

---

# Modelos de tuberculosis experimental

---

Pere-Joan Cardona<sup>a,c,\*</sup>, Vicenç Ausina<sup>a,c</sup> y Joan Caylà<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup>Servei de Microbiologia. Hospital Universitari Germans Trias i Pujol. Badalona. Barcelona. <sup>b</sup>Servei d'Epidemiologia. Institut Municipal de la Salut. Barcelona. <sup>c</sup>Unidad de Investigación en Tuberculosis de Barcelona.

---

## RESUMEN

La infección por *Mycobacterium tuberculosis* puede provocar la enfermedad tuberculosa durante toda la vida del huésped en un 10 % de los infectados. Si bien los mecanismos que ocasionan la aparición de la enfermedad en el huésped no han sido todavía dilucidados, los diferentes modelos experimentales han proporcionado una gran información sobre la importancia de los macrófagos, el desarrollo de la inmunidad específica y la memoria inmune que permiten controlar a la infección. Los modelos experimentales también han permitido profundizar en el estudio de los mecanismos patogénicos en caso de reinfección o reactivación, así como en estudios de virulencia. De igual manera, estos modelos han sido imprescindibles en el diseño de pautas de profilaxis y de tratamiento, para abordar uno de los problemas más importantes que plantea el tratamiento antibiótico en esta enfermedad: la presencia de bacilos persistentes en las lesiones. De entre todos los modelos descritos, la utilización del modelo murino de tuberculosis es el que ha proporcionado un mayor conocimiento, tanto en la inmunopatología como en la profilaxis y el tratamiento de la misma.

### Palabras clave:

Tuberculosis experimental. Fisiopatología. Tratamiento.

---

## TUBERCULOSIS EXPERIMENTAL MODEL

Infection by *Mycobacterium tuberculosis* can induce tuberculous disease among 10 % of infected hosts. So far, mechanisms concerned in the development of the disease has not been yet elucidated, but experimental models have been providing useful information about the importance of macrophages, development of specific immunity and memory immunity that allow hosts to control the infection. Experimental models have allowed to study deepest pathogenic mechanisms of reinfection, reactivation, and in studies about virulence. Actually, these models have been absolutely necessary in figure out one of the paramount problems that represents the antibiotic treatment of this disease: the presence of persistent bacilli in lesions. Among all, the murine model of tuberculosis has been the one that has provide the deepest knowledge both in immunopathology and in profilaxis and treatment of tuberculosis.

### Key words:

Experimental tuberculosis. Pathogenesis. Therapy.

---

---

## Introducción

Cada año fallecen más personas a causa de la tuberculosis que debido a ninguna otra enfermedad infecciosa. Actualmente la mortalidad anual se sitúa en los 3.000.000 de personas, y se diagnostican 8.000.000 de casos nuevos cada año. Se ha estimado que un tercio de la población

mundial (aproximadamente 2.000.000.000 de personas) están infectadas, entre las cuales un 10 % desarrollará la enfermedad. Esta situación indujo en 1993 a la Organización Mundial de la Salud (OMS) a reconocer que la tuberculosis era una "emergencia sanitaria global", siendo la primera ocasión en que una enfermedad se ha calificado de esta manera<sup>1</sup>. El hecho que la inci-

---

\*Correo electrónico: pcardona@ns.hugtip.scs.es.

dencia en España sea la más alta (después de Portugal) de los países desarrollados, con una incidencia estimada anual de 45 casos por 100.000 habitantes<sup>2</sup>, y que en España exista la tasa más elevada de síndrome de inmunodeficiencia adquirida (sida) de los países desarrollados, con el riesgo correspondiente de la aparición de cepas multirresistentes<sup>3</sup>, hacen de nuestro entorno un área en la que el control de esta enfermedad constituye una prioridad absoluta.

### Historia natural de la tuberculosis humana

En la mayoría de los casos, la tuberculosis humana es el resultado de la inhalación de las gotas de Flügge que contienen *M. tuberculosis* y que se establecen en los alvéolos pulmonares donde son fagocitados por los macrófagos alveolares. El macrófago infectado puede destruir el bacilo, en el caso que esté previamente activado de manera inespecífica; en caso contrario, el bacilo es capaz de multiplicarse en el interior de los fagosomas y destruir posteriormente al macrófago. Los macrófagos infectados secretan diferentes citocinas para atraer a los neutrófilos y a nuevos macrófagos, que fagocitan a los bacilos presentes en el medio extracelular, así como para generar un foco inflamatorio. Mientras tanto, los bacilos se van diseminando hacia los nódulos linfáticos regionales y los vasos sanguíneos.

Como consecuencia de la infección primaria por *M. tuberculosis* se produce una diseminación sistémica bacilar, por un lado y, por otro, la formación de un "complejo primario" compuesto por una linfadenopatía hiliar, donde se origina la respuesta inmune específica y el foco infeccioso parenquimatoso (foco de Ghon) en el que se origina una lesión granulomatosa estructurada por una necrosis caseosa central, rodeada de macrófagos y células epitelioides, y externamente por linfocitos T. A medida que la lesión evoluciona, aparecen células multinucleadas de Langhans en el interior del granuloma.

La repuesta inmunitaria específica consta no tan sólo de la proliferación de linfocitos específicos T CD4 que activan a los macrófagos y los transforman en células epitelioides, capaces de destruir a los bacilos, sino también por el estímulo de una hipersensibilidad retardada de tipo IV, puesta de manifiesto con la prueba de la tuberculina.

En el 95 % de los casos, el "complejo primario" suele resolverse, pero en un 5 % puede originar una enfermedad primaria, ocasionando cuadros patológicos de diferente gravedad, desde pleuritis a tuberculosis miliar. En otro 5 % de

los infectados, puede originarse una enfermedad posprimaria durante toda la vida del huésped, a partir de la reactivación de focos infecciosos localizados en zonas anatómicas especialmente susceptibles (como el ápice pulmonar), establecidos durante la diseminación hematogena inicial y que habían permanecido en un estado persistente. En países en los que existe un alto riesgo de infección, este proceso puede originarse mediante reinfección.

En la enfermedad posprimaria, la respuesta inmunitaria y la formación de granulomas son similares a las observadas en la enfermedad primaria, con la diferencia de que la formación de tejido necrótico caseoso es mucho más importante, generando unas lesiones denominadas tuberculomas<sup>4</sup> que no permiten la diseminación linfática o sanguínea de los bacilos. El tejido caseoso es desfavorable para la multiplicación de los bacilos; por ello, para desencadenar la enfermedad en estas lesiones debe producirse el fenómeno de liquefacción del tejido caseoso, que se ha asociado al fenómeno de hipersensibilidad retardada<sup>5</sup>. El tejido liquefactado permite el crecimiento masivo de la población bacilar extracelular, provocando el incremento de la lesión y, en el pulmón, la erosión bronquial que induce la cavitación<sup>6</sup>. Las lesiones cavitadas reciben un gran aporte de oxígeno que permite que se incremente más la población bacilar<sup>7</sup>. Así pues, es posible establecer una relación entre la concentración bacilar y la presencia de infección o enfermedad en un huésped (fig. 1).

### Modelos animales de experimentación en tuberculosis

#### Aproximación histórica

En el estudio de la tuberculosis, se ha trabajado mayoritariamente en tres especies animales: el conejo, el cobaya y el ratón. El conejo es el animal en el que la tuberculosis se asemeja más a la evolución humana, puesto que es el único en el que se produce cavitación de las lesiones<sup>8,9</sup>. Los cobayas desarrollan una hipersensibilidad retardada muy intensa, y son más sensibles a *M. tuberculosis* que los humanos o los conejos<sup>9</sup>, lo que ocasiona, como en niños y en pacientes inmunodeprimidos, una enfermedad diseminada por vía hematogena, si bien no desarrollan lesiones cavitadas<sup>10</sup>. Los ratones presentan un grado de resistencia a *M. tuberculosis* similar al de los humanos, pero desarrollan una hipersensibilidad retardada de baja intensidad y sus lesiones no presentan necrosis ni cavitación<sup>11</sup>.

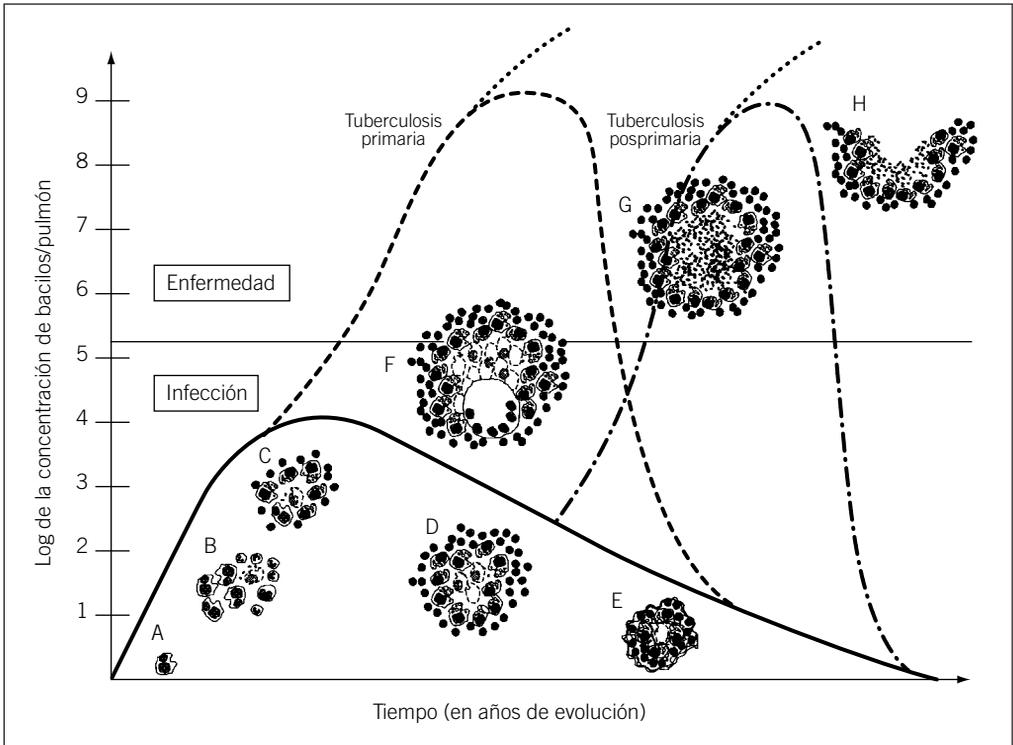


Fig. 1. Representación gráfica de la historia natural de la tuberculosis humana. Relación entre la histopatología y la concentración bacilífera en los tejidos. A: el bacilo entra en contacto con un macrófago alveolar; B: el bacilo se divide en el interior del macrófago al mismo tiempo que se atraen al foco infeccioso macrófagos y neutrófilos; C: adquisición de una inmunidad específica con la llegada de linfocitos capaces de activar a los macrófagos alveolares, inicio de la necrosis caseosa; D: formación de un granuloma caseoso; E: resolución del foco infeccioso mediante la esclerosis del granuloma; F: evolución hacia enfermedad, formación del tuberculoma a partir de una reinfección o de una reactivación (en esta figura se representa una célula de Langhans); G: liquefacción del granuloma e incremento masivo de la población bacilar; G: cavitación. La línea continua representa la evolución de la infección; las dos discontinuas representan la enfermedad primaria y la posprimaria que se resuelven; la línea de puntos representa la enfermedad que no se resuelve y finaliza con la muerte del huésped.

Los estudios iniciales sobre patología de la tuberculosis realizados por Robert Koch se llevaron a cabo en diferentes mamíferos. Posteriormente, el estudio de la tuberculosis se centró prácticamente en las experiencias del grupo de Max Lurie, utilizando cepas de *M. tuberculosis* y de *M. bovis* con diferentes grados de virulencia, y dos cepas de conejos (resistente y sensible)<sup>12,13</sup>. Estos estudios pusieron de manifiesto la importancia del macrófago y de la necrosis intragranulomatosa en el control de la infección por *M. tuberculosis*.

El año 1952, Middlebrook<sup>14</sup> publicó el diseño de un equipo para inducir infecciones por aerosol, proporcionando inóculos constantes y alta-

mente reproducibles a los animales (fig. 2). El diseño de este aparato fue de una gran importancia, puesto que, previamente, la utilización de aerosoles para provocar la infección había provocado muchos problemas de estandarización. A partir de este momento, los investigadores dispusieron de un instrumento eficaz para crear modelos de infección por la ruta que más imitaba las condiciones de infección en el huésped humano, si bien el peligro potencial, para el personal manipulador, de la creación de aerosoles en el laboratorio, ha hecho decantar a muchos grupos por la vía de inoculación intravenosa.

La alta sensibilidad del cobaya a *M. tuberculosis* ha provocado que este animal se haya utiliza-

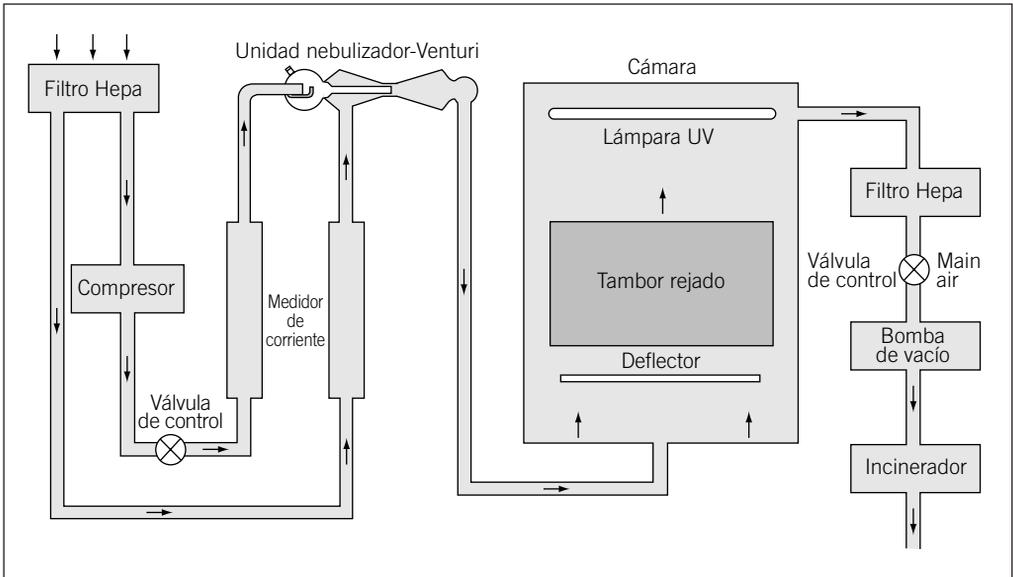


Fig. 2. Esquema de una máquina de Middlebrook. Diagrama del sistema de exposición por inhalación de Glas-Col. Esta máquina dispone de un tambor rejado donde se ubican hasta 125 ratones, un compresor de aire para generar el aerosol en el tubo de Venturi y un sistema de ventilación activado por una bomba de vacío, que permiten dosificar el inóculo. Así mismo este dispositivo tiene tres sistemas de seguridad: 1) filtros Hepa de entrada y salida de aire; 2) lámparas ultravioleta en la tapa superior de la máquina que se activan posteriormente a la finalización de la generación del aerosol para evitar contaminar al técnico que manipula la máquina al abrirla, y 3) por último, un incinerador a la salida del aire para destruir cualquier partícula en caso de fallo de los filtros Hepa.

do profusamente en laboratorios asistenciales para establecer la presencia de *M. tuberculosis* en las muestras patológicas antes de la aparición de medios de cultivo eficaces para el aislamiento de los bacilos<sup>15</sup>. También en este animal se realizaron los primeros estudios para establecer la capacidad virulenta de diferentes cepas de *M. tuberculosis*<sup>16</sup>, teniendo además una especial relevancia en la valoración de la eficacia de las diferentes vacunas para la tuberculosis<sup>17</sup>.

Entre los años 1960 y 1970 se empezaron a realizar los estudios clásicos sobre inmunidad en el ratón, animal en el que se estableció el concepto de "macrófago activado"<sup>18</sup>. A partir de entonces el estudio experimental de los mecanismos inmunológicos de las infecciones en general se empezó a realizar en este animal y los estudios en tuberculosis se centraron en el ratón en detrimento del cobaya, del que en realidad se dispone de muy poca información acerca de su sistema inmunológico. A partir de los años ochenta, los estudios inmunológicos experimentaron un gran auge con la aparición de las técnicas de biología molecular, la disposición de anticuerpos monoclonales, y de ratones transgénicos, pro-

porcionando una gran información sobre la red citocínica en la inmunopatología de la tuberculosis en el ratón<sup>19</sup>, de manera que los estudios en este animal han desplazado prácticamente a los del cobaya y del conejo.

### Descripción detallada del modelo de tuberculosis murina

A continuación se detallará el modelo de infección por aerosol y por inoculación intravenosa en el ratón, puesto que son los modelos más utilizados.

Se utilizan ratones hembra de 6 a 8 semanas de edad, libres de patógenos específicos (spf), del tipo C57Bl/6. La cepas de *M. tuberculosis* se cultivan en medio Proskauer-Beck, hasta una fase media logarítmica, y se conservan en alícuotas de 1 ml a -70 °C hasta su utilización, valorándose su concentración mediante el cultivo de diluciones seriadas en agar Middlebrook 7H11 a 37 °C con un 5% de CO<sub>2</sub>. Los ratones se infectan por exposición a un aerosol durante 45 min, mediante su ubicación en un aparato de infección tipo Middlebrook (Glas-col Inc., Terre Hau-

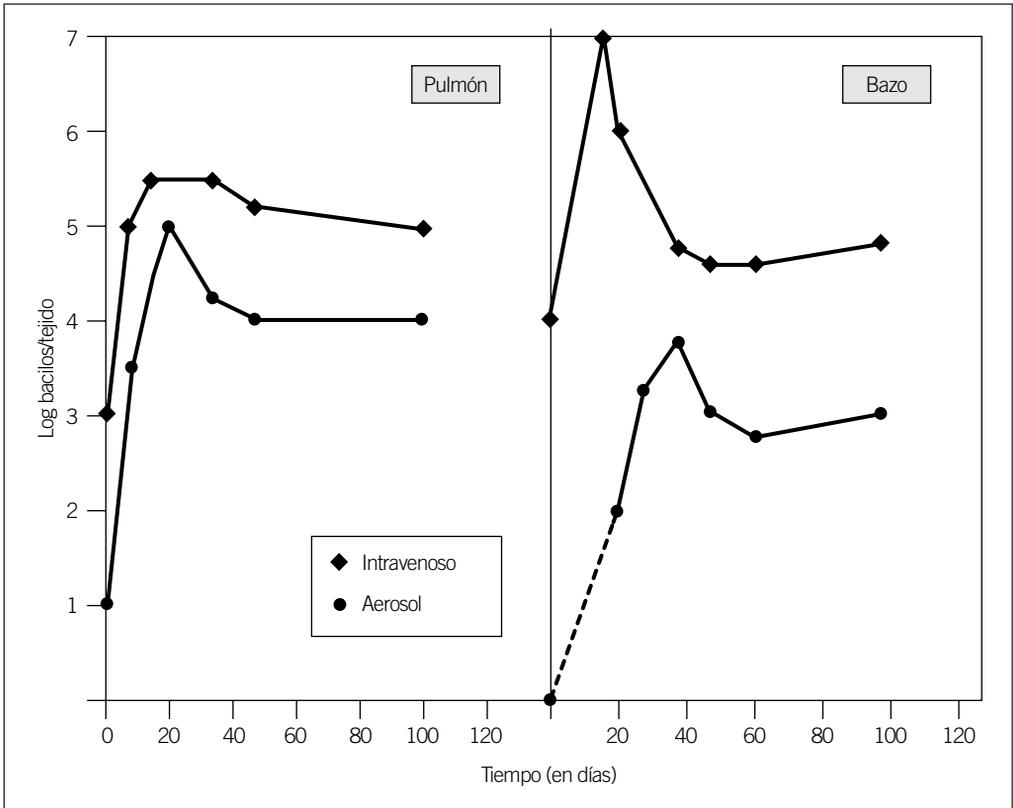


Fig. 3. Evolución de la infección por *M. tuberculosis* en el ratón, inoculando intravenosamente  $10^5$  bacilos viables o 20 bacilos viables mediante un aerosol.

te, IN), donde hay instalada una unidad de Venturi en la que se dispone un volumen de 10 ml de agua destilada que contiene  $10^7$  unidades formadoras de colonias (UFC), lo que proporciona un inóculo aproximado de 10-50 bacilos viables en los pulmones de cada animal. En el caso de utilizarse la infección intravenosa, se inoculan 0,2 ml de suero fisiológico que contiene  $10^5$  UFC.

Para monitorizar la evolución de la infección (fig. 3), se sacrifican los animales, en grupos de cuatro, introduciéndolos en una cámara de CO. Las muestras se trituran mediante un homogeneizador de vidrio. El número de bacilos viables se determina incubando diluciones seriadas de homogeneizados de pulmón y bazo en agar Middlebrook 7H11 a 37 °C con un 5% de CO<sub>2</sub>. Para el estudio de la presencia de ARNm de diferentes citocinas, se homogeneiza un lóbulo pulmonar en un medio con inhibidores de ARNsas (Ultraspect) y se conserva a -70 °C hasta proce-

der a la extracción del ARNm mediante una técnica clásica utilizando alcohol isopropílico y cloroformo. Para el estudio histológico, se instila una solución de formalina en phosphate buffer sodium (PBS) salino en un lóbulo pulmonar y, posteriormente, se incluye en parafina para ser teñido por las técnicas de hematoxilina-eosina y Ziehl-Neelsen.

Si bien parece claro que el modelo que mejor reproduce la infección es el de la inoculación por aerosol, este modelo es realizado por un número muy reducido de laboratorios debido a la necesidad de disponer de un estabulario de alta seguridad para evitar el riesgo potencial que supone la creación de aerosoles por *M. tuberculosis*. La diferencia entre la inoculación por aerosol o por vía intravenosa es notable. North et al<sup>20</sup> objetivaron que en el primer caso la infección es mucho más agresiva para los animales, ocasionando una mortalidad precoz a partir del día 100 postinocu-

lación, mientras que en el segundo caso, los animales no morían, al menos hasta el día 200 postinoculación. Los autores señalaban que en la inoculación por aerosol había mucha más afectación del parénquima pulmonar, hecho que implicaría un mayor compromiso respiratorio. Nuestro grupo<sup>21</sup> ha corroborado este extremo, observando que en el modelo de inoculación por aerosol las lesiones granulomatosas son significativamente mayores a las del modelo por inoculación intravenosa, y que esto se debería a que la adquisición de la inmunidad y del control de la infección es más tardía en el modelo de la inoculación por aerosol, en contraposición al de inoculación por vía intravenosa, en el que la concentración de bacilos inicial es tan importante en el bazo ( $10^4$  UFC; fig. 3) que estimula la inmunidad específica rápidamente.

### Ventajas y limitaciones de tuberculosis murina

La utilización del modelo de tuberculosis experimental en el ratón posee numerosas ventajas:

1. La gran similitud con la especie humana en cuanto a resistencia ante *M. tuberculosis*.
2. El gran conocimiento de su sistema inmunológico y la gran disponibilidad en reactivos o ratones transgénicos defectivos en diferentes moléculas implicadas en la patogenia.
3. La posibilidad de poder infectar a un gran número de animales al mismo tiempo, en caso de utilizar una máquina de tipo Middlebrook, cuya capacidad es de 125 ratones, 25 cobayas o 5 conejos, disminuyendo el error de la utilización de varias tandas de inoculación.
4. La economía de espacio y mantenimiento. Por razones de seguridad ambiental, este modelo de infección debe llevarse a cabo en un laboratorio equipado con un sistema de ventilación en depresión; el problema del espacio es mucho más importante en el caso de utilizar animales como el cobaya o el conejo.

En cuanto a las desventajas del modelo cabe destacar la ausencia de necrosis intragranulomatosa y la generación de una hipersensibilidad retardada débil.

En general, cabe señalar que, independientemente de la especie animal que se utilice, la realización de los modelos de tuberculosis experimental se ha de llevar a cabo en instalaciones de seguridad tipo 3, es decir, equipadas con un equipo de ventilación en depresión y con filtros de alta eficacia, y en las que se han de tomar medidas

estrictas de esterilización de alimentos y de todo el material fungible utilizado en su interior, y de protección física del personal para evitar cualquier riesgo de contaminación ambiental por *M. tuberculosis*. En el caso de utilizar el modelo de infección por aerosol, hay que añadir el peligro potencial de la máquina de Middlebrook que si bien lleva tres sistemas de seguridad incorporados para evitar la contaminación ambiental (fig. 2), se tiene que añadir un cuarto sistema: la ubicación de la máquina en un compartimento dentro del laboratorio, para poder tomar precauciones en caso de observar cualquier anomalía en los sistemas de seguridad existentes, lo que evitaría, consiguientemente, cualquier riesgo de exposición accidental del personal técnico.

### Avances que han supuesto los modelos de tuberculosis en el conocimiento de la fisiopatología de este proceso infeccioso

La complejidad de la inmunopatología de la tuberculosis ha hecho y hace imprescindible la investigación de esta enfermedad mediante el uso de modelos experimentales en animales.

Los estudios de Lurie, en los que se han utilizado dos cepas de conejos con diferente grado de sensibilidad a la infección por *M. tuberculosis* (cepa sensible y cepa resistente), demostraron que la diferencia entre ambas cepas se debía al grado de resistencia innata de los macrófagos que, en el caso de los conejos resistentes, provocaba una destrucción del inóculo inicial de *M. tuberculosis* 20 veces más elevada que en los sensibles<sup>13</sup>. Posteriormente, utilizando la información proporcionada por este modelo, Dannenberg<sup>9</sup> ha establecido cinco fases, desde un punto de vista anatomopatológico, en este proceso infeccioso, destacando la importancia de la activación de los macrófagos por los linfocitos específicos y de la hipersensibilidad retardada (DTH) en la histopatología de la infección (fig. 4):

- I. *Inicio*: el macrófago alveolar fagocita al bacilo y lo destruye en caso de estar previamente activado.
- II. *Simbiosis*: en el caso de que el macrófago no pueda destruir al bacilo, éste se multiplica en su interior y se libera cuando este macrófago se destruye. A continuación, los bacilos son fagocitados por otros macrófagos alveolares o por monocitos inactivados, formándose un tubérculo primario y estableciéndose una relación simbiótica en que ni los bacilos destruyen a los macrófagos ni éstos a los bacilos. En esta fase se objetiva un crecimiento logarítmico de los bacilos.

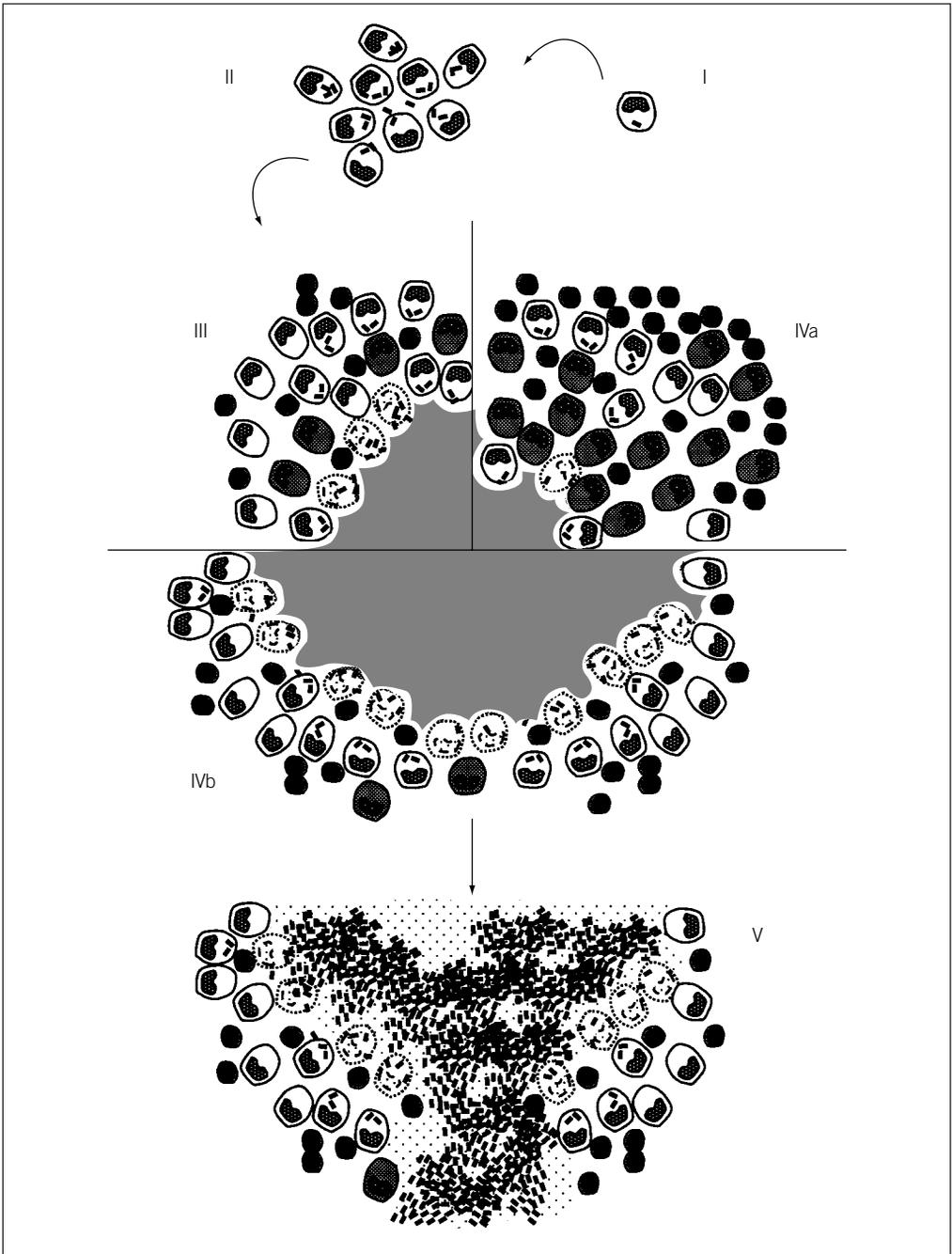


Fig. 4. Patogenia de la tuberculosis pulmonar experimental en conejos según Dannenberg (1994). I: fagocitosis del bacilo; II: simbiosis; III: necrosis caseosa inicial; IV: interacción entre destrucción de tejidos y activación de macrófagos, en los conejos resistentes (IVa) y sensibles (IVb); V: liquefacción y formación de cavidades. Los macrófagos activados están coloreados en gris, mientras que los destruidos se representan con una línea discontinua.

*III. Necrosis caseosa inicial:* esta fase se inicia cuando el crecimiento bacilar logarítmico se interrumpe, y coincide con el inicio de la necrosis caseosa y la aparición de la DTH que provoca la destrucción de los macrófagos no activados que contienen bacilos. Todavía no existe una respuesta inmunitaria, puesto que no hay macrófagos activados.

*IV. Interacción entre destrucción de tejidos y activación de macrófagos:* en esta fase se objetiva que los conejos resistentes (fase IVa) desarrollan una importante inmunidad celular que activa a los macrófagos, permitiéndoles destruir los bacilos que fagocitan, observándose una mayoría de macrófagos activados y poca necrosis en las lesiones granulomatosas. En el caso de los conejos sensibles (fase IVb) se objetivan una menor activación de los macrófagos y una mayor necrosis, debido a que presentan poca inmunidad celular y que en ellos sólo es efectivo el proceso de DTH.

*V. Liquefacción y formación de cavidades:* la liquefacción del tejido necrótico induce la proliferación extracelular de los bacilos, el aumento de las lesiones y la formación de cavidades.

La alta sensibilidad de los cobayas a la infección por *M. tuberculosis* y la facilidad de la diseminación hematógena de las infecciones han servido para estudiar el fenómeno de formación de lesiones metastásicas, junto con el de su reactivación y el de la naturaleza local de la inmunidad celular. Ho et al<sup>22</sup> constataron que infectando a cobayas mediante un aerosol, el inóculo inicial ocasionaba un cierto número de lesiones primarias en el pulmón. Este número de lesiones se incrementaba a la tercera semana postinoculación como consecuencia de la aparición de un nuevo tipo de lesiones incipientes, metastásicas, secundarias a la diseminación hematógena. Al realizar el seguimiento de la concentración de UFC en ambos tipos de lesiones, se constató que no seguían la misma evolución, puesto que mientras en las lesiones primarias la concentración de UFC se había controlado, en las metastásicas seguía incrementándose. Así pues, los bacilos que se establecían durante la bacilemia se multiplicaban en los focos metastásicos hasta conseguir una concentración determinada de antígenos con la que poder estimular la inmunidad y activar a los macrófagos en cada foco infectivo.

Posteriormente, en este mismo modelo Smith et al<sup>23</sup> demostraron en un estudio comparativo que las cepas de *M. tuberculosis* menos virulentas no tenían capacidad para ocasionar lesiones secundarias metastásicas. Pudieron demostrar la

teoría de que los bacilos con baja capacidad virulenta generan la enfermedad en el foco inicial de infección, razonamiento que contradecía la opinión generalizada que establecía que la tuberculosis pulmonar se originaba exclusivamente a partir de la reactivación de focos metastásicos, si bien este tipo de evolución se generaría en entornos con un gran riesgo de infección, puesto que harían falta muchas infecciones para que el foco generador de la enfermedad se situara en una localización susceptible al desarrollo de un tuberculoma, como el ápice pulmonar.

El modelo de tuberculosis murina ha permitido explorar y obtener una visión más clara de la inmunopatogenia de esta infección<sup>24</sup>. Este grupo de investigadores considera que hay dos fases: una protectora y una de control (fig. 5):

*I. Fase protectora:* los linfocitos T CD4 vírgenes reconocen a los epitopos de proteínas secretadas/exportadas por los bacilos que se multiplican en el interior del fagosoma del macrófago infectado, unidas a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) de clase II. Estos linfocitos se transforman en linfocitos de tipo Th1 bajo la influencia de la interleucina 12 (IL-12) secretada por los macrófagos infectados. Los linfocitos Th1 se caracterizan por secretar un patrón determinado de citocinas como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), que permite la llegada de más macrófagos al foco infeccioso, y el interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) que activa a los macrófagos infectados y permite la destrucción de los bacilos. En esta fase también participan los linfocitos T  $\gamma\delta$ , que ayudan a la activación de los macrófagos mediante la secreción de IFN- $\gamma$  y a la proliferación de los linfocitos Th1 mediante la síntesis de IL-2. Así mismo, mediante la secreción de IL-12, el macrófago estimula las células *natural killer* (NK), que también sintetizan IFN- $\gamma$ .

*II. Fase de control:* a medida que la infección progresa, los linfocitos Th1 específicos empiezan a desaparecer (tienen una vida media corta) y aparecen células de larga duración, cuya misión sería evitar la diseminación mediante el reconocimiento de focos nuevos. De esta manera, los linfocitos T efectoros de la hipersensibilidad retardada (DTH), al reconocer una amplia gama de antígenos micobacterianos, provocan respuestas granulomatosas. Otros linfocitos T CD4 tienen funciones citolíticas, y son capaces de destruir macrófagos muy infectados; también se ha demostrado la presencia de linfocitos T CD8, que destruirían a células no fagocíticas (como las células endoteliales) infectadas mediante la presentación de antígenos asociados a moléculas del

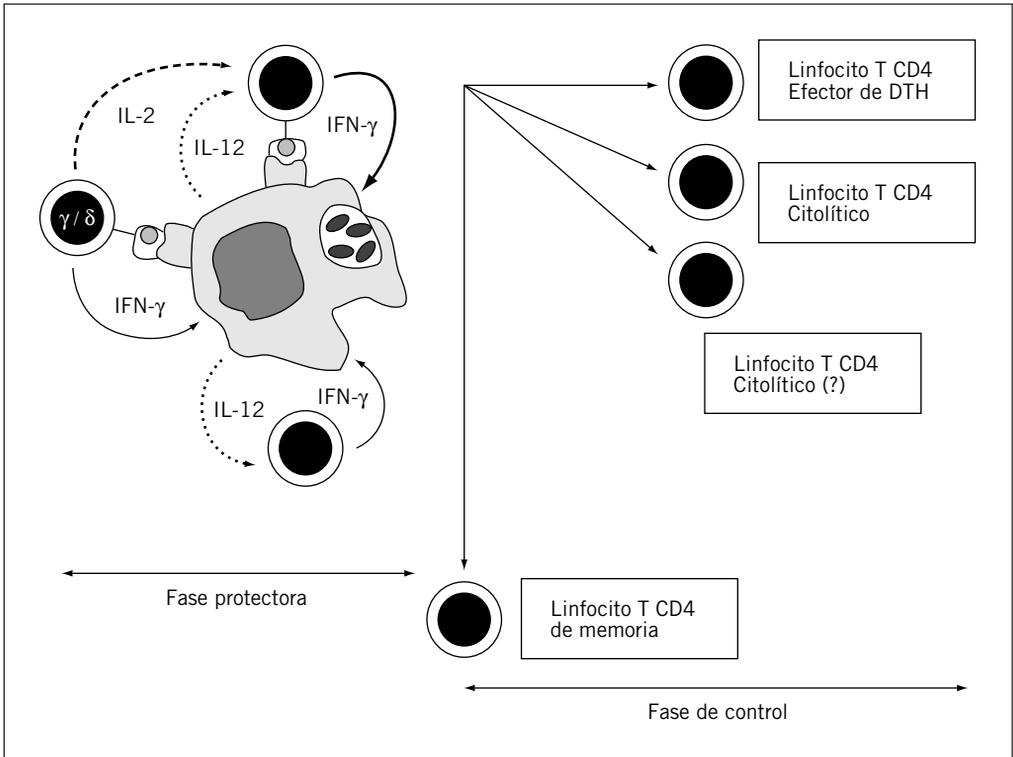


Fig. 5. Respuesta protectora en el modelo de tuberculosis murina según Orme.

CMH de clase I. Así mismo, se ha demostrado la presencia de linfocitos T CD4 de memoria capaces de iniciar rápidamente la activación de los macrófagos infectados en caso de reinfección.

En la respuesta inmunitaria ante *M. tuberculosis* también se ha podido demostrar que se produce una alternancia en el subtipo de linfocito T que responde ante la infección por *M. tuberculosis*, de manera que, posteriormente a la aparición de los linfocitos Th1, capaces de activar a los macrófagos infectados mediante el IFN- $\gamma$ , y que coincide con el período de control de la infección, aparece un segundo tipo de linfocito efector: el Th2<sup>25</sup> (fig. 6). Este subtipo se caracteriza por secretar IL-4 y estaría sensibilizado por antígenos de los bacilos "destruidos" que se han acumulado como consecuencia de la destrucción del 90 % de la concentración bacilífera (fig. 3) ocasionada por la activación de los macrófagos infectados. La emergencia del subtipo Th2 antagoniza con el Th1, bloqueando la destrucción de bacilos y ayudando a establecer una infección crónica<sup>24</sup>.

### Avances que ha supuesto el modelo experimental en la profilaxis y el tratamiento de las infecciones

El tratamiento de la tuberculosis humana ha de resolver dos problemas principales: *a)* la aparición de mutantes naturales a los antibióticos entre la población bacilífera extracelular de las lesiones cavitadas, que tiene una alta velocidad de crecimiento, y *b)* la recaída de la infección como consecuencia de la presencia de bacilos persistentes en las lesiones que requieren un tratamiento de larga duración.

Si bien en el modelo de tuberculosis murina no hay necrosis ni cavitación de las lesiones y, por tanto, carece de la gran población extracelular existente en las lesiones humanas, sí que presenta una población intracelular equivalente y una población bacilar persistente, factores muy importantes en el diseño de pautas útiles para destruir los bacilos persistentes. De hecho, el modelo de tuberculosis murina ha tenido una gran importancia en el diseño de la pauta de trata-

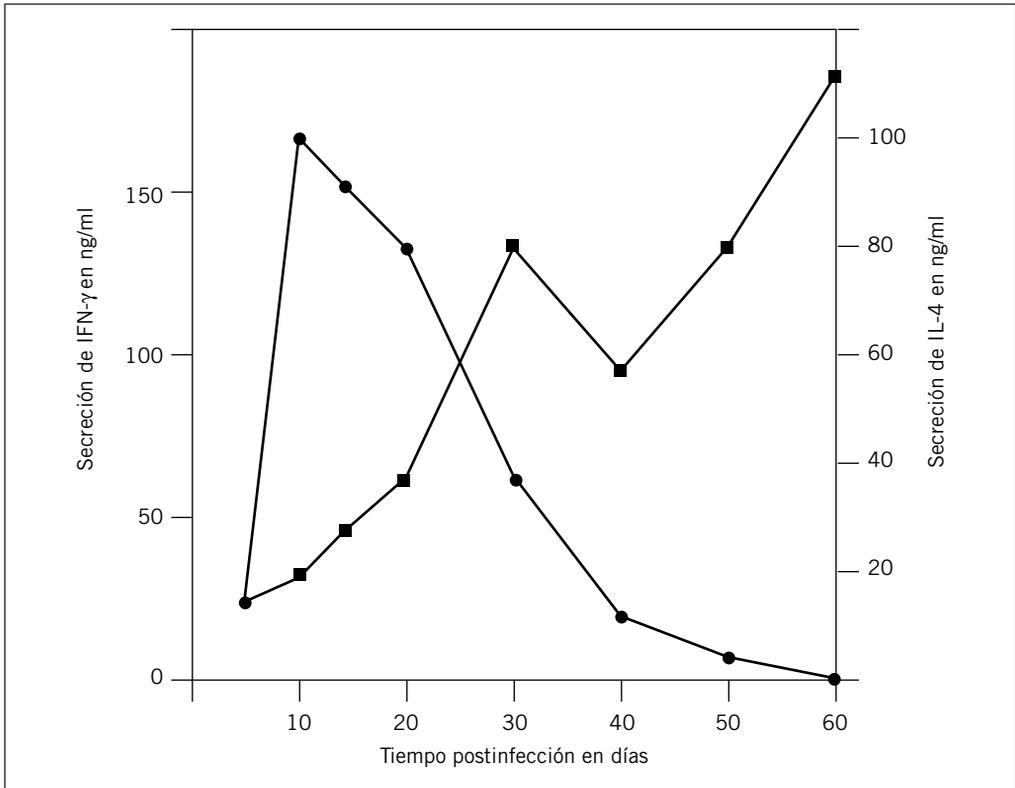


Fig. 6. Evolución de los linfocitos Th1 y Th2 en el modelo de tuberculosis murina. Producción de IL-4 e IFN-γ en linfocitos T CD4 del bazo de ratones infectados por *M. tuberculosis*, cepa Erdman y estimulados posteriormente in vitro con antígenos secretados por los bacilos (Orme, 1993).

miento de corta duración actual (de 6 meses), realizándose la mayoría de experimentos en este período, induciendo principalmente la infección mediante inoculación intravenosa e iniciando el tratamiento a los 10 días posteriores al inóculo<sup>26</sup>. Entre estos experimentos dos deben considerarse claves en el desarrollo de esta terapia:

1. McCune et al<sup>27</sup> observaron que la curación de la tuberculosis murina experimental era posible después de 3 meses de tratamiento con isoniácida y pirazinamida. Estos resultados no habían sido conseguidos nunca previamente por ninguna de las combinaciones de fármacos existentes. Inicialmente estos resultados no fueron considerados importantes porque después de 3 meses sin tratamiento un tercio de los animales presentó una recaída, lo que demostraba la persistencia de bacilos en estado persistente en los animales aparentemente “negativos”.

2. El segundo experimento clave fue realizado por Grumbach y Rist<sup>28</sup> en 1967, cuando se empezó a disponer de la rifampicina. En este experimento, todos los animales tratados con la combinación isoniácida (25 mg/kg) más rifampicina (25 mg/kg) tuvieron cultivos negativos a los 4 meses de tratamiento. Esta combinación representaba una revolución, puesto que era posible conseguir la negativización de los cultivos en un 100 % de los animales, mientras que con la combinación estándar de isoniácida-estreptomicina sólo el 80 % de los animales conseguía la negativización de los cultivos en un período de 18 meses de tratamiento<sup>26</sup>.

A partir de entonces se realizaron numerosos experimentos en los que se consideraron diferentes combinaciones y dosis con rifampicina en las pautas de tratamiento; se concluyó que no se observaban recaídas en tratamientos con isonia-

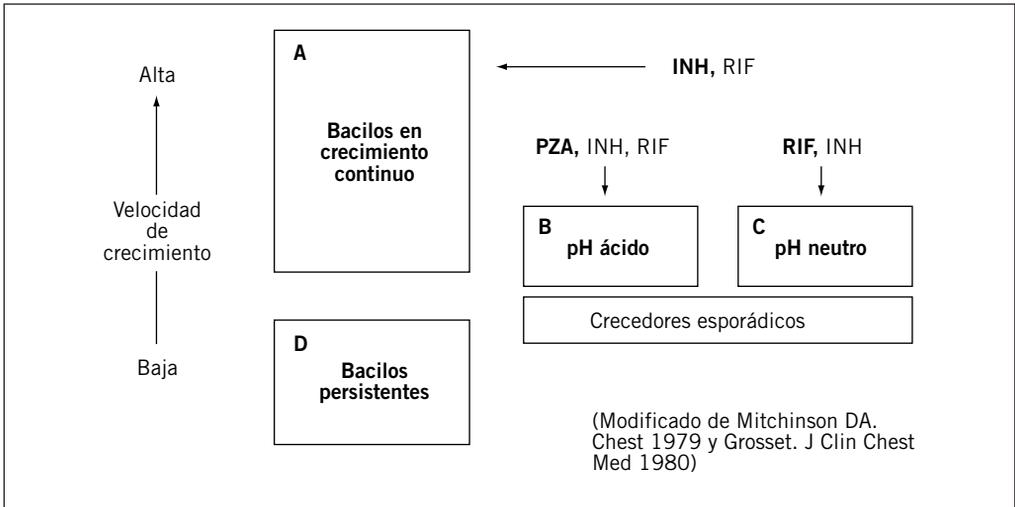


Fig. 7. Representación de las poblaciones bacilíferas presentes en las lesiones tuberculosas y los fármacos que son activos contra las mismas. En negrita el fármaco más activo en cada caso. INH: isoniazida; PZA: pirazinamida; RIF: rifampicina.

cida y rifampicina durante 9 meses, si bien no era necesario mantener la isoniazida durante los meses 6-9, ya que se observaba que la rifampicina era un fármaco muy eficaz en la destrucción de los bacilos persistentes, mientras que la isoniazida no lo era<sup>26</sup>.

Posteriormente se reconsideró el papel de la pirazinamida. Al principio se observó que aumentaba la eficacia de la combinación isoniazida-estreptomicina<sup>29</sup>, aunque la adición de la pirazinamida después del tratamiento con isoniazida y rifampicina durante 3 meses no aumentaba la eficacia de esta combinación, incluso no incrementaba la eficacia del tratamiento con rifampicina sola<sup>30</sup>. Se puso así de manifiesto la baja actividad de la isoniazida sobre la población bacilífera persistente y que la actividad de la pirazinamida frente a esta población no era lo suficientemente aparente durante la fase de continuación del tratamiento.

Así pues, a partir de los experimentos en el modelo murino y también *in vitro* se considera que un enfermo con tuberculosis tiene lesiones en las cuales hay cuatro tipos de poblaciones bacilíferas<sup>26,31</sup> (fig. 7):

A. Población extracelular. Es la más importante, se divide activamente en las lesiones cavitarias consiguiendo a menudo concentraciones de  $10^7$  a  $10^9$  y contiene un número significativo de bacterias resistentes a cualquier antibiótico por separado.

B. Población intracelular localizada en el interior de los fagosomas acidificados de los macrófagos y extracelular situada en las paredes de la cavidad necrótica, donde persiste la inflamación y se mantiene un pH ácido. Se localiza un número reducido de bacilos ( $10^2$ - $10^5$  UFC/g).

C. Población extracelular a pH neutro situada en el interior de la cavidad necrótica, en el *caseum*, y la población intracelular de los fagosomas no acidificados. La magnitud de la concentración bacilar es similar a la B.

En las poblaciones B y C el crecimiento es lento y esporádico, y depende de cambios en el medio ambiente (p. ej., en la presión de oxígeno) que permite cortos accesos de crecimiento.

D. Población de bacilos persistentes, con muy baja actividad metabólica, y difíciles de eliminar mediante fármacos.

Las poblaciones B, C y D son las que obligan a prolongar el tratamiento<sup>26</sup>.

En cuanto a la profilaxis de la tuberculosis en pacientes infectados, a partir de los años ochenta se empezaron a realizar estudios en modelos experimentales para encontrar alternativas a la pauta de isoniazida, debido al peligro de lesión hepático y a la aparición de cepas resistentes. El grupo de Grosset diseñó un modelo experimental basado en el hecho que los individuos infectados tienen una población de *M. tuberculosis* relativamente limitada y que no se multiplica ac-

tivamente. Para mimetizar estas condiciones vacunaban a los animales con *M. bovis* BCG y un mes más tarde infectaban a los animales intravenosamente con una concentración reducida de *M. tuberculosis* ( $10^3$  UFC), iniciando el tratamiento a los 14 días posteriores<sup>32</sup>. En estos estudios se comprobó que la profilaxis de 2 meses con rifampicina más pirazinamida o de 3 meses con rifampicina sola era tan eficaz como la profilaxis con isoniacida durante 6 meses, basándose en la capacidad para esterilizar el bazo de los animales infectados. Es de destacar que no será hasta 10 años más tarde que ensayos clínicos en humanos comprobarán la eficacia de estas pautas<sup>33</sup>.

Hoy día, el modelo de tuberculosis murina se está utilizando ampliamente en la búsqueda de nuevos fármacos activos contra *M. tuberculosis*. Entre éstos se ha demostrado la eficacia de las nuevas rifamicinas (rifabutina o rifapentina) y las nuevas quinolonas (ofloxacino, esparfloxacino o levofloxacino). Por otro lado, se están empezando a ensayar combinaciones de antibióticos liposomados en ratones tuberculosos, que parecen tener una eficacia similar a la de los tratamientos tradicionales, con dosis más bajas y pautas intermitentes.

Conviene, pues, impulsar los modelos de tuberculosis experimental a fin de aliviar, lo antes posible, la pesada carga que representa la tuberculosis en el mundo.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Young D. Genetics and tuberculosis. CHICHESTER: John Wiley & Sons, 1998.
2. SEPAR. Informe anual de l'area TIR, 1997.
3. De March P. La transmisión de la resistencia al *Mycobacterium tuberculosis* en los infectados por el VIH. La llamada tercera epidemia del VIH. Med Clin (BarC) 1994; 102: 98-100.
4. Grange JM. Immunophysiology and immunopathology of tuberculosis. En: Davies PDO, editor. Clinical tuberculosis. Londres: Chapman & Hall, 1998; 9: 129-152.
5. Yamamura Y, Ogawa Y, Maeda H, Yamamura Y. Prevention of tuberculous cavity formation by desensitization with tuberculin-active peptide. Am Rev Respir Dis 1974; 109: 594-601.
6. Canetti G. The tubercle bacillus in the pulmonary lesion of man. Nueva York: Springer Publishing Co., 1955.
7. Moulding T. Pathophysiology and immunology: clinical aspects. En: Schlossberg D, editor. Tuberculosis (3ª ed.). Nueva York: Springer-Verlag, 1994; 3: 41-50.
8. Converse PJ, Dannenberg AM Jr, Estep JE, Sugisaki K, Abe Y, Schofield BH, Pitt MLM. Cavitary tuberculosis produced in rabbits by aerosolized virulent tubercle bacilli. Infect Immun 1996; 64: 4.776-4.787.
9. Dannenberg AM Jr, Rook GAW. Pathogenesis on pulmonary tuberculosis: an interplay of tissue-damaging and macrophage-activating immune responses-dual mechanisms that control bacillary multiplication. En: Bloom BR, editor. Tuberculosis: pathogenesis, protection and control. Washington DC: American Society for Microbiology, 1994; 27: 459-483.
10. Smith DW, Harding GE. Animal model of human disease: experimental airborne tuberculosis in the guinea pig. Am J Pathol 1977; 89: 273-277.
11. Lefford MJ. Diseases in mice and rats. En: Kubica GP, Wayne LG, editores. The mycobacteria: a source book. Nueva York: Marcel Dekker Inc., 1984; 38: 947-977.
12. Lurie MB. The correlation between the histological changes and the fate of living tubercle bacilli in the organs of tuberculous rabbits. J Exp Med 1932; 55: 31-58.
13. Lurie MB, Zappasodi P, Tickner C. On the nature of genetic resistance to tuberculosis in the light of the host-parasite relationships in natively resistant and susceptible rabbits. Am Rev Tuberc 1955; 72: 297-321.
14. Middlebrook G. An apparatus for airborne infection in mice. Proc Soc Exptl Biol Med 1952; 80: 105-110.
15. Pallen MJ. The inoculation of tissue specimens into guinea-pigs in suspected cases of mycobacterial infection-does it aid diagnosis and treatment? Tubercle 1987; 68: 51-57.
16. Mitchinson DA. The virulence of tubercle bacilli from patients with pulmonary tuberculosis in India and other countries. Bull Int Union Against Tuberculosis 1964; 35: 287-306.
17. Smith DW, Harding GE, Chan J, Edwards M, Hank J, Muller D et al. Potency of 10 BCG vaccines as evaluated by their influence on the bacillemic phase of experimental airborne tuberculosis in guinea-pigs. J Biol Stand 1979; 7: 179-197.
18. Mackaness GB. The immunology of antituberculous immunity. Am Rev Respir Dis 1968; 97: 337-344.
19. Orme IM, McMurray DN. The immune response to tuberculosis in animal models. En: Rom WN, Garay SM, editores. Tuberculosis. Boston: Little, Brown and Company, 1996; 22: 269-280.
20. North RJ. *Mycobacterium tuberculosis* is strikingly more virulent for mice when given via the respiratory than via the intravenous route. J Infect Dis 1995; 172: 1.550-1.553.
21. Cardona PJ, Cooper A, Luquín M, Ariza A, Filipo F, Orme IM et al. The intravenous model of murine tuberculosis is less pathogenic than the aerogenic model owing to a more rapid induction of systemic immunity. Scand J Immunol 1999; 49: 362-366.
22. Ho RS, Fok JS, Harding GE, Smith DW. Host-parasite relationships in experimental airborne tuberculosis. VII. Fate of *Mycobacterium tuberculosis* in primary lung lesions and in primary lesion-free lung

- tissue infected as a result of bacillemia. *J Infect Dis* 1978; 138: 237-241.
23. Smith DW, Wiegshauss EH. What animal models can teach us about the pathogenesis of tuberculosis in humans. *Rev Infect Dis* 1989; 11 (Supl 2): 385-393.
  24. Orme IM, Roberts AD, Griffin JP, Abrams JS. Cytokine secretion by CD4 T lymphocytes acquired in response to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Immunol* 1993b; 151: 518-525.
  25. Orme IM. Immunity to mycobacteria. Austin, Texas: RG. Landes Company, 1995.
  26. Grosset J. Bacteriologic basis for short-course chemotherapy for tuberculosis. *Clin Chest Med* 1980; 1: 231-242.
  27. McCune RM, Tompsett R, McDermott W. The fate of *Mycobacterium tuberculosis* in mouse tissues as determined by the microbial enumeration technique. II. The conversion of tuberculous infection of the latent state by the administration of pyrazinamide and a companion drug. *J Exp Med* 1956; 104: 763-802.
  28. Grumbach F, Rist N. Activité antituberculeuse expérimentale de la rifampicine, dérivé de la rifamycine SV. *Rev Tuberc Pneum* 1967; 31: 749-762.
  29. Grosset J. The sterilizing value of rifampin and pyrazinamide in experimental short-course chemotherapy. *Bull Int Union Against Tuberculosis* 1978; 53: 5-12.
  30. Grosset J, Truffot Ch, Boval C. Sterilizing activity of isoniazid and pyrazinamide in combination with rifampicin in experimental tuberculosis of the mouse. *Thorax* 1979; 34: 708.
  31. Mitchinson DA. Basic mechanisms of chemotherapy. *Chest* 1979; 76; 6 (Supl): 771-781.
  32. Lecœur HF, Truffot-Pernot Ch, Grosset JH. Experimental short-course preventive therapy of tuberculosis with rifampin and pyrazinamide. *Am Rev Respir Dis* 1989; 140: 1.189-1.193.
  33. Halsey NA, Coberly JS, Desormeaux J, Losikoff P, Atkinson J, Moulton LH et al. Randomised trial of isoniazid versus rifampicin and pyrazinamide for prevention of tuberculosis in HIV-1 infection. *Lancet* 1998; 351: 786-792.

## DISCUSIÓN

J.M. GATELL: Si no es un secreto de investigación, ¿cómo conseguís inducir la necrosis en vuestro modelo de tuberculosis? Por otro lado, para estudiar la respuesta serológica, ¿qué ventajas ofrece el modelo animal sobre el propio hombre?

P.J. CARDONA: En primer lugar, esta necrosis intragranulomatosa es el fruto de una larga y exhaustiva investigación bibliográfica y de una hipótesis generada por un grupo inglés en el que aseguraba que la presencia de necrosis intragranulomatosa se debía a un fenómeno de Shartzman o necrosis hemorrágica. El hecho de inocular localmente lipopolisacárido o TNF, en un tejido con altas concentraciones de TNF, como el granulomatoso generado por infección por *M. tuberculosis*, provocaría una necrosis hemorrágica. Inducimos la necrosis integral al inocular intranasalmente lipopolisacárido de *Escherichia coli*. Respondiendo a tu segunda pre-

gunta, en el animal existe la ventaja de poder reproducir diferentes situaciones como inducir infección, reinfección, reactivación y podemos tratar las lesiones, de manera que nos permite analizar qué tipo de respuesta se genera en cada caso y, por tanto, diferenciar entre infección y enfermedad. Incluso nos permite estudiar lo que ocurre después del tratamiento, la existencia de falsos positivos, falsos negativos, etc.

J.M. MIRÓ: Este modelo experimental de tuberculosis, ¿es un modelo de tuberculosis pulmonar o es un modelo diseminado con meningitis tuberculosa?

P.J. CARDONA: Es simplemente una tuberculosis pulmonar, aunque también se produce una diseminación renal, hepática, esplénica, etc., como sucede en la tuberculosis pulmonar humana. Pero no hay afectación de meninges.