

**Aplicación del modelo de infección pulmonar  
progresiva en la evaluación de la capacidad protectora  
de formulaciones anti-tuberculosas en ratones.**

**Tesis en Opción al Grado Científico de  
Doctor en Ciencias de la Salud**

**Autor: Lic. Yamilé López Hernández, MSc**

**Tutores: Dr. Daniel Yero Corona  
Dr. Gustavo Falero-Díaz**

**Asesores: Dr. Gustavo Sierra González  
Dr. Armando Acosta Domínguez**

**Ciudad de La Habana, 2010**

## INDICE

<b>I. INTRODUCCION .....</b>	<b>1</b>
<b>II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>8</b>
2.1. MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS: CARACTERÍSTICAS GENERALES .....	8
2.2. SITUACIÓN DE LA TUBERCULOSIS .....	9
2.3. MODO DE TRANSMISIÓN .....	11
2.4. MECANISMO DE ENTRADA Y COLONIZACIÓN .....	12
2.5. PATOGENIA DE LA ENFERMEDAD. MANIFESTACIONES CLÍNICAS.....	13
2.6. PROTEÍNA A CRISTALINA DE 16 KDA .....	14
2.7. PROTEÍNA DE 38 KDA DE M. TUBERCULOSIS .....	15
2.8. BCG COMO VACUNA CONTRA LA TB.....	15
2.9. INMUNOTERAPIA EN EL TRATAMIENTO DE ENFERMEDADES INFECCIOSAS.....	16
2.10. TERAPIA BASADA EN ANTICUERPOS, VENTAJAS Y DESVENTAJAS .....	18
2.11. PAPEL DE LOS ANTICUERPOS CONTRA LA TB .....	21
2.12. LA VÍA MUCOSAL PARA LA VACUNACIÓN CONTRA TB.....	23
2.13. MODELO ANIMAL EN RATÓN.....	24
2.14. INMUNIZACIÓN CON BIBLIOTECAS DE EXPRESIÓN .....	26
<b>III. MATERIALES Y METODOS .....</b>	<b>31</b>
3.1. CEPAS BACTERIANAS .....	31
3.2. ANIMALES .....	31
3.3. VECTOR PLASMÍDICO .....	32
3.4. ENZIMAS Y REACTIVOS .....	33
3.5. MEDIOS DE CULTIVO Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO .....	33
3.6. ANTICUERPOS POLICLONALES, MONOCLONALES Y SUEROS CONTROLES .....	34
3.6.1. INTACGLOBIN®.....	34
3.6.2. Anticuerpos Monoclonales.....	35
3.6.3. Sueros humanos control.....	35
3.7. MÉTODOS GENERALES DE BIOLOGÍA MOLECULAR .....	35
3.8. CONSTRUCCIÓN DE UNA BIBLIOTECA GENÓMICA ANOTADA DE M. TUBERCULOSIS.....	36
3.8.1. Obtención y purificación del ADN genómico.....	36
3.8.2. Optimización de la digestión del ADN genómico .....	36
3.8.3. Digestión preparativa del ADN genómico .....	36
3.8.4. Construcción de la biblioteca genómica.....	37
3.8.5. Mantenimiento y replicación de la biblioteca.....	37
3.8.6. Preparación del ADN usado como inmunógeno.....	38
3.9. INDUCCIÓN DE LA SÍNTESIS DE PROTEÍNAS HETERÓLOGAS EN E. COLI .....	38
3.10. ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA DESNATURALIZANTE (SDS-PAGE) .....	39
3.11. MÉTODOS INMUNOENZIMÁTICOS .....	40
3.11.1. ELISA de células completas de BCG para la detección de anticuerpos humanos contra BCG .....	40
3.11.2. ELISA de células completas de BCG para la determinación de anticuerpos anti-BCG en ratón... ..	40
3.11.3. Ensayo inmunoenzimático sobre membrana de nitrocelulosa .....	41
3.12. ESTUDIO MICROBIOLÓGICO. DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS. COLECTA DE PULMONES .....	42
3.13. HISTOPATOLOGÍA Y ESTUDIOS MORFOMÉTRICOS .....	42
3.14. MODELOS ANIMALES .....	43
3.14.1. Establecimiento de un modelo de inoculación intranasal con BCG en ratones Balb/c .....	43
3.14.1.1. Inoculación intranasal de BCG.....	43
3.14.1.2. Estudio del efecto de la administración de cuatro dosis diferentes de BCG por vía intranasal ..	43
3.14.1.3. Estudio de la distribución sistémica de BCG al ser inoculado por vía intranasal .....	44
3.14.1.4. Estudio de relación dosis/volumen del inóculo en la inoculación intranasal con BCG .....	44
3.14.2. Evaluación del carácter protector del Intacglobin en ratones.....	44
3.14.2.1. Estudio de la cinética de distribución en ratón del Intacglobin.....	44

3.14.2.2. Evaluación del carácter protector del Intacglobin.....	45
3.14.2. Comparación de la inoculación de diferentes dosis de BCG por vía IN e IT.....	46
3.14.3. Estudio de inmunización pasiva con los anticuerpos monoclonales TBA61 y TBA84.....	46
3.14.4. Evaluación del carácter protector de una biblioteca genómica de <i>M. tuberculosis</i> frente al reto con micobacterias.....	47
3.15. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	49
<b>IV. RESULTADOS Y DISCUSION.....</b>	<b>50</b>
4.1. MODELO DE INFECCIÓN INTRANASAL DE RATONES CON BCG.....	50
4.1.1. Distribución tisular de <i>M. bovis</i> BCG administrado por vía intranasal.....	50
4.1.2. Relación dosis-volumen inoculado de <i>M. bovis</i> BCG por vía intranasal.....	54
4.2. EVALUACIÓN DEL INTACGLOBIN EN EL MODELO DE RETO INTRANASAL.....	56
4.2.1. Estudio en ratón de la distribución en el tiempo de los anticuerpos contra BCG presentes en el Intacglobin.....	56
4.2.2. Experimento de reto con BCG.....	59
4.2.3. Comparación de la inoculación de diferentes dosis de BCG por vía IN e IT.....	63
4.3. ESTUDIO DEL CARÁCTER PROTECTOR DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES TBA61 Y TBA84 ANTE LA INFECCIÓN POR <i>M. TUBERCULOSIS</i> EN UN MODELO DE INFECCIÓN PULMONAR PROGRESIVA.....	65
4.4. ESTUDIO DEL CARÁCTER PROTECTOR DE UNA BIBLIOTECA DE EXPRESIÓN FRENTE AL RETO CON BCG EN UN MODELO DE INFECCIÓN PULMONAR PROGRESIVA.....	71
4.4.1. Construcción de la genoteca de expresión de <i>M. tuberculosis</i> .....	72
4.4.2. Evaluación de la expresión de proteínas de <i>M. tuberculosis</i> en la cepa Top10 de <i>E. coli</i> transformada con la genoteca.....	75
4.4.3. Evaluación de la respuesta de anticuerpos de tipo IgG después de inmunizar con la genoteca de expresión de <i>M. tuberculosis</i> .....	78
4.4.4. Evaluación del carácter protector de la genoteca de <i>M. tuberculosis</i> frente al reto con BCG.....	80
4.4.5. Estudio Anatomopatológico de los pulmones de ratones inmunizados con la genoteca.....	82
<b>V. DISCUSION INTEGRADORA.....</b>	<b>86</b>
<b>VI. CONCLUSIONES.....</b>	<b>93</b>
<b>VII. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>94</b>
<b>VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....</b>	<b>95</b>
<b>IX. AUTOBIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>124</b>

## Abreviaturas y acrónimos

### Por orden alfabético:

<b>AcMs</b>	<b>Anticuerpos monoclonales</b>
<b>Acr1</b>	<b>Proteína <math>\alpha</math>-cristalina de 16 kDa de <i>M. tuberculosis</i></b>
<b>ADN</b>	<b>Acido desoxirribonucleico</b>
<b>AM</b>	<b>arabinomanano</b>
<b>BCG</b>	<b>Bacilo Calmette Guerin</b>
<b>CD</b>	<b>Célula dendrítica</b>
<b>CENPALAB</b>	<b>Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio</b>
<b>CIGB</b>	<b>Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología</b>
<b>CpG</b>	<b>Dinucleótido citocina-guanina no metilado</b>
<b>DO</b>	<b>Densidad óptica</b>
<b>ELI</b>	<b>Inmunización con Bibliotecas de Expresión (del inglés: <i>Expression Library Immunization</i>)</b>
<b>ELISA</b>	<b>Ensayo inmunoenzimático sobre fase sólida (del inglés: <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>)</b>
<b>h</b>	<b>hora</b>
<b>HBHA</b>	<b>Adhesina-hemaglutinina de unión a la heparina (del inglés: heparin binding hemagglutinin adhesin)</b>
<b>Hsp</b>	<b>Proteína de estrés térmico (del inglés: <i>heat shock protein</i>)</b>
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	<b>Interferón gamma</b>
<b>IgA</b>	<b>Inmunoglobulina A</b>
<b>IgG</b>	<b>Inmunoglobulina G</b>
<b>IMA</b>	<b>Inmunidad mediada por anticuerpos</b>
<b>IMC</b>	<b>Inmunidad mediada por células</b>
<b>IN</b>	<b>Intranasal</b>
<b>IPTG</b>	<b>Isopropiltiol-<math>\beta</math>-D-galactósido</b>
<b>IT</b>	<b>Intra-traqueal</b>
<b>LacZ</b>	<b>Subunidad alfa de la enzima Beta galactosidasa</b>

<b>LB</b>	<b>Medio Luria-Bertani</b>
<b>MHC</b>	<b>Complejo Mayor de Histocompatibilidad (del inglés: <i>major histocompatibility complex</i>)</b>
<b>min</b>	<b>minutos</b>
<b>OMS</b>	<b>Organización Mundial de la Salud</b>
<b>ORF</b>	<b>Marco de Lectura Abierto (del inglés <i>Open Reading Frame</i>)</b>
<b>Pb</b>	<b>Pares de bases</b>
<b>pCMV</b>	<b>Promotor inmediato temprano del citomegalovirus humano</b>
<b>pLac</b>	<b>Promotor del operón lactosa</b>
<b>PsTS-1</b>	<b>Glicolipoproteína de 38 kDa de <i>M. tuberculosis</i></b>
<b>RBS</b>	<b>Sitio de unión al ribosoma (del inglés: <i>ribosome binding site</i>)</b>
<b>SMC</b>	<b>Sitio múltiple de clonación</b>
<b>SV40</b>	<b>Virus 40 de los simios ( del inglés: <i>Simian virus 40</i>)</b>
<b>TB</b>	<b>tuberculosis</b>
<b>Th1 y Th2</b>	<b>Células T colaboradoras 1 y 2</b>
<b>TNF</b>	<b>Factor de Necrosis tumoral (del inglés : <i>tumour necrosis factor</i>)</b>
<b>UFC</b>	<b>Unidades formadoras de colonias</b>
<b>VIH</b>	<b>Virus de la Inmunodeficiencia Humana</b>
<b>X-Gal</b>	<b>5-bromo-4-cloro-3-indolil-<math>\beta</math>-D- piranósido</b>

## **SINTEISIS**

La tuberculosis es una enfermedad infecto-contagiosa que anualmente cobra la vida de millones de personas. Algunos de los factores que han limitado el desarrollo de métodos inmunoproliféricos y terapéuticos contra la tuberculosis son la carencia de un modelo animal que logre reproducir la enfermedad tal y como tiene lugar en humanos, unido al hecho de que se han desestimado los mecanismos de defensa mediados por anticuerpos. En este trabajo se desarrolló primeramente un modelo de infección intranasal en ratones con la cepa atenuada *Mycobacterium bovis* bacilo Calmette Guerin (BCG) y se evaluó en el mismo el carácter protector de una formulación de ganmaglobulinas humanas (Intacglobin) frente al reto con el BCG por vía intranasal (IN). En el modelo de infección IN propuesto en este trabajo de tesis, se definió que la misma se debía realizar con una dosis de  $0,5 \times 10^6$  bacilos contenidos en 50  $\mu$ L de inóculo, para evaluar los resultados a las 24 h post-inoculación si se desean hacer estudios de protección a nivel de mucosas. Adicionalmente se demostró que cuando se utiliza la inoculación directa intra-traqueal (IT) se recupera un mayor número de bacterias en los pulmones. Por otra parte, se demostró que el Intacglobin, aplicado tanto por vía IN como intraperitoneal es capaz de proteger significativamente frente al reto con el BCG por vía IN. Una vez demostrado el papel de los anticuerpos policlonales frente a la infección con el BCG, se evaluó la capacidad protectora de dos anticuerpos monoclonales, TBA61 y TBA84, en un modelo en ratón de infección pulmonar progresiva y reto IT con *Mycobacterium tuberculosis*. Mediante este modelo se demostró que a los 21 días post-infección, el tratamiento de los ratones con el anticuerpo TBA61 causó una disminución significativa en el número de unidades formadoras de colonias de *M. tuberculosis* en pulmón respecto a grupos controles, así como una menor patología pulmonar. Este mismo modelo de reto IT se aplicó finalmente para la evaluación del carácter protector frente al reto con micobacterias, conferido por la inmunización activa con una biblioteca genómica de expresión de *M. tuberculosis*. Después del reto se obtuvo una reducción significativa en el número de unidades formadoras de colonias recobradas de los pulmones de los animales inmunizados con la genoteca, una menor patología pulmonar y una respuesta de anticuerpos específicos significativamente superior a la inducida en los animales no inmunizados. Todos estos resultados avalan el uso de este modelo de infección en la evaluación de nuevas formulaciones antituberculosas.

## **I. INTRODUCCION**

Durante los siglos XVIII y XIX la tuberculosis (TB) pulmonar, conocida como la peste blanca, fue la primera causa de muerte en la Europa de aquel entonces (Kaufmann, 2003; Nathan, 2009). A pesar del surgimiento de la vacunación con la cepa atenuada de *Mycobacterium bovis* conocida como Bacilo Calmette Guerin (BCG) y la terapia con antibióticos como la isoniazida, la rifampicina y la estreptomina, el número de casos no ha cesado de aumentar hasta nuestros días, aumento que está siempre relacionado con un empeoramiento en las condiciones económicas. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que en la actualidad aproximadamente una tercera parte de la población mundial se encuentra infectada, lo cual ha llevado a considerar la TB un problema prioritario de salud mundial. Alrededor de 8 millones de personas adquieren TB anualmente y de ellas, 2,9 millones fallecen, lo que representa aproximadamente una muerte cada 15 segundos (Vashishtha, 2009). Sin un tratamiento adecuado, más del 60 % de las personas con TB podrían morir.

La actual vacuna anti-tuberculosa disponible en el mercado, el BCG, resulta eficaz en la prevención de formas diseminadas de TB en niños, pero no es muy efectiva en la prevención de la TB pulmonar en adultos. Existen hipótesis que explican la efectividad variable en la protección que ha tenido esta formulación vacunal, de lo que se deduce la gran necesidad de encontrar vacunas que puedan ser usadas para re-estimular la inmunidad conferida por el BCG, tanto en individuos infectados de forma latente, como en poblaciones con un alto índice de micobacterias ambientales (Agger y Andersen, 2002).

Para implementar estrategias que puedan conducir al desarrollo exitoso de formulaciones vacunales, con una mayor efectividad que la alcanzada por el BCG, es necesario tener en cuenta varios aspectos. Un aspecto muy importante radica en dilucidar por completo los mecanismos efectores del sistema inmune frente a este patógeno intracelular. Durante muchos años, se le atribuyó un papel exclusivo a los mecanismos de la inmunidad mediada por células (IMC) frente a la infección por este patógeno intracelular. El paradigma sobre la relación células T colaboradoras tipo 1/células T colaboradoras tipo 2 (Th1/Th2) prevaleció durante mucho tiempo y direccionó el desarrollo de vacunas según esta teoría. Con el devenir de la tecnología y la producción de anticuerpos monoclonales (AcMs) se han acumulado

evidencias claras que soportan un posible papel de los anticuerpos frente a patógenos intracelulares como virus, algunos hongos, parásitos y bacterias, incluyendo las micobacterias. Con respecto a los trabajos relacionados con micobacterias, se han utilizado AcMs anti- arabinomanano (AM), anti-lipoarabinomanano (LAM) o anti-adhesina-hemaglutinina de unión a la heparina (HBHA), de diferentes subclases de inmunoglobulina G (IgG) o inmunoglobulina M (IgM), en general opsonizados con la micobacteria y aplicados por diferentes vías (Glatman-Freedman y cols., 1996; Teitelbaum y cols., 1998; Pethe y cols., 2001; Hamasur y cols., 2003; Hamasur y cols., 2004; Glatman-Freedman y cols., 2004; Chambers y cols., 2004; Reljic, 2007). En todos estos trabajos se obtuvieron diferentes resultados, tales como prolongación de la supervivencia del hospedero, aumento del aclaramiento antigénico en el suero, prevención de la diseminación de la micobacteria y/o reducción de las unidades formadoras de colonias (UFC) en pulmón y bazo. En la mayoría de los casos estos anticuerpos pertenecieron al isotipo IgG. En el año 2004 se informa por primera vez acerca de la obtención de un AcM del isotipo IgA dirigido contra el antígeno Acr1, conocido también como proteína  $\alpha$ -cristalina de 16 kDa, Hsp 16.3 o Rv2031c (Yuan y cols., 1998). Esta proteína es la más abundante en *Mycobacterium tuberculosis* durante la fase no replicativa o de latencia y no está presente bajo condiciones de crecimiento logarítmico. El AcM específico a esta proteína se evaluó en un modelo murino de inoculación intranasal (IN) y reto posterior por aerosol con *M. tuberculosis*. Como resultado se obtuvo una protección en términos de reducción del número de unidades formadoras de colonias (UFC) en los pulmones de los ratones en estudio, aunque esta protección resultó ser de corta duración (Williams y cols., 2004). Este estudio sentó las bases para evaluar la protección de este tipo de AcM en otros modelos de reto frente a *M. tuberculosis*.

Por otro lado, en el caso específico de *M. tuberculosis*, no se han realizado estudios sistemáticos a gran escala para identificar candidatos vacunales potenciales que generen anticuerpos protectores. Las modernas metodologías de pesquisa de candidatos vacunales como la genómica y la vacunología reversa (Rappuoli and Covacci, 2003; Grandi and Zagursky, 2004), bien validadas para patógenos extracelulares (Yero et al., 2005; Pizza et al., 2000), están todavía en sus inicios para *M. tuberculosis* (Talaat and Stemke-Hale, 2005). Por tanto, cualquier acercamiento al uso de preparaciones de anticuerpos o antisueros específicos

contra la tuberculosis o a la exploración de nuevas plataformas de búsqueda de candidatos vacunales, contribuirá a la lucha contra esta devastadora enfermedad. Entre las metodologías de pesquisa masiva de candidatos vacunales, las bibliotecas genómicas de expresión constituyen una alternativa apropiada, ya que permiten la evaluación completa de cualquier genoma dado, ya sea que este esté secuenciado o no, para identificar potenciales antígenos vacunales (Piedrafita et al., 1999). Este método se basa en emplear el sistema inmune del hospedero para seleccionar los mejores candidatos vacunales contra una enfermedad. En esta estrategia, el genoma completo fraccionado es clonado en un vector de inmunización genética bajo el control de un promotor eucariótico para crear una biblioteca de genes. Los ADN plasmídicos purificados a partir de estas bibliotecas son inoculados a animales, con el fin de inducir una respuesta inmune contra los antígenos expresados a partir de los genes clonados. Los animales inmunizados son retados posteriormente con el organismo patógeno, con el objetivo de descubrir cuales clones inducen actividad protectora (Talaat y Stemke-Hale, 2005).

Cualquiera sea el acercamiento al estudio de la respuesta inmune específica para combatir la TB, la implementación de modelos animales de reto con micobacterias es vital para inferir la efectividad de los posibles candidatos en los hospedantes naturales de esta enfermedad.

El modelo animal en el que mejor se reproduce la patogenia de la TB, así como la respuesta inmune inducida en el hospedante es el modelo en curiel. Sin embargo, debido al alto costo de los animales, su manutención, así como la falta de la disponibilidad de reactivos para estudiar la respuesta inmune, este modelo es usado con preferencia en candidatos vacunales que han resultado ser exitosos en las pruebas desarrolladas en el modelo animal en ratón (Mitchison and Chang, 2009). Este último ha sido el más usado, a pesar de las limitaciones de correlacionar el curso de la infección con el proceso que se desarrolla en humanos. Concerniente a la ruta empleada para los retos con las micobacterias, en el modelo en ratón se han usado diferentes vías de inoculación. La vía nasal por aerosol resulta ser la más cercana a la fisiológica, pero su costo y disponibilidad en países subdesarrollados la hacen muy poco asequible. Por otra parte, el empleo de cepas virulentas es tan solo posible en laboratorios perfectamente equipados que permitan un nivel de bioseguridad que no implique riesgos para el investigador (Louveau et al., 2005).

En particular, el modelo de infección pulmonar progresiva por vía intra-traqueal (IT) en ratones ha sido utilizado con múltiples propósitos, desde el estudio de la patogénesis y la respuesta inmune en el hospedero, hasta la evaluación de la eficacia protectora conferida por la inmunización con cepas del BCG recombinante (Castillo-Rodal y cols., 2006). Este modelo fue propuesto primeramente por Hernández-Pando y cols. (1997) y consiste en inocular directamente en los pulmones, a través de una inoculación intra-traqueal, una dosis elevada de micobacterias. La principal ventaja en el uso de este modelo es que el inóculo llega en su totalidad a los pulmones, pudiéndose hacer estudios más confiables desde el punto de vista morfológico, histopatológico y microbiológico. Además, se induce una respuesta inmune que es similar a la inducida en humanos luego de la infección, por lo que lo hace ideal para la investigación de candidatos vacunales (Morais y cols., 2010). Sin embargo este modelo no ha sido empleado hasta el presente en la evaluación de candidatos vacunales terapéuticos y profilácticos contra la tuberculosis, como el AcM del tipo IgA TBA61 dirigido contra la proteína de 16 kDa de *M. tuberculosis*. Tampoco ha sido explotado como correlato de protección en métodos de pesquisa masiva de candidatos vacunales como la inmunización con bibliotecas genómicas de expresión.

Atendiendo a estos antecedentes, se formuló la siguiente **hipótesis**:

El modelo murino de infección pulmonar progresiva con micobacterias puede aplicarse en la evaluación de la capacidad de inducir inmunidad protectora de formulaciones de anticuerpos monoclonales específicos contra proteínas de *M. tuberculosis*, así como de bibliotecas genómicas de expresión de este bacilo.

Para dar respuesta a esta hipótesis, se plantearon los siguientes **objetivos**:

1. Evaluar el papel protector de anticuerpos anti-tuberculosis en modelos de inmunización pasiva y reto con micobacterias en ratones.
2. Demostrar la utilidad del modelo murino de reto infeccioso intra-traqueal en la evaluación del carácter protector conferido por la inmunización activa con genotecas de *M. tuberculosis*.

Para dar cumplimiento a estos objetivos, se plantearon las siguientes **tareas**:

**Objetivo 1:** Evaluar el papel protector de anticuerpos anti-tuberculosis en modelos de inmunización pasiva y reto con micobacterias en ratones.

1. Establecer un modelo de inoculación y reto intranasal con el BCG.
2. Evaluar de la biodistribución de un preparado policlonal anti-tuberculosis en ratones Balb/c después de la inoculación sistémica y mucosal.
3. Inmunizar pasivamente ratones con el preparado policlonal por vía intranasal y reto con el BCG.
4. Inmunizar pasivamente ratones Balb/c con anticuerpos monoclonales de tipo IgA.
5. Evaluar la protección conferida por la inmunización con estos anticuerpos después del reto intra-traqueal con *M. tuberculosis*.
6. Determinar de la reducción del número de UFC en tejido pulmonar
7. Realizar estudios histopatológicos y morfométricos de las secciones tisulares de los pulmones de los animales infectados.

**Objetivo 2:** Demostrar la utilidad del modelo de reto infeccioso intra-traqueal en la evaluación del carácter protector conferido por la inmunización activa con genotecas de *M. tuberculosis*.

1. Construir una biblioteca genómica anotada de *M. tuberculosis* H37Rv en un vector de expresión para células de mamífero.
2. Evaluar el reconocimiento específico de antígenos codificados por la genoteca expresada en *Escherichia coli* por anticuerpos monoclonales generados en ratón contra las proteínas de 16 y 38 kDa de *M. tuberculosis* y frente a sueros humanos de donantes sanos y enfermos de tuberculosis.
3. Evaluar en ratones de la respuesta de anticuerpos específicos inducida por la inmunización intramuscular con la biblioteca genómica.
4. Evaluar la protección conferida contra la infección micobacteriana por la inmunización con la biblioteca genómica después del reto intra-traqueal con el BCG.

La **novedad científica** de la presente tesis se resume en los siguientes aspectos:

1. Se estableció un modelo sencillo y económico de infección intranasal con el BCG en ratones que puede ser utilizado en los estadios iniciales de una investigación donde se evalúen candidatos vacunales o inmunoterapéuticos contra la TB.
2. Los estudios realizados con el Intacglobin frente al reto intranasal con el BCG en ratones constituyen una nueva evidencia acerca del papel de los anticuerpos secretorios en la defensa contra micobacterias, además de abrir un nuevo camino hacia la aplicación terapéutica de este tipo de preparados comerciales.
3. Se muestra la primera referencia en la literatura acerca de la inducción de respuesta protectora en ratones de un anticuerpo monoclonal del tipo IgA dirigido contra la proteína de 16 kDa de *M. tuberculosis* administrado por vía intra-traqueal frente al reto con *M. tuberculosis* inoculada por la misma vía.
4. Se demuestra por primera vez la protección inducida en ratones por una genoteca de expresión de *M. tuberculosis* usada como inmunógeno y en la que pudieran estar involucrados los mecanismos de defensa humorales.

#### **Valor Práctico de los resultados:**

Con el conjunto de resultados presentados en este trabajo se pudo contar con un modelo animal que permitiera la evaluación de candidatos vacunales de diversa naturaleza (basados en anticuerpos policlonales, monoclonales, ADN) bajo las condiciones específicas de laboratorios de países tropicales, donde este modelo de infección pulmonar progresiva resulta ideal. Por otra parte el demostrar que el AcM específico para la proteína de 16 kDa de *M. tuberculosis* resulta protector frente al reto con la bacteria, sienta las bases para la humanización de este AcM y su aplicación como agente terapéutico en el tratamiento de pacientes tuberculosos. En el caso específico de *M. tuberculosis*, que es una bacteria difícil de cultivar, la metodología de bibliotecas genómicas de expresión constituye una alternativa rápida y efectiva en la búsqueda de aquellos genes que codifiquen para antígenos que pudieran mediar en los mecanismos de inmunidad protectora contra *M. tuberculosis*.

La investigación descrita en esta tesis se desarrolló en el Instituto Finlay, presentándose ante el consejo científico de esta institución. Los resultados presentados en este trabajo se han discutido en 9 eventos científicos y forman parte de 5 publicaciones en revistas arbitradas. Han formado parte de dos tesis de diploma y una tesis de maestría. Parte de los resultados de esta tesis recibieron el Premio Anual de la Academia de Ciencias de Cuba correspondiente al año 2001. Esta tesis fue predefendida ante el Consejo Científico del Instituto Finlay, el 24 de mayo de 2010.

Este trabajo de tesis consta de 10 capítulos: Introducción (7 páginas), Revisión bibliográfica (23 páginas), Materiales y Métodos (19 páginas), Resultados y discusión (36 páginas), Discusión integradora (7 páginas), Conclusiones (1 página), Recomendaciones (1 página), Bibliografía y Autobiografía. Además, en las tres primeras páginas se muestra un índice con los epígrafes y sub-epígrafes de la tesis, seguido de dos páginas con las abreviaturas y acrónimos empleados en la tesis y luego una síntesis de una página.

## **II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1. *Mycobacterium tuberculosis*: características generales**

El género *Mycobacterium*, conjuntamente con *Corynebacterium* y *Nocardia*, forma un taxón monofilético dentro de la familia de los Actinomicetos (Embley y Stackebrandt, 1994). Estas bacterias Gram positivas poseen una pared celular muy rígida debido a la presencia de ácidos micólicos, lo cual les brinda la característica de ser ácido-alcohol resistentes, lo que las distingue del resto de las bacterias (Kubica, 1983;).

El género *Mycobacterium* es muy diverso, con alrededor de 85 especies diferentes desde la identificación de *Mycobacterium leprae* en 1873 (Rastogi y cols., 2001).

La vasta mayoría de estas especies son saprófitos ambientales (Falkinham, 1996). Se han adaptado a una gran variedad de condiciones y crecen en el suelo y agua de varias regiones del mundo (Collins y Yates, 1984). Pueden vivir en distintos tipos de aguas naturales, que incluyen aguas frescas y saladas, aguas tratadas, piscinas y agua potable, a partir de las cuales puede diseminarse mediante aerosoles. Algunas pocas especies de micobacterias, como *M. tuberculosis* y *M. bovis*, identificadas por primera vez en humanos y ganado respectivamente, nunca han podido ser aisladas ni identificadas en otro ambiente (Bloom y cols., 1994; Collins, 2000), lo cual sugiere que estos organismos son parásitos obligados de humanos y bovinos.

Los bacilos de la tuberculosis son bastoncillos rectos o ligeramente curvos con extremos redondeados. Estos microorganismos varían en ancho de 0,2 a 0,5  $\mu\text{m}$  y en longitud de 1 a 4  $\mu\text{m}$ . Son aerobios facultativos, lo cual explica su predilección por causar enfermedades en tejidos muy oxigenados como el lóbulo superior del pulmón y el riñón. Son inmóviles, no esporulan ni forman cápsulas y son resistentes a la decoloración alcohol-ácida cuando son teñidos con fucshina básica fenicada (tinción de Ziehl-Neelsen). Tienen un crecimiento muy lento (un tiempo de duplicación de 18 horas), lo que contrasta con la mayoría de las bacterias, que pueden duplicar su número en una hora o menos (Yegian y Porter, 1944).

Una característica distintiva de estos microorganismos es el alto porcentaje de lípidos presentes en la pared celular, que alcanza el 60% de su peso seco. Dicha cubierta, de característica impermeable, determina su gran resistencia a la coloración, a la actividad

bactericida del complemento y a la digestión intracelular por macrófagos (Barkan y cols., 2009). También permite explicar la resistencia a la desecación, propiedad esta muy importante para la transmisión, ya que permite la sobrevivencia del bacilo en esputo expectorado seco. Por todo esto se puede plantear que los lípidos le sirven a las micobacterias patógenas como una armazón protectora (Brennan y Nikaido, 1995; Brennan, 2003).

*M. bovis*, perteneciente al mismo orden, familia y género que *M. tuberculosis*, es el agente causal de la TB bovina, aunque puede ocasionar casos de TB en humanos por ingestión de leche de vacas enfermas de TB y productos lácteos contaminados (Abalos y Retamal, 2004). Inicialmente produce lesiones intestinales o faríngeas, aunque desde que se pasteuriza o se hierva la leche y sus derivados es rara la TB por *M. bovis* con puerta de entrada digestiva (Samad y cols., 1998; Beste y cols., 2009). La ausencia de crecimiento en medios que tengan más del 1 % de glicerina es una característica diferencial de *M. bovis* (Beste y cols., 2009).

La infección inicial por *M. tuberculosis* suele ser asintomática y se localiza en los pulmones con mayor frecuencia, aunque puede afectar cualquier tejido del organismo produciendo un amplio espectro de estados de la enfermedad. Anatómica y patológicamente se caracteriza por la formación de granulomas o tuberculomas donde quedan encerrados los bacilos. De estas estructuras en forma de tubérculos proviene el nombre de Tuberculosis (Samad y cols., 1998).

## **2.2. Situación de la Tuberculosis**

A través de toda 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 (Chung y Biggers, 2001; Davies, 2008; Gradmann, 2009). 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.

La tuberculosis constituye un problema de salud re-emergente en países desarrollados, pero es en los países subdesarrollados donde tiene lugar el 95% de los casos y el 98% de las defunciones. Se considera que un tercio de la población mundial se encuentra infectada con el bacilo y anualmente ocho millones de casos nuevos de tuberculosis se presentan, aún a pesar de la aparición de fármacos antituberculosos eficaces (Brosch y Vincent, 2007). En el año 2007 se reportaban 9,27 millones de casos nuevos y 1,8 millones de muertes debidas a esta enfermedad (Vashishtha, 2009).

La tuberculosis ha sido asociada históricamente con las regiones y poblaciones de bajo nivel socioeconómico, o sea, persiste y está incrementada entre muchos grupos socialmente definidos: ancianos que viven en asilos, personas desamparadas y sin hogar, personas retenidas en instituciones correccionales y aquellos infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (Nunn y cols., 2005).

El conocimiento de la historia natural de la enfermedad, la mejora de los métodos diagnósticos y la existencia de un tratamiento eficaz, llevaron a considerar en los países industrializados que la enfermedad se encontraba bajo control (Martín y cols., 2006). En 1993, la OMS declaró la TB como una enfermedad re-emergente de repercusión mundial, figurando en primer lugar como causa de muerte asociada a enfermedades infecciosas en todo el mundo (Robertson y cols., 2001).

Se estima que un tercio de la población mundial está infectada por *M. tuberculosis* y el 5% de estos portadores desarrollan la enfermedad activa en el primer año de infección. Cada año aparecen cerca de 8 millones de nuevos casos y 3 millones de muertes atribuidas a esta enfermedad, siendo los países en desarrollo los más afectados (Dye, 2000). En el período comprendido entre el 2000 y el 2020, cerca de mil millones de personas se infectarán por el bacilo, 200 millones enfermarán a causa de la TB y la misma cobrará la vida de alrededor de 35 millones de personas (Parida y cols., 2005).

La resistencia a medicamentos antituberculosos es un fenómeno en crecimiento que acompaña el cuadro general de la TB en el mundo y que plantea mayores dificultades para su futuro control (Matthys y cols., 2009). La resistencia de *M. tuberculosis* a los medicamentos no es más que un fenómeno natural que se produce por mutaciones génicas que conducen a la aparición de cepas resistentes al tratamiento, como consecuencia de un mal seguimiento de

las largas terapias con antibióticos. En la actualidad se acepta que en un cultivo de bacilo tuberculoso salvaje aparece, por mutación espontánea natural, un microorganismo resistente a la Isoniazida por cada  $10^6$ , uno resistente a la Rifampicina por cada  $10^8$  y para la Estreptomicina y Etambutol uno por cada  $10^5$  (Borgdorff y cols., 2003; Bibikova y cols., 2006; Fischbach y Walsh, 2009). En pacientes infectados con VIH las cepas de *M. tuberculosis* resistentes a multi-drogas tienen un índice de mortalidad del 80%, mientras que en pacientes inmunocompetentes es de un 50% (Menzies y cols., 2009).

### **2.3. Modo de transmisión**

*M. tuberculosis* tiene como principal puerta de entrada la vía respiratoria, por lo que esta vía es fundamental en la transmisión de la enfermedad de persona a persona. La infección a nivel pulmonar se adquiere mediante la inhalación de pequeñas partículas que contienen bacilos tuberculosos (Williams y cols., 2005).

Cuando una persona con TB pulmonar o laríngea tose, estornuda, ríe, habla o canta, genera aerosoles de pequeñas partículas líquidas (gotas de flügge). Los bacilos tuberculosos (en número de uno a tres) forman el núcleo de estas gotas, lo suficientemente pequeñas como para evaporarse y permanecer suspendidas en el aire varias horas. Las partículas de mayor tamaño, aunque tengan mayor número de bacilos, son menos contagiosas pues caen por gravedad, o en el caso de ser inhaladas son eliminadas por el sistema mucosal (Williams, 2006). Una persona con TB pulmonar activa puede infectar de 10 a 15 personas en un año (Kaufmann, 2005).

La posibilidad de que la enfermedad se transmita depende, entre otros factores, de las características del paciente, el entorno en que tiene lugar la exposición, la duración de la exposición y la susceptibilidad del receptor. Una vez iniciado un tratamiento correcto, en dos o tres semanas el esputo se desinfecta y la capacidad de transmitir la enfermedad descende en gran medida, de ahí la importancia que tiene el control de los enfermos y el inicio del tratamiento. Igualmente las medidas de cubrir la boca y la nariz del enfermo al estornudar o toser, disminuyen en gran medida la capacidad de transmitir dicha enfermedad (Williams, 2006).

#### 2.4. Mecanismo de entrada y colonización

En condiciones naturales *M. tuberculosis*, el agente causal de la TB, es transmitido mediante la encapsulación de partículas de flügge de un individuo infectado a uno no infectado. Estas goticas contienen bacilos tuberculosos no mayores de 2  $\mu\text{m}$  de diámetro, que pueden sobrevivir varias horas en ese estado, siendo capaces de penetrar en los alvéolos del tracto respiratorio de un individuo no infectado (Dannenberg, Jr. y cols., 1994; Aoki, 2004; Barniol y cols., 2009). El primer estado comienza con la inhalación del bacilo tuberculoso. Los macrófagos alveolares lo ingieren y en este momento pueden destruirlo. En este primer estado la destrucción de la micobacteria depende de la capacidad microbiciida intrínseca de los fagocitos del hospedero y de los factores de virulencia de la micobacteria. Por otra parte, las células dendríticas (CD) juegan un papel importante en estas etapas tempranas de la infección, ya que estas son células con mayor capacidad de presentar antígenos que los macrófagos y presumiblemente juegan un papel clave en la activación de las células T con antígenos específicos de *M. tuberculosis* (Tascon y cols., 2000b).

Las bacterias que logran escapar de este primer estado de destrucción intracelular se multiplican y llegan a provocar la lisis del macrófago. Cuando esto sucede, los monocitos de la sangre y otras células inflamatorias son movilizadas hacia el pulmón (segundo estado). Estos monocitos se diferencian en macrófagos, que nuevamente ingieren micobacterias, pero en este caso sin destruirlas (Clemens y Horwitz, 1995; Goxe y cols., 1998; Akagawa, 2002; Bocchino y cols., 2005). En este estado simbiótico, la micobacteria crece logarítmicamente, ocurriendo un pequeño daño tisular. Dos o tres semanas luego de la infección se desarrolla una inmunidad mediada por células T con linfocitos T antígeno- específicos que proliferan en las lesiones y activan a los macrófagos, para destruir las micobacterias intracelulares. En esta fase el crecimiento logarítmico de los bacilos se detiene (tercer estado). La necrosis sólida producida en las lesiones pulmonares primarias inhibe el crecimiento de las micobacterias extracelulares (Hirayama y cols., 2009).

Inicialmente esta respuesta se caracteriza por una respuesta inflamatoria (inmunidad innata) que destruye a los macrófagos que contienen *M. tuberculosis* y a las células circundantes. La lisis de estos macrófagos contribuye a la presentación de la bacteria al sistema inmune del hospedero, lo que genera una respuesta humoral específica y una respuesta celular contra la

bacteria. En este punto, las lesiones granulomatosas focales empiezan a formarse y están compuestas de células gigantes derivadas de macrófagos y linfocitos. Cuando la inmunidad celular se desarrolla, los macrófagos que contienen bacilos son eliminados y esto conlleva a la formación del centro caseoso del granuloma, rodeado de una zona celular de fibroblastos, linfocitos y monocitos derivados de la sangre (Dannenberg y cols., 1994). Como resultado, la infección puede permanecer estacionaria o latente. La enfermedad puede progresar y la diseminación puede tener lugar inmediatamente después de la infección primaria o meses o años después (infección post-primaria) bajo condiciones de inmunosupresión. La formación de la cavidad puede llevar a la ruptura de bronquios cercanos, lo que permite que el bacilo se disemine hacia otras partes del pulmón y hacia el ambiente exterior (Okumura y cols., 2008; Nedeltchev y cols., 2008; Nedeltchev y cols., 2009).

En personas con una eficiente IMC la infección puede quedar permanentemente en este punto. Los granulomas cicatrizan secuencialmente y dejan pequeñas fibras y lesiones calcificadas. Sin embargo, si una persona infectada no puede controlar la infección inicial en el pulmón o si el sistema inmune de una persona con latencia es debilitado por drogas inmunosupresoras (infección por el VIH o malnutrición u otros factores) el centro del granuloma se puede licuar por un proceso desconocido y sirve de medio para que la bacteria se replique de forma incontrolada. En este punto (TB pulmonar activa) las bacterias viables escapan del granuloma y se expanden dentro del pulmón, incluso a otros tejidos, vía sistema linfático y la sangre (TB extra pulmonar o miliar). Cuando esto ocurre, la persona se transforma en infecciosa y necesita terapia de antibióticos para sobrevivir (Kamholz, 1996).

En resumen, después de la entrada en el pulmón de *M. tuberculosis* se produce la activación de diferentes mecanismos de defensa del hospedero. El resultado final depende del balance entre la eliminación y destrucción de la bacteria y la extensión de la necrosis tisular, la fibrosis y la regeneración de los tejidos dañados del hospedero (Frieden y cols., 2003; Churchyard y cols., 2009; Kopylova y Lomova, 2009).

### **2.5. Patogenia de la enfermedad. Manifestaciones clínicas**

El primer estadio de la enfermedad dura alrededor de tres a ocho semanas. Luego de que el bacilo de *M. tuberculosis*, contenido en los aerosoles inhalados, comienza a implantarse en

los alveolos la bacteria es diseminada por la circulación linfática hacia los ganglios linfáticos regionales del pulmón, formando el complejo de “Ghon” o primario. En este momento es que comienza la reactividad a la tuberculina. La segunda etapa dura alrededor de tres meses y está caracterizada por la circulación hematogena a varios órganos de la bacteria, incluyendo a otras partes del pulmón. En este momento algunos individuos pueden presentar formas fatales de la enfermedad como la miliar o la meníngea. La tercera etapa dura de tres a siete meses y puede ocurrir pleurisma o inflamación de las superficies pleurales que causa severos dolores de pecho. Este estado puede ser retrasado por dos o más años. Se piensa que las causas de esta situación pueden ser diseminación hematogena o la liberación de la bacteria en el espacio pleural a partir de concentraciones subpleurales en el pulmón. Las bacterias libres o sus componentes interactúan con linfocitos T CD4+ sensibilizados que son atraídos, proliferan y liberan citoquinas inflamatorias (Kamholz, 2000). El último estado es la liberación del complejo primario, donde la enfermedad no progresa y puede tomar hasta tres años. En esta etapa es cuando más lentamente se desarrollan las lesiones extrapulmonares por ejemplo en huesos y articulaciones, presentándose frecuentemente como dolores crónicos de espalda. Sin embargo, la mayoría de las personas infectadas no exhiben progresión de la enfermedad. Una tercera parte de los individuos infectados con VIH se transforman en infectados, y de este número del 3 al 5 % desarrolla la TB en el primer año. Estos individuos y otros inmunosuprimidos pueden ser también nuevamente infectados y muestran rápida progresión a la enfermedad activa (Garay y Rutkin, 1996).

## **2.6. Proteína $\alpha$ cristalina de 16 kDa**

La Acr1, también conocida como Hps 16.3, HpsX, antígeno de 16 kDa o Rv2031c es una proteína de 16.3 kDa perteneciente a la familia de las  $\alpha$ -cristalina/hsp, encontrada en *M. tuberculosis* (Horwitz y cols., 1991; Lee y cols., 1992). Esta proteína es la más abundante en *M. tuberculosis* durante la fase no replicativa o de latencia y no está presente bajo condiciones de crecimiento logarítmico (Cunningham y Spreadbury, 1998). La delección del gen *acr*, que codifica para la proteína Acr1, da como resultado una cepa que en medios de cultivo crece igual que la cepa parental, pero disminuye su crecimiento dentro de macrófagos. La expresión incrementada de este gen se ha detectado en ratones infectados con *M. tuberculosis* y también en biopsias de pulmones de pacientes tuberculosos con lesiones

cavernosas crónicas, por lo que la proteína pudiera ser un antígeno diana importante durante el período de latencia (Yuan y cols., 1998). Adicionalmente se ha visto que después de un tratamiento quimioterapéutico, aumenta la proliferación de células T que reconocen al antígeno Acr1 (Friscia y cols., 1995; Dieli y cols., 2000). Se han encontrado anticuerpos específicos contra esta proteína en el suero de niños con TB (Imaz y cols., 2001), en el suero de personas contactos con casos de TB (Jackett y cols., 1988), en el suero de personas que han tenido una exposición ocupacional a la bacteria (Bothamley y cols., 1992) y también en fluido cerebroespinal de pacientes con meningitis tuberculosa (Chandramuki y cols., 1989).

### **2.7. Proteína de 38 kDa de *M. tuberculosis***

El antígeno PstS-1, también conocido como glicoproteína de 38 kDa, es una proteína extracelular que actúa como receptor inicial para el transporte activo de gran variedad de nutrientes (Harboe y Wiker, 1992). Induce una fuerte respuesta inmune contra *M. tuberculosis* y *M. bovis* y confiere inmunidad protectora en estudios realizados en modelos animales y humanos (Senol y cols., 2007). Este antígeno juega un papel esencial en la inducción de citoquinas pro-inflamatorias durante la infección con *M. tuberculosis* (Jung y cols., 2006).

### **2.8. BCG como vacuna contra la TB**

Hasta hoy la única vacuna aprobada por el programa de vacunación de la OMS contra la TB es BCG, que se deriva de *M. bovis*, especie muy próxima a *M. tuberculosis*, con más de un 99% de identidad (Garnier y cols., 2003; Andersen y Doherty, 2005). La cepa se obtuvo después de un cultivo prolongado por numerosos pases en un medio de cultivo constituido por glicerina, bilis de buey y papa. Se presenta como una vacuna liofilizada viva, no patógena que ha sido usada durante muchos años y se le ha administrado aproximadamente a 3 billones de personas en todo el mundo (Hirsch y cols., 1999a; Vashishtha, 2009).

La vacunación con BCG tiene como objetivo limitar la multiplicación y diseminación del bacilo tuberculoso tras la primoinfección mediante la estimulación de una respuesta inmune celular desarrollada debido a la similitud antigénica entre BCG y *M. tuberculosis* (Agger y Andersen, 2002; Nieves, 2002). BCG protege contra las formas graves de la enfermedad, no impide la infección pero evita la TB miliar y meníngea en la infancia (Bland y Clements,

1998; von Reyn y Vuola, 2002; Kondo y Nishimura, 2004; Sterling y cols., 2007; Brimnes, 2008). La protección que esta vacuna ofrece varía en dependencia de la población vacunada, y se han obtenido niveles de protección en estudios clínicos que van desde cerca de un 80% hasta la falta total de protección (Hirsch y cols., 1999b; Cainelli y Vento, 2002; Khadeeva y cols., 2003). Esto pudiera deberse a: variaciones de una cepa de BCG a otra, la pérdida progresiva de la capacidad de la vacuna para estimular una respuesta inmunitaria protectora, el estado nutricional y características genéticas del hospedero, el envejecimiento, la presencia de infecciones recurrentes, el amplio espectro de virulencia que existe entre las cepas de *M. tuberculosis* y el nivel de exposición a micobacterias ambientales (Hirsch y cols., 1999b; Martín, 2005).

Otras desventajas de la vacuna son atribuidas al efecto enmascarador que tiene sobre la prueba de la tuberculina (Lowrie y cols., 1998), a la imposibilidad de ser administrada a individuos inmunocomprometidos, a la vía de administración parenteral y a la potencialidad de desarrollar osteomielitis y adenitis, entre otras (von Reyn y Vuola, 2002).

A pesar de sus limitaciones, anualmente se continúa vacunando con BCG a millones de personas porque confiere protección contra la TB miliar y meníngea en la infancia (von Reyn y Vuola, 2002); porque tiene una baja incidencia de efectos secundarios y porque se puede administrar al nacimiento (Jacobs y cols., 1997).

Se piensa que la exposición natural a micobacterias ambientales ejerce una influencia importante en la respuesta inmune, lo que puede enmascarar o inhibir el efecto de la vacunación con BCG en países tropicales (Buddle y cols., 2002; Brandt y cols., 2002; de Lisle y cols., 2005).

De uno u otro modo, un gran número de personas en el mundo están expuestas a la TB, por lo que se hace necesario el desarrollo de nuevas vacunas que deberán superar las deficiencias de BCG (Roth y cols., 2006).

## **2.9. Inmunoterapia en el tratamiento de enfermedades infecciosas**

La terapia pasiva con anticuerpos fue la primera estrategia antimicrobiana consistentemente efectiva. La capacidad de anticuerpos específicos para proteger contra toxinas bacterianas se descubrió en 1890 por Behring y Kitasato y esta observación llevó en su momento a un

rápido desarrollo de la terapia con anticuerpos para el tratamiento de varias enfermedades infecciosas. Como todas las preparaciones de anticuerpos derivaban de los sueros de animales inmunizados o donantes humanos, esta forma de terapia se denominó seroterapia. Esta terapia fue efectiva, pero la administración de grandes cantidades de proteínas animales también se relacionó con efectos secundarios (Casadevall y cols., 1994; Casadevall y Scharff, 1995).

Hacia el año 1930, las mejoras en los métodos de purificación de anticuerpos permitió la producción de preparados de anticuerpos con toxicidad reducida, y la seroterapia fue un medio efectivo para el tratamiento de muchas enfermedades infecciosas. Sin embargo, después de 1935, el uso de la seroterapia declinó rápidamente debido a la introducción de las sulfonamidas y otras clases de quimioterapias antimicrobianas. Hacia 1940 la seroterapia fue prácticamente abandonada como método antibacteriano, aunque la terapia basada en anticuerpos aún se ha mantenido para el tratamiento contra venenos, toxinas y ciertas infecciones virales (Hawgood, 1999).

La toxicidad y la complejidad de la seroterapia fue tal que los beneficios que aportaba no fueron suficientes para justificar su uso continuado en el tratamiento de enfermedades para las cuales existía terapia antimicrobiana. Sin embargo, en la segunda mitad del siglo XX, la incapacidad para tratar ciertas enfermedades virales llevó a la preparación de formulaciones de anticuerpos derivados de donantes humanos inmunizados para la profilaxis y el tratamiento de la rabia, hepatitis A y B, virus varicella-zoster y la neumonía causada por el virus sincitial respiratorio (Buchwald y Pirofski, 2003).

En 1975, el descubrimiento del método de producción de anticuerpos monoclonales por células B inmortalizadas revolucionó la terapéutica con anticuerpos. Para este tiempo, fue posible por primera vez la producción *in vitro* de grandes cantidades de inmunoglobulinas de especificidad definida y de un solo isotipo. Esta innovación permitió la generación de anticuerpos homogéneos, en cantidades casi ilimitadas y eliminó la necesidad de donantes humanos o animales. Esta tecnología se utilizó rápidamente para el uso clínico y los anticuerpos monoclonales contra CD3 se introdujeron en la prevención de rechazo de órganos en los casos de trasplantes.

En contraste con el uso de la terapia con anticuerpos monoclonales para tratar enfermedades malignas, lo cual depende de la discriminación entre antígenos propios expresados por

células normales y células tumorales, la terapia pasiva con anticuerpos contra enfermedades infecciosas se basa en las grandes diferencias que existen entre los antígenos microbianos y el hospedero. Históricamente, los anticuerpos han sido efectivos cuando se dirigen hacia antígenos microbianos o sus productos, como por ejemplo, las toxinas. En algunas enfermedades microbianas, los anticuerpos constituyen un componente de la respuesta inmune humoral frente a infecciones naturales, mientras que la defensa contra otros tipos de microorganismos recae principalmente en los mecanismos de inmunidad mediada por células. Sin embargo, en la actualidad, hay un gran número de evidencias que indican que es posible generar anticuerpos protectores contra microorganismos como *M. tuberculosis* (Teitelbaum y cols., 1998; Pethe y cols., 2001), *Lysteria monocytogenes* (Edelson y cols., 1999), *Leishmania mexicana* (Anderson y May, 1983) e *Histoplasma capsulatum* (Nosanchuk y cols., 2003), para los cuales, la activación de la inmunidad humoral no había sido considerada importante para el desarrollo de la resistencia a la infección natural. Incluso, los microorganismos intracelulares pueden ser susceptibles a anticuerpos (Casadevall, 2003). En la era pre-antibiótica, la terapia con anticuerpos se desarrolló contra una amplia variedad de enfermedades infecciosas debido a que no había una opción alternativa. En la actualidad, aunque existen muchas drogas antimicrobianas disponibles, la re-emergencia de microorganismos resistentes a muchas de estas drogas y su inefectividad en individuos inmunocomprometidos ha limitado su uso (Casadevall, 2003). En la base de las evidencias acerca de la eficacia de los anticuerpos en la inducción o regulación de respuestas inmunes celulares, la terapia con anticuerpos con o sin inmunomoduladores constituye una esperanza en el tratamiento de enfermedades infecciosas en personas inmunocomprometidas (Casadevall, 2003).

### **2.10. Terapia basada en anticuerpos, ventajas y desventajas**

La terapia basada en anticuerpos que usa anticuerpos humanos o humanizados posee una baja toxicidad y alta especificidad. La alta especificidad de los anticuerpos constituye una ventaja y una desventaja. La ventaja de la alta especificidad es que esta terapia solo será efectiva contra el microorganismo causante de la enfermedad, no alterando la flora del hospedero. Sin embargo, la alta especificidad también significa que se requerirá más de un anticuerpo contra

microorganismos con una gran variabilidad antigénica. En teoría, una desventaja de la alta especificidad es la emergencia de variantes mutantes que mediante mecanismos de escape viral pierdan los determinantes que son reconocidos por los anticuerpos. El uso de cocteles de anticuerpos que son específicos para varios antígenos pudiera solucionar este problema, pero obviamente esto incrementaría los costos de producción y la complejidad de los elementos regulatorios (Holle y cols., 2008).

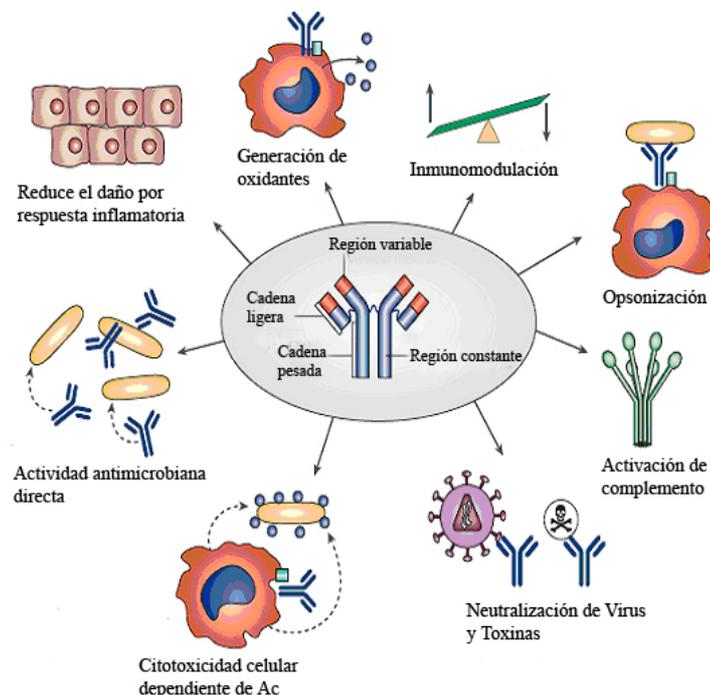
La alta especificidad de las moléculas de anticuerpos está complementada por su versatilidad, lo cual radica en que un anticuerpo capaz de unirse a un solo determinante antigénico pueda mediar varios efectos biológicos diferentes. Como productos naturales del sistema inmune, los anticuerpos pueden interactuar con otros componentes inmunitarios. Algunos mecanismos de acción de los anticuerpos, como la neutralización de toxinas y virus y la activación del complemento, y funciones directas antimicrobianas, como la generación de oxidantes, son independientes de otros componentes del sistema inmune del hospedero. Por el contrario, la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos y la opsonización, son dependientes de mediadores celulares del hospedero. El reconocimiento de que los anticuerpos pueden ser inmunomoduladores, cambiando las respuestas inmunes innata, adquirida, celular y humoral ha revelado nuevos conocimientos acerca de cómo y por qué los anticuerpos son efectivos contra microorganismos contra los cuales no ejercen un efecto biológico directo (Casadevall y Pirofski, 2003). De hecho, existen evidencias de que las células B y los anticuerpos pueden proteger contra enfermedades infecciosas reduciendo el daño resultante de la respuesta inflamatoria. Esto pudiera explicar parcialmente la eficacia de la inmunoglobulina intravenosa, la cual es usada para tratar ciertas condiciones inflamatorias. Evidencias de que el receptor a fracción constante (Fc) específico de inmunoglobulina G puede inhibir la respuesta inflamatoria indican que la terapia con anticuerpos pudiera ser efectiva contra ciertas enfermedades infecciosas al reducir el daño que resulta de la respuesta inflamatoria del hospedero (Maglione y cols., 2008).

Además, el uso de anticuerpos como agentes terapéuticos tiene la ventaja de que los constituyen varios isotipos, los cuales pueden actuar terapéuticamente en su forma intacta, o como fragmentos. En la molécula intacta, la región variable Fab enlaza al antígeno, mientras que la región constante, Fc, determina las propiedades biológicas de la inmunoglobulina,

tales como el tiempo de vida media en suero, la interacción con receptores celulares Fc y la capacidad para activar el complemento (Monari y cols., 1999).

Una potencial ventaja importante de la terapia con anticuerpos lo constituye el hecho de que su efecto puede ser sinérgico o aditivo cuando se combina con quimioterapia antimicrobiana convencional contra enfermedades virales y bacterianas, además de contra infecciones causadas por hongos (Ravindran y cols., 2004).

Además de sus ventajas como agentes terapéuticos, los anticuerpos han tenido un papel central en el desarrollo de vacunas, por todas las funciones asociadas a la respuesta inmune, tal y como se muestra en la Figura 1. La terapia con anticuerpos puede resultar protectora contra enfermedades infecciosas, lo cual sugiere que una vacuna que induzca anticuerpos similares pudiera ser protectora contra ese patógeno en cuestión. Por ejemplo, la exitosa terapia pasiva con anticuerpos contra neumonía neumocócica y difteria condujo al desarrollo de vacunas contra estos patógenos. Por otra parte, la generación de anticuerpos monoclonales protectores contra *Cryptococcus neoformans* (Cleare y cols., 1999) y *Candida albicans* (Poggi y cols., 2009) identificó antígenos polisacáridicos que fueron usados en el diseño de vacunas conjugadas efectivas.



**Figura 1:** Funciones ejercidas por los anticuerpos frente a agentes patógenos

La disponibilidad de nuevas tecnologías para estudiar la inmunidad mediada por anticuerpos (IMA) y la necesidad de terapias que actúen rápido y específicamente para las enfermedades nuevas y re-emergentes, como la TB, han impulsado el descubrimiento de nuevas funciones de los anticuerpos que han ampliado el punto de vista clásico de la IMA. Dentro de estas funciones podemos citar el papel de los anticuerpos como moléculas antimicrobicas directas (Pirofski y Casadevall, 2006; Casadevall, 2006; Woof y Kerr, 2006), como moléculas efectoras únicas e interactivas (Winslow y Jacobson, 2000) y que la eficacia de la IMA es producto de la suma de las eficacias de los anticuerpos individuales en un hospedero particular (Nussbaum y cols., 1996; Yuan y cols., 1997; Teitelbaum y cols., 1998).

### **2.11. Papel de los anticuerpos contra la TB**

Durante los últimos años se han publicado múltiples trabajos que demuestran la contribución del tejido linfoide asociado a mucosas del sistema respiratorio, intestinal, genital y urinario en la resistencia a las infecciones (Lugton, 1999; Young y cols., 2002; Woof y Kerr, 2006; Serbina y cols., 2008). La respuesta inmune a este nivel es importante para la protección frente a patógenos cuya puerta de entrada está relacionada con estos sistemas. La IgA es la clase de anticuerpo predominante en las secreciones que bañan las superficies mucosales. 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 (Kus y cols., 1977; Imaz y cols., 2001; Julian y cols., 2002). Existen además evidencias experimentales de que el receptor de inmunoglobulina polimérico puede neutralizar patógenos y antígenos intracelularmente a su paso por las células epiteliales durante su transporte desde la zona basolateral a la apical (Phalipon y Corthesy, 2003; Delbridge y O'Riordan, 2007). Los posibles mecanismos por lo que esto sucede involucran la aglutinación de los microbios, inhibición de su motilidad, bloqueo de su anclaje a epitelios mucosales por su unión a adhesinas bacterianas, eliminación de los productos microbianos y activación de las células fagocíticas. De esta manera, se piensa que la IgA juegue un papel fundamental contra patógenos respiratorios virales, ya sea por mecanismos de exclusión inmune o neutralización de la actividad viral (Reljic y Ivanyi, 2006).

En el caso específico de micobacterias, los niveles de anticuerpos del tipo IgA están asociados con la protección contra la lepra (Cree y cols., 1990). Por otra parte, la vacunación con BCG induce una respuesta sustancial de IgA, y ha sido reportado que los ratones deficientes en IgA son menos capaces de controlar la infección con BCG (Rodríguez y cols., 2005).

Existen algunas diferencias funcionales entre los AcMs inoculados pasivamente y aquellos inducidos por la infección natural o por la vacunación con BCG, que hacen considerar la terapia con estos anticuerpos como una alternativa adecuada (Reljic y cols., 2006b).

**Aspecto cuantitativo:** Por la aplicación directa del anticuerpo monoclonal purificado y concentrado se pueden alcanzar mayores concentraciones de anticuerpos efectivos en los lavados broncoalveolares, comparados con los producidos naturalmente.

**Especificidad antigénica:** A diferencia de la respuesta policlonal inducida por la bacteria viva, los anticuerpos monoclonales son específicos para un solo antígeno y con esto se elimina la posible interferencia de antígenos no-protectores.

**Tiempo de acción de IgA:** La disponibilidad instantánea de un anticuerpo monoclonal IgA efectivo en el momento de la invasión patogénica puede tener un mayor impacto, particularmente si el número de bacilos es pequeño, lo que hace adecuada la administración pasiva de IgA en individuos con un alto riesgo de contraer la infección.

**Activación de funciones fagocíticas:** A diferencia de la IgA secretoria, la administración pasiva de AcM del tipo IgA, que usualmente está compuesto por la forma monomérica y polimérica, puede directamente enlazarse al receptor Fc $\alpha$  de fagocitos e inducir más eficientemente las funciones bactericidas en esas células (Reljic y cols., 2006a).

Algunos trabajos de laboratorios del mundo se enfocan en el papel de los anticuerpos contra la infecciones micobacterianas. Estudios realizados con anticuerpos monoclonales contra LAM (Teitelbaum y cols., 1998; Glatman-Freedman y cols., 2000; Briken y cols., 2004), AM (Hamasur y cols., 2004), HBHA (Pethe y cols., 2001), MPB83 (Chambers y cols., 2004) han demostrado los efectos beneficiosos del uso de estos anticuerpos frente al reto con cepas virulentas, consistentes, de manera general, en una prolongación de la sobrevivencia, prevención de pérdida de peso, reducción en el número de UFC, cambios histopatológicos, eliminación del antígeno y reducción en la diseminación micobacteriana.

## **2.12. La vía mucosal para la vacunación contra TB**

La búsqueda de nuevos candidatos vacunales contra la TB no está solo dirigida a desarrollar vacunas para proteger individuos no inmunizados, sino también para proteger una gran proporción (80%) de la población mundial que ha sido vacunada en la infancia con BCG y necesita una re-estimulación para evitar contraer la TB pulmonar (Brooks y cols., 2001; Dye, 2004). Hasta hoy, se han desarrollado cerca de 200 candidatos vacunales por diferentes grupos de investigación (Fruth y Young, 2004; McShane, 2009; Barker y cols., 2009). Se incluyen entre estos candidatos vacunas vivas atenuadas, vacunas vivas recombinantes basadas en virus y bacterias (incluyendo BCG como vector), vacunas de subunidades (proteínas de fusión y vacunas conjugadas carbohidratos-proteínas), vacunas de ácidos desoxirribonucleicos (ADN), combinadas con nuevos adyuvantes y sistemas de liberación (revisado por Ly y McMurray, 2008).

Dentro de este escenario actual cobra especial importancia el desarrollo de vacunas para su administración por vía mucosal. Existen muchas ventajas logísticas e inmunológicas en este tipo de vacunación. En primer lugar, pueden ser administradas sin necesidad de agujas o jeringuillas, lo cual las hace más asequibles, seguras para campañas masivas de vacunación. Sin embargo, hasta la fecha, solo pocas vacunas han sido aprobadas para su administración mucosal en humanos: vacuna oral viva atenuada anti-polio, vacunas orales contra el cólera, vacuna nasal contra influenza y vacuna viva atenuada oral contra la fiebre tifoidea (Poland y Barrett, 2009). La principal ventaja de la ruta de inmunización mucosal es la inducción de IgA secretoria, anticuerpo que juega un importante papel en los mecanismos de exclusión inmune de patógenos en el sitio de entrada antes de que la invasión pueda tener lugar (Wu y cols., 2009).

En la TB, debido a que la puerta de entrada del patógeno es el tracto respiratorio superior, seguido por la colonización y establecimiento de la infección primaria en los pulmones, la vacuna debe, además de inducir una respuesta sistémica, también inducir una respuesta inmune mucosal en las vías respiratorias altas y bajas (Tjarnlund y cols., 2006). En este sentido, algunos candidatos vacunales están siendo evaluados como vacunas mucosales contra TB (Doherty y cols., 2002; Goonetilleke y cols., 2003; Vipond y cols., 2006).

### 2.13. Modelo animal en ratón

El desarrollo y evaluación de candidatos vacunales contra patógenos bacterianos requiere necesariamente de un modelo animal adecuado para evaluar la eficacia de estos candidatos. En el caso específico de la TB, existen varios modelos disponibles, entre los que se cuentan los desarrollados en el ratón, el curiel, el carnero y los primates. De todos ellos, el modelo en ratón constituye el más económico y fácilmente manipulable (Orme, 2005b; Gupta y Katoch, 2009). Sin embargo, no se ha logrado hasta hoy en día para la TB, un modelo animal que se correlacione con el desarrollo de esta enfermedad a tal punto que por sí solo permita aceptar o rechazar un candidato vacunal, ya sea profiláctico o terapéutico (Brennan, 2005).

Otro aspecto importante a considerar a la hora de implementar un modelo animal es simular la ruta natural de infección, de manera que la enfermedad, la patología y la respuesta inmune asociados a ella sea lo más cercano a lo que en realidad ocurre. En este sentido, en los modelos murinos se han implementado varias rutas de inoculación: nasal por aerosol, IT, IN, intravenosa e IP, listadas aquí en orden de mayor a menor similitud fisiológica con la enfermedad (Orme, 2005a). De todas estas vías, la vía nasal por aerosol es la más fisiológica, pero requiere un equipamiento especializado, caro y una rigurosa validación (Bhaskar y Upadhyay, 2003; Williams y cols., 2005). La vía IT y la IN se acercan también a las condiciones fisiológicas pues el inóculo es depositado directamente en el tracto respiratorio superior, con la diferencia técnica de que para la vía intra-traqueal se requiere aplicar anestesia prolongada al animal (Rook y Hernández-Pando, 1996; Hernández-Pando y cols., 1997; Rook y Hernández-Pando, 1997). No obstante esta diferencia, el modelo de infección IT tiene la gran ventaja de que el inóculo llega en casi un 100% a los pulmones, mientras que en el modelo de infección IN se desvía una fracción importante hacia el tracto digestivo (Logan y cols., 2008).

Es conocida la importancia de correlacionar, en el caso de *M. tuberculosis*, varios marcadores de protección aparte de la reducción significativa del número de UFC. La reducción de la carga bacteriana en pulmón (determinada por el conteo de UFC recobradas en el órgano luego de la infección con la cepa virulenta) no es por sí solo un correlato de protección. 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, tal como ocurre en los individuos inmunocomprometidos, resulta por último en la muerte por asfixia debido a insuficiencia de oxígeno. Esta anoxia es causada por obliteración de las células del parénquima pulmonar involucradas en la toma de oxígeno así como por la obstrucción de los espacios interbronquiales debido al crecimiento de los granulomas y por la sangre liberada durante la ruptura de los granulomas licuados en el tejido pulmonar adyacente. 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 (Skold y Behar, 2008; Myers y Tazelaar, 2008; Almeida y cols., 2009).

En este sentido resulta de vital importancia el estudio histopatológico de tejidos, fundamentalmente pulmón. En general, las lesiones inflamatorias en animales y personas son similares. Las principales diferencias radican en la velocidad de progresión de la enfermedad y el tipo de lesión. Las lesiones tuberculosas en todas las especies son una típica mezcla de macrófagos, linfocitos, células plasmáticas y granulocitos que se agrupan alrededor de los elementos celulares que constituyen el parénquima pulmonar (Junqueira-Kipnis y cols., 2006). Sin embargo, conocidos factores de riesgo como edad, hábito de fumar, exposición a tóxicos o contaminación, estado nutricional, infecciones concomitantes, o enfermedades crónicas como la diabetes, que afectan la progresión, patología de la enfermedad, incluso el nivel de respuesta, deberían también ser tenidas en cuenta a la hora de establecer modelos animales (Martins y Aguas, 1999; Chen y cols., 2002; Sugawara y cols., 2004; Young, 2009). Se ha demostrado que humanos y ratones son similares en varias de las características fundamentales de la respuesta inmune innata y adaptativa, incluyendo el papel protector de las células T CD4+, interferón ganma (IFN- $\gamma$ ) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) (Caruso y cols., 1999; Emoto y cols., 1999; Lyadova y cols., 2004; Turner y Orme, 2004; Dudani y cols., 2008). Por otra parte, existe una gran disponibilidad de recursos genéticos, que incluyen cientos de cepas de ratones consanguíneas, recombinantes, mutantes y genéticamente modificadas, así como una gran abundancia de reactivos inmunológicos y metodologías que permiten un profundo análisis de la patología de la TB en ratón. Además,

los experimentos con ratones son menos caros en comparación con otras especies, debido a que la menor variación genética individual reduce el número de animales en los grupos experimentales, y por consiguiente, los costos (Baldwin y cols., 1998; Mustafa y cols., 1999; Mitchison y Chang, 2009).

No obstante, este modelo es adecuado solo para la comparación histopatológica de los cambios acontecidos en las primeras semanas de la infección, pues en las lesiones en la mayoría de las cepas de ratones, a diferencia de las personas, no existen zonas de necrosis central en los granulomas (Shkurupii y cols., 1998; Saunders y Cooper, 2000; Egen y cols., 2008). La localización de los macrófagos y células T en los focos tuberculosos en ratones y humanos no es idéntica (McMurray, 2003) y las zonas granulomatosas permanecen como zonas aerobias en los pulmones de los ratones, sin existir zonas substanciales de hipoxia, en contraste con humanos (Shi y cols., 2008). En el caso del ratón, las lesiones son predominantemente del tipo lesiones sólidas, sobre todo en las dos cepas de ratones más ampliamente usadas: C57BL/6, una de las cepas más resistentes genéticamente a la infección respiratoria con *M. tuberculosis*, y Balb/c, relativamente resistente (Medina y North, 1998). Si se desea evaluar fases avanzadas de la enfermedad, como por ejemplo el estudio de lesiones cavitarias, esto solo es posible en algunos modelos animales en primates y en ratones, pero utilizando para esto cepas de micobacterias altamente virulentas (Converse y cols., 2008; Manabe y cols., 2008; Converse y cols., 2009). Actualmente existen cepas de ratones en las que varía la velocidad de crecimiento bacteriano, severidad de la inflamación en el pulmón y daño tisular, como por ejemplo, la cepa C3HeB/FeJ (Kramnik y cols., 2000; Pan y cols., 2005; Yan y cols., 2007).

#### **2.14. Inmunización con Bibliotecas de Expresión**

Por muchas décadas, la estrategia de evaluar un solo antígeno a la vez para identificar candidatos vacunales produjo vacunas efectivas. Sin embargo, en el escenario actual, se necesita combatir con urgencia numerosos agentes emergentes y re-emergentes, por lo que se requiere de técnicas de alta capacidad de búsqueda o pesquizado de candidatos vacunales. La disponibilidad de nuevas tecnologías ha hecho posible este pesquizado masivo.

La inmunización con genotecas de expresión (ELI, del inglés Expression Library Immunization) es un protocolo relativamente novedoso para la evaluación completa de cualquier genoma dado, ya sea que este esté secuenciado o no, para identificar potenciales candidatos vacunales (Piedrafita y cols., 1999). En principio, ELI puede reducir el conjunto de proteocualquier genoma patógeno a solo uno o varios antígenos responsables de actividad protectora. El concepto esencial en esta estrategia es emplear el sistema inmune del hospedero para seleccionar los mejores candidatos vacunales contra una enfermedad. En esta estrategia, el genoma completo fraccionado es clonado en un vector de inmunización genética bajo el control de un promotor eucariótico para crear una biblioteca de genes. Los ADN plasmídicos purificados a partir de estas bibliotecas son inoculados a animales, con el fin de inducir una respuesta inmune contra los antígenos expresados a partir de los genes clonados. Los animales inmunizados son retados posteriormente con el organismo patógeno, con el objetivo de descubrir cuales clones inducen actividad protectora (Talaat y Stemke-Hale, 2005).

Una de las principales ventajas de estas vacunas de ADN es la facilidad con que ellas pueden ser generadas, modificadas y purificadas. La generación dura varios meses, cuando la producción de un patógeno atenuado puede llevar años. Además, son baratas, lo que constituye un incentivo para su uso en países en desarrollo. Son extremadamente estables. Sólo existe una evidencia de integración de ADN dentro del genoma de la célula hospedero (Nichols y cols., 1995). Las reacciones autoinmunes como la estimulación persistente de anticuerpos contra el ADN no se han reportado, excepto en un estudio (Mor y Cohen, 1995), sin embargo los títulos no fueron altos.

La inyección de ADN que codifica para antígenos inmunodominantes estimula al sistema inmune del hospedero mediante cuatro mecanismos básicos:

- Presentación directa por las células somáticas transfectadas (Klinman y cols., 1998).
- Transfección directa de células presentadoras de antígeno (APC) profesionales (Iwasaki y cols., 1997).
- Liberación del polipéptido codificado por el plasmidio y estimulación del sistema humoral (Drew y cols., 1999).

- Fenómeno de estimulación cruzada, donde el ADN transfecta células somáticas o APC profesionales y la proteína o los péptidos son tomados por otras APC profesionales y son presentados a las células T CD8+ (Cho y cols., 2001) mediante un mecanismo conocido como presentación cruzada, constituyendo las células somáticas un reservorio para el antígeno (Shen y Rock, 2006).

El ADN inyectado en el músculo se introduce preferencialmente en los miocitos (Dupuis y cols., 2000). Estas células exponen en su superficie moléculas del MHC I (Ulmer y cols., 1996). El ADN inyectado es también internalizado por células presentadoras profesionales que se encuentran en el sitio de inoculación y que expresan y presentan los péptidos a células T CD8+ cuando son transportadas a los ganglios linfáticos o al bazo (Iwasaki y cols., 1997). Las células T CD4+ pueden ser también activadas por las CPA mediante la presentación en el contexto del MHC II de aquellos antígenos que se encuentran en el medio extracelular y son capturados por estas CPA. Estas moléculas localizadas extracelularmente son producidas por las células transfectadas por la vacuna de ADN, que liberan el antígeno proteico al romperse debido al estrés, el recambio celular o algún trauma sufrido. Este antígeno liberado es también reconocido por los receptores de las células B. Por tanto, con la inmunización genética ocurre activación tanto de la respuesta humoral, como celular, por lo que constituye una vía de inoculación que estimula el sistema inmune de diferentes maneras (Molling, 1997).

Las CD son las principales CPA profesionales que inician la respuesta inmune después de la inmunización con ADN. Se demostró que las CD extraídas de ratones inmunizados con ADN son capaces de presentar antígenos a las células T *in vitro*. En este estudio se estimó adicionalmente que solo una pequeña proporción (0,4%) de las CD son transfectadas con el ADN plasmídico (Casares y cols., 1997). El reclutamiento de las CD al sitio de la inoculación mediante la coadministración de citoquinas y quimioquinas específicas durante la inmunización con ADN, resulta en la expansión y activación de las CD con el consiguiente aumento de la respuesta inmune (Sumida y cols., 2004). Se ha demostrado que las CD son una de las principales APC que participan en la estimulación cruzada tomando antígenos secretados por células somáticas y presentándolos en el MHC I (Kutzler y Weiner, 2004).

Dada la relativa poca cantidad de proteína sintetizada después de la inmunización genética, en el orden de picogramos o nanogramos, la explicación más convincente de la eficiente estimulación del sistema inmune por estas vacunas, se basa en los tipos de APC transfectadas y en las propiedades adyuvantes que posee el ADN por sí mismo (Gurunathan y cols., 2000). Un aspecto clave en las vacunas de ADN es que el vector empleado de origen bacteriano contiene elementos intrínsecos con carácter inmunoestimulador, constituidos por el dinucleótido Citocina-Guanina no metilado (CpG). La inserción de múltiples copias de secuencias CpG en los vectores de inmunización aumenta los títulos de anticuerpos, la linfoproliferación específica y la secreción de IFN- $\gamma$  (Zhang y cols., 2005). El motivo CpG no metilado modula la proliferación de células B y la producción de anticuerpos (Krieg y cols., 1995), induce la secreción de citoquinas por las CPA (Jakob y cols., 1998) activándose indirectamente las células asesinas naturales y los linfocitos T (Bendigs y cols., 1999).

Según el patrón de citoquinas inducido por las secuencias CpG no metiladas, la respuesta inmune inducida después de la inmunización con ADN es preferiblemente de células Th1 (Liu y cols., 2005). Por tanto, las vacunas de ADN pueden ser de gran aplicabilidad contra aquellos patógenos como los causantes de la malaria o la TB. Mediante una vacuna de ADN se ha comprobado para algunos modelos animales y algunos inmunógenos, la inducción de anticuerpos efectores involucrados en una respuesta inmune protectora (Massaer y cols., 1999; Konishi y cols., 2000; Polack y cols., 2000; Hermanson y cols., 2004).

La inmunización genética es capaz de inducir respuesta inmune humoral y celular en estudios realizados en diferentes modelos animales, incluyendo primates. Por demás, este tipo de respuesta puede ser manipulada hacia un patrón del tipo Th1, Th2, o combinada si se requiere.

Se han realizado numerosos estudios con vacunas de ADN que codifican para antígenos de *M. tuberculosis*, como por ejemplo el antígeno 85B y la proteína de estrés térmico de 60 kDa (Hsp60), en los que se han obtenido resultados prometedores en estudios de reto con el microorganismo (Lu y cols., 1996; Huygen y cols., 1996; Fan y cols., 2003; Bahloul y cols., 2003). También se ha experimentado con los genes que codifican para otras proteínas, como la de estrés térmico Hsp65 y la proteína rica en prolina de 36 kDa, obteniéndose una protección equivalente a la obtenida con la vacuna de BCG (Tascon y cols., 2000a). Otros

trabajos realizados han sido la construcción de vacunas que codifican dos antígenos a la vez, como por ejemplo el antígeno 85 con el MPT64 (Tian y cols., 2004; Luo y cols., 2004). Además, los cocteles de vacunas de ADN han resultado una herramienta eficaz por su gran efectividad en la inducción de una respuesta inmune protectora (Derrick y cols., 2004). También se ha experimentado con rutas alternativas de liberación como los liposomas (Bivas-Benita y cols., 2004). Uno de los últimos acercamientos a este tema ha sido el uso de cepas atenuadas que transportan plasmidios recombinantes en su interior (Hess y cols., 2000; Miki y cols., 2004; Bejon y cols., 2006).

Para aplicar la estrategia de ELI debe existir primeramente un modelo animal para la enfermedad en cuestión y este modelo animal debe permitir experimentos a gran escala. En la mayoría de los casos se ha usado como modelo el ratón, aunque se ha sugerido que debería utilizarse un modelo más cercano al hospedero natural (Liu y cols., 1997). Además del modelo animal, otros dos aspectos muy importantes que se deben tener en cuenta a la hora de aplicar la ELI son: el vector a emplear y el modo de construir la biblioteca genómica (Barry y cols., 2004).

A pesar de los aportes que ha proporcionado la tecnología de ELI a la vacunología, muchos elementos quedan aún por optimizar, como por ejemplo aumentar el número de clones efectivos dentro de las bibliotecas, disminuir el número de rondas de inmunización para llegar a sub-bibliotecas más pequeñas, evitar la segregación de clones que actúen sinérgicamente y aumentar la respuesta inmune, sobre todo, de tipo humoral (Talaat y Stemke-Hale, 2005).

### **III. MATERIALES Y METODOS**

#### **3.1. Cepas bacterianas**

Se utilizó la cepa vacunal liofilizada de *M. bovis* BCG Tokió (Laboratorio BCG, Tokio, Japón) en los experimentos de infección intranasal después de la inoculación del Intacglobin.

Para la evaluación del carácter protector de los AcMs TBA84 y TBA61 se utilizó la cepa de *M. tuberculosis* H37Rv, cepa de referencia criopreservada en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, México, DF.

La biblioteca genómica anotada de *M. tuberculosis* se construyó a partir de la cepa 14323 (cepa de referencia) criopreservada en el Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri”, La Habana, Cuba.

Para los experimentos de evaluación del carácter protector de la biblioteca frente al reto IT se utilizó un liofilizado de bacilo atenuado de *M. bovis* (BCG), cepa búlgara producida por el laboratorio BB-NCIPD LTd-Bulgaria y suministrada por el Programa Nacional de Inmunización, Ministerio de Salud Pública, Cuba.

En la construcción de la biblioteca genómica también se utilizó la cepa de *E. coli* TOP10 [F<sup>+</sup> *mcrA*  $\Delta$ (*mrr-hdsRMS-mcrBC*)  $\phi$ 80*lacZ* $\Delta$ M15  $\Delta$ *lacX74deoR recA1 araD139  $\Delta$  (*ara-leu*)7697 *galU galK rpsL endA1 nupG*] (Invitrogene, Burlington, Ontario, Canadá).*

#### **3.2. Animales**

En los experimentos relacionados con la evaluación del carácter protector del Intacglobin y de la biblioteca genómica, se utilizaron ratones de la línea isogénica Balb/c, machos, de 6-8 semanas de edad, suministrados por el Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB).

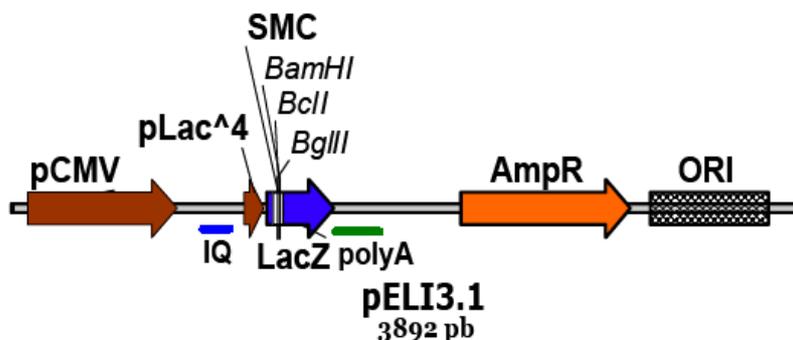
Para evaluar el carácter protector de los AcMs administrados por vía IT se utilizaron ratones Balb/c libres de patógenos suministrados por el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición, México. Estos ratones se mantuvieron bajo condiciones de contención en laboratorios de nivel de riesgo III.

Todos los experimentos con animales se llevaron a cabo según las reglas institucionales para el cuidado y uso de animales de laboratorio. Las normas de bioética para el uso y manipulación de los animales se respetaron durante el transcurso de todos los diseños

experimentales. Los animales se manipularon por técnicos entrenados y se mantuvieron en condiciones adecuadas de distribución y alimentación, con condiciones estándar de temperatura, humedad e iluminación durante el curso de los experimentos.

### 3.3. Vector plasmídico

El plasmidio pELI3.1 se construyó en colaboración con el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB) (Yero y cols., 2005). Se insertó en el vector de expresión eucariótico pCIneo (Promega, Madison WI), un cassette de expresión procariótico que regula la expresión de la subunidad alfa de la  $\beta$ -galactosidasa (LacZ'). Este diseño también incluyó la eliminación del cassette de resistencia a Neomicina y la región F1 de replicación del plasmidio pCIneo. El plasmidio pELI3.1 contiene además el promotor temprano de citomegalovirus humano, un intrón quimérico  $\beta$ -globin/IgG y la señal tardía de poliadenilación del virus SV40. El vector contiene el gen *lacZ'* bajo el control de una variante mutada del promotor *lac* para la selección de colonias blancas y azules durante la construcción de la biblioteca genómica. El vector pELI3.1 porta además un gen de resistencia a ampicilina (Figura 2).



**Figura 2:** Mapa del plasmidio pELI3.1 (Yero y cols., 2005). LacZ: subunidad alfa de la Beta-galactosidasa. pCMV: promotor inmediato/temprano de citomegalovirus humano. IQ: Intrón quimérico. pLac<sup>4</sup>: promotor del operón Lactosa mutado. polyA: señal de poliadenilación del virus SV40. SMC: sitio múltiple de clonación. ORI: origen de replicación para *E. coli* derivado de los vectores pUC. AmpR: gen que confiere resistencia a ampicilina. Se señalan los sitios de reconocimiento por aquellas endonucleasas de restricción utilizadas en la construcción de la biblioteca genómica.

### 3.4. Enzimas y reactivos

Las enzimas de restricción (Sau 3AI, BamHI, BclI, BglII, NheI) usadas fueron suministradas por Promega, EUA. Se utilizaron además las enzimas T4 ADN ligasa y ARNasa (Promega, EUA). Todas las enzimas se usaron según las condiciones recomendadas por el fabricante.

Se utilizaron los antibióticos Ampicilina y Tetraciclina (Sigma, EUA).

Para la selección de los recombinantes por el método de colonias bacterianas blancas y azules se empleó 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido (X-gal) (Promega, EUA) y el inductor isopropiltiol-  $\beta$ -D-galacto-piranosido (IPTG) (Sigma, EUA). Se utilizaron además orto-phenilendiamina (OPD) y Diamino bencidina (DAB) (Sigma, EUA) en los experimentos inmunoenzimáticos.

### 3.5. Medios de Cultivo y condiciones de crecimiento

La cepa liofilizada de *M. bovis* BCG Tokio presentada como un bulbo de 0,5 mg de peso húmedo de BCG y equivalente a  $1,5-6,0 \times 10^5$  UFC viables, se diluyó en solución Sauton (Sulfato de Magnesio: 125  $\mu$ g, Fosfato dibásico de Potasio: 125  $\mu$ g, Acido Cítrico monohidratado: 0,5 mg, L-aspargina monohidratada: 1mg, Citrato férrico-amónico: 12,5  $\mu$ g, Glicerol al 85%: 18,4 mg y agua para inyección, 1 mL).

Para el cultivo de BCG se utilizó el medio Ogawa (Griffith, 1998). Para 300 mL de medio se esterilizaron 100 mL de solución básica (Glutamato de sodio: 1% (m/v), Dihidrogenofosfato de potasio: 1% (m/v), Glicerol: 6 % (v/v) en agua destilada y se le añadieron en condiciones asépticas 200 mL de un homogenizado de huevos de gallina, suministrados por el CENPALAB y 3 mL de verde de malaquita al 2% en alcohol al 70%. Se agitó durante 10 minutos en agitador magnético, se filtró por gasa estéril y se dejó reposar durante 30 minutos (min). El medio se distribuyó en tubos de cristal de 16 x 100 (5 mL x tubo) y estos se colocaron en posición inclinada en un horno a una temperatura de 80-85°C durante 1 hora (h) para su coagulación.

La cepa de *M. tuberculosis* H37Rv se cultivó hasta la fase temprana de crecimiento exponencial en el medio Middelbrook 7H9 (Difco, EUA.) enriquecido con Albúmina-Dextrosa-Catalasa (BBL, Cockeysville, Md.) y Tween 80 al 0,05% (Sigma, EUA). Los cultivos se incubaron a 37°C en presencia de 5% de CO<sub>2</sub> y agitación continua. Los

microorganismos se cosecharon por centrifugación a 5000 x g, se lavaron tres veces en tampón fosfato salino (cloruro de sodio 140 mM, cloruro de potasio 2,7 mM, dihidrogenofosfato de sodio 1,8 mM, pH 7,4) y se almacenaron a -70°C hasta su uso en esta solución. Para los experimentos de reto, se descongeló un ampulla criopreservada, se incubó a 37°C y se ajustó su concentración en PBS hasta una concentración final de 10<sup>6</sup> UFC/mL. Se determinó la viabilidad de la bacteria mediante microscopía óptica (colorante diacetato fluorescente, 5 µg/mL) en cámara de Newbauer.

El medio Lowenstein Jensen se utilizó para el cultivo de la cepa 14323 de *M. tuberculosis*. Este medio está constituido por Dihidrogenofosfato de Potasio al 0,4%; Sulfato de Magnesio heptahidratado al 0,04%; Citrato de Magnesio al 0,1%; Asparagina al 0,6%; Glicerol en 600 al 2%. Esta solución se esterilizó (30 min, 121° C, 1 atm). Posteriormente, se adicionó una solución preparada asépticamente de verde de malaquita al 2% en agua. Por último, se adicionaron 1000 mL de un homogenizado de huevos frescos previamente lavados con solución de etanol al 70%. La mezcla total se dispensó en tubos estériles y se mantuvo en posición inclinada durante 45 min a 80-85 °C para su coagulación.

El medio Luria Bertani (LB) se utilizó para el cultivo de la cepa de *E. coli* TOP10, preparado con Triptona al 1% (Oxoid, Inglaterra), Extracto de levadura al 0,5% (Oxoid, Inglaterra) y Cloruro de Sodio al 1% (Oxoid, Inglaterra) por L de agua. Se preparó medio sólido adicionando a estos componentes agar bacteriológico al 1,5 %.

El medio 2xYT (1,6% de Triptona, 1% de Extracto de levadura y 0,5% de Cloruro de Sodio en agua) se utilizó para la amplificación de las subgenotecas. Las bacterias transformadas con la genoteca se crecieron en este medio a 37°C durante 14 h en agitación constante.

### **3.6. Anticuerpos policlonales, monoclonales y sueros controles**

#### **3.6.1. INTACGLOBIN®**

El preparado comercial de ganmaglobulina humana INTACGLOBIN® se obtuvo en el Centro de Hemoderivados, La Habana, Cuba. Este producto está constituido por Inmunoglobulinas Humanas del tipo IgG al 5% y Dextrosa anhidra al 5%, pH 7,4 en cantidad suficiente de agua calidad inyectable (Cádiz y cols., 1999).

### 3.6.2. Anticuerpos Monoclonales

Los AcMs contra las proteínas de 38 y 16 kDa de *M. tuberculosis* se obtuvieron según Falero-Díaz y cols. (2000). Los antígenos usados para la obtención de estos AcMs fueron variantes recombinantes purificadas de la proteína  $\alpha$ -cristalina de 16 kDa (antígeno Acr) y la lipoglicoproteína de 38 Kda (antígeno PstS-1) de *M. tuberculosis*. Los AcMs obtenidos pertenecieron al isotipo IgA. Se denotaron TBA61 (IgA anti-Acr) y TBA84 (IgA anti-PstS-1).

### 3.6.3. Sueros humanos control

Para el ensayo de reconocimiento de las proteínas codificadas por la biblioteca genómica expresada en *E. coli* se utilizaron mezclas de sueros de pacientes tuberculosos (dilución 1/50) donados por el Hospital Neumológico, Ciudad Habana, Cuba. Luego de una inactivación a 56°C, se conservaron a -70°C hasta su uso. Estos sueros fueron previamente adsorbidos con un lisado de proteínas de *E. coli*, con una concentración estimada por el método de Lowry de 2 mg/mL mediante incubación durante 16 h a 4°C con agitación suave. Se usaron como control negativo, sueros humanos provenientes de donantes sanos. Se consideró donante sano aquella persona que no ha padecido clínicamente la enfermedad. En todos los casos la extracción de la sangre a los donantes sanos y enfermos se llevó a cabo respetando todas las normas y principios éticos, por personal calificado del Hospital Neumológico.

### 3.7. Métodos generales de Biología Molecular

Las técnicas de uso común en los laboratorios de biología molecular, tales como análisis de restricción, reacciones de ligamiento, purificación de plasmidios, transformación genética y electroforesis en geles de agarosa se llevaron a cabo siguiendo los protocolos descritos por Sambrook y cols. (1989). Las electroforesis de ADN se realizaron en geles de agarosa al 0,8% (p/v) en tampón TBE (Tris-borato 90 mM, EDTA 2 mM, pH 8,0) a 5 V/cm. Las variaciones particulares introducidas en cada técnica se describen en las secciones correspondientes.

### **3.8. Construcción de una biblioteca genómica anotada de *M. tuberculosis***

#### **3.8.1. Obtención y purificación del ADN genómico**

Se obtuvo el ADN genómico a partir de la cepa de referencia 14323 de *M. tuberculosis*, en el Departamento de Micobacterias del Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí (IPK). La cepa se inoculó en medio Lowenstein Jensen a 37°C durante 21 días. Luego de la cosecha celular se transfirieron 0,1 g de masa microbiana a un tubo limpio con tampón TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,6) y se calentó a 80°C durante 1 h. Posteriormente, se le añadieron 100 µL de lisozima (10 mg/mL) (Sigma, EUA) y se incubó durante 1 h a 37°C, luego de lo cual se le adicionó 70 µL de SDS al 10% y 10 µL de proteinasa K (10 mg/mL) incubando a una temperatura de 65 °C durante 1 h. A la mezcla se le adicionaron 10 µL de solución de NaCl 5 M. Luego a esta suspensión se le adicionó igual volumen de mezcla cloroformo / alcohol isoamílico (1:1, v/v) y después de centrifugar a 5585 x g durante 5 min, se transfirió la fase acuosa a un tubo limpio. El ADN genómico se precipitó con 0,6 volúmenes de isopropanol y se lavó el precipitado con etanol al 70%. Posteriormente, se secó el sedimento, se resuspendió en tampón TE y se almacenó a 4°C hasta su uso.

#### **3.8.2. Optimización de la digestión del ADN genómico**

Se digirió 1 µg de ADN genómico con varias proporciones de la enzima *Sau3A* (Promega, EUA) a una concentración en la reacción de 1 U; 0,5 U; 0,25 U y 0,125 U por µg de ADN. La reacción se incubó durante 10 min a 37°C en baño termostatado (Pharmacia LKB Multitemp II). Se chequeó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,6% con bromuro de etidio (5 mg/mL) para la selección de la concentración enzimática con la que se obtuvieran fragmentos de ADN cuya talla oscilara entre 0,5-3 kb.

#### **3.8.3. Digestión preparativa del ADN genómico**

Se digirieron 10 µg del ADN genómico de *M. tuberculosis* con 2,5 U de la enzima *Sau3A* (Promega, EUA) y se incubó la reacción durante 10 min a 37°C en baño termostatado. Los fragmentos de ADN obtenidos se purificaron con un juego de reactivos de la firma Qiagen (QiaQuik PCR Purification Kit, EUA) siguiendo las instrucciones de los fabricantes.

### 3.8.4. Construcción de la biblioteca genómica

Para la construcción de la biblioteca genómica el vector pELI3.1 se digirió en tres reacciones separadas con las enzimas *Bam*HI, *Bcl*III y *Bg*III. Para la reacción de ligamiento se utilizaron 5 µg de ADN genómico fragmentado, 1 µg de vector digerido y 4 U de T4 ligasa, en un volumen final de 30 µL. Luego de una incubación a 14°C durante 16 h, la mezcla de reacción se sometió a 75°C por 10 min para la inactivación de la enzima. Con estas mezclas de ligamiento se transformaron por electroporación las células de *E. coli* TOP10. En cada cubeta de electroporación (*E. coli* Pulser Cuvette 0,2cm, Biorad, EUA) se mezclaron en frío 100 µL de células electrocompetentes con 10 µL de la mezcla de ligamiento y se sometieron a un pulso eléctrico de 2 500 V (Resistencia= 200 Ω, Capacitancia= 25 µF) en un electroporador (Gene Pulser II, Biorad). Se adicionaron inmediatamente a cada cubeta 900 µL de medio 2xYT y se esparcieron en placas de medio sólido LB suplementado con ampicillina (50 µg/µL), IPTG (0,5 mM) y X-gal (50 µg/µL). Se incubó durante 16 h a 37°C y al cabo de este tiempo se seleccionaron al azar aproximadamente 8000 colonias blancas. El número de clones que se tomaron para obtener una biblioteca genómica representativa del genoma de *M. tuberculosis* se basó en la fórmula propuesta por Seed y col. (1982).

$$N = \ln(1-P) / \ln[1-(I/G)]$$

Donde:

P es la probabilidad de que una secuencia de interés se encuentre representada.

I es la talla promedio de los fragmentos.

G es la talla del genoma de *M. tuberculosis* H37Rv, cepa de referencia secuenciada por Cole y col. (1998).

### 3.8.5. Mantenimiento y replicación de la biblioteca

De las placas de transformación se tomaron las colonias blancas con asas estériles y se pasaron a pocillos individuales en placas de cultivo de 96 pozos (Costar, EUA) que contenían cada uno 100 µL de medio 2xYT con Ampicillina (100 µg/µL). Se incubaron las placas en agitación durante 6 h a 37°C y posteriormente se adicionaron a cada pocillo 100 µL de medio 2xYT con glicerol 30% (v/v) para su conservación a -70°C (placas madres). Para hacer réplicas de cada placa madre, se tomaron 10 µL de cada pocillo y se pasaron a una nueva placa con medio 2xYT fresco con el antibiótico de selección. Esta placa se incubó en

agitación durante 6 h y se le añadió medio 2xYT con glicerol a cada pocillo como se describió anteriormente. El diagrama de obtención de la genoteca de expresión se muestra de forma resumida en la Figura 3.

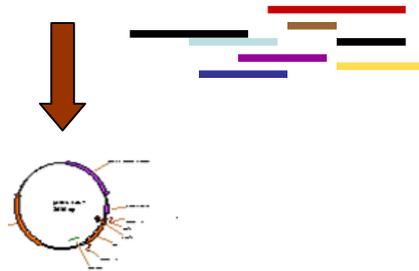
### **3.8.6. Preparación del ADN usado como inmunógeno**

Para la purificación de plasmidios a gran escala se usó el juego de reactivos EndoFree® Plasmid Mega Kit (Qiagen, EUA), según lo recomendado por el fabricante. Después de la precipitación con isopropanol, lavado con etanol y secado al vacío, el ADN se resuspendió en solución tampón TE y se cuantificó por espectrofotometría a 260 nm. A esta mezcla se le adicionó NaCl hasta una concentración final de 0,1 M y el doble de volumen de etanol absoluto. La precipitación se llevó a cabo a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 30 min y el precipitado se recuperó por centrifugación. El ADN se secó al vacío y se resuspendió en solución salina tamponada con fosfato (SSTF) estéril hasta alcanzar una concentración de 1 mg/mL. Durante todo este proceso se emplearon materiales y soluciones libres de pirógenos.

### **3.9. Inducción de la síntesis de proteínas heterólogas en *E. coli*.**

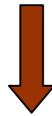
Se inoculó un erlenmeyer de 100 mL de medio LB suplementado con Ampicillina (100  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) con 100  $\mu\text{L}$  de la mezcla total de las subgenotecas (obtenida mezclando cantidades equivalentes a 4 mg/mL de cada subgenoteca) y otro erlenmeyer de 100 mL de medio LB suplementado con Ampicillina (100  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) con 100  $\mu\text{L}$  de un cultivo de la cepa Top10 transformada con el plasmidio pELI 3.1. Se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$  en agitación vigorosa hasta que se alcanzó una absorbancia a 560 nm de 0,8. En este momento se adicionó IPTG a ambos cultivos a una concentración final de 1 mM. Luego de tres horas en las mismas condiciones de incubación, se determinó nuevamente la  $\text{DO}_{560\text{nm}}$  y se tomó el volumen en mililitros correspondiente al factor  $2/\text{DO}$ . La suspensión celular se centrifugó a  $5585 \times g$  durante 10 min. El sobrenadante se eliminó y el precipitado celular se congeló hasta su uso.

ADN genómico digerido de *M. tuberculosis*

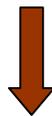


Clonaje en los tres marcos de lectura:

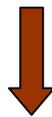
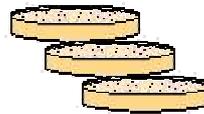
pELI3.1 / *Bam*HI, pELI3.1/ *Bcl*II, pELI3.1/*Bgl*III



Transformación en *E.coli* Top10 electrocompetentes



Siembra en medio LB selectivo,  
IPTG y X-GAL



Transferir colonias blancas individualmente a placas de 96 pocillos, glicerol, -70° C



Cuatro Subgenotecas, ~2000 clones cada una.

**Figura 3:** Diagrama que representa los pasos seguidos en la construcción de la biblioteca genómica anotada.

### 3.10. Electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturizante (SDS-PAGE)

El precipitado celular obtenido luego de la inducción de la síntesis de proteínas descrito en el acápite anterior (3.9) se resuspendió con 40  $\mu$ L de tampón de electroforesis desnaturizante en geles de poliacrilamida que contenía 2-mercaptoetanol. Las muestras se calentaron en

agua hirviendo durante cinco minutos y se aplicaron 10  $\mu\text{L}$  a un gel de acrilamida en un sistema discontinuo (12,5% de acrilamida). La corrida electroforética se realizó a una corriente constante de 30 mA (Laemmli, 1970).

### **3.11. Métodos inmunoenzimáticos**

#### **3.11.1. ELISA de células completas de BCG para la detección de anticuerpos humanos contra BCG**

Se utilizaron placas de poliestireno de 96 pocillos y fondo plano (MaxiSop, Nunc), las que se recubrieron durante 16 h con una suspensión celular consistente en  $0,5 \times 10^6$  células de BCG diluidas en 50  $\mu\text{L}$  de PBS. Se aplicaron diluciones decimales seriadas de tres lotes de Intacglobin. Como control negativo se utilizaron las muestras de suero procedentes de donantes sanos diluidas 1:20 en PBS. Para todos los casos se empleó como control positivo una mezcla de sueros de pacientes enfermos tuberculosos, diluidas 1:20 en PBS. Las muestras se aplicaron por duplicado (50  $\mu\text{L}$ /pocillo) y se incubaron 1 h a 37°C. Se añadió un conjugado humano anti-IgG-peroxidasa (Sigma, EUA) a una dilución de 1:3000 en PBS. Tras una nueva incubación a 37 °C durante 1h se procedió a añadir, a razón de 50  $\mu\text{L}$  por pozo, o-fenilendiamina (0,05 % (m/v)) en tampón sustrato fosfato-citrato (ácido cítrico 25 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  41 mM, pH= 5) con  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0,1 % (v/v)). Se permitió que ocurriera la reacción durante 15 minutos, a 25 °C y en la oscuridad y se detuvo la reacción con ácido sulfúrico 2N (25  $\mu\text{L}$ /pozo). Se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 492 nm en un microlector de placas de ELISA. Entre cada paso se lavaron las placas manualmente, 3 veces, con PBS más Tween 20 (Sigma, EUA) al 0,05% (200  $\mu\text{L}$ /pozo). El título se determinó como el inverso de la dilución que mostró el doble de la absorbancia obtenida con respecto a los sueros controles.

#### **3.11.2. ELISA de células completas de BCG para la determinación de anticuerpos anti-BCG en ratón**

Se utilizaron placas de poliestireno de 96 pocillos y fondo plano (MaxiSop, Nunc), las que se recubrieron con 50  $\mu\text{L}$ /pozo de una suspensión celular consistente en  $0,5 \times 10^6$  células de BCG diluidas en PBS, y posteriormente se incubaron a 37 °C durante 16 h. Las muestras de suero, saliva y lavado traqueobronquial se diluyeron de forma doble seriada hasta su

titulación partiendo de una dilución inicial de 1:20 en PBS. Como control negativo se utilizaron las muestras de suero, saliva o lavados traqueobronquiales respectivamente, procedente de los animales inoculados con PBS, diluidas 1:20 en PBS. Para todos los casos se empleó como control positivo una muestra de Intacglobin diluida 1:640 en PBS. Las placas se mantuvieron en incubación 1 h a 37°C. A continuación se adicionó el conjugado anti IgG ratón-peroxidasa (Sigma, EUA) (50 µL/pozo) diluido 1:3000 en PBS. Tras una nueva incubación a 37°C durante 1h se procedió a añadir, a razón de 50 µL por pozo, se añadió o-fenilendiamina (0,05 % (m/v)) en tampón sustrato fosfato-citrato (ácido cítrico 25 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 41 mM, pH= 5) con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,1 % (v/v)). Se permitió que ocurriera la reacción durante 15 min, a 25 °C y en la oscuridad, se detuvo con ácido sulfúrico 2N (25 µL/pozo). Se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 492 nm en un lector de placas de ELISA. Entre cada paso se lavaron las placas manualmente, 3 veces, con PBS más Tween 20 al 0,05% (200 µL/pozo). El título se determinó como el inverso de la dilución que mostró el doble de la absorbancia obtenida con respecto a los sueros controles.

### 3.11.3. Ensayo inmunoenzimático sobre membrana de nitrocelulosa

Al finalizar una corrida electroforética de un SDS-PAGE, las bandas proteicas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa de 0,45 µm (Hybond, Amershan, Biosciences), para lo que se utilizó un equipo de transferencia semi-seco Nova Blot II (Pharmacia, Suecia). Se aplicó una corriente de cuatro veces el área del gel durante 1 hora. Transcurrido este tiempo, las membranas se bloquearon con albúmina sérica bovina (BSA) al 2% durante 1 h con agitación suave en zaranda. Se realizaron tres lavados en PBS y posteriormente se incubaron con las muestras de suero de pacientes tuberculosos (dilución 1/50) previamente adsorbidos con 1 mg de lisado de proteínas de *E. coli*. Se incubó durante 16 h a 4°C con agitación suave. Se aplicaron además como controles sueros humanos provenientes de donantes sanos. Luego de otra ronda de tres lavados sucesivos en PBS, se aplicó el AcM anti IgG humano conjugado con peroxidasa (Sigma, EUA) a una dilución 1:1500. Se lavó nuevamente con PBS y se reveló la reacción con peróxido de hidrógeno como sustrato y diaminobencidina (DAB) como cromógeno.

### 3.12. Estudio microbiológico. Determinación del número de Unidades Formadoras de Colonias. Colecta de pulmones

En los experimentos de reto con *M. tuberculosis*, los pulmones de los ratones Balb/c infectados se removieron asépticamente y se homogenizaron de forma individual mediante homogenizador (Polytron, Brinkman Instruments, Rexleid, Canadá) en 3 mL de PBS más Tween 80 al 0,05 % estéril (Sigma, EUA). Se tomó 1 mL de este homogenado y se realizaron diluciones decimales seriadas de las que se sembraron 20 µL en placas Petri que contenían medio de cultivo Middlebrook 7H10. Las placas se sellaron en bolsas de nylon y se incubaron durante 21 días a 37°C para la realización del conteo de UFC.

En los experimentos de reto con BCG, cada pulmón se pesó en una balanza técnica (Sartorius, Alemania), luego se maceró el tejido en 1 mL de solución salina estéril empleando una jeringuilla de 1 mL. Posteriormente, se descontaminaron las muestras: se les añadió 1 mL de hidróxido de sodio al 4%, se agitaron durante 20 minutos a 25 °C y se les adicionaron 100 µL de ácido clorhídrico al 25%. A continuación, cada muestra se diluyó 10 veces con solución salina, luego se sembraron por duplicado en medio Ogawa y se incubaron a 37°C durante 28 días, al cabo de los cuales se realizó el conteo de colonias.

Se calculó el número de UFC por miligramo de tejido (UFC/mg de tejido) según las siguientes fórmulas:

$$\text{UFC / mg de tejido} = \frac{\text{Número de colonias} \times \text{factor de dilución}}{\text{Peso del órgano (mg)}}$$

$$\text{Factor de dilución} = \frac{\text{Volumen del macerado} \times \text{dilución}}{\text{Volumen sembrado}}$$

$$\text{Volumen del macerado} = 1000 \mu\text{L}$$

$$\text{Volumen sembrado} = 100 \mu\text{L}$$

$$\text{Dilución: } 10$$

### 3.13. Histopatología y estudios morfométricos

En los experimentos de reto con *M. tuberculosis*, el pulmón izquierdo de cada ratón se removió y se fijó en formalina al 10%, se sumergió en parafina y se procesó para examen

histológico. Las secciones tisulares de 4  $\mu\text{m}$  se tiñeron con hematoxilina y eosina y cada lámina se observó mediante microscopía óptica. Las áreas de inflamación perivascular y peribronquial se midieron y analizaron mediante un programa de procesamiento de imágenes (Leica Microsystem Imaging Solutions LTD, Cambridge, UK).

En los experimentos de reto con BCG, el pulmón derecho de cada animal se fijó en formol neutro al 10% y se procesaron por técnicas convencionales en el Laboratorio de Histopatología de la Vicepresidencia de Desarrollo del Instituto Finlay. Se colorearon con hematoxilina-eosina y se observaron al microscopio óptico. Se realizó además tinción Zielh-Neelsen para verificar la presencia de bacilos ácido-alcohol resistentes.

### **3.14. Modelos animales**

#### **3.14.1. Establecimiento de un modelo de inoculación intranasal con BCG en ratones Balb/c**

##### **3.14.1.1. Inoculación intranasal de BCG**

Se anestesió cada animal con pentobarbital sódico (IMEFA, Cuba), a razón de 0,05 g/kg de peso corporal, inyectado por vía IP. Luego se colocó el animal en posición vertical y se le aplicó gota a gota la mitad del volumen total del inóculo de BCG (25  $\mu\text{L}$ ) en cada fosa nasal con una pipeta automática, con un tiempo de descanso de 1 min entre la administración a cada fosa.

##### **3.14.1.2. Estudio del efecto de la administración de cuatro dosis diferentes de BCG por vía intranasal**

Se tomaron 45 animales que se distribuyeron en cinco grupos de 9 ratones cada uno, los cuales se inocularon por vía IN con diferentes cantidades de células de BCG (1, 2, 4 y  $8 \times 10^6$  células de BCG) contenidas en un volumen de 50  $\mu\text{L}$  de PBS y se aplicaron 25  $\mu\text{L}$  en cada fosa nasal. El grupo 0 (tomado como control negativo) se inoculó con igual volumen de diluyente.

Se sacrificaron tres animales de cada grupo en condiciones asépticas a los 7, 14 y 21 días post-inoculación y se les extrajeron muestras de hígado, bazo y pulmón derecho para estudiarlas desde el punto de vista microbiológico e histopatológico, según descripción detallada en los acápites 3.12 y 3.13.

### 3.14.1.3. Estudio de la distribución sistémica de BCG al ser inoculado por vía intranasal

Para conocer la distribución de las células de BCG en diferentes órganos a diferentes tiempos, se inocularon por vía IN 15 ratones con  $1 \times 10^6$  células de BCG contenidas en un volumen de 50  $\mu$ L de PBS. Se sacrificaron 5 animales a los 7, 14 y 21 días después de la inoculación respectivamente y se les extrajeron muestras de los siguientes órganos: hígado, bazo, pulmón derecho, cerebro, intestino delgado y grueso, estómago, corazón, páncreas, timo, ganglios linfáticos mesentéricos (GLM) y submaxilares (GS). A todas las muestras se les realizó estudio microbiológico según descripción detallada en acápite 3.12.

### 3.14.1.4. Estudio de relación dosis/volumen del inóculo en la inoculación intranasal con BCG

Se tomaron 45 animales que se distribuyeron en tres grupos de 15 ratones cada uno. Todos los animales, excepto los del grupo 0 (tomado como control negativo) se inocularon por vía IN tal y como se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Diseño del estudio de la relación dosis-volumen de inoculación

GRUPO	DOSIS ( $\times 10^6$ células de BCG)	Volumen de inóculo ( $\mu$ L)
0	Control Negativo	-
1	0,50	50
2	0,25	50
3	0,50	20
4	0,25	20

Se sacrificaron 5 animales de cada grupo a diferentes tiempos post-inoculación: 1, 2, 3, 7, 14, 21 días. Se les extrajo el pulmón derecho y se le realizó estudio microbiológico según descripción en acápite 3.12.

### 3.14.2. Evaluación del carácter protector del Intacglobin en ratones

#### 3.14.2.1. Estudio de la cinética de distribución en ratón del Intacglobin

Se anestesiaron cinco ratones Balb/c por inyección IP de Pentobarbital sódico (IMEFA, Cuba) (0,05 g /kg de peso) y posteriormente recibieron 25  $\mu$ L de Intacglobin (5 mg) en cada

fosa nasal con el empleo de una pipeta automática. Otro grupo de cinco ratones se inoculó por vía IP con 1 mg de Intacglobin/g de peso corporal contenido en un volumen de 250  $\mu$ L de PBS.

Se tomaron muestras de suero, saliva y lavados traqueobronquiales a 1, 2, 3 y 5 h después de la inoculación, con el objetivo de determinar la presencia de anticuerpos IgG en estos fluidos.

**Toma de las muestras:**

**Suero:** Se obtuvo a partir de la sangre recolectada por punción en el seno retroorbital del ojo, con un capilar de 1 mm de diámetro. La sangre se centrifugó durante 3 min a 5585 x g en una microcentrífuga (Costar, EUA).

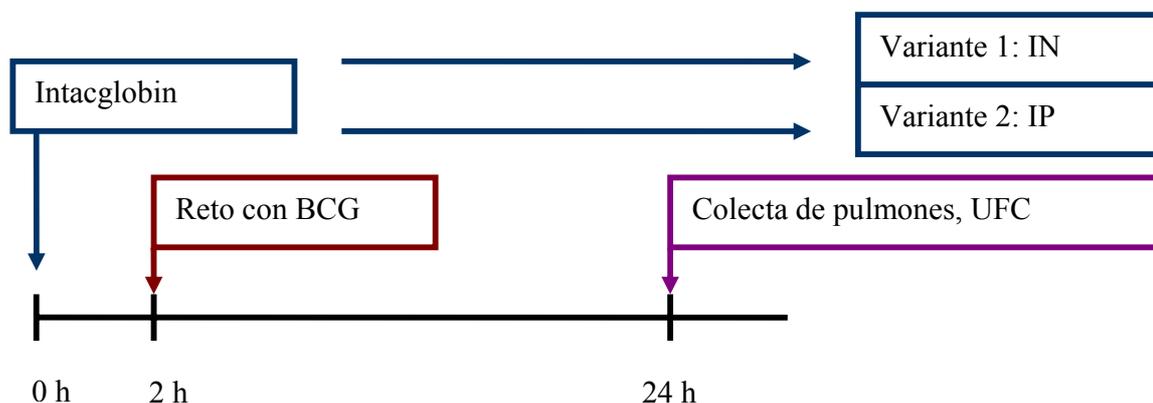
**Saliva:** Se le inocularon por vía IP a cada animal 50  $\mu$ L de pilocarpina al 1% (IMEFA, Cuba) en agua destilada estéril. Al cabo de 1-2 min, la saliva producida se colectó directamente de la boca del animal en microtubos de 1,5 mL (Eppendorf, Alemania).

**Lavados traqueobronquiales:** Cada animal se sacrificó por dislocación cervical. Luego se le practicó una incisión anterior en el cuello y se expuso la traquea que se perforó en su porción antero superior mediante una incisión con un bisturí. Luego, con una jeringuilla se introdujo hacia los pulmones 1 mL de solución salina estéril al 0,87% y finalmente se extrajo todo el contenido por aspiración.

**3.14.2.2. Evaluación del carácter protector del Intacglobin**

En este estudio se incluyeron cuatro grupos de cinco ratones Balb/c cada uno. Uno de estos grupos se inoculó con 5 mg de Intacglobin por vía IN (25  $\mu$ L en cada fosa nasal). Otro grupo se inoculó con Intacglobin a razón de 1 mg/g de peso corporal por vía IP. Se incluyeron dos grupos que no recibieron tratamiento previo. Dos horas después de la inoculación, los ratones de los dos grupos tratados y un grupo sin tratar se retaron por vía IN con  $0,5 \times 10^6$  UFC de BCG, mientras que otro de los grupos sin tratar se retó con la misma dosis de BCG por vía IN, pero pre-incubada con la preparación de Intacglobin. Para esto se incubaron  $0,5 \times 10^6$  células de BCG con 1 g de Intacglobin por g de peso corporal de los ratones. Se agitó de forma suave durante 4 h a 25 °C. Se centrifugó la mezcla durante 10 min a 5585 x g. El precipitado se resuspendió en 500  $\mu$ L de PBS y se centrifugó de igual forma para finalmente resuspenderlo en un volumen de 50  $\mu$ L de PBS donde la concentración celular fuera de  $0,5 \times 10^6$  células.

Todos los animales se anestesiaron con cloroformo y se sacrificaron por dislocación cervical 24 h después del reto y el pulmón izquierdo se removió asépticamente para el estudio microbiológico e histopatológico como se describió en acápites 3.12 y 3.13 respectivamente. En la Figura 4 se representa el esquema experimental diseñado.



**Figura 4:** Representación del esquema empleado para la inoculación por vía intranasal (Variante 1) y por vía intraperitoneal (Variante 2) del Intacglobin. Los ratones se retaron con BCG 24 h después de la inoculación y a las 24 h después del reto se determinó el número de UFC.

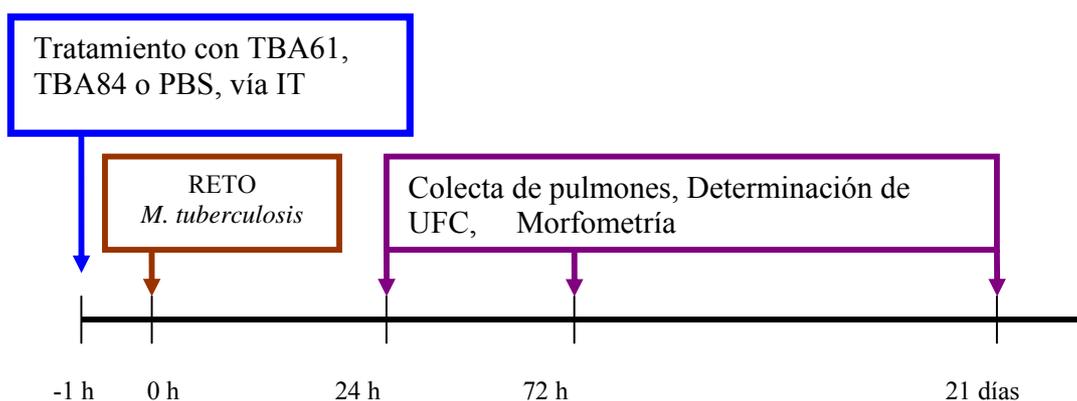
### 3.14.2. Comparación de la inoculación de diferentes dosis de BCG por vía IN e IT

Con el objetivo de comparar los niveles de colonización en pulmones si se varía la vía de inoculación, se diseñaron seis grupos de cinco ratones Balb/c cada uno, que se inocularon con tres dosis de BCG ( $1 \times 10^6$ ,  $0,5 \times 10^6$  y  $1 \times 10^5$ ) por vías IN o IT. Los animales se sacrificaron a los siete días post-inoculación y se determinó el número de UFC en pulmones.

### 3.14.3. Estudio de inmunización pasiva con los anticuerpos monoclonales TBA61 y TBA84

Se anestesiaron cinco ratones Balb/c por grupo con Pentobarbital sódico (0,05 g/Kg) por vía IP. Posteriormente se realizó una incisión longitudinal en la piel de la cara ventral del cuello, exponiéndose la tráquea. Dos grupos experimentales recibieron por vía intra-traqueal 5 mg/mL de cada AcM respectivamente, contenidos en un volumen de 100  $\mu$ L de PBS. El grupo control sólo recibió 100  $\mu$ L de PBS por la misma vía. Una hora después de la inoculación, cada ratón se retó con  $10^6$  UFC de la cepa H37Rv de *M. tuberculosis*, contenida también en un volumen de 100  $\mu$ L. Una vez completado el procedimiento, los ratones se

suturaron, se retornaron a sus cajas y se observaron hasta la recuperación total en aisladores donde se les suministró suficiente agua y comida. Los ratones se sacrificaron a las 24 h, 72 h y 21 días después de la infección. Para el sacrificio se anestesiaron con éter etílico y se desangraron mediante un corte en la arteria subclavia. En la Figura 5 se describe en detalle el esquema empleado.



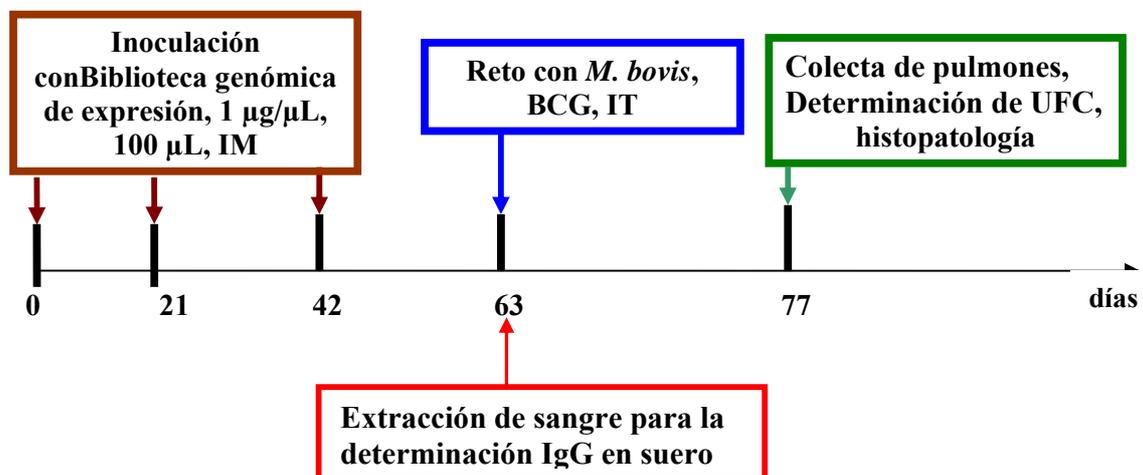
**Figura 5:** Representación del esquema empleado para la inoculación de los anticuerpos monoclonales por vía intra-traqueal 1h antes del reto con *M. tuberculosis*. Los pulmones de los ratones se analizaron a las 24, 72 h y 21 días después del reto.

#### 3.14.4. Evaluación del carácter protector de una biblioteca genómica de *M. tuberculosis* frente al reto con micobacterias

Se utilizaron cuatro grupos de ratones Balb/c que se inocularon como se muestra en la Tabla 2. Veintiun días después de la última inoculación los animales se anestesiaron con pentobarbital sódico (IMEFA, Cuba) a razón de 0,05 g/Kg de peso del animal administrado por vía IP. Posteriormente se practicó una incisión a nivel de tráquea y una vez expuesta esta se administraron por vía IT  $10^5$  UFC de BCG contenidas en 100  $\mu$ L de PBS. El esquema de inmunización, así como el tiempo de reto y de toma de muestras se describe en la Figura 6.

Tabla 2: Esquema de inmunización con la biblioteca genómica

GRUPOS	INÓCULO	VÍA DE ADMINISTRACIÓN	DOSIS
1 (CONTROL POSITIVO)	BCG	SUBCUTÁNEA	1 DOSIS; 100 $\mu$ L CONTENIENDO 10 <sup>5</sup> UFC DE BCG.
2	GENOTECA	INTRAMUSCULAR	3 DOSIS, INTERVALOS 21 DÍAS; 100 $\mu$ G DE PLASMIDIOS RECOMBINANTES DISTRIBUIDOS EN CADA MUSLO.
3 (CONTROL NEGATIVO)	PLASMIDIO PELI3.1	INTRAMUSCULAR	3 DOSIS, INTERVALOS 21 DÍAS; 100 $\mu$ G DE PLASMIDIOS DISTRIBUIDOS EN CADA MUSLO.
4 (CONTROL NEGATIVO)	PBS	INTRAMUSCULAR	3 DOSIS, INTERVALOS 21 DÍAS; 100 $\mu$ L DISTRIBUIDOS EN CADA MUSLO.



**Figura 6:** Representación del esquema empleado para la inmunización con la biblioteca genómica. Los ratones recibieron tres dosis de la biblioteca y se extrajo sangre 21 días después de la última inmunización. El reto se realizó por vía intra-traqueal con BCG 21 días después de la tercera dosis de la biblioteca. Los pulmones se analizaron 14 días después del reto.

Los animales se suturaron y se regresaron a sus cajas y se observaron hasta visualizar signos de recuperación. Al cabo de los 14 días fueron sacrificados por dislocación cervical y los pulmones fueron removidos asépticamente para realizar estudio microbiológico e histopatológico tal y como se describió en acápite 3.12 y 3.13 respectivamente.

### **3.15. Análisis estadístico**

La normalidad de los datos fue comprobada mediante la prueba Kolmogorov-Smirnov y la homogeneidad de varianza mediante la prueba de Barlet (Sigarroat, 1985).

En los ensayos de protección los resultados de los conteos de colonias se transformaron a valores logarítmicos para calcular el valor de la media geométrica de las UFC de cada grupo de animales. La significación estadística se analizó utilizando la prueba no paramétrica Kruskal Wallis.

Para todos los cálculos relacionados con los estudios de protección y ELISA se utilizó el programa GraphPad Prism, versión 4.00 para Windows (GraphPad Software, EUA). En todos los casos, un valor de  $p < 0,05$  se consideró estadísticamente significativo. En las figuras, las barras representan la media, más la desviación estándar de los valores individuales de cada grupo experimental.

La significación de las diferencias observadas en los estudios del efecto de la inmunización con la genoteca de expresión de *M. tuberculosis* en la aparición de granulomas fue analizada mediante un ANOVA seguido de una prueba de comparaciones múltiples de Fisher. Para esto se utilizó el paquete de programas STATISTICA (Edición 98) (StatSoft, Inc., 1998).

#### **IV. RESULTADOS Y DISCUSION**

Para el estudio de la TB, se han utilizado diversos tipos de modelos experimentales, donde la especie de ratón ha permitido el estudio de la patogenia y respuesta inmune del hospedero. Como la puerta de entrada de *M. tuberculosis* al hombre es la vía respiratoria, los modelos que utilizan esta vía son más representativos del fenómeno real y aportan muchos datos acerca de la patogenia y mecanismos de defensa del hospedero. En este sentido, las infecciones de ratones con micobacterias por vía nasal por aerosol han resultado útiles y reproducen en gran medida la dosis y forma en que las bacterias penetran a las vías respiratorias superiores, pero requiere de un equipamiento muy costoso (Orme y cols., 2001). Es por ello que en este trabajo se evalúan alternativas de inoculación más asequibles pero que a la vez permitieran evaluar la respuesta inmune protectora en los pulmones de los animales inoculados. Al mismo tiempo se propone demostrar que este modelo alternativo es útil para evaluar preparaciones vacunales que movilizan el sistema inmune de manera activa.

##### **4.1. Modelo de infección intranasal de ratones con BCG**

###### **4.1.1. Distribución tisular de *M. bovis* BCG administrado por vía intranasal**

En un primer experimento para establecer el modelo de infección intranasal, se evaluó la distribución tisular en ratones después de la administración IN de diferentes dosis de células de BCG. En la Tabla 3, se muestra que para los grupos 2, 3 y 4, inoculados con 2, 4 y 8 x 10<sup>6</sup> células respectivamente, el número de colonias recuperadas en las muestras de pulmón extraídas a los 7, 14 y 21 días, resultó incontable (más de 10<sup>4</sup> colonias). En bazo sólo se apreció crecimiento de colonias a los 21 días para los dos últimos grupos y en el hígado no se detectó infección. En el caso del grupo 1 (1 x 10<sup>6</sup> células), se recuperaron del pulmón derecho 3,5 x 10<sup>3</sup> UFC/mg de tejido a los 7 días; 2,8 x 10<sup>3</sup> a los 14 días y 2,2 x 10<sup>3</sup> a los 21 días (mediana del grupo), sin diferencias estadísticamente significativas entre estos grupos para un nivel de significación de p<0,05. En las muestras de hígado y bazo no se observó crecimiento bacteriano alguno después de 28 días de incubación.

Tabla 3: Resultados del estudio microbiológico e histopatológico luego de la administración a ratones Balb/c de cuatro dosis diferentes de BCG aplicadas por vía intranasal.

Grupo	Tiempo	Estudio microbiológico (UFC)*			Estudio histopatológico**		
		Pulmón	Hígado	Bazo	Pulmón	Hígado	Bazo
1 (1 x 10 <sup>6</sup> )	7 días	3500	-	-	-	-	-
	14 días	2800	-	-	-	-	-
	21 días	2200	-	-	-	-	-
2 (2 x 10 <sup>6</sup> )	7 días	>10 <sup>4</sup>	-	-	-	-	-
	14 días	>10 <sup>4</sup>	-	-	1+	-	-
	21 días	>10 <sup>4</sup>	-	-	1+	-	-
3 (4 x 10 <sup>6</sup> )	7 días	>10 <sup>4</sup>	-	-	-	-	-
	14 días	>10 <sup>4</sup>	-	-	1+	-	-
	21 días	>10 <sup>4</sup>	-	90	2+	-	-
4 (8 x 10 <sup>6</sup> )	7 días	>10 <sup>4</sup>	-	-	-	-	-
	14 días	>10 <sup>4</sup>	-	-	2+	-	-
	21 días	>10 <sup>4</sup>	-	100	2+	-	-

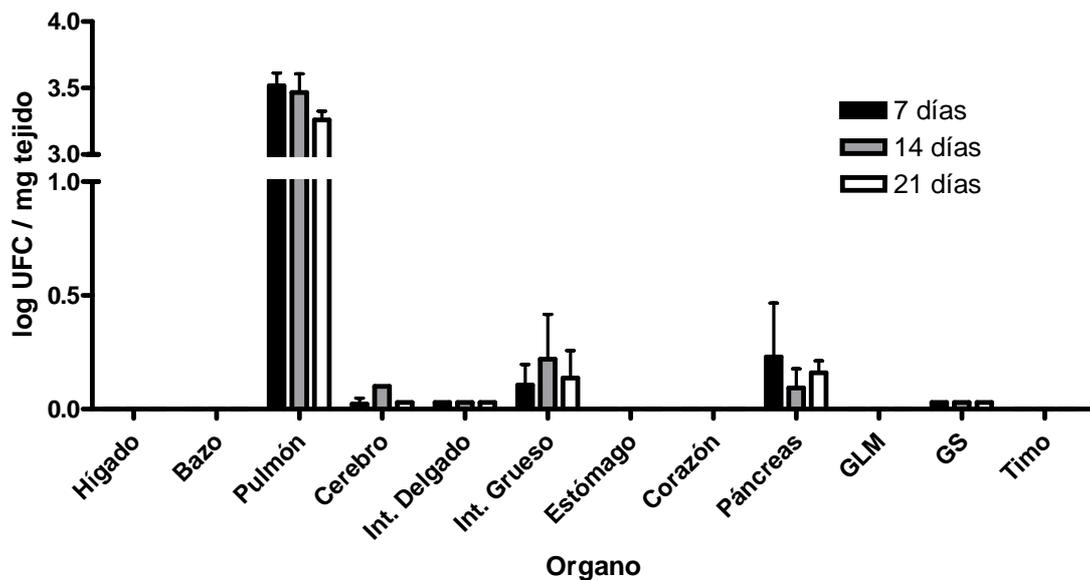
\* Mediana de cada grupo (n=9). (-) significa no conteo de UFC.

\*\* (1+) Cambios histopatológicos leves: infiltrado celular. (2) cambios histopatológicos moderados: infiltrado celular, formaciones granulomatosas incipientes. (-) no se encontraron alteraciones

Los resultados obtenidos están en correspondencia con lo obtenido por Tree y cols. (2004), en un estudio en el que al infectar ratones Balb/c con diferentes dosis de BCG por vía IN, para dosis mayores de 1 x 10<sup>6</sup> células, hubo un incremento en la patología pulmonar.

Para determinar el grado de afección (daño tisular) causado por la inoculación de las diferentes dosis de células del bacilo, se realizó un estudio histopatológico en el cual las muestras de hígado, bazo y pulmón izquierdo se tiñeron con hematoxilina-eosina, para localizar lesiones granulomatosas características de esta patología. También se realizó la tinción de Zielh-Neelsen para detectar la presencia de bacilos ácido-alcohol resistentes. Estas lesiones granulomatosas aparecieron en el pulmón a partir de los 14 días post-inoculación para las dosis de 2, 4 y 8 x 10<sup>6</sup> células, con un incremento en la proporción de animales con lesiones al aumentar la dosis administrada: 33% para el grupo 2; 44% para el grupo 3 y 55% para el grupo 4. Para la dosis menor empleada (1 x 10<sup>6</sup> células de BCG) no se observó este tipo de lesión en el pulmón a ninguno de los tiempos de muestreo. Las muestras de hígado y bazo en todos los grupos fueron negativas para el desarrollo de lesiones granulomatosas, resultado que coincide con el del estudio microbiológico.

A pesar de ello pudiera pensarse que algunos bacilos pudieran migrar por vía linfohemática y formar focos de infección extrapulmonares, por lo que se decidió realizar posteriormente un estudio tisular más amplio en términos de conteo de UFC, de la distribución de *M. bovis* BCG después de ser administrado por vía IN. Los resultados se muestran en la Figura 7.



**Figura 7:** Distribución tisular de *M. bovis* BCG en ratones Balb/c luego de la administración por vía IN de  $1 \times 10^6$  células. Las muestras de tejido de cada órgano, extraídas a los 7, 14, 21 días post-inoculación, se maceraron e inocularon en medio Ogawa. Posteriormente los tubos se incubaron durante 28 días y se determinó el número de UFC/mg de tejido. Las barras representan la media, más la desviación estándar de los valores individuales de cada grupo experimental.

Como se aprecia en la Figura 7, el conteo de UFC en los tiempos estudiados reveló que con esta dosis de infección, se infectaron principalmente los pulmones. El número de UFC recuperadas a los 7 días resultó mayor que a los 14 y 21 días sin diferencias significativas entre estos grupos para una  $p < 0,05$ , resultado que coincidió con el del experimento anterior (ver Tabla 3). En este experimento se apreció también que luego de la inoculación por esta vía IN, una parte, aunque no significativa, del inóculo, infecta otros órganos.

Los mayores recobrados de BCG fueron en pulmón, acorde con la vía de inoculación empleada. Sin embargo, la aparición de algunas UFC en órganos del sistema digestivo indica que hay un desvío del inóculo hacia este sistema. Más importante aún significa el hecho de

haber encontrado micobacterias en cerebro, pues una de las mayores preocupaciones de las autoridades regulatorias acerca de la inoculación IN, es la cercanía anatómica y posible transmisión hacia sistema nervioso debido a la proximidad del bulbo olfatorio con terminaciones nerviosas expuestas en la cavidad nasal (Kallenius y cols., 2007; Giri y Khuller, 2008). No obstante la cantidad recobrada fue mínima, no encontrándose daño tisular en estos órganos.

Como primer punto en la propuesta de modelo de infección por vía IN, se seleccionó como agente infectante *M. bovis* BCG debido a que ha sido reiteradamente demostrada su reactividad cruzada con el bacilo de la TB humana (Jungblut y cols., 1999; Pym y Brosch, 2000; Agger y Andersen, 2002). Además es un microorganismo atenuado que no constituye peligro para el investigador (Fine y Vynnycky, 1998; Hirsch y cols., 1999a). Se prefirió el bacilo vacunal en una formulación liofilizada para uso humano debido a su alto nivel de pureza, su manera de cuantificación más precisa y a que su forma líquida de reconstitución es muy apropiada para una inoculación IN.

Como se utilizó *M. bovis* BCG como agente infectante, sería necesario además destacar cuan semejante es el genoma de *M. bovis* BCG con respecto a la cepa virulenta H37Rv de *M. tuberculosis*.

El complejo *M. tuberculosis* está constituido por las especies *M. africanum*, *M. canetti*, *M. microti* y *M. bovis*. BCG forma un sub-grupo dentro de esta última (Brosch y cols., 2002). El genoma de *M. bovis* es menor que el de *M. tuberculosis* H37Rv (4,32 Mb y 4,41 Mb respectivamente). El mapa genómico de varias especies micobacterianas es casi idéntico, pero al menos existen 14 regiones de diferencia (RD1 a RD14) entre los miembros del complejo (Gordon y cols., 1999). Con respecto a la cepa virulenta *M. tuberculosis* H37Rv y a *M. bovis*, BCG contiene tres regiones de diferencia (RD1 a RD3) que no están compartidas y presumiblemente son responsables de la atenuación en BCG.

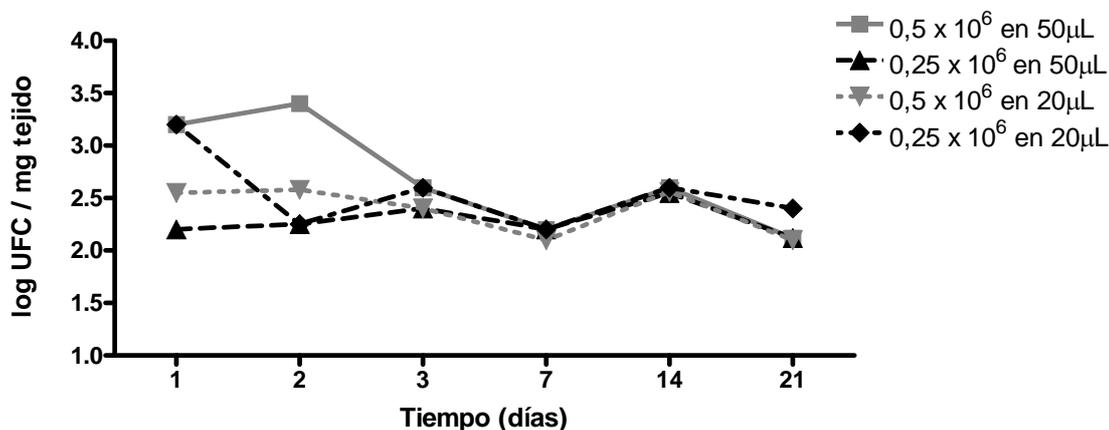
Los estudios de hibridación de ADN genómico de *M. bovis* BCG con el genoma de *M. tuberculosis* H37Rv (cepa completamente secuenciada) (Cole y cols., 1998), por los métodos de microarreglos (Behr y cols., 1999) o basados en cromosoma artificial bacteriano ordenado (Gordon y cols., 1999), identificaron 16 deleciones en el genoma de *M. bovis* BCG comparado con el genoma de *M. tuberculosis* H37Rv, que oscilaban en tamaños entre 2 a

12,7 kb. Estas regiones genómicas están relacionadas con la codificación de antígenos de potencial virulencia. Sin embargo, en ambas cepas están presentes genes que codifican para proteínas importantes desde el punto de vista inmunológico, como la proteína de 38 kDa y el antígeno 85B, cuya protección en modelos murinos de infección frente virulenta han sido demostrados ya con anterioridad (Ulmer, 1997). A pesar de las diferencias antes mencionadas, los genomas de las micobacterias se encuentran conservados en más de un 99%, debido principalmente a que entre estas especies no existen mecanismos de transferencia horizontal de material genético (Brosch y cols., 2007).

Debido a la similitud entre los dos genomas, algunos de los mecanismos inmunes desencadenados en el hospedero para el control de la progresión de la enfermedad luego de la infección con *M. bovis* BCG, son muy similares a lo que ocurriría frente al reto con *M. tuberculosis*.

#### 4.1.2. Relación dosis-volumen inoculado de *M. bovis* BCG por vía intranasal

Para el estudio de la relación entre la dosis y el volumen, se diseñó un experimento donde se evaluó el efecto de la disminución de la dosis de infección sobre la colonización del bacilo en el pulmón. En la Figura 8 se muestran los resultados obtenidos.



**Figura 8:** Gráfico que muestra el promedio del número de UFC recuperadas en pulmón luego de la infección IN con diferentes dosis de BCG contenidas en dos volúmenes diferentes. Los grupos 1 y 2 se inocularon con  $0,5 \times 10^6$  y  $0,25 \times 10^6$  células de BCG respectivamente contenidas en 50 µL. Los grupos 3 y 4 se inocularon con las mismas dosis de BCG contenidas en 20 µL.

Si se analiza la dosis de BCG en la inoculación, de los 60 animales inoculados con 50  $\mu$ L, se obtuvo colonización en 44 de ellos que equivalen al 73,3% del total. De ellos, 25 animales (41,7%) pertenecían al grupo 1 inoculados con  $0,5 \times 10^6$  células de BCG y los otros 19 (31,6%) correspondientes al grupo 2 inoculados con  $0,25 \times 10^6$  células. De los 60 animales inoculados con 20  $\mu$ L se encontró colonización en sólo 20 de ellos, que corresponden al 33,3% del total. De ellos, 11 animales (18,3%) que pertenecían al grupo 3 que se inocularon con  $0,5 \times 10^6$  células de BCG y los otros 9 (15%) correspondientes al grupo 4 que se inocularon con  $0,25 \times 10^6$  células.

Si comparamos los resultados obtenidos teniendo en cuenta el volumen de inoculación, los niveles de colonización fueron superiores para los grupos infectados con  $0,5 \times 10^6$  células, donde de los 60 animales empleados, en el 60% de ellos (36 animales) se obtuvo colonización. No obstante, el número de colonias recuperadas en el grupo 1, inoculado con 50  $\mu$ L, fue superior a las recuperadas en el grupo 3, inoculadas con 20  $\mu$ L. Sin embargo, la colonización tras la inoculación de  $0,25 \times 10^6$  células fue numéricamente inferior, pues de los 60 animales infectados, solo el 46,7% de ellos presentaron colonias en sus pulmones. Si analizamos los tiempos de sacrificio post-inoculación, el número de UFC obtenidas en los dos primeros días fue superior para todos los grupos que en el resto de los días. En el grupo 1 el número de colonias muestra un comportamiento bifásico para el crecimiento de las micobacterias sin diferencias significativas entre cada tiempo. Para el grupo 2 la infección se comportó similar para todos los tiempos de sacrificio sin diferencias significativas. Sin embargo, los grupos 3 y 4 tuvieron niveles de colonización muy bajos, encontrándose un crecimiento no significativo en algunos tiempos, lo cual indica que la inoculación con 20  $\mu$ L no es recomendable. Toda la comparación se realizó mediante la Prueba de Kruskal Wallis y una Comparación Múltiple no Paramétrica para un nivel de significación de  $p < 0,05$ .

En cuanto a la dosis a inocular, basados en que la dosis de *M. tuberculosis* administrada a ratones en forma de aerosol inicialmente por Collins y col. (1984) fue de  $10^3$  UFC, se decidió aumentar esta dosis debido a que la comunicación anatómica que existe entre el tracto respiratorio y digestivo pudiera ocasionar que parte del inóculo pasara órganos del sistema digestivo del animal. En este caso se trabajó con dosis de  $1 \times 10^6$  células, dosis a partir de la

cual se puede realizar un conteo seguro y reproducible de las colonias recuperadas de pulmón varios días después de la infección.

El volumen del inóculo seleccionado está en correspondencia con un informe encontrado en la literatura para inoculación intranasal (Pickett y cols., 2000). Otros investigadores han trabajado modelos similares de colonización nasal con otros microorganismos, utilizando un volumen de 10  $\mu$ L (5  $\mu$ L/fosa) (Kiser y cols., 1999; Kurono y cols., 1999), pero en el caso de las micobacterias, donde es imprescindible su llegada a los pulmones para la colonización del tejido y el comienzo del proceso infeccioso, se debe administrar un mayor volumen. Por ello se entendió que si se trabajaba con un volumen de inóculo tan pequeño (10  $\mu$ L), se corría el riesgo de que este no llegase a los pulmones debido a la presencia en las mucosas respiratorias de mecanismos protectores de exclusión (Waldman y Ganguly, 1974; Reynolds, 1987; Alonso, 2008).

Este experimento permitió concluir, para las condiciones ensayadas, que la infección IN con BCG se debía realizar con una dosis de  $0,5 \times 10^6$  bacilos contenidos en 50  $\mu$ L de inóculo, para evaluar los resultados a las 24 h post-inoculación si se desean hacer estudios de protección a nivel de mucosas.

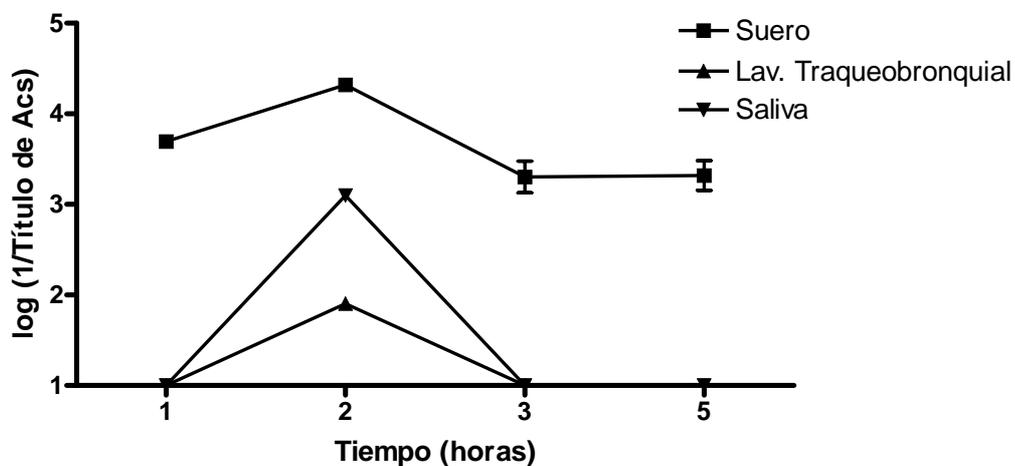
## **4.2. Evaluación del Intacglobin en el modelo de reto intranasal**

### **4.2.1. Estudio en ratón de la distribución en el tiempo de los anticuerpos contra BCG presentes en el Intacglobin**

Como la población cubana se encuentra vacunada con BCG, como parte del Programa Nacional de Inmunización vigente en Cuba (Delgado, 1991), era de esperar encontrar títulos de anticuerpos anti-BCG encontrados para los tres lotes de Intacglobin evaluados. Después de titular 3 lotes de Intacglobin, se detectaron estos anticuerpos mediante ELISA con título de  $40960 \pm 6380$ .

Para comprobar la presencia de anticuerpos específicos a antígenos micobacterianos contenidos en el Intacglobin a nivel de mucosa respiratoria y suero, luego de su administración por vía IP e IN a ratones Balb/c, se diseñó un experimento para la determinación de la distribución en el tiempo de estos. En este diseño experimental el grupo 1 se inoculó por vía IP y el grupo 2 por vía IN con el Intacglobin. Para ambos grupos, tras la

administración IP, los valores máximos se detectaron a las 2 horas post-inoculación del Intacglobin con títulos contra BCG de 20 480, 1280 y 80 para suero, saliva y lavados traqueobronquiales respectivamente (Figura 9). En correspondencia con la vía por la que se inoculó el Intacglobin, en este caso la vía IP, los valores mayores obtenidos estuvieron en las muestras de suero de los ratones. A las tres horas de inoculados, en el suero el título de anticuerpos presentes en esta formulación decayó a valores que fueron estadísticamente similares a los de saliva y lavados traqueobronquiales para este mismo tiempo. El mismo comportamiento se repitió a las cinco horas post-inoculación.

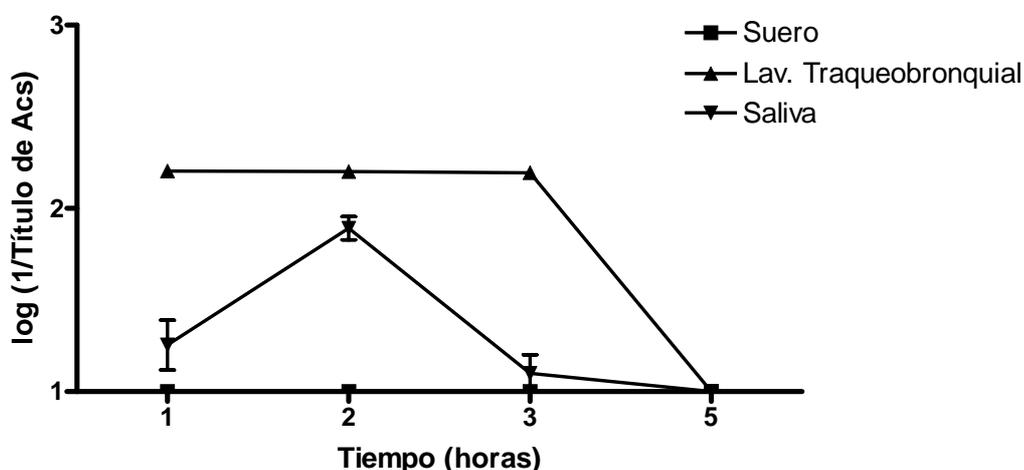


**Figura 9:** Dinámica de distribución de anticuerpos específicos del Intacglobin administrado por vía IP a ratones Balb/c. Los valores representan el promedio del título de las muestras extraídas en cada tiempo, determinado mediante un ELISA de células completas de BCG.

Los anticuerpos de tipo IgG, por mecanismos de difusión pasiva pueden ser transportados hasta las mucosas (Falero-Díaz y cols., 2000b). Teniendo en cuenta esto, se supuso que si se aplicaba una fracción de Intacglobin por vía IP, podría esperarse su presencia posterior en saliva y tracto respiratorio, donde los anticuerpos específicos pudieran jugar algún papel en la protección contra la infección posterior con BCG. Por el corto tiempo en que se determinó la distribución de estos anticuerpos en las muestras analizadas, es evidente la relación que existe entre los anticuerpos presentes en la saliva, en los lavados traqueobronquiales y en el suero, ya que al estar el peritoneo ricamente vascularizado, fue posible el paso de estos anticuerpos desde la cavidad peritoneal hacia la circulación mayor y su distribución a otros órganos y

tejidos, pasando al lumen de las glándulas salivares y de las vías respiratorias, por mecanismos de difusión pasiva.

Luego de la inoculación por vía IN, el mayor título de anticuerpos se detectó en los lavados traqueobronquiales realizados, manteniéndose constante este valor durante las tres primeras horas post-inoculación, tiempo después del cual disminuyó el título hasta hacerse cero al cabo de las cinco horas. En saliva se detectó un máximo título a las dos horas luego de la inoculación, disminuyendo este valor hasta cero, a las tres horas post-inoculación; en el caso de las muestras de suero, no se detectó título de anticuerpos en ninguno de los tiempos evaluados en este experimento, como se aprecia en la Figura 10.



**Figura 10:** Dinámica de distribución del Intacglobin administrado por vía IN a ratones Balb/c. Los valores representan el promedio de los títulos de las muestras evaluadas a cada tiempo, determinado mediante un ELISA de células completas de BCG.

Los tiempos de distribución de anticuerpos anti-BCG en suero, saliva y lavados traqueobronquiales se corresponden con los encontrados en otros trabajos desarrollados con anticuerpos monoclonales de isotipos IgA e IgG específicos para las proteínas de 16 y 38 kDa de *M. tuberculosis* administrados por vía IP e IN, donde los valores máximos se alcanzaron a las 3 h de una dinámica de 1, 3, 5 y 8 h para la saliva y 0; 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5 h para suero (Falero-Díaz y cols., 2000b).

Los bajos títulos de anticuerpos detectados en las muestras de lavado traqueobronquial respecto a las del Intacglobin inoculado pudieran estar dados por varios motivos, entre ellos

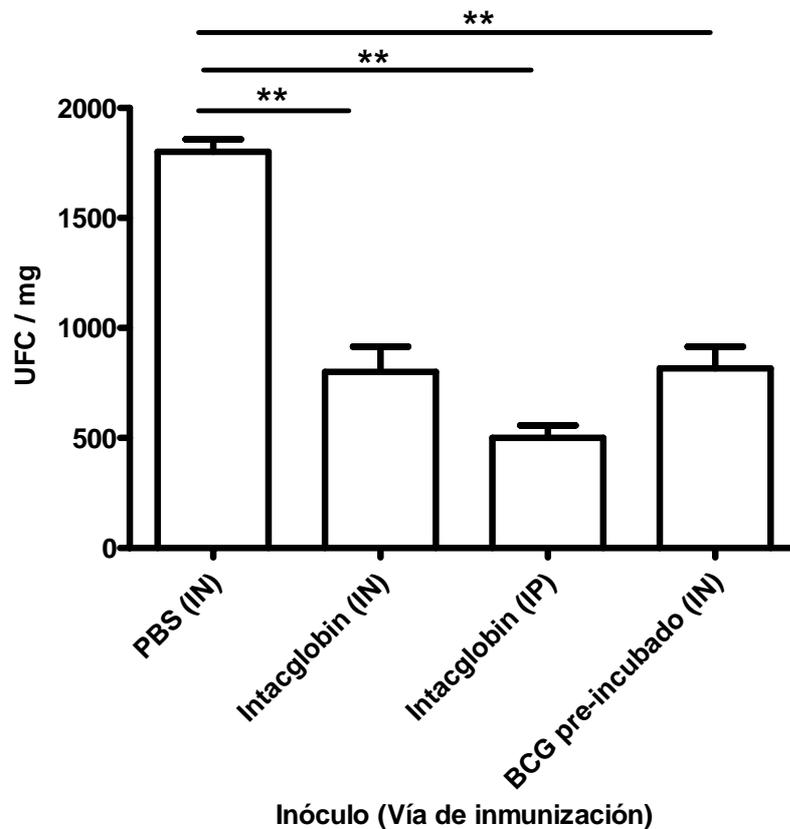
la dilución que sufre el inóculo a lo largo del árbol traqueobronquial, a la dilución que se produce después al obtener el lavado traqueobronquial en 1 mL de PBS y a la degradación de los anticuerpos bajo la acción de proteasas. Este último factor pudiera ser el responsable principal de la caída brusca de los niveles de anticuerpos que se observa entre las 3 y 5 h post-inoculación. Respecto a las muestras de saliva era de esperar que después de la inoculación IN paulatinamente los anticuerpos pasen por difusión hacia las glándulas salivares debido a la cercanía anatómica de estas con las vías respiratorias, aunque pudiera estar influido por un fenómeno inespecífico, dado por el arrastre mecánico por la saliva de anticuerpos procedentes de la inoculación IN. El experimento mostró un bajo título de anticuerpos en la saliva en la primera hora, para luego hacerse indetectable a partir de la tercera hora. Este comportamiento pudiera justificarse porque hasta las dos horas el proceso de difusión garantiza el paso de los anticuerpos hacia el lumen de las glándulas salivales y al ser estimuladas con Pilocarpina son arrastrados hacia la boca del animal.

Este análisis permitió llegar a la conclusión de que empleando tanto la vía IP como la IN para la administración del Intacglobin, se detectaron en las mucosas respiratorias anticuerpos específicos a BCG; así como el establecimiento de los tiempos adecuados para su detección en los distintos tipos de fluidos.

#### **4.2.2. Experimento de reto con BCG**

Con el objetivo de evaluar el papel de los anticuerpos antimicobacterianos en controlar, o modular la infección con BCG se diseñó un experimento de reto empleando el modelo de infección intranasal cuyos parámetros se definieron en el acápite 4.1.

La Figura 11 muestra el comportamiento de la infección con BCG en los cuatro grupos experimentales. Puede apreciarse como el número de UFC recuperadas en el grupo 1 resultó significativamente superior ( $p < 0,01$ ) a las recuperadas en los restantes grupos. Sin embargo, no se detectaron diferencias significativas entre el número de UFC recuperadas en los pulmones de los ratones de los grupos 2, 3 y 4, analizadas mediante la prueba no paramétrica Kruskal Wallis.



**Figura 11:** Resultados del experimento en ratones Balb/c retados con BCG administrado por vía IN. Las barras representan el promedio del número de UFC/órgano para cada grupo estudiado. Los animales del grupo 1 (control negativo) se inocularon con PBS por vía IN, los grupos 2 y 3 se inocularon con Intacglobin por vía IN e IP respectivamente. Los animales se retaron a las dos horas post-inoculación con BCG por vía IN. Los del grupo 4 se retaron por vía IN con BCG preincubado con Intacglobin. Las barras representan la media, más la desviación estándar de los valores individuales de cada grupo experimental. \*\*: Diferencias significativas para  $p < 0,01$ , mediante la prueba de Kruskal Wallis

Otros autores han utilizado la ganmaglobulina humana administrada por vía IP en diferentes modelos de reto, para prevenir otras patologías en ratones y han logrado resultados satisfactorios, lo que nos hace pensar que en esos animales ocurrió una distribución adecuada del preparado en los diferentes compartimentos corporales (Gaudin y cols., 1998; Nys y cols., 1999a; Nys y cols., 1999b).

Las inmunoglobulinas han sido usadas en el tratamiento de personas con deficiencias de anticuerpos y niños con púrpura trombocitopénica en dosis de 2 g/Kg/mes, dosis en la que

actúa como agente inmunomodulador (Imbach y cols., 1981). Se ha descrito que este tipo de formulaciones posee cuatro mecanismos de acción por separado:

1. Acciones mediadas por la región variable F(ab)<sub>2</sub>: relacionadas con la presencia de un vasto repertorio de especificidades a anticuerpos que conllevan a la neutralización de un amplio rango de antígenos, incluyendo patógenos y superantígenos. Posee además un efecto inhibitorio considerable en la proliferación de células T *in vitro*. Aunque por regla general estas preparaciones ejercen acciones anti-apoptóticas y causan arresto del ciclo celular, bajo ciertas condiciones pueden inducir apoptosis. Reducen la adhesión de células T a la matriz extracelular. Poseen anticuerpos naturales del tipo IgG codificados por la línea germinal. Pueden también contener anticuerpos contra importantes moléculas del sistema inmune, tales como IL-1, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ .
2. Acciones de la región Fc sobre los receptores Fc: la unión de la fracción Fc a los receptores Fc activadores e inhibitorios tiene múltiples efectos. Uno de estos es inhibir la maduración de las células dendríticas y regular la concentración de citoquinas. Puede interferir además en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, así como inhibir la fagocitosis.
3. Acciones mediadas por la unión del complemento a la región Fc: Las inmunoglobulinas endovenosas, así como los complejos inmunes, producen la generación de C3b, que teóricamente, es un pro-inflamatorio. Pequeñas dosis de inmunoglobulinas provocan la activación de las vías clásica y alternativa. La región Fc, por su parte, secuestra C3a y C5a. Por el contrario, altas dosis inactivan los complejos inmunes, atenuando selectivamente la amplificación de la cascada del complemento.
4. Acciones debidas a otros componentes presentes en la formulación: estas preparaciones pueden contener citoquinas, moléculas CD4, MHC clase II y agentes estabilizantes, como los azúcares, que pueden contribuir a la inhibición de la proliferación de células mononucleares (Sewell y Jolles, 2002; Stager y cols., 2003).

En este experimento se observó que el Intacglobin, aplicado tanto por vía IN como IP es capaz de proteger significativamente frente al reto con BCG por vía IN, suponiendo que la interacción de los anticuerpos con BCG en las vías respiratorias, o *in vitro*, pre-incubando la

bacteria con los anticuerpos antes de la inoculación, modifica el curso de la infección, reduciéndola.

En un estudio realizado por otros autores, se demostró que el tratamiento de ratones infectados con *M. tuberculosis*, con dosis altas de inmunoglobulinas endovenosas, redujo sustancialmente la carga bacteriana en bazo y pulmón de los ratones tratados cuando esta formulación se aplicó tanto en la etapa inicial como tardía de la infección (Roy y cols., 2005). En trabajos encontrados en la literatura, se destaca que la micobacteria cubierta con anticuerpos específicos se procesó y presentó mejor por las células dendríticas para la estimulación de la respuesta de linfocitos T CD4+ y CD8+ (Teitelbaum y cols., 1998; Pethe y cols., 2001; Chambers y cols., 2004).

La adhesión microbiana a los tejidos del hospedero es un paso importante en la colonización de este y el establecimiento de la infección. Los anticuerpos dirigidos contra determinantes de superficie de *M. tuberculosis* y BCG pudieran interferir con la adhesión de las micobacterias a los tejidos del hospedero (Glatman-Freedman y Casadevall, 1998). Otros autores demostraron que compuestos derivados del BCG que contienen manosa se unen a macrófagos y granulocitos. La unión puede producirse a través de receptores de manosa del macrófago o por proteínas séricas que unen a la manosa y favorecen la fagocitosis del microorganismo por los granulocitos (Venisse y cols., 1995a; Venisse y cols., 1995b). Se demostró además que la unión de *M. tuberculosis* a los macrófagos se inhibe por la preincubación del microorganismo con anticuerpos monoclonales dirigidos contra componentes de su superficie (Schlesinger y Cheng, 1994; Schlesinger y Horwitz, 1994; Schlesinger y cols., 1994a; Schlesinger y cols., 1994b).

Teitelbaum y cols. (1998) protegieron contra la infección por *M. tuberculosis* a ratones carentes de inmunidad celular, administrándoles anticuerpos monoclonales IgM e IgG contra antígenos de este bacilo.

Más recientemente, Olivares y col. (2009) demostraron que la inoculación IN de la gammaglobulina, así como la gammaglobulina preincubada con *M. tuberculosis*, reduce significativamente el número de UFC en pulmón a las 24, 48, 72 h, una semana, 21 días y dos meses luego del reto IT con *M. tuberculosis*. En dicho trabajo, al utilizarse la misma fuente de gammaglobulina que la utilizada en el presente trabajo, aunque con un modelo de

infección diferente, se refuerza el papel profiláctico de los anticuerpos contenidos en esta formulación, así como su capacidad para modificar el curso de la infección y estimular los mecanismos de respuesta celular.

Toda esta serie de experimentos usando el modelo de infección IN permitieron primero proponer este modelo para lograr la colonización de micobacterias en pulmones de los ratones inoculados. Estos experimentos sirvieron de base además para evaluar el papel protector a nivel de mucosa de AcMs específicos a proteínas de *M. tuberculosis*.

#### 4.2.3. Comparación de la inoculación de diferentes dosis de BCG por vía IN e IT

Con el objetivo de comparar los niveles colonización en pulmones si se varía la vía de inoculación, se diseñaron seis grupos de cinco ratones Balb/c cada uno, que se inocularon con tres dosis de BCG por vías IN o IT. Los animales se sacrificaron a los siete días post-inoculación y se determinó el número de UFC en pulmones. Los resultados se observan en la Tabla 4.

Tabla 4: Número de UFC recuperadas en pulmón siete días después de la inoculación de tres dosis diferentes de BCG por vías IN e IT.

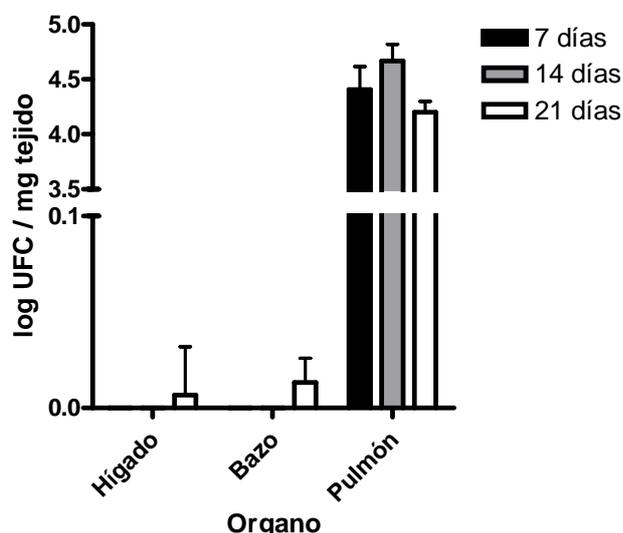
Dosis de BCG	Promedio de UFC recuperadas en pulmón*			
	Vía IN		Vía IT	
10 <sup>6</sup>	5,3 x 10 <sup>3</sup>	(a)	3,1 x 10 <sup>4</sup>	(b)
0,5 x 10 <sup>6</sup>	4,5 x 10 <sup>3</sup>	(a)	2,5 x 10 <sup>4</sup>	(b)
10 <sup>5</sup>	3,5 x 10 <sup>3</sup>	(a)	2,1 x 10 <sup>4</sup>	(b)

\* Letras diferentes significa que hay diferencias estadísticamente significativas entre las medias,  $p < 0,05$ , evaluados por la prueba de Kruskal Wallis.

En este estudio se pudo constatar que luego de la inoculación de varias dosis de BCG contenidas en un volumen de 50  $\mu$ L por vía IN, al cabo de siete días de la inoculación se recupera un número de bacterias que está en el orden de 10<sup>3</sup> y que es estadísticamente diferente al número de bacterias recobradas en pulmones de los animales que se inocularon con las mismas dosis pero por vía IT. Estos resultados están en correspondencia con resultados mostrados en el acápite 4.1.1, donde se demuestra que por vía IN una parte del inóculo pasa a sistema digestivo, diseminándose hacia páncreas, hígado e intestino (ver Figura 7).

Al comparar los recobrados de bacterias en pulmón luego de la inoculación de diferentes dosis de BCG aplicadas por vía IN e IT se pudo comprobar que por la vía IN el recobrado fue significativamente menor en todos los casos, lo cual corrobora el hecho de que parte de las bacterias pasaron a sistema digestivo a partir del cual se diseminan hacia otros órganos.

En un estudio similar al realizado en el acápite 3.14.1.3, pero empleando la vía de inoculación IT, se pudo constatar que luego de este tipo de inoculación, los niveles de UFC recuperadas en pulmón a los 7, 14 y 21 días superaron en un orden a los valores obtenidos por vía IN. Por otra parte, se observó que además del pulmón, solo se obtuvieron colonias en hígado y bazo a los 21 días post- inoculación y no se detectaron colonias en el resto de los órganos evaluados (Figura 12).



**Figura 12:** Distribución tisular de *M. bovis* BCG en ratones Balb/c luego de la administración por vía IT de  $10^6$  células. Las muestras de tejido de cada órgano, extraídas a los 7, 14, 21 días post-inoculación, se maceraron e inocularon en medio Ogawa durante 28 días. En el resto de los órganos evaluados el conteo de UFC para micobacterias resultó negativo. Las barras representan la media, más la desviación estándar de los valores individuales de cada grupo experimental.

Con sus peculiaridades, ventajas y desventajas, las vías de inoculación IN e IT han sido utilizadas con relativo éxito en la evaluación de candidatos vacunales. Por ejemplo, la vacunación IN con BCG vivo o inactivado o las vacunas basadas en adenovirus recombinantes han mostrado protección frente al reto con *M. tuberculosis* (Falero-Díaz y cols., 2000a; Haile y cols., 2004; Chen y cols., 2004; Giri y cols., 2005; Buddle y cols.,

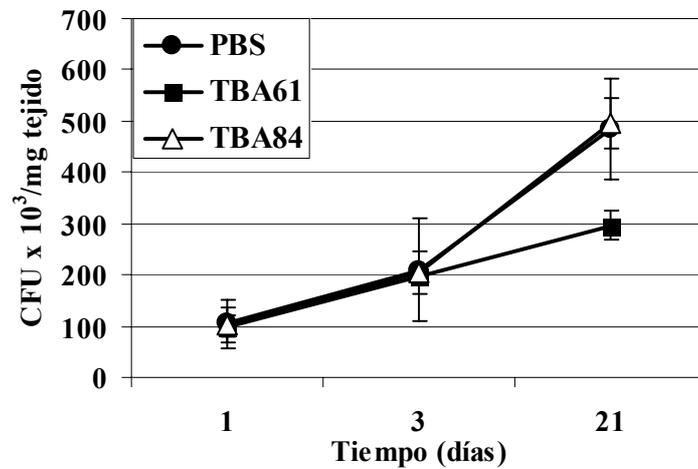
2005). Por otra parte, existen también antecedentes de que la vacunación nasal es el mejor modo para inducir una respuesta inmune robusta en los pulmones de los animales (Goonetilleke y cols., 2003; Santosuosso y cols., 2005; Carpenter y cols., 2005; Santosuosso y cols., 2006; Xing y Lichty, 2006). Por otro lado, a pesar de su aparición más reciente en la literatura (Hernández-Pando y cols., 1997) la ruta de inoculación IT ha demostrado ser efectiva en la evaluación de numerosos candidatos vacunales, drogas, así como en la comparación de la virulencia de diferentes cepas de *M. tuberculosis* (López y cols., 2003; Aguilar y cols., 2009).

Estos experimentos en su conjunto permitieron definir y optimizar una serie de parámetros necesarios para la posterior evaluación de candidatos vacunales o terapéuticos basados en formulaciones de anticuerpos y su protección a nivel del sistema de mucosas y directamente en pulmón.

#### **4.3. Estudio del carácter protector de los anticuerpos monoclonales TBA61 y TBA84 ante la infección por *M. tuberculosis* en un modelo de infección pulmonar progresiva**

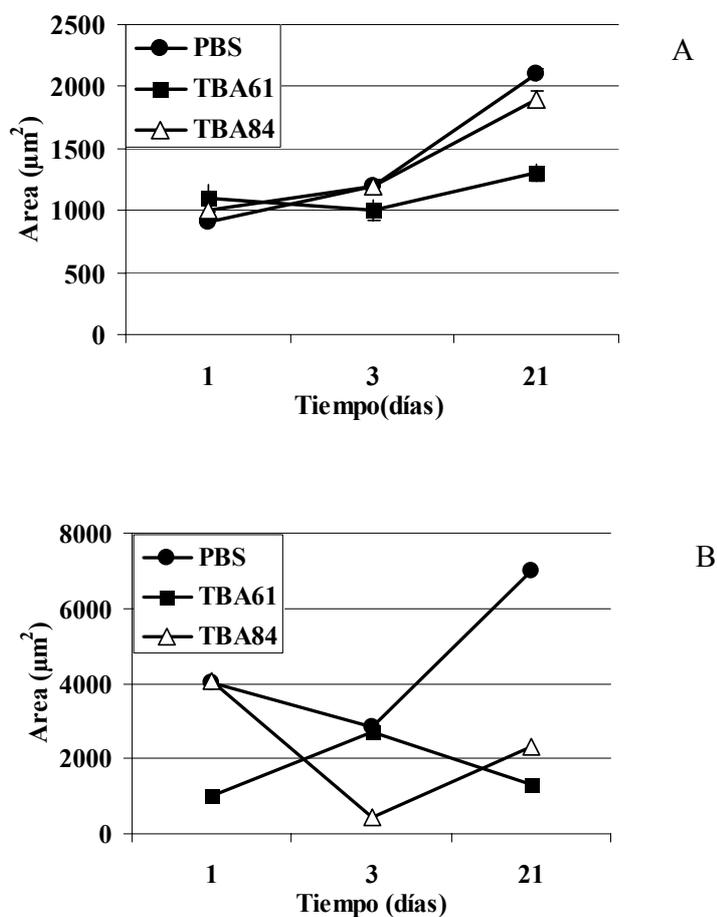
Se decidió evaluar el papel protector de anticuerpos específicos antimicobacterianos en modelos de reto por vía respiratoria. Se empleó la vía IT para la inoculación de los AcMs y la bacteria, pues en este caso se persiguió evaluar fundamentalmente la respuesta protectora y los cambios histológicos y morfométricos acontecidos en pulmón. A pesar de que la inoculación por vía IT requiere un mayor entrenamiento del personal, y una dosis mayor de anestesia a los animales en experimentación, son ineludibles las ventajas en cuanto a la administración directa del inóculo en las vías respiratorias y pulmón. Los AcM, de tipo IgA, denominados TBA61 y TBA84, incluidos en este experimento, están dirigidos contra las proteínas de 16 kDa (antígeno Acr) y 38 kDa (antígeno PstS-1) respectivamente (Falero-Díaz y cols., 2000a).

El conteo de UFC aisladas del pulmón de los ratones de los tres grupos evaluados fue similar tanto a las 24 h como a las 72 h después del reto. Sin embargo, a los 21 días post-infección, el tratamiento de los ratones con el AcM TBA61 causó una disminución significativa en el número de UFC de *M. tuberculosis* cuantificadas en pulmón respecto al grupo no tratado y el grupo tratado con el AcM TBA84 (Figura 13).



**Figura 13:** Determinación de la carga bacteriana en pulmones de ratones tratados con AcM TBA61, AcM TBA84 o PBS y retados con *M. tuberculosis* H37Rv 1 h después de la inoculación de los anticuerpos por vía intra-traqueal. A las 24, 72h y 21 días post-infección los pulmones se removieron, procesaron y se determinó el número de UFC. Solo los animales tratados con TBA61 mostraron una reducción significativa del número de UFC de *M. tuberculosis* ( $p < 0,05$ , prueba de Kruskal-Wallis) comparado con el resto de los grupos a 21 días post-inoculación.

Consistentemente con la reducción del número de bacterias viables lograda por el tratamiento con el anticuerpo TBA61, a los 21 días post-inoculación, el área de inflamación peribronquial fue también estadísticamente menor en este grupo comparada con el grupo control. Sin embargo, el área de inflamación perivascular no mostró diferencias entre los grupos evaluados (Figura 14 A y B).



**Figura 14:** Áreas de inflamación perivascular (A) y peribronquial (B) en pulmones extraídos a 1, 3 y 21 días post-infección de ratones inoculados con *M. tuberculosis*. Solo se obtuvieron diferencias estadísticas en el grupo tratado con TBA61 a los 21 días post-infección ( $p < 0,05$ , prueba de Kruskal-Wallis) comparado con el resto de los grupos.

La eficacia protectora del AcM TBA61 administrado intranasalmente antes y después de reto IN y nasal por aerosol con *M. tuberculosis* se demostró en un trabajo previo, pero la eficacia protectora fue de corta duración (Williams y cols., 2004). En el presente trabajo, se evaluó la eficacia protectora de este AcM administrado intra-traquealmente frente al reto IT con la bacteria, con el objetivo de evaluar la actividad de este anticuerpo usando otro modelo animal relevante para el estudio de la TB pulmonar. También se empleó en este estudio el AcM TBA84, dirigido contra otro antígeno micobacteriano. Los experimentos se condujeron con el

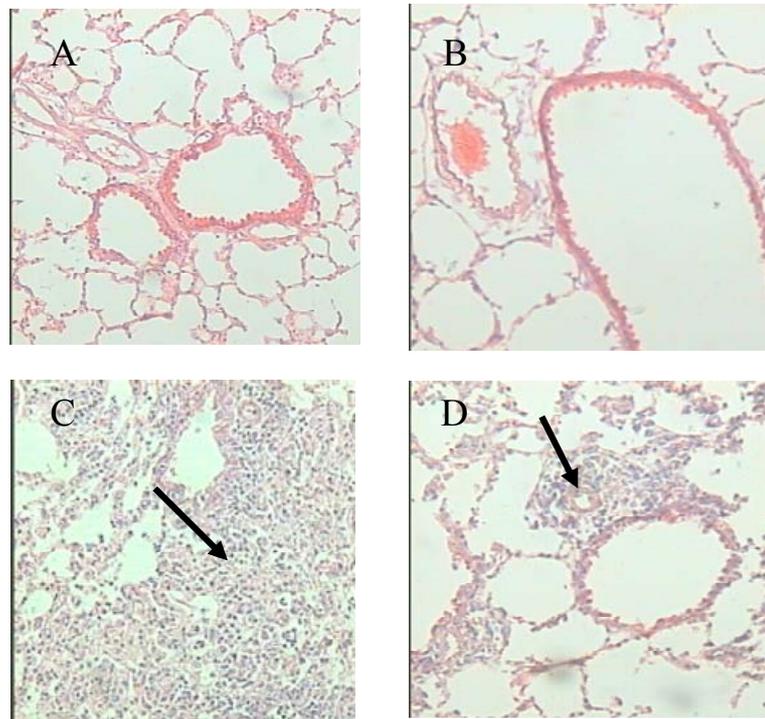
objetivo de evaluar el rol de estas formulaciones en la mucosa respiratoria inmediatamente después del encuentro con el patógeno.

El antígeno de 16 kDa es una proteína mayoritaria asociada con la membrana de *M. tuberculosis* (Lee y cols., 1992) y su expresión se ha visto aumentada en bacterias que crecen en macrófagos infectados, lo cual puede explicar el efecto protector del anticuerpo dirigido contra dicha proteína respecto al grupo tratado con el AcM TBA84. El bloqueo del antígeno Acr con el AcM TBA61 puede interferir con el crecimiento intracelular del bacilo tuberculoso (Reljic y cols., 2005). Por otra parte, se sugiere que este anticuerpo pudiera interactuar con la proteína Gal-3, que es una lectina de unión a la  $\beta$ -galactosidasa, inhibiendo la interacción de la micobacteria con el fagolisosoma, interfiriendo por tanto en la sobrevivencia de la bacteria en este compartimento celular (Reljic y cols., 2006b). El antígeno contra el cual está dirigido el AcM TBA84 no es considerado una proteína mayoritaria, a pesar de ser una proteína de superficie y secreción (Devi y cols., 2002). El fallo del anticuerpo TBA84 en la protección de los ratones luego de la infección se reportó también por Williams y col. (2004) usando el modelo de reto IN. En otro estudio de transmisión de ambos anticuerpos a fluidos mucosales y la sangre luego de inoculación intranasal y endovenosa, se demostró que la distribución del AcM TBA84 fue diferente a la del AcM TBA61, teniendo el primero una mayor persistencia en lavados pulmonares y sufriendo más pérdida durante el transporte a la saliva (Falero-Díaz y cols., 2000b). Esto sugiere el papel de los mecanismos mucosales sitio-específicos que involucran diferencias en la unión de IgA al componente secretorio o en la acción de algunas proteasas. Otros factores pudieran estar involucrados, como por ejemplo, la densidad de ambos antígenos en la superficie micobacteriana o la afinidad de ambos anticuerpos. La ausencia de cualquier efecto protector antes de los 21 días pudiera deberse a que la eliminación de la micobacteria opsonizada tarda más de 24 h.

Durante muchos años, los modelos animales para el estudio de la TB se basaron en el empleo de vías no naturales de infección (IV o IP) enmascarándose el fenómeno real (Logan y cols., 2008). El modelo de tuberculosis pulmonar progresiva usado en este trabajo permitió hacer un estudio acerca de la patología de la enfermedad, debido a que se inocularon un alto

número de bacterias vivas y virulentas directamente en la tráquea, garantizando un mejor control de la dosis y un depósito de estas bacterias en los pulmones.

Se decidió también examinar histopatológicamente diferentes secciones de los pulmones de los ratones tratados y no tratados (Figura 17), con base en estudios que indican la importancia de este tipo de estudios en la eficacia protectora conferida tras la administración de un candidato vacunal (Ulrichs y cols., 2004). Cuando los cortes de los pulmones se evaluaron histológicamente, los granulomas estuvieron mejor organizados en los animales infectados que recibieron anticuerpos contra la proteína de 16 kDa con respecto al grupo control o el grupo tratado con el AcM TBA84. También se observaron en este grupo menores áreas de neumonía. No se observaron reacciones inflamatorias en los pulmones de los ratones sacrificados 24 h post-infección. (Figura 15).



**Figura 15:** Secciones histológicas de tejidos de pulmón de ratones sacrificados a 24 h (A y B) y 21 días (C y D) después del reto con la bacteria. Las secciones fijadas en formalina se analizaron microscópicamente (aumento 40X). Los granulomas fueron más evidentes a partir de las tres semanas de infección y estuvieron mejor organizados en los ratones tratados con TBA61 (D) comparados con aquellos animales inoculados con PBS (C). Las flechas indican formaciones granulomatosas.

Por ejemplo, el AcM 9d8 dirigido contra el polisacárido de superficie arabinomanano, previamente incubado con *M. tuberculosis*, prolongó la supervivencia de ratones inmunocompetentes e inmunosuprimidos. En ese estudio, sin embargo, no hubo reducción del número de UFC en los ratones que recibieron este AcM. El estudio histopatológico mostró un aumento en la formación de granulomas y de la contención del bacilo dentro de los granulomas en los pulmones de los ratones tratados con este anticuerpo. Esos resultados sugirieron que ese anticuerpo indujo una modulación de la respuesta inmune que resultó en una respuesta celular efectiva (Glatman-Freedman, 2006).

En otro estudio, el AcM SMITHB14, un anticuerpo del tipo IgG1 específico al arabinomanano, prolongó la supervivencia de ratones inmunocompetentes luego de administración local o sistémica. Este anticuerpo también condujo a la reducción de UFC en órganos y una disminución de la pérdida de peso corporal. Por otra parte, la administración del AcM SMITHB14 previo a la infección, condujo a la disminución del número de UFC dos días después de la infección en ratones (Hamasur y cols., 2004).

El AcM MBS43 (IgG2b específico contra la lipoglicoproteína MPB83) preincubado con *M. bovis* previo a la infección intravenosa, prolongó significativamente la supervivencia de los ratones tratados. En este estudio, se reportó que los pulmones de estos ratones tenían el parénquima más preservado y una mayor contención de los bacilos dentro de las estructuras granulomatosas, a pesar de no haberse reportado una disminución estadísticamente significativa de las UFC (Chambers y cols., 2004).

Previamente se había demostrado que la administración de AcM anti-HBHA eran capaces de modificar el curso de la infección en ratones (Pethe y cols., 2001). Además, recientemente se sugirió que la inmunización con anticuerpos inducidos por HBHA podía proteger contra el reto micobacteriano (Kohama y cols., 2008). Sin embargo, en un estudio aún más reciente realizado por Rouanet y col. (2009), en el que se realizó un régimen de estimulación/refuerzo con BCG/HBHA previo al reto intravenoso con *M. tuberculosis*, se pudo comprobar que la respuesta humoral contra HBHA no se correlacionó con el efecto protector observado luego de la reestimulación con HBHA (Rouanet y cols., 2009).

Actualmente se acepta que isotipos específicos de anticuerpos, como IgG e IgA y células T son requeridos para la inducción de inmunidad protectora frente a patógenos intracelulares.

Los AcM usados en este trabajo son de la clase IgA, por lo que se asumió que su acción pudiera involucrar un número de mecanismos: mediante la estimulación de la inducción de efectores Th1 a través de la toma rápida del antígeno mediada por receptores Fc; aumento del procesamiento antigénico; incremento de la eficiencia de las señales coestimuladoras; la rápida presentación del antígeno para la activación de una respuesta Th1 elevada, un mayor direccionamiento hacia los pulmones luego de la infección respiratoria y el aumento de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (Reynolds, 1987; Regnault y cols., 1999; Ravetch y Bolland, 2001; Robinson y cols., 2001; Casadevall y Pirofski, 2003; Monteiro y cols., 2003; Iankov y cols., 2004). Estos resultados apoyan la idea de que algunos anticuerpos, si están presentes en el sitio y el momento de la entrada del patógeno al hospedero, pueden alterar el curso de la infección micobacteriana.

En los experimentos del presente trabajo, el efecto protector de este anticuerpo, evidenciado por una reducción en el número de UFC y una menor patología pulmonar, se detectó solo a los 21 días post- infección. Teniendo en cuenta que el tiempo de vida media para las inmunoglobulinas es de 11 a 21 días (Roy y cols., 2005) y que la micobacteria posee tres fases de crecimiento extracelular (al inicio de la infección; durante la formación de granulomas en el tejido pulmonar, a partir de los 21 días; y en el momento en que ocurre la muerte de las células infectadas), se consideró que en este caso la acción protectora del anticuerpo no estuvo dada por la interacción del anticuerpo con las micobacterias, sino más bien por la acción moduladora sobre la respuesta inmune celular, que pudo ser detectable al cabo de la tercera semana post- infección.

#### **4.4. Estudio del carácter protector de una biblioteca de expresión frente al reto con BCG en un modelo de infección pulmonar progresiva**

La metodología de construcción de genotecas de expresión, ha sido muy empleada en la identificación de genes que codifiquen para antígenos posibles a ser usados como candidatos vacunales (Piedrafita y cols., 1999; Melby y cols., 2000; Fachado y cols., 2003; Yero y cols., 2005).

El método de inmunización con bibliotecas de expresión se seleccionó para este trabajo ya que además es una herramienta de búsqueda de candidatos vacunales que ofrece ventajas

adicionales sobre otras metodologías de la genómica. Constituye un método de búsqueda basado en la interacción directa de los antígenos con el sistema inmune, no implica que los antígenos identificados tengan que ser necesariamente clonados, expresados y purificados previo a los ensayos de inmunogenicidad y reto, y además, esta tecnología ha demostrado ser efectiva para detectar combinaciones de antígenos que actúan sinérgicamente en el desarrollo de una respuesta protectora (Barry y cols., 2004).

#### **4.4.1. Construcción de la genoteca de expresión de *M. tuberculosis***

Para la construcción de una biblioteca genómica se debe de partir del ADN genómico completo del microorganismo en cuestión y fraccionarlo al azar con vistas a lograr la clonación de los fragmentos generados en vectores de expresión eucarióticos. Con la disponibilidad de un adecuado modelo animal, es posible, mediante la inmunización con estos plasmidios recombinantes, lograr identificar los genes capaces de codificar antígenos protectogénicos.

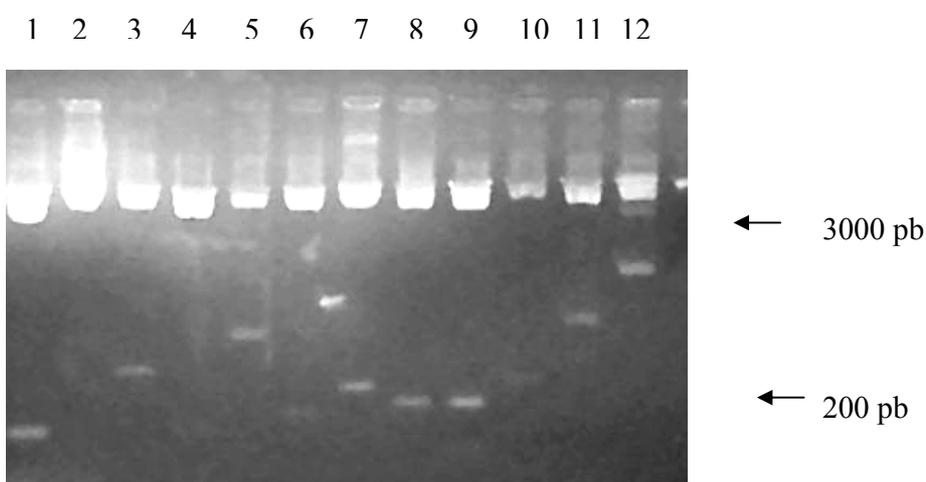
La endonucleasa de restricción *Sau3AI*, cuya secuencia de reconocimiento es GATC, fracciona teóricamente el ADN genómico de la cepa de *M. tuberculosis* H37Rv (Cole y cols., 1998) en 31 359 fragmentos con una talla promedio de 140 pb. Como el tamaño promedio que se requería para la construcción de la genoteca es de aproximadamente 1750 pb, talla que coincide con el tamaño promedio de proteínas de *M. tuberculosis* (Rosenkrands y cols., 2000), se realizó una digestión parcial con la enzima y por tanto se ajustó la concentración enzimática adecuada para este propósito.

Se escogió como concentración óptima 0,5 U de enzima / $\mu$ g de ADN, pues con esta se obtienen fragmentos de ADN comprendidos en el rango de 0,5-3 kb, que para el caso de *M. tuberculosis*, se corresponde con el tamaño promedio de los genes que codifican para la mayoría de las proteínas de interés, como por ejemplo, los que codifican para las proteínas Hsp65 (1,8 kb), 38 kDa (1,053 kb), la proteína de secreción 27 kDa (0,75 kb), la superóxido dismutasa de 23 kDa (0,6 kb) y las proteínas de transporte a través de membrana (3,0 kb) (Schmidt y cols., 2004).

Los fragmentos de ADN generados al azar por corte enzimático, se clonaron en el vector pELI3.1 en condiciones apropiadas para favorecer la inserción de dichos fragmentos en el sitio específico de este vector de expresión. Para verificar la inserción de fragmentos

genómicos en los plasmidios fue necesario realizar una doble digestión a algunos plasmidios purificados a partir de colonias blancas seleccionadas al azar.

Como se muestra en la Figura 16, en el análisis de restricción realizado a los plasmidios purificados a partir de las 12 colonias seleccionadas al azar, se pudo evidenciar la presencia de bandas de menor tamaño (0,5-1 kb) correspondientes probablemente a los fragmentos del genoma de *M. tuberculosis* insertados y una banda de mayor tamaño (alrededor de 3 kb) correspondiente al plasmidio pELI3.1 linealizado. Este resultado demostró que los fragmentos genómicos se insertaron en el plasmidio y en esta muestra de colonias, escogidas al azar, la inserción ocurrió para un 83% de frecuencia de recombinantes.



**Figura 16:** Electroforesis en gel de agarosa al 0,8% donde se muestra el resultado de la doble digestión (*EcoRI*/*NheI*) de algunos plasmidios purificados al azar a partir de colonias blancas obtenidas durante la construcción de la biblioteca genómica de *M. tuberculosis*. Líneas 1-12: plasmidios digeridos.

A partir de cada subgenoteca obtenida, cada una en un marco de lectura diferente con el objetivo de aumentar la probabilidad de que el inserto genómico fuera traducido correctamente, se purificaron los plasmidios. Con estos plasmidios se elaboró el inmunógeno, constituido por 4 mg de la mezcla total de estos grupos de plasmidios en los tres marcos de lectura, de manera que de cada subgenoteca se tomó 1 mg de la mezcla de plasmidios, tal y como se muestra en la Tabla 6.

Tabla 6: Composición de las subgenotecas construidas y de la genoteca total. Se muestra además el nivel de pureza de las preparaciones en cuanto a la relación de absorbancia a 260 y 280 nm.

INMUNÓGENO	Nº. DE CLONES INDIVIDUALES	MARCO DE LECTURA	BIOMASA DE <i>E. COLI</i> (POR 1,5 L DE MEDIO)	CANTIDAD DE ADN (MG)	RELACIÓN ABSORBANCIA 260/280 NM
<b>1</b>	<b>1920</b>	<b>+1</b>	<b>6,9 G</b>	<b>1,05</b>	<b>1,71</b>
<b>2</b>	<b>1825</b>	<b>+1</b>	<b>7,2 G</b>	<b>2,45</b>	<b>1,74</b>
<b>3</b>	<b>2112</b>	<b>+2</b>	<b>7,9 G</b>	<b>2,79</b>	<b>1,73</b>
<b>4</b>	<b>2400</b>	<b>+3</b>	<b>7,4 G</b>	<b>3,42</b>	<b>1,79</b>
<b>PELI 3.1</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>8,0 G</b>	<b>5,35</b>	<b>1,75</b>
<b>GENOTECA</b>	<b>8257</b>	<b>+1,+2,</b>	<b>-</b>	<b>4,00</b>	<b>1,76</b>
<b>TOTAL</b>		<b>+3</b>			

Previamente se había incursionado por otros autores en el uso de bibliotecas de expresión para identificar antígenos relevantes de especies del género *Mycobacterium*. El trabajo pionero en el que se usaron bibliotecas de expresión de *M. tuberculosis* fue un estudio realizado en el que se inmunizaron ratones con una genoteca no anotada del microorganismo. Se demostró mediante Western blott el reconocimiento de bandas específicas en el sonificado de BCG y en el derivado proteico precipitado de *M. tuberculosis* (PPD) frente al suero de los animales inmunizados con la genoteca (Acosta, 2001). Por otro lado, Delcayre y cols. (2003) desarrollaron una estrategia para identificar polipéptidos micobacterianos fuertemente inmunogénicos. En un primer paso, una biblioteca genómica de expresión de *M. vaccae* se evaluó *in vitro* para identificar plasmidios que codificaran polipéptidos que estimularan esplenocitos obtenidos a partir de ratones inmunizados y de células T de donantes sanos positivos a PPD. En un segundo paso, se seleccionaron los plasmidios capaces de inducir una inmunidad protectora en un modelo murino de TB luego de la inmunización con ADN. Como resultado, se aisló exitosamente una selección de plasmidios a partir de la biblioteca genómica, que codifican polipéptidos antigénicos con habilidad para reestimar la respuesta Th1 inducida en individuos previamente expuestos a micobacterias y que inducen una inmunidad protectora en un modelo murino de TB, pudiendo constituir posibles candidatos vacunales para el desarrollo de una vacuna multiepitópica. Huntley y cols. (2005)

demonstraron protección frente al reto con *M. avium* subespecie paratuberculosis, llegándose a identificar 26 antígenos responsables de esta protección.

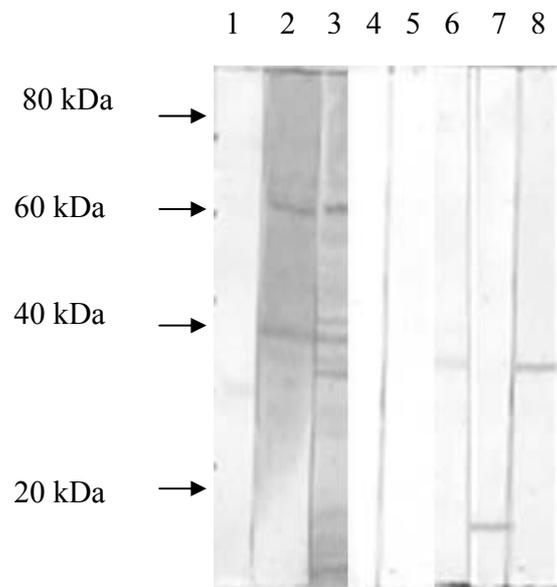
Por otra parte, existe un estudio reciente en el que a partir de una genoteca construida de *M. tuberculosis* (cepa Erdman), se enfrentó esta a líneas celulares T CD4<sup>+</sup> y se detectaron algunos antígenos, que se secuenciaron y uno de ellos se evaluó en un modelo de inmunización y reto, constituyendo este reporte una evidencia más, acerca de la invaluable utilización de genotecas de expresión en la evaluación del genoma del patógeno con el objetivo de encontrar candidatos vacunales (Coler y cols., 2009).

Uno de los aportes del presente trabajo radica también en el diseño que se realizó durante la construcción de la genoteca, algo hasta ahora llevado a cabo por muy pocos autores. En este sentido se utilizó el vector de expresión eucariótico diseñado por Yero y cols. (2005), que, además del cassette clásico para la expresión en células superiores, contiene el gen que codifica para la subunidad  $\alpha$  de la enzima  $\beta$ -galactosidasa con el objetivo de lograr una precisa selección de los plasmidios recombinantes basada en el método de selección de colonias blancas y azules. En el estudio realizado anteriormente por Acosta y cols. (2001), la frecuencia de aparición de recombinantes en la genoteca no anotada de *M. tuberculosis* al analizar una muestra aleatoria de igual tamaño, fue del 75%. Sin embargo, el vector usado en esa oportunidad fue el pcDNA3, que no contenía el gen *lacZ* que codifica la subunidad  $\alpha$  de la enzima  $\beta$  galactosidasa, por lo que la frecuencia de clones recombinantes obtenida en ese estudio fue menor.

#### **4.4.2. Evaluación de la expresión de proteínas de *M. tuberculosis* en la cepa Top10 de *E. coli* transformada con la genoteca**

Previo a evaluar en un estudio *in vivo* el carácter protector de esta genoteca frente al reto con micobacterias, se evaluó mediante un estudio *in vitro* la expresión de proteínas de *M. tuberculosis* codificadas por genes contenidos en esta biblioteca. Para ello se determinó si algunas de estas proteínas codificadas podían ser reconocidas por anticuerpos monoclonales así como anticuerpos presentes en sueros de donantes sanos y enfermos de TB y que en alguna medida han sido reconocidos como mediadores en la inducción de una respuesta inmune efectiva frente a *M. tuberculosis*. El vector pELI3.1 utilizado durante la construcción de la genoteca, además del promotor para células superiores, contiene un promotor para

expresión en bacterias (pLac) que regula la expresión de los mismos genes insertados en él (Yero y cols., 2005). La síntesis de proteínas bajo el promotor pLac se induce suplementando el cultivo con el inductor IPTG. Los resultados del Western Blot se muestran en la Figura 17.



**Figura 17:** Western Blot donde se muestra el resultado de la expresión de la síntesis de proteínas de *M. tuberculosis* por la cepa Top10 de *E. coli* transformada con la genoteca (líneas 2,3,5,6,7,8) y con el plasmidio control (línea 4). Línea 2: *E. coli* transformada con genoteca y enfrentada a sueros adsorbidos\* de pacientes tuberculosos. Línea 3: *E. coli* transformada con genoteca y enfrentada a sueros sin adsorber de pacientes tuberculosos. Línea 4: *E. coli* transformada con el vector vacío y enfrentada al anticuerpo monoclonal TBA61. Línea 5: *E. coli* transformada con la genoteca completa sin inducir con IPTG. Línea 6: *E. coli* transformada con genoteca y enfrentada a sueros de donantes sanos. Línea 7: *E. coli* transformada con la genoteca completa y enfrentada al anticuerpo monoclonal TBA61. Línea 8: *E. coli* transformada con la genoteca completa y enfrentada al anticuerpo monoclonal TBA84. \* Sueros adsorbidos frente a lisado de *E. coli*

De los resultados obtenidos en la Figura 17 se puede deducir como primer elemento importante, que la inducción de la síntesis de proteínas con IPTG fue efectiva. Debido a que se escogió suero humano para evaluar el reconocimiento de las proteínas, fue necesario adsorber la mezcla de sueros con un lisado de *E. coli* para neutralizar los anticuerpos que contra muchas proteínas de este microorganismo, se encuentran normalmente presentes en el suero humano. En la línea 2 se observa una banda en la región de 66 kDa y otra cercana a los

40 kDa. Estas bandas pudieran corresponderse con la proteína de 65 kDa o estrés térmico, que es una proteína constitutiva citoplasmática que incrementa su síntesis frente a estímulos estresantes. La otra banda puede corresponderse con la proteína de 38 kDa. Esta proteína es constitutiva de la pared celular, presente en *M. tuberculosis* y en menor medida en *M. bovis*. La línea 5 se corresponde con la cepa de *E. coli* transformada con la genoteca, pero sin inducir con IPTG. Acorde con esto, no se observa ningún reconocimiento frente al anticuerpo monoclonal. De igual manera ocurrió al inducir la expresión de las proteínas en el cultivo de la cepa Top 10 transformada con el plasmidio pELI3.1 (línea 4) donde al enfrentarse al AcM TBA61, no hubo ningún reconocimiento.

En la línea 6 se puede apreciar también reconocimiento de al menos una proteína, aunque en menor grado, debido a que las membranas se enfrentaron con suero humano (donante sano). Esta banda coincide en tamaño con la proteína de 38 kDa, que se ha reportado como marcador diagnóstico de la TB. Los anticuerpos presentes en este suero pueden deberse a la inmunización con BCG, que en Cuba se realiza desde edades tempranas a toda la población (Marrero Figueroa, 1998).

Las líneas 7 y 8 se corresponden con la cepa de *E. coli* transformada con la genoteca, inducida y enfrentada a los anticuerpos monoclonales TBA61 y TBA84 (los mismos que se usaron en los experimentos relacionados con la determinación del carácter protector de estos frente al reto con la micobacteria por vía IT). Se pudo apreciar reconocimiento de bandas por estos dos anticuerpos. De esto pudiera interpretarse que en la genoteca debían estar contenidos genes que codifican para estas proteínas.

Teóricamente, en la biblioteca se encuentra representada una parte importante del genoma completo del microorganismo, pero debe de tenerse en cuenta que durante la clonación de estos fragmentos en el vector, muchos genes pueden no haberse insertado en la posición correcta, lo cual afecta la síntesis de las proteínas que codifican dichos genes. Como el fraccionamiento del genoma se realizó al azar, es posible además que se truncaran muchos genes que codifiquen para proteínas relevantes de *M. tuberculosis*, lo que impide su expresión. Otro factor que puede afectar la expresión de proteínas de *M. tuberculosis* es la diferente utilización de codones por los dos microorganismos. Es posible por tanto que se esté subestimando la efectividad de esta genoteca a través de los estudios de expresión en *E.*

*coli*. Sin embargo, este estudio constituye un paso importante para corroborar la expresión funcional de los genes clonados en el vector de expresión.

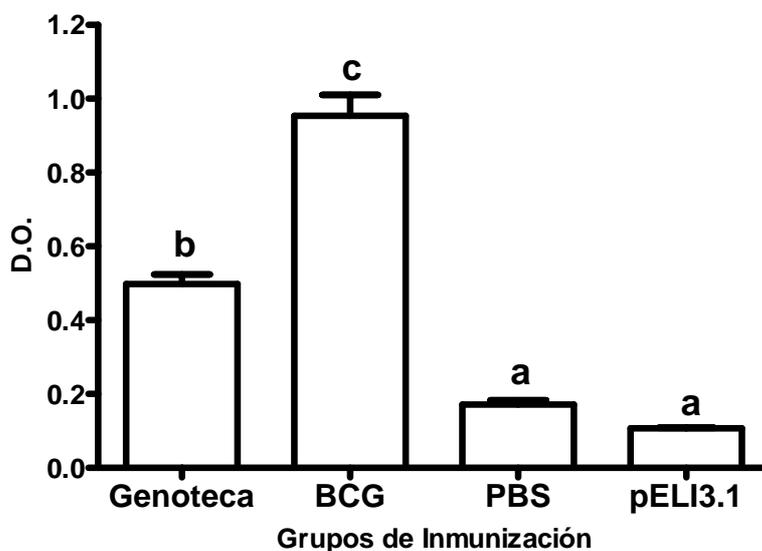
En este estudio se pudo constatar el reconocimiento inmune por parte de los AcM TBA61 y TBA84 contra las proteínas de 16 kDa y 38 kDa, respectivamente. Esto sugiere que al menos *in vitro* estas proteínas están siendo expresadas en la cepa de *E. coli* transformada con la genoteca, por lo que en la mezcla de genes obtenida por fraccionamiento al azar se encuentran presentes los genes que codifican para estas proteínas o al menos polipéptidos que portan los epítopes reconocidos por estos AcM.

En un estudio reciente, una línea de células T CD4<sup>+</sup> obtenida a partir de la sangre de nueve donantes sanos PPD<sup>+</sup>, fue usada para evaluar una biblioteca genómica de *M. tuberculosis* expresada en *E. coli*. Con este ensayo se identificaron numerosos antígenos de *M. tuberculosis*, incluyendo el antígeno de 16 kDa (Coler y cols., 2009).

Una vez demostrado que la biblioteca construida contenía clones que expresaban proteínas inmunogénicas de *M. tuberculosis* y para demostrar la utilidad de los modelos animales propuestos en este trabajo, se evaluó el efecto protector que la mezcla total de plasmidios que conforman la genoteca pudiera tener frente a la infección con micobacterias. Para ello, se llevó a cabo la inmunización de ratones Balb/c con la genoteca total, por ser el ratón el modelo animal ampliamente descrito en el estudio de nuevos candidatos contra la TB.

#### **4.4.3. Evaluación de la respuesta de anticuerpos de tipo IgG después de inmunizar con la genoteca de expresión de *M. tuberculosis***

En la Figura 18 se aprecia, que en los animales inmunizados con BCG (control positivo), el título de anticuerpos IgG que se obtuvo fue significativamente mayor que con el resto de los animales en estudio ( $p < 0,05$ ). En el caso de los animales inmunizados con la genoteca, se obtuvo una respuesta de anticuerpos que fue estadísticamente superior ( $p < 0,05$ ) a la de los animales inmunizados con el plasmidio pELI3.1 y con PBS (grupos control negativo), pero menor que la de los animales inmunizados con BCG. Este resultado constituye una evidencia acerca de la presencia en el suero de los animales inmunizados con la biblioteca, de anticuerpos específicos contra antígenos micobacterianos.



**Figura 18:** Respuesta de anticuerpos en los sueros de los ratones inmunizados con PBS, Plásmido pELI3.1, Genoteca y BCG, tres semanas después de la última inmunización. La respuesta de anticuerpos del tipo IgG se determinó mediante un ELISA de células completas de BCG. Los valores representan el promedio de las D.O. de las muestras de suero correspondientes a cada grupo. Se encontraron diferencias significativas para un  $\alpha = 0,05$  en test de Kruskal-Wallis entre los grupos tratados con BCG y la genoteca. La respuesta obtenida en estos dos grupos, fue a su vez, estadísticamente superior que la obtenida en animales inmunizados con PBS y el vector vacío. Las barras representan la media, más la desviación estándar de los valores individuales de cada grupo experimental. Letras diferentes significan que hubo diferencia estadística entre las medias geométricas de cada grupo.

La inmunización con bibliotecas de expresión tiene su basamento en las vacunas de ADN (Koide y cols., 2000). Las vacunas de ácidos nucleicos representan un método para expresar antígenos *in vivo* con la consiguiente generación de respuesta inmune humoral y celular. También se ha demostrado que son capaces de inducir inmunidad protectora en un número considerable de modelos preclínicos (Donnelly y cols., 1997b). Esta forma de inmunización ha mostrado ser efectiva en la generación de anticuerpos contra algunos antígenos y microorganismos. Sin embargo, numerosos autores han realizado la evaluación satisfactoria mediante la técnica ELISA de la respuesta inmune humoral conferida tras la inmunización de ratones con vacunas de ácidos nucleicos. En un trabajo previo, en el que se realizó la inyección intramuscular en ratones con ADN plásmidico que contiene el gen que codifica

para el antígeno 85B, se detectó en un ELISA la presencia de anticuerpos IgG1, IgG2a, IgG2b específicos paraa antígenos de *M. tuberculosis*. En ese trabajo, se indujo un nivel alto y persistente en el tiempo de anticuerpos del tipo IgG2a específicos a este antígeno comparado con la vacunación con BCG (Tollefsen y cols., 2002).

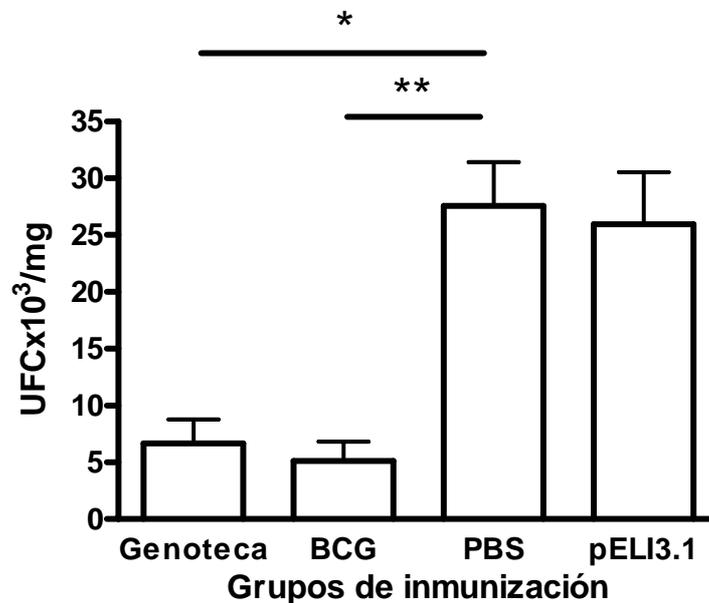
En otro trabajo realizado por Fan y cols. (2001), se demostró (mediante ELISA y dot blot), la inducción de un alto título de anticuerpos contra el antígeno 85B de *M. tuberculosis* en ratones Balb/c, 4 semanas después de haber sido vacunados con un plasmidio que portaba el gen que codifica para dicho antígeno. En otro trabajo realizado por Tian y cols. (2004), se inmunizaron ratones C57BL-6 con tres dosis de una vacuna divalente, que contenía los genes que codifican para los antígenos Ag85B y MPT64 de *M. tuberculosis* fusionados y clonados en un vector de expresión eucariótico. Mediante la técnica ELISA, los autores evaluaron la respuesta humoral específica a estos antígenos y se demostró la inducción de un alto título de anticuerpos del tipo IgG específico a estos antígenos.

En este estudio en particular, las variaciones de la respuesta observada entre distintos animales del grupo inmunizado con la genoteca, reflejan que aunque la composición y la dosis de los inóculos suministrados a los animales fue la misma, los plasmidios que lograron transfectar los miocitos y expresar el polipéptido codificado por el gen que contenían, debió ser diferente en cada animal inmunizado. Sin embargo, otro factor muy importante a tener en cuenta en este caso es que el ELISA se realizó con células completas de BCG. En este caso, serían reconocidos solamente anticuerpos contra aquellas proteínas de superficie que estuvieran presentes tanto en *M. tuberculosis* como en BCG. Por tal motivo, es de gran importancia en futuros trabajos estandarizar un ELISA recubriendo con un sonicado de células de *M. tuberculosis*, lo cual brindaría más posibilidad de detectar anticuerpos contra proteínas intracelulares o aquellas proteínas que se conoce son inmunodominantes y están presentes en *M. tuberculosis* pero no en *M. bovis* BCG.

#### **4.4.4. Evaluación del carácter protector de la genoteca de *M. tuberculosis* frente al reto con BCG**

Una vez construida la genoteca de expresión, evaluada su expresión *in vitro* y la respuesta de anticuerpos inducida tras la inmunización con esta, se procedió a evaluar el carácter protector de la misma frente al reto con micobacterias. Se decidió emplear como vía de reto la vía IT.

Los ratones se retaron con BCG y se sacrificaron 21 días post- inoculación para evaluar el nivel de protección conferido por la genoteca mediante la evaluación de la reducción del número de UFC, mostrado en la Figura 19.



**Figura 19:** Se muestra el resultado del experimento de reto frente a la infección intra-traqueal con BCG. Los valores representan los logaritmos de las UFC/mg de tejido recuperado en cada grupo estudiado. A los animales del grupo control negativo se les administró PBS. Los animales inmunizados con BCG recibieron una sola dosis ( $10^5$  UFC) por vía subcutánea. Los animales inmunizados con la genoteca de *M. tuberculosis* y plasmidio (vector vacío) recibieron tres dosis de  $1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  contenidas en  $100 \mu\text{L}$  por vía intramuscular. Las barras representan la media, más la desviación estándar de los valores individuales de cada grupo experimental.

\*\* : Diferencias significativas para  $p < 0,01$ , mediante la prueba de Kruskal Wallis

En este estudio, los animales se inmunizaron con tres dosis de la genoteca administrada por vía intramuscular, a diferencia del grupo control positivo, que se inmunizó con  $10^5$  UFC de *M. bovis* BCG administradas por vía subcutánea. Se utilizaron diferentes vías de inoculación de acuerdo con lo informado en la literatura para cada tipo de formulación en particular. En el caso de la genoteca, se trata de una formulación semejante a una vacuna de ADN, que ya ha sido informada la inducción de una respuesta inmune efectiva cuando es administrada por vía intramuscular en dosis de  $100 \mu\text{g}$  contenidos en  $100 \mu\text{L}$  de inóculo (Donnelly y cols., 1997a). En el caso específico de *M. tuberculosis*, se informó que las vacunas de ADN combinadas

que codifican los antígenos Ag85B y MPT64 eran capaces de inducir una respuesta inmune mayor que la inducida luego de la inmunización con cualquiera de las dos vacunas por sí solas, y se han desarrollado varias vacunas de ADN constituidas por dos, tres, cuatro e incluso 10 plasmidios diferentes que expresan varios antígenos (Kamath y cols., 1999; Morris y cols., 2000; Delogu y cols., 2002; Cai y cols., 2002; Cai y cols., 2003). En un estudio realizado por Delogu y cols. (2002) se demostró que luego del reto con una cepa virulenta de *M. tuberculosis*, en el grupo de los ratones inmunizados con la combinación de 10 vacunas de ADN, hubo una mayor reducción de la carga bacteriana en pulmón e hígado, una menor patología pulmonar y un incremento en la producción de citoquinas con respecto al grupo control.

En la Figura 19 se muestra que hubo una reducción estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) de las UFC recobradas de los pulmones de los animales que se trataron con la genoteca y con BCG (control positivo) con respecto a aquellos que se trataron con el vector vacío y PBS. La magnitud de la protección conferida por la genoteca de expresión se midió por la reducción en el número de UFC en el pulmón, la cual fue comparable con la protección inducida por la vacuna basada en *M. bovis* BCG. Aunque no se conoce en este estudio el componente específico de la mezcla de plasmidios responsable de conferir protección, este resultado indica que al menos uno de estos plasmidios o una fracción de ellos codifica para antígenos. Con este experimento se demuestra que estos clones se expresan también *in vivo*. Por otra parte, consistentemente con la presencia de anticuerpos en el suero de los animales inmunizados con la genoteca, se puede inferir que al menos, si no es el único factor, debido a que no se deben excluir los mecanismos de respuesta celular, los anticuerpos desempeñan un papel protector en la defensa contra la TB.

#### **4.4.5. Estudio Anatomopatológico de los pulmones de ratones inmunizados con la genoteca.**

Debido a que no siempre la disminución en el número de UFC en pulmón luego de la infección con *M. tuberculosis* constituye por sí solo un correlato de protección, era necesario evaluar otros aspectos importantes, tales como la patología pulmonar. En la Tabla 7 se muestran los resultados del estudio histopatológico, reflejándose la proporción de animales

que desarrollaron lesiones granulomatosas en cada grupo, así como la composición del infiltrado inflamatorio observado en los cortes histológicos de pulmón.

Tabla 7: Cambios histopatológicos en los pulmones de los animales 14 días después del reto con BCG.

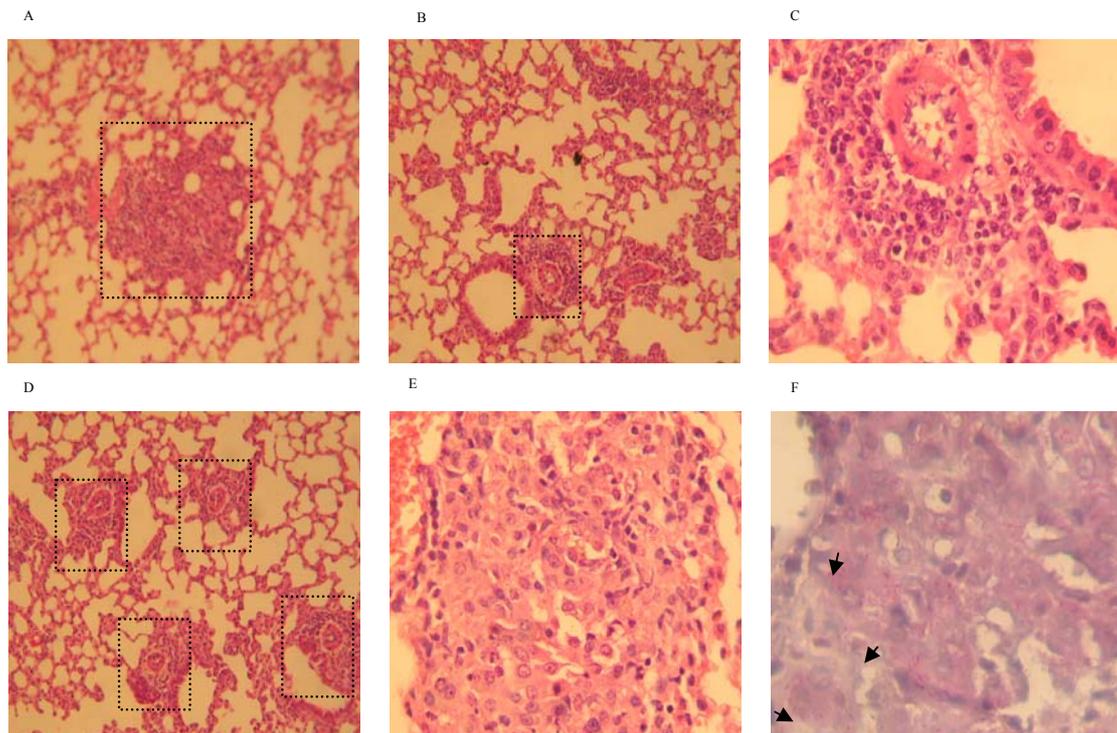
Grupo	Proporción de animales con granulomas (%)	Infiltrado perivascular	Tinción de Zielh-Neelsen**
<b>BCG</b>	22%*	Discretos acúmulos de células redondas	+
<b>Genoteca</b>	25%* (granulomas muy bien organizados)	Algunos neutrófilos acumulados.	+
<b>Plásmido</b>	50%	Infiltrado mononuclear	++
<b>PBS</b>	75%	Acúmulo de células inflamatorias, linfocitos y neutrófilos.	+++

\*: Diferencias con respecto al grupo tratado con PBS para  $p = 0,028$  (Prueba Exacta de Fisher)

\*\* : Presencia de bacilos ácido-alcohol resistentes. La cantidad de + indica la abundancia relativa.

Se pudo observar, tal y como se resume en la Tabla 7, que la aparición de granulomas fue más generalizada en los ratones inmunizados con PBS y el vector vacío, que con respecto a los animales inmunizados con BCG y la genoteca. Al realizar la observación al microscopio óptico de los cortes de pulmón teñidos con hematoxilina-eosina, se pudo detallar la apariencia y composición general de los granulomas desarrollados en cada grupo. Todas estas lesiones se consideran incipientes, pues los animales se sacrificaron a los 14 días, tiempo en el cual estas lesiones comienzan a desarrollarse.

La Figura 20 representa los cortes de pulmón a los 14 días luego del reto IT con BCG luego de una tinción con hematoxilina-eosina y Zielh-Neelsen.



**Figura 20:** Secciones histológicas de los pulmones de ratones inmunizados con los diferentes grupos y retados 21 días después con BCG por vía IT. A: Ratón inmunizado con BCG (formaciones granulomatosas incipientes, HE 80X). B: Ratón inmunizado con vector pELI 3.1. (formación granulomatosa alrededor de una arteriola, HE 80X), C: Ratón inmunizado con la genoteca de expresión (infiltrado inflamatorio perivascular, HE 120X), D: Ratón inoculado con PBS (varias formaciones granulomatosas diseminadas en el parénquima pulmonar, HE 80X), E: Ratón inoculado con PBS (vista más ampliada de una formación granulomatosa donde se observa el infiltrado de células fagocíticas y mononucleadas, HE 180X), F: Ratón inoculado con PBS (tinción de Ziehl Neelsen donde se aprecian los bacilos contenidos en el tejido granulomatoso, 220X).

En cuanto a la evaluación histopatológica, en este caso, se observa un menor número de granulomas en los ratones vacunados con la genoteca y con BCG. Estos aspectos repercuten en un mejor control del crecimiento bacteriano y coincidentemente, en estos dos grupos se obtuvieron menores valores de UFC recobradas en pulmón, una menor inflamación del tejido en general y por tanto una mejor respuesta protectora. El hecho de que el reto se haya realizado con BCG no es contradictorio con estos resultados, pues ya ha sido demostrado en estudios anteriores que, administrado incluso por distintas vías, este microorganismo se biodistribuye de manera similar en ratones y causa lesiones granulomatosas e infiltrado celular similar a los inducidos por *M. tuberculosis* (Acosta y cols., 1994).

Los resultados obtenidos, en los que se refleja una reducción significativa en número de UFC recobradas de los pulmones de los animales inmunizados con la genoteca, una menor patología pulmonar y una respuesta de anticuerpos significativamente superior a la inducida en los animales no inmunizados, sugieren que en esta genoteca se encuentran genes que codifican para proteínas de *M. tuberculosis* capaces de estimular una respuesta inmune protectora en el modelo animal estudiado.

## **V. DISCUSION INTEGRADORA**

En el periodo comprendido entre el 2000 y el 2020, cerca de mil millones de personas se infectarán por el bacilo, 200 millones enfermarán a causa de la TB y la misma cobrará la vida de alrededor de 35 millones de personas (Parida y cols., 2005). Por otro lado una vez desarrollada la enfermedad es difícil combatirla y existen contados fármacos con efectividad relativa capaces de aclarar la infección en el hospedero (Vashishtha, 2009). Los principales mecanismos de defensa contra este patógeno son los relacionados con la respuesta inmune innata y celular (Salgame, 2005; Reece y Kaufmann, 2008; van y cols., 2009) y el papel de los anticuerpos en la respuesta inmune contra esta bacteria fue subestimado durante décadas de estudio de las defensas del hospedero hacia este bacilo. Esta generalización proviene del paradigma Th1/Th2, que dominó durante las últimas dos décadas no solo el conocimiento acerca de la inmunidad hacia agentes infecciosos, sino también la proyección hacia el desarrollo de vacunas. Sin embargo, en los últimos 5 años se acumularon datos que apuntan a que la protección contra patógenos intra y extracelulares no es estrictamente del tipo Th1 o Th2 (Kidd, 2003; Gor y cols., 2003; Chaouat, 2007).

En un estudio reciente, se analizaron las muestras de suero que contenían anticuerpos específicos antimicobacterianos, obtenidas a partir de voluntarios que se vacunaron dos veces con BCG por vía intradérmica (frecuencia semestral). En estas muestras se encontraron títulos significativos de anticuerpos del tipo IgG específicos contra LAM, y se encontró una mayor internalización de BCG por parte de las células fagocíticas. Además, hubo un aumento significativo del efecto inhibitorio de neutrófilos y macrófagos en el crecimiento micobacteriano provocado por los anticuerpos inducidos por BCG. Estos anticuerpos además, indujeron producción significativa de IFN $\gamma$  por parte de las células T CD8 $^{+}$  y CD4 $^{+}$ . Este estudio es único hasta el momento en demostrar que los anticuerpos anti-micobacterianos estimulan la respuesta del tipo Th1 en vez de disminuirla, tal como se planteaba anteriormente (paradigma Th1/Th2) (de Valliere y cols., 2005).

Contrario al dogma actual acerca del papel inefectivo de los anticuerpos contra patógenos intracelulares, durante los últimos años se ha acumulado una serie de evidencias acerca de la importancia de mediadores humorales en la activación de importantes mecanismos inmunes para controlar la progresión de la enfermedad causada por patógenos intracelulares, como es

el caso de *M. tuberculosis* (Igietseme y cols., 2004; Moore y Hutchings, 2007). Principalmente en el caso de patógenos intracelulares que son facultativos, los anticuerpos pueden ser decisivos en los estadios tempranos de la enfermedad, durante la fase extracelular, o pueden ser capaces de penetrar en células recientemente infectadas para unirse al patógeno internalizado y aumentar su procesamiento antigénico (Grosset, 1999; Reljic y Ivanyi, 2006). Actualmente se postula la necesidad de obtener vacunas basadas en anticuerpos, los cuales reconozcan patógenos inmediatamente después de su entrada en el hospedero, fundamentalmente en las superficies mucosales donde tales anticuerpos deben ser estratégicamente inducidos. De esta manera, Kaufmann y cols. (2009) aseveran que tales vacunas deben inducir anticuerpos del tipo IgA que:

- Inactiven componentes bacterianos esenciales para la sobrevivencia bacteriana en el hospedero.
- Activen el complemento para lisar directamente la bacteria.
- Opsonen la bacteria para promover su captura por fagocitos, neutrófilos, monocitos y macrófagos.

Por otra parte, el papel de las células B permanece aún como un enigma en el campo de la TB. Han surgido observaciones recientes acerca de la presencia de agregados similares a folículos de células B en los pulmones de pacientes tuberculosos. Estas células B, durante la fase de infección aguda, se piensa que son requeridas para una respuesta granulomatosa óptima y una respuesta inmune efectiva contra el reto pulmonar con *M. tuberculosis*. (Maglione y cols., 2007). En ausencia de estas células, se produce una desregulación de la formación granulomatosa, resultando en un incremento de la inflamación pulmonar. Durante la fase crónica, cuando los bacilos son contenidos, los clusters de células B activos promueven la perpetuación de la respuesta inmune local del hospedero y puede ayudar en la prevención de la reactivación de la enfermedad (Ulrichs y cols., 2004). El papel de los folículos de células B en los pulmones en modular la inflamación y respuesta de citoquinas, es demasiado importante para ignorar (Cooper, 2009). No obstante, se requerirán futuros estudios para dilucidar muchas preguntas aún sin responder. Por otra parte, se requieren esfuerzos para optimizar los modelos animales en ratón, dada la correlación limitada entre la patología en ratón con respecto a la de la enfermedad en humanos (Maglione y Chan, 2009).

Con respecto a los modelos animales, el modelo más apropiado para el estudio del posible papel protector de las células B y de anticuerpos del tipo IgA debe ser preferentemente el que involucra la vía respiratoria. Como bajo las condiciones de este estudio resulta prácticamente imposible contar con modelos de reto nasal por aerosol, el establecimiento de un modelo IN por instilación y el ajuste de parámetros para su evaluación, constituyó un inicio de gran importancia en este trabajo de tesis. Con este modelo, sencillo, económico, y de poco riesgo para el operador, se logró por aplicación directa del agente infectante en las fosas nasales de los ratones, una infección específica en pulmones. Se conoce que en la vacunación IN participan mecanismos efectores mediados por células T y B en tejidos mucosal nasal y asociado a bronquios, los cuales difieren de otros tejidos linfoides asociados a mucosas (Rodríguez y cols., 2005).

Por otra parte, el hecho de que un preparado comercial de gammaglobulinas humanas obtenido en Cuba, administrado a ratones Balb/c por vía IN e IP proteja contra el reto con BCG abre las puertas a nuevos tratamientos inmunoterapéuticos, sobre todo en el caso de individuos inmunocomprometidos y pacientes con SIDA, en los que la infección tuberculosa cobra cada vez más mayores índices de morbi-mortalidad (Manosuthi y cols., 2009; Tieu y cols., 2009).

Sin embargo, las reacciones inmunes mucosales en los pulmones son mucho menos comprendidas y sus méritos necesitarán ser considerados no solamente por la eficacia protectora, sino también por el posible riesgo para la función respiratoria de la infiltración inflamatoria de los pulmones (Rodríguez y cols., 2005).

El modelo de reto IT para el estudio de una TB pulmonar progresiva se describió por primera vez por Hernández-Pando y col. en el año 1997. En la Tabla 8 se muestran las principales aplicaciones que ha tenido este modelo en el estudio de numerosos aspectos relacionados con la patología pulmonar causada por la TB, así como la evaluación de numerosos candidatos vacunales.

Tabla 8: Aplicaciones que hasta el año 2008 tuvo el Modelo de Infección Pulmonar Progresiva en ratones.

Aplicación modelo de reto IT con micobacterias	Referencia
Correlación entre la cinética de células Th1 y Th2 y patología pulmonar	(Rook y Hernández-Pando, 1996)
Cinética de citoquinas luego de infección pulmonar	(Rook y Hernández-Pando, 1997)
Estudio de patogénesis en modelo pulmonar progresivo	(Hernández-Pando y cols., 1997)
Efecto de androstenodiol	(Hernández-Pando y cols., 1998)
Efecto de glucocorticoides y esteroides anti-glucocorticoides	(Rook y Hernández-Pando, 1998)
Estudio de interacción entre hormonas y vacunas	(Hernández-Pando y cols., 2000)
Rol de prostaglandina E2	(Rangel y cols., 2002)
Factores de transferencia combinada con quimioterapia	(Fabr�e y cols., 2004)
Comparación de virulencia diferentes cepas de <i>M. tuberculosis</i>	(García-Romo y cols., 2004)
Comparación de 10 subcepas de BCG	(Castillo-Rodal y cols., 2006)
Administración de antagonistas de TGF-�	(Ríos-Barrera y cols., 2006)
Estudio de expresión génica de �-defensinas	(Rivas-Santiago y cols., 2006)
Vacuna subunidades antígeno Rv1759c de <i>M. tuberculosis</i>	(Campuzano y cols., 2007)
Candidatos vacunales basados en BCG recombinante	(Hern�andez-Pando y cols., 2007)
Adenovirus recombinante expresando IFN-�	(Mata-Espinosa y cols., 2008)
Tomate transgénico expresando Il-12	(Elias-López y cols., 2008)
Tratamiento con Metoxyestradiol en modelo de asma	(Huerta-Yepez y cols., 2008)
Administración oral de <i>M. vaccae</i>	(Hern�andez-Pando y cols., 2008)
Mutante de <i>M. tuberculosis</i> PhoP inactivado	(Gonzalo-Asensio y cols., 2008)
Eficacia de Rifabutin contra <i>M. avium</i> , H37Rv, MDR	(Figueiredo y cols., 2008)

Hasta el momento de la discusión de este trabajo de tesis, nuestro estudio fue el primero en utilizar este modelo de reto IT para la evaluación de AcM y una biblioteca genómica de expresión de *M. tuberculosis*.

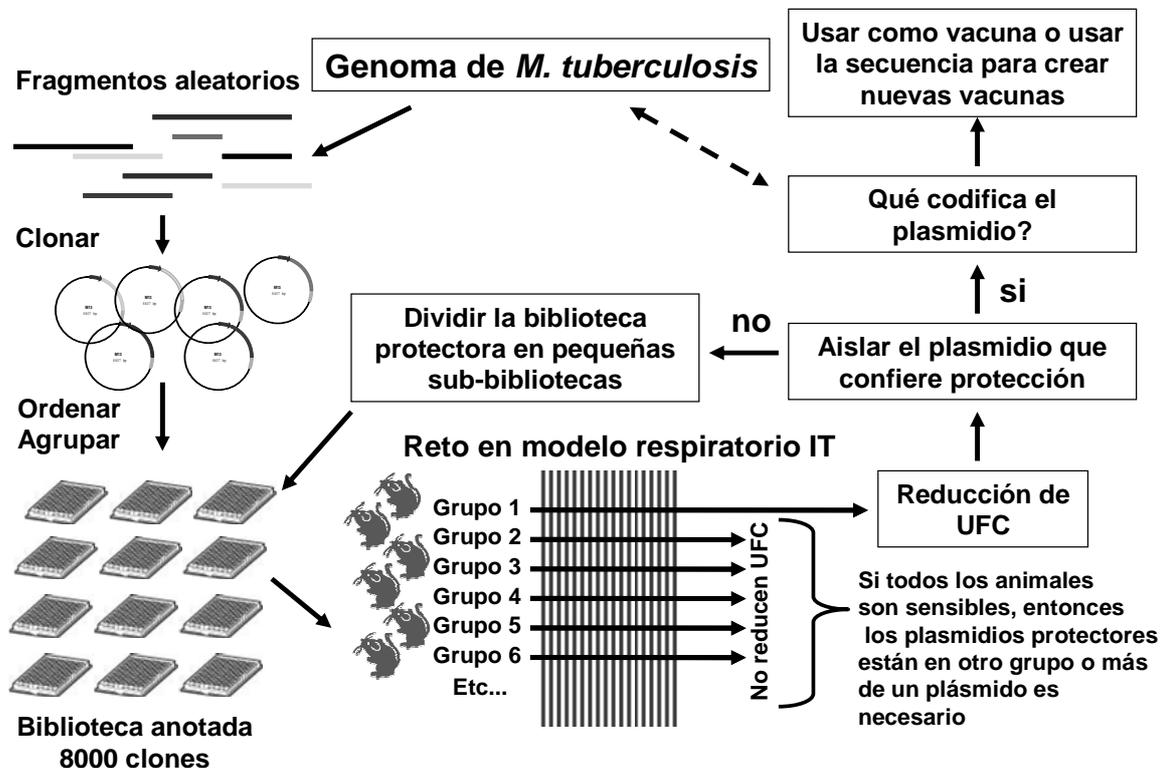
Con el uso de este modelo de inoculación IT, otros investigadores ensayaron varias dosis de inóculo de *M. tuberculosis* por esta vía y evaluaron los cambios histopatológicos y morfométricos que tuvieron lugar en los pulmones, así como la respuesta de citoquinas y anticuerpos en suero. En este modelo, con altas dosis de inóculo, los ratones desarrollaron una respuesta inmune similar a la descrita en humanos. Inicialmente ocurrió una activación de las células Th1 y con la progresión de la enfermedad, se activaron además las células de tipo Th2 y células T regulatorias. Con ese trabajo se demostró que el modelo experimental de infección pulmonar progresiva usando altas dosis de inóculo es apropiado para entender la interacción patógeno- hospedero, así como para evaluar candidatos inmunológicos profilácticos y terapéuticos (Morais y cols., 2010).

En este trabajo se ha demostrado que el modelo de infección pulmonar progresiva es útil en la evaluación del papel de los anticuerpos protectores en la defensa contra *M. tuberculosis*, no solo cuando estos son administrados pasivamente, sino también cuando pueden ser inducidos luego de la inmunización activa con genotecas de expresión. No obstante, no se descarta en lo absoluto los mecanismos inmunes de respuesta celular, que, para el caso de patógenos intracelulares desempeñan un papel fundamental.

El contar con un AcM del tipo IgA específico a la proteína de 16 kDa de *M. tuberculosis* que ha resultado protector en dos modelos de reto con micobacterias, sugiere la posibilidad de humanizar este anticuerpo. Gracias a la disponibilidad de herramientas de ingeniería genética, es posible combinar los dominios constantes de la molécula de IgG humana con las regiones variables murinas por fusión transgénica de los genes de inmunoglobulinas manteniendo la especificidad epitópica, con lo que se eliminan los posibles efectos adversos de la inoculación de anticuerpos provenientes de especies diferentes (Morrison y cols., 1984). Actualmente numerosos anticuerpos quiméricos humanizados están siendo aplicados en el tratamiento de diferentes tipos de neoplasias (Dadachova y cols., 2007; Cavarga y cols., 2009; Wu y cols., 2009a), lo cual pudiera ser extrapolado al tratamiento de agentes infecciosos tales como *M. tuberculosis*.

Por otro lado se continúa la búsqueda de vacunas de subunidades recombinantes o basadas en ADN para prevenir la TB. Después de la secuenciación de varios genomas de esta especie (Djelouadji y cols., 2009; Comas y cols., 2009; Garza-González y cols., 2009; Huang y cols.,

2009) se han abierto las puertas para el pesquizado rápido de muchos candidatos. Igualmente para ello se necesitan modelos animales óptimos que permitan agilizar estos pasos de selección de candidatos. En este trabajo se hizo un primer acercamiento al empleo de un nuevo modelo de reto mucosal para evaluar un inmunógeno complejo que es el punto de partida para una metodología de búsqueda masiva de candidatos vacunales. Esta metodología es la inmunización con bibliotecas genómicas. Como los clones se encuentran almacenados de manera individual y registrada (biblioteca anotada), es posible a partir de este punto comenzar a subdividir la genoteca en facciones cada vez más pequeñas para identificar el gen o los genes involucrados en la protección contra la enfermedad, como se muestra en la Figura 21.



**Figura 21:** Esquema que representa la estrategia general para la generación, almacenamiento y evaluación de una biblioteca genómica en el modelo de reto intra-traqueal para la determinación de posibles antígenos protectogénicos.

En una estrategia nueva de pesquizaje de genes protectores y para enfatizar aún más en las evidencias acerca del papel de los anticuerpos en la defensa contra *M. tuberculosis*, los sueros de los animales inmunizados con esta genoteca, cuyo carácter protector ha sido demostrado en este trabajo, podrían ser administrados a ratones Balb/c pasivamente con el objetivo de evaluar su carácter protector frente al reto con *M. tuberculosis*. Teniendo ya construida esta biblioteca genómica anotada de *M. tuberculosis* se tiene la posibilidad de realizar futuros estudios encaminados a la búsqueda y selección de nuevos candidatos vacunales contra la TB, usando el modelo de reto IT con micobacterias desarrollado bajo nuestras condiciones. Finalmente con este trabajo se aportaron nuevas evidencias acerca del papel que desempeñan los anticuerpos en la defensa contra micobacterias en un modelo de infección pulmonar que hasta el momento de la realización del trabajo de tesis, no había sido explorado con este propósito. Con estos resultados, se aportan nuevas evidencias acerca de la factibilidad del uso de este modelo de infección pulmonar progresiva en la evaluación de candidatos inmunoprolácticos y terapéuticos contra la TB. Estos resultados, en conjunto con los acumulados hasta la fecha acerca de los mecanismos inmunes involucrados en la defensa contra la TB, deberán ser considerados para el desarrollo racional y efectivo de vacunas de nueva generación contra la TB.

## **VI. CONCLUSIONES**

1. La preparación farmacéutica de gammaglobulina humana Intacglobin aplicada a ratones resulta protectora, en términos de reducción del número de UFC en pulmones, frente al reto con BCG por vía intranasal.
2. En el modelo de infección pulmonar progresiva, el anticuerpo monoclonal TBA61, dirigido contra la proteína de 16 kDa de *M. tuberculosis*, y administrado por vía intra-traqueal, reduce la colonización bacteriana y disminuye la patología pulmonar luego del reto intra-traqueal con *M. tuberculosis*.
3. La inmunización con una genoteca de expresión de *M. tuberculosis* induce una respuesta inmune protectora contra micobacterias en este modelo de infección pulmonar progresiva, lo que demuestra la factibilidad del uso de este modelo animal en la evaluación de la protección conferida por la inmunización con genotecas de expresión.

## **VII. RECOMENDACIONES**

1. Determinar el papel de la respuesta celular inducida luego de la administración de las diferentes preparaciones evaluadas en este trabajo de tesis.
2. Aplicar de forma pasiva los sueros de los ratones inmunizados con las diferentes preparaciones y evaluar su protección frente al reto infeccioso con micobacterias.
3. Subdividir la genoteca en fracciones más pequeñas y evaluar el carácter protector de las distintas subgenotecas en un modelo murino frente al reto con *M. tuberculosis* y así secuenciar los genes involucrados en la protección contra *M. tuberculosis*.

## **VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

Abalos,P. and Retamal,P. (2004). Tuberculosis: a re-emerging zoonosis?. *Rev. Sci. Tech.* 23, 583-594.

Achkar,J.M., Casadevall,A., and Glatman-Freedman,A. (2007). Immunological options for the treatment of tuberculosis: evaluation of novel therapeutic approaches. *Expert. Rev. Anti. Infect. Ther.* 5, 461-474.

Acosta, A. (2001). Tesis en opción al Grado Científico de Doctor en Ciencias de la Salud: Inmunización con bibliotecas genómicas de expresión. Ciudad de La Habana, Cuba.

Acosta,A., Sarmiento,M.E., González,A., Estévez,P., Aguila,A., Infante,J.F., Izquierdo,L., Capo,V., Sierra,G., Malberty,J.A.(1994). Histopathologic and humoral study of Balb/c mice inoculated with BCG by different routes. *Arch. Med. Res.* 25, 159-163.

Agger,E.M. and Andersen,P. (2002). A novel TB vaccine; towards a strategy based on our understanding of BCG failure. *Vaccine* 21, 7-14.

Aguilar,L.D., Zumarraga,M.J., Jiménez,O.R., Gioffre,A.K., Bernardelli,A., Orozco,E.H., Cataldi,A.A., and Hernández,P.R. (2009). *Mycobacterium bovis* with different genotypes and from different hosts induce dissimilar immunopathological lesions in a mouse model of tuberculosis. *Clin. Exp. Immunol.* 157, 139-147.

Akagawa,K.S. (2002). Functional heterogeneity of colony-stimulating factor-induced human monocyte-derived macrophages. *Int. J. Hematol.* 76, 27-34.

Almeida,A.S., Lago,P.M., Boechat,N., Huard,R.C., Lazzarini,L.C., Santos,A.R., Nociari,M., Zhu,H., Perez-Sweeney,B.M., Bang,H., Ni,Q., Huang,J., Gibson,A.L., Flores,V.C., Pecanha,L.R., Kritski,A.L., Lapa E Silva JR, and Ho,J.L. (2009). Tuberculosis is associated with a down-modulatory lung immune response that impairs Th1-type immunity. *J. Immunol.* 183, 718-731.

Alonso,J.M. (2008). Immunity and pathophysiology of respiratory tract infections. *Med. Mal Infect.* 38, 433-437.

Andersen,P. and Doherty,T.M. (2005). TB subunit vaccines:putting the pieces together. *Microbes. Infect.* 7, 911-921.

Anderson,R.M. and May,R.M. (1983). Two-stage vaccination programme against rubella. *Lancet* 2, 1416-1417.

Aoki,M. (2004). Transmission of tuberculosis (II). *Kekkaku* 79, 693-703.

- Bahloul,C., Ahmed,S.B., B'chir,B.I., Kharmachi,H., Hayouni,e.A., and Dellagi,K. (2003). Post-exposure therapy in mice against experimental rabies: a single injection of DNA vaccine is as effective as five injections of cell culture-derived vaccine. *Vaccine* 22, 177-184.
- Baldwin,S.L., D'Souza,C., Roberts,A.D., Kelly,B.P., Frank,A.A., Lui,M.A., Ulmer,J.B., Huygen,K., McMurray,D.M., and Orme,I.M. (1998). Evaluation of new vaccines in the mouse and guinea pig model of tuberculosis. *Infect. Immun.* 66, 2951-2959.
- Barkan,D., Liu,Z., Sacchettini,J.C., and Glickman,M.S. (2009). Mycolic acid cyclopropanation is essential for viability, drug resistance, and cell wall integrity of *Mycobacterium tuberculosis*. *Chem. Biol.* 16, 499-509.
- Barker,L.F., Brennan,M.J., Rosenstein,P.K., and Sadoff,J.C. (2009). Tuberculosis vaccine research: the impact of immunology. *Curr. Opin. Immunol.* 21, 331-338.
- Barniol,J., Niemann,S., Louis,V.R., Brodhun,B., Dreweck,C., Richter,E., Becher,H., Haas,W., and Junghanss,T. (2009). Transmission dynamics of pulmonary tuberculosis between autochthonous and immigrant sub-populations. *BMC. Infect. Dis.* 9, 197.
- Barry,M.A., Howell,D.P., Andersson,H.A., Chen,J.L., and Singh,R.A. (2004). Expression library immunization to discover and improve vaccine antigens. *Immunol. Rev.* 199, 68-83.
- Behr,M.A., Wilson,M.A., Gill,W.P., Salamon,H., Schoolnik,G.K., Rane,S., and Small,P.M. (1999). Comparative genomics of BCG vaccines by whole-genome DNA microarray. *Science* 284, 1520-1523.
- Bejon,P., Peshu,N., Gilbert,S.C., Lowe,B.S., Molyneux,C.S., Forsdyke,J., Lang,T., Hill,A.V., and Marsh,K. (2006). Safety profile of the viral vectors of attenuated fowlpox strain FP9 and modified vaccinia virus Ankara recombinant for either of 2 preerythrocytic malaria antigens, ME-TRAP or the circumsporozoite protein, in children and adults in Kenya. *Clin. Infect. Dis.* 42, 1102-1110.
- Bendigs,S., Salzer,U., Lipford,G.B., Wagner,H., and Heeg,K. (1999). CpG-oligodeoxynucleotides co-stimulate primary T cells in the absence of antigen-presenting cells. *Eur. J. Immunol.* 29, 1209-1218.
- Beste,D.J., Espasa,M., Bonde,B., Kierzek,A.M., Stewart,G.R., and McFadden,J. (2009). The genetic requirements for fast and slow growth in mycobacteria. *PLoS. One.* 4, e5349.
- Bhaskar,S. and Upadhyay,P. (2003). Design and evaluation of an aerosol infection chamber for small animals. *Int. J. Pharm.* 255, 43-48.
- Bibikova,M.V., Borisova,N.A., Orekhov,S.N., and Katlinskii,A.V. (2006). Problems of screening novel antituberculosis antibiotics. 3. New data on mechanism of action of antituberculosis agents. *Antibiot. Khimioter.* 51, 34-40.

- Bivas-Benita,M., van Meijgaarden,K.E., Franken,K.L., Junginger,H.E., Borchard,G., Ottenhoff,T.H., and Geluk,A. (2004). Pulmonary delivery of chitosan-DNA nanoparticles enhances the immunogenicity of a DNA vaccine encoding HLA-A\*0201-restricted T-cell epitopes of *Mycobacterium tuberculosis*. *Vaccine* 22, 1609-1615.
- Bland,J. and Clements,J. (1998). Protecting the world's children: the story of WHO's immunization programme. *World Health Forum* 19, 162-173.
- Bloom,B.R., Flynn,J., McDonough,K., Kress,Y., and Chan,J. (1994). Experimental approaches to mechanisms of protection and pathogenesis in *M. tuberculosis* infection. *Immunobiology* 191, 526-536.
- Bocchino,M., Galati,D., Sanduzzi,A., Colizzi,V., Brunetti,E., and Mancino,G. (2005). Role of mycobacteria-induced monocyte/macrophage apoptosis in the pathogenesis of human tuberculosis. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 9, 375-383.
- Borgdorff,M.W., Kolk,A., Van Soolingen,D., van der Meer,J.W., and Ottenhoff,T.H. (2003). Research into new methods for diagnosing, treating and preventing tuberculosis. *Ned. Tijdschr. Geneesk.* 147, 1838-1841.
- Bothamley, G. H., Beck, J. S., Potts, R. C., Grange, J. M., Kardjito, T., Ivanyi, J. (1992). Specificity of antibodies and tuberculin response after occupational exposure to tuberculosis. *J Infect Dis* 166, 182-186.
- Brandt,L., Feino,C.J., Weinreich,O.A., Chilima,B., Hirsch,P., Appelberg,R., and Andersen,P. (2002). Failure of the *Mycobacterium bovis* BCG vaccine: some species of environmental mycobacteria block multiplication of BCG and induction of protective immunity to tuberculosis. *Infect. Immun.* 70, 672-678.
- Brennan,M.J. (2005). The tuberculosis vaccine challenge. *Tuberculosis. (Edinb.)* 85, 7-12.
- Brennan,P.J. (2003). Structure, function, and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis. (Edinb.)* 83, 91-97.
- Brennan,P.J. and Nikaido,H. (1995). The envelope of mycobacteria. *Annu. Rev. Biochem.* 64, 29-63.
- Briken,V., Porcelli,S.A., Besra,G.S., and Kremer,L. (2004). Mycobacterial lipoarabinomannan and related lipoglycans: from biogenesis to modulation of the immune response. *Mol. Microbiol.* 53, 391-403.
- Brimnes,N. (2008). BCG vaccination and WHO's global strategy for tuberculosis control 1948-1983. *Soc. Sci. Med.* 67, 863-873.
- Brooks,J.V., Frank,A.A., Keen,M.A., Bellisle,J.T., and Orme,I.M. (2001). Boosting vaccine for tuberculosis. *Infect. Immun.* 69, 2714-2717.

Brosch,R., Gordon,S.V., Garnier,T., Eiglmeier,K., Frigui,W., Valenti,P., Dos,S.S., Duthoy,S., Lacroix,C., García-Pelayo,C., Inwald,J.K., Golby,P., García,J.N., Hewinson,R.G., Behr,M.A., Quail,M.A., Churcher,C., Barrell,B.G., Parkhill,J., and Cole,S.T. (2007). Genome plasticity of BCG and impact on vaccine efficacy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 104, 5596-5601.

Brosch,R., Gordon,S.V., Marmiesse,M., Brodin,P., Buchrieser,C., Eiglmeier,K., Garnier,T., Gutierrez,C., Hewinson,G., Kremer,K., Parsons,L.M., Pym,A.S., Samper,S., van,S.D., and Cole,S.T. (2002). A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99, 3684-3689.

Brosch,R. and Vincent,V. (2007). Cutting-edge science and the future of tuberculosis control. *Bull. World Health Organ* 85, 410-412.

Buchwald,U.K. and Pirofski,L. (2003). Immune therapy for infectious diseases at the dawn of the 21st century: the past, present and future role of antibody therapy, therapeutic vaccination and biological response modifiers. *Curr. Pharm. Des* 9, 945-968.

Buddle,B.M., Aldwell,F.E., Skinner,M.A., de Lisle,G.W., Denis,M., Vordermeier,H.M., Hewinson,R.G., and Wedlock,D.N. (2005). Effect of oral vaccination of cattle with lipid-formulated BCG on immune responses and protection against bovine tuberculosis. *Vaccine* 23, 3581-3589.

Buddle,B.M., Wards,B.J., Aldwell,F.E., Collins,D.M., and de Lisle,G.W. (2002). Influence of sensitisation to environmental mycobacteria on subsequent vaccination against bovine tuberculosis. *Vaccine* 20, 1126-1133.

Cádiz,A., Hernández,J., Joó,L., Moya,A., and Camero,A. (1999). Pasteurización de soluciones de inmunoglobulinas de uso intravenoso. El ph ácido como elemento estabilizante. *Rev. Cubana Farm* 33, 155-160.

Cai,L.T., Shu,H.P., and Jiang,L.P. (2003). Construction and sequencing of recombinant plasmid pcDNA3/GRA1 from *Toxoplasma gondii*. *Hunan. Yi. Ke. Da. Xue. Xue. Bao.* 28, 221-223.

Cai,Q., Zhang,X., Tian,L., Yuan,M., Jin,G., and Lu,Z. (2002). Variant analysis and immunogenicity prediction of envelope gene of HCV strains from China. *J. Med. Virol.* 67, 490-500.

Cainelli,F. and Vento,S. (2002). BCG efficacy and tuberculin skin testing. *Lancet* 359, 1521-1522.

Campuzano,J., Aguilar,D., Arriaga,K., Leon,J.C., Salas-Rangel,L.P., Merchand,J., Hernández-Pando,R., and Espitia,C. (2007). The PGRS domain of *Mycobacterium tuberculosis* PE\_PGRS Rv1759c antigen is an efficient subunit vaccine to prevent reactivation in a murine model of chronic tuberculosis. *Vaccine* 25, 3722-3729.

- Carpenter,Z.K., Williamson,E.D., and Eyles,J.E. (2005). Mucosal delivery of microparticle encapsulated ESAT-6 induces robust cell-mediated responses in the lung milieu. *J. Control Release* 104, 67-77.
- Caruso,A.M., Serbina,N., Klein,E., Triebold,K., Bloom,B.R., and Flynn,J.L. (1999). Mice deficient in CD4 T cells have only transiently diminished levels of IFN-gamma, yet succumb to tuberculosis. *J. Immunol.* 162, 5407-5416.
- Casadevall,A. (2006). The third age of antimicrobial therapy. *Clin. Infect. Dis.* 42, 1414-1416.
- Casadevall,A. (2003). Antibody-mediated immunity against intracellular pathogens: two-dimensional thinking comes full circle. *Infect. Immun.* 71, 4225-4228.
- Casadevall,A., DeShaw,M., Fan,M., Dromer,F., Kozel,T.R., and Pirofski,L.A. (1994). Molecular and idiotypic analysis of antibodies to *Cryptococcus neoformans* glucuronoxylomannan. *Infect. Immun.* 62, 3864-3872.
- Casadevall,A. and Pirofski,L.A. (2003). Antibody-mediated regulation of cellular immunity and the inflammatory response. *Trends Immunol.* 24, 474-478.
- Casadevall,A. and Pirofski,L.A. (2004). New concepts in antibody-mediated immunity. *Infect. Immun.* 72, 6191-6196.
- Casadevall,A. and Scharff,M.D. (1995). Return to the past: the case for antibody-based therapies in infectious diseases. *Clin. Infect. Dis.* 21, 150-161.
- Casares,S., Inaba,K., Brumeanu,T.D., Steinman,R.M., and Bona,C.A. (1997). Antigen presentation by dendritic cells after immunization with DNA encoding a major histocompatibility complex class II-restricted viral epitope. *J. Exp. Med.* 186, 1481-1486.
- Castillo-Rodal,A.I., Castañón-Arreola,M., Hernández-Pando,R., Calva,J.J., Sada-Díaz,E., and López-Vidal,Y. (2006). *Mycobacterium bovis* BCG substrains confer different levels of protection against *Mycobacterium tuberculosis* infection in a BALB/c model of progressive pulmonary tuberculosis. *Infect. Immun.* 74, 1718-1724.
- Cavarga,I., Kocan,P., Boor,A., Belak,J., Zak,V., Kluchova,Z., Slavik,L., and Tkacova,R. (2009). Immunohistochemical markers of proliferation and vascularisation in preneoplastic bronchial lesions and invasive non-small cell lung cancer. *Neoplasma* 56, 414-421.
- Chambers,M.A., Gavier-Widen,D., and Hewinson,R.G. (2004). Antibody bound to the surface antigen MPB83 of *Mycobacterium bovis* enhances survival against high dose and low dose challenge. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 41, 93-100.
- Chandramuki, A., Bothamley, G. H., Brennan, P. J., Ivanyi, J. (1989). Levels of antibody to defined antigens of *M. tuberculosis* in tuberculous meningitis. *J Clin Microbiol* 25, 821-825.

- Chaouat,G. (2007). The Th1/Th2 paradigm: still important in pregnancy? *Semin. Immunopathol.* 29, 95-113.
- Chen,H., Luo,Y., Huang,X., and Guo,S. (2002). Experimental study on prevention of diabetes complicated with tuberculosis by *Mycobacterium vaccae*. *Zhonghua Jie. He. He. Hu Xi. Za Zhi.* 25, 21-24.
- Chen,L., Wang,J., Zganiacz,A., and Xing,Z. (2004). Single intranasal mucosal *Mycobacterium bovis* BCG vaccination confers improved protection compared to subcutaneous vaccination against pulmonary tuberculosis. *Infect. Immun.* 72, 238-246.
- Cho,J.H., Youn,J.W., and Sung,Y.C. (2001). Cross-priming as a predominant mechanism for inducing CD8(+) T cell responses in gene gun DNA immunization. *J. Immunol.* 167, 5549-5557.
- 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.
- Churchyard,G.J., Kaplan,G., Fallows,D., Wallis,R.S., Onyebujoh,P., and Rook,G.A. (2009). Advances in immunotherapy for tuberculosis treatment. *Clin. Chest Med.* 30, 769-82, ix.
- Cleare,W., Brandt,M.E., and Casadevall,A. (1999). Monoclonal antibody 13F1 produces annular immunofluorescence patterns on *Cryptococcus neoformans* serotype AD isolates. *J. Clin. Microbiol.* 37, 3080.
- Clemens,D.L. and Horwitz,M.A. (1995). Characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* phagosome and evidence that phagosomal maturation is inhibited. *J. Exp. Med.* 181, 257-270.
- Cole,S.T., Brosch,R., Parkhill,J., Garnier,T., Churcher,C., Harris,D., Gordon,S.V., Eiglmeier,K., Gas,S., Barry,C.E., III, Tekaia,F., Badcock,K., Basham,D., Brown,D., Chillingworth,T., Connor,R., Davies,R., Devlin,K., Feltwell,T., Gentles,S., Hamlin,N., Holroyd,S., Hornsby,T., Jagels,K., Krogh,A., McLean,J., Moule,S., Murphy,L., Oliver,K., Osborne,J., Quail,M.A., Rajandream,M.A., Rogers,J., Rutter,S., Seeger,K., Skelton,J., Squares,R., Squares,S., Sulston,J.E., Taylor,K., Whitehead,S., and Barrell,B.G. (1998). Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 393, 537-544.
- Coler,R.N., Dillon,D.C., Skeiky,Y.A., Kahn,M., Orme,I.M., Lobet,Y., Reed,S.G., and Alderson,M.R. (2009). Identification of *Mycobacterium tuberculosis* vaccine candidates using human CD4+ T-cells expression cloning. *Vaccine* 27, 223-233.
- Collins,C.H. and Yates,M.D. (1984). *Mycobacterium africanum* and the 'African' tubercle bacilli. *Med. Lab Sci.* 41, 410-413.
- Collins,D.M. (2000). New tuberculosis vaccines based on attenuated strains of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Immunol. Cell Biol.* 78, 342-348.

- Comas,I., Homolka,S., Niemann,S., and Gagneux,S. (2009). Genotyping of genetically monomorphic bacteria: DNA sequencing in *Mycobacterium tuberculosis* highlights the limitations of current methodologies. *PLoS. One.* 4, e7815.
- Converse,P.J., Karakousis,P.C., Klinkenberg,L.G., Kesavan,A.K., Ly,L.H., Allen,S.S., Grosset,J.H., Jain,S.K., Lamichhane,G., Manabe,Y.C., McMurray,D.N., Nuernberger,E.L., and Bishai,W.R. (2009). Role of the dosR-dosS two-component regulatory system in *Mycobacterium tuberculosis* virulence in three animal models. *Infect. Immun.* 77, 1230-1237.
- Cooper,A.M. (2009). Cell-mediated immune responses in tuberculosis. *Annu. Rev. Immunol.* 27, 393-422.
- Cree,I.A., Smith,W.C., and Beck,J.S. (1990). A quantitative study of the relationship between systemic and histological parameters of immunity in individual leprosy patients. *Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.* 58, 347-352.
- Cunningham, A. F., Spreadbury, C.L. (1998). Mycobacterial stationary phase induced by low oxygen tension: cell wall thickening and localization of the 16-kilodalton alpha-crystallin homolog. *J Bacteriol* 180, 801-808.
- Dadachova,E., Wang,X.G., and Casadevall,A. (2007). Targeting the virus with radioimmunotherapy in virus-associated cancers. *Cancer Biother. Radiopharm.* 22, 303-308.
- Dannenberga,A.M., Jr., Schofield,B.H., Rao,J.B., Dinh,T.T., Lee,K., Boulay,M., Abe,Y., Tsuruta,J., and Steinbeck,M.J. (1994). Histochemical demonstration of hydrogen peroxide production by leukocytes in fixed-frozen tissue sections of inflammatory lesions. *J. Leukoc. Biol.* 56, 436-443.
- Davies,P.D. (2008). Medical classics. La Boheme and tuberculosis. *BMJ* 337, a2587.
- de Lisle,G.W., Wards,B.J., Buddle,B.M., and Collins,D.M. (2005). The efficacy of live tuberculosis vaccines after presensitization with *Mycobacterium avium*. *Tuberculosis. (Edinb.)* 85, 73-79.
- de Valliere,V.S., Abate,G., Blazevic,A., Heuertz,R.M., and Hoft,D.F. (2005). Enhancement of innate and cell-mediated immunity by antimycobacterial antibodies. *Infect. Immun.* 73, 6711-6720.
- Delbridge,L.M. and O'Riordan,M.X. (2007). Innate recognition of intracellular bacteria. *Curr. Opin. Immunol.* 19, 10-16.
- Delgado,D. (1991). Conferencias de historia de la administración de Salud Pública en Cuba. *Cuad Hist Salud Pública* 81, 55-57.
- Delogu,G., Li,A., Repique,C., Collins,F., and Morris,S.L. (2002). DNA vaccine combinations expressing either tissue plasminogen activator signal sequence fusion proteins or ubiquitin-

conjugated antigens induce sustained protective immunity in a mouse model of pulmonary tuberculosis. *Infect. Immun.* 70, 292-302.

Derrick,S.C., Repique,C., Snoy,P., Yang,A.L., and Morris,S. (2004). Immunization with a DNA vaccine cocktail protects mice lacking CD4 cells against an aerogenic infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* 72, 1685-1692.

Devi,K.R., Kumar,K.S., Ramalingam,B., and Alamelu,R. (2002). Purification and characterization of three immunodominant proteins (38, 30, and 16 kDa) of *Mycobacterium tuberculosis*. *Protein Expr. Purif.* 24, 188-195.

Dieli, F., Singh, M., Spallek, R., Romano, A., Sireci, G. (2000). Change of Th0 to Th1 cell-cytokine profile following tuberculosis chemotherapy. *Scand J Immunol* 52, 96-102.

Djelouadji,Z., Henry,M., Bachtarzi,A., Foiselle,N., Raoult,D., and Drancourt,M. (2009). Pyrosequencing identification of *Mycobacterium tuberculosis* W-Beijing. *BMC. Res. Notes* 2, 239.

Doherty,T.M., Olsen,A.W., van Pinxteren,L., and Andersen,P. (2002). Oral vaccination with subunit vaccines protects animals against aerosol infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* 70, 3111-3121.

Doi,N. (1998). Development of the intratracheal infection model of experimental murine mycobacteriosis: comparison with the intravenous infection model. *Kekkaku* 73, 339-347.

Donnelly,J.J., Friedman,A., Ulmer,J.B., and Liu,M.A. (1997a). Further protection against antigenic drift of influenza virus in a ferret model by DNA vaccination. *Vaccine* 15, 865-868.

Donnelly,J.J., Ulmer,J.B., Shiver,J.W., and Liu,M.A. (1997b). DNA vaccines. *Annu. Rev. Immunol.* 15, 617-648.

Drew,D.R., Lightowlers,M., and Strugnell,R.A. (1999). Vaccination with plasmid DNA expressing antigen from genomic or cDNA gene forms induces equivalent humoral immune responses. *Vaccine* 18, 692-702.

Dudani,R., Murali-Krishna,K., Krishnan,L., and Sad,S. (2008). IFN-gamma induces the erosion of preexisting CD8 T cell memory during infection with a heterologous intracellular bacterium. *J. Immunol.* 181, 1700-1709.

Dupuis,M., Denis-Mize,K., Woo,C., Goldbeck,C., Selby,M.J., Chen,M., Otten,G.R., Ulmer,J.B., Donnelly,J.J., Ott,G., and McDonald,D.M. (2000). Distribution of DNA vaccines determines their immunogenicity after intramuscular injection in mice. *J. Immunol.* 165, 2850-2858.

Dye,C. (2000). Tuberculosis 2000-2010: control, but not elimination. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 4, S146-S152.

- Dye,C. (2004). A booster for tuberculosis vaccines. *JAMA* 291, 2127-2128.
- Edelson,B.T., Cossart,P., and Unanue,E.R. (1999). Cutting edge: paradigm revisited: antibody provides resistance to *Listeria* infection. *J. Immunol.* 163, 4087-4090.
- Egen,J.G., Rothfuchs,A.G., Feng,C.G., Winter,N., Sher,A., and Germain,R.N. (2008). Macrophage and T cell dynamics during the development and disintegration of mycobacterial granulomas. *Immunity.* 28, 271-284.
- Elias-López,A.L., Marquina,B., Gutiérrez-Ortega,A., Aguilar,D., Gómez-Lim,M., and Hernández-Pando,R. (2008). Transgenic tomato expressing interleukin-12 has a therapeutic effect in a murine model of progressive pulmonary tuberculosis. *Clin. Exp. Immunol.* 154, 123-133.
- Embley,T.M. and Stackebrandt,E. (1994). The molecular phylogeny and systematics of the actinomycetes. *Annu. Rev. Microbiol.* 48, 257-289.
- Emoto,M., Emoto,Y., Buchwalow,I.B., and Kaufmann,S.H. (1999). Induction of IFN-gamma-producing CD4+ natural killer T cells by *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette Guerin. *Eur. J. Immunol.* 29, 650-659.
- Fabré,R.A., Pérez,T.M., Aguilar,L.D., Rangel,M.J., Estrada-García,I., Hernández-Pando,R., and Estrada,P.S. (2004). Transfer factors as immunotherapy and supplement of chemotherapy in experimental pulmonary tuberculosis. *Clin. Exp. Immunol.* 136, 215-223.
- Fachado,A., Rodríguez,A., Molina,J., Silverio,J.C., Marino,A.P., Pinto,L.M., Angel,S.O., Infante,J.F., Traub-Cseko,Y., Amendoeira,R.R., and Lannes-Vieira,J. (2003). Long-term protective immune response elicited by vaccination with an expression genomic library of *Toxoplasma gondii*. *Infect. Immun.* 71, 5407-5411.
- Falero-Díaz,G., Challacombe,S., Banerjee,D., Douce,G., Boyd,A., and Ivanyi,J. (2000a). Intranasal vaccination of mice against infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Vaccine* 18, 3223-3229.
- Falero-Díaz,G., Challacombe,S., Rahman,D., Mistry,M., Douce,G., Dougan,G., Acosta,A., and Ivanyi,J. (2000b). Transmission of IgA and IgG monoclonal antibodies to mucosal fluids following intranasal or parenteral delivery. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 122, 143-150.
- Falkinham,J.O., III (1996). Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. *Clin. Microbiol. Rev.* 9, 177-215.
- Fan,X.L., Wang,L.M., Wang,F.X., Shi,C.H., Li,Y., Xue,Y., Bai,Y.L., and Xu,Z.K. (2003). Effects of Th1 cytokine gene on anti-CFP10 antibody production in BALB/c mice induced by *Mycobacterium tuberculosis* DNA vaccine. *Xi. Bao. Yu Fen. Zi. Mian. Yi. Xue. Za Zhi.* 19, 260-262.

Figueiredo,R., Moiteiro,C., Medeiros,M.A., Silva,P.A., Ramos,D., Spies,F., Ribeiro,M.O., Lourenco,M.C., Junior,I.N., Gaspar,M.M., Cruz,M.E., Curto,M.J., Franzblau,S.G., Orozco,H., Aguilar,D., Hernández-Pando,R., and Costa,M.C. (2008). Synthesis and evaluation of rifabutin analogs against *Mycobacterium avium* and H(37)Rv, MDR and NRP *Mycobacterium tuberculosis*. *Bioorg. Med. Chem.*

Fine,P.E. and Vynnycky,E. (1998). The effect of heterologous immunity upon the apparent efficacy of (e.g. BCG) vaccines. *Vaccine* 16, 1923-1928.

Fischbach,M.A. and Walsh,C.T. (2009). Antibiotics for emerging pathogens. *Science* 325, 1089-1093.

Frieden,T.R., Sterling,T.R., Munsiff,S.S., Watt,C.J., and Dye,C. (2003). Tuberculosis. *Lancet* 362, 887-899.

Frischia, G., Vordermeier, H. M., Pasvol, G., Harris, D. P., Moreno, C., Ivanyi, J. (1995). Human T cell responses to peptide epitopes of the 16-kDa antigen in tuberculosis. *Clin Exp Immunol* 102, 53-57.

Fruth,U. and Young,D. (2004). Prospects for new TB vaccines: Stop TB Working Group on TB Vaccine Development. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 8, 151-155.

Garay,E.B. and Rutkin,A.S. (1996). A pound of cure. Take steps to limit liability based on marketing materials. *J. Health Care Mark.* 16, 50-53.

García-Romo,G.S., Pedroza-González,A., Aguilar-León,D., Orozco-Estévez,H., Lambrecht,B.N., Estrada-García,I., Flores-Romo,L., and Hernández-Pando,R. (2004). Airways infection with virulent *Mycobacterium tuberculosis* delays the influx of dendritic cells and the expression of costimulatory molecules in mediastinal lymph nodes. *Immunology* 112, 661-668.

Garnier,T., Eiglmeier,K., Camus,J.C., Medina,N., Mansoor,H., Pryor,M., Duthoy,S., Grondin,S., Lacroix,C., Monsempe,C., Simon,S., Harris,B., Atkin,R., Doggett,J., Mayes,R., Keating,L., Wheeler,P.R., Parkhill,J., Barrell,B.G., Cole,S.T., Gordon,S.V., and Hewinson,R.G. (2003). The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100, 7877-7882.

Garza-González,E., González,G.M., Renteria,A., Cruz-Pulido,W., Rivera,G., and Bocanegra-García,V. (2009). A pyrosequencing method for molecular monitoring of regions in the inhA, ahpC and rpoB genes of *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin. Microbiol. Infect.* 15(8), 699-703.

Gaudin,P., Trocme,C., Monier,F., Zaoui,P., Barro,C., Polack,B., Hadjian,A., Berthier,S., and Morel,F. (1998). Focalized matrix proteolysis and inflammation. *Ann. Biol. Clin. (Paris)* 56, 661-669.

Giri,P.K. and Khuller,G.K. (2008). Is intranasal vaccination a feasible solution for tuberculosis? *Expert. Rev. Vaccines*. 7, 1341-1356.

Giri,P.K., Sable,S.B., Verma,I., and Khuller,G.K. (2005). Comparative evaluation of intranasal and subcutaneous route of immunization for development of mucosal vaccine against experimental tuberculosis. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 45, 87-93.

Glatman-Freedman,A. (2003). Advances in antibody-mediated immunity against *Mycobacterium tuberculosis*: implications for a novel vaccine strategy. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 39, 9-16.

Glatman-Freedman,A. (2006). The role of antibody-mediated immunity in defense against *Mycobacterium tuberculosis*: advances toward a novel vaccine strategy. *Tuberculosis. (Edinb. )* 86, 191-197.

Glatman-Freedman,A. and Casadevall,A. (1998). Serum therapy for tuberculosis revisited: reappraisal of the role of antibody-mediated immunity against *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin. Microbiol. Rev.* 11, 514-532.

Glatman-Freedman,A., Casadevall,A., Dai,Z., Jacobs,W.R., Jr., Li,A., Morris,S.L., Navoa,J.A., Piperdi,S., Robbins,J.B., Schneerson,R., Schwebach,J.R., and Shapiro,M. (2004). Antigenic evidence of prevalence and diversity of *Mycobacterium tuberculosis* arabinomannan. *J. Clin. Microbiol.* 42, 3225-3231.

Glatman-Freedman,A., Martin,J.M., Riska,P.F., Bloom,B.R., and Casadevall,A. (1996). Monoclonal antibodies to surface antigens of *Mycobacterium tuberculosis* and their use in a modified enzyme-linked immunosorbent spot assay for detection of mycobacteria. *J. Clin. Microbiol.* 34, 2795-2802.

Glatman-Freedman,A., Mednick,A.J., Lendvai,N., and Casadevall,A. (2000). Clearance and organ distribution of *Mycobacterium tuberculosis* lipoarabinomannan (LAM) in the presence and absence of LAM-binding immunoglobulin M. *Infect. Immun.* 68, 335-341.

Gonzalo-Asensio,J., Mostowy,S., Harders-Westerveen,J., Huygen,K., Hernández-Pando,R., Thole,J., Behr,M., Gicquel,B., and Martin,C. (2008). PhoP: a missing piece in the intricate puzzle of *Mycobacterium tuberculosis* virulence. *PLoS. One.* 3, e3496.

Goonetilleke,N.P., McShane,H., Hannan,C.M., Anderson,R.J., Brookes,R.H., and Hill,A.V. (2003). Enhanced immunogenicity and protective efficacy against *Mycobacterium tuberculosis* of bacille Calmette-Guerin vaccine using mucosal administration and boosting with a recombinant modified vaccinia virus Ankara. *J. Immunol.* 171, 1602-1609.

Gor,D.O., Rose,N.R., and Greenspan,N.S. (2003). TH1-TH2: a procrustean paradigm. *Nat. Immunol.* 4, 503-505.

- Gordon,S.V., Brosch,R., Billault,A., Garnier,T., Eiglmeier,K., and Cole,S.T. (1999). Identification of variable regions in the genomes of tubercle bacilli using bacterial artificial chromosome arrays. *Mol. Microbiol.* 32, 643-655.
- Goxe,B., Latour,N., Bartholeyns,J., Romet-Lemonne,J.L., and Chokri,M. (1998). Monocyte-derived dendritic cells: development of a cellular processor for clinical applications. *Res. Immunol.* 149, 643-646.
- Gradmann,C. (2009). Robert Koch and tuberculosis: the beginning of medical bacteriology. *Pneumologie* 63, 702-708.
- Grandi,G. and Zagursky,R. (2004). The impact of genomics in vaccine discovery: achievements and lessons. *Expert. Rev. Vaccines.* 3, 621-623.
- Griffith,D. (1998). Mycobacteria as Pathogens of Respiratory Infection. *Infect Dis Clin North America* 12, 593-600.
- Grosset,J. (1999). Which strategies for eradication of tuberculosis?. *Bull. Acad. Natl. Med.* 183, 25-37.
- Gupta,U.D. and Katoch,V.M. (2009). Animal models of tuberculosis for vaccine development. *Indian J. Med. Res.* 129, 11-18.
- Gurunathan,S., Klinman,D.M., and Seder,R.A. (2000). DNA vaccines: immunology, application, and optimization. *Annu. Rev. Immunol.* 18, 927-974.
- Haile,M., Schroder,U., Hamasur,B., Pawlowski,A., Jaxmar,T., Kallenius,G., and Svenson,S.B. (2004). Immunization with heat-killed *Mycobacterium bovis* bacille Calmette-Guerin (BCG) in Eurocine L3 adjuvant protects against tuberculosis. *Vaccine* 22, 1498-1508.
- Hamasur,B., Haile,M., Pawlowski,A., Schroder,U., Kallenius,G., and Svenson,S.B. (2004). A mycobacterial lipoarabinomannan specific monoclonal antibody and its F(ab') fragment prolong survival of mice infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin. Exp. Immunol.* 138, 30-38.
- Hamasur,B., Haile,M., Pawlowski,A., Schroder,U., Williams,A., Hatch,G., Hall,G., Marsh,P., Kallenius,G., and Svenson,S.B. (2003). *Mycobacterium tuberculosis* arabinomannan-protein conjugates protect against tuberculosis. *Vaccine* 21, 4081-4093.
- Hawgood,B.J. (1999). Doctor Albert Calmette 1863-1933: founder of antivenomous serotherapy and of antituberculous BCG vaccination. *Toxicon* 37, 1241-1258.
- Hermanson,G., Whitlow,V., Parker,S., Tonsky,K., Rusalov,D., Ferrari,M., Lalor,P., Komai,M., Mere,R., Bell,M., Brenneman,K., Mateczun,A., Evans,T., Kaslow,D., Galloway,D., and Hobart,P. (2004). A cationic lipid-formulated plasmid DNA vaccine confers sustained antibody-mediated protection against aerosolized anthrax spores. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 101, 13601-13606.

Harboe, M. (1992). The significance of proteins actively secreted by *Mycobacterium tuberculosis* in relation to immunity and complications of mycobacterial diseases. *Int Lepr Other Mycobact Dis* 60, 470-476.

Hernández-Pando,R., Aguilar,D., Orozco,H., Cortez,Y., Brunet,L.R., and Rook,G.A. (2008). Orally administered *Mycobacterium vaccae* modulates expression of immunoregulatory molecules in BALB/c mice with pulmonary tuberculosis. *Clin. Vaccine Immunol.* 15, 1730-1736.

Hernández-Pando,R., Castanon,M., Espitia,C., and López-Vidal,Y. (2007). Recombinant BCG vaccine candidates. *Curr. Mol. Med.* 7, 365-372.

Hernández-Pando,R., De La Luz,S.M., Orozco,H., Arriaga,K., Pavon,L., Al-Nakhli,S.A., and Rook,G.A. (1998). The effects of androstenediol and dehydroepiandrosterone on the course and cytokine profile of tuberculosis in BALB/c mice. *Immunology* 95, 234-241.

Hernández-Pando,R., Pavon,L., Arriaga,K., Orozco,H., Madrid-Marina,V., and Rook,G. (1997). Pathogenesis of tuberculosis in mice exposed to low and high doses of an environmental mycobacterial saprophyte before infection. *Infect. Immun.* 65, 3317-3327.

Hernández-Pando,R., Pavon,L., Orozco,E.H., Rangel,J., and Rook,G.A. (2000). Interactions between hormone-mediated and vaccine-mediated immunotherapy for pulmonary tuberculosis in BALB/c mice. *Immunology* 100, 391-398.

Hess,J., Grode,L., Hellwig,J., Conradt,P., Gentshev,I., Goebel,W., Ladel,C., and Kaufmann,S.H. (2000). Protection against murine tuberculosis by an attenuated recombinant *Salmonella typhimurium* vaccine strain that secretes the 30-kDa antigen of *Mycobacterium bovis* BCG. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 27, 283-289.

Hirayama,Y., Yoshimura,M., Ozeki,Y., Sugawara,I., Udagawa,T., Mizuno,S., Itano,N., Kimata,K., Tamaru,A., Ogura,H., Kobayashi,K., and Matsumoto,S. (2009). Mycobacteria exploit host hyaluronan for efficient extracellular replication. *PLoS. Pathog.* 5, e1000643.

Hirsch,C.S., Johnson,J.L., and Ellner,J.J. (1999a). Pulmonary tuberculosis. *Curr. Opin. Pulm. Med.* 5, 143-150.

Hirsch,C.S., Toossi,Z., Vanham,G., Johnson,J.L., Peters,P., Okwera,A., Mugerwa,R., Mugenyi,P., and Ellner,J.J. (1999b). Apoptosis and T cell hyporesponsiveness in pulmonary tuberculosis. *J. Infect. Dis.* 179, 945-953.

Holle,J.U., Schinke,S., and Gross,W.L. (2008). Risk of infection by biologics. *Z. Rheumatol.* 67, 295-304.

Horwitz, H.A. (1991). Heat shock proteins and antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 59, 3086-3093.

Huang,W.L., Chen,H.Y., Kuo,Y.M., and Jou,R. (2009). Performance assessment of the GenoType MTBDRplus test and DNA sequencing in detection of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Clin. Microbiol.* 47, 2520-2524.

Huerta-Yepeze,S., Baay-Guzmán,G.J., García-Zepeda,R., Hernández-Pando,R., Vega,M.I., González-Bonilla,C., and Bonavida,B. (2008). 2-Methoxyestradiol (2-ME) reduces the airway inflammation and remodeling in an experimental mouse model. *Clin. Immunol.* 129, 313-324.

Huygen,K., Content,J., Denis,O., Montgomery,D.L., Yawman,A.M., Deck,R.R., DeWitt,C.M., Orme,I.M., Baldwin,S., D'Souza,C., Drowart,A., Lozes,E., Vandenbussche,P., Van Vooren,J.P., Liu,M.A., and Ulmer,J.B. (1996). Immunogenicity and protective efficacy of a tuberculosis DNA vaccine. *Nat. Med.* 2, 893-898.

Iankov,I.D., Petrov,D.P., Mladenov,I.V., Haralambieva,I.H., Kalev,O.K., Balabanova,M.S., and Mitov,I.G. (2004). Protective efficacy of IgA monoclonal antibodies to O and H antigens in a mouse model of intranasal challenge with *Salmonella enterica* serotype Enteritidis. *Microbes. Infect.* 6, 901-910.

Igietseme,J.U., Eko,F.O., He,Q., and Black,C.M. (2004). Antibody regulation of Tcell immunity: implications for vaccine strategies against intracellular pathogens. *Expert. Rev. Vaccines.* 3, 23-34.

Imaz,M.S., Comini,M.A., Zerbini,E., Sequeira,M.D., Spoletti,M.J., Etchart,A.A., Pagano,H.J., Bonifasich,E., Díaz,N., Claus,J.D., and Singh,M. (2001). Evaluation of the diagnostic value of measuring IgG, IgM and IgA antibodies to the recombinant 16-kilodalton antigen of *Mycobacterium tuberculosis* in childhood tuberculosis. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 5, 1036-1043.

Imbach,P., Barandun,S., Baumgartner,C., Hirt,A., Hofer,F., and Wagner,H.P. (1981). High-dose intravenous gammaglobulin therapy of refractory, in particular idiopathic thrombocytopenia in childhood. *Helv. Paediatr. Acta* 36, 81-86.

Iwasaki,A., Torres,C.A., Ohashi,P.S., Robinson,H.L., and Barber,B.H. (1997). The dominant role of bone marrow-derived cells in CTL induction following plasmid DNA immunization at different sites. *J. Immunol.* 159, 11-14.

Jackett, P. S., Bothamley, G. H., Batra, H. V., Mistry, A., Young, D. B., Ivanyi, J. (1998). Specificity of antibodies to immunodominant mycobacterial antigens in pulmonary tuberculosis. *J Clin Microbiol* 26, 2313-2318.

Jacobs,G.G., Johnson,J.L., Boom,W.H., Wallis,R.S., Whalen,C.C., and Ginsberg,A.M. (1997). Tuberculosis vaccines: how close to human testing? *Tuber. Lung Dis.* 78, 159-169.

Jakob, T., Walker, P. S., Krieg, A. M., Udey, M. C., and Vogel, J. C. (1998). Activation of cutaneous dendritic cells by CpG-containing oligodeoxynucleotides: a role for dendritic cells in the augmentation of Th1 responses by immunostimulatory DNA. *J. Immunol.* 161, 3042-3049.

Julian, E., Matas, L., Perez, A., Alcaide, J., Laneelle, M. A., and Luquin, M. (2002). Serodiagnosis of tuberculosis: comparison of immunoglobulin A (IgA) response to sulfolipid I with IgG and IgM responses to 2,3-diacyltrehalose, 2,3,6-triacyltrehalose, and cord factor antigens. *J. Clin. Microbiol.* 40, 3782-3788.

Jung, S. B., Yang, C. S., Lee, J. S., Shin, A. R., Jung, S. S., Son, J. W. (2006). The mycobacterial 38-kilodalton Glycolipoprotein Antigen activates the mitogen-activated protein kinase pathway and release of proinflammatory cytokines through toll-like receptors 2 and 4 in human monocytes. *Infect Immun* 74, 2686-2696.

Jungblut, P. R., Schaible, U. E., Mollenkopf, H. J., Zimny-Arndt, U., Raupach, B., Mattow, J., Halada, P., Lamer, S., Hagens, K., and Kaufmann, S. H. (1999). Comparative proteome analysis of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* BCG strains: towards functional genomics of microbial pathogens. *Mol. Microbiol.* 33, 1103-1117.

Junqueira-Kipnis, A. P., Basaraba, R. J., Gruppo, V., Palanisamy, G., Turner, O. C., Hsu, T., Jacobs, W. R., Jr., Fulton, S. A., Reba, S. M., Boom, W. H., and Orme, I. M. (2006). Mycobacteria lacking the RD1 region do not induce necrosis in the lungs of mice lacking interferon-gamma. *Immunology* 119, 224-231.

Kallenius, G., Pawlowski, A., Brandtzaeg, P., and Svenson, S. (2007). Should a new tuberculosis vaccine be administered intranasally? *Tuberculosis. (Edinb. )* 87, 257-266.

Kamath, A. T., Hanke, T., Briscoe, H., and Britton, W. J. (1999). Co-immunization with DNA vaccines expressing granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and mycobacterial secreted proteins enhances T-cell immunity, but not protective efficacy against *Mycobacterium tuberculosis*. *Immunology* 96, 511-516.

Kamholz, S. L. (1996). Resurgence of tuberculosis: the perspective a dozen years later. *J. Assoc. Acad. Minor. Phys.* 7, 83-86.

Kamholz, S. L. (2000). Tuberculosis at the millennium (yes, we should worry). *J. Assoc. Acad. Minor. Phys.* 11, 1-2.

Kaufmann, S. H. (2003). A short history of Robert Koch's fight against tuberculosis: those who do not remember the past are condemned to repeat it. *Tuberculosis. (Edinb. )* 83, 86-90.

Kaufmann, S. H. (2005). Introduction. Rational vaccine development against tuberculosis: "Those who don't remember the past are condemned to repeat it". *Microbes. Infect.* 7, 897-898.

- Khadeeva,P.V., Morozov,I., and Koz'iakova,E.S. (2003). Efficacy of BCG vaccination. *Probl. Tuberk. Bolezn. Legk.* 9-11.
- Kidd,P. (2003). Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. *Altern. Med. Rev.* 8, 223-246.
- Kiser,K.B., Cantey-Kiser,J.M., and Lee,J.C. (1999). Development and characterization of a *Staphylococcus aureus* nasal colonization model in mice. *Infect. Immun.* 67, 5001-5006.
- Klinman,D.M., Sechler,J.M., Conover,J., Gu,M., and Rosenberg,A.S. (1998). Contribution of cells at the site of DNA vaccination to the generation of antigen-specific immunity and memory. *J. Immunol.* 160, 2388-2392.
- Kohama,H., Umemura,M., Okamoto,Y., Yahagi,A., Goga,H., Harakuni,T., Matsuzaki,G., and Arakawa,T. (2008). Mucosal immunization with recombinant heparin-binding haemagglutinin adhesin suppresses extrapulmonary dissemination of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin (BCG) in infected mice. *Vaccine* 26, 924-932.
- Koide,Y., Nagata,T., Yoshida,A., and Uchijima,M. (2000). DNA vaccines. *Jpn. J. Pharmacol.* 83, 167-174.
- Kondo,S. and Nishimura,G. (2004). An infant with tuberculosis who previously contacted an infant with congenital tuberculosis. *Kekkaku* 79, 537-540.
- Konishi,E., Yamaoka,M., Kurane,I., and Mason,P.W. (2000). A DNA vaccine expressing dengue type 2 virus premembrane and envelope genes induces neutralizing antibody and memory B cells in mice. *Vaccine* 18, 1133-1139.
- Kopylova,I.F. and Lomova,L.A. (2009). Outcomes of pulmonary tuberculosis in patients without bacterial isolation (according to sputum microscopy data). *Probl. Tuberk. Bolezn. Legk.* 12-15.
- Kramnik,I., Dietrich,W.F., Demant,P., and Bloom,B.R. (2000). Genetic control of resistance to experimental infection with virulent *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97, 8560-8565.
- Krieg,A.M., Yi,A.K., Matson,S., Waldschmidt,T.J., Bishop,G.A., Teasdale,R., Koretzky,G.A., and Klinman,D.M. (1995). CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* 374, 546-549.
- Kubica,A.J. (1983). The importance of building trust and credibility. *Curr. Concepts Hosp. Pharm. Manage.* 5, 10-1, 15.
- Kurono,Y., Suzuki,M., Mogi,G., Yamamoto,M., Fujihashi,K., McGhee,J.R., and Kiyono,H. (1999). Effects of intranasal immunization on protective immunity against otitis media. *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* 49 Suppl 1, S227-S229.

- Kus,L., Mysakowska,H., Fafrowicz,B., Tomaszewski,J., Wojciechowska,E., and Ligeza,B. (1977). Effect of corticotherapy on IgA, IgM and IgG serum levels in patients with tuberculosis. *Pol. Tyg. Lek.* 32, 1545-1547.
- Kutzler,M.A. and Weiner,D.B. (2004). Developing DNA vaccines that call to dendritic cells. *J. Clin. Invest* 114, 1241-1244.
- Laemmli,U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lee,B.Y., Hefta,S.A., and Brennan,P.J. (1992). Characterization of the major membrane protein of virulent *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* 60, 2066-2074.
- Liu,L., Zhou,X., Liu,H., Xiang,L., and Yuan,Z. (2005). CpG motif acts as a 'danger signal' and provides a T helper type 1-biased microenvironment for DNA vaccination. *Immunology* 115, 223-230.
- Liu,M.A., McClements,W., Ulmer,J.B., Shiver,J., and Donnelly,J. (1997). Immunization of non-human primates with DNA vaccines. *Vaccine* 15, 909-912.
- Logan,K.E., Gavier-Widen,D., Hewinson,R.G., and Hogarth,P.J. (2008). Development of a *Mycobacterium bovis* intranasal challenge model in mice. *Tuberculosis. (Edinb. )* 88, 437-443.
- López,B., Aguilar,D., Orozco,H., Burger,M., Espitia,C., Ritacco,V., Barrera,L., Kremer,K., Hernández-Pando,R., Huygen,K., and Van Soolingen,D. (2003). A marked difference in pathogenesis and immune response induced by different *Mycobacterium tuberculosis* genotypes. *Clin. Exp. Immunol.* 133, 30-37.
- Louveau,C., Descroix,D., Garnier,L., Delamanche,I., Chavarot,P., Ramiisse,F., Marchal,G., and Vergnaud,G. (2005). A nose-only apparatus for airborne delivery of *Mycobacterium tuberculosis* to mice: calibration of biological parameters. *Microbes. Infect.* 7, 457-466.
- Lowrie,D.B., Silva,C.L., and Tascon,R.E. (1998). Progress towards a new tuberculosis vaccine. *BioDrugs.* 10, 201-213.
- Lu,F., Zhuang,H., Zhu,Y., and Zhu,X. (1996). A preliminary study on immune response to hepatitis E virus DNA vaccine in mice. *Chin Med. J. (Engl.)* 109, 919-921.
- Lugton,I. (1999). Mucosa-associated lymphoid tissues as sites for uptake, carriage and excretion of tubercle bacilli and other pathogenic mycobacteria. *Immunol. Cell Biol.* 77, 364-372.
- Luo,X.D., Zhu,D.Y., Jiang,S., Chen,Q., and Jiang,Y. (2004). The estimation of protective efficacy of the fusion gene vaccine encoding tubercle antigen 85B and MPT64 in mice challenged with *Mycobacterium tuberculosis*. *Zhonghua Yi. Xue. Za Zhi.* 84, 687-691.

- Ly,L.H. and McMurray,D.N. (2008). Tuberculosis: vaccines in the pipeline. *Expert. Rev. Vaccines*. 7, 635-650.
- Lyadova,I.V., Oberdorf,S., Kapina,M.A., Apt,A.S., Swain,S.L., and Sayles,P.C. (2004). CD4 T cells producing IFN-gamma in the lungs of mice challenged with mycobacteria express a CD27-negative phenotype. *Clin. Exp. Immunol.* 138, 21-29.
- Maglione,P.J. and Chan,J. (2009). How B cells shape the immune response against *Mycobacterium tuberculosis*. *Eur. J. Immunol.* 39, 676-686.
- Maglione,P.J., Xu,J., Casadevall,A., and Chan,J. (2008). Fc gamma receptors regulate immune activation and susceptibility during *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J. Immunol.* 180, 3329-3338.
- Maglione,P.J., Xu,J., and Chan,J. (2007). B cells moderate inflammatory progression and enhance bacterial containment upon pulmonary challenge with *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Immunol.* 178, 7222-7234.
- Manabe,Y.C., Breen,R., Perti,T., Girardi,E., and Sterling,T.R. (2008). Unmasked Tuberculosis and Tuberculosis Immune Reconstitution Inflammatory Disease: A Disease Spectrum after Initiation of Antiretroviral Therapy. *J. Infect. Dis.*
- Manosuthi,W., Van,T.H., Mankatitham,W., Lueangniyomkul,A., Ananworanich,J., Avihingsanon,A., Siangphoe,U., Klongugkara,S., Likanonsakul,S., Thawornwan,U., Suntisuklappon,B., and Sungkanuparph,S. (2009). Clinical case definition and manifestations of paradoxical tuberculosis-associated immune reconstitution inflammatory syndrome. *AIDS* 23, 2467-2471.
- Marrero Figueroa (1998). Tuberculosis: situación actual en el contexto mundial y nacional. *RESUMED* 11, 196-209.
- Martin,C. (2005). The dream of a vaccine against tuberculosis; new vaccines improving or replacing BCG? *Eur. Respir. J.* 26, 162-167.
- Martin,C., Williams,A., Hernández-Pando,R., Cardona,P.J., Gormley,E., Bordat,Y., Soto,C.Y., Clark,S.O., Hatch,G.J., Aguilar,D., Ausina,V., and Gicquel,B. (2006). The live *Mycobacterium tuberculosis* phoP mutant strain is more attenuated than BCG and confers protective immunity against tuberculosis in mice and guinea pigs. *Vaccine* 24, 3408-3419.
- Martins,T.C. and Aguas,A.P. (1999). Mechanisms of *Mycobacterium avium*-induced resistance against insulin-dependent diabetes mellitus (IDDM) in non-obese diabetic (NOD) mice: role of Fas and Th1 cells. *Clin. Exp. Immunol.* 115, 248-254.
- Massaer,M., Haumont,M., García,L., Mazzu,L., Bollen,A., Jacobs,P., and Jacquet,A. (1999). Differential neutralizing antibody responses to varicella-zoster virus glycoproteins B and E following naked DNA immunization. *Viral Immunol.* 12, 227-236.

Mata-Espinosa,D.A., Mendoza-Rodríguez,V., guilar-Leon,D., Rosales,R., López-Casillas,F., and Hernández-Pando,R. (2008). Therapeutic effect of recombinant adenovirus encoding interferon-gamma in a murine model of progressive pulmonary tuberculosis. *Mol. Ther.* 16, 1065-1072.

Matthys,F., Rigouts,L., Sizaire,V., Vezhnina,N., Lecoq,M., Golubeva,V., Portaels,F., Van der,S.P., and Kimerling,M. (2009). Outcomes after chemotherapy with WHO category II regimen in a population with high prevalence of drug resistant tuberculosis. *PLoS. One.* 4, e7954.

McMurray,D.N. (2003). Hematogenous reseeding of the lung in low-dose, aerosol-infected guinea pigs: unique features of the host-pathogen interface in secondary tubercles. *Tuberculosis. (Edinb. )* 83, 131-134.

McShane,H. (2009). Vaccine strategies against tuberculosis. *Swiss. Med. Wkly.* 139, 156-160.

Medina,E. and North,R.J. (1998). Resistance ranking of some common inbred mouse strains to *Mycobacterium tuberculosis* and relationship to major histocompatibility complex haplotype and Nramp1 genotype. *Immunology* 93, 270-274.

Melby,P.C., Ogden,G.B., Flores,H.A., Zhao,W., Geldmacher,C., Biediger,N.M., Ahuja,S.K., Uranga,J., and Melendez,M. (2000). Identification of vaccine candidates for experimental visceral leishmaniasis by immunization with sequential fractions of a cDNA expression library. *Infect. Immun.* 68, 5595-5602.

Menzies,D., Benedetti,A., Paydar,A., Martin,I., Royce,S., Pai,M., Vernon,A., Lienhardt,C., and Burman,W. (2009). Effect of duration and intermittency of rifampin on tuberculosis treatment outcomes: a systematic review and meta-analysis. *PLoS. Med.* 6, e1000146.

Miki,K., Nagata,T., Tanaka,T., Kim,Y.H., Uchijima,M., Ohara,N., Nakamura,S., Okada,M., and Koide,Y. (2004). Induction of protective cellular immunity against *Mycobacterium tuberculosis* by recombinant attenuated self-destructing *Listeria monocytogenes* strains harboring eukaryotic expression plasmids for antigen 85 complex and MPB/MPT51. *Infect. Immun.* 72, 2014-2021.

Mitchison,D.A. and Chang,K.C. (2009). Experimental models of tuberculosis: can we trust the mouse? *Am. J. Respir. Crit Care Med.* 180, 201-202.

Molling,K. (1997). Naked DNA for vaccine or therapy. *J. Mol. Med.* 75, 242-246.

Monari,C., Casadevall,A., Pietrella,D., Bistoni,F., and Vecchiarelli,A. (1999). Neutrophils from patients with advanced human immunodeficiency virus infection have impaired complement receptor function and preserved Fc gamma receptor function. *J. Infect. Dis.* 180, 1542-1549.

- Monteiro,R.C., Leroy,V., Launay,P., Moura,I.C., rcos-Fajardo,M., Benhamou,M., and Haddad,E. **(2003)**. Pathogenesis of Berger's disease: recent advances on the involvement of immunoglobulin A and their receptors. *Med. Sci. (Paris)* 19, 1233-1241.
- Moore,A.C. and Hutchings,C.L. **(2007)**. Combination vaccines: synergistic simultaneous induction of antibody and T-cell immunity. *Expert. Rev. Vaccines*. 6, 111-121.
- Mor,F. and Cohen,I.R. **(1995)**. Pathogenicity of T cells responsive to diverse cryptic epitopes of myelin basic protein in the Lewis rat. *J. Immunol.* 155, 3693-3699.
- Morais,F.D., Rosada,R.S., Oliveira e Paula, Wowk,P.F., Franco,L.H., Soares,E.G., Silva,C.L., and peron Bonato,V.L. **(2010)**. Experimental tuberculosis: Designing a better model to test vaccines against tuberculosis. *Tuberculosis. (Edinb. )*.
- Morris,S., Kelley,C., Howard,A., Li,Z., and Collins,F. **(2000)**. The immunogenicity of single and combination DNA vaccines against tuberculosis. *Vaccine* 18, 2155-2163.
- Morrison,S.L., Johnson,M.J., Herzenberg,L.A., and Oi,V.T. **(1984)**. Chimeric human antibody molecules: mouse antigen-binding domains with human constant region domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 81, 6851-6855.
- Mustafa,T., Phyu,S., Nilsen,R., Jonsson,R., and Bjune,G. **(1999)**. A mouse model for slowly progressive primary tuberculosis. *Scand. J. Immunol.* 50, 127-136.
- Myers,J.L. and Tazelaar,H.D. **(2008)**. Challenges in pulmonary fibrosis: 6--Problematic granulomatous lung disease. *Thorax* 63, 78-84.
- Nathan,C. **(2009)**. Taming tuberculosis: a challenge for science and society. *Cell Host. Microbe* 5, 220-224.
- Nedeltchev,G.G., Raghunand,T.R., Jassal,M.S., Lun,S., Cheng,Q.J., and Bishai,W.R. **(2009)**. Extrapulmonary dissemination of *Mycobacterium bovis* but not *Mycobacterium tuberculosis* in a bronchoscopic rabbit model of cavitary tuberculosis. *Infect. Immun.* 77, 598-603.
- Nichols,W.W., Ledwith,B.J., Manam,S.V., and Troilo,P.J. **(1995)**. Potential DNA vaccine integration into host cell genome. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 772, 30-39.
- Nieves,E.J. **(2002)**. The effectiveness of the assertive community treatment model. *Adm Policy Ment. Health* 29, 461-480.
- Nosanchuk,J.D., Steenbergen,J.N., Shi,L., Deepe,G.S., Jr., and Casadevall,A. **(2003)**. Antibodies to a cell surface histone-like protein protect against *Histoplasma capsulatum*. *J. Clin. Invest* 112, 1164-1175.
- Nunn,P., Williams,B., Floyd,K., Dye,C., Elzinga,G., and Raviglione,M. **(2005)**. Tuberculosis control in the era of HIV. *Nat. Rev. Immunol.* 5, 819-826.

- Nussbaum,G., Yuan,R., Casadevall,A., and Scharff,M.D. **(1996)**. Immunoglobulin G3 blocking antibodies to the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *J. Exp. Med.* 183, 1905-1909.
- Nys,M., Damas,J., Damas,P., Laub,R., Cloes,J.M., and Lamy,M. **(1999a)**. Study of the protective effects of hyperimmune immunoglobulins G and M against endotoxin in mice and rats. *Med. Microbiol. Immunol.* 188, 55-64.
- Nys,M., Damas,J., Damas,P., Laub,R., and Lamy,M. **(1999b)**. Influence of human anti-lipopolysaccharide immunoglobulins on tissue distribution and clearance of lipopolysaccharide in rats. *Med. Microbiol. Immunol.* 188, 65-71.
- Okumura,M., Iwai,K., Ogata,H., Ueyama,M., Kubota,M., Aoki,M., Kokuto,H., Tadokoro,E., Uchiyama,T., Saotome,M., Yoshiyama,T., Yoshimori,K., Yoshida,N., Azuma,A., and Kudoh,S. **(2008)**. Clinical factors on cavitory and nodular bronchiectatic types in pulmonary *Mycobacterium avium* complex disease. *Intern. Med.* 47, 1465-1472.
- Olivares,N., Puig,A., Aguilar,D., Moya,A., Cadiz,A., Otero,O., Izquierdo,L., Falero,G., Solis,R.L., Orozco,H., Sarmiento,M.E., Norazmi,M.N., Hernandez-Pando,R., and Acosta,A. **(2009)**. Prophylactic effect of administration of human gamma globulins in a mouse model of tuberculosis. *Tuberculosis. (Edinb. )* 89, 218-220.
- Orme,I.M. **(2005a)**. Mouse and guinea pig models for testing new tuberculosis vaccines. *Tuberculosis. (Edinb. )* 85, 13-17.
- Orme,I.M. **(2005b)**. The use of animal models to guide rational vaccine design. *Microbes. Infect.* 7, 905-910.
- Orme,I.M., McMurray,D.N., and Belisle,J.T. **(2001)**. Tuberculosis vaccine development: recent progress. *Trends Microbiol.* 9, 115-118.
- Pan,H., Yan,B.S., Rojas,M., Shebzukhov,Y.V., Zhou,H., Kobzik,L., Higgins,D.E., Daly,M.J., Bloom,B.R., and Kramnik,I. **(2005)**. Ipr1 gene mediates innate immunity to tuberculosis. *Nature* 434, 767-772.
- Parida,S.K., Huygen,K., Ryffel,B., and Chakraborty,T. **(2005)**. Novel bacterial delivery system with attenuated *Salmonella typhimurium* carrying plasmid encoding Mtb antigen 85A for mucosal immunization: establishment of proof of principle in TB mouse model. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1056, 366-378.
- Pethe,K., Puech,V., Daffe,M., Josenhans,C., Drobecq,H., Lochter,C., and Menozzi,F.D. **(2001)**. *Mycobacterium smegmatis* laminin-binding glycoprotein shares epitopes with *Mycobacterium tuberculosis* heparin-binding haemagglutinin. *Mol. Microbiol.* 39, 89-99.
- Phalipon,A. and Corthesy,B. **(2003)**. Novel functions of the polymeric Ig receptor: well beyond transport of immunoglobulins. *Trends Immunol.* 24, 55-58.

- Pickett, T.E., Pasetti, M.F., Galen, J.E., Sztein, M.B., and Levine, M.M. (2000). In vivo characterization of the murine intranasal model for assessing the immunogenicity of attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhi strains as live mucosal vaccines and as live vectors. *Infect. Immun.* 68, 205-213.
- Piedrafita, D., Xu, D., Hunter, D., Harrison, R.A., and Liew, F.Y. (1999). Protective immune responses induced by vaccination with an expression genomic library of *Leishmania major*. *J. Immunol.* 163, 1467-1472.
- Pirofski, L.A. and Casadevall, A. (2006). Immunomodulators as an antimicrobial tool. *Curr. Opin. Microbiol.* 9, 489-495.
- Pizza, M., Scarlato, V., Masignani, V., Giuliani, M.M., Arico, B., Comanducci, M., Jennings, G.T., Baldi, L., Bartolini, E., Capecchi, B., Galeotti, C.L., Luzzi, E., Manetti, R., Marchetti, E., Mora, M., Nuti, S., Ratti, G., Santini, L., Savino, S., Scarselli, M., Storni, E., Zuo, P., Broecker, M., Hundt, E., Knapp, B., Blair, E., Mason, T., Tettelin, H., Hood, D.W., Jeffries, A.C., Saunders, N.J., Granoff, D.M., Venter, J.C., Moxon, E.R., Grandi, G., and Rappuoli, R. (2000). Identification of vaccine candidates against serogroup B meningococcus by whole-genome sequencing. *Science* 287, 1816-1820.
- Poggi, A., Catellani, S., Musso, A., and Zocchi, M.R. (2009). Gammadelta T lymphocytes producing IFN gamma and IL-17 in response to *Candida albicans* or mycobacterial antigens: possible implications for acute and chronic inflammation. *Curr. Med. Chem.* 16, 4743-4749.
- Polack, F.P., Lee, S.H., Permar, S., Manyara, E., Nousari, H.G., Jeng, Y., Mustafa, F., Valsamakis, A., Adams, R.J., Robinson, H.L., and Griffin, D.E. (2000). Successful DNA immunization against measles: neutralizing antibody against either the hemagglutinin or fusion glycoprotein protects rhesus macaques without evidence of atypical measles. *Nat. Med.* 6, 776-781.
- Poland, G. and Barrett, A. (2009). The old and the new: successful vaccines of the 20th century and approaches to making vaccines for the important diseases of the 21st century. *Curr. Opin. Immunol.* 21, 305-307.
- Pym, A.S. and Brosch, R. (2000). Tools for the population genomics of the tubercle bacilli. *Genome Res.* 10, 1837-1839.
- Rangel, M.J., Estrada, G., I, De La Luz García Hernández, Aguilar, L.D., Marquez, R., and Hernández, P.R. (2002). The role of prostaglandin E2 in the immunopathogenesis of experimental pulmonary tuberculosis. *Immunology* 106, 257-266.
- Rappuoli, R. and Covacci, A. (2003). Reverse vaccinology and genomics. *Science* 302, 602.
- Rastogi, N., Legrand, E., and Sola, C. (2001). The mycobacteria: an introduction to nomenclature and pathogenesis. *Rev. Sci. Tech.* 20, 21-54.

Ravetch, J.V. and Bolland, S. (2001). IgG Fc receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 19, 275-290.

Ravindran, R., Anam, K., Bairagi, B.C., Saha, B., Pramanik, N., Guha, S.K., Goswami, R.P., Banerjee, D., and Ali, N. (2004). Characterization of immunoglobulin G and its subclass response to Indian kala-azar infection before and after chemotherapy. *Infect. Immun.* 72, 863-870.

Reece, S.T. and Kaufmann, S.H. (2008). Rational design of vaccines against tuberculosis directed by basic immunology. *Int. J. Med. Microbiol.* 298, 143-150.

Reggiardo, Z. and Middlebrook, G. (1974). Failure of passive serum transfer of immunity against aerogenic tuberculosis in rabbits. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 145, 173-175.

Regnault, A., Lankar, D., Lacabanne, V., Rodríguez, A., Thery, C., Rescigno, M., Saito, T., Verbeek, S., Bonnerot, C., Ricciardi-Castagnoli, P., and Amigorena, S. (1999). Fc gamma receptor-mediated induction of dendritic cell maturation and major histocompatibility complex class I-restricted antigen presentation after immune complex internalization. *J. Exp. Med.* 189, 371-380.

Reljic, R. (2007). IFN-gamma therapy of tuberculosis and related infections. *J. Interferon Cytokine Res.* 27, 353-364.

Reljic, R., Clark, S.O., Williams, A., Falero-Díaz, G., Singh, M., Challacombe, S., Marsh, P.D., and Ivanyi, J. (2006a). Intranasal IFN-gamma extends passive IgA antibody protection of mice against *Mycobacterium tuberculosis* lung infection. *Clin. Exp. Immunol.* 143, 467-473.

Reljic, R., Di Sano, C., Crawford, C., Dieli, F., Challacombe, S., and Ivanyi, J. (2005). Time course of mycobacterial infection of dendritic cells in the lungs of intranasally infected mice. *Tuberculosis. (Edinb.)* 85, 81-88.

Reljic, R. and Ivanyi, J. (2006). A case for passive immunoprophylaxis against tuberculosis. *Lancet Infect. Dis.* 6, 813-818.

Reljic, R., Williams, A., and Ivanyi, J. (2006b). Mucosal immunotherapy of tuberculosis: is there a value in passive IgA? *Tuberculosis. (Edinb.)* 86, 179-190.

Reynolds, H.Y. (1987). Identification and role of immunoglobulins in respiratory secretions. *Eur. J. Respir. Dis. Suppl* 153, 103-116.

Ríos-Barrera, V.A., Campos-Pena, V., Aguilar-Leon, D., Lascurain, L.R., Meraz-Ríos, M.A., Moreno, J., Figueroa-Granados, V., and Hernández-Pando, R. (2006). Macrophage and T lymphocyte apoptosis during experimental pulmonary tuberculosis: their relationship to mycobacterial virulence. *Eur. J. Immunol.* 36, 345-353.

Rivas-Santiago, B., Sada, E., Tsutsumi, V., Aguilar-Leon, D., Contreras, J.L., and Hernández-Pando, R. (2006). beta-Defensin gene expression during the course of experimental tuberculosis infection. *J. Infect. Dis.* 194, 697-701.

Robertson,S.E., Mayans,M.V., El Husseiny,A., Clemens,J.D., and Ivanoff,B. (2001). The WHO Vaccine Trial Registry. *Vaccine* 20, 31-41.

Robinson,S., Charini,W.A., Newberg,M.H., Kuroda,M.J., Lord,C.I., and Letvin,N.L. (2001). A commonly recognized simian immunodeficiency virus Nef epitope presented to cytotoxic T lymphocytes of Indian-origin rhesus monkeys by the prevalent major histocompatibility complex class I allele Mamu-A\*02. *J. Virol.* 75, 10179-10186.

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.

Rook,G.A. and Hernández-Pando,R. (1998). Immunological and endocrinological characteristics of tuberculosis that provide opportunities for immunotherapeutic intervention. *Novartis. Found. Symp.* 217, 73-87.

Rook,G.A. and Hernández-Pando,R. (1996). The pathogenesis of tuberculosis. *Annu. Rev. Microbiol.* 50, 259-284.

Rook,G.A. and Hernández-Pando,R. (1997). Pathogenetic role, in human and murine tuberculosis, of changes in the peripheral metabolism of glucocorticoids and antiglucocorticoids. *Psychoneuroendocrinology* 22 Suppl 1, S109-S113.

Rosenkrands,I., Weldingh,K., Jacobsen,S., Hansen,C.V., Florio,W., Gianetri,I., and Andersen,P. (2000). Mapping and identification of *Mycobacterium tuberculosis* proteins by two-dimensional gel electrophoresis, microsequencing and immunodetection. *Electrophoresis* 21, 935-948.

Roth,A.E., Stensballe,L.G., Garly,M.L., and Aaby,P. (2006). Beneficial non-targeted effects of BCG--ethical implications for the coming introduction of new TB vaccines. *Tuberculosis. (Edinb. )* 86, 397-403.

Rouanet,C., Debrie,A.S., Lecher,S., and Lochter,C. (2009). Subcutaneous boosting with heparin binding haemagglutinin increases BCG-induced protection against tuberculosis. *Microbes. Infect.* 11, 995-1001.

Roy,E., Stavropoulos,E., Brennan,J., Coade,S., Grigorieva,E., Walker,B., Dagg,B., Tascon,R.E., Lowrie,D.B., Colston,M.J., and Jolles,S. (2005). Therapeutic efficacy of high-dose intravenous immunoglobulin in *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. *Infect. Immun.* 73, 6101-6109.

Salgame,P. (2005). Host innate and Th1 responses and the bacterial factors that control *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Curr. Opin. Immunol.* 17, 374-380.

- Samad,L., Ali,M., and Ramzi,H. **(1998)**. Tracheobronchial foreign bodies in children: reaching a diagnosis. *J. Pak. Med. Assoc.* 48, 332-334.
- Sambrook,J., Fritsch,E.F., and Maniatis,T. **(1989)**. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor. *New York: Laboratory Press.*
- Santosuosso,M., McCormick,S., Zhang,X., Zganiacz,A., and Xing,Z. **(2006)**. Intranasal boosting with an adenovirus-vectored vaccine markedly enhances protection by parenteral *Mycobacterium bovis* BCG immunization against pulmonary tuberculosis. *Infect. Immun.* 74, 4634-4643.
- Santosuosso,M., Zhang,X., McCormick,S., Wang,J., Hitt,M., and Xing,Z. **(2005)**. Mechanisms of mucosal and parenteral tuberculosis vaccinations: adenoviral-based mucosal immunization preferentially elicits sustained accumulation of immune protective CD4 and CD8 T cells within the airway lumen. *J. Immunol.* 174, 7986-7994.
- Saunders,B.M. and Cooper,A.M. **(2000)**. Restraining mycobacteria: role of granulomas in mycobacterial infections. *Immunol. Cell Biol.* 78, 334-341.
- Schlesinger,B.C. and Cheng,L. **(1994)**. Characterization of a novel monoclonal antibody against human perforin using transfected cell lines. *Immunology* 81, 291-295.
- Schlesinger,L.S. and Horwitz,M.A. **(1994)**. A role for natural antibody in the pathogenesis of leprosy: antibody in nonimmune serum mediates C3 fixation to the *Mycobacterium leprae* surface and hence phagocytosis by human mononuclear phagocytes. *Infect. Immun.* 62, 280-289.
- Schlesinger,L.S., Hull,S.R., and Kaufman,T.M. **(1994a)**. Binding of the terminal mannosyl units of lipoarabinomannan from a virulent strain of *Mycobacterium tuberculosis* to human macrophages. *J. Immunol.* 152, 4070-4079.
- Schlesinger,M., Chu,F.N., Badamchian,M., Jiang,J.D., Roboz,J.P., Goldstein,A.L., and Bekesi,J.G. **(1994b)**. A distinctive form of soluble CD8 is secreted by stimulated CD8+ cells in HIV-1-infected and high-risk individuals. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 73, 252-260.
- Schmidt,F., Donahoe,S., Hagens,K., Mattow,J., Schaible,U.E., Kaufmann,S.H., Aebbersold,R., and Jungblut,P.R. **(2004)**. Complementary analysis of the *Mycobacterium tuberculosis* proteome by two-dimensional electrophoresis and isotope-coded affinity tag technology. *Mol. Cell Proteomics.* 3, 24-42.
- Senol, G., Erer, O. F., Yalcin, Y. A., Coskun, M., Gunduz, A. T., Bicmen, C. **(2007)**. Humoral immune response against 38-kDa and 16-kDa mycobacterial antigens in tuberculosis. *Eur Respir J* 29, 143-148.
- Serbina,N.V., Jia,T., Hohl,T.M., and Pamer,E.G. **(2008)**. Monocyte-mediated defense against microbial pathogens. *Annu. Rev. Immunol.* 26, 421-452.

- Sewell, W.A. and Jolles, S. (2002). Immunomodulatory action of intravenous immunoglobulin. *Immunology* 107, 387-393.
- Shen, L. and Rock, K.L. (2006). Priming of T cells by exogenous antigen cross-presented on MHC class I molecules. *Curr. Opin. Immunol.* 18, 85-91.
- Shi, L., Sohaskey, C.D., North, R.J., and Gennaro, M.L. (2008). Transcriptional characterization of the antioxidant response of *Mycobacterium tuberculosis* in vivo and during adaptation to hypoxia in vitro. *Tuberculosis. (Edinb.)* 88, 1-6.
- Shkurupii, V.A., Filimonov, P.N., and Kurunov, I. (1998). Evolution of granulomas induced by BCG vaccine administered in the experiment. *Probl. Tuberk.* 63-65.
- Sigarroa, A. (1985). Biometría y diseño experimental. Editorial Pueblo y Educación. La Habana.
- 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.
- Stager, S., Alexander, J., Kirby, A.C., Botto, M., Rooijen, N.V., Smith, D.F., Brombacher, F., and Kaye, P.M. (2003). Natural antibodies and complement are endogenous adjuvants for vaccine-induced CD8+ T-cell responses. *Nat. Med.* 9, 1287-1292.
- Sterling, T.R., Martire, T., de Almeida, A.S., Ding, L., Greenberg, D.E., Moreira, L.A., Elloumi, H., Torres, A.P., Sant'Anna, C.C., Calazans, E., Paraguassu, G., Gebretsadik, T., Shintani, A., Miller, K., Kritski, A., Lapa E Silva JR, and Holland, S.M. (2007). Immune function in young children with previous pulmonary or miliary/meningeal tuberculosis and impact of BCG vaccination. *Pediatrics* 120, e912-e921.
- Sugawara, I., Yamada, H., and Mizuno, S. (2004). Pathological and immunological profiles of rat tuberculosis. *Int. J. Exp. Pathol.* 85, 125-134.
- Sumida, S.M., McKay, P.F., Truitt, D.M., Kishko, M.G., Arthur, J.C., Seaman, M.S., Jackson, S.S., Gorgone, D.A., Lifton, M.A., Letvin, N.L., and Barouch, D.H. (2004). Recruitment and expansion of dendritic cells in vivo potentiate the immunogenicity of plasmid DNA vaccines. *J. Clin. Invest* 114, 1334-1342.
- Talaat, A.M. and Stemke-Hale, K. (2005). Expression library immunization: a road map for discovery of vaccines against infectious diseases. *Infect. Immun.* 73, 7089-7098.
- Tascon, R.E., Ragno, S., Lowrie, D.B., and Colston, M.J. (2000a). Immunostimulatory bacterial DNA sequences activate dendritic cells and promote priming and differentiation of CD8+ T cells. *Immunology* 99, 1-7.

- Tascon,R.E., Soares,C.S., Ragno,S., Stavropoulos,E., Hirst,E.M., and Colston,M.J. (2000b). *Mycobacterium tuberculosis*-activated dendritic cells induce protective immunity in mice. *Immunology* 99, 473-480.
- Teitelbaum,R., Glatman-Freedman,A., Chen,B., Robbins,J.B., Unanue,E., Casadevall,A., and Bloom,B.R. (1998). A mAb recognizing a surface antigen of *Mycobacterium tuberculosis* enhances host survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, 15688-15693.
- Tian,X., Cai,H., and Zhu,Y.X. (2004). Protection of mice with a divalent tuberculosis DNA vaccine encoding antigens Ag85B and MPT64. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)* 36, 269-276.
- Tieu,H.V., Ananworanich,J., Avihingsanon,A., Apateerapong,W., Sirivichayakul,S., Siangphoe,U., Klongugkara,S., Boonchokchai,B., Hammer,S.M., and Manosuthi,W. (2009). Immunologic markers as predictors of tuberculosis-associated immune reconstitution inflammatory syndrome in HIV and tuberculosis coinfecting persons in Thailand. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 25, 1083-1089.
- Tjarnlund,A., Guirado,E., Julian,E., Cardona,P.J., and Fernandez,C. (2006). Determinant role for Toll-like receptor signalling in acute mycobacterial infection in the respiratory tract. *Microbes. Infect.* 8, 1790-1800.
- Tollefsen,S., Tjelle,T., Schneider,J., Harboe,M., Wiker,H., Hewinson,G., Huygen,K., and Mathiesen,I. (2002). Improved cellular and humoral immune responses against *Mycobacterium tuberculosis* antigens after intramuscular DNA immunisation combined with muscle electroporation. *Vaccine* 20, 3370-3378.
- Tree,J.A., Williams,A., Clark,S., Hall,G., Marsh,P.D., and Ivanyi,J. (2004). Intranasal bacille Calmette-Guerin (BCG) vaccine dosage needs balancing between protection and lung pathology. *Clin. Exp. Immunol.* 138, 405-409.
- Turner,J. and Orme,I.M. (2004). The expression of early resistance to an infection with *Mycobacterium tuberculosis* by old mice is dependent on IFN type II (IFN-gamma) but not IFN type I. *Mech. Ageing Dev.* 125, 1-9.
- Ulmer,J.B. (1997). Elegantly presented DNA vaccines. *Nat. Biotechnol.* 15, 842-843.
- Ulmer,J.B., Sadoff,J.C., and Liu,M.A. (1996). DNA vaccines. *Curr. Opin. Immunol.* 8, 531-536.
- Ulrichs,T., Kosmiadi,G.A., Trusov,V., Jorg,S., Pradl,L., Titukhina,M., Mishenko,V., Gushina,N., and Kaufmann,S.H. (2004). Human tuberculous granulomas induce peripheral lymphoid follicle-like structures to orchestrate local host defence in the lung. *J. Pathol.* 204, 217-228.

- van Crevel, C.R., Parwati, I., Sahiratmadja, E., Marzuki, S., Ottenhoff, T.H., Netea, M.G., van, d., V, Nelwan, R.H., van der Meer, J.W., Alisjahbana, B., and van, d., V (2009). Infection with *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype strains is associated with polymorphisms in SLC11A1/NRAMP1 in Indonesian patients with tuberculosis. *J. Infect. Dis.* 200, 1671-1674.
- Vashishtha, V.M. (2009). WHO Global Tuberculosis Control Report 2009: Tuberculosis elimination is a distant dream. *Indian Pediatr.* 46, 401-402.
- Venisse, A., Fournie, J.J., and Puzo, G. (1995a). Mannosylated lipoarabinomannan interacts with phagocytes. *Eur. J. Biochem.* 231, 440-447.
- Venisse, A., Riviere, M., Vercauteren, J., and Puzo, G. (1995b). Structural analysis of the mannan region of lipoarabinomannan from *Mycobacterium bovis* BCG. Heterogeneity in phosphorylation state. *J. Biol. Chem.* 270, 15012-15021.
- Vipond, J., Vipond, R., Ien-Vercoe, E., Clark, S.O., Hatch, G.J., Gooch, K.E., Bacon, J., Hampshire, T., Shuttleworth, H., Minton, N.P., Blake, K., Williams, A., and Marsh, P.D. (2006). Selection of novel TB vaccine candidates and their evaluation as DNA vaccines against aerosol challenge. *Vaccine* 24, 6340-6350.
- von Reyn, C.F. and Vuola, J.M. (2002). New vaccines for the prevention of tuberculosis. *Clin. Infect. Dis.* 35, 465-474.
- Waldman, R.H. and Ganguly, R. (1974). The role of the secretory immune system in protection against agents which infect the respiratory tract. *Adv. Exp. Med. Biol.* 45, 283-294.
- Williams, A., Hatch, G.J., Clark, S.O., Gooch, K.E., Hatch, K.A., Hall, G.A., Huygen, K., Ottenhoff, T.H., Franken, K.L., Andersen, P., Doherty, T.M., Kaufmann, S.H., Grode, L., Seiler, P., Martin, C., Gicquel, B., Cole, S.T., Brodin, P., Pym, A.S., Dalemans, W., Cohen, J., Lobet, Y., Goonetilleke, N., McShane, H., Hill, A., Parish, T., Smith, D., Stoker, N.G., Lowrie, D.B., Kallenius, G., Svenson, S., Pawlowski, A., Blake, K., and Marsh, P.D. (2005). Evaluation of vaccines in the EU TB Vaccine Cluster using a guinea pig aerosol infection model of tuberculosis. *Tuberculosis. (Edinb.)* 85, 29-38.
- Williams, A., Reljic, R., Naylor, I., Clark, S.O., Falero-Díaz, G., Singh, M., Challacombe, S., Marsh, P.D., and Ivanyi, J. (2004). Passive protection with immunoglobulin A antibodies against tuberculous early infection of the lungs. *Immunology* 111, 328-333.
- Williams, R. (2006). Escape from fatal fusion. *J. Exp. Med.* 203, 2047.
- Winslow, E.H. and Jacobson, A.F. (2000). Can a fashion statement harm the patient? Long and artificial nails may cause nosocomial infections. *Am. J. Nurs.* 100, 63-65.
- Woof, J.M. and Kerr, M.A. (2006). The function of immunoglobulin A in immunity. *J. Pathol.* 208, 270-282.

- Wu,C., Hao,H., Li,L., Zhou,X., Guo,Z., Zhang,L., Zhang,X., Zhong,W., Guo,H., Bremner,R.M., and Lin,P. (2009). Preliminary investigation of the clinical significance of detecting circulating tumor cells enriched from lung cancer patients. *J. Thorac. Oncol.* 4, 30-36.
- Wu,S., Barnes,P.F., Samten,B., Pang,X., Rodrigue,S., Ghanny,S., Soteropoulos,P., Gaudreau,L., and Howard,S.T. (2009). Activation of the eis gene in a W-Beijing strain of *Mycobacterium tuberculosis* correlates with increased SigA levels and enhanced intracellular growth. *Microbiology* 155, 1272-1281.
- Xing,Z. and Lichty,B.D. (2006). Use of recombinant virus-vectored tuberculosis vaccines for respiratory mucosal immunization. *Tuberculosis. (Edinb. )* 86, 211-217.
- Yan,B.S., Pichugin,A.V., Jobe,O., Helming,L., Eruslanov,E.B., Gutierrez-Pabello,J.A., Rojas,M., Shebzukhov,Y.V., Kobzik,L., and Kramnik,I. (2007). Progression of pulmonary tuberculosis and efficiency of bacillus Calmette-Guerin vaccination are genetically controlled via a common sst1-mediated mechanism of innate immunity. *J. Immunol.* 179, 6919-6932.
- Yegian,D. and Porter,K.R. (1944). Some Artifacts Encountered in Stained Preparations of Tubercle Bacilli: I. Non-Acid-fast Forms Arising From Mechanical Treatment. *J. Bacteriol.* 48, 83-91.
- Yero,C.D., Pajón,F.R., Caballero,M.E., Cobas,A.K., López,H.Y., Fariñas,M.M., González,B.S., and Acosta,D.A. (2005). Immunization of mice with *Neisseria meningitidis* serogroup B genomic expression libraries elicits functional antibodies and reduces the level of bacteremia in an infant rat infection model. *Vaccine* 23, 932-939.
- Young,D. (2009). Animal models of tuberculosis. *Eur. J. Immunol.* 39, 2011-2014.
- Young,D., Hussell,T., and Dougan,G. (2002). Chronic bacterial infections: living with unwanted guests. *Nat. Immunol.* 3, 1026-1032.
- Yuan,R.R., Casadevall,A., Oh,J., and Scharff,M.D. (1997). T cells cooperate with passive antibody to modify *Cryptococcus neoformans* infection in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94, 2483-2488.
- Yuan, Y., Crane, D. D., Simpson, R. M., Zhu, Y. Q., Hickey, M. J., Sherman, D. R. (1998). The 16-kDa alpha-crystallin (Acr) protein of *Mycobacterium tuberculosis* is required for growth in macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 9578-9583.
- Zhang,A., Jin,H., Zhang,F., Ma,Z., Tu,Y., Ren,Z., Zhang,X., Zhu,K., and Wang,B. (2005). Effects of multiple copies of CpG on DNA vaccination. *DNA Cell Biol.* 24, 292-298.

## **IX. AUTOBIBLIOGRAFIA**

1. **Yamilé López**, Gustavo Falero, Daniel Yero, María E. Sarmiento, Rosa L. Solis, Armando Acosta. Antibodies in the protection against tuberculosis: what we have learned? **Proc. Vaccinology 2010;2:172-177.**
2. **Yamilé López**, Daniel Yero, Gustavo Falero, Nesty Olivares, María E. Sarmiento, Sergio Sifontes, Rosa L. Solis, Jorge A. Barrios, Rogelio Hernández, Armando Acosta. Induction of a protective response with an IgA monoclonal antibody against *Mycobacterium tuberculosis* 16 kDa protein in a model of progressive pulmonary infection. **Int. J. Med. Microbiol. 2009;299(6):389-466.**
3. **Yamilé López**, Daniel Yero, Sergio Sifontes, Juan Francisco Infante, Maria Elena Sarmiento, Nesty Olivares, Enrique Casado Maceo, Daiyana Díaz, Raúl Díaz, Armando Acosta. Immunization with a *Mycobacterium tuberculosis* genomic expression library results in a lower bacterial load in lungs of mice after the challenge with BCG. **Tuberculosis 2006; 86:247-54.**
4. Nesty Olivares, Annette León, **Yamilé López**, Alina Puig, Armando Cádiz, Gustavo Falero, Máximo Martínez, María E. Sarmiento, Mildrey Fariñas, Juan F. Infante, Gustavo Sierra, Rosa L. Solís, Armando Acosta. The effect of administration of Human gammaglobulins in a model of BCG infection in mice. **Tuberculosis 2006;86:268-72.**
5. Armando Acosta Domínguez, Gustavo Falero Díaz, Armando Cádiz, Gustavo Sierra, Juan Francisco Infante, María Elena Sarmiento, Annette León, **Yamilé López**, Nesty Olivares, Máximo Martínez, Aniel Moya, Alexandro Rodríguez, Ania Zayas, Mildrey Fariñas, Zoe Díaz, Keren Hernández, Irelio Rodríguez, María Elena Pérez, Alina Alvarez, Idalis Griñán, Teresita Vidal, Pedro Estévez. Un nuevo enfoque en el estudio de los mecanismos protectores contra la Tuberculosis. Papel de los anticuerpos específicos. **Biotecnología Aplicada; 2003:20(2):130-3.**

### Otros artículos relacionados

1. Daniel Yero, Rolando Pajón, Evelyn Caballero, Karem Cobas, **Yamilé López**, Mildrey Fariñas, Sonia Gonzáles, Armando Acosta. Immunization of mice with *Neisseria meningitidis* serogroup B genomic expression libraries elicits functional antibodies and reduces the level of bacteremia in an infant rat infection model. **Vaccine 2005; 23:932-39.**
2. Daniel Yero, Rolando Pajon, Evelin Caballero, Sonia Gonzalez, Karem Cobas, Mildrey Fariñas, **Yamilé López**, Armando Acosta. A novel method to screen genomic libraries that combines genomic immunization with the prime-boost strategy. **FEMS Imm and Med Microbiol 2007;50(3):430-3.**

### Presentaciones en Congresos

#### Congreso Internacional Biotecnología Habana, 1999

- Development of an animal model to study mucosal immunity against BCG in Balb/c mice.

#### I Congreso Internacional de la Sociedad Cubana de Inmunología, Habana, 1999

- Development of a biomodels for the study of mucosal immunity against *Mycobacteria* by intranasal infection with BCG in Balb/c mice.

#### V Congreso Latinoamericano de Inmunología, Uruguay, 1999

- Evaluation of protection at mucosal level of IgA monoclonal antibody specific to 16 kDa protein of *M.tuberculosis*.

#### VI Congreso Latinoamericano de Inmunología, Cuba, 2002

- Humoral Immune response of Cuban population vaccinated with BCG against 38 kDa protein of *M.tuberculosis*
- Evaluation of protection effect of human gammaglobulins administered by intranasal route against BCG infection in Balb/c mice.

#### Congreso Internacional Biotecnología Habana 2003

- Evaluation of therapeutic effect of human gammaglobulin administered by intranasal route to Balb/c mice.

- Induction of protective immune response in Balb/c mice after immunisation with genomic expression library of *Neisseria meningitides B*.

#### **TB Vaccines for the world, Montreal, Canada, 2003**

- Evaluation of the effect of the administration of human gammaglobulins in a model of infection with BCG in mice.

#### **12 Congreso Internacionalde Inmunología, Montreal, Canada, 2004.**

- Immunisation with an optimised genomic expression library of *Neisseria meningitides B* elicits specific lymphoproliferative response in mice.

#### **Taller Internacional Tbvaccines, Varadero, Cuba, 2005.**

- Immunization with *M. tuberculosis* expression library elicits a protective response in mice after challenge with BCG.

#### **Global Vaccine Research Forum, Bamako, Mali, 2009**

- Application of the intratracheal model of progressive pulmonary infection for preclinical evaluation of new therapeutic and prophylactic formulations against *Mycobacterium tuberculosis*.

#### **Patentes**

**Compositions for the treatment of Mycobacterial infections.** European Patent Specification, WO 2004/047865(10.06.2004 Gazette 2004/24)

#### **Distinciones y Premios**

##### **Premio Anual de la Academia de Ciencias de Cuba, 2002.**

“Un nuevo enfoque en los mecanismos protectores de defensa contra la tuberculosis. Papel de los anticuerpos específicos”

##### **Destacado Provincial XVI Forum de Ciencia y Técnica, 2005**

“La inmunización con una biblioteca genómica de expresión de *M. tuberculosis* resulta protectora en un modelo de infección pulmonar progresiva en ratones.”