



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

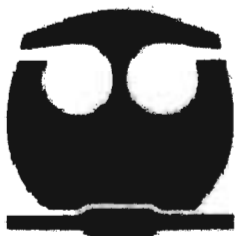
FACULTAD DE QUÍMICA

CONSTRUCCIÓN DE *Mycobacterium microti*
RECOMBINANTE CON EL ANTÍGENO 85B DE
Mycobacterium tuberculosis.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A :

TERESA DE JESÚS FLORES RODRÍGUEZ



EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUÍMICA

MÉXICO, D. F.

Abril 2005

m. 343903



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

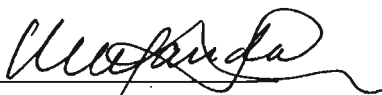
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: MARIA GUADALUPE TSUZUKI REYES
VOCAL: LUCIANO HERNÁNDEZ GÓMEZ
SECRETARIO: YOLANDA LÓPEZ VIDAL
1er SUPLENTE: MARÍA BENITA LEONOR FERNÁNDEZ SALGADO
2do SUPLENTE: GONZALO CASTILLO ROJAS

Sitio donde se desarrolló el tema:

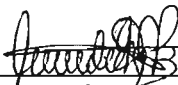
Programa de Inmunología Molecular Microbiana, Departamento de
Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina, UNAM.



Drá. Yolanda López Vidal
Asesor



Dr. Mauricio Castañón Arreola
Supervisor Técnico



Teresa de Jesús Flores Rodríguez
Sustentante

Agradecimientos

Agradezco el apoyo y la asesoría brindados por la Dra. Yolanda López Vidal, así como también el tiempo, la dedicación y el apoyo del Dr. Mauricio Castañón Arreola en la realización de esta tesis.

Esta tesis fue realizada con el financiamiento otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología al proyecto “Selección y prueba de vacunas para la tuberculosis” (Proyecto No. 36923-M).

Dedicatorias

A Dios:

Por permitirme lograr este objetivo tan importante para mí.

A mis padres Manuel y Gertrudis:

Por su gran amor y apoyo incondicional, por creer en mí, por que su ejemplo me motiva para no rendirme. Los amo.

A mis hermanos:

María, Juan, Manuela, Leonardo, Elena, Celia, Alejandro, Eugenia, Hugo y Carolina, por apoyarme siempre y aguantar mi mal genio, los quiero mucho.

A mis amigas de toda la vida:

Carolina, Liliana, Elena, Lorena y Edith, gracias por su apoyo y cariño.

A todos los maestros que influyeron en mi formación, gracias por transmitir sus conocimientos.

A Dulce:

Por compartir los momentos buenos y sobre todo por apoyarme en los malos. ¡Gracias amiga, faltas tú!

A todos mis compañeros del Programa de Inmunología Molecular Microbiana.

Por hacer agradable mi estancia en el laboratorio y por su apoyo.

A Alberto:

Gracias por tu amistad y apoyo incondicional.

A Leo:

Por que el pensar en ti me motivó a continuar, sabes que eres especial para mí.

A Gonzalo, Mary, Maritoña, Dra. Yolanda:

Por sus consejos y enseñanzas.

Índice

	Página
Agradecimientos	<i>iii</i>
Dedicatorias	<i>iv</i>
Índice	<i>v</i>
Resumen	<i>vii</i>
1. Antecedentes	1
1.1 Tuberculosis	1
1.2 <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	1
1.3 Epidemiología	2
1.3.1 Tuberculosis en México	2
1.4 Características de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	6
1.5 Patogenia de la tuberculosis	8
1.5.1 Transmisión	8
1.5.2 Infección primaria	9
1.5.3 Infección secundaria	9
1.6 Inmunología de la tuberculosis	11
1.6.1 Respuesta inmune innata	11
1.6.2 Respuesta inmune adquirida	12
1.6.3 El granuloma	13
1.7 Prevención	15
1.7.1 El bacilo de Calmette y Guérin	15
1.8 Estrategias para el desarrollo de nuevas vacunas	19
1.9 Antígeno 85B	21
1.10 <i>Mycobacterium microti</i>	22
2. Justificación	25
3. Objetivo	26
4. Material y Metodología	27
4.1 Diseño de los iniciadores	27
4.2 Amplificación del gen Rv1886c por PCR	27

4.3 Clonación del gen Rv1886c en el plásmido pMV261	28
4.4 Preparación de <i>Escherichia coli</i> DH5- α competentes	30
4.5 Transformación de <i>Escherichia coli</i> DH5- α	30
4.6 Identificación por PCR de clonas transformadas	31
4.7 Obtención de la sonda Sr30	31
4.8 Hibridación de Rv1886c	33
4.9 Transformación de <i>Mycobacterium microti</i>	33
4.10 Identificación de las clonas de <i>Mycobacterium microti</i> transformadas	35
4.11 Expresión del antígeno 85B en <i>Mycobacterium microti</i>	35
4.11.1 SDS-PAGE	35
4.11.2 Inmunodot	37
5. Resultados	38
5.1 Amplificación del gen Rv1886c por PCR	38
5.2 Transformación de <i>Escherichia coli</i> DH5- α	39
5.3 Identificación por PCR de clonas transformadas	40
5.4 Obtención de la sonda Sr30	40
5.5 Hibridación de Rv1886c	41
5.6 Transformación de <i>Mycobacterium microti</i>	42
5.7 Identificación de las clonas de <i>Mycobacterium microti</i> transformadas.	43
5.8 Expresión del antígeno 85B en <i>Mycobacterium microti</i>	43
5.8.1 SDS-PAGE	43
5.8.2 Inmunodot	44
6. Discusión	45
7. Conclusiones	49
8. Perspectivas	50
9. Bibliografía	51
Apéndice	56

Resumen

La medida más importante de prevención contra la tuberculosis es la vacunación con BCG; sin embargo, su eficacia protectora no ha sido consistente ya que varía entre 0 % y 80 %. Ya se ha explorado de forma exitosa el uso de *Mycobacterium microti* (*M. microti*) como vacuna en humanos, ya que es filogenéticamente más cercana a *M. tuberculosis* y no es patógena para el humano. Dada la homología de *M. microti* con el agente etiológico de la tuberculosis, se sugiere su uso como vehículo para la expresión de antígenos inmunodominantes de *M. tuberculosis*, entre ellos el antígeno 85B [Ag85B (30 kDa)] que induce respuestas B y T, y recombinada en BCG demostró inmunidad protectora e incrementó significativamente la eficacia comparada con la vacuna BCG. En este trabajo se desarrolló una cepa recombinante con *M. microti* (Mmr30) que expresa el antígeno 85B de *M. tuberculosis*. Para la clonación del gen Rv1886c se diseñaron iniciadores con sitios de restricción, con los cuales se amplificó este gen por PCR. El amplicón fue purificado y clonado en el plásmido de expresión pMV261. La selección del vector clonado con el gen Rv1886c se realizó en la cepa *E. coli* DH5-alfa. Los plásmidos seleccionados se hibridaron con la sonda del Rv1886c. El plásmido clonado se denominó pMV261-30kDa y se utilizó para la transformación de células competentes de *M. microti* por electroporación. La detección de la proteína recombinante en la clona obtenida se realizó por electroforesis en gel de poli-acrilamida y se confirmó por inmunodot con el anticuerpo monoclonal 49T específico contra la proteína de 30 kDa. Se obtuvo la transformación de *M. microti* con el vector pMV261-30kDa y se detectó la expresión de la proteína de 30 kDa. Se corroboró en ensayos de inmunodot en los que se utilizó el anticuerpo monoclonal 49T específico contra el antígeno 85B de *M. tuberculosis*.

1. Antecedentes

1.1 Tuberculosis

La tuberculosis es una enfermedad muy antigua, en restos humanos de la Edad de Piedra y en los esqueletos de algunas de las primeras momias egipcias se han identificado lesiones atribuibles a la tuberculosis. En el siglo XVIII se le conocía como la “peste blanca”. Las características de la tuberculosis respiratoria y espinal fueron descritas por Hipócrates alrededor de 400 a.C. [13, 29, 39, 49].

Esta enfermedad es infecto-contagiosa y se identifica por la presencia de lesiones semejantes a tubérculos y necrosis caseosa en el pulmón. Es causada por un grupo de micobacterias conocidas como “complejo *Mycobacterium tuberculosis*”, el cual se conforma por las especies *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. africanum*, *M. canetti* y *M. microti* [7, 19, 26, 30, 35, 46].

1.2 *Mycobacterium tuberculosis*

Mycobacterium tuberculosis (*M. tuberculosis*) también conocido como el “bacilo de Koch”, es el principal agente causal de la tuberculosis humana, fue descubierto por Robert Koch en 1882, quien aisló la bacteria de lesiones tuberculosas [30, 41, 46, 48].

Este microorganismo se clasifica taxonómicamente dentro del Orden de los Actinomycetales, el cual a su vez está dentro de la clase Actinomycetae. Este Orden contiene ocho familias entre las cuales se encuentra la Familia Mycobacteriaceae, con un solo género: *Mycobacterium* [48].

1.3 Epidemiología

La tuberculosis representa un serio problema de salud mundial, debido a que se estima que anualmente se infectan de 8 a 10 millones de personas y mueren de 2 a 3 millones. Esta situación se agrava debido a la creciente coinfección con el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), situación en la que el riesgo anual de desarrollar tuberculosis se incrementa de 7-10 % y al surgimiento de cepas de *M. tuberculosis* fármaco-resistentes [6, 44, 49]. El uso de tratamientos inmunosupresores es un factor que incrementa el riesgo a desarrollar la enfermedad en aquellos sujetos que presentan una infección latente [32].

La tuberculosis se presenta en todo el mundo independientemente de factores geográficos o raciales (Figura 1). Sin embargo, la mayor incidencia se concentra en los países en vías de desarrollo, frecuentemente asociado a las clases socioeconómicas bajas, siendo característicos la desnutrición, el hacinamiento humano y las malas condiciones de higiene en estas regiones. Un grupo de alto riesgo de infección lo constituyen los trabajadores de la salud y las personas que conviven con pacientes con tuberculosis pulmonar activa. La diabetes y la silicosis pulmonar son padecimientos que predisponen al desarrollo de la tuberculosis [38].

Debido a que a nivel mundial se ha incrementado el número de casos de tuberculosis, en abril de 1993 la Organización Mundial de la Salud (OMS) declaró el estado de emergencia global contra la tuberculosis [22].

1.3.1 Tuberculosis en México

En México la tuberculosis afecta a todos los grupos de edad, particularmente a los adultos jóvenes. En el año 2000 la OMS consideró a México entre los países con tasas de morbilidad intermedia, es decir, mayor de 25 y menor de 49 casos por 100 000 habitantes.

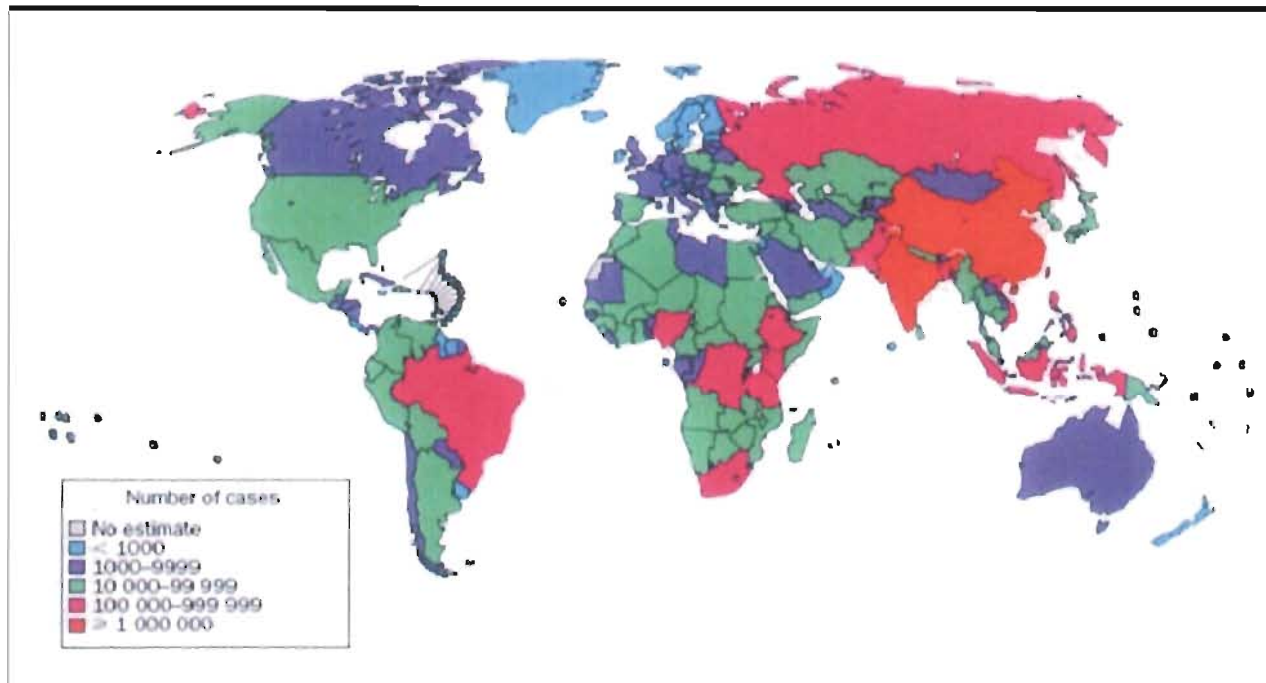


Figura 1.

Distribución mundial de la tuberculosis. En la figura se esquematiza la incidencia mundial de la tuberculosis estimada para el año 2001. Lancet 2003;362:887.

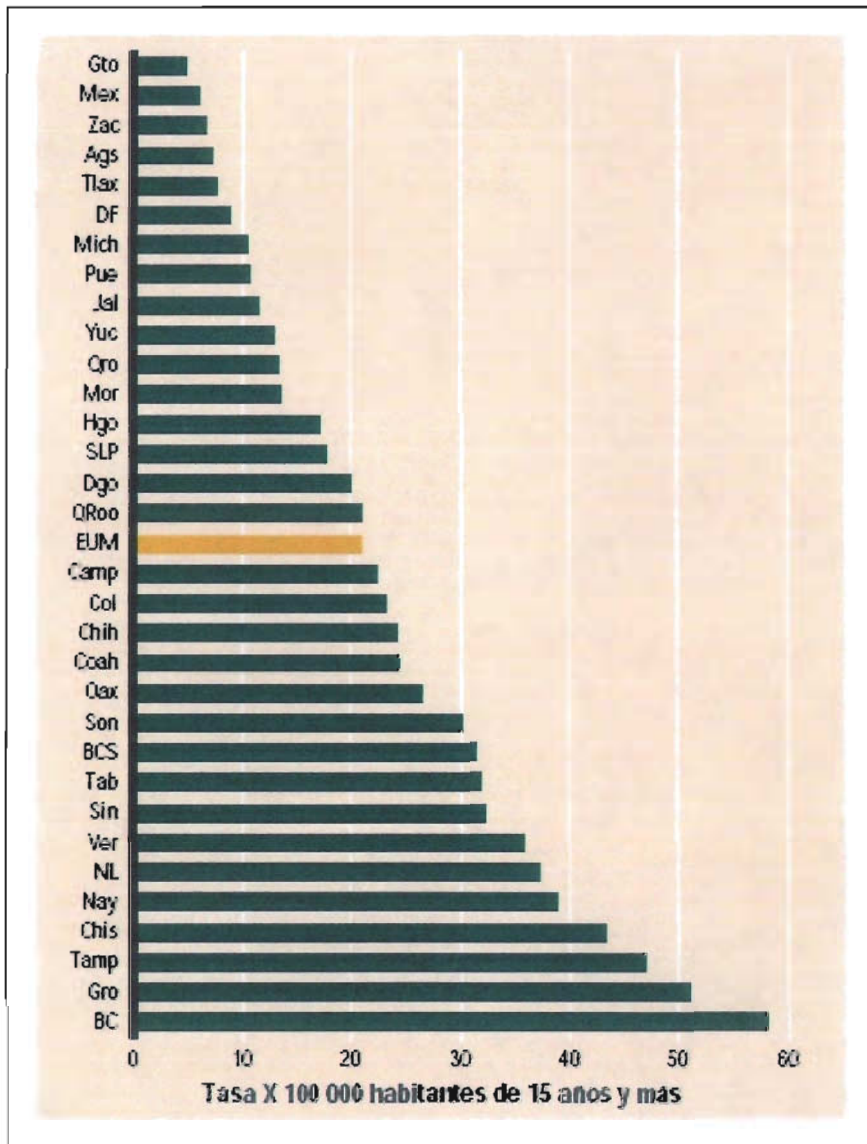


Figura 2. Incidencia de tuberculosis en México. En la gráfica se representa la morbilidad por tuberculosis pulmonar por entidad federativa, México 2002. Secretaría de Salud 2002.

Sin embargo, en México solo se diagnostican de 15,000 a 20,000 casos nuevos de tuberculosis al año. Los estados con mayor incidencia son Tamaulipas, Baja California, Guerrero, Veracruz, Nuevo León, Nayarit, Sinaloa, Tabasco y Chiapas y los estados con menor incidencia son Tlaxcala, Zacatecas, Guanajuato, Estado de México, Distrito Federal, Michoacán, Yucatán, Aguascalientes, Puebla y Jalisco (Figura 2).

De acuerdo a los datos de morbilidad de los años 1990 a 2000 (Tabla 1) en 1994 se incrementó la notificación de casos, como respuesta al informe de la Organización Panamericana de la Salud, en la cual se estimó que en 1993 en México había un subregistro de casos nuevos, en el cual solo se detectaban uno de cada 4 casos nuevos de tuberculosis. Con la intensificación de las estrategias para detectar los casos nuevos de tuberculosis, actualmente se estima que existe un subregistro mayor al 50% [41].

Morbilidad y mortalidad por tuberculosis pulmonar en los Estados Unidos Mexicanos, 1990-2000				
Año	Casos Nuevos	Tasa*	Defunciones	Tasa*
1990	12 242	14.7	5 452	6.5
1991	12 554	14.7	4 691	5.5
1992	11 855	13.6	4 508	5.2
1993	12 370	13.9	4 269	4.8
1994	13 450	14.9	4 269	4.5
1995	17 157	18.7	4 099	4.4
1996	16 995	18.2	4 023	4.2
1997	19 577	20.6	3 976	3.8
1998	18 032	18.7	3 666	3.7
1999	16 881	17.2	3 240	3.3
2000	15 649	15.7	2 583**	2.6**

Tabla 1. Incidencia de tuberculosis en México. En la tabla aparecen las tasas de morbilidad y mortalidad por tuberculosis pulmonar en México. *Tasa por cada 100,000 habitantes. **Información preliminar SEED, SSA.

En México, la coinfección tuberculosis-VIH es de aproximadamente 3%; sin embargo, se estima que el 25% de los sujetos infectados por el VIH desarrollan tuberculosis clínica durante el curso de esta infección [4].

En un estudio de fármaco-resistencia que se llevó a cabo en 1997 en los estados de Baja California, Sinaloa y Oaxaca, se encontró la presencia de resistencia a uno o más fármacos en 12.9% de los casos nuevos y 50.5% en casos de tratamiento repetido [4].

1.4 Características de *Mycobacterium tuberculosis*

M. tuberculosis es un bacilo ácido alcohol-resistente (BAAR), aerobio, recto o ligeramente curvo; mide de 0.3 a 0.6 μm de ancho y de 1 a 4 μm de largo (Figura 3). En los macrófagos el bacilo tuberculoso es recto y delgado, mide casi 0.4 x 3 μm . Los bacilos no forman esporas ni cápsula [30, 46, 48].



Figura 3.
Mycobacterium tuberculosis. Fotomicrografía electrónica de transmisión de *M. tuberculosis* (www.wadsworth.org).

Al igual que otras micobacterias cuenta con una pared celular compleja que contiene una gran cantidad de lípidos, los cuales son alrededor del 60% del peso seco de la pared. Esta pared le confiere la característica de ser ácido alcohol resistente y esta conformada por tres capas: a) La más interna, está conformada por peptidoglucano y micopéptido, b) la intermedia, compuesta por arabinogalactano y ácidos micólicos y c) la más externa, en la que se encuentran ceras D y micósidos-C. Además también tiene lipoarabinomananas (Figura 4) [30, 41].

Sobre la superficie de la bacteria existen otros compuestos lipídicos, como el factor cordón (trehalosa 6, 6'-dimicolato), los sulfátidos y los micósidos. El factor cordón es esencial para que el bacilo crezca formando "cordones serpentin" [48].

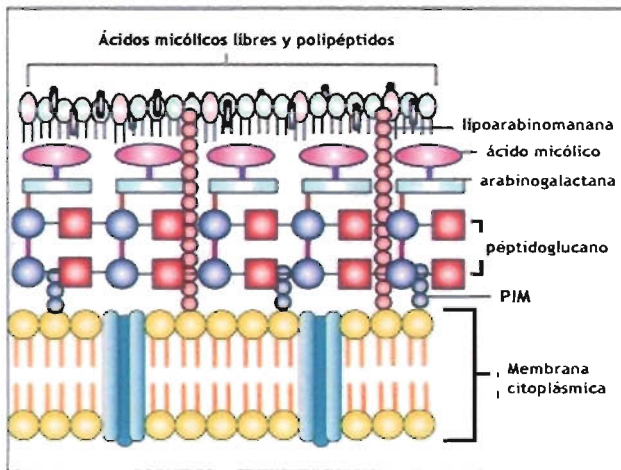


Figura 4. Representación esquemática de los componentes de la pared celular de *M. tuberculosis* (www.cpmc.columbia).

1.5 Patogenia de la tuberculosis

1.5.1 Transmisión

La enfermedad se transmite de persona a persona por vía aérea, al inhalar pequeñas gotas de saliva que contienen abundantes microorganismos, expelidas al toser o estornudar (Figura 5). También puede transmitirse por fomites pero esto es muy poco frecuente. La tuberculosis puede también adquirirse por vía oral cuando se ingiere leche no pasteurizada proveniente de vacas infectadas con *M. bovis* [2, 21, 30].

La tuberculosis se manifiesta generalmente como tuberculosis pulmonar pero, puede infectar otros órganos como ganglios linfáticos, riñón, oviductos, epidídimo, esqueleto, meninges, intestino y entre otros sitios; asociada o no, al proceso pulmonar. En la infección secundaria se puede diseminar por vía hematógena y puede infectar simultáneamente diversos órganos. En todos los sitios la contención de la infección se da por la formación de una estructura organizada denominada el granuloma tuberculoso. La infección por tuberculosis puede ser primaria o secundaria dependiendo de la vía por la cual es adquirida [2, 29, 31, 48].

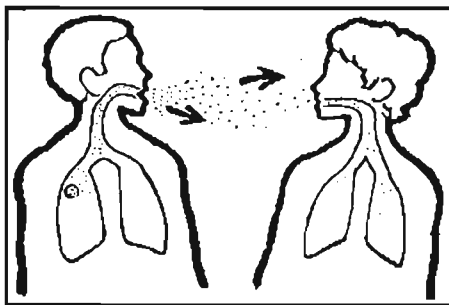


Figura 5.

Vía de transmisión de la tuberculosis. La transmisión se realiza principalmente de persona a persona por la exposición a un paciente con tuberculosis pulmonar crónica (www.cpmc.columbia).

1.5.2 Infección primaria

La infección primaria o primoinfección se localiza generalmente en el pulmón y se presenta en individuos susceptibles al bacilo de la tuberculosis. Generalmente produce una lesión conocida como el foco de Gohn (Figura 6). Después que se establece la primoinfección se induce una respuesta de hipersensibilidad retardada a ciertas proteínas del bacilo de la tuberculosis. La hipersensibilidad a estos compuestos desempeña un papel muy importante en la destrucción tisular y en la aparición de una reacción inflamatoria granulomatosa. La hipersensibilidad se demuestra y evalúa por medio de la prueba de la tuberculina [32, 48].

La infección primaria en la mayoría de los casos cursa de forma asintomática y se mantiene latente durante toda la vida del individuo; sin embargo, la reactivación de la infección puede ocurrir en respuesta a perturbaciones de la respuesta inmune que ocasiona la tuberculosis activa [2, 31, 32].

1.5.3 Infección secundaria

La infección secundaria es la que se presenta en los individuos con la evidencia de la primoinfección. Esta infección puede ser por reactivación endógena ó por infección exógena. La infección secundaria se localiza con mayor frecuencia en los vértices pulmonares y se caracteriza por su diseminación y la necrosis del tejido pulmonar [48].

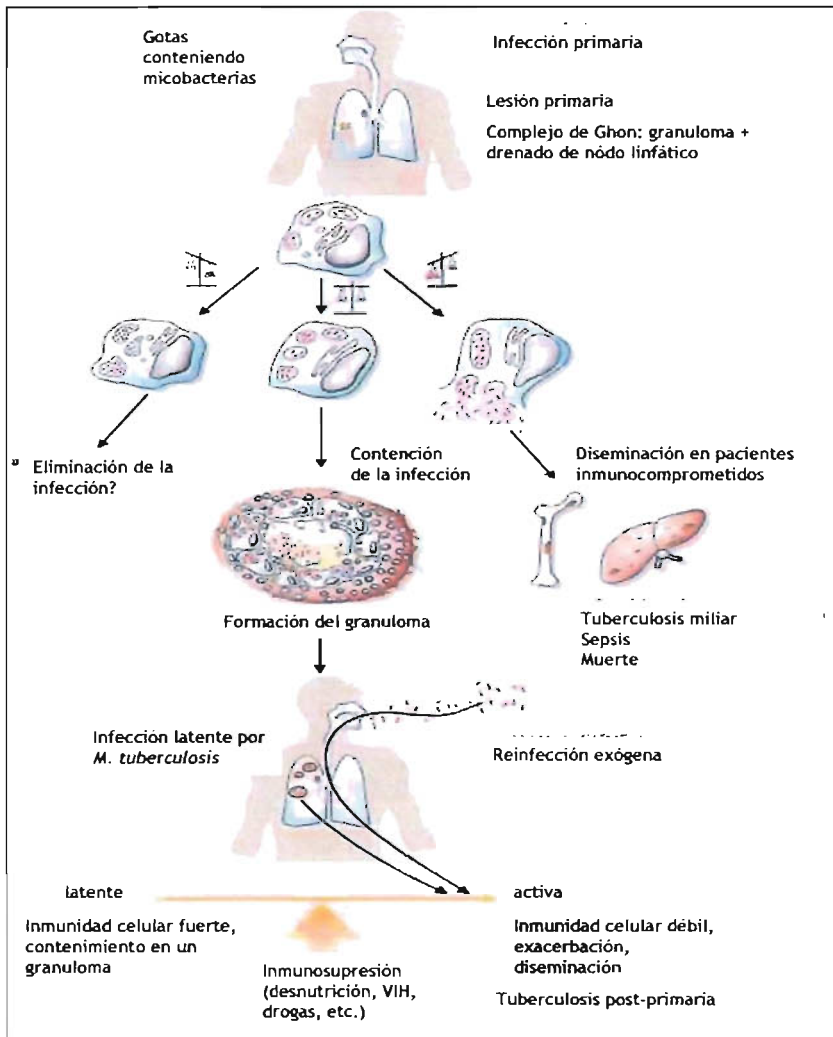


Figura 6. Patogénesis de la tuberculosis. Al término de la primoinfección, el 90% de los casos limitan la infección primaria por la formación de granulomas. En el 10% restante la infección progresa directamente a infección secundaria (aproximadamente 5%) o por reactivación de una infección latente (5% restante). La progresión ocurre por alteración inmunológica que resulta en la diseminación de los bacilos a otros órganos, la transmisión de la enfermedad y, la muerte.

1.6 Inmunología de la tuberculosis

1.6.1 Respuesta inmune innata

La respuesta inmune innata inicia con la fagocitosis y la subsecuente secreción de interleucina 12 (IL-12) por los macrófagos alveolares. Ya formado el fagosoma, éste puede fusionarse con el lisosoma, el cual contiene enzimas hidrolíticas que degradan a los microorganismos. Estas enzimas se activan secuencialmente conforme el pH del fagolisosoma se acidifica [31, 32].

Sin embargo, se sabe que *M. tuberculosis* puede sobrevivir dentro del fagosoma mediante mecanismos de evasión que impiden la fusión del fagolisosoma, la activación del macrófago y la producción de intermediarios reactivos de oxígeno (ROI) y nitrógeno (RNI). No se conoce exactamente el mecanismo por el cual *M. tuberculosis* inhibe la fusión fago-lisosoma, pero se ha reportado que sulfátidos micobacterianos pueden participar en esta inhibición [2, 31, 32, 39].

Estudios *in vitro* demostraron que *M. tuberculosis* produce amonio en grandes cantidades, lo cual impide la acidificación del fagosoma. Por otra parte se observó que el bacilo tuberculoso impide la activación de las enzimas lisosomales mediante la alcalinización del fago-lisosoma. Esto se lleva a cabo por medio de dos sistemas enzimáticos micobacterianos relacionados con el metabolismo del amonio: la ureasa, la cual cataliza la conversión de la urea en amonio y dióxido de carbono y, la glutamina sintetasa que participa en el metabolismo del nitrógeno. El principal mecanismo de neutralización de los intermediarios reactivos de oxígeno es mediante la acción de la enzima superóxido dismutasa. Además, los componentes de la lipoarabinomanana (LAM) y fenolglucolípidos I (PGL-I) también son potentes eliminadores de los radicales libres [2, 31, 32, 27, 39].

La resistencia natural de los macrófagos a la infección con *M. tuberculosis* se asocia a una proteína denominada NRAMP (de sus siglas en inglés Natural Resistant Associated Macrophage Protein), esta proteína participa en el transporte de nitrito a los compartimentos intracelulares como el fagosoma, en el cual se oxida y da lugar al óxido nítrico (NO). Algunas variantes alélicas de la proteína NRAMP se asocian a una mayor susceptibilidad a la infección por micobacterias [31, 32].

Los neutrófilos son las células que llegan primero al sitio de infección en el cual incrementan su capacidad fagocítica. Estudios en humanos demostraron que producen péptidos catiónicos denominados defensinas, los cuales tienen actividad bactericida en presencia de calcio. Durante la infección temprana, las células NK son capaces de activar a las células fagocíticas en el lugar de la infección, por su producción de interferón- γ (IFN- γ) [31, 32].

1.6.2 Respuesta inmune adquirida

Ante la infección con *M. tuberculosis* se originan la inmunidad humoral y celular, siendo esta última la protectora, debido a que *M. tuberculosis* es un patógeno intracelular y los anticuerpos no tienen acceso a éste [2, 31, 32, 39].

Después de la fagocitosis del bacilo, con la concomitante producción de interleucina 12 (IL-12) por parte del macrófago, el microorganismo es procesado y sus epítomos son presentados por moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad clase II (MHC II) a células T CD4+, las cuales se activan y proliferan, produciendo interferón-gamma (IFN- γ). Esta citocina a su vez activa a los macrófagos para la producción de factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), que junto con el IFN- γ conducen a la formación de óxido nítrico (NO), que es el principal mecanismo antimicrobiano. La producción de NO se lleva a cabo vía la sintetasa de óxido nítrico II (iNOS2) [2, 29, 31, 32, 27, 39].

La presentación de los epítopos de *M. tuberculosis* también puede ser a través de las moléculas MHC clase I a células TCD8+. Este tipo de linfocitos junto con las células NK lisan a las células infectadas, permitiendo que los bacilos sean fagocitados por macrófagos activados que los eliminan eficientemente [29, 31, 27, 39].

1.6.3 El granuloma

La formación de granulomas delimita el sitio de la infección y es en esta estructura donde la destrucción de células y macrófagos infectados permite la eliminación de *M. tuberculosis* por los macrófagos activados. En contraste, la inapropiada y no regulada destrucción de tejido, provoca la progresión de la enfermedad [2, 21, 31, 32].

El primer evento para la formación del granuloma es el reclutamiento de neutrófilos, linfocitos, monocitos y macrófagos de la circulación a la proximidad del foco infeccioso y su preparación para su extravasación. Esto es controlado por moléculas de adhesión (como ICAM-1) y por quimocinas. Éstas contribuyen a la migración celular y localización [2, 21, 31, 32].

El granuloma se conforma de una capa gruesa de macrófagos activados que asemejan a células epiteliales por lo que se conocen como células epitelioides, células gigantes multinucleadas y linfocitos que secretan INF- γ y otras citocinas (Figura 7). Los macrófagos activados producen factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), para mantener la integridad del granuloma [2, 29, 31, 32, 27, 39].

Durante la infección latente se desconoce el estado fisiológico del microorganismo dentro del granuloma. Se especula que *M. tuberculosis* puede estar viable pero sin replicarse, ó replicándose activamente pero siendo

controlado por la respuesta inmune dentro del granuloma, ó metabólicamente alterado con limitados o infrecuentes ciclos replicativos [2, 31, 32].

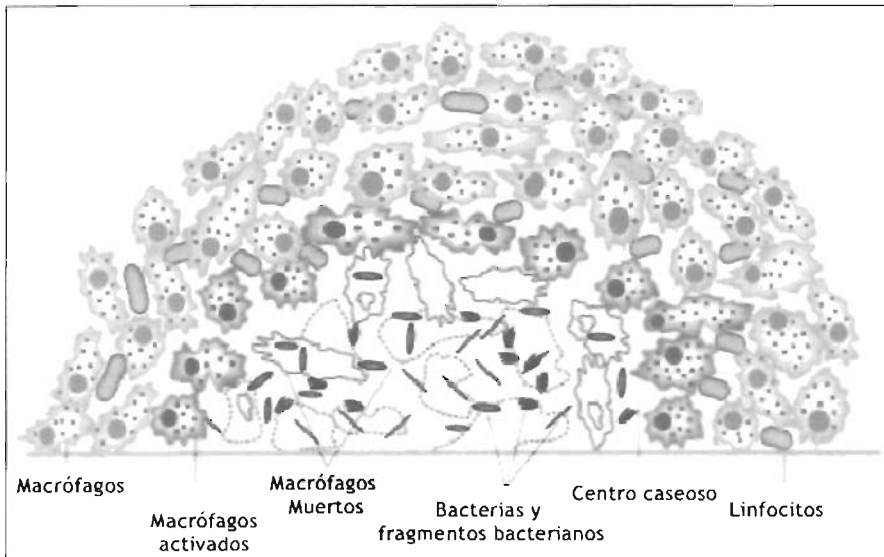


Figura 7.

El granuloma se conforma del centro hacia la periferia, de una capa gruesa de macrófagos activados que asemejan a células epiteliales por lo que se conocen como células epitelioides, células multinucleadas gigantes y linfocitos CD4+ y CD8+ (www.cpmc.columbia).

El granuloma puede permanecer estático y lentamente tender a la curación y entonces va siendo recubierto por tejido fibroso y posteriormente se calcificará, aún en este caso pueden persistir en él bacilos viables o, por el contrario, el proceso se agrava, la necrosis caseosa se hace más extensa y puede incluso tender a la supuración, con la presencia de leucocitos polimorfonucleares en la lesión [2, 30, 31, 32]. El proceso inflamatorio es extenso e involucra a un

bronquio o cavidad vecina. Su evolución dependerá del estado inmunoalérgico del paciente y del tratamiento empleado [2, 31, 32].

Si el bacilo no es destruido, éste se replica y el macrófago muere. Posterior a esto hay una inflamación local y son reclutados más macrófagos al sitio. Simultáneamente algunos bacilos son transportados a los nodos linfáticos por células dendríticas que estimulan la expansión clonal de linfocitos antígeno específicos. Otros bacilos son llevados a diferentes lugares del organismo y son los que causan las formas extrapulmonares de enfermedad primaria [29, 27, 31, 32, 39].

1.7 Prevención

El mejorar el nivel socioeconómico de los miembros de la comunidad, la vivienda (sin hacinamiento) y en general las condiciones de higiene y nutrición, particularmente de niños y jóvenes, ayudará a prevenir la transmisión.

También se puede evitar la transmisión humana de la enfermedad por medio de la detección oportuna de ésta, el aislamiento de todo paciente que pueda ser infectivo, el garantizar la administración del tratamiento de todo caso comprobado y el darle seguimiento hasta lograr su curación. Sin embargo, la medida más importante es la inmunización. Esta se logra por medio de la vacunación con el bacilo de Calmette y Guérin (BCG) [30, 41, 46, 48].

1.7.1 El bacilo de Calmette y Guérin

La vacuna conocida como BCG fue desarrollada entre 1908 y 1921 por Albert Calmette y Camille Guérin en el Instituto Pasteur de Lille, Francia,

durante sus investigaciones realizadas con bacilos tuberculosos virulentos de la especie *M. bovis* [41].

Calmete y Guérin en 1905 demostraron que el microorganismo se transmitía a las cabras jóvenes a través de la leche de cabras adultas que consumieron una cepa virulenta de *M. bovis*, por lo que se dieron a la tarea de investigar la infección por vía oral [25].

Experimentos posteriores sugirieron a Calmette que la administración de bacilos muertos por calor podía servir para inmunizar recién nacidos por la vía oral [25].

La cepa de BCG fue obtenida cuando el Dr. Calmette cultivó *M. bovis* en medio de papa glicerizada. En estos cultivos los bacilos crecieron como colonias apretadas y dificultaron obtener una suspensión homogénea. Después de adicionar una gota de bilis de buey estéril, observó que la homogenización se favorecía grandemente y concluyó que el medio de papa saturado con 5 % de glicerina y bilis de buey, era un buen medio para crecer a *M. bovis*. Durante la propagación del bacilo (cada 21 días), observó después de varios subcultivos, cambios en la morfología de la cepa. En el primer año, observó que se incrementó la virulencia de la cepa pero en los siguientes años la virulencia regularmente disminuyó. En diciembre de 1908 Calmette y Guérin reportaron ante la Academia de Ciencias que su bacilo había modificado sus propiedades morfológicas [25].

Al inyectar 5 mg del bacilo tratado (una dosis letal cuando se usa bacilo silvestre), no se produjo más que una condición febril que duró alrededor de 36 días y no hubo formación de lesiones. Después de alrededor de 70 cultivos sucesivos en este medio con bilis, el bacilo redujo su virulencia y los becerros toleraban una inyección intravenosa de 100 mg mientras que los animales inyectados con 3 mg de la cepa silvestre murieron a causa de una tuberculosis

miliar. Los bacilos atenuados en el medio con bilis mantuvieron su antigenicidad [25].

En agosto de 1915, los experimentos fueron interrumpidos por la toma de Lille por la Armada Alemana. Terminada la guerra, Calmette regresó a París y en 1919 fue nombrado subdirector del Instituto Pasteur y creó el laboratorio de Investigaciones sobre la tuberculosis.

En esta nueva etapa junto con Camille Guèrin culminó su estudio sobre el bacilo no tuberculoso confirmando la inocuidad absoluta y la imposibilidad para el bacilo de revertir a su virulencia. Esta cepa, obtenida después de 230 subcultivos en un lapso de aproximadamente 13 años fue denominada Bacilo Calmette-Guèrin (BCG) [25, 41].

Ensayos posteriores en bovinos, monos y chimpancés mostraron que la vacunación con BCG, protegía contra la infección natural y la respuesta inmunológica se mantenía por más de un año [25].

La vacuna BCG se aplicó por primera vez en humanos en 1921 para inmunizar a un recién nacido que en aquella época tenía un alto riesgo de morir por tuberculosis al ser criado por su abuela tuberculosa. A este niño se le administraron tres dosis de 6 mg de BCG por vía oral y fue protegido exitosamente. Posteriormente se vacunó a 120 recién nacidos de madres tuberculosas siguiendo el mismo esquema de vacunación y se observó una disminución significativa en la mortalidad por tuberculosis que, pasando del 25 % a menos del 2 %. En un anexo al artículo, Calmette estableció las reglas que deberían seguir los laboratorios para cultivar al bacilo y prevenir su contaminación [25].

En 1923 se cambió a la vía de administración oral por la intradérmica y posteriormente a subcutánea. Para el 1 de enero de 1926 en Francia ya habían

sido vacunados 5,183 bebés con la BCG. En los siguientes años, se incrementó el uso de la vacuna BCG en Europa; sin embargo, también hubo controversia por la carencia de evidencias estadísticas que demostraran que la vacunación reducía la mortalidad por tuberculosis en los infantes y por el miedo a que la BCG recuperara su virulencia [25, 41].

La aceptación internacional de la vacuna BCG se vio comprometida en 1929 por un desafortunado accidente ocurrido en Lubeck (Alemania), en el cual la vacuna BCG se contaminó con una cepa de *M. tuberculosis* (la cepa Kiel) y después de ser administrada a 251 niños provocó la muerte a 72 de ellos [25].

La primera distribución documentada de la BCG, fue a Rusia en 1924. De 1921 hasta su liofilización en 1961, la vacuna BCG se conservó por subcultivo en tiempos irregulares. Actualmente se sabe que las vacunas desarrolladas en los países a los cuales se distribuyó la vacuna original son microbiológicamente diferentes y se les conocen como subcepas BCG [5].

A más de 120 años del descubrimiento del agente causal de la tuberculosis (*M. tuberculosis*), la principal medida de prevención es la vacunación con BCG, la cual no previene la infección pero sí protege contra las formas graves de la enfermedad (tuberculosis miliar y meníngea) y reduce el riesgo de progresión a tuberculosis pulmonar y de muerte. La mayoría de los países recomienda la vacunación rutinaria con BCG y hoy en día es la vacuna más utilizada en el mundo, particularmente en los países en vías en desarrollo y endémicos para la tuberculosis [18].

Los ensayos clínicos controlados realizados en los más de 80 años de uso de la vacuna BCG muestran que su eficacia protectora no es consistente y varía de 0 % a 80 % [18].

Dentro de las hipótesis planteadas para explicar esta variación se encuentran:

- a. Diferencias entre las cepas de BCG y pérdida progresiva de capacidad de generar inmunidad protectora durable.
- b. Diferencias genéticas en la susceptibilidad del hospedero.
- c. La protección con BCG disminuye con la edad de la vacuna y con el tiempo transcurrido después de la vacunación.
- d. Interferencia o enmascaramiento de la eficacia protectora por sensibilización con micobacterias no tuberculosas (MNT) [9, 16].

1.8 Estrategias para el desarrollo de nuevas vacunas

Las alternativas exploradas son: el uso de ADN, subunidades proteicas, cepas atenuadas y vacunas recombinantes [3, 9, 16, 17, 18, 40].

Algunos de los antígenos más estudiados y empleados para el desarrollo de estas vacunas son: ESAT-6, CFP-10, antígeno 85B (30kDa) y PstS-1 (38kDa). Debido a que promueven una respuesta celular protectora (Th1) y experimentalmente en modelos animales demostraron incrementar significativamente la eficacia de la vacuna [1, 9, 11, 15, 17, 40].

Uso de ADN

Consisten en la administración intramuscular de ADN desnudo que codifica para una o varias de las proteínas más inmunogénicas de *M. tuberculosis*, principalmente de las proteínas secretadas al medio de cultivo. La producción de

este tipo de vacunas fue posible con el acelerado desarrollo de las herramientas de biología molecular, genéticas y la secuenciación del genoma completo de dos cepas de *M. tuberculosis*. Estas vacunas solo han sido evaluadas en modelos animales y han demostrado inducir tanto respuesta celular como humoral. Vacunas que expresan los antígenos MPT64, ESAT-6 ó el antígeno 85B reducen la carga bacilar en pulmón, después del reto con *M. tuberculosis*, por medio de la inducción de la respuesta celular. En contraste, las vacunas que codifican los antígenos de 38kDa ó 19kDa generaron una respuesta humoral no protectora. Este tipo de vacunas requieren de un adyuvante, además de que la administración de varias dosis por la vía intramuscular, para inducir una respuesta Th1. Sin embargo, hasta hoy no superan la protección conferida por la BCG y se requieren ensayos que estudien su seguridad en población humana [1, 9, 11, 15, 17, 40].

Subunidades proteicas

Esta consiste en proteínas recombinantes, o proteínas purificadas de un filtrado de cultivo de *M. tuberculosis* que característicamente inducen una respuesta Th1. Éstas mostraron inmunidad protectora en modelos de ratones, cobayos y primates. Para su preparación se requieren grandes cantidades de proteína y se administran con adyuvantes. En estudios *in vivo* en animales e *in vitro* en humanos se ha evaluado la capacidad protectora de antígenos como ESAT-6, MPT64, MPB70 y antígeno 85B, sin embargo, hasta hoy no superan la protección conferida por la BCG [1, 9, 11, 15, 17, 40].

Cepas atenuadas

En su elaboración se han empleado aislamientos de *M. tuberculosis*, cepas tipo y especies filogenéticamente cercanas a ésta, sin embargo el riesgo de que reviertan su virulencia permanece latente, por lo cual es muy poco factible su

uso, además de que en casi todos los casos inducen protección en menor grado que BCG [1, 9, 11, 15, 17, 40].

Vacunas recombinantes

Otra alternativa son las vacunas recombinantes, las cuales en algunos casos han demostrado inducir una respuesta inmune protectora igual o superior a la inducida por la BCG. Estas vacunas consisten en cepas que expresan o sobre-expresan citocinas o antígenos inmunodominantes de *M. tuberculosis*, como las interleucinas IL-2, IL-4, IL-6 ó IFN- γ ; proteínas como la de 18kDa, el antígeno 85B ó PstS-1. Dentro de éstas, destacan la subcepa Tice recombinada con el antígeno 85B ó la proteína PstS-1 de *M. tuberculosis*, las cuales demostraron inducir una respuesta inmune protectora superior a la conferida por la BCG [1, 8, 9, 11, 28, 27, 15, 17, 40].

En el desarrollo de estas vacunas se requiere de cepas no patógenas para el humano que sean capaces de multiplicarse en el hospedero, y que pueda expresar y secretar los antígenos con los cuales son recombinadas.

1.9 Antígeno 85B

Este antígeno fue descrito por primera vez por Fukui y Moneda en 1961, como el componente principal del filtrado de cultivo de *M. tuberculosis* H37Rv. En 1965 con resultados más refinados, fue presentado un reporte sobre el antígeno, en ese entonces denominado antígeno alfa. Posteriormente, también fue descrito por otros autores, en el sistema de referencia de EU y Japón, se le denominó antígeno 6 al identificarlo en inmunoelectroforesis, al identificarlo por el contrario en inmunoelectroforesis lo llamaron antígeno 85B. En la terminología de Nagai se le denominó MPT59/MPB59 [23].

El antígeno 85B forma parte de un grupo de tres proteínas conocido como complejo 85 ó 30/32kDa. Las proteínas de este complejo se secretan en una relación de 3:2:1 (30kDa/32A/32B). La proteína de 30kDa ha demostrado ser inmunogénica y desencadenar una respuesta celular tipo Th1. Presenta una actividad de micolil transferasa y tiene un papel importante en la síntesis de la pared celular [12,14, 23, 24, 33].

Ya ha sido comprobada la secreción de esta proteína dentro del fagosoma de los macrófagos humanos. También se ha visto que la depleción del gen que codifica para la proteína, altera la formación adecuada de la pared celular. Por sus cualidades antigénicas se le considera un candidato vacunal, pues se ha visto que la vacunación de cobayos y ratones con la proteína purificada, confiere inmunidad protectora al reto *con M. tuberculosis* [12, 14, 24, 27, 28, 33].

1.10 *Mycobacterium microti*

M. microti fue descubierto por Wells en 1937 durante sus investigaciones sobre las especies de microorganismos que infectan al ratón de campo *Microtus agrestis*. En un principio se le clasificó como *M. tuberculosis* subespecie *muris*, sin embargo, actualmente se le conoce como *M. microti* y se le clasifica dentro del complejo *M. tuberculosis* ya que causa una infección pulmonar caseosa diseminada en los ratones de campo (voles) [47].

Este microorganismo crece en forma de "S", la cual se pierde al cultivarla *in vitro* [25, 44]. Mediante la comparación de las secuencias 16S ARNr y *gyrB* se encontró que *M. microti* es filogenéticamente muy cercano a *M. tuberculosis* ya que tiene 99.9 % de similitud (Figura 8) [7, 26].

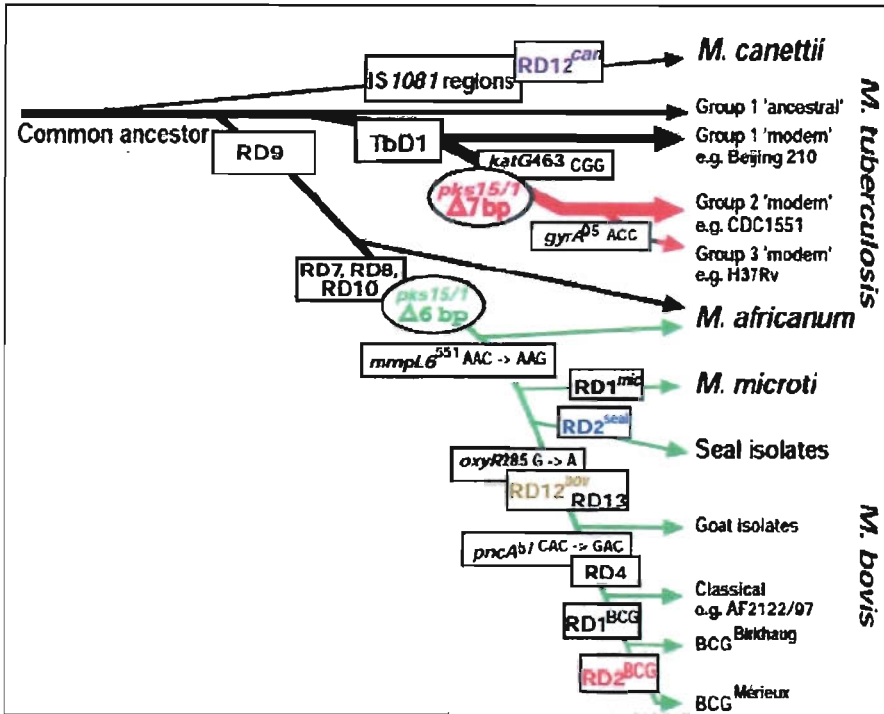


Figura 8. Árbol filogenético del género *Mycobacterium*, construido por análisis de secuencias *katG*, *gyrA*, *oxyR*, *pncA*, *mmpL6*. En el esquema se puede observar las regiones perdidas (RD) en las especies del complejo *M. tuberculosis*.

Debido a que es una especie patógena específica de roedores de campo, en la segunda mitad del siglo XX se exploró su utilidad como vacuna en un ensayo clínico en el que fueron vacunados aproximadamente 10,000 personas entre 1946 y 1961, demostrando ser inmunogénica, protectora y segura. En Checoslovaquia se administró como vacuna por vía intradérmica entre 1951 y 1969 a alrededor de 500,000 personas, principalmente recién nacidos y, se observó una protección de aproximadamente el 75 %. En un ensayo realizado por la British Medical Research Council (entre 1950 y 1952) se comparó la eficacia protectora de *M. microti* con

la vacunación con BCG y se encontró que ambas vacunas brindaron 77% de protección. Debido a estos resultados se empleó de forma exitosa como vacuna en Checoslovaquia y Gran Bretaña. Sin embargo, se descartó su uso debido a las reacciones cutáneas de aspecto lupoides que se presentaron aunque de forma infrecuente (3 a 17 %) en las personas vacunadas. EL grupo involucrado en estos estudios prefirió discontinuar la vacunación [10, 11, 35, 47].

Dado que *M. microti* es filogenéticamente muy cercano a *M. tuberculosis*, desencadena una respuesta inmune protectora contra la tuberculosis comparable a la conferida por la BCG, además de no ser patógena para el humano, hacen que hoy en día aun se considera la posibilidad de evaluarlo como un buen candidato a vacuna. Diversos estudios evaluaron vías alternativas de administración de *M. microti* para evitar las reacciones secundarias y de esta manera no discontinuar su uso como vacuna. En ensayos con ratones se observó que al administrar *M. microti* por vía oral se logró la mayor protección en comparación con la BCG administrada subcutáneamente. También se demostró que la administración intranasal de *M. microti* confiere mayor protección a los ratones, comparada con la vacunación subcutánea con BCG [14, 49].

Las ventajas de *M. microti* son su atenuación natural y su habilidad de mantener su inmunogenicidad mediante la infección con esta cepa de ratón de campo.

En ensayos comparativos de los genomas de los miembros del complejo *M. tuberculosis* se encontró la pérdida de la región RD1 en *M. microti* y en BCG, la cual probablemente contribuye a la virulencia de cepas como *M. tuberculosis* y *M. bovis*. En un ensayo en el que se complementó a una cepa de *M. microti* con la región RD1 se observó un cambio morfológico y, al administrarla a ratones SCID se incrementó la formación de granulomas y se produjo esplenomegalia [10, 19, 20, 36, 37, 42].

2. Justificación

La variación de la vacuna BCG en el control de la tuberculosis que va de 0 % a 80 %, hace necesario desarrollar vacunas más eficaces. Dentro de las alternativas exploradas, destacan las cepas recombinantes que expresan antígenos inmunodominantes de *M. tuberculosis*, para lo cual se emplean cepas filogenéticamente relacionadas a *M. tuberculosis*, como *M. microti* que además no es patógena para el humano. Por lo que la recombinación de *M. microti* con el antígeno inmunodominante 85B (Rv1886c) es una alternativa viable para su posterior evaluación como vacuna contra la tuberculosis.

3. Objetivo

Construir una cepa de *Mycobacterium microti* recombinante con el gen Rv1886c (Antígeno 85B) de *Mycobacterium tuberculosis*.

4. Material y Metodología

4.1 Diseño de los iniciadores

Para clonar el gen que codifica para la proteína de 30-kDa (Rv1886c), se diseñaron iniciadores con sitios de corte para las endonucleasas de restricción *EcoRI* y *HindIII*, a partir de la secuencia reportada del genoma de *M. tuberculosis* H37Rv (Figura 9).

Secuencia	Iniciador
5'- GGCT GAATTC ATGACAGACGTGAGCCGAAA -3'	30kDa1
3'- CAAGCAATCCGCGGCCGACT TTCGAA GCGC -5'	30kDa2

Figura 9.

Secuencia de los iniciadores 30kDa1 y 30kDa2. En la secuencia se indican los codones de inicio y término del gen Rv1886c con letra en cursiva y negritas. Las secuencias enmarcadas en negro corresponden a los sitios de corte para las enzimas *EcoRI* y *HindIII*.

Los iniciadores, incluyeron el codón de inicio (ATG, metionina) y codón de término, de la secuencia reportada para el gen.

4.2 Amplificación del gen Rv1886c por PCR

El gen Rv1886c se amplificó a partir de DNA de *M. tuberculosis* H37Rv. 2 µL del templado de DNA fueron adicionados a un cóctel de PCR que contiene: solución amortiguadora 1X (200mM Tris-HCl pH 8.4, 500mM KCl), cloruro de

magnesio 1.5 mM, dNTP's 0.2 mM, 0.2 μ M de los iniciadores y 2.5 unidades de Taq polimerasa. El gen se amplificó durante 30 ciclos constituidos por: desnaturalización a 94° C, alineación de los iniciadores a 55° C y extensión a 72° C.

El producto de PCR se visualizó por electroforesis en gel de agarosa al 2% durante 1 h a 100 volts en solución amortiguadora de Tris-Borato-EDTA (TBE) al 0.5X, teñido con bromuro de etidio.

La banda de DNA correspondiente al gen se purificó utilizando el kit comercial de GeneClean (BIO101, La Jolla, CA), siguiendo las instrucciones del proveedor. En breve: la banda de DNA se cortó del gel de agarosa, se colocó en un tubo eppendorf. Posteriormente se adicionó una solución de NaI (100 μ L por cada 0.1 mg de agarosa) y 0.5 volúmenes de solución amortiguadora de Tris-EDTA (TE). Para fundir la agarosa el tubo se incubó por 3 min a 60° C y se mezcló periódicamente por inversión. Finalmente se adicionó la resina (glass milk) y se incubó en hielo 5 min, mezclando por inversión cada minuto. Después de incubar se centrifugó 1 min a 14,000 rpm, se decantó el sobrenadante y la resina se lavó tres veces con solución de lavado para finalmente eluir el ADN adicionando agua para PCR y calentando de la suspensión por 10 min a 45° C.

4.3 Clonación del gen Rv1886c en el plásmido pMV261

El gen Rv1886c fue clonado en el plásmido pMV261 (Figura 10), el cual fue previamente extraído por lisis alcalina de la cepa de *E. coli* DH5 α (Apéndice) y purificado por precipitación con acetato de amonio, de la siguiente manera: se adicionó un $\frac{1}{4}$ de volumen de acetato de amonio 10 M (concentración final de 2 M) y mezcló. Posteriormente, se adicionaron 2 volúmenes de etanol absoluto y se incubó en hielo por 10 min. El DNA se recuperó por centrifugación a 10,000 X g,

durante 10 min a 4° C, se lavó con etanol al 70 %, el DNA se secó y se resuspendió en agua para PCR.

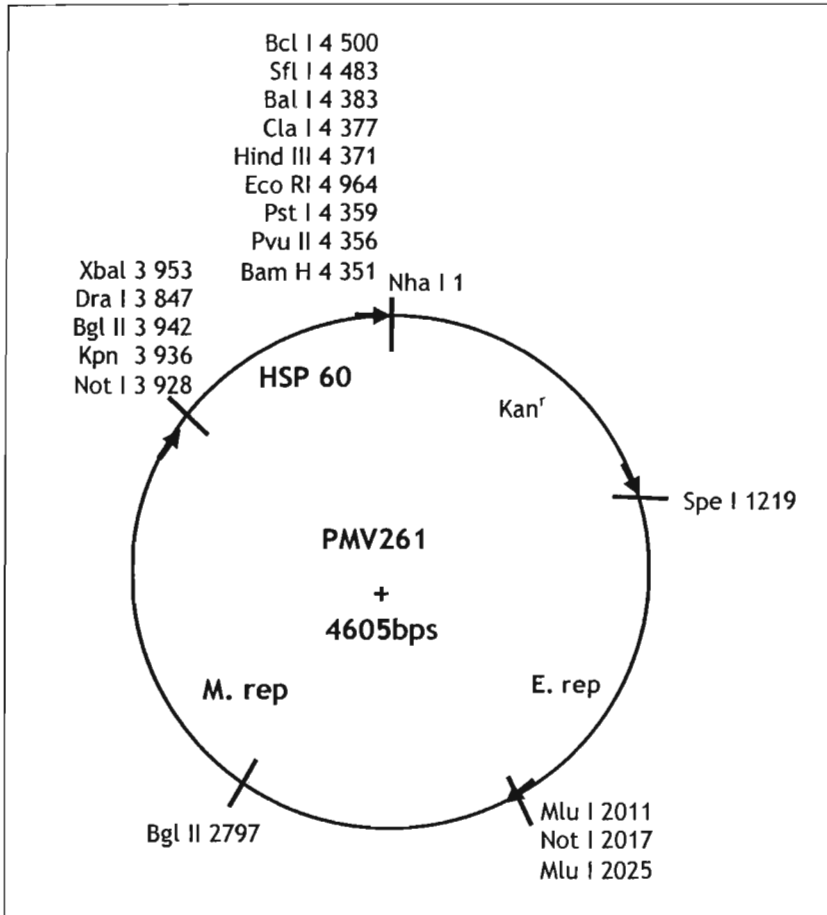


Figura 10. Mapa del plásmido de expresión pMV261. El plásmido tiene sitios de replicación para *E. coli* y para micobacterias, sitios de clonación múltiple, el promotor HSP60 y un cassette de resistencia a kanamicina.

Para la clonación del pPCR del gen Rv1886c en el plásmido pMV261, ambos fueron digeridos con las enzimas *EcoRI* y *HindIII* toda la noche a 37° C. Al término de la digestión, ambas muestras se purificaron por precipitación con acetato de amonio como se describió anteriormente y se mezclaron en una proporción 1:3 para ser ligados con la T4 DNA ligasa (1 U) siguiendo las recomendaciones del proveedor.

4.4 Preparación de *Escherichia coli* DH5- α competentes

La cepa *E. coli* DH5- α fue sembrada en medio luria y se incubó a 37° C por 24 horas, posteriormente, se seleccionó una colonia con la cual se inocularon 5 mL de caldo luria que fueron incubados a 37° C por 2 h a 300 rpm. El cultivo se vertió en 100 mL de caldo luria y se incubó a 37° C con agitación a 300 rpm hasta obtener una DO₅₅₀ de 0.5. Una vez alcanzada la DO, este fue centrifugado a 2,500 rpm/5 min/a 4° C. Se eliminó el sobrenadante y el paquete celular fue resuspendido con una solución conteniendo: KOAc, MgCl₂, KCl, CaCl₂ y Glicerina, pH 5.8 (Tfbl). La suspensión bacteriana, se incubó en hielo por 30 min y se centrifugó a 2,000 rpm por 5 min a 4° C. El sobrenadante se descartó y el paquete celular se resuspendió en una solución que contiene: MOPS, CaCl₂, KCl y Glicerina (Tfbl).

La suspensión bacteriana se distribuyó en volúmenes de 100 μ L e inmediatamente se congelaron en N₂ líquido. Las bacterias competentes se almacenaron a -70° C, hasta su uso.

4.5 Transformación de *Escherichia coli* DH5- α

Para transformar las *E. coli* competentes con el vector (plásmido ligado con el gen Rv1886c), gradualmente se descongeló una alícuota y se le

adicionaron 10 μL del plásmido con el cual se incubó por 30 min en hielo; posteriormente, se le dio un choque térmico a 42° C por 30 s e inmediatamente después se colocó en hielo por 2 min más. Posteriormente, se adicionan 500 μL de medio SOC y se incubó 1 h a 37° C con agitación constante a 220 rpm. Finalmente las bacterias se inocularon en agar luria con 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de kanamicina.

4.6 Identificación por PCR de clonas transformadas

Para la identificación de las bacterias transformadas con el plásmido clonado con el gen Rv1886c al cual se denominó pMV261-30kDa, las clonias seleccionadas se cultivaron en caldo luria con kanamicina 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y se les extrajo el plásmido por lisis alcalina (Apéndice). Los plásmidos extraídos se analizaron por electroforesis (1 h a 100 volts) en geles de agarosa al 1.2% (TBE al 0.5X). Posteriormente se seleccionaron las clonas que presentaban perfiles electroforeticos distintos para identificar por amplificación del gen Rv1886c por PCR, aquellas bacterias en las que se encontraba la construcción pMV261-30kDa.

4.7. Obtención de la sonda Sr30

Para identificar los plásmidos clonados con el gen Rv1886c se generó una sonda para hibridar el gen en las construcciones preparadas, la cual fue denominada Sr30. La sonda se obtuvo por amplificación por PCR del gen Rv1886c, utilizando dNTP's marcados con digoxigenina.

El producto de PCR se purificó por precipitación con acetato de amonio y a partir de éste se hicieron diluciones decimales seriadas, las cuales se utilizaron para preparar una membrana para hibridación. En la misma membrana se colocaron diluciones decimales seriadas de un estándar de concentración

conocida (5 ng/ μ L), se reveló y de esta forma, por comparación se obtuvo el título de la sonda, como se presenta a continuación:

Sonda	→	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
Estándar	→	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}

Después de colocar en la membrana las diluciones de la sonda y del estándar, el DNA se fijó a esta por exposición a luz UV. Posteriormente, la membrana se colocó en amortiguador de malatos pH 7.5 (Tris-HCl 100 mM, NaCl 150 mM) 1 a 2 min a temperatura ambiente y los sitios de unión inespecífica fueron bloqueados incubando la membrana en la solución de bloqueo (reactivo de bloqueo para DNA al 2% en amortiguador de malatos) por 30 min a temperatura ambiente. En seguida se colocó en solución de bloqueo más anticuerpo anti-digoxigenina marcado con fosfatasa alcalina (dilución 1:5000), 30 min a temperatura ambiente. Se eliminó el exceso de anticuerpo haciendo dos lavados en la solución de malatos por 15 min, cada uno y un lavado más en la solución de revelado pH 9.5 (Tris-HCl 100 mM, NaCl 100 mM, $MgCl_2$ 50 mM) por 5 min. Se reveló con una solución que contenía solución de revelado, nitroazul de tetrazolio (NBT) y 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato (X-fosfato), incubando en la oscuridad por unos minutos. El revelado se detuvo eliminando de la membrana el exceso del sustrato con agua corriente y se preservó la membrana secándola.

El título se obtuvo mediante la comparación de la intensidad de las marcas obtenidas con la sonda y con el estándar, multiplicando por el inverso de la dilución en la que la intensidad de la marca de la sonda coincidió con una de las concentraciones conocidas del estándar.

La sonda se empleó en una dilución de 1: 200 para la hibridación con la construcción del plásmido.

4.8 Hibridación de Rv1886c

Para realizar la hibridación se preparó la membrana con el DNA extraído de las clonas seleccionadas; como control positivo se empleó el gen Rv1886c y el control negativo fue solo el plásmido PMV261.

El DNA de las muestras seleccionadas se desnaturalizó por calentamiento a 96° por 10 min e inmediatamente se colocaron en hielo por 5 min. Posteriormente, se colocó una alícuota del ADN en la membrana y se fijó a ésta con luz UV.

La membrana se prehibridó por 1 h a 42° C con solución de prehibridación (SSC 2x, reactivo de bloqueo 10x, sarcosinato, SDS 10%, reactivo de Denhart 50x) y posteriormente se hibridó toda la noche a 42° C con una solución de sonda/solución de prehibridación (1:200). Para eliminar la hibridación inespecífica del DNA, al día siguiente se lavó la membrana con solución SSC 2x-SDS 0.1% y se incubó en esta solución durante 50 min a 50° C. El revelado se realizó como en la titulación de la sonda.

De las colonias transformadas con la construcción pMV261-30kDa que fueron identificadas por PCR e hibridación, se seleccionó una y se cultivó masivamente en medio luria con kanamicina, para extraer la construcción pMV261-30kDa por el método de lisis alcalina (Apéndice), purificarla por precipitación con acetato de amonio y utilizarla en la transformación de células electrocompetentes de *M. microti*.

4.9 Transformación de *Mycobacterium microti*

Para transformar la cepa de *M. microti* ATCC 11156, primero se prepararon células competentes de ésta. Para lo cual se cultivó la cepa en medio

7H9 con Tween 80 y con ADC al 10 %, por 20 días, con agitación a 37° C. Transcurrido este tiempo, se cosechó el cultivo por centrifugación a 3,500 rpm por 15 min a 4° C. Las bacterias se cosecharon por centrifugación a 5000 x g. El precipitado se resuspendió inicialmente en un volumen igual al original con solución estéril de agua con glicerol (Sigma, USA) al 10 %, posteriormente se redujo el volumen original a la mitad del anterior hasta concentrar las bacterias 50 veces. La suspensión resultante se dividió en alícuotas de 100 µl que fueron congeladas en N₂ y almacenadas a -70° C hasta su uso.

Las células competentes que se obtuvieron, se transformaron con la construcción pMV261-30kDa por electroporación. Para lo cual se colocó en un tubo eppendorf una alícuota de la construcción PMV261-30kDa y otra de células competentes, en relación 1:9, se incubó en hielo por 30 min y posteriormente las alícuotas se colocaron en cubetas especiales en las que se les aplicó uno o varios pulsos eléctricos empleando las condiciones que se presentan en la tabla 2.

1.8 V	2.5 V
1 pulso	1 pulso
3 pulsos	3 pulsos

Tabla 2.
Condiciones estandarizadas para transfectar a *M. microti*.

Después de la electroporación a cada tubo se le adicionó medio 7H9, hasta completar 1mL y se incubó a 37° C toda la noche. A la mañana siguiente las bacterias se cultivaron en medio 7H10 adicionado con OADC al 10 % y kanamicina (30 µg/mL) para seleccionaron a las bacterias transformadas.

4.10 Identificación de las clonas de *Mycobacterium microti* transformadas

La transformación de *M. microti* fue comprobada mediante la selección de una colonia para cultivarla en medio 7H9 con kanamicina y posteriormente realizar la extracción de DNA, con el método de lisozima y proteinasa K (Apéndice). Para lo cual, las bacterias se cosecharon por centrifugación a 3,500 rpm por 15 min y el paquete celular se resuspendió en 100 μ L de TE.

Con el DNA extraído se realizó una electroforesis (100V por 1 h) en gel de agarosa al 1.2 % en TBE al 0.5X, para verificar la presencia de la construcción en las micobacterias.

4.11 Expresión del antígeno 85B en *Mycobacterium microti*

Para corroborar la expresión del antígeno 85B se extrajeron las proteínas de *M. microti* recombinada y sin recombinar (control) y se analizaron por electroforesis en gel de acrilamida (SDS-PAGE) e inmunodot.

4.11.1 SDS-PAGE

Las proteínas de *M. microti* se obtuvieron de un cultivo de 20 días en medio 7H9 suplementado con Tween 80, kanamicina (30 μ g/mL) y 10 % de ADC, mantenido a 37° C y agitación constante. Los cultivos de *M. microti* se cosecharon por centrifugación a 3,500 rpm por 15 min a 4° C. Los paquetes celulares se lavaron tres veces en agua desionizada estéril y centrifugando a 3,500 rpm por 15 min a 4° C. Al término los tubos se pesaron y por diferencia se obtuvo el peso húmedo de los paquetes celulares. Éstos se resuspendieron en agua desionizada estéril para obtener una concentración final de 20 mg/mL.

De cada una de las suspensiones bacterianas se tomó 1mL que fue depositado en un tubo de vidrio estéril, en el cual fueron sonicadas con la punta de 2mm de diámetro, aplicando 15 pulsos de 100mV (1min encendido/1min apagado). Durante la sonicación se adicionó en dos ocasiones el inhibidor de proteasas PMSF (concentración final 10 mM), una después del tercer pulso y la otra después del décimo pulso.

Al término de la sonicación, se recuperó la suspensión y se eliminaron los bacilos no lisados y detritos de pared celular por centrifugación a 14,000 rpm por 5 min. En los sobrenadantes se cuantificaron las proteínas por espectrofotometría de luz UV, a 280nm.

Se analizaron 20 µg de proteína por electroforesis en un gel de poliacrilamida-SDS. Las proteínas se prepararon adicionando solución amortiguadora para la electroforesis (Tris-HCl pH6.8 0.5 M, glicerol, SDS 10 %, beta-mercaptoetanol, azul de bromofenol 0.1 %), se mezclaron y se calentó en un baño de agua a ebullición por 10 min.

Para la electroforesis se preparó un gel de dos fases. La fase inferior (separadora) consistió de un gel de acrialmida al 12% [Agua, Tris 0.5M-SDS 0.4% (pH 8.8), Acrilamida 30%, PSA (10µL/mL), TEMED] y la fase superior (concentradora) de gel al 4% [Agua, Tris 0.5M-SDS 0.4% (pH 6.8), acrilamida 30%, PSA (10µL/mL), TEMED].

La electroforesis se realizó a 50 volts durante una hora y posteriormente se incrementó el voltaje a 100 volts y continuó hasta que el frente de corrida de la muestra alcanzo el límite inferior del gel.

Al término de la electroforesis se colocó el gel en solución de fijación (50 % MetOH, 50 % ácido acético, 0.5 mL /L de formaldehído al 37 %) y se guardó a 4° C toda la noche. Al día siguiente se realizaron tres lavados de 20 minutos cada

uno. Después se colocó en solución de pretratamiento por 1 min (tiosulfato de sodio pentahidratado 0.2g/L) y se eliminó el exceso de éste con agua desionizada (3 lavados de 20 s). En seguida se colocó en solución de plata (nitrato de plata 2 g/L - 0.75 mL /L de formaldehído al 37 %) y se dejó 20 min en oscuridad. El exceso del reactivo se eliminó lavando 2 veces con agua desionizada (20 s por lavado).

Finalmente se reveló el gel con una solución de carbonato de sodio (60 g/L), formaldehído al 37 % (0.5mL/L) y tiosulfato de sodio pentahidratado (4 mg/L). Una vez que se visualizaron las bandas en el gel se detuvo sumergiendo el gel durante 10 min en una solución de metanol (50 %), ácido acético (12 %) y posteriormente en una solución de metanol al 50 % por un mínimo de 20 min.

4.11.2 Inmunodot

Para evidenciar la expresión de la proteína recombinante de 30-kDa en la cepa transformada, se depositaron 5 µg de extracto de proteínas en una membrana de nitrocelulosa que posteriormente fue bloqueada durante 60 minutos con leche descremada (PBS + leche en polvo 0.5 %). A continuación, se lavó durante un minuto con PBS-Tween 20 y se incubó durante 1 h a 37° C con el anticuerpo monoclonal 49T (Dilución 1:200). El exceso de anticuerpo se eliminó mediante 3 lavados con PBS-Tween 20 después de lo cual se adicionó el anticuerpo conjugado con peroxidasa utilizando el tiempo y dilución recomendadas por el fabricante. Los complejos inmunes se revelaron adicionando el sustrato (α -naftol, MeOH, H₂O₂, PBS) e incubando en oscuridad hasta que las manchas del precipitado fueron visibles. Para detener la reacción enzima-sustrato, la membrana se lavó con agua y después se secó y se almacenó protegida de la luz.

5. Resultados

5.1 Amplificación del gen Rv1886c por PCR

De acuerdo al análisis de las secuencias de los iniciadores diseñados se determinó que la temperatura de alineamiento de los iniciadores fuera de 55° C. Al analizar los pPCR por electroforesis en gel de azarosa al 2.0 % se observó un amplicón de aproximadamente 1,000 pb, correspondiente al peso molecular del gen Rv1886c reportado previamente (Figura 11).

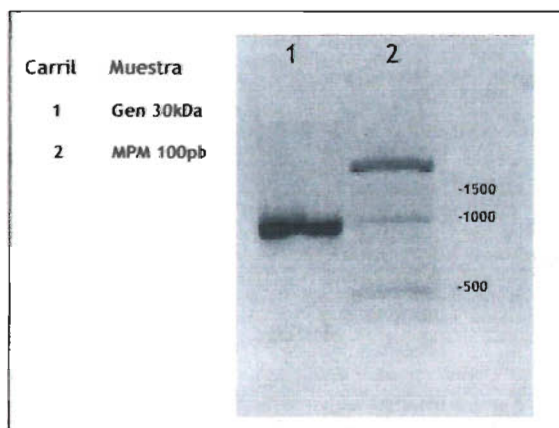


Figura 11. Producto de PCR del gen Rv1886c. El pPCR se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con Br-ET.

Para la clonación del gen Rv1886c se eliminaron los subproductos de amplificación al purificar el amplicón a partir de un gel de agarosa al 2 %.

5.2 Transformación de *Escherichia coli* DH5 α

Al transformar la cepa de *E. coli* DH5 α con el producto de ligación del plásmido y el amplicón previamente digeridos con las endonucleasas de restricción *EcoRI* y *HindI*, se obtuvo una eficiencia de 2×10^3 UFC /mg de DNA.

De las colonias obtenidas en el medio selectivo con kanamicina (50 μ g/mL), se seleccionaron de forma aleatoria 15 colonias para la extracción de plásmidos. Al analizar los plásmidos por electroforesis en gel de agarosa al 1.2 % se encontraron 2 patrones electroforéticos distintos. Para verificar la presencia del gen *Rv1886c* clonado en el vector *pMV261* se seleccionaron las clonas *Ecr8*, *Ecr11*, *Ecr13* y *Ecr14* correspondientes a los carriles 8, 11, 13 y 14 (Figura 12).

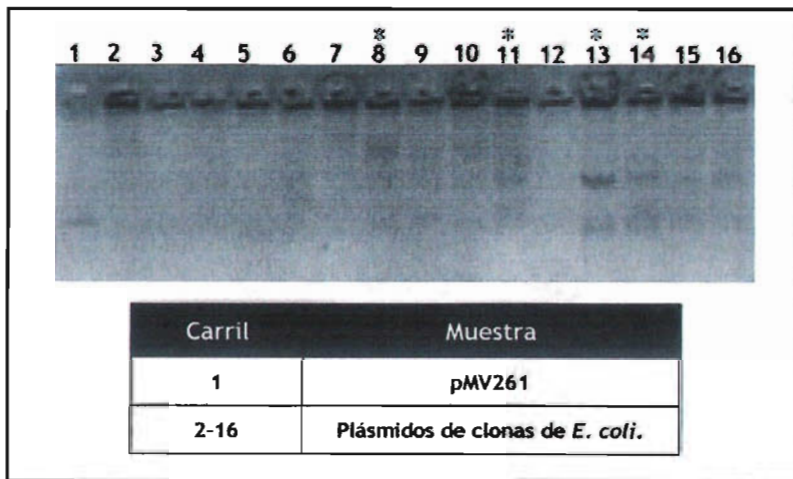


Figura 12.

Patrón electroforético de los plásmidos extraídos de las clonas de *E. coli* transformadas con la construcción *pMV261-30kDa*. El asterisco indica las clonas que potencialmente poseen la construcción *pMV261-30kDa*. Electroforesis en gel de agarosa al 1.2%, TBE 0.5X, 100V, 1h.

5.3 Identificación por PCR de clonas transformadas

En los plásmido de las clonas seleccionadas se buscó la presencia el gen Rv1886c por PCR, encontrando que en tres de las 4 clonas se amplificó un producto de 1,000 pb, correspondiente al peso molecular del gen Rv1886c, como puede observarse en la figura 13.

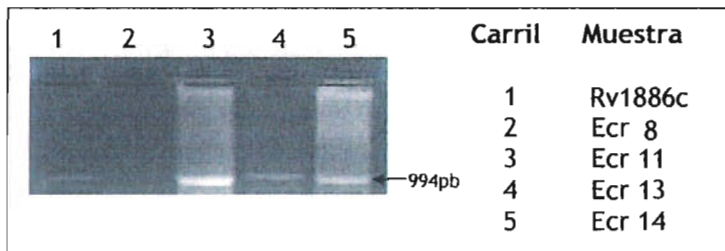


Figura 13. Detección del gen Rv1886c por PCR en las clonas Ecr8, Ecr11, Ecr13 y Ecr14. La flecha indica la posición del amplicón del gen Rv1886c. Electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con Br-Et.

5.4 Obtención de la sonda Sr30

La presencia del gen Rv1886c en las clonas Ecr11, Ecr13 y Ecr14 se confirmó por hibridación de los plásmidos extraídos de éstas, utilizando una sonda específica para el gen obtenida por la amplificación del pPCR del gen Rv1886c de *M. tuberculosis* H37Rv en la que se utilizaron nucleótidos marcados con digoxigenina.

En la titulación de la sonda Sr30 (Figura 14) la dilución 10^{-4} del estándar (5×10^{-4} ng/ μ L) coincidió con la dilución 10^{-3} de la sonda Sr30, por lo que la concentración de ésta fue:

$$(5 \times 10^{-4} \text{ ng}/\mu\text{L}) (1 \times 10^3) = 0.5 \text{ ng}/\mu\text{L}$$

Con esta concentración se determino utilizar la sonda diluida 1:200 para la hibridación de las muestras.

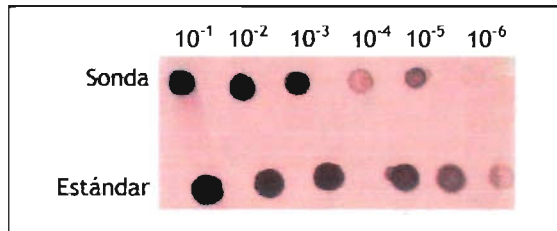


Figura 14. Determinación del título de la sonda Sr30. La primera serie corresponde a diluciones decimales seriadas de la sonda obtenida y la segunda a las diluciones del estándar.

5.5 Hibridación de Rv1886c

Al hibridar los plásmidos de las clonas Ecr8, Ecr11, Ecr13 y Ecr14 se confirmó la presencia del gen Rv1886c en las clonas Ecr11, Ecr13 y Ecr14, que previamente habían sido positivas por PCR (Figura 15 y Figura 13 respectivamente). Para la transformación de *M. microti* se seleccionó el plásmido PMV261-30 obtenido de la clona Ecr14.

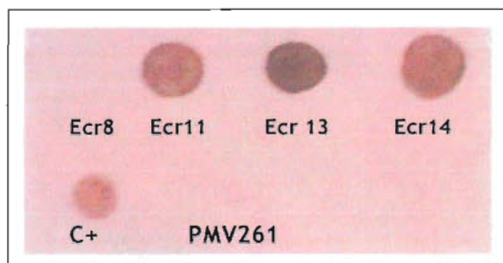


Figura 15. Hibridación de los plásmidos Ecr8, Ecr11, Ecr13 y Ecr14, se identificó la presencia del gen Rv1886c. Las manchas presentes indicaron un resultado positivo.

5.6 Transformación de *Mycobacterium microti*

Al electroporar la cepa de *M. microti* ATCC11152 se encontró que la mayor eficiencia de transformación se obtiene al aplicar 3 pulsos consecutivos de 2.5 volts cada uno (Tabla 3). Al aplicar 3 pulsos de 1.8 volts o 1 pulso de 2.5 volts no se encontraron diferencias en la eficacia de transformación. De las colonias obtenidas, se seleccionó de forma aleatoria una de ellas, para extraer el plásmido y verificar la presencia del gen Rv1886c clonado.

1.8 Volts		2.5 Volts	
1 pulso	3 pulsos	1 pulso	3 pulsos
3 colonias	5 colonias	5 colonias	8 colonias

Tabla 3. Eficiencia de transformación de *M. microti*. En la tabla se muestra el número de colonias transformadas que se obtuvieron al electroporar a *M. microti* ATCC 11152 con la construcción pMV261-30kDa utilizando diferentes condiciones.

5.7 Identificación de las clonas de *Mycobacterium microti* transformadas

El análisis de la extracción de plásmidos de la colonia de *M. microti* transformada demostró la presencia del plásmido pMV261-30kDa y que la resistencia a kanamicina no fue el resultado de alguna mutación espontánea dada por el pulso eléctrico (Figura 16). A la cepa recombinante se le denominó *Mmr30*.

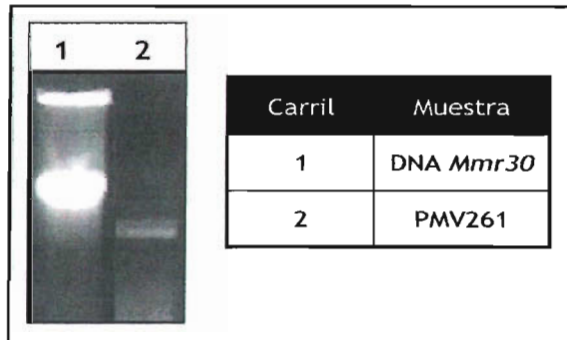


Figura 16. Plásmido extraído de *M. microti* transformada con pMV261-30kDa. En la figura se observa que la cepa transfectedada contiene un plásmido cuyo peso es mayor al del vector pMV261. Electroforesis en gel de agarosa al 1.2%, teñido con Br-Et.

5.8 Expresión del Antígeno 85B en *Mycobacterium microti*

5.8.1 SDS-PAGE

En los extractos proteicos de la cepa de *M. microti* transfectedada con la clonación pMV261-30kDa y la cepa de *M. microti* sin transfectedar, se encontró que al analizarlos por electroforesis en gel de acrilamida, únicamente en la cepa transformada se encuentra la sobre-expresión de una proteína de aproximadamente 30kDa (Figura 17).

5.8.2 Inmunodot

La expresión de la proteína de 30kDa se corroboró en ensayos de inmunodot en los que se utilizó el anticuerpo monoclonal 49T específico contra el antígeno 85B de *M. tuberculosis*. Únicamente en la cepa transformada con el plásmido clonado pMV261-30kDa se observó el reconocimiento con la proteína de 30 kDa (Figura 18).

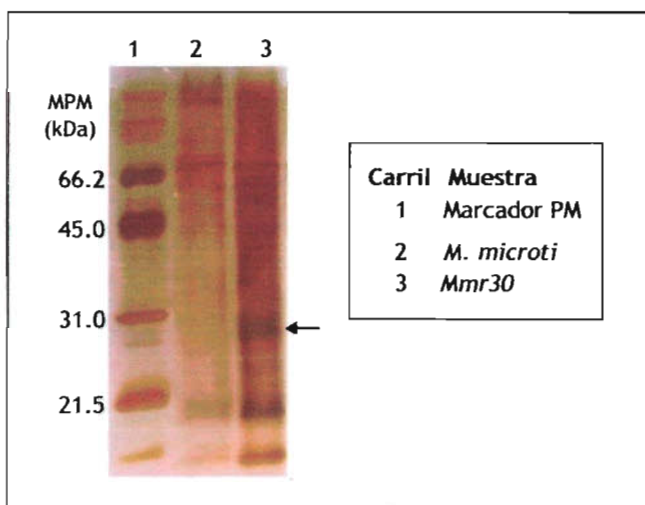


Figura 17. SDS-PAGE de *M. microti* transfectada con pMV261-30kDa. La flecha indica la banda correspondiente a la proteína de 30kDa.

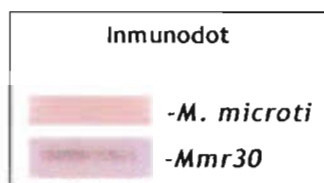


Figura 18. Inmunodot de la proteína de 30 kDa. Reactiva con anticuerpo 49T, (anti 30 kDa).

6. Discusión

La vacunación con BCG es la medida preventiva más eficiente contra la tuberculosis, sin embargo, la eficacia protectora observada en ensayos clínicos varía de 0 % a 80 %; por lo que se requiere desarrollar nuevas vacunas con mayor eficacia protectora.

En esfuerzos por alcanzar este objetivo se han explorado alternativas como las vacunas de ADN, subunidades proteicas, cepas atenuadas y cepas recombinantes. Sin embargo, la protección conferida por éstas apenas es comparable a la inducida por la vacuna BCG, con excepción de algunas cepas recombinantes de BCG, como la subcepa BCG Tice recombinada con el antígeno 85B de *M. tuberculosis* [9, 15, 28, 40].

Una de las alternativas más viables es la recombinación de cepas filogenéticamente relacionadas a *M. tuberculosis* con antígenos inmunodominantes que inducen el desarrollo de una respuesta Th1 y la generación de células T de memoria, que responden rápida y eficientemente en infecciones posteriores. Recientemente Castañón-Arreola y cols, demostraron que la vacuna recombinante rBCG38 incrementa de forma significativa la protección al ser comparado con la subcepa Tice sin recombinar en el modelo murino de tuberculosis pulmonar progresiva. Esta vacuna, basada en la subcepa Tice que fue recombinada con el antígeno inmunodominante 38-kDa, adicionalmente induce el desarrollo de una respuesta inmune Th1 caracterizada por la producción de citosina como IL-12 e IFN- γ [8, 9, 40].

En el presente trabajo se construyó una cepa recombinante de *M. microti*, debido a que filogenéticamente es más cercana a *M. tuberculosis* (99.9% de similitud en su genoma), no es patógena para el humano y en ensayos clínicos en los que fue evaluada como vacuna demostró inducir protección equiparable a la inducida mediante la vacunación con BCG. Para obtener la cepa recombinante se

clonó el antígeno inmunodominante 85B [Ag85B (proteína de 30 kDa)] en el plásmido pMV261 y con la construcción resultantes se transfectó por electroporación a una cepa de *M. microti*. Este antígeno se seleccionó debido a que en estudios previos se ha demostrado que induce inmunidad protectora en cobayos inmunizados con la proteína purificada y al ser transfectada en la subcepa BCG Tice se incrementó significativamente la eficacia de la vacuna BCG [23, 24, 27, 40].

Al diseñar iniciadores que incluyen secuencias de corte para endonucleasas de restricción distintas, además de amplificar de forma específica el gen Rv1886c, incluyendo los codones de inicio y término, al mismo tiempo se le dio direccionalidad al gen clonado para que quedara en el marco de lectura correcto y bajo el control del promotor de la proteína de choque térmico de 60kDa (*hsp60*).

Para seleccionar fácilmente el plásmido en el cual se clonó correctamente el gen Rv1886c, ésta se seleccionó transfectando una cepa de *E. coli* DH5- α con la reacción de ligación inserto-vector y evidenciando en las clona srecuperadas la presencia del gen Rv1886c por PCR e hibridación. Una vez seleccionada la clona que presentaba la construcción deseada pMV261-30kDa, ésta se purifico de forma masiva para ser utilizada en la transfección de una cepa electrocompetente de *M. microti*. De esta forma se redujo significativamente el tiempo para obtener la cepa recombinante de *M. microti*, ya que la selección de la constricción pMV261-30kDa se realizó utilizando una cepa de crecimiento rápido como *E. coli* DH5- α , aprovechando que le plásmido de expresión seleccionado presenta origen de replicación para *Escherichia* sp y *Mycobacterium* sp.

Una de las características más importantes dentro de las especies del género *Mycobacterium* es el presentar una pared celular muy gruesa y compleja que hace más difícil su transformación. La estrategia de transformación mas exitosa es la electroporación, la cual consiste en la aplicación de pulsos

eléctricos para formar poros en la pared del microorganismo y permitir el ingreso del material al interior, sin embargo, la eficiencia es mucho mas baja que en *E. coli*. Para la electroporación de *M. microti* más eficientemente se requiere la aplicación de 3 pulsos consecutivos de 2.5 V, sin embargo, también se puede transformar aplicando tan solo 1 pulso de 1.8 V obteniendo un rendimiento casi tres veces menor.

Una vez que se logró la transformación de *M. microti*, se verificó la estabilidad de la construcción pMV261-30kDa al extraer el plásmido clonado de la cepa transfectada y verificar la presencia del gen Rv1886c clonado en esta construcción.

Una vez que se verificó que la cepa de *M. microti* mantenía el plásmido clonado sin alterar su estructura, se comprobó la expresión de la proteína de 30kDa, al separar las proteínas del extracto de *M. microti* transfectada y sin transfectar por electroforesis SDS-PAGE. Únicamente en la primera se encontró un incremento en la concentración de una proteína de aproximadamente 30kDa, la cual correspondió a la expresión del antígeno 85B en la cepa de *M. microti*, como fue determinado por inmunodot con el anticuerpo monoclonal 49T específico contra este antígeno. Por lo anterior se puede concluir que se obtuvo la cepa recombinante Mmr30 que expresa el antígeno 85B de *M. tuberculosis*.

En los países en vías de desarrollo como México, en los cuales la tuberculosis es endémica y la vacunación con BCG no ha disminuido su incidencia, es fundamental el desarrollo de una nueva vacuna que sea de bajo costo y que proteja de manera eficiente contra la tuberculosis, con la aplicación de una sola dosis. La cepa recombinante Mmr30 que nosotros proponemos como candidato a vacuna contra la tuberculosis, deberá de ser caracterizada y evaluada en un modelo murino en el que se compare su eficacia protectora con la inducida por la vacuna BCG y otras vacunas recombinantes que ya han demostrado inducir mayor protección que BCG [8, 27].

Considerando las características de *M. microti*, esperamos que los resultados obtenidos al evaluar nuestra cepa recombinante sean mejores en comparación con otras cepas recombinantes y con BCG, debido a que el genoma de *M. microti* guarda mayor homología con el de *M. tuberculosis*. Además de proteger contra la tuberculosis, *M. microti* tiene la peculiaridad de ser un patógeno específico de ratones del género *Microtus* y algunas especies de mamíferos cuadrúpedos. Debido a esto se puede recuperar su virulencia residual e inmunogenicidad al infectar ratones de campo (voles), evitándose así el proceso de sobreatenuación que ocurrió en algunas subcepas BCG.

7. Conclusiones

- El diseño de los iniciadores para la amplificación del gen Rv1886c fue exitoso.
- Se construyó el plásmido pMV261-30kDa clonado con el gen Rv1886c.
- La hibridación con la sonda específica Sr30 confirmó la presencia del gen Rv1886c en el plásmido pMV261-30kDa.
- La transformación de *M. microti* con el plásmido pMV261-30kDa fue llevada a cabo de manera más eficiente con la aplicación de 3 pulsos de 2.5 volts.
- Se logró la transformación de la cepa de *M. microti* ATCC 11152 con el vector pMV261-30kDa y se le denominó Mmr30.
- Se logró la expresión del Antígeno 85B en la cepa Mmr30, la cual fue detectada por electroforesis SDS-PAGE e inmunodot.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

8. Perspectivas

- Determinar la seguridad y tiempo de eliminación de Mmr30 en modelos animales.
- Caracterizar la repuesta inmune inducida por Mmr30 en modelos animales.
- Evaluar la eficacia protectora de la cepa Mmr30 en modelos animales susceptibles y resistentes a la infección con *M. tuberculosis* H37Rv.
- Evaluar la eficacia protectora de la vacuna en modelos retados con cepas tipo y con aislamientos clínicos representativos de la epidemiología mundial, siempre en comparación con la vacunación con BCG.

9. Bibliografía

1. **Agger EM, P Andersen.** A novel TB vaccine; towards a strategy based on our understanding of BCG failure. *Review Vaccine* 2002;21:7-14.
2. **Alamelu Raja.** Immunology of tuberculosis, Review Article. *Indian J Med Res* 2004;120:213-232.
3. **Andersen Peter.** TB vaccines: progress and problems. *TRENDS Immunol* 2001;22:160-168.
4. **Báez-Saldaña AR.** Epidemiología de la tuberculosis en México. *Salud pública de México* 2003;43:3-6.
5. **Behr MA, PM Small.** A historical and molecular phylogeny of BCG strains. *Vaccine* 1999;17:915-922.
6. **Brodin P, Karin Eiglmeier, Magali Marmiesse, A Billault, T Garnier, S Niemann, ST Cole, R Brosch.** Bacterial Artificial Chromosome-Based Comparative Genomic Analysis Identifies *Mycobacterium microti* as a Natural ESAT-6 Deletion Mutant. *Infect Immun* 2002;70:5568-5578.
7. **Brosch R, SV Gordon, M Marmiesse, P Brodin, C Buchrieser, K Eiglmeier, T Garmier, C Gutierrez, G Hewinson, K Kremer, LM Parsons, AS Pym, S Samper, D van Soolingen, ST Cole.** A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *PNAS USA* 2002;99:3684-3689.
8. **Castañón-Arreola Mauricio, López-Vidal Yolanda, Espitia-Pinzón Clara, Hernández-Pando Rogelio.** A new vaccine against tuberculosis shows greater protection in a mouse model with progressive pulmonary tuberculosis. *Tuberculosis* 2005;85:115-126.
9. **Castañón-Arreola Mauricio, Yolanda López-Vidal.** A second-generation anti TB vaccine is long overdue. *Review Ann Clin Microb* 2004;3(1):10.
10. **Cavanagh R, M Begon, M Bennett, T Ergon, IM Graham, PEW de Haas, CA Hart, M Koedman, K Kremer, X Lambin, P Roholl, D van Soolingen.** *Mycobacterium microti* Infection (Vole Tuberculosis) in Wild Rodent Populations. *J Clin Microbiol* 2002;40:3281-3285.

11. **D'Arcy HP, I Sutherland.** BCG and vole bacillus vaccines in the prevention of tuberculosis in adolescence and early adult life. *Brit Med J* 1997;2:293-295.
12. **Daffé Mamadou.** The mycobacterial antigens 85 complex-from structure to function and beyond. *Trends Microbiol* 2000;8:438-440.
13. **De la Parte-Pérez M, MP Hurtado, M Rivera.** Tuberculosis en el nuevo milenio. *Revista de La Facultad de Medicina* 2001;24:104-119.
14. **Devi KR, Kumar KS, Ramalingam B, Alamelú R.** Purification and Characterization of Three Immunodominant Proteins (38, 30, and 16 kDa) of *Mycobacterium tuberculosis*. *Protein Expression and Purification* 2002;24:188-195
15. **Dhar Neeraj, Vivek Rao, Anil K Tyagi.** Skewing of the Th1/Th2 responses in mice due to variation in the level of expression of an antigen in a recombinant BCG system. *Immunol Letters* 2003;88:175-184.
16. **Dhar Neeraj, Vivek Rao, Anil K. Tyagi.** Recombinant BCG approach for development of vaccines: cloning and expression of immunodominant antigens of *M. tuberculosis*. *FEMS Microbiology Letters* 2000;190:309-316.
17. **Doherty TM.** New vaccines against tuberculosis. *Tropical Medicine and International Health* 2004;9:818-826.
18. **Fine PEM, LC Rodríguez.** Modern Vaccines. *Mycobacterial diseases. Lancet* 1990;335:1016-1020.
19. **Frota CC, DM Hunt, RS Buxton, L Rickman, J Hinds, K Kremer, D Soolingen, MJ Colston.** Genome structure in the vole bacillus, *Mycobacterium microti*, a member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex with a low virulence for humans. *Microbiology* 2004;150:1519-1527.
20. **Garcia-Pelayo MC, Caimi KC, Inwald JK, Hinds J, Bigi F, Romano MI, van Soolingen D, Hewinson RG, Cataldi A, Gordon SV.** Microarray analysis of *Mycobacterium microti* reveals deletion of genes encoding PE-PPE proteins and ESAT-6 family antigens. *Tuberculosis.* 2004;84:159-66.

21. **García-Sancho Figueroa María CE.** Respuesta inmune a la infección por *Mycobacterium tuberculosis*. Una revisión de la literatura. Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias 2001;14:114-128.
22. **Grange JM, Zumla A.** The global emergency of tuberculosis: what is the cause? J R Soc Health 2002;122:78-81.
23. **Harald G Wiker, Morten Harboe.** The antigen 85 complex: a major secretion product of *Mycobacterium tuberculosis*. Microbiol Rev 1992;56:648-661.
24. **Harth G, BY Lee, J Wang, DL Clemens, MA Hortwitz.** Novel Insights into the Genetics, Biochemistry, and Immunocytochemistry of the 30-Kilodalton Major Extracellular Protein of *Mycobacterium tuberculosis*. Infect Immun 1996;64:3038-3047.
25. **Hawgood BJ.** Doctor Albert Calmette: founder of antivenomous serotherapy and of antituberculous BCG vaccination, Review Toxicon 1999;37:1241-1258.
26. **Hiroaki Kasai, Takayuki Ezaki, Shigeaki Harayama.** Differentiation of phylogenetically related slowly growing Mycobacteria by their *girB* sequences. J Clin Microbiol 2000;38:301-308.
27. **Horwitz MA, G Harth, BJ Dillon, Maslesa-Galic' S.** Recombinant bacillus Calmette-Guérin (BCG) vaccines expressing the *Mycobacterium tuberculosis* 30kDa major secretory protein induce greater protective immunity against tuberculosis than conventional BCG vaccines in a highly susceptible animal model. Microbiol 2000;97:13853-13858.
28. **Horwitz MA, Günter Harth.** A New Vaccine against Tuberculosis Affords Greater Survival after Challenge than the Current Vaccine in the Guinea Pig Model of Pulmonary Tuberculosis. Infect Immun 2003;71:1672-1679.
29. **Ian Orme.** Adaptive immunity to mycobacteria. Curr Opin Microbiol 2004;7:58-61.
30. **Jawetz, E Melnick, Joseph L.** Microbiología Médica. 16ª edición. Editorial El Manual Moderno. México. 1999. 343-352.

31. **JoAnne L Flynn, Joel D Ernst.** Immune responses in tuberculosis. *Current Opinion in Immunology* 2000;12:432-436.
32. **JoAnne L Flynn, John Chan.** Immunology of tuberculosis. *Annu Rev Immunol* 2001;19:93-129.
33. **Kremer L, WN Maughan, LG Dover, GS Besra.** The M. tuberculosis antigen 85 complex and mycolyltransferase activity. *Lett Appl Microbiol* 2002;34:233-237.
34. **Lihao Chen, Jun Wang, Anna Zganiacz, Zhou Xing.** Single Intranasal Mucosal *Mycobacterium bovis* BCG Vaccination Confers Improved Protection Compared to Suncutaneous Vaccinatuon against Pulmonary Tuberculosis. *Infect Immun* 2004;72:238-246.
35. **Manabe YC, CP Scott, WR Bishai.** Naturally Attenuated, Oraly Administered *Mycobacterium Microti* as a Tuberculosis Vaccine Is Better than Subcutaneous *Mycobacterium bovis* BCG. *Infect Immun.* 2002;70:1556-1570.
36. **Marmiesse Magali, Priscille Brodin, Carmen Buchrieser, C Gutierrez, M Simoes, V Vincent, P Glaser, ST Cole, R Brosch.** Macro-array and bioinformatic analyses reveal mycobacterial 'core' genes, variation in the ESAT-6 gene family and new phylogenetic markers for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Microbiology* 2004;150:483-496.
37. **Mostowy S, Cleto C, Sherman DR, Behr MA.** The *Mycobacterium tuberculosis* complex transcriptome of attenuation. *Tuberculosis* 2004;84:197-204.
38. **Niemann S, Elvira Richter, Helga Dalügge-Tamm, H Schlesinger, D Graupner, B Königstein, G Gurath, U Greinert, SR Gerdes.** Two Cases of *Mycobacterium microti*-Derived Tuberculosis in HIV-Negative Immunocompetent patients. *Emerg Infect Dis* 2000;6:539-542.
39. **North RJ, Yu-Jin Jung.** Immunity to Tuberculosis. *Annu Rev Immunol* 2004;22:599-623.
40. **Ohara Naoya, Takeshi Yamada.** Recombinant BCG vaccines. *Review Vaccine* 2001;19:4089-4098.

41. Pacheco CR, VV Rinza, N Badillo. Vacuna del Bacilo de Calmette y Guérin (BCG). Vacunas, Ciencia y Salud. 1998. pág. 187-201.
42. Pym AS, P Brodin, R Brosch M Huerre, ST Cole. Loss of RD1 contributed to the attenuation of the live tuberculosis vaccines *Mycobacterium bovis* BCG and *Mycobacterium microti*. Molec Microbiol 2002;46:709-717.
43. Rao V, N Dhar, AK Tyagi. Modulation of Host Immune Responses by Overexpression of Immunodominant Antigens of *Mycobacterium tuberculosis* in Bacille Calmette-Guérin. Scan J Immunol 2003;58:449-461.
44. Raviglione MC. The TB epidemic from 1992 to 2002. Tuberculosis 2003;83:4-14.
45. Stover CK, VF de la Cruz, TR Fuerst, JE Burlein, LA Benson, LT Bennett, GP Bansal, JF Young, MH Lee, GF Hatfull, SB Snapper, RG Barletta, WR Jacobs, BR Bloom. New use of BCG for recombinant vaccines. Nature 1991;351:456-460.
46. Tay Zavala J. Microbiología y Parasitología Médicas. 2ª edición. Méndez Editores. México, 1995. pág. 1,320-1,334.
47. Wells AQ, JAH Wylie, D Phil. Vaccination against tuberculosis with the vole bacillus. Brit Med Bull 1954;10:96-100.
48. Wolfgang K, MP Willett, DB Amos. Microbiología de Zinsser. 20ª edición. Editorial Médica Panamericana. Argentina, 1994. Pág. 684-703.
49. World Health Organization. Tuberculosis. 53 sesión del Comité Regional. Septiembre 2002.

APÉNDICE

Extracción de DNA por lisis alcalina

1. Tomar una asada de la cepa y resuspender en 100 μ L de solución TE previamente enfriada.
2. Agregar 200 μ L de solución de lisis (NaOH 0.2N, SDS 1%) y mezclar.
3. Adicionar 150 μ L de la solución de acetato de potasio 5M, pH 3.5, mezclar suavemente y dejar reposar en hielo 5 minutos.
4. Centrifugar a 14,000 rpm, 5 minutos. Recuperar el sobrenadante a un tubo nuevo.
5. Adicionar 2.5 volúmenes de etanol absoluto a 4° C, mezclar.
6. Incubar a 4° C por 5 minutos.
7. Centrifugar a 14,000 rpm 10 minutos, eliminar sobrenadante.
8. Lavar con 0.5 mL de etanol al 70% frío.
9. Resuspender, centrifugar a 14,000 rpm 5 minutos, eliminar sobrenadante y repetir el lavado.
10. Eliminar sobrenadante, dejar secar por 10 min.
11. Adicionar 50 μ L de agua para PCR.
12. Se almacena a -20° C, hasta su uso.

Extracción de DNA por lisozima/Proteínasa K

1. Inactivar las bacterias con azida de sodio 0.01%.
2. Cosechar las bacterias por centrifugación a 3,500 rpm, 15 minutos.
3. Congelar el paquete celular por 4 horas a -20° C.
4. Resuspender el paquete celular en 50µL de TE.
5. Adicionar un volumen igual de cloroformo/metanol (2:1) y agitar por 5 minutos.
6. Centrifugar a 3,500 rpm por 20 minutos y eliminar las fases orgánica y acuosa.
7. Incubar el tubo destapado a 55° C por 10 a 15 minutos.
8. Adicionar 50 µL de TE resuspender en vórtex.
9. Adicionar 5 µL de Tris-HCl pH9.0.
10. Adicionar lisozima a una concentración final de 100 µg/mL e incubar a 37° C por 12 a 16 horas.
11. Adicionar 0.1 volumen de SDS al 10% y 0.01 volumen de proteínasa K (10 mg/mL), homogeneizar e incubar a 55° C por 3 horas.
12. Adicionar un volumen de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1), homogeneizar por 30 minutos y centrifugar a 12,000 X g por 30 minutos.
13. Recuperar la fase acuosa y adicionar un volumen de cloroformo/alcohol isoamílico (42:1), homogeneizar por 30 minutos y centrifugar a 12,000 X g por 30 minutos.
14. Recuperar la fase acuosa.
15. Precipitar el DNA adicionando 0.1 volumen de acetato de sodio 3 M, pH 5.2 y un volumen de isopropanol. Incubar a 4° C por una hora.
16. Centrifugar a 12,000 X g por 30 minutos y lavar la pastilla con etanol al 70% (dos lavados).
17. Secar la pastilla y resuspenderla en 100 µL de TE ó agua para PCR.
18. Almacenar a -20° C, hasta su uso.