cultivos del *M. tuberculosis*. (25)

**D)** El último grupo está constituido por las enzimas, la L-alanina deshidrogenasa de 40 kDa y la superóxidodismutasa de 23 kDa, que están involucradas en los mecanismos de defensa del bacilo dentro de los macrófagos. (25)

### **Lipoproteína de 19 kDa**

La lipoproteína (LP) 19 kDa, inhibe la expresión del Complejo Mayor de Histocompatibilidad clase II (MHC-II) inducida por el IFN-gamma, a través de un mecanismo que involucra a los receptores tipo toll (TLR). La señalización de TLRs en forma prolongada por la LP 19 kDa, inhibe ciertas respuestas del macrófago al IFN-gamma, particularmente aquellas relacionados a la expresión de MHC-II y la presentación de antígenos. Por consiguiente la LP19 kDa tiene la capacidad para inhibir las actividades de procesamiento antigénico y la expresión del MHC-II en el macrófagos, sólo con la condición de que estas sean estimuladas por IFN-gamma, porque si el proceso es estimulado por la IL-4, el mecanismo de inhibición no se lleva a cabo, lo que sugiere que la inhibición se realiza a nivel de genes cuya expresión está regulada por el IFN-gamma. (25)

### **3.2.2) ANTIGENO OXIDOREDUCTASA.**

Son enzimas que catalizan una amplia variedad de reacciones de óxido-reducción, empleando coenzimas, tales como NAD<sup>+</sup> y NADP<sup>+</sup>, como aceptor de hidrógeno. Este grupo incluye las enzimas denominadas comúnmente como

---

deshidrogenasas, reductasas, oxidasas, oxigenasas, hidroxilasas y catalasas. Este tipo de enzimas favorecen la degradación de especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno citotóxicas que se forman como consecuencia de la fagocitosis y la activación del macrófago.

### **3.2.3) ANTIGENO ACIL Coa-ligasa.**

Los mecanismos de transporte de ácidos grasos de cadena larga exógenos a través de la envoltura celular micobacteriana aun no han sido elucidados; en cambio en *Escherichia coli* este mecanismo se encuentra bien establecido; en este caso se conoce que cuando la bacteria detecta la presencia de ácidos grasos de cadena larga en el ambiente, los capta a través de una proteína de membrana externa conocida como FadL que vía ligando induce un cambio conformacional dentro de la proteína que conlleva a la apertura de un canal de difusión y al paso de los ácidos grasos al espacio periplásmico. A su vez el ambiente ácido que permanece en el espacio periplásmico promueve la formación de ácido graso no cargado que puede pasar a través de la membrana interna y una vez en el citosol la acil Coa-ligasa lo esterifica a un acil CoA, este es degradado mediante la  $\beta$ -oxidación, produciendo acetil CoA la cual tendría dos destinos principales dentro del metabolismo de la micobacteria. El primero sería la oxidación a través del ciclo de Krebs y el segundo la biosíntesis de ácidos grasos. Por otra parte la acetil-CoA también participaría en la biosíntesis de ácidos micólicos. (26, 27)

### **3.2.4) ANTIGENO DE Biblioteca genómica.**

La caracterización molecular de un gen requiere tanto su identificación y aislamiento a partir del resto del genoma, como su ampliación para poder obtener cantidades suficientes para su análisis. Aunque es posible amplificar *in vitro* fragmentos de ADN mediante PCR, la identificación y amplificación de genes de interés se realiza muy a menudo recurriendo a técnicas que permiten multiplicar *in vivo* un gen determinado, tras la introducción de una única copia del mismo en una

---

célula hospedadora, generalmente bacteriana. El número de copias del gen aumenta a medida que se multiplica el organismo hospedador. (28)

El proceso, en su conjunto, se denomina clonación molecular y se resumen los pasos siguientes:

- Se comienza con el aislamiento del ADN genómico (ADNg) de varias células, que al ser digerido con enzimas de restricción, genera una enorme cantidad de segmentos cortos de ADN, llamados fragmentos de restricción. También el ARN mensajero (ARNm) se puede usar como material de partida. Como las moléculas de ARN son excepcionalmente lábiles, difíciles para amplificar en su forma original y no pueden por sí mismas ser ligadas a un vector para clonación, son convertidas en ADN por síntesis de ADN complementario (ADNc), mediante la enzima transcriptasa reversa. (28)
- Estos fragmentos son incorporados a otras secuencias de ADN (vectores plásmidos o bacteriófagos), de modo que cada vector recibe uno de los fragmentos. Las moléculas resultantes de esta unión se denomina ADN recombinante. (28)
- Los vectores con sus fragmentos de restricción se introducen en la célula hospedadora (bacterias principalmente, levaduras u otras células eucariotas), las cuales son sembradas en medios de cultivo para su multiplicación. (28)
- La multiplicación de cada bacteria genera una colonia separada de las demás, de modo que en los cultivos se forman miles de colonias. Como consecuencia, cada colonia está formada por un clon de bacterias que descienden de un ancestro común, conteniendo cada clon un fragmento de restricción o molécula de ADN recombinante diferente. (28)

---

En términos generales, la colección de estos clones, suficientes en número para que contenga cada gen presente en la célula de origen que se estudia, se denomina **genoteca o biblioteca genómica**. (28)

## **VECTORES.**

Para que un fragmento de ADN (ADN foráneo o inserto) quede permanentemente presente en la célula hospedadora y su descendencia, es necesario que vaya unido a otras secuencias de ADN que confieran al conjunto la capacidad de autorreplicación, y que permitan, además, diferenciar fácilmente las células que se han transformado captando el ADN, de las que no lo han hecho. (28)

Por ello, es necesario unir *in vitro* los fragmentos de ADN que se quieren clonar a una molécula de ADN denominada vector, con capacidad de ser introducida, replicada y seleccionada en las células hospedadoras. Entonces, el vector es el vehículo que transporta un gen dentro de la célula receptora y es responsable de su replicación. (28)

Para que una molécula de ADN actúe como un vehículo para la clonación de genes debe poseer algunas características:

- Ser capaz de replicarse dentro de la célula receptora, de tal manera que numerosas copias de la molécula de ADN recombinante se puedan reproducir y pasar a las células hijas. (28)
- Un vehículo para clonación necesita ser pequeño, menor de 10 Kb en tamaño, que permita la incorporación del inserto y su entrada en la célula. Moléculas más grandes tienden a romperse durante la purificación y son más difíciles de manipular. (28)
- Poseer marcadores para la selección de las bacterias que los capten. (28)



- 
- Poseer una o varias secuencias de restricción en donde las endonucleasas de restricción actúen generando extremos para ligar los insertos. (28)

Las dos clases de moléculas de ADN que satisfacen estos criterios son: plásmidos y bacteriófagos. (28)

#### **4) MODELO DE TUBERCULOSIS PULMONAR PROGRESIVA EN RATÓN.**

El modelo de tuberculosis pulmonar progresiva se caracteriza por usar animales genéticamente idénticos (cepa singenica Balb/c) los cuales se infectan por vía intra-traqueal (esto garantiza un mejor control de la dosis y que la mayoría de las bacterias se depositen realmente en el pulmón ) con bacterias vivas y virulentas. La dosis empleada de micobacteria es elevada puesto que estos animales no son huéspedes naturales de estos microorganismos. (8)

En este modelo se establece dos fases principales durante el desarrollo de la enfermedad:

1) La primera fase es la etapa temprana la cual corresponde al primer mes de infección y se distingue histológicamente por la presencia de infiltrado inflamatorio constituido por linfocitos y macrófagos y se forman sistemáticamente granulomas durante la segunda semana de infección alcanzando su máxima madurez en el día 21.(8)

Durante esta fase de la infección, estos granulomas de fase temprana y el infiltrado inflamatorio intersticial y perivenular coexistente están constituidos principalmente por linfocitos T (CD-4) de tipo 1 productores de las citocinas IFN-gamma e IL-2 y macrófagos activados productores de TNF-alfa e IL-1. (8)

---

De esta manera se establece que durante la fase temprana de la infección existe predominio de la actividad de linfocitos Th-1 y macrófagos activados lo cual permite el control temporal de la infección. (8)

2) La segunda etapa de la enfermedad corresponde a la fase avanzada progresiva, la cual se caracteriza por un gran incremento de micobacterias vivas en los pulmones, áreas progresivas de consolidación neumónica con focos de necrosis y extensa fibrosis de intersticial, que en conjunto conduce a la muerte. (8)

También en esta fase se incrementa significativamente la presencia y actividad de los linfocitos T cooperadores de tipo 2 (Th-2) los cuales se caracterizan por producir las interleucinas 4, 5, 6, 10 y 13. En particular, la IL-4 es una citocina fundamental en la inducción de la diferenciación de los linfocitos B productores de anticuerpos, que se consideran como no protectores en la tuberculosis. Además la IL-4 al igual que la IL-10 y la IL-13 son eficientes antagonistas de las células Th-1. En consecuencia, consideramos que la emergencia de los linfocitos Th-2 durante la fase progresiva de la enfermedad puede contrarrestar la actividad protectora de las células Th-1 y desviar la inmunidad celular hacia la inmunidad humoral, contribuyendo así a favorecer la progresión de la enfermedad. (8)

En conclusión, durante fase progresiva de la enfermedad existen importantes anomalías inmunológicas que permiten la supervivencia y proliferación bacteriana, tales como mayor actividad de los linfocitos Th-2 (con menos actividad de los Th-1) este tipo de alteraciones inmunológicas permiten que la enfermedad progrese generando extensa consolidación neumónica y muerte por insuficiencia respiratoria. (8)

---

## II) PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Debido a la variabilidad en la respuesta protectora que origina la vacuna BCG (bacilo de Calmette-Guérin), y que en la mayoría de los países pobres, pocas personas pueden pagar el tratamiento de la infección por *M. tuberculosis*, el presente proyecto plantea establecer una nueva estrategia que ayude a potenciar la eficacia de la vacuna por medio de un efecto sinérgico con bacteriófagos recombinantes para favorecer un mejor control de la tuberculosis.

Gracias a la colaboración del Dr. Karen Manoutcharian del Departamento de Biología Moléculas y Biotecnología Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM quien construyó los bacteriófagos recombinantes los cuales expresan de manera independiente una biblioteca genómica de *M. tuberculosis*, una enzima oxidoreductasa, una lipoproteína de 19 KDa y una enzima Acil CoA ligasa. Con los cuales se podrá evaluar su protección y su efecto sinérgico con la vacuna de BCG-Phipps en un modelo murino de tuberculosis pulmonar.

---

### III) HIPOTESIS:

El nivel de protección de la BCG-Phipps se aumentará con la aplicación posterior de fagos recombinantes que contienen una biblioteca genómica de *M. tuberculosis*, fagos recombinantes que contiene una enzima oxidoreductasa, fagos recombinantes que contiene una lipoproteína de 19 KDa, fagos recombinantes que contiene una enzima Acil CoA ligasa, para prevenir tuberculosis pulmonar en un modelo murino con una cepa de *M. tuberculosis H37Rv*.

---

#### **IV) OBJETIVOS.**

##### **OBJETIVO GENERAL.**

- Desarrollar una nueva estrategia de vacunación utilizando las cepas BCG-Phipps con fagos recombinantes que expresan antígenos de *M.tuberculosis* como refuerzos de la vacuna en un modelo murino de tuberculosis.

##### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS.**

- Analizar la carga bacilar por unidades formadoras de colonias (UFC) para estimar la efectividad de la vacunación.
  
- Determinar el nivel de protección a través del análisis histopatológico de pulmones de ratones vacunados.
  
- Determinar la supervivencia en ratones Balb/c de 8 semanas de edad vacunados con BCG-Phipps y/o fagos recombinantes infectados con la cepa de *M. tuberculosis H37Rv*

---

## **V) MATERIAL Y METODOS.**

### **A. DISEÑO.**

Tipo de estudio:

Experimental, prospectivo, longitudinal y comparativo.

Criterios de inclusión:

Ratones Balb/c singenicos machos de 6-8 semanas.

Criterios de exclusión:

Ratones enfermos, mayores o menores de 6-8 semanas.

Criterios de eliminación:

Ratones muertos por peleas.

### **B. UNIVERSO.**

113 ratones singenicos Balb/c de 8 semanas de edad.

### **C. VARIABLES.**

Dependiente: profilaxis de la enfermedad

Independiente: vacuna de BCG-Ph y aplicación de fagos recombinantes que expresan biblioteca genómica de *M tuberculosis*, oxidoreductasa, lipoproteína de 19KDa y acil CoA ligasa.

---

## D.TÉCNICAS.

### **PREPARACIÓN DE LA VACUNA BCG-PHIPPS Y PREPARACIÓN DE LA CEPA DE *M. tuberculosis* H37Rv.**

#### *Verificación de la pureza de la cepa y de la vacuna.*

Para verificar la pureza de la cepa se realizara una tinción de Ziehl-Neelsen. Se toma una asada de la cepa en medio 7H9 (Becton, Dickinson y Compañy, Sparks, MD) enriquecido con albumina, catalasa y dextrosa (ADC) (Becton, Dickinson y Compañy, Sparks, MD) y se deposita en un portaobjetos limpio. Se fija con fenol al 5% en metanol todo esto en una campana de flujo laminar con nivel de bioseguridad clase III (Forma Class II, A2 Biological Safety Cabinet modelo 128c). Una vez secas las muestras se irradian con luz ultravioleta y se fijan otra vez por calor con un mechero. Posteriormente se tiñen dejando las laminillas 15 minutos dentro de un vaso Coplin con fucsina fenicada previamente filtrada. Después se lavan las laminillas con agua corriente y se les adiciona a las laminillas alcohol-ácido hasta la obtención de un frotis transparente. En un siguiente paso se colocan las laminillas en un vaso Coplin con azul de metileno también previamente filtrado, se dejan durante 2 minutos y se lavaron con agua corriente.

Se dejan secar las laminillas y se montan con resina. Finalmente se observan al microscopio en el objetivo de 100x, con aceite de inmersión.

#### *Curvas de crecimiento de la cepa y de la vacuna.*

La cepa de *M tuberculosis* H37Rv y la vacuna BCG-Phipps se crecerán de la misma manera en medio 7H9 (Becton, Dickinson y Compañy, Sparks, MD) enriquecido con ADC (Becton, Dickinson y Compañy, Sparks, MD).El cual se prepara pesando 4.7 g del polvo y se disuelven en 900 ml de agua destilada adicionando 5 ml de glicerol y 0.05% de tween 80, después de prepararlo se esteriliza en un autoclave por 15 minutos a 121°C y se deja enfriar, una vez estéril dentro de una campana de flujo laminar con nivel de bioseguridad clase III (Forma

---

Class II, A2 Biological Safety Cabinet modelo 128c), limpia y esterilizada por irradiación UV durante 10 minutos, se adiciona al medio 100ml de medio enriquecido ADC (Becton, Dickinson y Compañy, Sparks, MD) se mezcla y al medio final se fracciona en botellas (Corning) con cuello angulado y tapa con filtro, y se colocan en una incubadora con 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C por 24 horas, para realizar prueba de esterilidad.

Una vez que se confirmó la esterilidad del medio se preparan botellas de crecimiento donde se colocan 500 µl de bacteria por cada 8 ml del medio en botellas (Corning) dentro de una campana de bioseguridad. Las botellas se colocan en una incubadora durante 48 horas con agitación constante a 35°C. Posteriormente se colocan 4 ml de la bacteria antes incubadas en las botellas de cultivo con 60 ml de 7H9 estéril y se toman lecturas de absorbancia diariamente en un espectrofotómetro a 600 nm hasta obtener una D.O de 0.6 la cual indica la fase logarítmica del crecimiento bacteriano.

#### *Pre-cultivo y escalamiento de cultivo de la cepa y la vacuna.*

La cepa de *M tuberculosis H37Rv* y la vacuna BCG-Ph serán sometidas al mismo procedimiento. Después de obtener la D.O deseada, se procede a recuperar a la bacteria en una campana de flujo laminar con nivel de bioseguridad clase III (Forma Class II, A2 Biological Safety Cabinet modelo 128c), se colecta el contenido de las la botellas en tubos cónicos de 50 ml (Falcon BD) estériles. Se centrifugan a 3000 rpm por 10 minutos a 4°C. El sobrenadante se desecha, y al botón bacteriano se le agregan 2 ml de perlas de vidrio de 3mm de diámetro estériles y 15 ml de PBS (solución amortiguadora de fosfatos)-Tween 80 al 0.05%. El tubo con perlas se agita en un Vortex® durante un minuto por un minuto de reposo y se le repite el ciclo de agitación y reposo 5 veces. Posteriormente los tubos se centrifugan a 1500 rpm por 10 minutos y se elimina el sobrenadante. El botón formado se resuspende y se le agrega PBS el cual se volvió a centrifugar por 10 minutos a 2500 rpm a 4°C para eliminar el Tween. Por último se desecha el sobrenadante y se realiza un último lavado con solución salina estéril



---

centrifugando a 2500 rpm y desechando el sobrenadante pero esta vez el botón se resuspende en 15 ml de solución salina.

Una vez que se disgregan las micobacterias en solución salina se realizan alícuotas en criotubos estériles de 1.5 ml. A cada tubo se le agrega un ml de suspensión de bacterias para un total de 15 tubos, se cierran perfectamente y se colocan en nitrógeno líquido para posteriormente almacenarlos a -70°C.

#### Titulación de la cepa y la vacuna por UFC.

Después de 24 horas de congelación se tomara un tubo de inicio, un medio un final de procedimiento anterior, se descongelan gradualmente a -20°C, después a 4°C y finalmente se terminan de descongelar en una una campana de flujo laminar con nivel de bioseguridad clase III (Forma Class II, A2 Biological Safety Cabinet modelo 128c), a temperatura ambiente en donde se realiza la titulación de bacterias (control de calidad). Para ello se realizan diluciones seriadas y se siembran en medio 7H10, se incuban durante 14 días en el cual se hizo un conteo preliminar del número de colonias y al días 21 se obtienen la cuenta final de UFC por ml.

#### **VACUNACIÓN DE RATONES.**

Se vacunaran con la cepa BCG Phipps (BCG Ph) a 68 ratones machos singenicos Balb/c de 8 semanas de edad. La aplicación será vía subcutánea en la base de la cola. Se inyectaran con una jeringa de insulina 50 µl (aprox. 10,000 UFC's/50 µl) de la vacuna disuelta en una solución salina estéril.

#### **APLICACIÓN DE LOS FAGOS RECOMBINANTES.**

Los fagos serán proporcionados por el Dr. Karen Manoutcharian del Departamento de Biología Moléculas y Biotecnología Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Los cuales se aplicaran por vía intravenosa en la cola de los ratones. Se administraran 2 meses después de que los ratones sean vacunados, la aplicación

de los fagos se realizaran el mismo día y una vez a la semana según el número de aplicaciones que requería el grupo.

La distribución del experimento será dividida en 2: a) experimento con fagos recombinantes que contienen la biblioteca genómica *M.tuberculosis* y b) experimento de fagos recombinantes que contienen antígenos individuales.

Dando un total de 15 grupos mostrados a continuación:

a) experimento con fagos recombinantes que contienen la biblioteca genómica *M.tuberculosis*.

V3= biblioteca genómica

<b>PRIME</b>	<b>PRIME/BOOST</b>	<b>PRIME/3 BOOST</b>
V3. (6 ratones )	V3/V3 (6 ratones )	V3/V3 /V3/V3 (6 ratones )
BCG Ph (10 ratones)	BCG Ph/V3 (10 ratones )	BCG Ph / V3/V3 /V3 (10ratones )
	BCG Ph / BCG Ph (10 ratones )	BCG Ph / BCG Ph / BCG Ph / BCG Ph (10 ratones )
SOLUCION SALINA (10ratones)		

b) experimento de fagos recombinantes que contienen antígenos individuales.

<b>PRIME</b>	<b>PRIME/ BOOST</b>
V1 (6 ratones)	BCG/V1(6 ratones)
V2(6 ratones)	BCG/V2 (6 ratones)
V4(6 ratones)	BCG/V4 (6 ratones)

---

V1 = lipoproteína 19 kDa V2= oxidoreductasa V4= Enzima Acil CoA ligasa.

### **RETO CON LA CEPA DE *M .tuberculosis H37Rv*.**

Los ratones se infectaran 2 meses después de la última aplicación de la vacunación con BCG-Phipps o los fagos según el grupo correspondiente.

Un día antes de la infección se eligira al azar uno de los criotubos a -70°C y se lleva a -20°C.El día de la infección se pasaran a 4°C y se terminaran de descongelar dentro de la campana de flujo laminar con nivel de bioseguridad clase III (Forma Class II, A2 Biological Safety Cabinet modelo 128c) a temperatura ambiente. Se realiza una dilución en solución salina estéril, en base a la cuenta de control de calidad para tener una concentración final de 250 000 UFC's por cada 100 µl del preparado. Esta última dilución se siembra de igual manera en cajas de medio 7H10 para control de calidad. El volumen restante se utiliza para la infección.

Los ratones serán anestesiados con sevoflurano. Luego cada ratón anestesiado se coloca en una cama en la cual se sujetan los dientes superiores y se le introduce una cánula en la tráquea para inocular 100 µl de la bacteria.

Los grupos separados por cajas se colocan en un micro-aislador conectado a un sistema de ventilación individual de presión positiva (Allentown, USA). A partir de ese momento se determina la sobrevivencia de los ratones. Todos los procedimientos serán realizados en una campana de flujo laminar con nivel de bioseguridad clase III (Forma Class II, A2 Biological Safety Cabinet modelo 128c).

### **SACRIFICIO.**

A dos meses post-infección se sacrificaran la mitad de los ratones por grupo y a los cuatro meses se sacrifico el resto. El sacrificio se realiza por exanguinacion y anestesia con éter en una campana de flujo laminar con nivel de bioseguridad

---

clase III (Forma Class II, A2 Biological Safety Cabinet modelo 128c) y se extraerán el pulmón derecho, izquierdo y bazo.

### **DETERMINACIÓN DE LA CARGA BACTERIA POR UFC'S.**

Se tomara el pulmón derecho de los animales sacrificados y se colocan inmediatamente en nitrógeno líquido. Dichos pulmones se almacenan a -70°C hasta su uso.

Para determinar la carga bacilar de los pulmones se descongelan y se homogenizan con un homogeneizador de tejidos (marca FastPrep-24 versión 6004.3) durante 20 segundos, una ocasión solo el tejido y tres ocasiones en 1 ml de PBS-Tween 80 al 0.05 %, y se sónica la muestra durante 45 segundos en un sonicador (UltrasonicCleaner Cole Palmer). Se realizan diluciones seriadas de los tubos homogenizados y se siembran por duplicado en cajas Pretri con medio BactoMediabrook 7H10 (Difco, Detroit, MI USA) enriquecido con ácido oleico, albúmina, catalasa y dextrosa (Becton, Dickinson y Compañía, Sparks, MD), se incuban a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>, la cuenta de el número de colonias se cuenta 14 y 21 días después del sembrado.

### **PREPARACIÓN DEL TEJIDO PULMONAR PARA EL ESTUDIO HISTOLÓGICO Y MORFOMETRICO.**

Para este estudio se tomara el pulmón izquierdo de cada ratón sacrificado, se fija por perfusión intratraqueal con alcohol absoluto. Después el tejido se deshidrata por tres pasajes en alcoholes, tres por xiloles, para finalmente ser embebidos en parafina. Posteriormente se incluyen para la obtención de bloques, los cuales se cortan en un micrótomo (LeicaMicrorotome, RM2145) dejando cortes de 4 micras de espesor los cuales se colocan en portaobjetos limpios y se tiñen con hematoxilina-eosina y se montan con resina.

---

El porcentaje del pulmón afectado por la neumonía se mide utilizando un analizador de imágenes (Q WinLeica, Milton Keynes, UK) y la medición se realiza en micras cuadradas

#### **E. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.**

Para la determinación de la carga bacilar y para el porcentaje de neumonía se realizara una T student. Para las curvas de sobrevida se utilizara la prueba de Klapán-Meyer. Las diferencias se consideraran significativas cuando  $p < 0.05$ .

## VI) RESULTADOS.

### DETERMINACION DE SOBREVIVENCIA.

#### A) Experimento con fagos recombinantes que contienen la biblioteca genómica *M.tuberculosis*.

Para la mejor apreciación de la sobrevivencia de esta parte del experimento se separó en tres gráficos, en la figura 5 se aprecia la sobrevivencia de los grupos que solo fueron vacunados con el V3=biblioteca genómica de *M.tuberculosis* en este gráfico los grupos de V3, V3/V3 y V3/V3/V3/V3 sobrevivieron a los 2 meses la diferencia entre estos grupos no es significativa, el descenso que se observa con el grupo V3/V3 se debe a la muerte de 2 ratones y al ser un grupo de 6 ratones baja el porcentaje de sobrevivencia pero no teniendo significancia utilizando la prueba de Kaplan-Meier. En estos grupos solo se llegó a los dos meses debido a que eran un número reducido de ratones (6 ratones) y en el primer sacrificio todo el grupo tuvo que ser sacrificado a diferencia del grupo control (solución salina) que contaba con el doble de animales y sobrevivieron hasta los 4 meses.

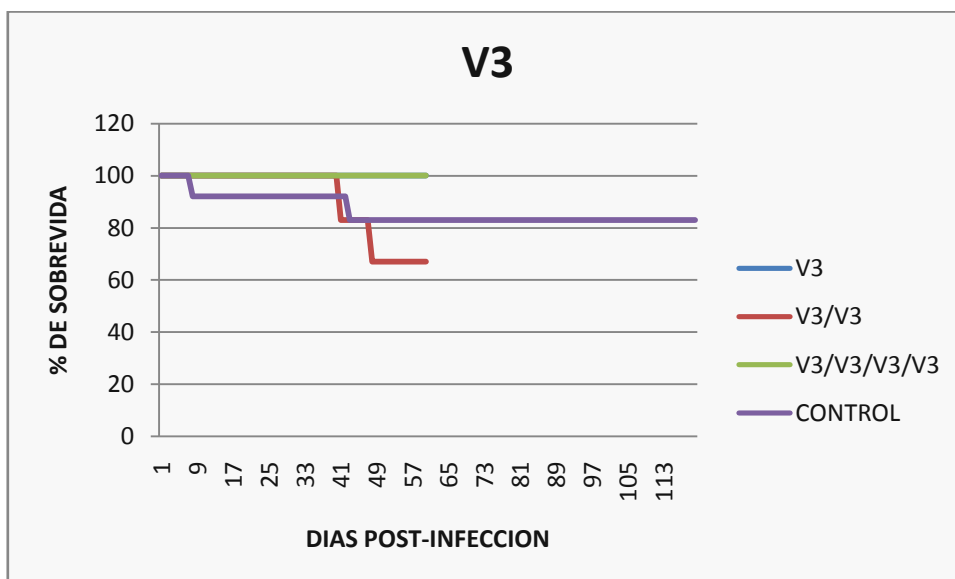


Fig 5. Sobrevivencia de animales vacunados con el V3=biblioteca genómica de *M.tuberculosis* y retados con *M.tuberculosis*. H37Rv.

En la figura 6 se aprecia que todos los grupos sobrevivieron a los 4 meses no presentando significancia utilizando la prueba de Klapan-Meyer. En este grafico se observa la aplicación de la vacuna BCG Phipps y se utilizo como refuerzo el V3.

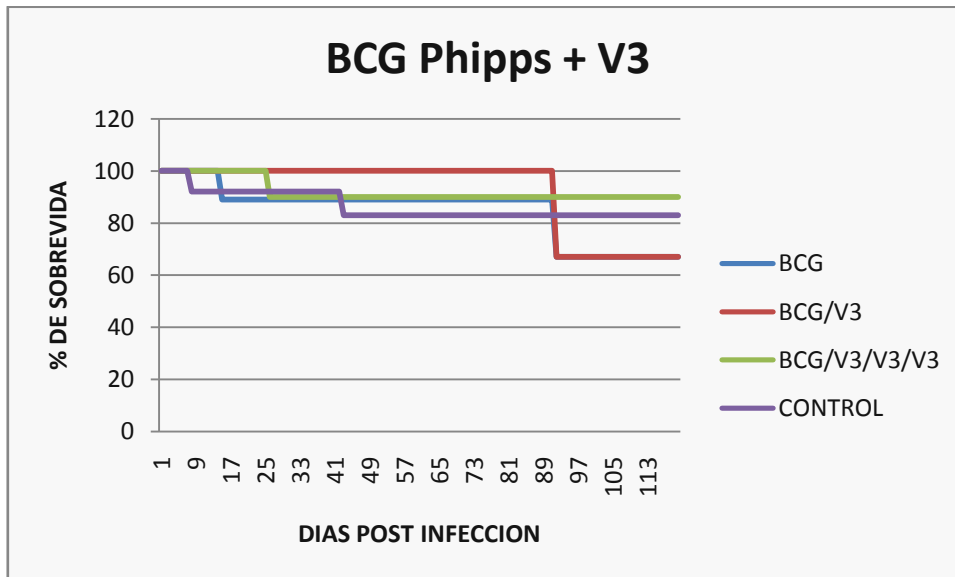


Fig 6. Sobrevida de animales vacunados con BCG Ph y aplicado como refuerzo el V3=biblioteca genómica de *M.tuberculosis* y retados con *M.tuberculosis*. H37Rv.

En la figura 7 se aprecia que todos los grupos sobrevivieron a los 4 meses no presentando significancia utilizando la prueba de Klapan-Meyer. En este grafico se observa la aplicación de la vacuna BCG Ph y se utilizo más aplicaciones de BCG Phipps.

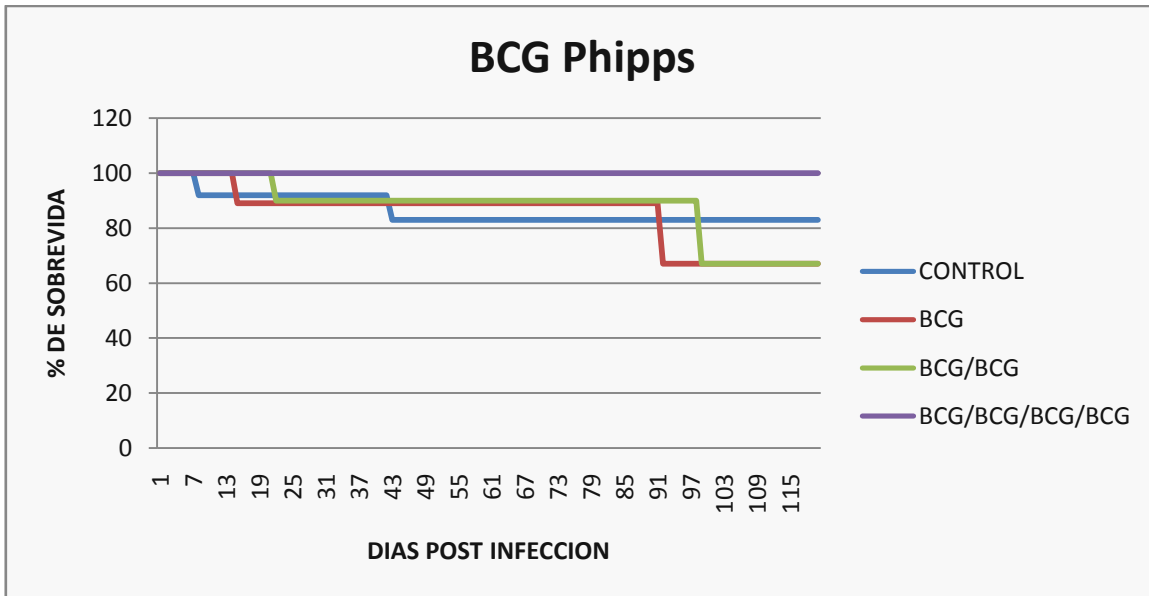
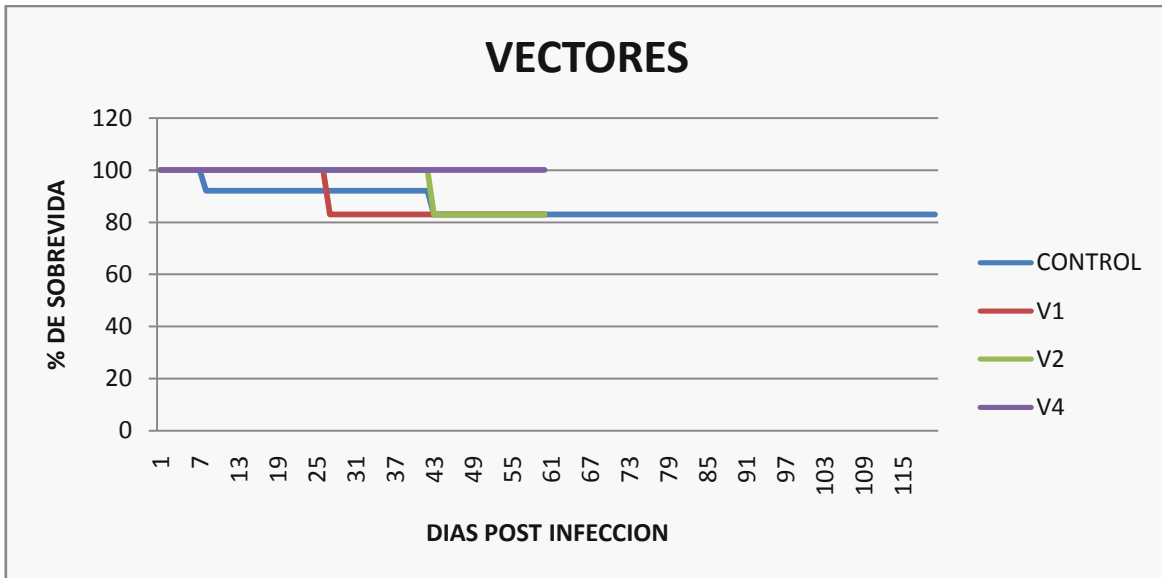


Fig 7. Sobrevida de animales vacunados con BCG Ph y aplicando como refuerzo BCG Phipps retados con *M.tuberculosis. H37Rv.*

**B) Experimento de fagos recombinantes que contienen antígenos individuales.**

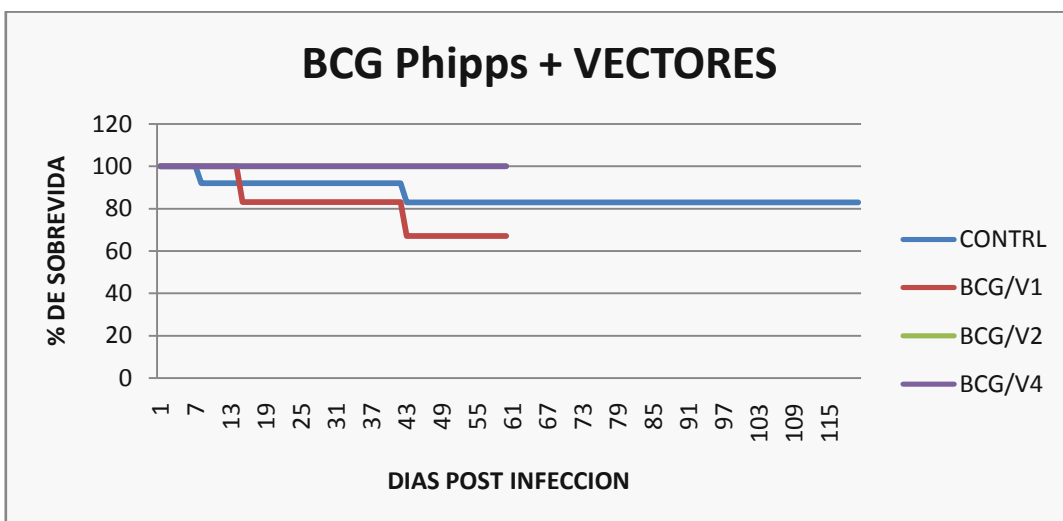
La parte b del experimento fue diseñado para solo un tiempo de sacrificio ( 2 meses) debido al número de ratones de los grupos y por ese motivo ningún grupo llega a los cuatro meses como si lo hace el grupo control por las razones antes mencionadas. En la figura 8 todos los grupos llegan hasta los 2 meses no mostrando significancia utilizando la prueba de Klapan-Meyer, en este grafico se vacunaron solo utilizando como vacuna los vectores V1, V2, V4.





**Fig 8.** Sobrevida de animales vacunados con los V1 = lipoproteína 19 kDa V2= oxidoreductasa V4= AcilCoAligasa.y retados con *M.tuberculosis. H37Rv.*

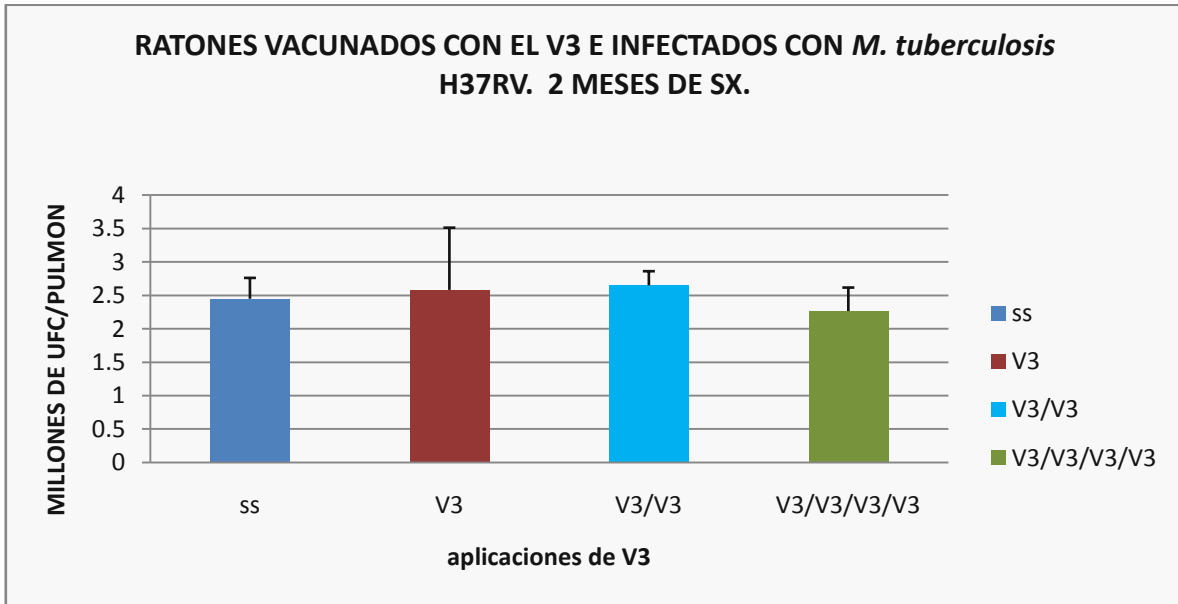
En la figura 9 todos los grupos llegan hasta los 2 meses no mostrando significancia utilizando la prueba de Klapan-Meyer, en este grafico se vacunaron solo utilizando como vacuna la BCG Ph y reforzando con los vectores V1, V2, V4.



**Fig 9.** Sobrevida de animales vacunados con BCG Ph y aplicado como refuerzo los V1 = lipoproteína 19 kDa V2= oxidoreductasa V4= Acil CoAligasa.y retados con *M.tuberculosis. H37Rv.*

**DETERMINACION DE LA CARGA BACULAR MEDIANTE UNIDADES FORMADORAS DE COLONIA (UFC 's).**

**A) Experimento con fagos recombinantes que contienen la biblioteca genómica *M.tuberculosis*.**



**Fig 10. Carga bacilar en pulmon aplicando como vacuna y refuerzo el V3=biblioteca genómica de *M.tuberculosis* y retos con *M.tuberculosis*. H37Rv.**

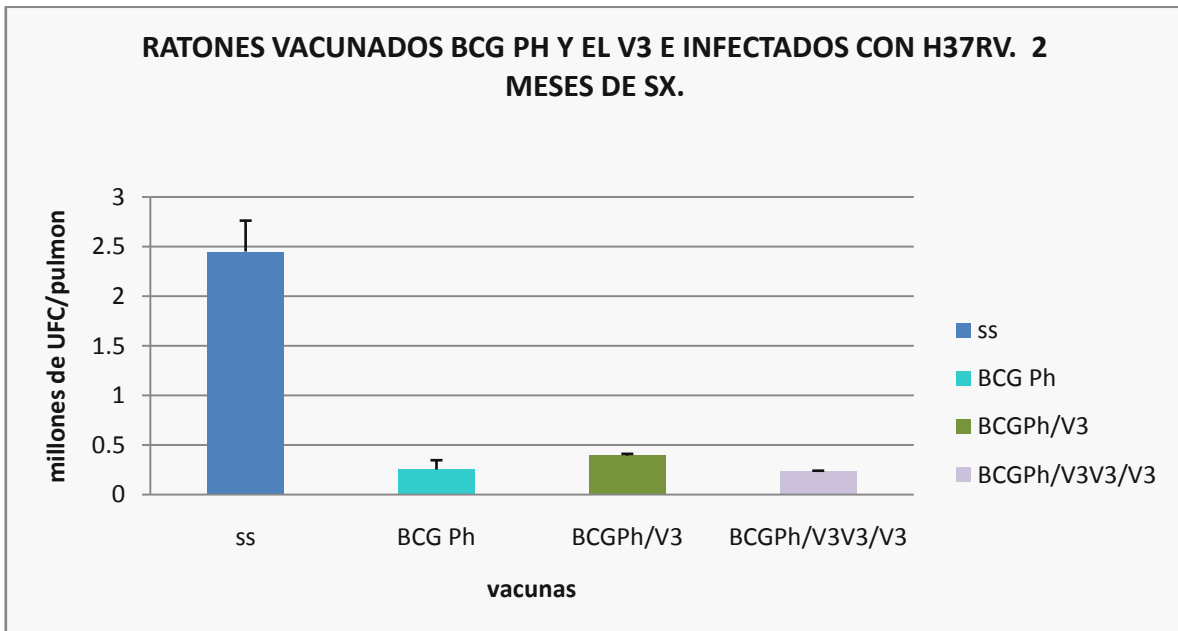


Fig 11. Carga bacilar en pulmon aplicando como vacuna la BCG Phipps (Ph) y refuerzo el V3=biblioteca genómica de *M.tuberculosis* y retados con *M.tuberculosis. H37Rv.*

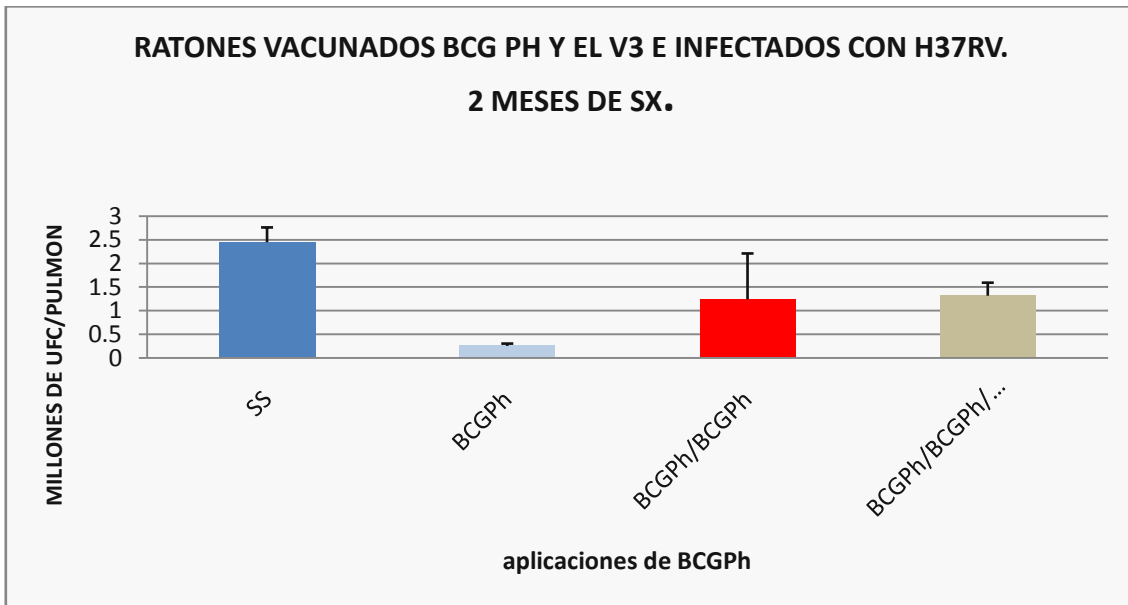
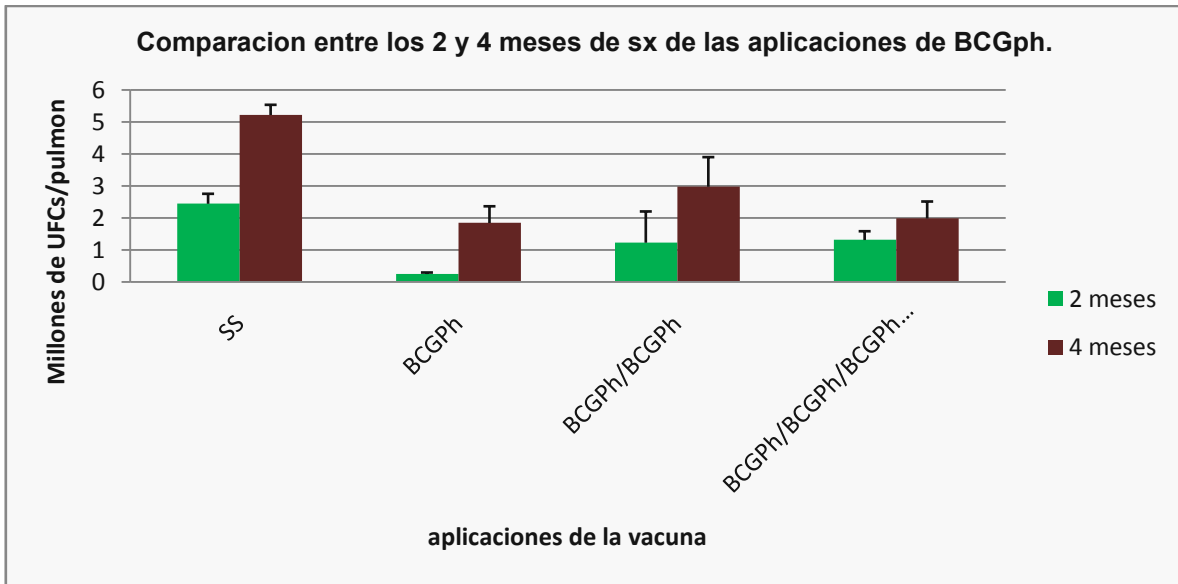
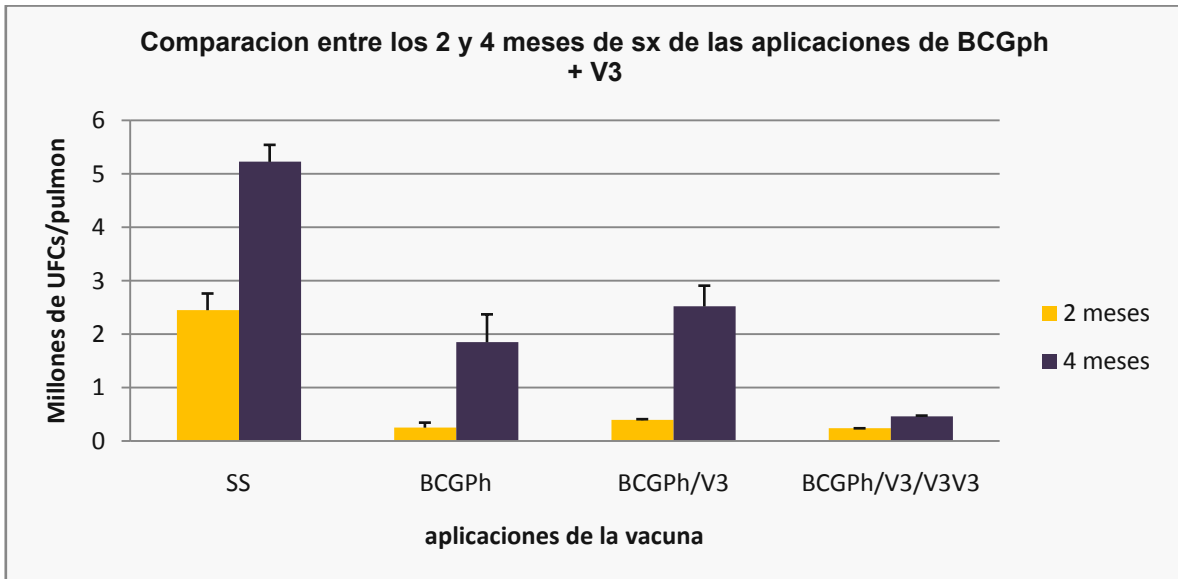


Fig 12. Carga bacilar en pulmon aplicando como vacuna y refuerzo la BCG Phipps (Ph) y retados con *M.tuberculosis. H37Rv.*

En el figura 13 y 14 se muestran los comparativos de la carga bacilar entre los 2 y 4 meses de la parte A del experimento, los grupos correspondientes V3, V3/ V3, V3/ V3 /V3/ V3 que también corresponden a esta parte del experimento no tienen un tiempo de 4 meses de sacrificio debido al número reducido de animales en estos grupos (6 ratones) y solo se realizo el sacrificio de 2 meses.



**Fig. 13.** Comparación de la carga bacilar en pulmón a los 2 y 4 meses aplicando como vacuna BCG Phipps (Ph) y reforzados también con BCG Phipps y retados con *M.tuberculosis. H37Rv*



**Fig. 14.** Comparación de la carga bacilar en pulmón a los 2 y 4 meses aplicando como vacuna BCG Phipps (Ph) y reforzados con V3=genoteca de *M.tuberculosis* y retados con *M.tuberculosis. H37Rv*.

**B) Experimento de fagos recombinantes que contienen antígenos individuales.**

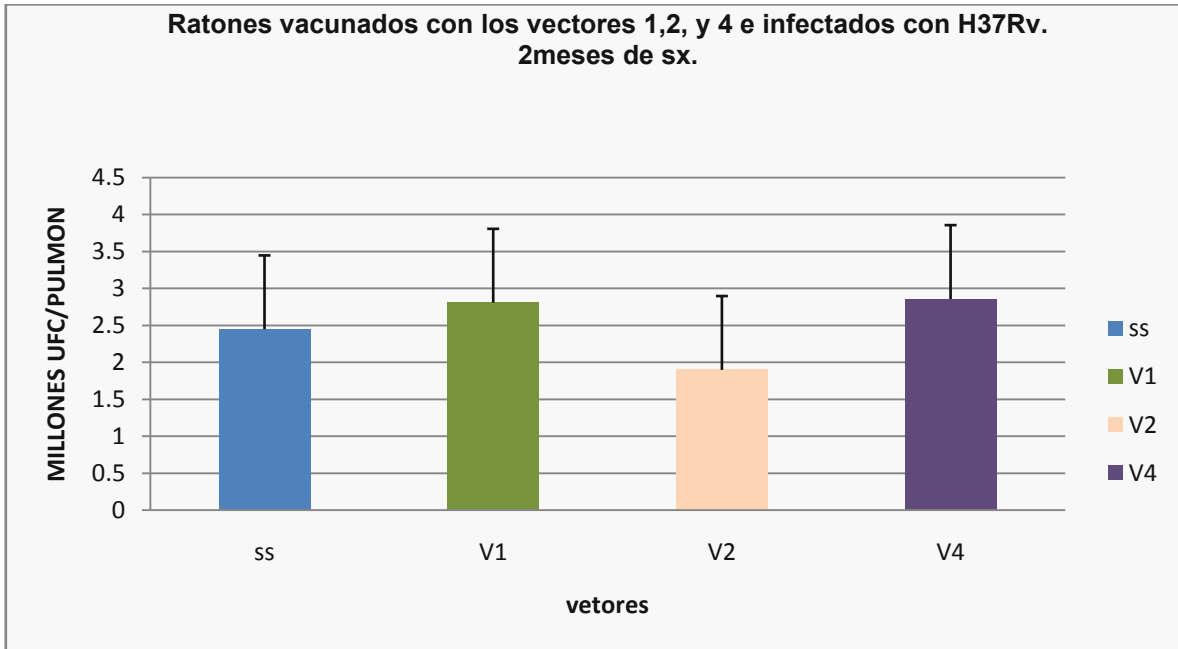


Fig 15. Carga bacilar en pulmon aplicando como vacuana V1 = lipoproteína 19 kDa V2= oxidoreductasa V4= AcilCoAligasa.y retados con *M.tuberculosis. H37Rv*

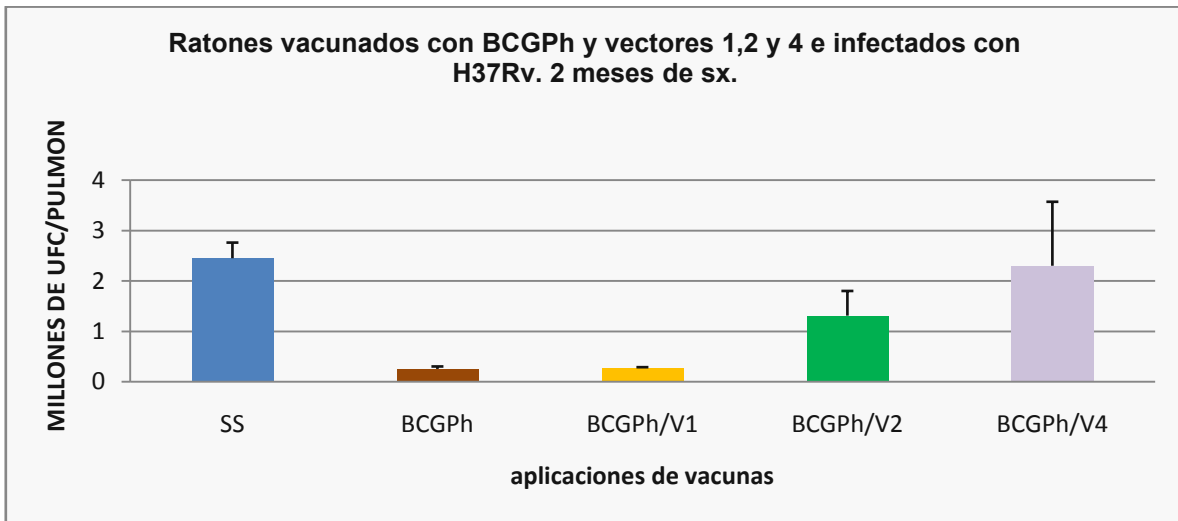
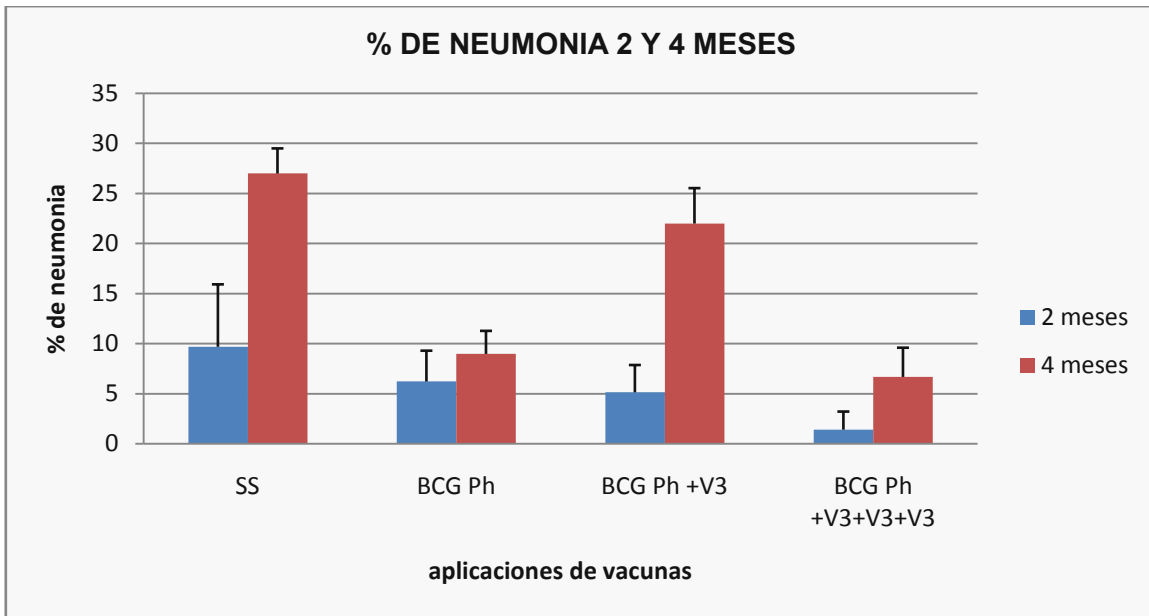


Fig. 16. Carga bacilar en pulmón aplicando como vacuna BCG Phipps (Ph) y aplicado como refuerzo los V1 = lipoproteína 19 kDa V2= oxidoreductasa V4= Acil CoA ligasa.y retados con *M.tuberculosis. H37Rv*.

## DETERMINACION DEL % DE NEUMONIA.

Esta determinación solo se realizo a los grupos BCG Phipps, BCG Phipps/V3 y BCG Phipps/V3/V3/V3 ya que son fueron los únicos grupos en donde se encontró una reducción significativa de la carga bacilar en comparación tanto del grupo control ( solución salina) y el grupo de BCG Phipps.



**Fig. 17. Comparación del % de neumonía a los 2 y 4 meses aplicando como vacuna BCG Phipps (Ph) y reforzados con V3=genoteca de *M.tuberculosis* y retados con *M.tuberculosis*. *H37Rv*.**

---

## VII) DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

Este trabajo se realizo con la finalidad de mejorar el nivel de protección de la única vacuna actualmente aceptada por la OMS contra la tuberculosis la BCG, para medir esto obtuvimos tres resultados:

El primero es la determinación de la sobrevivida de todos los grupos vacunados ya sea con la BCG Phipps o vacunados con alguno de los bacteriófagos recombinantes y posteriormente infectados con la cepa *M. tuberculosis* H37Rv. La cepa H37 fue aislada originalmente en 1905. En 1934, H37 se disocia en cepas "virulenta" (Rv) y "no virulenta" (Ra). Entonces el aislado H37 original fue discontinuado, y el H37Rv y H37Ra se han mantenido desde entonces. Por otro lado resulta interesante observar la virulencia de la cepa la cual es usada comúnmente como cepa de referencia en laboratorios clínicos y de investigación. Su gran uso se debe a que es una cepa patógena y de mediana virulencia, droga sensible y en animales presenta un comportamiento similar a la enfermedad en humanos. (29)

Una vez mencionado esto podemos explicar los comportamientos mostrados en las figuras 5,6,7,8 y 9, ya que todos los grupos sobrevivieron hasta el final del experimento y esto se debe a que la cepa H37Rv es una cepa de mediana virulencia y por lo tanto permite realizar cinéticas de sacrificio de periodos más extendidos. La sobrevivida de todos los grupos oscila entre un 70-100% lo cual al realizar un análisis de Kaplan- Meyer a estos grupos en comparación del grupo control (solución salina) arroja que no existe significancia en los grupos. Es importante señalar que en los grupos de la parte B del experimento solo hubo un tiempo de sacrificio a los 2 meses y eso se debió a que eran grupos con pocos ratones (6 animales) y se tuvo que sacrificar todo el grupo ya que con solo una muerte en esos grupos quedan con 5 animales, en el primer tiempo bien se pudieron tomar 3 animales para el primer tiempo de sacrificio y dejar 2 para el segundo tiempo a los 4 meses, pero se corría el riesgo de tener muertes no relacionadas por la enfermedad (peleas, deshidratación, etc) y perder el estudio

---

estadístico del segundo tiempo de sacrificio, por tal motivo la parte B del experimento solo tiene un tiempo de sacrificio.

El segundo resultado es el de la determinación de la carga bacilar en base a las UFC's/ pulmón, en la parte A del experimento con fagos recombinantes que contienen la biblioteca genómica *M.tuberculosis*, en la figura 10 se muestran los grupos que solo fueron vacunados con el V3 en ellos se puede apreciar claramente que utilizando solo el V3 como vacuna no es una opción viable ya que la carga bacilar es equivalente al grupo control el cual no se vacuno solo se le administro solución salina, el V3 por si solo ni siquiera genera algún tipo de protección a los 2 meses.

Es preciso mencionar que la BCG Phipps ha demostrado tener un poco mejor nivel de protección en comparación con otras cepas de BCG, como se aprecio en un estudio realizado por Castillo y colaboradores que evaluaron el nivel de eficacia de 10 distintas cepas de BCG, en la cual se observó que la BCG Phipps presentaba la mejor protección contra la enfermedad, teniendo un menor número de UFC's, un menor % de neumonía y mejor sobrevivida BCG Phipps en comparación con las otras 9 cepas. (30)

En la figura 11 los grupos en los cuales se vacunaron con BCG Phipps y se aplico el V3 como refuerzo, se puede apreciar un claro descenso (aproximadamente 5 veces menos) en la carga bacilar con respecto al grupo control si lo comparamos con la figura 10 es claro que la protección obtenida es por la vacuna de la BCG Phipps y no por el V3, es mas el V3 no mejorar en nada a la BCG Phipps ni aplicando 3 veces por lo menos a los 2 meses post infección.

En la figura 12 se aprecian los grupos de BCG Phipps aplicando como refuerzo otras aplicaciones de BCG Phipps, aquí lo que se puede observar es que resulta claramente contraproducente usar más de una aplicación de BCG Phipps para generar la protección deseada a los 2 meses, y se conserva el patrón a los 4 meses en donde continúa aumentando la carga bacilar (figura 14).



---

Ahora bien en la figura 14 se logra apreciar que a los cuatro meses en los grupos: solución salina, BCG Phipps y BCG Phipps/V3 hay un incremento bastante significativo entre sus mismos grupos de 2 meses, pero en el grupo BCG Phipps/V3/V3/V3 se observa claramente como la aplicación de 3 refuerzos de V3 incrementa la memoria inmunológica y con ello se mantiene el nivel de protección que otorga BCG Phipps a los 2 meses.

Esto indica que BCG Phipps, mantiene una buena protección en un inicio a corto plazo, pero no la logra mantener a lo largo del tiempo y es evidente que varias aplicaciones del V3 como refuerzo incrementa la memoria inmunológica de BCG Phipps.

Los fagos recombinantes podrían estar generando una inmunidad humoral para generar la protección por ejemplo, en 1988, de la Cruz y colaboradores propusieron el empleo de los fagos filamentosos como inmunógenos. Para ello inmunizaron conejos y ratones con fagos filamentosos en los que insertaron péptidos derivados de la proteína del circumesporozoito del parásito de la malaria humana *Plasmodiumfalciparum* una de las proteínas de la cápsida viral, la proteína III (PIII). Estos investigadores demostraron la inducción de respuesta inmune en conejos y en ratones C57BL/10, tanto contra las proteínas del fago como contra las estructuras peptídicas expuestas en la superficie de los mismos.<sup>(31)</sup> Tres años más tarde, Greenwood y colaboradores obtuvieron una fuerte respuesta de anticuerpos en conejos contra estos mismos péptidos de malaria expresados en fagos filamentosos, pero fusionados al extremo amino terminal de la proteína VIII (PVIII) del fago. <sup>(32)</sup>

Los fagos filamentosos que exponían péptidos de malaria fusionada a PVIII, obtenida con anterioridad por Greenwood y colaboradora en 1991 fueron empleados en 1993 para inmunizar ratones sin el empleo de adyuvantes. Los péptidos expresados en fagos estimularon la inducción de anticuerpos específicos y se demostró que la respuesta inmune que se indujo fue dependiente de células T y que hubo cambio de clase de las inmunoglobulinas de IgM a IgG. <sup>(33)</sup>

---

De esta forma si los fagos generan anticuerpos en este casos contra antígenos de carácter peptídicos o proteico hay que considerar que la importancia que cobrarían los diferentes mecanismos efectores de los anticuerpos protectores en la defensa frente a *M. tuberculosis* variarían en dependencia de la etapa en particular en que se encuentre el proceso infeccioso. Inicialmente cuando la micobacteria llega a la superficie de mucosa, los anticuerpos actuarían como elementos efectores singulares, cobrando importancia los clásicos mecanismos de neutralización y opsonización, lo que conllevaría a la activación eficiente de la célula fagocítica y probablemente a la eliminación de la bacteria. Suponiendo que la infección lograra establecerse, los anticuerpos podrían también jugar su papel si tenemos en cuenta los nuevos conceptos de sus funciones: su efecto regulador sobre la inmunidad mediada por células (IMC), su interacción con este sistema y la habilidad de ellos para regular la respuesta de anticuerpos. (9)

La opsonización, además de aumentar la capacidad de presentación celular, la actividad lisosomal y la degradación intracelular del patógeno, también induce una rápida y elevada producción de IL-12, que estimula una respuesta inmune rápida y preferencial hacia Th1. (9)

La activación hacia una respuesta tipo Th1 es el tipo de protección deseada contra la tuberculosis como ya se mencionó anteriormente.

En la parte B del experimento (fagos recombinantes que expresan antígenos individuales) en la figura 15 se aprecian la UFC's/pulmón de los grupos vacunados con el V1, V2,V4 en los cuales se puede observar que no hay protección alguna si lo comparamos con el grupo control (solución salina) esto se debe a que:

- 1) El V1 contiene una lipoproteína de 19KDa la cual tienen la capacidad para inhibir las actividades de procesamiento antigénico y la expresión del MHC-II en el macrófagos, sólo con la condición de que estas sean estimuladas por IFN-gamma, porque si el proceso es estimulado por la IL-4, el mecanismo de inhibición no se

---

lleva a cabo, lo que sugiere que la inhibición se realiza a nivel de genes cuya expresión está regulada por el IFN-gamma . (34)

La inhibición de la activación de los macrófagos, provocada por el *M.tuberculosis* y su lipoproteína 19 kDa se demostró cuando se tomó dos grupos de macrófagos provenientes de ratones, los cuales se infectaron con el bacilo de Koch e incubaron con la lipoproteína 19 kDa respectivamente, transcurridas 24 horas añadieron a las dos preparaciones IFN.gamma. A través de microradiografía estudiaron la relación entre la activación de los TLRs por los antígenos (*M. tuberculosis* y lipoproteína) y la ausencia de expresión de moléculas codificadas por genes estimulados por el IFN-gamma sobre la superficie del macrofagos. Se obtuvo como resultado una inhibición del 42 y 36% de los 347 genes inducidos por el IFN-gamma, según fueran tratados con *M. tuberculosis* o LP 19 kDa, respectivamente. Estos y otros genes distintos a los estimulados por el IFN-gamma también fueron estudiados, a través de técnicas como PCR y citometría de flujo, confirmando los resultados obtenidos por los estudios de microradiografía, es decir sólo es inhibida la expresión de algunos de los genes regulados por el IFN-gamma. Debido a estas evidencias se puede decir que *M. tuberculosis* por sí mismo o a través de la LP19 kDa inhibe la inducción de genes involucrados en el procesamiento y presentación de antígenos, expresión de MHC-II y activación de linfocitos T, a través de una hiperestimulación de TLRs, lo cual provee a la bacteria de una mayor capacidad evasiva y de invasión. (34).

Por tal motivo inclusive en la figura 11 se ve un aumento de UFC en comparación con el grupo control, entonces se puede decir que el fago que expresa la lipoproteína no es un buen candidato vacunal ya que exacerba la enfermedad.

2) El V2 expresa una enzima oxidoreductasa aislada por el Dr. Karen Manoutcharian del Departamento de Biología Moléculas y Biotecnología Instituto de Investigaciones Biomédicas en la cual se desconoce la reacción específica que cataliza.

---

3) El V4 que expresa la enzima acil CoA ligasa que como se menciono anteriormente estrifica acidos grasos y lo convierte a un acil CoA , este es degradado mediante la  $\beta$ -oxidacion, produciendo acetil CoA la cual tendría dos destinos principales dentro del metabolismo de la micobacteria.

Este tipo enzima cobra importancia ya que participa dentro de la ruta en la cual la micobacteria ingresa ácidos grasos exógenos que en estudios previos sugieren que los ácidos grasos podrían jugar un papel fundamental durante la fase de latencia; ya que la capacidad de *M. tuberculosis* de persistir por largos periodos en el hospedero depende en gran parte de su capacidad para adquirir y utilizar nutrientes del granuloma. Sin embargo se ha propuesto que antes de que la bacteria entre en estado de latencia acumula lípidos derivados de la degradación de la membrana celular de la célula hospedera o sintetizados de novo <sup>(35)</sup>. Con respecto a lo anterior Grabner y Meerbach encontraron que el surfactante pulmonar característicamente rico en una compleja mezcla de ácidos grasos de cadena larga como el dipalmitoil fosfatidilcolina, era internalizado por macrófagos pulmonares y metabolizado a través del ciclo glioxilato por las micobacterias <sup>(36)</sup>

Por otra parte Álvarez y Steinbuchel en el 2002 plantearon como hipótesis que los triglicéridos podrían ser una reserva energética eficiente para la micobacteria durante la fase de latencia y como ocurre en otros estados fisiológicos con baja actividad metabólica como la hibernación en animales superiores. De esta forma el tejido necrosado del huésped alrededor del granuloma podría proveer a la micobacteria de acidos grasos que serian convertidos a triacilglicerol. <sup>(35)</sup>

Finalmente el hecho de que se proponga a los ácidos grasos como elemento clave durante la fase de persistencia no replicativa implica que la degradación de lípidos a partir de la célula hospedera seria vital durante esta fase, además de que la micobacteria tuviera mecanismos de transporte de lípidos exógenos a través de la envoltura celular micobacteriana.

---

Una de la explicaciones más tentativas del porque el V4 no funciono adecuadamente es porque por lo antes mencionado la enzima juega un papel fundamental en la fase de latencia y en el modelo que se probaron las vacunas es uno de tuberculosis progresiva en cual se manifiesta le enfermedad y por tanto no hay un margen de tiempo en el cual la micobacteria requiera la entrada de ácidos grasos para sobrevivir y por lo tanto generar inmunidad contra este antígeno una vez expresada la enfermedad resulta ineficiente.

Finalmente en la figura 116, se aprecian los grupos en los que se aplicaron el V1, V2 y V4 como refuerzos de la BCG Phipps y se ve que el descenso de carga bacilar de los grupos respectivos en comparación con la figura 11 se debe a la BCG Phipps que en el caso del grupo BCG Phipps/V1 la carga bacilar es casi idéntica, pero en el caso de los grupos BCG Phipps/V2 y BCG Phipps/V4 los antígenos son tan inmunógenos que aun con la vacunación con BCG Phipps la enfermedad se exacerba.

El tercer y último resultado obtenido fue el % de neumonía; la inflamación es un parámetro de crucial importancia en el control de la progresión de la enfermedad. El crecimiento de *M. tuberculosis* induce una respuesta inflamatoria en el hospedero que es necesaria para el control de la enfermedad, pero que puede causar un extenso daño tisular. El crecimiento no controlado de la bacteria, resulta por último en la muerte por asfixia debido a insuficiencia de oxígeno. Es por tal razón que los hospederos con menor daño pulmonar producto de la inflamación inducida como respuesta al crecimiento de la bacteria, tendrán una mejor progresión de la enfermedad, que puede llevar a su control. (37,38,39)

Es por tal motivo la importancia de correlacionar, en el caso de *M. tuberculosis*, varios marcadores de protección aparte de la reducción significativa del número de UFC no es por sí solo un correlato de protección. Es por eso que solo se midió el % de neumonía del único grupo en que se obtuvo una excelente disminución de la carga bacilar tanto en los 2 como en los 4 meses que es BCG Phipps/V3/V3/V3. En la figura 17 se muestra un comparativo del % de neumonía de los 2 y 4 meses

---

del grupo antes mencionado y se aprecia una considerable disminución del % de neumonía tanto a los 2 como a los 4 meses en comparación con los otros grupos de esa figura.

---

## VIII) CONCLUSIONES.

En este estudio se evaluaron tanto la protección que conferían los fagos recombinantes V1 = lipoproteína 19 kDa V2= oxidoreductasa V4= Acil CoA ligasa de manera individual así como si estos fagos pudieran aumentar la eficacia de la vacuna BCG Phipps y también se evaluó el uso de una biblioteca genómica de *M. tuberculosis* expresada en un fago como vacuna así también si dicha biblioteca aumentaba el nivel de protección que otorga la BCG Phipps.

Tomando en cuenta que como ya se menciona hay que correlacionar varios marcadores de protección como la reducción significativa del número de UFC, un % bajo de neumonía y una buena supervivencia solo el grupo BCG Phipps/V3/V3/V3 es el único que cumple con el objetivo principal de este proyecto el cual consistía en mejorar la protección que la BCG tiene y el V3 aplicado 3 veces es capaz de alargar la memoria inmunológica de la BCG Phipps y por tanto mejorarla.

---

## **IX) PERSPECTIVAS.**

- Evaluar la capacidad protectora del grupo BCG Phipps/V3/V3/V3 frente a una cepa más virulenta de *M. tuberculosis* (fenotipo LAM y Beijing).
- Evaluar si V3 conserva su efecto en otras cepas de BCG.



---

## **X) REFERENCIAS.**

- 1.-Organización Mundial de la Salud (consultado 22 de enero 2015) disponible <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/es/>
- 2.- Ministerio de Salud de la Nación. Enfermedades infecciosas tuberculosis diagnostico d de la tuberculosis. 2<sup>da</sup> edición. Republica de Argentina: 2009; pag 5 - 7.
- 3.- Fanlo P., Tiberio G; Extrapulmonary Tuberculosis; An. Sis. Sanit.; Navar.;2007; 30 (supl 2) 143-162.
4. - Barrios-Payán J, Saqui-Salces M, Jeyanathan A; Extrapulmonary locations of Mycobacterium tuberculosis DNA During Latent Infection. J Infect Dis. 2012; 206; 1194-205.
5. - Chung,K.T. and Biggers,C.J. (2001). Albert Leon Charles Calmette (1863-193) and the antituberculous BCG vaccination. Perspect. Biol. Med. 44, 379-389.
- 6.- Universidad de la República | Facultad de Medicina Departamento de Bacteriología y Virología Instituto de Higiene; Temas de Bacteriología y Virología Médica; 2<sup>da</sup> edición; 2006; 381-399.
- 7.- Rogelio Hernández Pando, Dulce Mata, Diana Aguilar, Héctor Orozco; Factores Inmunológicos que Participan en la Progresión de la Tuberculosis Pulmonar; Mensaje Bioquímico, Vol. XXXV, 2011, 1-16.
- 8.- Rogelio Hernández Pando, Héctor Orozco E, Diana Aguilar L, Fernando López Casillas\*, Graham Rook; Inmunopatología de la Tuberculosis Pulmonar Experimental; Mensaje Bioquímico, Vol XXVIII. 2004, 129-153.
- 9.- Nesty Olivares, Ailín Vila, Aniel Moya, María Elena Sarmientos, Armando Acosta, Norazmi Mohd; Papel de los anticuerpos en la protección contra *Micobacterium tuberculosis*; VacciMonitor 2006; Año 15 No. 3.

---

**10.-** Rodríguez,A., Tjarnlund,A., Ivanji,J., Singh,M., García,I., Williams,A., Marsh,P.D., Troye-Blomberg,M., and Fernandez,C. (2005). Role of IgA in the defense against respiratory infections IgA deficient mice exhibited increased susceptibility to intranasal infection with *Mycobacterium bovis* BCG. *Vaccine* 23, 2565-2572.

**11.-** Falero-Díaz G, Challacombe S, Rhaman D, Mistry M, Dougan G, Acosta A, Ivanyi J. Transmission of IgA and IgG monoclonal antibodies to mucosal fluids following intranasal or parenteral delivery. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 2000; 122:143-150.

**12.-** Teitelbaum R, Glatman-Fredman A, Chen B, Robbins JB, Unanue E, Casadevall A, Bloom BR. An Ab recognizing a surface antigen of *Mycobacterium tuberculosis* enhances host survival. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95:15688-93.

**13.-** Galman – Freedman A, Casadevall A. Serum therapy for Tuberculosis revised: reappraisal of the role of antibody-mediated immunity against *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Microbiol Rev* 1998;11:514-532.

**14. -** Armstrong JA, Hart PD. Phagosome-lysosome interactions in cultured macrophages infected with virulent tubercle bacilli. Reversal of the usual non fusion pattern and observations on bacterial survival. *J Exp Med* 1975; 142:1-16.

**15.-** de Valliere S, Abate G, Blazevic A, Heuertz RM, Hoft DF. Enhancement of innate and cell-mediated immunity by antimycobacterial antibodies. *Infect Immun* 2005;73:6711-20.

**16.-** Roy E, Stavropoulos E, Brennan J, Coade S, Grigorieva E, Walker B, Dagg B, Tascon RE, Lowrie DB, Colston MJ, Jolles S. Therapeutic efficacy of high-dose intravenous immunoglobulin in *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. *Infect Immun* 2005;73:6101-9.

**17.-** Blanco Quirós A ; Nuevas vacunas contra la tuberculosis obtenidas a partir de los avances inmunitarios y genéticos; Área de Pediatría. Instituto de Biología y Genética Molecular (IBGM). Universidad de Valladolid; *BOL PEDIATR* 2006; 46: 7-22.

---

18.- Sánchez OMA, Valencia ZMP, Montes MJ, Sánchez OJA, Flores MI. Inmunología y terapéutica de la vacuna BCG. *Rev Alerg Mex* 2008;55(4):153-63.

19.- Blanco Quirós A. Recuerdo histórico de las vacunas. En: *Manual de vacunas en Pediatría*. Madrid: AEP; 2005. p. 41-54.

20.- Rodrigues LC, Diwan VK, Wheeler JG. Protective effect of BCG against tuberculosis meningitis and miliary tuberculosis: a metaanalysis. *Int J Epidemiol* 1993; 22: 1154-

21.- Demangel C, Garnier T, Rosenkrands I, Cole ST. Differential effects of prior exposure to environmental mycobacteria on vaccination with *Mycobacterium bovis* BCG or a recombinant BCG strain expressing RD1 antigens. *Infect Immun* 2005; 73: 2190-6.

22.- Aronson NEM, Santosham GW, Comstock RS, Howard LH, Moulton LH, Rhoades ER, Harrison LH. Long-term efficacy of BCG vaccine in american indians and Alaska natives. A 60 year followup study. *JAMA* 2004; 291: 2086-91.

23.- Deeks SL, Clark M, Scheifele DW, Law BJ, Dawar M, Ahmadipour N, Walop W, Ellis CE, King A. Serious adverse events associated with bacille Calmette-Guerin vaccine in Canada. *Pediatr Infect Dis J* 2005; 24: 538-41.

24.- Nelson S. Vispo, Yaquelin Puchades; Bacteriófagos: de la terapia con fagos a la biología combinatoria; *Biotecnología Aplicada* 2001; Vol.18, No.3, 135-147.

25.- Zaida Araujo, Mariana Acosta, Hemir Escobar, Ricardo Baños, Carlos Fernández de Larrea y Bruno Rivas-Santiago; Respuesta inmunitaria en tuberculosis y el papel de los antígenos de secreción de *Mycobacterium tuberculosis* en la protección, patología y diagnóstico; 2008 *Invest Clin* 49(3): 411 - 441,

26.- DiRusso CC y Black PN. 2004; Bacterial long chain fatty acid transport: gateway to a fatty acid-responsive signaling system. *J Biol Chem*. 279: 49563-49566.

27.- Trivedi OA, Arora P, Sridharan V.2004; Enzymic activation and transfer of fatty acids as acyl-adenylates in micobacteria. *Nature*; 428:441-445.

28.- Guillen, A. La genoteca como herramienta de la ingeniería genética. Maracay, Venezuela, Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas. 2009; pp10-56.

29.- Bifani P, Moghazeh S, Shopsis B, Driscoll J ; Molecular characteritaton of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv/Ra variants:distinguishing the mycobacterium laboratory strain; *JClin Microbiol*; 2000; 38 (9): 3200-3204.

- 
- 30.-** Castillo- Rodal I, Castañon Arreolo M, Hernandez Pando R; *Mycobacterium bovis* BCG substrain confer different levels of protection against Mycobacterium tuberculosis infection in BALB/C model of progressive pulmonary tuberculosis ; *Infec Inmun*; 2006; 74(3) :1718-1724.
- 31.-** De la Cruz V, Lal AA, McCutchan TF. Immunogenicity and epitope mapping of foreign sequences via genetically engineered filamentous phage. *J Biol Chem* 1988;263:4318-22.
- 32. -** Greenwood J, Willis AE, Perham RN. Multiple display of foreign peptides on a filamentous bacteriophage. Peptides from Plasmodium falciparum circumsporozoite protein as antigens *J Mol Biol* 1991;220:821-827.
- 33. -** Willis AE, Perham RN, Wraith D. Immunological properties of foreign peptides in multiple display on a filamentous phage. Minenkova OO, Ilyichev AA, Kishchenko GP, Petrenko VA. Design of specific immunogens using filamentous phage as the carrier. *Gene* 1993; 128:79-83.
- 34. -** Pai RK, Pennini M, Tobian AA, Canaday DH, Boom WH, Harding CV. Prolonged Toll-like Receptor signaling by *Mycobacterium tuberculosis* and its 19-kDa lipoprotein inhibits Interferon gamma induced regulation of selected genes in macrophages. *Infect Immun* 2004; 72(11):6603-6614.
- 35-** Alvarez HM , Steinbuchel A; Triacylglycerols in prokaryotic microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol*; 2002, 60:367-376.
- 36.-** Grabner R, Meerbach W; Phagocytosis of surfactant by alveolar macrophages in vitro . *Am J Physiol*, 1991, 261: L472-L477.
- 37. -** Skold, M. and Behar, S.M. (2008). Tuberculosis triggers a tissue-dependent program of differentiation and acquisition of effector functions by circulating monocytes. *J. Immunol.* 181, 6349-6360.
- 38.-** Myers, J.L. and Tazelaar, H.D. (2008). Challenges in pulmonary fibrosis: 6 Problematic granulomatous lung disease. *Thorax* 63, 78-84.
- 39. -** Chung, K.T. and Biggers, C.J. (2001). Albert Leon Charles Calmette (1863-1933) and the antituberculous BCG vaccination. *Perspect. Biol. Med.* 44, 379-389.