

# GENETICA DE LA TUBERCULOSIS

El control genético de la infección micobacteriana entraña una gran complejidad. Resistencia y proclividad a la enfermedad hunden su raíz en un efecto multigénico

Mauricio Rojas López

## CONCEPTOS BASICOS

- Se han hallado, en el cromosoma 1 de ratones, dos genes dominantes asociados a la sensibilidad a *Mycobacterium bovis* y a *M. tuberculosis*.
- Ninguno de esos genes explica, por sí solo, la proclividad a la infección ni el desarrollo de la enfermedad.
- La aparición de granulomas con necrosis en animales sensibles a *M. tuberculosis* sugiere que el tipo de muerte celular observado en fases tempranas de la infección podría hallarse en la base de la resistencia natural.



**A**lrededor del noventa por ciento de las personas infectadas con *Mycobacterium tuberculosis*, la bacteria responsable de la tuberculosis, muestran una resistencia natural al desarrollo de la enfermedad. Pese a la cifra, seguimos desconociendo los mecanismos que subyacen bajo tal resistencia.

La tuberculosis es la enfermedad infecciosa más importante de las causadas por un solo agente etiológico. Otras afecciones con igual potencia devastadora se deben a la acción de múltiples agentes infecciosos (enfermedades respiratorias agudas y diarrea). Diversas especies más del género *Mycobacterium* resultan sumamente dañinas: *M. leprae* causa la lepra; las bacterias del complejo *M. avium* se hallan entre las responsables de las enfermedades oportunistas observadas en individuos infectados con el virus de inmunodeficiencia humana (VIH).

En los últimos lustros, la lucha contra esos tres agentes infecciosos (*M. tuberculosis*, *M. leprae* y *M. avium*) se ha complicado con la emergencia de cepas multirresistentes a los tratamientos farmacológicos [véase “Nuevas tácticas contra la tuberculosis”, por Clifton E. Barry III y Maija S. Cheung; INVESTIGACIÓN Y CIENCIA, mayo de 2009]. Ante este panorama, se hace imperiosa la necesidad de nuevos estudios que arrojen luz sobre las bases moleculares de la resistencia y la sensibilidad a infecciones micobacterianas.

Desde hace tiempo viene sugiriéndose la existencia de factores genéticos que podrían dar cuenta de la resistencia o proclividad de un individuo a contraer la tuberculosis y la lepra. El hallazgo de familias y grupos étnicos que muestran una frecuencia elevada

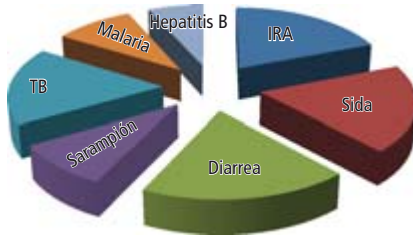
de tales enfermedades y los estudios de concordancia en gemelos respaldan la hipótesis de una base hereditaria de la resistencia. Asimismo, el desarrollo de modelos animales (conejos y ratones) ha facilitado la identificación de genes candidatos.

Cuando se infectan con el bacilo BCG (una forma atenuada de *Mycobacterium bovis*, preparada por Albert Calmette y Camille Guérin, del Instituto Pasteur de París) ratones de cepas distintas es posible distinguir entre individuos resistentes e individuos sensibles a la enfermedad. (*Mycobacterium bovis* causa la tuberculosis bovina.)

La infección es bifásica. En la primera fase —que abarca las tres primeras semanas subsiguientes a la infección— se produce un rápido crecimiento bacteriano en el hígado y el bazo. Luego, tras la activación de las células T (linfocitos responsables de la inmunidad celular), se observa en los animales resistentes una reducción del número de bacterias; en los sensibles, las bacterias se multiplican. La segunda fase es multigénica, vale decir, depende de la acción de varios genes que participan en la presentación y reconocimiento de antígenos: los del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), los relacionados con el receptor T (TCR), todos los que afectan a la activación de las células T en la fase adaptativa de la infección y genes que afectan a la migración celular.



## LOS MAYORES ASESINOS



Desde finales de los noventa, la Organización Mundial de la Salud ha presentado estas enfermedades como las más devastadoras del planeta. Algunas de ellas (infecciones respiratorias agudas, o IRA, y diarrea) pueden ser causadas por distintos agentes. La tuberculosis se debe a un solo agente y, sin embargo, da cuenta de un número equiparable de muertes al año.

## El gen de la resistencia

Al objeto de identificar genes que confieran resistencia a la enfermedad se llevaron a cabo ensayos en ratones. Se infectaron con *M. bovis* BCG doce cepas endogámicas de ratón. Tres semanas después, se midió el crecimiento de las bacterias en el bazo y los pulmones. Y se dividieron los ratones entre sensibles y resistentes.

Se realizaron cruces entre miembros de cepas resistentes y sensibles, así como cruces retrógrados entre los hijos de la primera generación y los animales sensibles. Luego, se seleccionaron los animales que habían heredado el fenotipo resistente; volvieron a cruzarse con sensibles y a seleccionarse los hijos resistentes. Tras un mínimo de diez generaciones de cruces, se obtuvieron animales resistentes pero con el acervo genético de los sensibles.

Los parentales susceptibles diferían de sus hijos en el locus que confería la resistencia. El locus en cuestión comprende unos 30 centimorgan del cromosoma 1 (el centimorgan, o cM, es una unidad de recombinación, proporcional a la longitud en un mapa genético). La identificación del locus y su estudio en las distintas cepas de ratón reveló la existencia de dos variantes alélicas. Este gen de resistencia presenta las características de un gen autosómico dominante, se halla codificado en el cromosoma 1 del ratón y controla las fases tempranas de la infección. Se le llamó *Bcg*; a las variantes alélicas, *Bcg<sup>s</sup>* y *Bcg<sup>r</sup>*. Posteriormente, se observó que *Bcg* confería, además, resistencia a *Salmonella typhimurim* y a *Leishmania donovani*.

La investigación se centró ulteriormente en la identificación de los mecanismos celulares responsables de la resistencia a la tuberculosis. Experimentos realizados con ratones privados de timo, demostraron que la ausencia de las células T no afectaba a la expresión y función de *Bcg*. La célula responsable de la expresión fenotípica codificada por un gen de dicho locus era probablemente el macrófago (célula inmunitaria encargada de la fagocitosis y de la inmunidad específica). Estudios *in vitro* mostraron que los macrófagos de animales *Bcg<sup>s</sup>* eran permisivos; los macrófagos *Bcg<sup>r</sup>*, en cambio, controlaban el crecimiento de *M. bovis*, *M. smegmatis* y *M. intracellulare*.

Conocidos el locus y la célula responsables, las preguntas se encaminaron a situar el gen *Bcg* y desentrañar los mecanismos que éste regulaba en los macrófagos *Bcg<sup>r</sup>*. Se empezó por establecer un mapa físico del locus para así ordenar los genes codificados en regiones vecinas. Se consultaron bibliotecas y bases de datos que contenían copias del ARN mensajero (ARNm) de macrófagos. Se construyeron nuevas bibliotecas de ADN genómico para

identificar productos de la transcripción y se acometieron múltiples aproximaciones moleculares e informáticas para identificar regiones genómicas involucradas en la resistencia.

Inicialmente, sólo un exón de todo el locus mostró homología con alguna secuencia descrita con anterioridad: la del gen *VIL* humano (que codifica parte de la vililina, una proteína del citoesqueleto). Así se allanó el camino para identificar el gen candidato cuyo ARNm tuviese una expresión restringida en macrófagos alojados en órganos del sistema retículo-endotelial. Pese a cumplir con los requisitos, el gen codificado en el locus *Bcg* no se consideró más que un candidato; se le denominó *Nramp* (de "Natural resistance-associated macrophage protein"). Posteriormente, cuando apareció un segundo gen estructuralmente relacionado, se le dio el nombre de *Nramp1*; en la actualidad se designa como *Slc11a1*. Para comprobar que se trata del gen buscado, debería aislarse, introducirse en embriones de animales proclives y obtener animales transgénicos resistentes.

## Nramp1, proteína de transporte

Aislados los clones de ADN complementario, se pudo predecir la secuencia de nucleótidos correspondiente al transcrito que llevaría a la proteína. Se encontró que el gen *Nramp1* codifica para una proteína cuya secuencia guarda semejanza con proteínas asociadas al transporte celular en varios microorganismos. En 1993 se llevaron a cabo estudios teóricos para desentrañar la estructura de la misma.

Se determinó que se trataba de una proteína propia de las membranas asociadas a vesículas intracelulares, conformada por entre diez y doce dominios transmembranales, con dos sitios de glicosilación y una secuencia evolutivamente conservada (dominio de unión a proteínas transportadoras) que demostraba su función.

El análisis de las bases de datos de proteínas mostró que la proteína en cuestión podría guardar homología con ciertas proteínas halladas en eucariotas, aunque sin el motivo de unión al ATP; entre ellas destacaba la proteína CrnA, transportadora de nitratos en *Aspergillus nidulans*, que consta de diez dominios transmembranales y el motivo de transporte conservado.

Según los estudios teóricos, la proteína *Nramp1* contaba con tres sitios de fosforilación por parte de la proteína quinasa C (PKC), un sitio rico en prolinas y serinas que constituyen un posible sitio de homología con las proteínas que se unen a dominios SH3. La homología con la proteína CrnA llevó a postular que *Nramp1* podría operar a modo de lanzadera de nitratos a través de la membrana del fagolisosoma, donde el ambiente ácido



Expectoración con *M. tuberculosis* (rojo)



permitiría la conversión de éste a óxido nítrico, uno de los principales agentes antibacterianos producidos por los macrófagos de ratones pero no por los macrófagos humanos.

Esa función no explicaba la pleiotropía del gen *Nramp1*, esto es, su capacidad de producir efectos fenotípicos diversos. Sin embargo, dado que el óxido nítrico puede actuar como segundo mensajero mediante la regulación de varias vías, el nexo entre el óxido nítrico y los efectos pleiotrópicos de la proteína *Nramp1* sugería que el gen *Bcg* era un buen candidato.

Otros estudios estructurales apoyaron la hipótesis de que la proteína *Nramp1* era una lanzadera de nitratos. Se halló en *Drosophila* el gen homólogo *mvl*, cuyo producto, la proteína Malvolio, era expresada por macrófagos y neuronas que mostraban sensibilidad al óxido nítrico, nitritos y nitratos. Los nitritos y los nitratos son productos del óxido nítrico que no deben acumularse en los sitios donde el óxido nítrico opera como segundo mensajero; son eliminados por el transportador que codifica *mvl*.

El motivo de transporte constituyó una fuente de información sobre su función. Si se comparan los 20 residuos de *Nramp1* comprometidos en la función de transporte con los productos homólogos de la levadura *SMF1* y *SMF2*, se encuentra una relación estrecha; por tanto, igual que estas proteínas expresadas en la mitocondria, la *Nramp1* podría participar en el transporte de proteínas. Sobre ese hallazgo se apuntalaron una serie de posibilidades donde interviniera *Nramp1*: entre ellas, la regulación de la apoptosis inducida por el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (FNT $\alpha$ ) y la modulación de un producto que participaría en el transporte de sustratos a través de la mitocondria.

Con anterioridad, se había asociado el *Nramp1* a la modulación de la explosión respiratoria (o explosión oxidativa). Moléculas como el LPS, el FNT $\alpha$  y la IL-1 $\beta$ , que median la activación del macrófago regulada por *Nramp1*, son también inductoras de la actividad del factor de transcripción nuclear FN- $\kappa$ B. Más interesante aún, los genes que codifican para el FNT $\alpha$ , la IL-1 $\beta$ , la óxido nítrico sintasa 2 (NOS2) y KC, así como la *Nramp1*, presentan, en sus regiones promotoras, sitios de reconocimiento  $\kappa$ B. De esta forma, podrían integrarse en sólo un conmutador las especies de oxígeno producidas durante la infección o la estimulación con productos bacterianos, los segundos mensajeros y las vías de señalización para la activación del macrófago. Una prueba adicional que reforzaba esta idea: se observó que la *Nramp1* afectaba a la activación del FN- $\kappa$ B.

El hallazgo de *Nramp2*, un segundo miembro de la familia, arrojó luz sobre el mecanismo

de acción y la función de la *Nramp1*. Se han asociado variantes de *Nramp2* con la anemia microcítica, que altera el transporte de hierro independiente de transferrina. Al descubrir que la *Nramp1* colocaliza con Lamp1 y catepsina D, se demostró su asociación con los endosomas tardíos. La expresión de la *Nramp1* es inducida por el interferón gamma y productos bacterianos como el LPS. La expresión en los macrófagos activados fue en los animales silvestres resistentes entre 3 y 4 veces superior que en los deficientes.

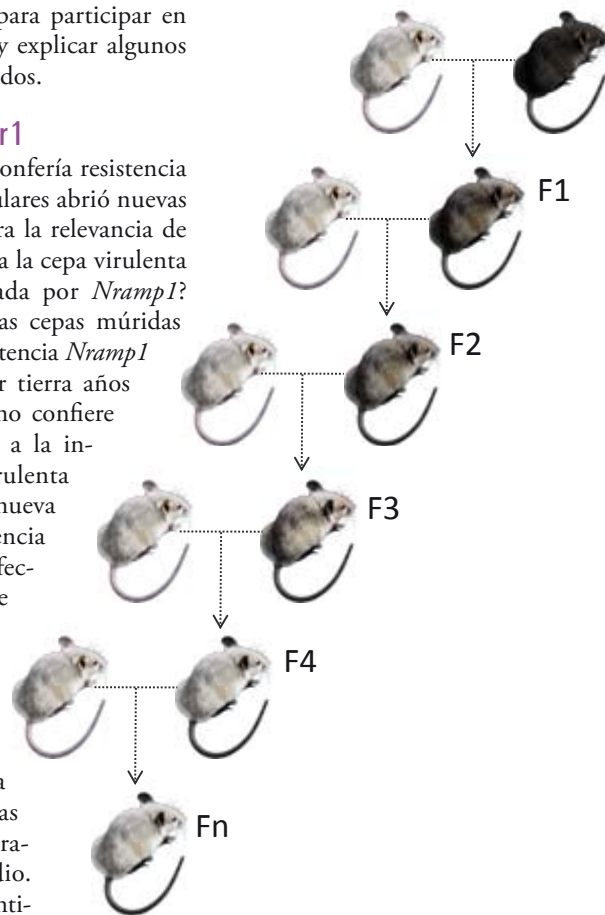
En los macrófagos infectados con *Leishmania*, se observó la *Nramp1* en las vesículas que contenían los parásitos. La función de *Nramp1* se relaciona, pues, con el transporte de cationes divalentes, como el de hierro (Fe<sup>2+</sup>), manganeso (Mn<sup>2+</sup>) y zinc (Zn<sup>2+</sup>). Cuando se logra la expresión ectópica de la *Nramp1* y se miden los metales mediante quelantes fluorescentes, se observa que la *Nramp1* actúa como un transportador simultáneo de protones y cationes divalentes hacia el exterior de los lisosomas. La *Nramp1* contribuye, pues, a la homeostasis del pH intracelular, mientras elimina cationes divalentes de las vesículas donde se encuentran confinados los parásitos intracelulares que requieren de esos iones para su crecimiento. La remoción de hierro férrico del lisosoma podría contribuir a la generación de radicales de oxígeno con capacidad para participar en la eliminación del parásito y explicar algunos de los efectos antes observados.

### Del locus *sst1* al gen *ipr1*

El hallazgo de un gen que confería resistencia a varias infecciones intracelulares abrió nuevas vías de exploración: ¿cuál era la relevancia de ese gen en humanos? ¿Estaba la cepa virulenta de *M. tuberculosis* controlada por *Nramp1*? Mediante la infección de las cepas múridas que portaban el alelo de resistencia *Nramp1* se demostró —echando por tierra años de trabajo— que este gen no confiere ninguna resistencia *in vivo* a la infección con la bacteria virulenta (cepa Erdman). Ello arrojó nueva luz al estudio de la resistencia y la proclividad, pues la infección de distintas cepas de ratón con *M. tuberculosis* mostró otro espectro de “control”.

La cepa C3HeB/FeJ resultó ser la más propensa a la infección; C57BL7/6J la más resistente. Otras cepas (BALB/c y 129/SvJ) mostraron un fenotipo intermedio. Tal polaridad llevó a la identi-

**2. PARA OBTENER ANIMALES HIBRIDOS, se cruzan ratones de dos acervos génicos: uno resistente a la infección por *M. tuberculosis* (color 1) y otro proclive a contraer la enfermedad (color 2). Se obtienen así ratones F1, que se cruzan con animales sensibles (cruce retrógrado). El procedimiento se repite durante un mínimo de diez generaciones. Los descendientes de la última generación difieren de los animales proclives en un locus.**



## El autor

Mauricio Rojas López es profesor de la facultad de medicina de la Universidad de Antioquia, donde obtuvo su doctorado en inmunología. Desde el grupo de inmunología celular e inmunogenética, centra su trabajo en los mecanismos de muerte de los macrófagos y su relación con la resistencia a infecciones micobacterianas.

**3. LA PROTEINA NRAMP1 se expresa en el fagolisosoma (fusión de un lisosoma y un fagosoma) tardío. Participa en la remoción de cationes divalentes del fagolisosoma que resultan esenciales para el crecimiento de *M. tuberculosis* (Fe<sup>+2</sup>, por ejemplo).**

ficación de un nuevo locus: el *sst1* (de “super susceptibility to tuberculosis 1”). Se cruzaron individuos C3HeB/FeJ con C57BL/6J para generar cepas congénicas (que difieren en un solo locus) y se tamizaron 127 marcadores polimórficos. El análisis demostró una asociación intensa entre la proclividad y un marcador propio del cromosoma 1.

En términos de supervivencia, cuando se compararon los animales congénicos para el *sst1* (C3HeB/FeJ *sst<sup>R</sup>* con los C3HeB/FeJ *sst<sup>S</sup>*) se observaron diferencias. Cuando se compararon los congénicos C3HeB/FeJ *sst<sup>R</sup>* con los silvestres C57BL/6J las diferencias fueron mayores todavía, lo que evidenció la participación de otros genes distintos del locus *sst1* y, más aún, del cromosoma 1, que son todavía objeto de investigación.

El gen codificado en ese locus goza de ciertas características que le confieren interés en el contexto de la enfermedad micobacteriana. La primera es un fenotipo localizado. Cuando se compararon el crecimiento de la micobacteria en el hígado y el bazo, no se observaron diferencias en el número de bacterias; los recuentos fueron inferiores a los del pulmón. En los sensibles (C3HeB/FeJ *sst<sup>S</sup>*), en cambio, los recuentos fueron elevados.

Otra característica se asocia con el tipo de lesiones que se manifiestan: los animales resistentes no presentaron lesiones necróticas; los sensibles mostraron marcas típicas. También los macrófagos, que expresan el gen alojado en el locus *sst1*, activaron mecanismos de muerte celular distintos: los macrófagos de animales resistentes sufrieron apoptosis en respuesta a la infección micobacteriana; los macrófagos de animales sensibles sufrieron necrosis. Cabe re-

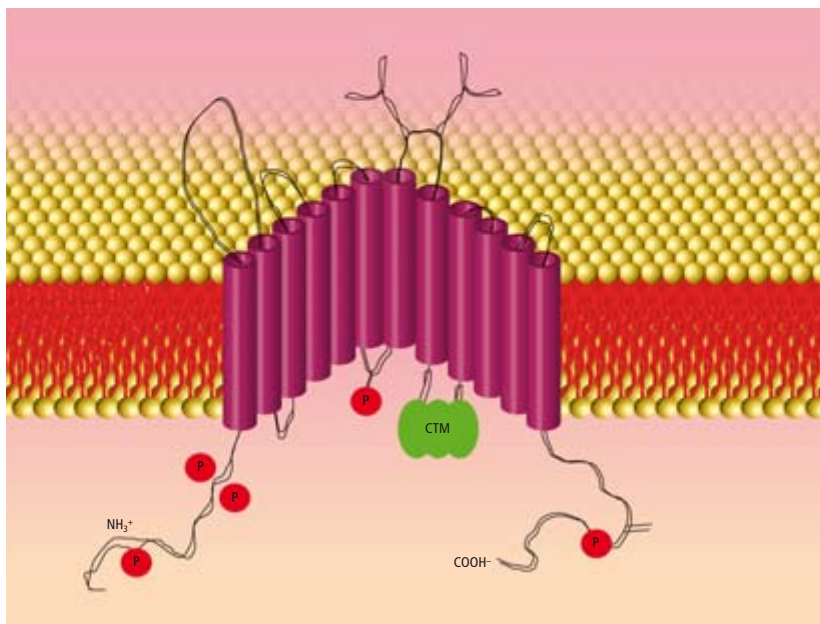
señar que los mecanismos de muerte celular se han descrito en diferentes sistemas *in vivo* e *in vitro* en presencia de la infección micobacteriana, lo mismo en humanos que en animales.

Se recurrió al clonaje posicional para identificar el gen codificado dentro del locus *sst1*. La región mínima de ese gen, que como el *Nramp1* se aloja en el cromosoma 1 del ratón, constaba de dos marcadores que enmarcaban una de las regiones más repetitivas del genoma murino. Según bases de datos genéticas, podría haber un total de 22 genes codificados en dicha región. La expresión de esos genes se estudió en los pulmones durante la infección *in vivo* en ratones e *in vitro* en macrófagos derivados de médula ósea. Mediante transcripción reversa se identificó que un producto del gen *Ifi75* se expresaba de manera diferencial. Este gen se halla dentro de una región altamente repetitiva del cromosoma 1.

En ratones, *Ifi75* codifica un receptor coactivador de hormonas liposolubles, que en humanos se denomina *nuclear dot protein* IFI75, o SP110. Se estima que puede haber unas 50 copias en las cepas endogámicas C57BL/6 de laboratorio y 2000 en animales silvestres; los productos eran, pues, numerosos. Para identificar las isoformas (versiones distintas de la misma proteína) relevantes en la infección con *M. tuberculosis* se buscaron los transcritos que estuviesen presentes en los animales resistentes, pero no en los proclives a la infección. Se identificó una secuencia del gen que se designó *Ipr1* (de “intracellular pathogen resistance 1”).

Los productos relacionados con *Ifi75-rs* en los pulmones de los animales infectados divergían entre los congénicos; se observó un producto de los animales *sst1* resistentes ausente en los *sst1* sensibles; se generaron entonces clones que contenían la secuencia de posibles productos, que permitiesen apresar un producto de la transcripción que se hallase sólo en las lesiones de los pulmones de animales resistentes. Aunque se encontraron algunos productos aberrantes presentes en las lesiones de pulmón de los individuos *sst1<sup>R</sup>*, la mayoría de los transcritos *Ifi75-rs* se localizó una sola isoforma de 12 exones, con un 92 por ciento de identidad con el *Ifi75* de *M. caroli*. Dicha isoforma correspondía a la del *Ipr1*.

La proteína que predijo el transcrito del gen *Ipr1* contiene en el extremo N-terminal un dominio de tipo Sp100, un motivo LXXLL de unión propio de receptores nucleares, una señal bipartita de localización en el núcleo y un dominio SAND de unión a cromatina en su región C-terminal. Cuando se estudió la cinética de expresión del *Ipr1*, mediante sondas específicas para los dominios Sp100 y SAND en animales congénicos, se detectó





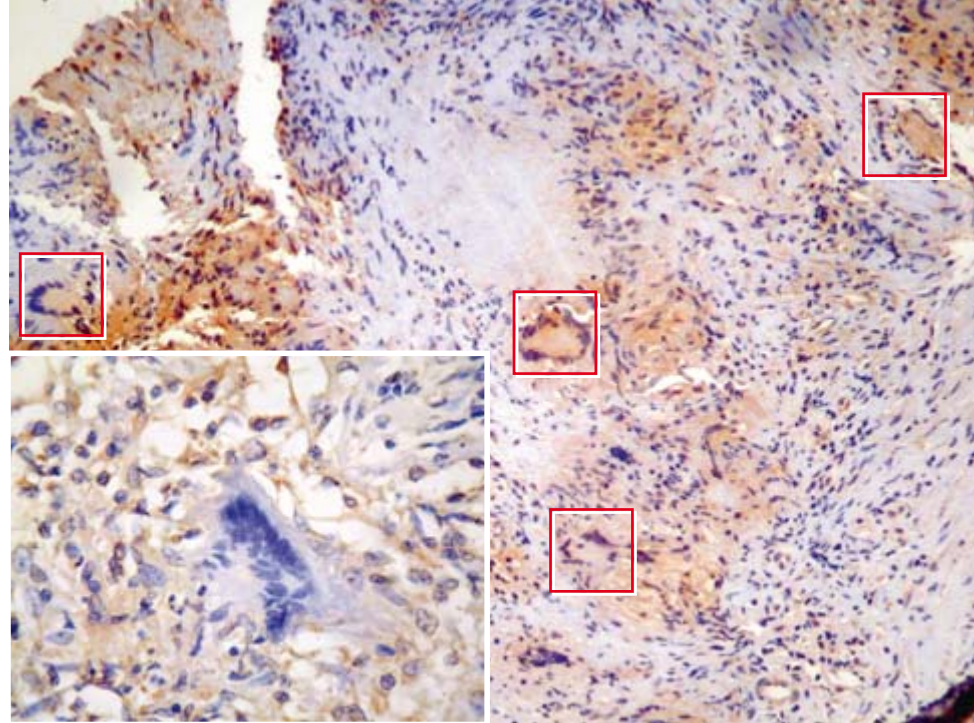
en los pulmones de los animales resistentes la expresión del *Ipr1*, dos semanas después de iniciarse la infección con *M. tuberculosis*; en los animales susceptibles, la expresión de Sp100 y SAND (en los *Ifi75-rs*) permaneció por debajo de los niveles de detección. El *Sp100-rs*, otro transcrito codificado en la región repetitiva, sí apareció en concentraciones elevadas en los ratones *sst1<sup>S</sup>*.

A partir del producto ADN complementario del *Ipr1* se generaron animales transgénicos con el acervo de los C3HeB/FeJ. No obstante, para que la expresión fuese específica de los macrófagos, éste se insertó mediante la regulación de un promotor del receptor basurero de tipo A (“scavenger A”) humano; la expresión de este receptor, bajo condiciones en las que prevalece una respuesta inflamatoria, es regulada de manera negativa. Muchos de los experimentos que se llevaron a cabo con dicho transgénico fueron de corta duración, antes de que su expresión prescribiera. Con todo, los transgénicos presentaron los mismos fenómenos observados en los animales C3HeB/FeJ *sst<sup>R</sup>*: control intracelular de *M. tuberculosis* y *Listeria monocytogenes*, y prevención de necrosis durante la infección con ambos microorganismos.

Cabe mencionar que el gen *SP110b*, el homólogo humano, ya se había descrito. Presenta un 41 por ciento de identidad con el murino y se encuentra en el cromosoma 2. Las proteínas correspondientes tienen motivos de interacción proteína-proteína; podría ser que operara a modo de cofactor transcripcional de un receptor hormonal. Según su localización y estructura probable, este receptor hormonal podría interactuar con la vitamina D, crítica en la modulación de la activación del macrófago (ciclo biológico, respuesta a patógenos y apoptosis) y cuyos polimorfismos también se han asociado con susceptibilidad a la infección con *M. tuberculosis*. La expresión del gen *Ipr1* y su homólogo humano está regulada por el interferón de tipo I; algunos de sus polimorfismos se han asociado con la exposición a hepatitis C.

### Suicidio del macrófago y control intracelular

En humanos, la infección con *M. tuberculosis* comienza por el tracto respiratorio. Las bacterias inhaladas alcanzan los espacios alveolares y son fagocitadas por células responsables de la inmunidad innata. En los pulmones, las micobacterias inhaladas son fagocitadas por los macrófagos alojados en el alvéolo, responsables de los mecanismos micobactericidas tempranos. Sin embargo, la bacteria puede evadir esos ataques y sobrevivir en las vías respiratorias.



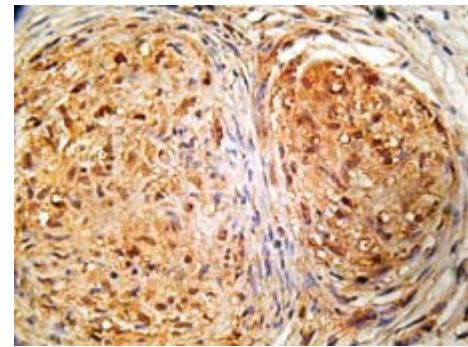
El foco primario de la infección corresponde al complejo Ghon. Lesión amorfa, abundante en bacilos, el foco se caracteriza por un infiltrado de células mononucleares y neutrófilos. Conforme se desarrolla la respuesta inmunitaria, aparece una lesión secundaria que limita la dispersión de la bacteria, insta la presencia de células gigantes multinucleadas y despierta el reclutamiento de nuevos macrófagos (células epitelioides) y linfocitos.

La lesión secundaria es circundada por células fibroblastoides. Se observan en ella niveles variables de necrosis central con un número menor de bacilos.

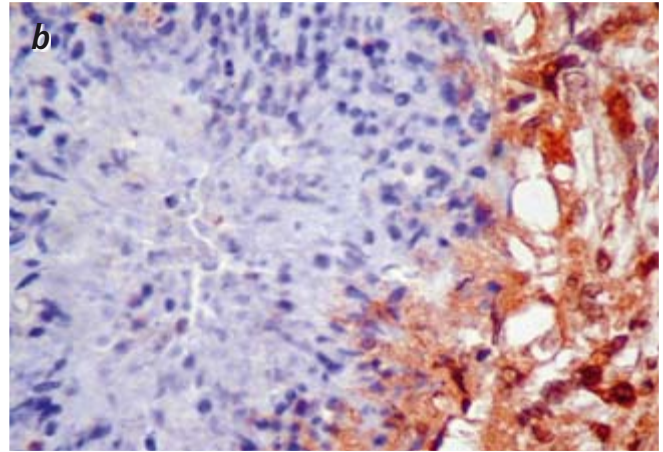
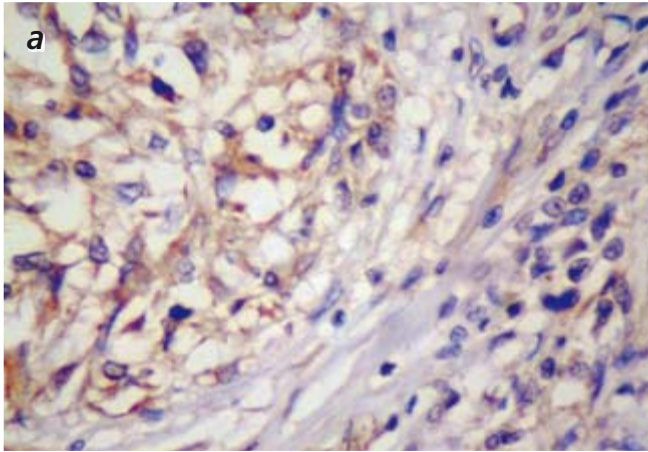
La interacción entre la bacteria y el macrófago causa la muerte de las células huéspedes infectadas. Se reconocen dos patrones de muerte celular: la apoptosis (autorregulada por la célula que muere) y la necrosis (fenómeno en apariencia “accidental”, en el que la célula parece perder el control). Otras células se encargan de reconocer y eliminar las células muertas o fragmentos de las mismas (cuerpos apoptóticos). Se cree que la fagocitosis de los cuerpos apoptóticos permitiría la eliminación de la célula muerta y de la bacteria contenida en ella, con alteraciones mínimas del tejido circundante, pues impide la liberación del contenido intracelular al medio extracelular y la consiguiente respuesta inflamatoria.

La necrosis se caracteriza por alteraciones de la forma y el volumen celulares. Un agotamiento de las reservas de ATP y un incremento de la permeabilidad de la membrana celular conducen a la destrucción y a la liberación del contenido intracelular, incluido el arsenal enzimático encargado de la defensa contra la infección y las bacterias, lo que favorece la diseminación de éstas hacia los tejidos vecinos.

La apoptosis de las células infectadas podría guardar relación con la capacidad de controlar



**4. LAS CELULAS GIGANTES multinucleadas resultan de la fusión de núcleos de macrófagos (arriba); producen la citoquina IL-10 (áreas pardas) pero no FNT $\alpha$  (inserto). Constituyen una marca típica de los granulomas tuberculosos. Se muestra también un granuloma (abajo), con un infiltrado celular en el centro, donde se alojan las células infectadas y otras que convergen en el sitio de la infección. Las células alargadas y pequeñas corresponden a neumocitos (macrófagos), rodeados de linfocitos. Las ahuecadas circundantes son células fibroblastoides; aparentemente interconectadas, delimitan el granuloma.**



**5. EN EL GRANULOMA EPITELIOIDE (a), las células productoras del FNT $\alpha$  (factor de necrosis tumoral) se alojan en el centro y la periferia. En el granuloma con caseum (b), región necrótica acelular del centro del granuloma, las células productoras de FNT $\alpha$ , los monocitos y algunas células T activadas se alojan en la periferia de las áreas necróticas.**

la infección. Se ha observado que los macrófagos que expresan genes relacionados con la resistencia a la tuberculosis y otras infecciones intracelulares están más encaminados al suicidio que los que provienen de acervos génicos sensibles, que sufren necrosis.

En cultivos de monocitos aislados de la sangre periférica de pacientes tuberculosos se ha comprobado que la infección y el tratamiento con el derivado proteico purificado (PPD) induce apoptosis en una fracción de los monocitos y necrosis en otra fracción. En cambio, cuando se infectan monocitos de individuos sanos reactivos al PPD, sufren sólo apoptosis.

La apoptosis podría constituir, pues, un mecanismo de control de las infecciones micobacterianas. En macrófagos derivados de monocitos humanos infectados con *M. bovis* (BCG) y tratados con ATP para inducir apoptosis se observó una caída de la viabilidad del BCG; en cambio, en macrófagos infectados y tratados con peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), que induce necrosis en fagocitos mononucleares, no disminuyó la viabilidad del BCG. De esa contrastación se desprende que la apoptosis de macrófagos infectados podría limitar el crecimiento micobacteriano; por su parte, la necrosis podría favorecer el crecimiento, o ser consecuencia del mismo, exacerbar la inflamación y favorecer la diseminación de las bacterias.

En macrófagos derivados de monocitos humanos infectados con *M. tuberculosis*, el tratamiento con ATP extracelular y en algunos

casos el tratamiento con anti-CD95 (ambos inductores de apoptosis) aumentan el control de la micobacteria.

Ese proceso afecta a la interacción entre células infectadas y células de la defensa del huésped. *In vivo*, los monocitos y las células dendríticas son reclutados en los sitios de infección; allí encuentran macrófagos alveolares infectados con *M. tuberculosis*, que sufren apoptosis, y cuerpos apoptóticos que contienen bacilos. Las micobacterias contenidas en los cuerpos apoptóticos pueden tener un procesamiento distinto del experimentado por bacilos libres.

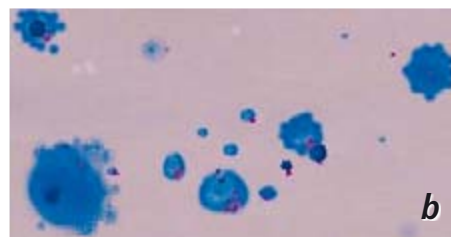
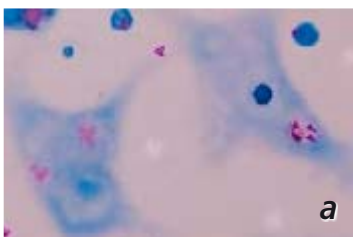
Además de la limitación de la replicación, la apoptosis del macrófago puede servir para limitar la destrucción de los tejidos durante la tuberculosis. Si la apoptosis predomina sobre la necrosis, se deja intacta la arquitectura del pulmón y se evita la dispersión de la infección.

La apoptosis, al permitir el mantenimiento de la integridad de la membrana celular y limitar la dispersión del contenido citoplásmico, frenaría la propagación de los patógenos intracelulares. Además, la apoptosis promueve la capacidad de los macrófagos para presentar los péptidos de las células apoptóticas y, con ello, facilitar la activación de células T específicas de antígeno y potenciar la respuesta inmunitaria específica.

Se ha acuñado el término piroptosis para designar cierto tipo de muerte intermedio. Aquí, las células infectadas con *M. tuberculosis* promueven, a pesar de la apoptosis, mecanismos proinflamatorios debido a la actividad de la caspasa 1, pero previenen la ruptura de las membranas y la diseminación de las micobacterias.

En ratones, la inducción de apoptosis en fagocitos mononucleares con *M. tuberculosis* se asocia con factores de la inmunidad congénita. Se ha observado que depende del ambiente de citoquinas producidas por los macrófagos durante la infección. El uso de cepas congénicas

**6. MUERTE CELULAR.** Se infectan con *M. tuberculosis* macrófagos de ratón (*fucsia*). Al cabo de 16 horas (a), se observan células aún con la morfología intacta. Sin embargo, 48 horas después de la infección aparecen rasgos morfológicos típicos de la apoptosis (b): encogimiento celular y citoplasma con ampollas.



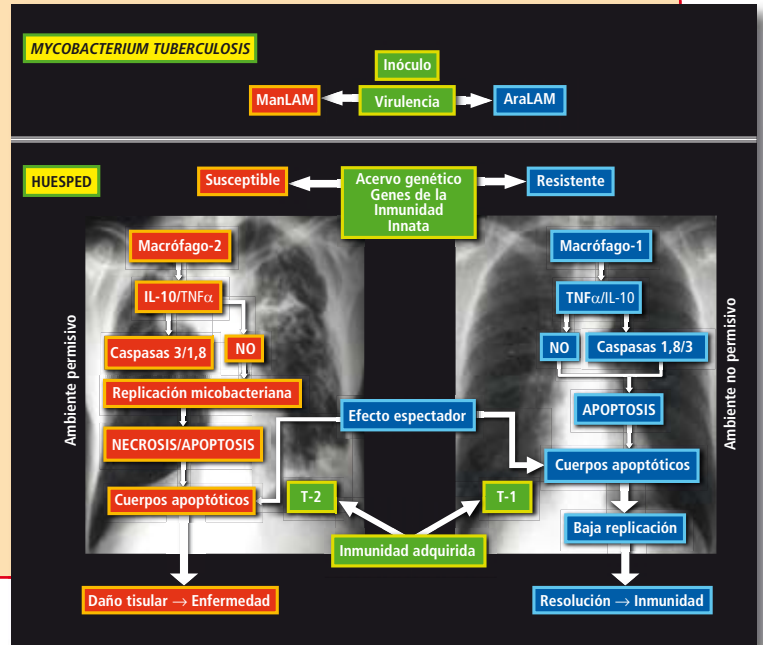


# Interacciones entre *M. tuberculosis* y el huésped

La interacción entre *M. tuberculosis* y el huésped puede considerarse un encuentro de dos genomas. En *M. tuberculosis*, uno de los componentes más abundantes de las micobacterias de crecimiento lento y las patógenas es el lipoarabinománan manosilado (ManLAM), un lípido estructural de la pared; en las bacterias de crecimiento rápido, domina el arabisil-lipoarabinománan (AraLAM). Cada lípido tiene un efecto distinto en la respuesta de los macrófagos. Amén de esos componentes estructurales, otros genes de la micobacteria determinan su virulencia.

En los huéspedes sensibles hallamos macrófagos de tipo 2. El ambiente es permisivo para la micobacteria: producción de citoquinas (IL-10), necrosis, poca apoptosis, daño tisular e inflamación no controlados. Se favorece la diseminación de la bacteria y, por tanto, la enfermedad.

En los huéspedes resistentes, los macrófagos presentan una activación de tipo 1, con mayor capacidad de acción sobre la micobacteria. Sufren apoptosis (probablemente piroptosis), hay una inflamación regulada y se limita la diseminación de la bacteria. No hay enfermedad, se establece la latencia y se contienen las micobacterias.



para el gen *Nramp1* mostró que los macrófagos que portan el alelo que confiere resistencia a algunas infecciones intracelulares son más propensos a sufrir apoptosis, en respuesta a la infección con *M. tuberculosis* H37Rv viva o a la estimulación con proteínas de la micobacteria, que los macrófagos sensibles.

La inducción de apoptosis muestra una clara correlación con la producción de óxido nítrico y con la activación de la caspasa 1, que es inducida por *M. tuberculosis*, por una lipoproteína y por derivados proteicos de la micobacteria. Estos procesos dependen de la producción del FNT $\alpha$ ; son antagonizados por la IL-10. Estas dos citoquinas cumplen funciones opuestas en el control de la infección y de la muerte celular. En macrófagos que portan el alelo de resistencia *Nramp1*, la infección con *M. tuberculosis* y la estimulación con el PPD inducen una mayor proporción de células productoras de FNT $\alpha$  que de IL-10; los macrófagos que portan el alelo de sensibilidad, en cambio, presentan mayor porcentaje de células productoras de IL-10 que de FNT $\alpha$ , en respuesta a los mismos tratamientos.

La función de las citoquinas en la modulación de la muerte celular se ha evaluado mediante ensayos de bloqueo con anticuerpos monoclonales. El bloqueo del FNT $\alpha$  previene la producción de óxido nítrico, disminuye el porcentaje de células con la caspasa 1 activa, reduce la expresión del factor proapoptótico p53, impide la regulación negativa de la proteína mitocondrial antiapoptótica Bcl-2 e inhibe la apoptosis inducida durante la infección con *M. tuberculosis*.

Por otro lado, el bloqueo de la IL-10 favorece la apoptosis, aumenta el porcentaje de células positivas para la caspasa 1 y p53, pero no aumenta la producción de óxido nítrico. La modulación de la apoptosis en este modelo no depende sólo de la célula huésped, sino también de la micobacteria.

Dado que la aminoguanidina (inhibidor competitivo de la enzima óxido nítrico sintasa 2, NOS2) no previene los efectos de la micobacteria sobre la expresión del Bcl-2, se considera que durante la infección podrían activarse eventos que disminuyen la expresión de este factor. Uno de los principales mediadores de la muerte celular es el calcio (Ca<sup>2+</sup>), implicado en la homeostasis y la señalización celulares.

Al poco de la infección, la micobacteria induce alteraciones mitocondriales dependientes del calcio. Sin embargo, el bloqueo del Ca<sup>2+</sup> no afecta a la producción de FNT $\alpha$ , sólo inhibe parcialmente la producción de óxido nítrico; la vía de señalización que lleva a la producción del FNT $\alpha$  opera, pues, con independencia de Ca<sup>2+</sup>.

Con el propósito de identificar esa posible vía de señalización que media la producción del FNT $\alpha$ , se bloquearon varias enzimas; se encontró que la infección micobacteriana promovía la actividad de proteínas quinasas de tirosina y que ésta era inhibida por bloqueadores de la quinasa de tirosina como Jak-2 ("Janus Kinase 2"). El bloqueo de la quinasa repercute en la síntesis de FNT $\alpha$ , de óxido nítrico, en la activación de la caspasa 1 y la muerte celular.



**7. CAMPAÑA DE PREVENCIÓN de la tuberculosis y la gripe llevada a cabo a principios del siglo pasado por la Asociación contra la Tuberculosis del Condado de Rensselaer, Nueva York.**





El hecho de que *M. tuberculosis* active distintas vías de señalización ha llevado también a buscar los receptores que median la interacción entre los macrófagos y las micobacterias. Se ha estudiado la contribución de los receptores de tipo Toll (TLR, de "Toll like receptor") TLR2 y TLR4 en la modulación de la apoptosis en humanos y en ratones. El análisis de fenómenos distintos de la muerte celular, que son dependientes de los TLR2 y TLR4 mediante la generación de dominantes negativos en la línea murina de macrófagos RAW 264.7, mostró que el efecto de ambos TLR es parcial.

En cambio, en los dominantes negativos dobles, donde hay ablación funcional de TLR2 y TLR4, no se produce señalización a través del factor NF- $\kappa$ B. Quedaba así resaltada la función de este factor de transcripción pleiotrópico. No se ha hallado ninguna asociación de los TLR con la tuberculosis.

Algunas pruebas *in vivo* sugieren que las diferencias existentes en los estadios de diferenciación de los macrófagos podrían guardar relación con la activación de mecanismos que controlan la infección. En el granuloma, la lesión que se forma en el sitio de infección, parece haber un reclutamiento de células que detentan distintos grados de diferenciación. La distribución de los monocitos inmaduros CD14<sup>+</sup>, que expresan niveles elevados del receptor basurero de tipo A (SRA) y niveles bajos de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (MHC II), se produce sobre todo en el centro del granuloma; estas células tienen a su vez mayor número de bacterias. Las células maduras (con niveles superiores de MHC II y baja expresión del SRA y CD14<sup>+</sup>) se alojan en la periferia del granuloma.

Algunos estudios sugieren que la maduración podría afectar a los mecanismos de muerte en macrófagos y a la capacidad de controlar las micobacterias. Sin embargo, se desconoce el modo en que los mecanismos de muerte celular de los monocitos y los macrófagos afectan a la capacidad de controlar el crecimiento micobacteriano. Las investigaciones indican que, en respuesta a la infección micobacteriana, la diferenciación podría afectar a la producción de FNT $\alpha$  e IL-10. Se ha sugerido que los genes que se asocian con el control de las micobacterias podrían modular los mecanismos de migración, la maduración de los monocitos desde la médula ósea al pulmón o ambas. Estos eventos dependen de la expresión y regulación de múltiples productos cuyas alteraciones en la producción condicionarían el curso de la infección y favorecerían el desarrollo de la enfermedad.

Durante la infección con *M. tuberculosis*, se activan flujos de calcio, que intervienen en

determinadas alteraciones del estado de transición de permeabilidad de la mitocondria y modulan la apoptosis, con independencia del FNT $\alpha$ . Por lo observado en nuestro laboratorio, la presencia de IL-10 y de calcio modula la inducción de necrosis, ya que la remoción de cualquiera de estos dos elementos previene el daño en la membrana celular subsecuente a la infección micobacteriana.

Las isoformas de la fosfolipasa A dependientes de calcio intervienen en la muerte celular, la producción de citoquinas y el control micobacteriano. El bloqueo farmacológico de la PLA2 previno la inducción de necrosis, aumentó la proporción de células productoras de FNT $\alpha$ , disminuyó la proporción de células productoras de IL-10 y redujo el crecimiento intracelular de *M. tuberculosis*. Sin embargo, no hemos podido establecer cuál o cuáles de los metabolitos derivados de la actividad de la PLA2 podría ser el modulador directo de la muerte; tampoco sabemos si éste es responsable de los efectos sobre la producción de citoquinas y mucho menos el modo en que afecta al crecimiento intracelular de la micobacteria.

La identificación de este metabolito, así como la evaluación de su función en la acción del macrófago abrirán nuevas puertas para el control del crecimiento intracelular de la micobacteria y ayudarán a desentrañar la función de la muerte celular en la patogénesis de la enfermedad.

### Corolario

La investigación genética de las enfermedades infecciosas sobre ratones se ha centrado en la identificación de genes aislados y en el estudio de sus efectos, también aislados, en la progresión de la infección y la enfermedad. Existen cientos de estudios que analizan, de manera individual en humanos, la relación entre los polimorfismos de distintos genes en la respuesta inmunitaria y la propensión a la infección. Esos estudios cubren buena parte del espectro de factores implicados en la respuesta inmunitaria contra la micobacteria.

Se han estudiado polimorfismos de citoquinas y sus receptores, polimorfismos de receptores que interactúan de forma directa o indirecta con la micobacteria, polimorfismos del *Nramp1* y polimorfismos del receptor de la vitamina D en factores que regulan la movilidad de los monocitos y macrófagos, y en el complejo mayor de histocompatibilidad. Ninguno de ellos ha demostrado que los efectos se deban a un solo gen. El control genético de la infección por *M. tuberculosis* es claramente multigénico.

### Bibliografía complementaria

STRUCTURE AND FUNCTION OF THE NATURAL-RESISTANCE-ASSOCIATED MACROPHAGE PROTEIN (NRAMP1), A CANDIDATE PROTEIN FOR INFECTIOUS AND AUTOIMMUNE DISEASE SUSCEPTIBILITY. J. M. Blackwell en *Molecular Medicine Today*, vol. 2, págs. 205-211; 1996.

RESISTANCE RANKING OF SOME COMMON INBRED MOUSE STRAINS TO *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* AND RELATIONSHIP TO MAJOR HISTOCOMPATIBILITY COMPLEX HAPLOTYPE AND NRAMP1 GENOTYPE. E. Medina y R. J. North en *Immunology*, vol. 93, págs. 270-274; 1998.

DIFFERENTIAL INDUCTION OF APOPTOSIS AND NECROSIS IN MONOCYTES FROM PATIENTS WITH TUBERCULOSIS AND HEALTHY CONTROL SUBJECTS. D. P. Gil, L. G. León, L. I. Correa, J. R. Maya, S. C. París, L. F. García y M. Rojas en *The Journal of Infectious Diseases*, vol. 189, págs. 2120-2128; 2004.

IPR1 GENE MEDIATES INNATE IMMUNITY TO TUBERCULOSIS. H. Pan, B. S. Yan, M. Rojas, Y. V. Shebzukhov, H. Zhou, L. Kobzik, D. E. Higgins, M. J. Daly, B. R. Bloom y I. Kramnik en *Nature*, vol. 434, págs. 767-772; 2005.