

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN
SALVADOR ZUBIRÁN**

**ASOCIACIÓN ENTRE MUTACIONES EN EL GEN *PKS 15/1* Y
CAPACIDAD DE PROGRESIÓN DE AISLADOS CLÍNICOS DE
*MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS***

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS MÉDICAS

ALUMNO:

ARTURO GALINDO FRAGA

TUTOR:

DR. LUIS ALFREDO PONCE DE LEÓN GARDUÑO
INVESTIGADOR TITULAR
LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA CLÍNICA
DEPARTAMENTO DE INFECTOLOGÍA, I.N.C.M.N.S.Z.

ASESORES:

DR. JOSÉ SIFUENTES OSORNIO
JEFE DEL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA CLÍNICA
DEPARTAMENTO DE INFECTOLOGÍA, I.N.C.M.N.S.Z.

DRA. MIRIAM BOBADILLA DEL VALLE
INVESTIGADOR TITULAR
LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA CLÍNICA
DEPARTAMENTO DE INFECTOLOGÍA, I.N.C.M.N.S.Z.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

INDICE

Resumen.	2
Introducción.	3
Antecedentes.	4
Justificación.	13
Hipótesis.	14
Objetivos.	14
Material y métodos.	15
Aspectos éticos y de bioseguridad.	19
Resultados.	20
Discusión.	21
Conclusiones.	24
Anexos	
1. Población.	25
2. Cálculo del tamaño de la muestra.	26
3. Definición de variables.	27
4. Métodos de laboratorio.	28
Figuras y Tablas.	32
Presentaciones y reconocimientos.	37
Referencias.	39

RESUMEN

Antecedentes: Algunos de los lípidos producidos por *Mycobacterium tuberculosis* modifican la respuesta inmunológica del hospedero. La producción de una variedad de ellos, los fenolglícolípidos (phenolglycolipids, PGL) por algunas cepas se ha asociado a una enfermedad rápidamente progresiva y con muerte temprana en modelos animales. Para la producción de PGL, es necesario el gen *pk15/1* íntegro.

Métodos: Obtuvimos aislados de pacientes con tuberculosis pulmonar, y formamos dos grupos: A. Este grupo estuvo conformado por aislados con un patrón del polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción (RFLP) igual, indicativo de enfermedad de infección reciente y progresión rápida a enfermedad. B. Aislados con un patrón de RFLP único, los cuales definimos como enfermedad por reactivación. Amplificamos por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y secuenciamos un segmento polimórfico descrito en el gen *pk15/1*. Utilizamos como controles, para el gen íntegro, a cepas W/Beijing, y para las diferentes mutaciones descritas, a las cepas H37Rv, CDC1551 y BCG.

Resultados: Nuestra prueba de PCR amplificó la región deseada. La secuencia de las cepas control mostró las deleciones o la secuencia silvestre como han sido descritas en la literatura. Posteriormente, estudiamos 24 aislados clínicos, 13 (54.1%) en el grupo de enfermedad por reactivación, y 11 (44.9%) en el grupo de progresión rápida. Encontramos el gen silvestre en 2 aislados (18.1%) del primero, y en 3 (23%), del segundo grupos. La razón de productos cruzados calculada fue de 0.74 (IC95% 0.1-5.4, p01). Estos aislados posteriormente fueron caracterizados como pertenecientes al grupo W/Beijing.

Conclusión: No encontramos asociación entre la progresión rápida a enfermedad y la integridad del gen *pk15/1*, aunque debe considerarse que la prevalencia de cepas del grupo W/Beijing en México es baja.

INTRODUCCIÓN

Actualmente, *Mycobacterium tuberculosis*, el agente etiológico de la tuberculosis, infecta aproximadamente a la tercera parte de la población mundial. Se estima que en el año 2003, se presentaron 8.8 millones de casos nuevos y poco más de 1.7 millones de muertes. [1,2]

A pesar del avance logrado por la investigación sobre este microorganismo en las últimas décadas, y en contraste con otras bacterias como *Salmonella* o *Shigella*, sus mecanismos moleculares de patogénesis aun no están bien definidos, situación dada en gran parte por la dificultad que existió en el desarrollo de técnicas para su manipulación y estudio genético, por su comportamiento en medio de cultivo. Sin embargo, en los últimos años se desarrollaron técnicas de biología molecular, con las cuales fue posible completar la secuencia del genoma de varios organismos, entre ellos, algunas especies del género *Mycobacterium*. Al comparar dichas secuencias, se encontró que a pesar de tener un parentesco cercano, existen diferencias propias de cada especie, que pueden tener origen en la adaptación a hospederos particulares, y que pueden modificar el grado de patogenicidad del microorganismo – el ejemplo más conocido es la cepa BCG –, y dar lugar a la variedad de manifestaciones clínicas que se presentan por esta infección. [3,4,5]

ANTECEDENTES.

Tuberculosis. Fisiopatología.

La transmisión de *M tuberculosis* por aerosoles es relativamente eficiente, ya que con un número pequeño de bacterias que alcance el alveolo pulmonar, es suficiente para producir infección, lo que explica la alta tasa de sujetos con reacción cutánea positiva en estudios poblacionales, sobre todo en las áreas en que la enfermedad es endémica. Sin embargo, sólo una pequeña proporción de los sujetos infectados desarrolla la enfermedad clínica. De acuerdo con el modelo tradicional, de todos los sujetos que se infectan por *M tuberculosis*, sólo el 10% desarrolla la enfermedad en el transcurso de su vida. De ellos, la mitad en los primeros dos años de la infección (enfermedad de progresión rápida), y el resto, cuando se presenta alguna alteración en su respuesta inmunológica, por lo general factores propios del hospedero, que favorecen la progresión a enfermedad activa, como la coinfección con virus de la inmunodeficiencia humana o el desarrollo de diabetes mellitus. Este estado, de potencial desarrollo de la enfermedad, en el cual se tiene evidencia de una respuesta inmunológica de tipo celular, indicativa de infección, en un sujeto asintomático y no transmisor de la bacteria, se conoce como tuberculosis latente (latencia). [6]

Se cree que este estado es producido por la capacidad de las bacterias de permanecer viables en algunos tejidos sin ocasionar en ellos una respuesta inflamatoria. Las causas por las que se origina son actualmente motivo de debate entre los expertos. Es posible que se alcance un equilibrio entre el número de bacterias que se producen y las que el hospedero elimina, o que las bacterias entren en un estado no replicativo y de bajo gasto metabólico, en el cual no se estimule su reconocimiento inmunológico. [6,7,8] Como posible causa de estas variaciones, existen varias teorías. Se han descrito diferencias en el tipo y la calidad de la respuesta inmunológica del

hospedero, posiblemente modulada por la propia bacteria; se ha documentado un comportamiento heterogéneo de la enfermedad en modelos animales e *in vitro* entre cepas [9,10]; aunado a esto, se encontraron diferencias entre el contenido del genoma de algunas especies del complejo *M tuberculosis*, lo que podría explicar los dos fenómenos anteriores. [11,12]

Mecanismos del huésped que modifican la respuesta inmunológica.

Mycobacterium tuberculosis puede modificar la respuesta inmune a varios niveles: [7]

- a) *Modulación de la presentación antigénica*: algunos componentes de la pared celular, como el lipoarabinomano y otras glicolipoproteínas, disminuyen la expresión de ciertas moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad tipo II, que son inducidas por interferón en los macrófagos humanos. Para que se produzca este fenómeno, es necesario que en los fagosomas se encuentren bacilos viables, lo que sugiere la secreción activa de estos compuestos o algunos relacionados por parte del microorganismo. Sin embargo, este suceso no se observa en todas las cepas: está ausente en los modelos de infección por BCG.
- b) *Inhibición de la toxicidad por intermediarios reactivos de nitrógeno*: la producción de estos compuestos por la enzima óxido nítrico sintasa inducida (iNOS) durante el estallido respiratorio en el macrófago, es un paso esencial para contener la infección primaria por *M tuberculosis* y otros organismos intracelulares en el ratón, y según algunos datos actuales, también en el humano.[13] Se han identificado algunos genes que le permiten a *M tuberculosis* sobrevivir en presencia de estos compuestos, como el *noxR1*, *noxR3*, *glbN*, *glbO*, propios del género, o el *ahpC* que comparte con otros microorganismos. [14]

- c) *Remodelación de los fagosomas*: el proceso de maduración del fagolisosoma se encuentra alterado en las células infectadas por algunas cepas de *M tuberculosis*, que impiden la fusión de las vesículas con las bacterias fagocitadas y los lisosomas. Este proceso al parecer también está mediado a través de compuestos lipídicos liberados del fagosoma hacia el citoplasma, donde afectan al citoesqueleto, y con ello la red normal de transporte de las vesículas del retículo endoplásmico.[8]
- d) *Modificación de composición de granulomas*: en algunas cepas, la interacción de la bacteria con las células huésped, produce una alteración del ácido micólico de su pared celular. En modelos murinos, las cepas con esta alteración producen granulomas con predominio de linfocitos en lugar de macrófagos.[8]

Comportamiento *in vitro*.

Si bien, como se comentó previamente, las características propias del hospedero son importantes para determinar la evolución de la enfermedad [15,16,17], se ha encontrado que las cepas aisladas de enfermos por *M tuberculosis* difieren en la infección que producen en modelos animales. Algunas de estas bacterias también tienen variaciones en sus características fenotípicas *in vitro* (como morfología colonial, velocidad de síntesis de la pared celular o capacidad de respuesta a estímulos fisicoquímicos).

No es de extrañar que en búsqueda de los determinantes de virulencia propios de este microorganismo, una gran parte de la investigación se haya enfocado a las propiedades de su pared celular, formada por un complejo de glicolípidos y ácidos micólicos, muchos de los cuales son únicos de este grupo de microorganismos (figura 1). Estos compuestos constituyen el 60% del peso seco de la bacteria. En concordancia con estas particularidades, el análisis del genoma encontró que alrededor de 250 genes

están destinados a codificar los elementos involucrados en el metabolismo de estos ácidos grasos. [18,19]

Cambios en el genoma.

Actualmente existe un gran interés en la genética comparativa entre especies de micobacterias, como resultado de la secuenciación del genoma completo de cepas de *M tuberculosis* y *M leprae*. En un principio, la comparación entre diferentes especies, mostró que una gran parte del genoma se encuentra conservado, y que las variaciones que se encontraron son en una proporción menor a la que se esperaba. Sin embargo, ahora se conoce que estas pequeñas variaciones son de importancia. Se ha demostrado que la delección de ciertas regiones completas (designadas como regiones de diferencia, *difference regions* o RD), pueden explicar variaciones fenotípicas. La primera de estas regiones estudiada, la RD1, no se encuentra en las cepas de *M bovis* BCG ni en *M microti*. En esta región existen genes relacionados con la producción de algunas de las proteínas características de las micobacterias patógenas, como el complejo llamado ESAT 6 (blanco antigénico de secreción temprana, *early secretory antigen target 6*), que está relacionado con la pared celular, y es importante para el reconocimiento antigénico y la producción de citocinas por parte del hospedero. En estudios *in vitro* y en modelos animales, se ha comprobado que la reinserción de esta secuencia en cepas BCG aumenta su virulencia, si bien no al mismo nivel que el que presentan las cepas silvestres. [3,20,21,22]

Reportes recientes muestran una elevada proporción de delecciones en algunas regiones RD que codifican para componentes del metabolismo de los lípidos en aislados clínicos, aunque con variabilidad importante entre las muestras de diferentes localizaciones geográficas (30% en pacientes ingleses vs. 3% en pacientes norteamericanos) [23,24].

Otro ejemplo es el fenómeno que se observa al hacer la comparación entre la cepa H37Rv de *M tuberculosis* (cepa de referencia, aislada en 1905 y que ha

mantenido una virulencia y patrón de resistencia constantes en modelos animales) y la cepa conocida como CDC 1551. Esta última se aisló en Estados Unidos, y ha sido muy bien caracterizada, ya que en el estudio de contactos del caso, se encontró que se presentó una proporción mayor de conversores a una intradermorreacción con derivado proteico purificado (PPD) positiva que la esperada, lo que hizo pensar que podía tener una virulencia mayor. En modelos animales, presenta una mortalidad mayor que la cepa H37Rv, aunque en humanos, no aumentó la proporción de enfermedad activa en el grupo de contactos. Al hacer el análisis genético comparativo, se demostraron 1075 polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) [25,26]. Aunque en un principio se atribuyeron a errores en la secuenciación, actualmente se ha confirmado que el 91% de estos SNP son reales, lo que hace suponer que tal vez su estudio pueda explicar la diferencia de su comportamiento *in vivo*. [3,20,27-29]

El gen *pks15/1* (Rv2947c/Rv2946c).

Una buena parte de los genes de *M tuberculosis* codifican factores relacionados con el metabolismo de los compuestos destinados a la formación de la pared celular, rica en lípidos. De estos, existen dos familias relacionadas de gran importancia: los diésteres de ftiocerol y los glicolípidos fenólicos o fenolglicolípidos (PGL).

Los primeros están conformados por una mezcla de β -dioles de cadena larga, esterificados con ácidos grasos ramificados multimetilados. Dependiendo de la asimetría de los átomos (series D o L) que tienen las ramas metiladas, los ácidos grasos son llamados micocerósicos o ftioceránicos, respectivamente; los complejos lipídicos son llamados dimicocerosatos de ftiocerol (DIM) o diftioceranatos del ftiocerol (DIP) (figura 2). [30]

Los DIP y DIM tienen actividades biológicas notables, como la modulación inmunológica. Estos dos compuestos en particular, son producidos sólo por micobacterias de crecimiento lento, las de mayor capacidad patogénica, como *M leprae*,

M marinum, *M ulcerans* y el complejo *M tuberculosis*. Dado el descubrimiento de su estructura y función, la investigación sobre estas moléculas se amplió a la familia de los PGL. [18]

Los fenolglucolípidos presentan una base lipídica similar a la de los DIM o DIP, pero con terminación ω con un grupo aromático que está glicosilado con uno a cuatro residuos de carbohidratos, dependiendo de la especie, los cuales quedan expuestos en la superficie externa de la micobacteria (figura 2). Estos residuos poseen un poder antigénico importante, quizá a través de la unión a la zona tipo lectina del receptor de complemento 3 (CR3), además de estimular el estallido respiratorio en los neutrófilos. [30]

La similitud estructural entre los derivados del fenolftiocerol de *M leprae* y *M tuberculosis*, hicieron pensar en una vía metabólica común. En *M leprae* la enzima Pks1 está involucrada en la síntesis del fenolglucolípidos 1 (PGL-1). [31-33] Este compuesto es producido en gran cantidad por este microorganismo. Varios estudios recientes han mostrado que la detección de anticuerpos contra este lípido, podría ser de utilidad como prueba diagnóstica de lepra, ya que una proporción importante de pacientes lo presenta. Además de compartir las propiedades inmunomoduladoras de muchos de los derivados lipídicos, es uno de los mediadores principales en la adhesión de la micobacteria a el complejo lámina basal-célula de Schwann, que se lleva a cabo de forma específica y le confiere el particular tropismo que tiene *M leprae* por los nervios periféricos. [34] Al comparar el genoma de *M leprae* con el de *M tuberculosis*, en particular los genes involucrados en la producción de este compuesto, se encontró una similitud de alrededor del 90%. Llamó la atención encontrar, que si bien todas las cepas conocidas de *M tuberculosis* producen dimiocerosatos, sólo algunas producen PGL. Para la formación de éste es necesario modificar el precursor común de ambos compuestos, el ácido p-hidroxibenzoico (p-HBA), por una reacción para la cual se requiere de una enzima especial que se encuentra codificada en el gen *pks15/1* (figura 3). [35]

El gen *pks15/1* está constituido de 1491 nucleótidos y codifica para una proteína de 496 aminoácidos, caracterizada como una de las sintetas de policétidos (Pks 15/1) de *M tuberculosis*. [36] La zona del cromosoma en que se encuentra este gen incluye otros como *mas*, *mmpL7* y el grupo *ppsA-E*, que se sabe están involucrados en la formación o el transporte del dimicocerosato de ftiocerol (*phthiocerol dimycocerosate*, PDIM). [37,38] Toda esta región está altamente conservada en *M leprae*, y la organización genética en general es muy similar en *M tuberculosis*. En forma experimental, se comprobó que la inactivación del gen *pks15/1* ocasiona en *M bovis* incapacidad para la producción de PGL. Asimismo, cepas H37Rv, que en forma natural no producen este lípido, transformadas con plásmidos con el gen *pks15/1* de *M bovis*, llegan a producir PGL. [18]

Ya se ha demostrado que los PGL tienen actividades biológicas *in vitro* que pueden estar relacionadas con la patogénesis de *M tuberculosis*: inhiben la proliferación de linfocitos T y modulan la producción de citocinas. Existe una correlación inversa entre la producción de PGL y el nivel de secreción de citocinas proinflamatorias (TNF- α , interleucina-6, IL-12). Además, es posible que pueda alterar los procesos necesarios para la destrucción de la bacteria en el interior del macrófago, disminuyendo la producción de radicales libres de oxígeno y de óxido nítrico. [18,39-41]

Las cepas de *M tuberculosis* que no producen PGL, posiblemente tienen una capacidad menor para modificar la respuesta inmunológica del hospedero. Si esta se encuentra íntegra, se genera un microambiente más hostil para estas bacterias, y quizá sea una de las causas que motivan a la bacteria para modificar su estado metabólico y capacidad reproductiva, de tal forma que pasen inadvertidas para el hospedero, situación compatible con el estado de latencia. Bajo estas circunstancias, se esperaría un menor número de pacientes con enfermedad de progresión rápida y de casos con enfermedad activa entre los contactos de un enfermo y quizá menor gravedad en las manifestaciones de quienes presenten la enfermedad. [42]

Constant y colaboradores [18], demostraron que existen cepas que no producen PGL y encontraron que este fenotipo se asocia a una delección de 7 pares de bases en el gen *pks15/1*. Esta delección ocasiona un desplazamiento del marco de lectura abierta, que genera un codón de paro, lo cual detiene la traducción y la producción de la enzima Pks15/1 en forma funcional. Esta enzima es necesaria para la formación de los compuestos lipídicos necesarios como precursores de los PGL. Estos mismos autores describieron una delección de 6 pares de bases en cepas de *M bovis*, que si producen una variedad de PGL, lo que sugiere que la ausencia del codón de paro genera una enzima funcional, a pesar de presentar dos aminoácidos menos. Con base a estos hallazgos, Marmiesse y colaboradores [43] realizaron un estudio filogenético en el que combinaron macro-arreglos y bases de datos bioinformáticas y sugieren que las delecciones en esta región del gen *pks15/1*, ocurrieron en dos ramas distintas del árbol filogenético del complejo *M tuberculosis*. La delección de 7 pares de bases, que impide la traducción del gen *pks15/1*, ocurrió en cepas “modernas” de *M tuberculosis*. La delección de 6 pares de bases ocurrió en la línea de *M africanum-M bovis*, que conserva la capacidad de producir PGL; finalmente el gen *pks15/1* silvestre se encuentra en cepas derivadas de los ancestros más antiguos de este grupo de microorganismos, que han originado a la actual familia W/Beijing.

La familia W/Beijing.

Los estudios de epidemiología molecular han identificado un grupo de cepas de *M tuberculosis*, denominadas familia W/Beijing, las cuales se han diseminado en varias regiones del mundo. Las cepas de este grupo se han asociado a resistencia a fármacos de primera línea, en aislados de la ciudad de Nueva York, y más recientemente, en Rusia. En Vietnam, estas cepas se han asociado a recaídas y falla terapéutica. En el laboratorio, presentan un fenotipo hipervirulento en el modelo murino. Producen una respuesta inmunológica particular, con niveles de citocinas de inducción de respuesta Th1 menores que en controles, y una mayor velocidad de crecimiento en monocitos humanos. Se ha sugerido que la vacunación con BCG otorga un menor grado de

protección a la infección con esta cepa, por lo que se ha sugerido que sería una variante de escape ante la presión selectiva por la vacuna. [30,44]

Las cepas W/Beijing comparten marcadores genéticos. Presentan un patrón de polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción de *IS6110* (RFLP) y espoligotipo similares. Actualmente, la identificación se basa principalmente en el número de espaciadores en la región de repetición directa (DR) del genoma de *M tuberculosis*, con un patrón llamado espoligotipo S00034, que se caracteriza por la delección de los espaciadores 1 a 34. Se han colocado en el grupo 1 de la clasificación de Sreevatsan, junto con las cepas conocidas como ancestrales, todas las cuales presentan un gen *pks15/1* íntegro. Aun cuando se ha descrito la presencia de esta familia en varias regiones del mundo, su prevalencia en cada una de ellas es muy variable. [43,45]

La propuesta de este trabajo fue estudiar la presencia de las mutaciones descritas en el gen *pks15/1*, en un grupo de aislados de *M tuberculosis* obtenidos de pacientes mexicanos, y determinar si existía alguna relación entre estas mutaciones y la capacidad para producir una enfermedad de progresión rápida.

JUSTIFICACION.

La tuberculosis continúa siendo una crisis mundial para los sistemas de salud. Actualmente, los esfuerzos realizados para su control no han tenido el resultado esperado en algunas comunidades, ya que las herramientas para su prevención no son completamente eficaces, el diagnóstico en las etapas tempranas, que facilitaría el tomar medidas para evitar su transmisión, no es preciso, y el tratamiento para los enfermos tiene desventajas como la frecuencia de efectos adversos y su larga duración, lo que dificulta el apego. A su vez, este último fenómeno ha favorecido la aparición de cepas con resistencia a los fármacos utilizados como primera línea, complicando aun más la terapéutica.

A pesar de que el agente causal es bastante homogéneo en su composición genética, en los últimos años se ha encontrado evidencia de que existen cepas que producen enfermedad con un curso más agresivo en modelos animales. Su estudio llevó a la descripción de la producción de moléculas que difieren entre una y otra cepa, y que pueden tener importancia en la patogénesis de la enfermedad. Estos compuestos intervienen en la capacidad de estas bacterias de modificar la respuesta inmunológica del hospedero, contribuyendo así con la diversidad de manifestaciones clínicas de la enfermedad. La caracterización de la estructura química de ellos, de su actividad biológica y de las vías metabólicas involucradas en su producción, es necesaria para el desarrollo de blancos para nuevos agentes terapéuticos, vacunas y pruebas diagnósticas. El definir cuales de estos compuestos tienen una mayor actividad biológica es el primer paso para este tipo de estudios.

HIPOTESIS.

Los aislados de *M tuberculosis* de pacientes con enfermedad de progresión rápida tendrán el gen *pks15/1* silvestre.

Los aislados de *M tuberculosis* de pacientes con enfermedad por reactivación presentarán la delección de 7 pares de bases en la región variable del gen *pks15/1* que ocasiona un desplazamiento en el marco de lectura y forma un codón de paro.

OBJETIVOS.

GENERAL:

Determinar si las mutaciones en la región variable del gen *pks15/1* de aislados clínicos de *M tuberculosis* están asociadas con progresión rápida a enfermedad.

ESPECIFICOS:

1. Identificar la presencia de la región variable descrita en el gen *pks15/1* en aislados clínicos de *M tuberculosis* de pacientes con enfermedad por tuberculosis con progresión rápida y de pacientes con enfermedad por tuberculosis por reactivación.
2. Identificar mutaciones en la región variable del gen *pks15/1* en los aislados clínicos de *M tuberculosis*.
3. Determinar si existe asociación entre el comportamiento epidemiológico de los casos de tuberculosis con las diferencias en el gen *pks15/1* de *M tuberculosis*.

MATERIAL Y METODOS.

DISEÑO.

Este estudio es parte de un proyecto con base poblacional que se está desarrollando en Orizaba, Veracruz, desde octubre de 2000 (anexo 1). Esta parte exploratoria se considera un estudio transversal analítico.

POBLACION Y MUESTRA.

Se analizaron aislados de *M tuberculosis* de pacientes del estudio poblacional de Orizaba (anexo 1). Estos aislados se encuentran guardados en el cepario del Laboratorio de Microbiología Clínica del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. [46]

Todos los aislados han sido caracterizados con identificación y pruebas de susceptibilidad a antibióticos de primera línea (estreptomina, isoniazida, rifampicina y etambutol). Asimismo, fueron tipificados con el polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) para determinar si existen grupos. De todos los aislados se tienen datos epidemiológicos y las características clínicas de los pacientes de los que fueron obtenidos. Con estos datos, se han agrupado de acuerdo a su comportamiento biológico. [47]

Consideramos como eventos de progresión rápida a los microorganismos aislados de pacientes que fueron contactos de un caso índice, quienes desarrollaron la enfermedad en los dos años siguientes al contacto, y que por RFLP pertenecen a un grupo.

Los aislados de pacientes que sin contacto entre sí, con patrón de RFLP único, los consideramos como representativos de casos de enfermedad por reactivación.

Para este estudio, calculamos una muestra de 7 aislados para cada uno de estos grupos, alcanzando un poder mínimo de 80%, y considerando aceptable un error alfa de 0.05 (el cálculo matemático se describe en el anexo 2).

Criterios de inclusión:

Se analizaron los aislados de *M tuberculosis* que cumplieron con las siguientes características, divididas en 2 grupos:

- a) **Enfermedad de progresión rápida:** aislados de *M tuberculosis* de casos secundarios y que pertenecían a un grupo o conglomerado por estudio de polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción - RFLP.
- b) **Enfermedad por reactivación:** aislados de *M tuberculosis* de casos únicos por RFLP, sin contacto epidemiológico entre ellos; también se podrían incluir casos índice que presentaran resistencia a estreptomycinina.

Criterio de exclusión:

- a) Aislados de pacientes coinfectados por virus de la inmunodeficiencia humana.

MEDICIONES.

- Para este estudio, de los aislados utilizados se obtuvieron:
 - Comportamiento epidemiológico: formación de grupo (conglomerado) aislados únicos, por RFLP.
 - Resistencia a fármacos antituberculosis.
 - Características de la región variable del gen *pks15/1*.

Las definiciones de las variables se desarrollan en el anexo 3.

PROCEDIMIENTOS.

METODOLOGÍA.

Los métodos en extenso se comentan en el anexo 4. En resumen:

1. Recuperación de los microorganismos: Los aislados se recuperaron en medio de Lowenstein-Jensen. Cuando presentaron crecimiento confluyente se extrajo el ADN por métodos convencionales. Se midió concentración y pureza en el espectrofotómetro a 280 y 260 nm.

2. Amplificación de la región variable en el gen *pks15/1*: Se hizo la amplificación de un fragmento de 383 pb del gen *pks15/1*, en la zona variable descrita en la literatura [18], mediante la reacción de la polimerasa en cadena (PCR). Las condiciones de la reacción de PCR fueron las siguientes: a un volumen final de 25 ul, una mezcla de deoxinucleótidos trifosfatados –dNTPs– (Gibco® BRL, NY, EUA) 100 mM; MgCl₂ 2mM; Taq polimerasa 1U (Gibco® BRL, NY, EUA), 10 picomolas de los oligonucleótidos PGL F GTGTCCTCCTTTGGGATCAG y PGL R CTGCCAGGAAACACGAC y 10 ng de ADN. La amplificación se llevó a cabo en termociclador automático (MJ Research Inc. PTC-

200); el programa consistió de un ciclo a 95°C por 5 minutos; 30 ciclos con las siguientes temperaturas: 95°C por 45 segundos; 60°C por 45 segundos; 72°C por 45 segundos y un ciclo final a 72°C por 8 minutos. Se usó un control con ADN de la cepa *M tuberculosis* H37Rv y CDC1551 con delección de 7 pares de bases en *pks15/1*, cepas de *M bovis* con delección de 6 pares de bases y cepas del grupo W/Beijing con el gen silvestre, además de un control negativo de reactivos. Los productos de PCR se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 0.8% (Gibco® BRL), se tiñeron con bromuro de etidio (10 mg/mL) para observar la banda de 383 pb en un transiluminador con luz ultravioleta y se fotografiaron.

3. Secuenciación: los productos amplificados se purificaron con un equipo comercial (Qiaquick® DNA Gel Extraction Kit, Quiagen, Stanford, CA) para eliminar el exceso de nucleótidos, iniciadores y sales. La reacción de secuenciación de los productos purificados se hizo también con un equipo comercial (BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, Applied BioSystems, Perkin Elmer, Foster City, CA), y se analizaron en un secuenciador automatizado Applied BioSystems 3100® (Perkin Elmer) según las instrucciones del fabricante.

Para evaluar los oligonucleótidos diseñados para el ensayo de PCR, utilizamos como controles para la delección de 7 pares de bases a una cepa de *M tuberculosis* H37Rv y una de *M tuberculosis* CDC1551. Para la delección de 6 pares de bases, tomamos una cepa ya caracterizada como *Mycobacterium bovis* de la colección del Laboratorio y una cepa BCG de *M bovis* de una casa comercial. Se obtuvieron tres cepas de *Mycobacterium tuberculosis* del grupo W/Beijing de laboratorios con quienes se tiene colaboración, para su uso como controles de cepas con el gen silvestre.

La amplificación del segmento se hizo por duplicado, tanto en los controles como en los problemas.

ANALISIS ESTADISTICO.

Se hicieron tablas de contingencia para comparar los grupos de aislados de progresión rápida y de enfermedad por reactivación, con y sin la delección en el gen *pks15/1*. Se calculó la razón de productos cruzados y se utilizó la prueba exacta de Fisher como estadístico de prueba, tomando como significativos los valores de $p < 0.05$.

ASPECTOS ETICOS Y DE BIOSEGURIDAD.

Los participantes del estudio poblacional firmaron consentimiento informado. El manejo de las micobacterias se realizó en la zona de seguridad nivel 3 del Laboratorio de Microbiología Clínica del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”.

RESULTADOS.

Las cepas que se utilizaron como controles presentaron los cambios esperados: delección de 6 pares de bases en las cepas de *M bovis*, de 7 pares de bases en las cepas H37Rv y CDC1551, y ninguna en las cepas del tipo W/Beijing.

Se estudiaron 24 aislados clínicos de la colección. Trece aislados que cumplieron los criterios de enfermedad por reactivación (aislado único) y 11 con criterios para enfermedad de progresión rápida (conglomerado). Las secuencias de la región amplificada en estos aislados y los controles se compararon con el programa MegAlign[®] 3.2.3.16 para Windows (figura 4).

Entre los aislados clínicos se encontraron 19 microorganismos con la delección de 7 pares de bases. Nueve aislados con comportamiento de enfermedad de progresión rápida y 10 por enfermedad por reactivación (tabla 1). Cinco aislados tuvieron el gen íntegro, 3 de los aislados de enfermedad por reactivación y 2 de los de progresión rápida. Todos estos aislados fueron caracterizados posteriormente como genotipo W/Beijing por espoligotipificación.

Al comparar la proporción de aislados de pacientes con enfermedad por reactivación y de pacientes con progresión rápida a enfermedad, y su relación con la ausencia/presencia de mutaciones en el gen, obtuvimos una razón de productos cruzados de 0.74 (IC95%0.1-5.4). Con la prueba exacta de Fisher se obtuvo una $p=1$.

DISCUSION.

Las condiciones para la PCR y los oligonucleótidos utilizados para amplificar la región del gen *pks15/1* utilizados en este estudio mostraron ser específicos y reproducibles.

Todos los aislados clínicos de *M tuberculosis* analizados, excepto los que corresponden al grupo W/Beijing, tuvieron la delección de 7 pares de bases descrita en estudios previos [48]. Es posible que estas cepas no produzcan fenolglicolípido, aun cuando para confirmarlo, sería necesario buscar su producción en particular.

Al no encontrar el gen silvestre en nuestra muestra, no es posible atribuirle un papel en el riesgo para el desarrollo de enfermedad de progresión rápida en esta población. Sin embargo, hay que considerar la baja prevalencia de cepas del grupo W/Beijing en el medio en donde se aislaron las muestras. Es posible que en las comunidades en que este grupo se presenta en mayor número de casos, como en Asia, los resultados sean diferentes. [49]

Durante el desarrollo de este protocolo, Reed y colaboradores publicaron sus hallazgos sobre la producción de fenolglicolípidos en cepas de tipo W/Beijing, que apoya la idea de que esta familia produce de forma constante estos compuestos. [48]

La prevalencia global de las cepas de tipo W/Beijing se considera en alrededor del 11%, aunque la variación por áreas geográficas es muy importante: en Asia, como es de suponer por su nombre, es del 50%. En Estados Unidos se calcula en un 11% y los países de la Comunidad Europea (excepto Rusia, en donde el comportamiento es similar al resto de Asia) reportan un 5%. [50-52]

La importancia que ha adquirido el estudio de las cepas de esta familia está dada por un comportamiento epidemiológico agresivo, ya que se ha presentado en brotes con un gran número de casos. En ellos, existe una proporción importante de cepas resistentes a fármacos antituberculosis de primera línea, lo que se ha atribuido a una variabilidad genética mayor que en otros grupos de micobacterias. Se ha descrito que su crecimiento dentro de los macrófagos es más rápido que el de otras cepas de *M tuberculosis*, y recientemente se ha reportado que en los modelos murinos en los que se ha probado, la mortalidad es más alta, por lo que algunos autores la consideran una cepa hipervirulenta. [48]

Recientemente se ha descrito que la capacidad de estas cepas para producir fenolglucolípidos puede conferirle una mayor patogenicidad. Kaplan y colaboradores utilizaron un modelo experimental en conejo para producir meningitis por tuberculosis. Los animales a los que se inoculó una cepa W/Beijing, presentaron una mayor carga bacilar en el líquido cerebroespinal y tejido cerebral, mayor diseminación a otros órganos y mayor leucocitosis y manifestaciones clínicas más severas. Este mismo grupo, creó una cepa mutante con delección del gen *pks15/1*, la cual tiene un comportamiento menos agresivo en el mismo modelo, apoyando la teoría del papel inmunomodulador de los fenolglucolípidos. [53]

Nuestros datos coinciden con lo reportado por Tsolaki y colaboradores, [47] quienes estudiaron 102 cepas de la familia W/Beijing, divididas en 4 subgrupos. En todas, encontraron el gen *pks15/1* íntegro, lo que amplía los hallazgos del estudio de Marmiesse [43], en donde se utilizaron las mutaciones en el gen *pks15/1* para definir con mayor exactitud la filogenia del complejo *M tuberculosis*. Este grupo encontró que las cepas que presentan la delección de 7 pares de bases sólo se presentan en un subgrupo particular de *M tuberculosis*. Son cepas que presentan la mutación CGG en *katG*⁴⁶³, y de acuerdo a la nomenclatura de Sreevatsan, pertenecen a los grupos genéticos 2 y 3. Todos estos microorganismos tienen delección de la región TbD1 y no tienen los espaciadores 32-36 en el espoligotipo. En contraste, las cepas del grupo genético 1 (*katG*⁴⁶³ CTG), que incluyen cepas denominadas “tipo ancestral”, que tienen

la región TbD1, y cepas del tipo W/Beijing, que presentan delección de esta región, tienen el *pks15/1* íntegro

Ya que es posible que la producción de PGL sea característica de este grupo, se piensa que este compuesto contribuye con su comportamiento particular. Sin embargo, también existen reportes de cepas de grupos diferentes al W/Beijing, con comportamiento similar en modelos animales, por lo que es de suponerse que existen otros factores propios de la bacteria que aun no conocemos y que deben de ser explorados. [54,55].

Recientemente se reportó el hallazgo del gen *pks15/1* íntegro en cepas con RFLP diferente al presentado por cepas del grupo W/Beijing. [30] Aun cuando este trabajo tiene la limitación de que en la tipificación de las cepas no se utilizó el espoligotipo, el confirmar estos hallazgos limita el uso que podría tener el polimorfismo de *pks15/1* como marcador genético del grupo W/Beijing. Sin embargo, en este mismo trabajo llama la atención el elevado número de cepas obtenidas de infecciones en sistema nervioso central (alrededor del 50%), lo que apoyaría el concepto de que la capacidad de producción de PGL puede estar asociada a un comportamiento clínico más agresivo.

En México, sería importante determinar la prevalencia de cepas del tipo W/Beijing en población abierta. Para estimarla con un error del 5%, sería necesario tipificar con RFLP y espoligotipificación por lo menos 1068 aislados.

CONCLUSIONES.

El comportamiento clínico de este grupo de aislados no está asociado con diferencias en la zona variable del gen *pks15/1*. Sin embargo, en nuestros resultados debe tomarse en cuenta la baja prevalencia de casos ocasionados por cepas del grupo W/Beijing en México.

Si se determina que la integridad del gen *pks15/1* es característica particular del grupo W/Beijing, debe considerarse como un posible factor de patogenicidad y un posible marcador genético de esta familia.

ANEXO 1. Población.

Población de la que se obtuvieron las muestras.

La población de la cual se obtuvieron las muestras incluye 12 municipios en la Jurisdicción Sanitaria de Orizaba. Comprende un área 618.11 km², y tiene 369,235 habitantes, 14-9% en comunidades rurales. Desde 1995 inició un estudio prospectivo de base poblacional en el que participan el Instituto Nacional de Salud Pública, el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, los Servicios Coordinados de Salud en el Estado de Veracruz y la Universidad de Stanford; su objetivo principal es estudiar la transmisión de tuberculosis en esta región mediante técnicas de epidemiología convencional y molecular.

La tasa de incidencia de tuberculosis en el estado de Veracruz durante el años 2000 (28 casos por 100,000 habitantes), era mayor que la tasa de incidencia nacional (15.9 casos por 100,000 habitantes). Esta tasa persiste a pesar del tratamiento estrictamente supervisado. Se realizó una búsqueda pasiva de casos, apoyados en 25 trabajadores para la salud en la comunidad y haciendo escrutinio en personas que refirieron tos por más de 15 días. Se estableció colaboración con las autoridades de salud locales. Periódicamente se revisó el registro de casos de tuberculosis, para identificar casos de tuberculosis pulmonar que pudieran haber sido no registrados en un principio. [56,57]

Entre marzo de 1995 y abril de 2004, se identificaron 9798 tosedores crónicos. De ellos, a 907 pacientes se les diagnosticó tuberculosis. Aceptaron participar en el seguimiento 880 pacientes. De estos casos, 827 pacientes tuvieron un episodio y 53 pacientes más de uno.

De estos 880 casos, 822 fueron casos índices. Hasta el momento, se ha realizado estudio genético a 632 aislados (77%), encontrándose 460 aislados únicos,

72 en conglomerado y 90 casos no definidos. Los casos índices han tenido 3639 contactos, de los cuales 58 (1.5%) han desarrollado la enfermedad. De ellos se encontró en 18 pacientes aislados únicos, y en 22 casos conglomerados.

Todo lo anterior se resume en la figura 5.

ANEXO 2. Cálculo del tamaño de muestra.

Para el cálculo del tamaño de muestra se utilizó la siguiente fórmula, para un estudio de comparación de proporciones:

$$n = \frac{2\bar{P}\bar{Q} (Z_{\alpha} + Z_{\beta})^2}{\Delta^2}$$

En donde:

P_1 = proporción en el grupo 1.

P_2 = proporción en el grupo 2.

$\bar{P} = (P_1 + P_2) / 2$

$\bar{Q} = 1 - \bar{P}$

Z_{α} = valor de z para el error alfa

Z_{β} = valor de z para error beta

Δ = diferencia entre las proporciones ($P_1 - P_2$)

En los datos obtenidos de la población estudiada en Orizaba, se encontraron en casos índice, 460 aislados que fueron únicos (95% del total de casos). De los contactos que desarrollaron enfermedad, 22 aislados se encontraron con patrón de RFLP de conglomerado (5%). Estos datos coinciden con lo reportado hasta hace algunos años, en que la proporción de casos de enfermedad por reactivación de los casos prevalentes de tuberculosis era del 90%. Por lo tanto tomamos como proporción en el grupo 1 (reactivación) 90% y en el grupo 2 (enfermedad progresiva) 10%, lo que nos da una diferencia entre las proporciones de 80%. Sustituyendo en la fórmula, con un error alfa de 5% y un error beta del 20%:

$$n = 2(0.5)(0.5)(1.96 + 0.84)^2 / (0.8^2)$$

Resolviendo la ecuación $n=6.125$ aislados por grupo. También se calculó una curva de poder, para definir el número de aislados variando el error beta aceptado (figura 6).

ANEXO 3. Definición de variables.

Variables y definiciones.

La categorización y definición de variables se expone en la tabla 2.

DEFINICIONES.

Aislado único: aislado de *M tuberculosis* con patrón único de RFLP.

Caso índice: primer paciente con diagnóstico de enfermedad por tuberculosis de un conglomerado.

Grupo o conglomerado: dos o más aislados de *M tuberculosis* con patrones idénticos tanto en peso molecular como en número de bandas en el polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP).

Enfermedad por *M tuberculosis* o tuberculosis: signos y síntomas clínicos compatibles con la enfermedad y aislamiento del microorganismo en muestras clínicas.

Infección por *M tuberculosis* (tuberculosis latente): reacción cutánea con PPD positiva (> 10 mm en inmunocompetentes, > 5 mm en inmunocomprometidos) en pacientes sin síntomas o signos de enfermedad por tuberculosis.

Progresión rápida a enfermedad: desarrollo de la enfermedad durante los dos años del contacto con un caso de tuberculosis, con patrón de RFLP compartido en un grupo.

Tuberculosis por reactivación: son casos de enfermedad que se presentan después de los dos años siguientes a la conversión a PPD+, con un patrón de RFLP único. Incluimos casos índice ocasionados por aislados con resistencia a estreptomycin.

Tiempo de progresión a enfermedad: tiempo entre la conversión a PPD+ y el diagnóstico de enfermedad por tuberculosis.

ANEXO 4. Métodos de laboratorio.

1.- Extracción de ADN de *Mycobacterium tuberculosis* [58].

- a) Se inocula en medio de Lowenstein-Jensen la cepa a estudiar. Se mantiene a 37°C hasta observar el crecimiento de la colonia.
- b) Se toma con el asa bacteriológica la porción de una colonia y se coloca en un tubo de microcentrífuga con 400 ul de amortiguador Tris-EDTA (TE, Tris-HCl, pH 7.8).
- c) Calentar a 80°C por 20 minutos, enfriar a temperatura ambiente.
- d) Agregar 50 ul de lisozima (10 mg/ml), mezclar en vórtex e incubar a 37°C una noche.
- e) Agregar 75 ul de una mezcla de proteinasa K/SDS 10% e incubar por 10 min a 65°C.
- f) Agregar 100 ul de NaCl 5 M.
- g) Agregar 100 ul de solución NaCl/CTAB precalentada a 65°C. Mezclar en vórtex hasta que se observe un aspecto lechoso. Incubar a 65°C por 10 min.
- h) Agregar 750 ul de una mezcla de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1), mezclar por 10 segundos y centrifugar por 5 min a 12000 x g.
- i) Transferir la fase acuosa sobrenadante en volúmenes de 180 ul a un tubo nuevo.
- j) Agregar 0.6 volumen (450 ul) de isopropanol para precipitar los ácidos nucleicos.
- k) Colocar a -20°C por 30 minutos.
- l) Centrifugar por 15 min a 12000 x g.
- m) Desechar el sobrenadante.
- n) Agregar 1 ml de etanol al 70% frío y mezclar.
- o) Centrifugar 5 min a 12000 x g. Descartar el sobrenadante.
- p) Remover los restos de etanol y permitir que el *pellet* seque a temperatura ambiente por ~10 minutos.
- q) Disolver el *pellet* en amortiguador TE o agua.

- r) Revisar la concentración de ADN en un espectrofotómetro con longitudes de onda de 260 y 280 nm.

2.- Reacción en cadena de la polimerasa.

Se hace la mezcla de PCR con los siguientes reactivos (por reacción):

B10x	2.5 ul
dNTP	100 mM
MgCl ₂	2 mM
Primer 1	10 pM
Primer 2	10 pM
Taq polimerasa	1 U
ADN	10 ng

Todo a un volumen final de 25 ul por reacción.

Se utilizó el siguiente programa: 1 ciclo inicial de desnaturalización a 95°C por 5 minutos; 30 ciclos con las siguientes temperaturas: desnaturalización a 95°C por 45 segundos; unión de iniciadores a 60°C por 3 m; extensión a 72°C por 45 segundos. Al final de estos ciclos, dejamos un ciclo final para completar la síntesis de los fragmentos, a 72°C por 8 minutos. Se obtiene un producto de alrededor de 400 pb. Una vez terminado el programa, examinamos los productos en una electroforesis en gel de agarosa (0.8%). Se recomienda utilizar 100 V constantes, por 45-60 minutos.

3.- Purificación de los productos de amplificación.

Se identificó la banda en el retroiluminador de luz ultravioleta. Se cortó el gel de agarosa con una hoja de bisturí y se colocó el fragmento en un tubo de microcentrífuga limpio, posteriormente:

- Se pesan los fragmentos de agarosa.
- Se agregan 3 volúmenes de la solución QG[®].
- Se disuelve la agarosa incubando a 50°C por 10 m in.

- d) Se agrega 1 volumen de isopropanol y se mezcla.
- e) Se coloca esta mezcla en una columna.
- f) Se centrifuga por 1 min a 13000 x g.
- g) Se deshecha el líquido recolectado en el tubo de la columna.
- h) Se lava con 750 ul de solución PE[®].
- i) Se centrifuga por 1 min a 13000 x g.
- j) Se descarta el líquido recolectado.
- k) Se coloca la columna en un tubo de centrifuga limpio.
- l) Agregar 15 ul de amortiguador BE[®] y centrifugamos 1 min a 13000 x g.
- m) Agregar 15 ul de agua y centrifugamos 1 min a 13000 x g.
- n) Se revisa la concentración de ADN en un gel de agarosa al 0.8% o en un espectrofotómetro.

4.- Secuenciación del ADN.

En general, se hace una reacción de polimerización, utilizando el amplicón a estudiar y uno de los iniciadores utilizados. Se hace la mezcla con oligonucleótidos estándar (deoxinucleótidos) en cantidades suficientes, junto con dideoxinucleótidos trifosfato marcados ("tagged"), en cantidades limitadas (se utiliza una proporción 5:1 con los oligonucleótidos normales).

Se realiza una reacción de PCR. Los productos de esta reacción se separan por capilaridad y se estimula la fluorescencia de los marcadores con láser. Debido a que se tienen los cuatro oligonucleótidos presentes, la cadena se sintetiza de forma normal, hasta que, en determinado momento, por azar, se introduce un dideoxinucleótido, terminando en ese momento la síntesis de esa cadena. Así, algunas cadenas podrán incluir varios cientos de nucleótidos normales antes que uno dideoxi. Al final del período de incubación, los fragmentos se separan por longitud, del más grande al más pequeño, por peso molecular en gel o por capilaridad. Después, se estimula fluorescencia iluminando con láser, y se registra la secuencia.

La mezcla de reacción se prepara de la siguiente forma:

Mezcla Terminator Ready Reaction®	8 uL
Amplicón	3-10 ng
Iniciador	3.2 pmol
Agua desionizada	cuanto baste para

Todo a un volumen final de 20 uL.

El programa recomendado para el termociclador consiste en 50 ciclos: desnaturalización a 95° por 30 segundos, unión de iniciador a 50-55° por 10 segundos, extensión a 60° por 4 min.

Posteriormente debe purificarse el producto de la reacción:

- a) Agregar 5 uL de EDTA 125 mM.
- b) Agregar 60 uL de etanol al 100%.
- c) Sellar con cinta de aluminio y mezclar por inversión 4 veces.
- d) Incubar a temperatura ambiente por 15 minutos.
- e) Centrifugar a 2000-3000 x g por 30 minutos.
- f) Invertir la placa y girar hasta 185 x g.
- g) Agregar 60 uL de etanol al 70%.
- h) Centrifugar a 4° a 1650 x g por 15 minutos.
- i) Invertir la placa y centrifugar a 185 x g por 1 minuto.
- j) Resuspender la muestra en amortiguador.

El producto purificado puede almacenarse a 4°C. Para realizar lectura, se preparan los polímeros de acuerdo a cada equipo. En nuestro caso se utilizó separación por capilaridad. Se obtuvo el electroferograma y se guardó una copia impresa.

FIGURAS

Y

TABLAS

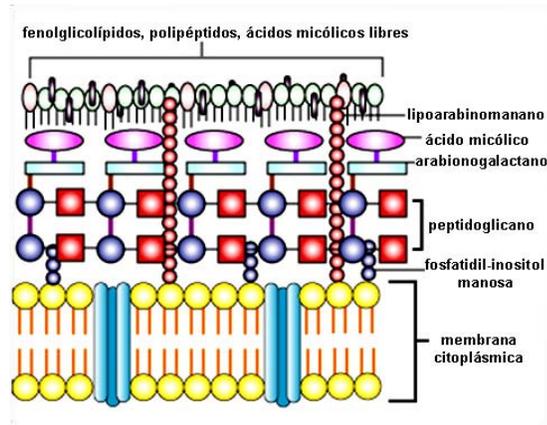


Figura 1. Esquema de la pared celular de *Mycobacterium tuberculosis*

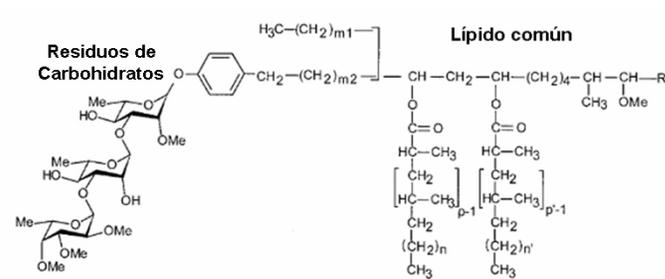


Figura 2. Esquema de la estructura química del fenolglucolípidos de *M tuberculosis*

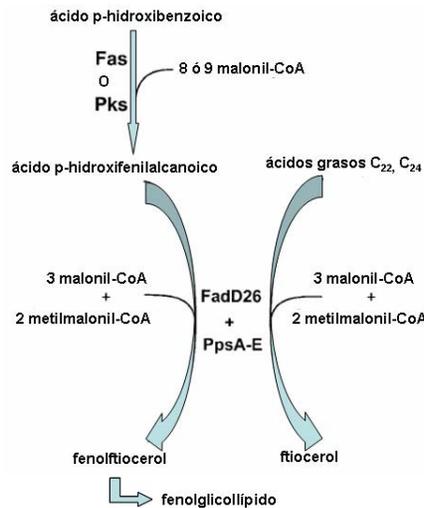


Figura 3. Vía de la síntesis de fenolglucolípidos.

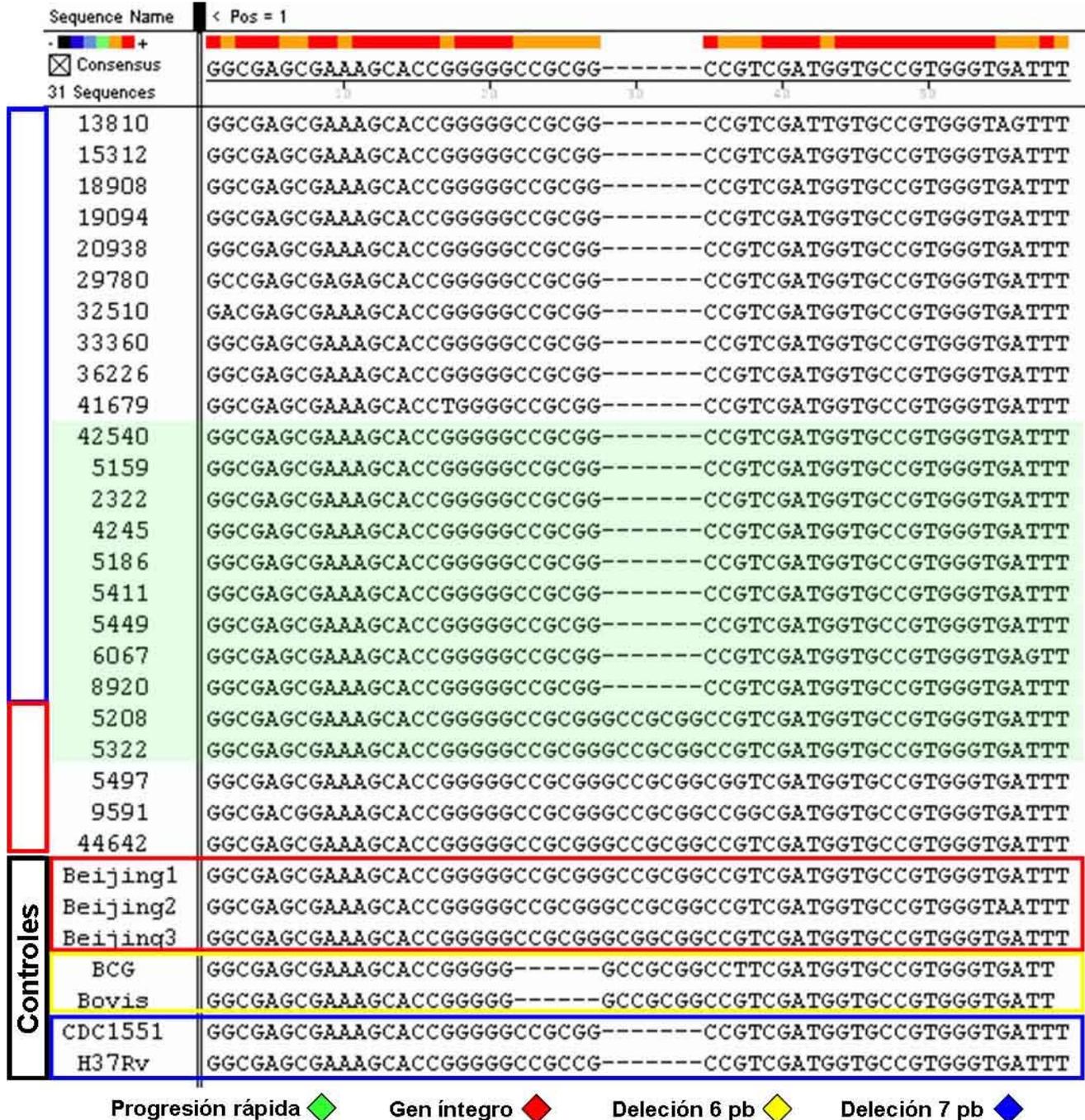


Figura 4. Alineamiento del segmento secuenciado.

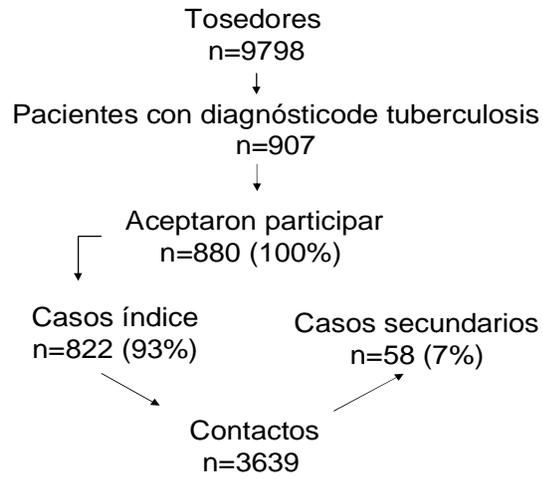


Figura 5. Población de la que se obtuvieron las muestras

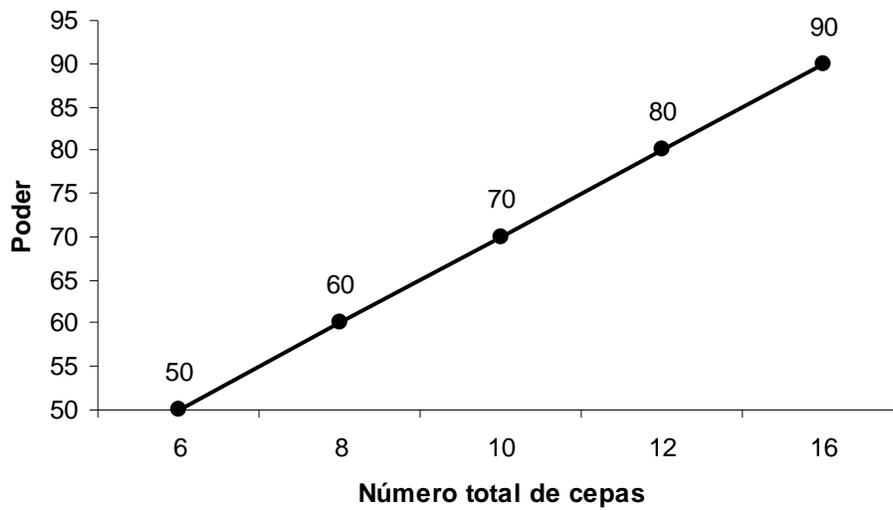


Figura 6. Curva de poder

Tabla 1. Características del gen *pks15/1* por comportamiento clínico

Comportamiento clínico	Características de <i>pks15/1</i>	
	Delección de 7 pb	Gen silvestre
Progresión rápida	9	2
Reactivación	10	3

Tabla 2. Categorización y definición de variables.

VARIABLE	DEFINICIONES			
	CONCEPTUAL	OPERACIONAL	CATEGORÍA/ESCALA	
Comportamiento clínico	Tiempo del desarrollo de la enfermedad desde la infección por <i>M tuberculosis</i>	Reactivación o progresión rápida	Cualitativa nominal dicotómica	0. Aislado único 1. Grupo
Características de <i>pks15/1</i>	Posible incapacidad de la cepa de producir PGL	Delección de 7 pares de bases	Cualitativa nominal dicotómica	0. No 1. Sí



"Lack of Association Between the Integrity of the Mycobacterium tuberculosis pks15/1 Gene and Rapid Progression Disease"



GALINDO FRAGA A¹, BERNALDIJA BIL, VILLALBA S, BERNIERES OSORBO J, GARCIA GARCIA M, STEFANIKOWICZ P, YOUNG S, PONEZ DE LEON GARDUOLA I.
¹ Laboratorio de Microbiología Clínica, Departamento de Infectología, Instituto Nacional de Genética Molecular y Neumología "CIG", Córdoba, México; ² Unidad de Tuberculosis, Instituto Nacional de Salud Pública, Cuernavaca, México; ³ Centre for Molecular Microbiology and Infection, Imperial College, London

The length of the cell wall of Mycobacterium tuberculosis and components characteristic of its type of organism. Some of these have the capacity to modify the immunological response of the host.

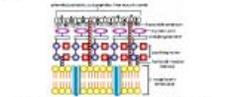


Figure 1. Structure of the cell wall of Mycobacterium tuberculosis. Some of the components characteristic of this type of organism. Some of these have the capacity to modify the immunological response of the host.

The production of phenolglyoxal (PG) by some strains of Mycobacterium tuberculosis has been associated with a fast progression to disease. A defining enzyme for the production of this compound, Pks15/1, is localized in the gene pks15/1 (Figure 2). A deletion of 7 pairs of bases (pb) has been described. This deletion could be the product of a random mutation.

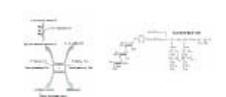


Figure 2. A random mutation could be the synthesis of phenolglyoxal (PG) and its product, Pks15/1. For this Pks15/1 gene, a deletion of 7 pairs of bases (pb) has been described.

In vitro studies have shown that PGL, unlike other lipids, decreases the production of tumor necrosis factor alpha (TNF- α) and other cytokines of the type 1 immune response (TH1) (Figure 3, 4). It is believed that this type of phenomenon can explain the difference in the behavior of the infection in animal models (Figure 5, 6).

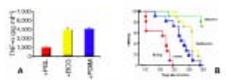
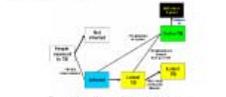


Figure 3. Effect of PGL on the TNF production. TNF production in different mouse models. Figure 4. TNF production in different mouse models.

Figure 5. Survival in the infection of different strains of M tuberculosis in mice. Figure 6. Survival in the infection of different strains of M tuberculosis in mice.



Objectives:
 To identify the presence and characteristics of the variable region of the gene pks15/1 in clinical isolates of Mycobacterium tuberculosis from patients with disease with rapid progression and of patients with slow disease.
 To determine if the mutation in the variable region of the gene pks15/1 of clinical isolates of Mycobacterium tuberculosis are associated with rapid progression to disease.

Methods:
 Strains of M tuberculosis isolated from patients with pulmonary tuberculosis were analyzed. They were divided in two groups:
 Disease with rapid progression: strains of M tuberculosis that cause secondary cases (same comparison by study of the mutation in rapid length polymorphism - IS6110) (11 strains).
 Disease by reactivation (relapse) strains of M tuberculosis with primary IS6110 patterns, or strains of origin primary, in the case with mutations in IS6110 (11 strains).

From each strain, the DNA was obtained. Primers were designed to amplify the region of the gene pks15/1 in which mutations have been described. Strains in which the occurrence of the region is known were used as controls. Mycobacterium bovis, M tuberculosis H37Rv, CDC1551 and Beijing, amplified products were sequenced to determine the presence of mutations. The proportion of strains with mutation in each group was compared, in order to calculate an odds ratio (OR).

Results:
 The strains that were used as controls presented the expected characteristic: deletion of 7 pairs of bases in the strain of M bovis and 7 pairs of bases in H37Rv and CDC 1551, in the strains of Beijing genotype there were no mutations.
 In the 24 clinical isolates, we found the deletion of 7 pairs of bases in 10 strains, and in 5, the complete gene. These last strains were characterized later as Beijing genotype by spoligotyping.



Figure 7. Alignment of the sequenced fragments.

Conclusions:
 We did not find association between disease by reactivation or rapid progression and the mutation in the gene pks15/1 in the strains OR 0.14 (OR 0.11-0.4, p=0.1). However, it must be taken into account that the prevalence of strains of the Beijing genotype is higher in the 10 cases. The wild gene only has been found in strains of this family. If the integrity of the gene pks15/1 and with it the phenolglyoxal production in an individual characteristic of the strains of Beijing genotype, it can be one of the factors that confer a greater pathogenicity to this family.



Presentación en Póster
 10th Annual Conference
 International Union Against Tuberculosis and Lung Disease
 North American Region
 Chicago, Marzo 2-4, 2006.

REFERENCIAS.

1. WHO. **Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing.** WHO report 2005. Geneva, World Health Organization (WHO/HTM/TB/2005.349).
2. Raviglione MC. **The TB epidemic from 1992 to 2002.** Tuberculosis. 2003;83:4-14.
3. Clark-Curtiss JE, Haydel SE. **Molecular genetics of *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis.** Annu Rev Microbiol 2003;57:517-49.
4. Manabe YC, Dannenberg AM, Tyagi SK, Hatem CL, Yoder M, Woolwine SC, Zook BC, Pitt ML, Bishai WR. **Different strains of *Mycobacterium tuberculosis* cause various spectrums of disease in the rabbit model of tuberculosis.** Infect Immun 2003;71:6004-6011.
5. Fleischmann RD, Alland D, Eisen JA, Carpenter L, White O, Peterson J, DeBoy R, Dodson R, Gwinn M, Haft D, Hickey E, Kolonay JF, Nelson WC, Umayam LA, Ermolaeva M, Salzberg SL, Delcher A, Utterback T, Weidman J, Khouri H, Gill J, Mikula A, Bishai W, Jacobs Jr WR Jr, Venter JC, Fraser CM. **Whole-genome comparison of *Mycobacterium tuberculosis* clinical and laboratory strains.** J Bacteriol 2002;184:5479-5490.
6. Boom WH, Canaday DH, Fulton SA, Gehring AJ, Rojas RE, Torres M. **Human immunity to *M tuberculosis*: T cell subsets and antigen processing.** Tuberculosis 2003;83:98-106.
7. Tufariello JAM, Chan J, Flynn JAL. **Latent tuberculosis: mechanisms of host and bacillus that contribute to persistent infection.** Lancet Infect Dis 2003;3:578-90.
8. Cosma CL, Sherman DR, Ramakrishnan L. **The secret lives of the pathogenic mycobacteria.** Annu Rev Microbiol 2003;57:641-76.
9. López B, Aguilar D, Orozco H, Burger M, Espitia C, Ritacco V, Barrera L, Kremer K, Hernández-Pando R, Huygen K, Van Soolingen D. **A marked difference in pathogenesis and immune response induced by different *Mycobacterium tuberculosis* genotypes.** Clin Exp Immunol 2003;133:30-37.
10. Glickman MS, Cox JS, Jacobs WR. **A novel mycolic acid ciclopropane synthetase is required for cording, persistence, and virulence of *Mycobacterium tuberculosis*.** Mol Cell 2000;5:717-727.
11. Kato-Maeda M, Rhee JT, Gingeras TR, Salamon H, Drenkow J, Smittipat N, Small PM. **Comparing genomes within the species *Mycobacterium tuberculosis*.** Genome Res 2001;11:547-554.
12. Glickman MS, Jacobs WR. **Microbial pathogenesis of *Mycobacterium tuberculosis*: dawn of a discipline.** Cell 2001;104:477-485.
13. Raupach B, Kaufmann SHE. **Immune responses to intracellular bacteria.** Curr Op Immunol 2001;13:417-428.
14. Smith I. ***Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis and molecular determinants of virulence.** Clin Microbiol Rev 2003;16:463-96.
15. Lienhardt C, Bennett S, Del Prete G, Bah-Sow O, Newport M, Gustafson P, Manneh K, Gomes V, Hill A, McAdam K. **Investigation of Environmental and host-related risk factors for tuberculosis in Africa I. Methodological aspects of a combined design.** Am J Epidemiol 2002;155:1066-73.
16. Bennett S, Lienhardt C, Bah-Sow O, Gustafson P, Manneh K, Del Prete G, Gomes V, Newport M, McAdam K, Hill A. **Investigation of environmental and host-related risk factors for tuberculosis in Africa II. Investigation of host genetic factors.** Am J Epidemiol 2002;155:1074-79.

17. Cervino AC, Lakiss S, Sow O, Bellamy R, Beyers N, Hoal-van Helden E, van Helden P, McAdam KP, Hill AV. **Fine mapping of a putative tuberculosis susceptibility locus on chromosomes 15q11-13 in African families.** Hum Mole Genetics 2002;11:1599-1603.
18. Constant P, Perez E, Malaga W, Laneelle MA, Saurel O, Daffe M, Guilhot C. **Role of the *pks15/1* gene in the biosynthesis of phenolglycolipids on the *Mycobacterium tuberculosis* complex.** J Biol Chem 2002;277:38148-38158.
19. Dubey VS, Sirakova TD, Kolattukudy PE. **Disruption of *msl3* abolishes the synthesis of mycolipanoic and mycolipenic acids required for polyacyltrehalose synthesis in *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv and causes cell aggregation.** Mol Microbiol 2002;45:1451-1459.
20. Pym A, Brodin P, Brosch R, Huerre M, Cole ST. **Loss of RD1 contributed to the attenuation of the live tuberculosis vaccines *Mycobacterium bovis* BCG and *Mycobacterium microti*.** Mol Microbiol 2002;46:709-717.
21. Banu S, Honore N, Saint-Joanis B, Philpott D, Prevost MC, Cole ST. **Are the PE-PGRS proteins of *Mycobacterium tuberculosis* variable surface antigens?** Mol Microbiol 2002;44:9-19.
22. Behr MA, Wilson MA, Gill WP, Salamon H, Schoolnik GK, Rane S, Small P. **Comparative genomics of BCG vaccines by whole genome DNA microarray.** Science 1999;284:1520-1523.
23. Camacho L, Constant P, Raynaud C, Lenéelle MA, Triccas JA, Gicquel B, Daffé M, Guilhot C. **Analysis of the phthiocerol dimycocerosate locus of *Mycobacterium tuberculosis*.** J Biol Chem 2001;276:19845-19854.
24. Cole ST. **Comparative and functional genomics of the *Mycobacterium tuberculosis* complex.** Microbiology 2002;148:2919-2928.
25. Gutacker MM, Smoot JC, Migliaccio CA, Ricklefs SM, Hua S, Cousins DV, Graviss EA, Shashkina E, Kreiswirth BN, Musser JM. **Genome-wide analysis of synonymous single nucleotide polymorphisms in *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms: resolution of genetic relationships among closely related microbial strains.** Genetics. 2002;162:1533-1543.
26. Hughes AL, Friedman R, Murray M. **Genomewide pattern of synonymous nucleotide substitution in two complete genomes of *Mycobacterium tuberculosis*.** Emerg Infect Dis 2002;8:1342-46.
27. Randhawa GS, Bishai WR. **Beneficial impact of genome projects on tuberculosis control.** Infec Dis Clin N Am 2002;16:145-161.
28. Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, Gordon SV, Eiglmeier K, Gas S, Barry CE 3rd, Tekaia F, Badcock K, Basham D, Brown D, Chillingworth T, Connor R, Davies R, Devlin K, Feltwell T, Gentles S, Hamlin N, Holroyd S, Hornsby T, Jagels K, Krogh A, McLean J, Moule S, Murphy L, Oliver K, Osborne J, Quail MA, Rajandream MA, Rogers J, Rutter S, Seeger K, Skelton J, Squares R, Squares S, Sulston JE, Taylor K, Whitehead S, Barrell BG. **Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence.** Nature. 1998;393:537-544.
29. Young DB. **Ten years of research progress and what's to come.** Tuberculosis. 2003;83:77-81.
30. Chaiprasert A, Yorsangsuksamol J, Prammananan T, Palittapongarnpim P, Leechawengwong M, Dhiraputra C. **Intact *pks15/1* in non-W-Beijing *Mycobacterium tuberculosis* isolates.** Emerg Infect Dis 2006;12:772-774.
31. Gande R, Gibson KJC, Brown Alistair J, Krumbach K, Dover LG, Sahm H, Shioyama S, Oikawa T, Besra GS, Eggeling L. **Acyl-CoA carboxylases (*accD2* and *accD3*) together with a unique polyketide**

synthase (Cg-pks) are key to mycolic and biosynthesis in *Corybacteriineae* like *Corynebacterium glutamicum* and *Mycobacterium tuberculosis*. J Biol Chem 2004;279:44847-57.

32. Trivedi OA, Arora P, Sridharan V, Tickoo R, Mohanty D, Gokhale RS. **Enzymatic activation and transfer of fatty acids as acyl-adenylates in mycobacteria.** Nature 2004; 428:441-445.

33. Smith DR, Richterich P, Rubenfield MK, Rice PW, Butler C, Lee HM, Kirst S, Gundersen K, Abenschan K, Xu Q, Chung M, Deloughery C, Aldredge T, Maher J, Lundstrom R, Tulig C, Falls K, Imrich J, Torrey D, Engelstein M, Breton G, Madan D, Nietupski R, Seitz B, Connelly S, McDougall S, Safer H, Gibson R, Doucette-Stamm L, Eiglmeier K, Bergh S, Cole ST, Robinson K, Richterich L, Johnson J, Church GM, Mao J. **Multiplex sequencing of 1.5 Mb of the *Mycobacterium leprae* genome.** Gen Res 1997;7:802-819.

34. Ng V, Sanáis G, Timpi R, Talts JF, Salzar JL, Brennan PJ, Rambukkana A. **Role of the cell wall phenolic glycolipid-1 in the peripheral nerve predilection of *Mycobacterium leprae*.** Cell 2000;103:511-524.

35. Takayama K, Wang C, Bestra GS. **Pathway to synthesis and processing of mycolic acids in *Mycobacterium tuberculosis*.** Clin Microb Rev 2005;18 81-101.

36. Saxena P, Yadavi G, Mohanty D, Gokhale RS. **A new family of type III polyketide synthases in *Mycobacterium tuberculosis*.** J Biol Chem 2003;278:44780-44790.

37. Kolattukudy PE, Fernandes ND, Azad AK, Fitzmaurice AM, Sirakova TD. **Biochemistry and molecular genetics of cell-wall lipid biosynthesis in mycobacteria.** Mol Microbiol 1997;24:263-270.

38. Sankaranarayanan R, Saxena P, Marathe UB, Gokhale RS, Shanmugam VM, Rukmini R. **A novel tunnel in mycobacterial type III polyketide synthase reveals the structural basis for generating diverse metabolites.** Nature Struct Mol Biol 2004;9:894-900.

39. Cardona PJ, Julián E, Vallés X, Gordillo S, Muñoz M, Luquin M, Auxina V. **Production of antibodies against glycolipids from the *Mycobacterium tuberculosis* cell wall in aerosol murine models of tuberculosis.** Scan J Immunol 2002;55:639-645.

40. Fäldt J, Dahlgren C, Karlsson A, Ahmed AMS, Minnikin DE, Ridell M. **Activation of human neutrophils by mycobacterial phenolic glycolipids.** Clin Exp Immunol 1999;118:253-60.

41. Dubey VS, Sirakova TD, Kolattukudy PE. **Disruption of *msl3* abolishes the synthesis of mycolipanoic and mycolipenic acids required for polyacyltrehalose synthesis in *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv and causes cell aggregation.** Mol Microbiol 2002;45:1451-1459.

42. Ho TBL, Robertson BD, Rhee JT, Younge DB Small PM et al. **Are deletions in the *plcD* locus associated with variation in infectivity in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*?** Thorax 2001;56:56.

43. Marmiesse M, Brodin P, Buchrieser C, Gutierrez C, Simoes N, Vincent V, Glaser P, Cole ST, Brosch R. **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.

44. Manca C, Reed MB, Freeman S, Mathema B, Kreiswirth B, Barry CE, Kaplan G. **Differential monocyte activation underlies strain-specific *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis.** Infection Immun 2004;72:551-5514.

45. Tsolaki AG, Gagneux S, Pym }AS, de la Salmoniere YLG, Kreiswirth BN, van Soolingen D, Small PM. **Genomic deletions classify the Beijing/W strain as a distinct genetic lineage of *Mycobacterium tuberculosis***. J Clin Microbiol 2005;43:3185-91.
46. Garcia-Garcia M, Palacios-Martinez M, Ponce-de-Leon A, Jimenez-Corona ME, Jimenez-Corona A, Balandrano-Campos S, Olivera-Diaz H, Valdespino-Gomez JL, Small PM. **The role of core groups in transmitting *Mycobacterium tuberculosis* in a high prevalence community in Southern Mexico**. Int J Tuberc Lung Dis. 2000;4:12-7.
47. Garcia-Garcia ML, Sifuentes-Osornio J, Jimenez-Corona ME, Ponce-de-Leon A, Jimenez-Corona A, Bobadilla-del Valle M, Palacios-Martinez M, Canales G, Sangines A, Jaramillo Y, Martinez-Gamboa A, Balandrano S, Valdespino-Gomez JL, Small P. **Resistencia de *Mycobacterium tuberculosis* en Orizaba, Veracruz. Implicaciones para el programa de prevención y control de la tuberculosis**. Rev Invest Clin. 2001;53:315-23.
47. Reed MB, Domenech P, Manca C, Su H, Barczak AK, Kreiswirth BM, Kaplan G, Barry CE. **A glycolipid of hypervirulent tuberculosis strains that inhibits the innate immune response**. Nature 2004;431:84-87.
48. Gagneux S, DeRiemer K, Van T, Kato-Maeda M, de Jong BC, Narayanan S, Nicol M, Niemann S, Kremer J, Gutierrez MC, Hilty M, Hopewell PC, Small PM. **Variable host-pathogen compatibility in *Mycobacterium tuberculosis***. Proc Nat Acad Sci 2005;103:2069-2873.
49. Bifani PJ, Mathema B, Kurepina NE, Kreiswirth BN. **Global dissemination of the *Mycobacterium tuberculosis* W-Beijing family strains**. TRENDS Microbiol 2002;10:45-53
50. Glynn JR, Whiteley J, Bifani PJ, Kremer K, van Soolingen D. **Worldwide occurrence of Beijing/W strains of *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review**. Emerg Infect Dis 2002;8:843-849.
51. Kremer K, Glynn J, Lillebaek T, Niemann S, Kurepina NE, Kreiswirth BN, Bifani PJ, van Soolingen D. **Definition of the Beijing/W lineage of *Mycobacterium tuberculosis* on the basis of genetic markers**. J Clin Microbiol 2004;42:4040-4049.
52. Tsenova L, Ellison E, Harbacheuski R, Moreira AL, Kurepina N, Reed MB, Mathema B, Barry CE, Kaplan G. **Virulence of selected *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates in the rabbit model of meningitis is dependent on phenolic glycolipid produced by the bacilli**. J Infect Dis 2005;192:98-106.
53. Barnes PF, Cave MD. **Molecular epidemiology of tuberculosis**. N Engl J Med 2003;349:1149-56.
54. Collyns TA, Gascoyne-Binzi DM, Hawkey PM. **Molecular fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis*: does it help in understanding the epidemiology of tuberculosis?** Rev Medical Microbiol 2002;13:119-127.
55. García-García ML, Ponce de León A, García-Sancho MC, Ferreyra-Reyes L, Palacios-Martínez M, Fuentes J, Kato-Maeda M, Bobadilla M, Small PM, Sifuentes-Osornio J. **Tuberculosis-related deaths within a well-functioning DOTS control program**. Emerg Infect Dis 2002;8:1327-1333.
56. Jiménez-Corona ME, García García L, DeRiemer K, Ferreyra-Reyes L, Bobadilla del Valle M, Cano-Arellano B, Canizales-Quintero S, Martínez-Gamboa A, Small PM, Sifuentes-Osornio J, Ponce de León A. **Gender differentials of pulmonary tuberculosis transmisión and reactivation in an endemic area**. Thorax 2006;61:348-353.
57. Wilson K. **Preparation of genomic DNA from bacteria**. En: Asubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K, eds. Current Protocols in Molecular Biology. Vol. 1. New York. Green & Wiley-Interscience. 1990.