

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS**

**“CARACTERIZACIÓN INMUNOLÓGICA DE LA  
PROTEÍNA Rv1759c DE *Mycobacterium tuberculosis*”**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR  
EN CIENCIAS**

**P R E S E N T A**

**MC. MVZ. JAIME CAMPUZANO GRANADOS**

**DIRECTORA DE TESIS: Dra. CLARA INÉS ESPITIA PINZÓN**

**MEXICO, D.F.**

**2007**



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.

El presente trabajo se realizó bajo la dirección de la **Dra. CLARA INÉS ESPITIA PINZÓN** del departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México y en colaboración con el **Dr. ROGELIO HERNÁNDEZ PANDO** del departamento de Patología Experimental del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Subirán”.

Este trabajo fue financiado por CONACYT (G36923-M, 33580-M), DGAPA (IN221599) Universidad Nacional Autónoma de México y la Comunidad Europea (INCO DC ICA4-CT-2002-10063)

## Agradecimientos

A la Dra. **Clara Espitia Pinzón** por haberme permitido realizar este trabajo de tesis, por su asesoría y por darme la oportunidad de continuar en el camino de la investigación.

Al Dr. **Rogelio Hernández Pando** por la gran oportunidad que me brindo para realizar parte del proyecto de investigación en su laboratorio, por sus enseñanzas, su confianza, su tiempo, dedicación y esfuerzo para que pudiera concluir este proyecto.

A mi comité tutorial Dra **Iris Estrada García** y Dr Francisco Trigo Tavera por sus enseñanzas, consejos y tiempo dedicado para mi formación.

A mis sinodales: Dra. **Yolanda López Vidal**, Dr. **Eduardo Díaz Sada**, Dr. **César González Bonilla**, Dr. **Ricardo Lascurain Ledesma** y Dra. **Clara Espitia Pinzón**. Por su tiempo dedicación en la revisión de esta tesis.

A la Dra. **Diana Aguilar León** por su paciencia, enseñanzas y su gran ayuda en la realización de los experimentos.

A la Dra. **Martha Lara** por su ayuda en el desarrollo de esta tesis.

A **Rafael Cervantes Roldan** por sus invaluable enseñanzas, consejos y ayuda en el desarrollo de esta tesis.

A **Cristina Parada** por su ayuda en el desarrollo de esta tesis.

Al Sr. **Luis Antonio Morales Arreola** por su colaboración y ayuda en el proceso de las muestras para el desarrollo de la tesis.

Al Sr. **Jaime Córdova López** por su colaboración en la toma fotográfica

A todos mis **compañeros y amigos** del laboratorio del Instituto de Investigaciones Biológicas de La UNAM: Elizabeth, Eden, Wendy, Ingrid, Martha, Ma. Antonieta, Karen, Cristina, Margarita, Angélica, Eika, Mariano, Rafael, Javier, Pedro, Alejandro, Marco Antonio, Antonio, Fernando, por su paciencia e invaluable amistad.

A todos mis **compañeros y amigos** del departamento de Patología Experimental del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Subirán": Diana, Kutzy, Yuri, Dulce, Brenda, Ana, Jorge, Juan Carlos, Francisco, por su ayuda y amistad.

A todos mis **compañeros y amigos** del departamento de Patología de La Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM:

A la Dra. **Nuria de Buen** y Dra. **Laura Romero** por darme el tiempo y la oportunidad de realizar este proyecto.

A la **Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM**

Al **Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM**

Al **Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Subirán" de la SS.**

**A todas las personas que han contribuido en mi formación.**

## Dedicatoria

*A mi esposa **Ada Guadalupe** por su amor, apoy, comprensión y gran paciencia para poder concluir este proyecto. **Gracias** por ser lo más importante y hermoso en mi vida.*

*A mis hijos **Ada Guadalupe** y **Chistian David** por su amor, por ser quiénes me motivan a seguirme superando día con día. Y les doy gracias por darle luz y alegría a mi vida.*

*A mi Madre **Paula Elena** por estar siempre a mi lado en todos los momentos y por todas sus enseñanzas que me han permitido llegar a este momento.*

*A mi Padre **Juan Fernando** por su amor y apoyo.*

*A mis hermanos **Ana María, Fernando, Aristeo** e **Ivonne** por ser parte importante en mi vida*

*A mis sobrinos **Jonnathan, Diego, Emmanuel, Raymundo, Fernanda, Dario** y **Daphne** por ser quienes dan alegría a mi vida.*

*A toda **mi familia** por ser quienes siempre me han ayudado, han estado conmigo en al buenas y en las malas y a **Dios** por darme la fuerza para cumplir mis objetivos.*

# ÍNDICE

	<b>Páginas</b>	
<b>RESUMEN.....</b>	<b>1</b>	
<b>SUMMARY.....</b>	<b>2</b>	
<b>ABREVIATURAS.....</b>	<b>3</b>	
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>4</b>	
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>		
1.1 HISTORIA DE LA TUBERCULOSIS.....	5	
1.2 EPIDEMIOLOGIA		
1.2.1 LA TUBERCULOSIS EN EL MUNDO.....	6	
1.2.2 LA TUBERCULOSIS EN MÉXICO.....	7	
1.3 AGENTE CAUSAL.		
1.3.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES.....	8	
1.3.2 CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL GENOMA.....	9	
1.4 TUBERCULOSIS: LA ENFERMEDAD.....	10	
1.5 PATOGENIA.....	11	
1.6 RESPUESTA INMUNE.....	12	
1.7 TUBERCULOSIS ENFERMEDAD LATENTE.....	15	
<b>II. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>17</b>	
<b>III. OBJETIVO GENERAL.....</b>	<b>21</b>	
<b>IV. OBJETIVOS ESPECIFICOS.....</b>	<b>21</b>	
<b>V. MATERIAL Y MÉTODOS</b>		
5.1. BACTERIAS.....	22	
5.2 ANIMALES.....	22	
5.3 SECUENCIA DE LA PGRS <i>RV1759c</i> .....	22	
5.4 CLONACIÓN Y EXPRESIÓN DEL DEL GEN <i>Rv1759c</i> EN <i>E. coli</i> .....	22	
5.5 PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS POLICLONALES.....	23	
5.6 SUEROS DE PACIENTES CON TUBERCULOSIS.....	24	
5.7 INMUNOELECTROMICROSCOPIA.....	24	

5.8 MODELO EXPERIMENTAL DE LA TUBERCULOSIS CRÓNICA EN RATONES.....	24
5.9 CUANTIFICACIÓN DE LOS NIVELES DE ARNm DEL GEN <i>Rv1759c</i> MICOBACTERIANO POR PCR EN TIEMPO REAL DURANTE LA INFECCIÓN CRÓNICA EXPERIMENTAL.....	25
5.10 LOCALIZACIÓN CELULAR DE LA PROTEÍNA <i>Rv1759c</i> EN LOS PULMONES DE RATONES CON INFECCIÓN EXPERIMENTAL LATENTE MEDIANTE LA TÉCNICA DE INMUNOHISTOQUÍMICA.....	27
5.11 LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE LA PROTEÍNA <i>Rv1759c</i> EN LOS PULMONES DE RATONES CON INFECCIÓN EXPERIMENTAL LATENTE MEDIANTE LA TÉCNICA DE INMUNOELECTRONMICROSCOPIA.....	28
5.12 PRODUCCIÓN DE IFN- $\gamma$ EN SOBRENADANTES DE CULTIVO CELULAR DE LINFONODOS MEDIASTÍNICOS, PULMONES Y BAZO DESPUÉS DE LA ESTIMULACIÓN CON EL ANTÍGENO <i>Rv1759c-C</i> DURANTE LA INFECCIÓN EXPERIMENTAL CRÓNICA.....	28
5.13 RESPUESTA DE HIPERSENSIBILIDAD RETARDADA A LA PROTEÍNA RECOMBINANTE <i>Rv1759c-C</i> EN RATONES.....	29
5.14 PREVENCIÓN DE LA REACTIVACIÓN DE TUBERCULOSIS MEDIANTE LA INMUNIZACIÓN CON LA PROTEÍNA RECOMBINANTE <i>Rv1759c-C</i> .....	30
5.15 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	30
<b>VI. RESULTADOS</b>	
6.1 SECUENCIA DEL GEN <i>Rv1759c</i> .....	31
6.2 EXPRESIÓN DE LA REGIÓN CARBOXILO TERMINAL DE LA PGRSR <i>v1759c</i> .....	32
6.3 LOCALIZACIÓN DE LA PROTEÍNA <i>Rv1759c</i> EN CÉLULAS DE <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv POR INMUNOELECTROMICROSCOPIA.....	33
6.4 CINÉTICA DE LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA <i>Rv1759c</i> DURANTE LA INFECCIÓN CRÓNICA EXPERIMENTAL .....	34
6.5 INMUNOGENICIDAD DEL ANTÍGENO MICOBACTERIANO <i>Rv1759c</i> .....	37
6.6 PROTECCIÓN EN CONTRA DE LA REACTIVACIÓN DE LA TUBERCULOSIS INDUCIDA POR CORTICOSTERONA EN RATONES CON INFECCIÓN LATENTE VACUNADOS CON EL ANTÍGENO <i>Rv1759c</i> .....	39
<b>VII. DISCUSIÓN</b> .....	41
<b>VIII. CONCLUSIONES</b> .....	45
<b>IX. LITERATURA CITADA</b> .....	46

## RESUMEN

El conocimiento de la biología de *Mycobacterium tuberculosis*, el agente causal de la tuberculosis humana, se ha desarrollado rápidamente permitiendo que varios genes hayan sido aislados y caracterizados. Esto ha sido posible en gran parte, a que actualmente se cuenta con la secuencia completa del genoma de varias especies de micobacterias incluyendo a las del complejo *Mycobacterium tuberculosis*. Dentro del genoma de estas últimas, se ha establecido la existencia de una familia de genes denominada PE/PE\_PGRS, a la cual pertenece el gen *Rv1759c*. En el presente trabajo determinamos que la región carboxilo-terminal de la proteína *Rv1759c* se unió a fibronectina y fue reconocida por los sueros de pacientes infectados con *M. tuberculosis*. Aunado a esto, utilizando un modelo experimental de tuberculosis crónica en ratones B6D2F1, se observó la expresión constante de este antígeno en la pared de las bacterias fagocitadas por macrófagos activados localizados en los granulomas pulmonares. La proteína, indujo la producción de IFN- $\gamma$  después de la estimulación de cultivos celulares procedentes de linfonodos mediastinales. Interesantemente, encontramos que la inmunización con la proteína *Rv1759c* a ratones infectados crónicamente previa al tratamiento con corticosterona para inducir la reactivación, previnó el incremento en las unidades formadoras de colonias, en comparación con los animales no vacunados tratados con corticosterona, los cuales mostraron un incremento significativo en las unidades formadoras de colonia. Estos resultados sugieren que el gen *Rv1759c* de la familia PE-PGRS es expresado por el bacilo tuberculoso en la infección crónica y por lo tanto, este antígeno pudiera jugar un papel importante en la respuesta inmune generada durante el desarrollo de la enfermedad, lo que hace a este antígeno un buen candidato como subunidad vacunal con el fin de prevenir la reactivación de la enfermedad.

## SUMMARY

The knowledge of the Biology of *Mycobacterium tuberculosis*, the casual agent of human tuberculosis is developed rapidly, allowing the cloning and characterization of several genes. This has been possible due to the availability of mycobacterial genome sequences, including those of *Mycobacterium tuberculosis* complex. The genome analysis of the members of the *M. tuberculosis* complex has shown, the existence of a gene family called PE/PE\_PGRS, being the Rv1759c a member of this family. In this work, it was found that the C-terminal region of this protein is able to binds to fibronectin and be recognized by sera of *Mycobacterium tuberculosis* infected individuals. In addition, by using an experimental model of chronic tuberculosis in B6D2F1 mice, the expression of this gene was persistently observed during the infection. The protein was detected in the cell wall of bacteria phagocytied by activated macrophages, located in granulomas. The antigen was able to induce the IFN- $\gamma$  production, after stimulation of cells from mediastinal lymph nodes. It is a worth of note, that the immunization of chronic infected mice with the antigen, before corticosterone treatment to reactivate the diseases, prevents the increased of Unit Forming Colonies, when compare with no vaccinated corticosterone treated animals, which showed a significant increased in Unit Forming Colonies compare with vaccinated animals. Together these results, suggest that the PE-PGRS *Rv1759c* gene is expressed during the chronic infection with tubercles bacilli and it be possible that the product of the gene could be playing an important role in the immune response generated during the chronic infection and therefore, it could be considerer a good candidate for a subunit vaccine for reactivation diseases prevention.

## Lista de abreviaturas

**AC:** Antes de Cristo

**BCG:** Bacilo de Calmette-Guerin

**OMS:** Organización Mundial de la Salud

**VIH:** Virus de la Inmunodeficiencia Humana

**GC:** Guanina – Citosina

**AT:** Adenina-Timina

**PE:** Prolina- Glutamina

**PPE:** Prolina- Prolina- Glutamina

**IS:** Secuencia de Inserción

**ARN:** Ácido Ribonucleico

**ADN:** Ácido Desoxirribonucleico

**MHC:** Complejo Mayor de Histocompatibilidad

**IFN- $\gamma$ :** Interferón gamma

**PGRS:** Secuencias Polimórficas Ricas en Guanina

**EBNA-1:** antígeno nuclear del virus del Epstein-Barr

**DR´s:** Secuencias Repetidas Directas

**RLFP´s:** Fragmentos Largos de Restricción Polimórficos

**PCR:** Reacción en Cadena de la Polimerasa

**PBS:** Solución Amortiguadora de Fosfatos Salina

**BSA:** Albúmina Sérica Bovina

**dNTP´s:** Deoxynucleotidos trifosfatos

**ADNc:** Ácido Desoxirribonucleico complementario

**FC:** Filtrado de Cultivo

**UFC:** Unidades Formadoras de Colonia

**Fn:** Fibronectina

**DTH:** Respuesta de Hipersensibilidad Retardada

**TNF:** Factor de Necrosis tumoral

**INO´s:** Oxido Nítrico Sintetasa

## LISTA DE FIGURAS

		<b>Página</b>
<b>Figura 1.</b>	Incidencia de la tuberculosis en el Mundo.....	<b>7</b>
<b>Figura 2.</b>	Incidencia de la tuberculosis en México.....	<b>8</b>
<b>Figura 3.</b>	Persistencia de las micobacterias.....	<b>12</b>
<b>Figura 4.</b>	Mecanismos de la respuesta inmune.....	<b>14</b>
<b>Figura 5.</b>	Mapa de las enzimas de restricción del gen PE-PGRS <i>Rv1759c</i> ....	<b>23</b>
<b>Figura 6.</b>	Secuencia del gen PE-PGRS <i>Rv1759c</i> de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv.....	<b>31</b>
<b>Figura 7.</b>	Esquema y secuencia de la proteína Rv1759c.....	<b>32</b>
<b>Figura 8.</b>	Expresión y purificación de la proteína recombinante Rv1759c-C...	<b>33</b>
<b>Figura 9.</b>	Inmunolectromicrografía del bacilo tuberculoso indicando la distribución de la proteína Rv1759c.....	<b>34</b>
<b>Figura 10.</b>	Cinética de la transcripción del gen <i>Rv1759c</i> por PCR en tiempo real en el modelo murino de tuberculosis crónica.....	<b>35</b>
<b>Figura 11.</b>	Porcentaje de macrófagos positivos a la proteína Rv1759c por inmunohistoquímica y morfometría automatizada del modelo murino de tuberculosis crónica.....	<b>36</b>
<b>Figura 12.</b>	Inmunolectromicrografía indicando la distribución de la proteína Rv1759c en micobacterias fagocitadas por macrófagos activados.....	<b>37</b>
<b>Figura 13.</b>	Concentración de IFN- $\gamma$ en suspensiones celulares de linonodos mediastínicos, pulmones y bazo en el modelo murino de tuberculosis crónica.....	<b>38</b>
<b>Figura 14.</b>	Respuesta de Hipersensibilidad Retardada a la proteína recombinante Rv1759c del modelo murino de tuberculosis crónica.....	<b>39</b>
<b>Figura 15.</b>	Carga bacilar en los pulmones de ratones vacunados con la proteína Rv1759c-C y desafiados con corticosterona.....	<b>40</b>

## I. INTRODUCCIÓN.

### 1.1 Historia de la tuberculosis

La tuberculosis es una enfermedad que ha afectado a la humanidad desde hace muchos siglos, las primeras referencias documentadas sobre ésta se encuentran en los jeroglíficos hallados en Egipto, Babilonia y China. También, existen evidencias morfológicas de lesiones de tipo tuberculoso en fragmentos de la columna vertebral en momias egipcias que vivieron entre 1550 y 1080 A.C. Las primeras descripciones anatómo-patológicas de la enfermedad comenzaron a realizarse en el siglo XVII. En 1679, Franciscus de la Boe fue el primero en identificar y caracterizar las lesiones macroscópicas asociadas con la enfermedad, denominándolas tubérculos. Posteriormente, Manget en 1702, describió los rasgos anatómo-patológicos de la tuberculosis miliar<sup>1</sup>.

En 1720, Marten fue el primero en afirmar que la tuberculosis podría ser causada por criaturas diminutas, que serían las responsables de generar las lesiones y síntomas de la enfermedad. El término tuberculosis, derivado del latín *tubercula* (protuberancia o nódulo pequeño), fue utilizado desde 1839<sup>2</sup>. En 1882, Robert Koch demostró que el agente causal de la enfermedad era un bacilo, en ese tiempo se le denominó "bacilo de Koch", y posteriormente se le denominó *Mycobacterium tuberculosis*. Koch identificó al bacilo en lesiones tuberculosas mediante la tinción de Ziehl-Neelsen. Los primeros registros sobre las epidemias causadas por esta bacteria aparecen en Europa y en los Estados Unidos en el siglo XIX, asociadas con la Revolución Industrial. En el siglo XIX, Bayle y Laënc establecieron las formas y estadios de la tuberculosis como enfermedad<sup>2</sup>.

En 1924, Albert Calmette y Alphonse Guérin desarrollaron una vacuna denominada BCG (Bacilo de Calmette-Guérin). Más tarde se descubrieron los

primeros antibióticos contra esta enfermedad, siendo la estreptomicina, descubierta por Selman Waksman en 1944, el primer agente quimioterapéutico específico contra la tuberculosis. Posteriormente se descubrieron otros agentes antifímicos como el ácido p-amino salicílico, la isoniacida, el etambutol y la rifampicina<sup>3</sup>.

## **1.2 Epidemiología**

### **1.2.1 La tuberculosis en el Mundo**

La tuberculosis continúa siendo un grave problema de salud pública en el mundo, a pesar de los avances para su diagnóstico, tratamiento y prevención. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que durante el periodo comprendido entre el 2000 al 2020 habrá 1 000 millones de individuos infectados por *M. tuberculosis*, de los cuales 200 millones enfermarán y 35 millones morirán si no se mejora el control y el tratamiento de la enfermedad. Las incidencias más altas de la enfermedad se presentan en los países subdesarrollados del continente Africano, Asiático y América Latina, como puede observarse en la Figura 1<sup>4</sup>. Actualmente la OMS estima que cada año, tres millones de personas mueren por tuberculosis y ocho millones se infectan; de éstos el 95% vive en países en vías de desarrollo. Así mismo, la OMS estimó que un tercio de la población mundial está infectada por *M. tuberculosis* de y solamente del 5-10% de los individuos infectados desarrollará la enfermedad<sup>5</sup>. Las condiciones que favorecen la tuberculosis en los países en vías de desarrollo son: la pobreza, la coinfección con VIH, la falta de control y de diagnóstico temprano y preciso<sup>6</sup>. Además, se ha estimado que la incidencia mundial de tuberculosis aumenta aproximadamente 0.4% al año<sup>7,8</sup>.

## Incidencia de tuberculosis 2001

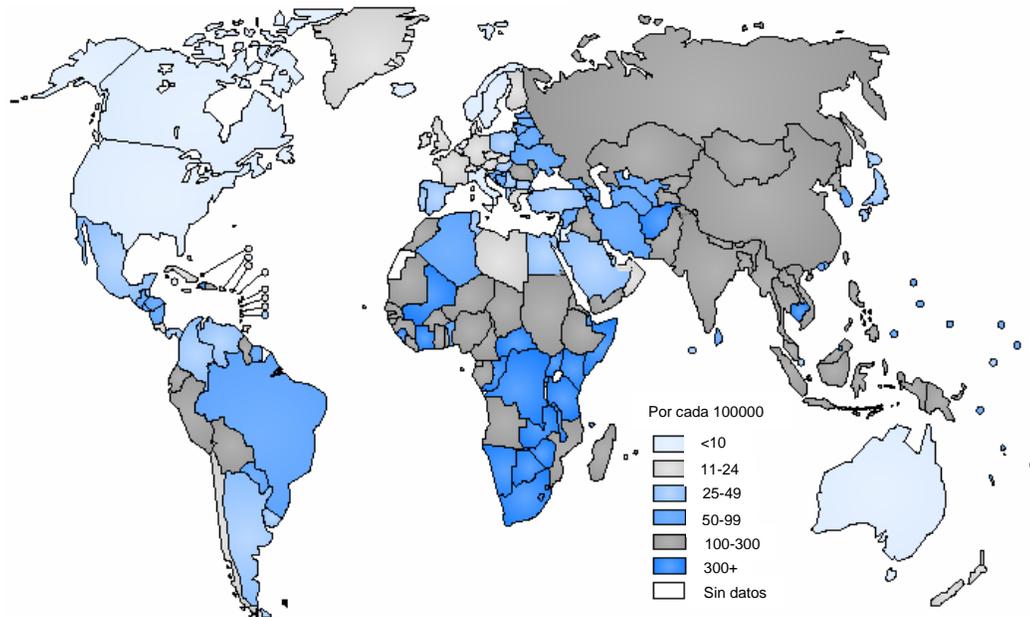


Figura 1. Tasas de incidencia de tuberculosis en el mundo en el año 2001, estimadas por la OMS. (Tomado del informe 2003 de la OMS).

### 1.2.2 La tuberculosis en México

En el 2001, la Secretaría de Salud determinó que la incidencia de tuberculosis en México fue de 18 por 100 000 habitantes<sup>9</sup>. Esta incidencia fue inferior al promedio latinoamericano, que a mediados de los años noventa se estimó en 32 casos nuevos por 100 000 habitantes. La infección por tuberculosis se observa principalmente en jóvenes y adultos de edad media que pertenecen a la población económicamente activa<sup>10</sup>. Otro problema grave que incrementa la incidencia de la tuberculosis en México y otras partes del mundo es la presencia de cepas multifármaco resistentes. Esto fue confirmado en un estudio realizado en tres estados de México en los que se observó una alta resistencia a los fármacos de primera elección<sup>11</sup>.

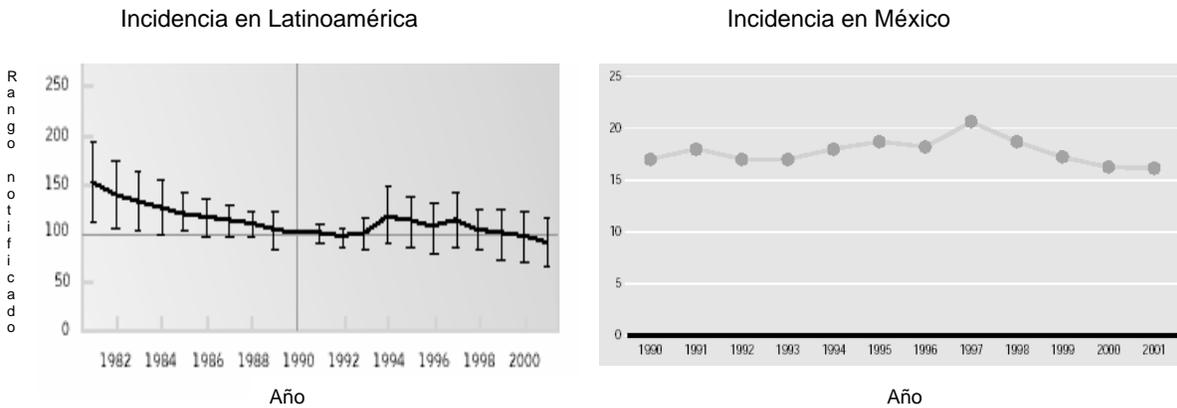


Figura 2. Incidencia de tuberculosis en Latinoamérica y México. A la izquierda se representa la tendencia de la tasa de casos notificados de 1981-2001 en Latinoamérica. (Tomada del informe de la OMS 2003). A la derecha se presenta la morbilidad por tuberculosis pulmonar en México de 1990 al 2001. (Tomado de Salud: México, 2001).

En el año de 1997, la OMS consideró a México como un país de alto riesgo para tuberculosis. Como se muestra en el Figura 2, la tasa de incidencia de esta enfermedad en México y Latinoamérica se ha mantenido relativamente estable en los últimos años. Sin embargo las diferencias entre entidades federativas son considerables, siendo los estados con mayor incidencia Baja California, Tamaulipas, Guerrero y Chiapas<sup>12</sup>. En México y otros países, la tuberculosis constituye un grave problema de salud y presenta importantes retos para su control, entre los que destacan, la asociación con la infección por VIH y la originada por micobacterias fármaco-resistentes<sup>13</sup>.

### 1.3 Agente causal

#### 1.3.1 Características generales

La tuberculosis es causada por bacterias del género *Mycobacterium*. La tuberculosis humana es causada principalmente por tres especies distintas de micobacterias, *M. tuberculosis*, *Mycobacterium bovis* y *Mycobacterium africanum*, siendo *M. tuberculosis* el patógeno más común<sup>1</sup>.

*M. tuberculosis* es un bacilo aerobio estricto, inmóvil, no esporulado, no encapsulado, con un tiempo de generación de 15 a 20 horas, que requiere de 2 a 6 semanas de cultivo, para observar colonias en medios sólidos. Su desarrollo puede favorecerse con una temperatura entre 35 y 37° C en una atmósfera enriquecida con O<sub>2</sub>. Microscópicamente es un bacilo alargado curvo de aproximadamente 0.4 x 3 µm. De acuerdo a la clasificación taxonómica, ésta bacteria pertenece a la clase Actinobacteridae; orden Actinomycetales; familia Mycobacteriaceae; género *Mycobacterium* y al complejo *Mycobacterium tuberculosis*<sup>1</sup>.

Las micobacterias se caracterizan por tener una gruesa capa de lípidos y ácidos micólicos, que al ser tratadas con alcohol ácido y teñidas con colorantes derivados de las anilinas como la fucsina fenicada, retienen esta coloración, por lo que se les ha denominado bacilos ácido-alcohol-resistentes. El alto contenido lipídico de la pared celular de la micobacteria favorece la resistencia a las defensas del huésped y posiblemente contribuyan a la patología de la enfermedad. Así mismo el bacilo está cubierto con una capa de lípidos que le confiere la capacidad de sobrevivir en un ambiente seco durante largos periodos<sup>2</sup>.

### **1.3.2 Características generales del genoma de *Mycobacterium tuberculosis*.**

El genoma de *Mycobacterium tuberculosis*, contiene un 67% de bases GC y 34% de bases AT, las cuales se encuentran contenidas en 3924 genes<sup>14</sup>. Con el análisis de estos, se ha podido inferir que el 40% de los genes codifican para proteínas con función conocida, basado en su similitud con otras proteínas bien estudiadas, que el 44% codifica para proteínas que tienen una función hipotética y el 16% restante para proteínas de las cuales se desconoce su función<sup>14</sup>.

Dentro de la secuencia del genoma se caracterizaron e identificaron 34 diferentes elementos repetidos, dentro de los cuales destacan las secuencias de inserción *IS6110* y *IS1081*, además de 2 familias de secuencias repetidas denominadas PE y PPE. Además de los elementos repetidos, es notoria la presencia de numerosos genes reguladores que corresponden a los factores sigma de la ARN polimerasa y cerca de 250 genes involucrados en la biosíntesis y degradación de lípidos<sup>14,15</sup>.

#### **1.4 Tuberculosis: La enfermedad**

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa crónica y debilitante en la que predominan con frecuencia los síntomas generales como fiebre, anorexia, debilidad, pérdida de peso y disnea. Cada persona enferma infectará en promedio entre 10 y 15 personas cada año. La tuberculosis se transmite fundamentalmente por vía respiratoria, a través de pequeñas partículas de menos de 10  $\mu\text{m}$  emitidas al estornudar, hablar o toser que contienen al bacilo. Con la tos pueden emitirse unas 3 000 partículas potencialmente infecciosas e igual número puede eliminarse al hablar cinco minutos y muchas más al estornudar. La mayoría de los pacientes tuberculosos eliminan pocos bacilos, por lo que generalmente se requiere un contacto continuo para infectarse, como sucede con la convivencia intrafamiliar. Sin embargo, una sola bacteria es teóricamente capaz de producir la enfermedad en un individuo inmunodeprimido<sup>16</sup>.

#### **1.5 Patogenia**

*M. tuberculosis* origina a lesiones características denominadas tubérculos. La infección inicial se produce cuando los bacilos alcanzan los alvéolos pulmonares.

Una vez establecida la infección se afectarán los segmentos posteriores de los lóbulos superiores por su preferencia por las áreas pulmonares mejor ventiladas<sup>17</sup>.

La principal vía de entrada de *M. tuberculosis* es la respiratoria. La ventilación bronquial favorece la deposición de los bacilos inhalados en los segmentos basales del lóbulo bajo, medio, de la lingula, o bien el segmento anterior del lóbulo superior, llamado "segmento de infección primario"<sup>18</sup>. Los bacilos tuberculosos inhalados son fagocitados por los macrófagos alveolares y transportados a los linfonodos locales. Los macrófagos infectados y los monocitos circulantes, una vez presentes en el sitio de infección comienzan a secretar enzimas proteolíticas, generando una lesión exudativa. Los fagocitos mononucleares activados inician la formación del granuloma con activación eventual de células T. El granuloma está formado por macrófagos infectados rodeados por células no infectadas como macrófagos y linfocitos. Solamente las partículas inhaladas más pequeñas, que contienen entre uno y tres bacilos, llegan al alvéolo y son fagocitados por los macrófagos alveolares. Unos bacilos son destruidos y otros pueden resistir los mecanismos defensivos celulares y provocar una primoinfección tuberculosa, con lo cual se constituye el llamado nódulo de Ghon, acompañado de linfangitis regional y adenopatía satélite<sup>19</sup>. Las bacterias pueden sobrevivir por largos periodos en los tejidos y linfonodos generando una enfermedad post-primaria (Figura 3). La repercusión sobre el pulmón se traduce en dos situaciones patológicas distintas:

- Primoinfección tuberculosa subclínica: ocurre por el contacto con el bacilo tuberculoso. Se caracteriza por la ausencia de síntomas y signos clínicos, radiológicos y bacteriológicos. Sin embargo, la prueba de tuberculina es positiva.

— Enfermedad tuberculosa: manifestaciones clínicas, radiológicas, bacteriológicas e inmunológicas<sup>20</sup>.

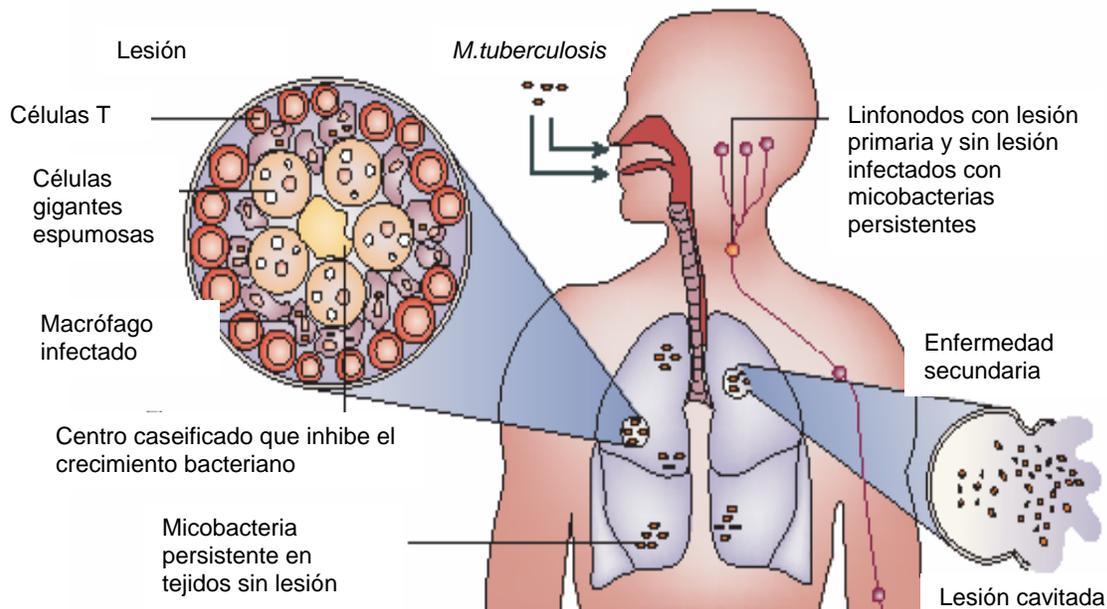


Figura 3. Persistencia de micobacterias. Tomado de Stewart G. et al. 2003. Tuberculosis: a problem with persistence. *Nature Rev Microb.* 1(2): 97-105

## 1. 6. Respuesta inmune

*M. tuberculosis* posee una gran variedad de biomoléculas en su pared celular, que interfieren en la función de los macrófagos y eventualmente permite la sobrevivencia de las bacterias en su interior. Inicialmente, cuando la micobacteria consigue llegar al alvéolo pulmonar, se produce una reacción

inflamatoria ligera en la que predominan los neutrófilos. Estas células son pronto substituidas por macrófagos que ingieren a los bacilos para ser luego transportados hacia el sistema linfático<sup>21</sup>. La capacidad de estos macrófagos para erradicar por sí

solos al bacilo tuberculoso en las primeras etapas parece ser muy escasa, quizá porque su función se ve interferida por los productos

liberados por la bacteria, de modo que, a pesar de la acción microbicida de los macrófagos, los bacilos siguen dividiéndose durante unas semanas<sup>22</sup>. Posteriormente, cuando los macrófagos presentan a los antígenos micobacterianos a través del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), se produce la activación de linfocitos T, que lleva a una expansión clonal y la liberación de citocinas que activan y atraen a más macrófagos al sitio de la infección para constituir un granuloma. Los granulomas están constituidos principalmente por macrófagos, que pueden transformarse en células epitelioides, las cuales tienen una menor capacidad microbicida, pero una mayor capacidad de síntesis de citocinas y en células gigantes multinucleadas tipo Langerhans, que son grupos de macrófagos cuyos núcleos se disponen en la periferia rodeando al bacilo tuberculoso<sup>23</sup>.

Las células epitelioides secretan una sustancia que estimula a los fibroblastos para la producción de colágeno. Esto contribuye a la formación de la cápsula del granuloma, la cual tiene la función de delimitar físicamente la lesión. Los linfocitos T activados estimulan a los macrófagos; estos a su vez comienzan a producir una gran cantidad de enzimas líticas con capacidad de destruir las bacterias e inducir necrosis celular y tisular de tipo caseoso, lesión que caracteriza al granuloma tuberculoso<sup>23</sup>.

La reacción granulomatosa, es la manifestación de una respuesta de hipersensibilidad de tipo tardío a los antígenos de la micobacteria<sup>24</sup>. Además, como parte de la respuesta a la infección por *M. tuberculosis*, los macrófagos producen IL-12 la cual promueve la producción de IFN- $\gamma$  por parte de las células T CD4+, T CD8+ y las células NK, que forman parte de la respuesta inmune de tipo Th1<sup>25</sup>. Tanto el IFN- $\gamma$  como la IL-12 son

esenciales para el desarrollo de células las T CD8+ y las células T doble negativas restringidas a CD1 así como de células citotóxicas CD8+ restringidas a MHC clase I capaces de matar a macrófagos infectados por *M. tuberculosis*<sup>26,27</sup>.

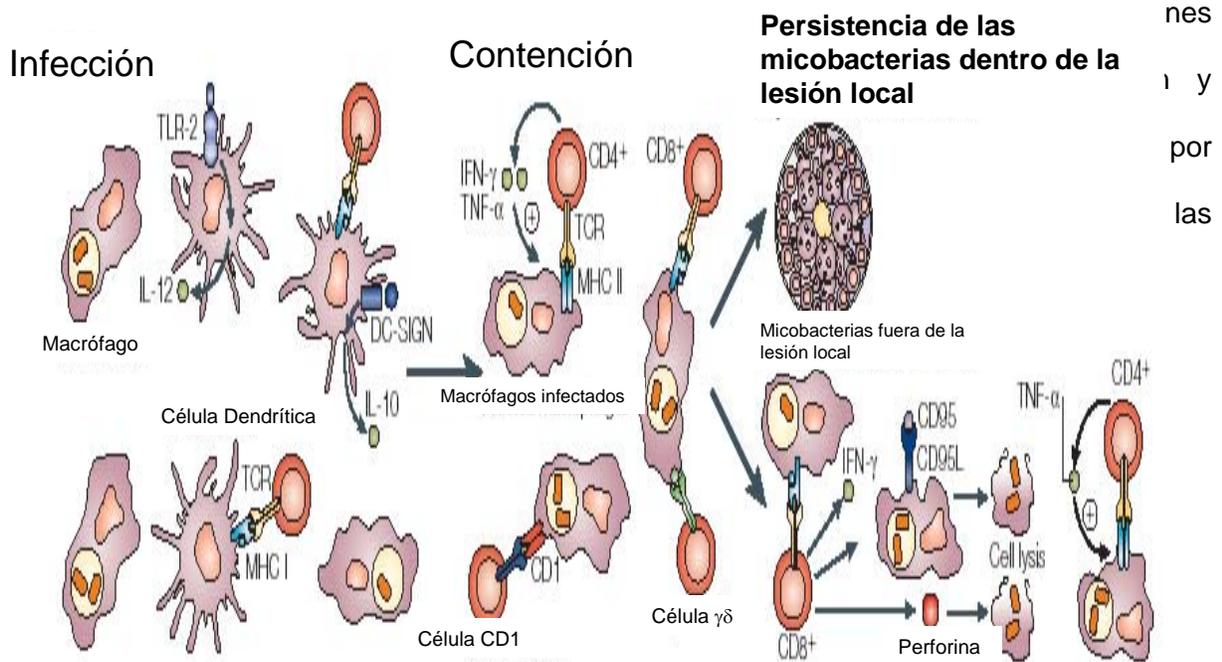


Figura 4. Persistencia de las micobacterias. Tomado de Stewart G. et al. 2003. Tuberculosis: a problem with persistence. Nature Rev Microb. 1(2): 97-105

### 1.7. Tuberculosis: Infección latente

La OMS ha estimado que una tercera parte de la población humana (dos mil millones de personas) tienen infección tuberculosa latente. Esta infección se caracteriza clínicamente por que los individuos son positivos a la prueba cutánea de la tuberculina y no presentan sintomatología, ni cambios radiológicos que indique enfermedad activa. Debido al gran número de individuos con infección latente, éstos representan un

enorme reservorio de casos potenciales que pueden llegar a desarrollar tuberculosis activa<sup>28,29</sup>. Es conveniente recordar que la mayoría de los casos de tuberculosis activa son consecuencia de la reactivación de la infección latente, por consiguiente se ha estimado que el 5% de las personas con infección tuberculosa latente pueden desarrollar tuberculosis activa durante su vida, mientras que las personas infectadas con el VIH el riesgo de desarrollar tuberculosis activa se incrementa en 10% año con año<sup>30-32</sup>. Aún cuando se considera que el bacilo tuberculoso en estado de latencia, se encuentra en los pulmones como una población limitada y con poca actividad metabólica, no se conocen los mecanismos que utiliza este microorganismo para sobrevivir, reactivarse e inducir la enfermedad activa<sup>33</sup>. Mediante el uso de diversos modelos experimentales se ha tratado de inducir a las micobacterias para que entren en estado de latencia. Ninguno de los modelos ha logrado hasta la fecha reproducir en forma idéntica la tuberculosis latente humana, sin embargo, a través de ellos se ha logrado empezar a dilucidar algunas de las condiciones que inducen los estados de latencia en el microorganismo, destacándose la hipoxia, la carencia de nutrimentos, la exposición al óxido nítrico entre otros. Así mismo, se han podido identificar algunos de los genes que parecen ser esenciales para el desarrollo de la latencia, como por ejemplo *acr* (*hspX*), *Rv2626c*, *Rv1738*, *fdx*, *acg* (*Rv2032*) y algunos factores sigma (*sigB*, *sigE*, *sigF*, *sigD*)<sup>28, 34-37</sup>.

Por la gran importancia que representa la tuberculosis latente humana como reservorio y origen potencial de tuberculosis activa, es necesario conocer de forma más precisa los mecanismo involucrados en la interacción huésped-parásito, que dan como resultado la infección latente. El conocimiento de estos

mecanismos indudablemente contribuirá al desarrollo de nuevos fármacos o vacunas que permitan el control y en medida de lo posible la erradicación de la tuberculosis

## II. JUSTIFICACIÓN

A partir de la secuencia del genoma de *M. tuberculosis*, se estableció que éste se encuentra constituido por 4'411,529 pares de bases, que codifican aproximadamente para 4000 genes. El contenido de G + C es de 65.6%, el cual es relativamente constante a través de todo el genoma. Sin embargo, existen regiones que muestran un mayor contenido de G + C<sup>14</sup>. En algunas de estas regiones se encuentran secuencias que pertenecen a una familia constituida por 61 genes denominados PGRS (del inglés Polymorphic GC-rich repetitive sequences), los cuales se caracterizan por presentar una secuencia consenso repetida de 9 pb CGGCGCAA<sup>38</sup>. Como parte central de este motivo se encuentra el triplete CGG o CRR (en donde R puede ser G o A). La estructura de las PGRSs sugieren que éstas pudieran aparecer como resultado de la expansión del triplete antes mencionado y esto a su vez pudo conducir a la formación de múltiples copias en "tandem" de este trinucleótido, dando origen al polimorfismo interno<sup>14</sup>. Esto concuerda con el patrón polimórfico observado en los ensayos de "Southern blot" cuando se utilizan las PGRSs como sondas<sup>39-41</sup>. Otras características importantes de las secuencias PGRS es que tienen frentes de lectura abiertos, que codifican para proteínas potencialmente ricas en glicina. El análisis de estas proteínas mostró que presentan una región amino-terminal conservada en sus primeros 110 aminoácidos, que tienen un motivo PE (Pro-Glu) y una conformación globular, seguida de un segmento carboxi-terminal que varía en tamaño, secuencia y número de copias repetidas<sup>14</sup>

Mediante estudios de hibridación molecular utilizando las PGRS como sonda específica y genómica comparativa, se ha podido demostrar que las PE\_PGRS no se encuentran exclusivamente en las micobacterias del complejo *M. tuberculosis*, se han detectado en *Mycobacterium marinum*, *Mycobacterium*

*gordoniae*, *Mycobacterium kansasii* y probablemente en *Mycobacterium smegmatis*, y en forma específica en *Mycobacterium lepra* se encontraron un número importante de secuencias PE\_PGRS en forma de pseudogenes<sup>40,38</sup>. Aunque su uso como marcadores de polimorfismo genético en estudios epidemiológicos de *M. tuberculosis* y *M. bovis*<sup>40,41</sup>, utilizando PGRSs identificadas antes de la secuenciación del genoma como la pTBN12 y pMBA2, fue extenso, en la actualidad la utilización de marcadores como las Repeticiones Directas (DRs) o las Secuencias de Inserción (IS), la IS6110 parecen ser mejores, debido a su gran estabilidad y al número de copias presentes (6-17)<sup>42</sup>.

En contraste, el polimorfismo de las PGRS parece adquirir gran importancia, como una fuente de variación genética y por lo tanto de variación antigénica, lo cual permitiría la alteración del perfil antigénico, y posiblemente la adaptación de la bacteria a los diferentes microambientes a los que se expondrá en su interacción con el hospedero. Aunado a esto, se ha visto que estas moléculas preferencialmente se localizan en la superficie de la bacteria<sup>43-45</sup>, lo cual adquiere importancia principalmente por su potencial interacción con moléculas de la matriz extracelular como la fibronectina<sup>39,46</sup>. Aunado a esto, recientes estudios demuestran que por lo menos algunas de estas proteínas parecen favorecer la interacción de la micobacteria con las células fagocíticas y contribuyen a la arquitectura de la pared celular. Estas observaciones están soportadas por la comparación de las PGRSs con otras proteínas ricas en glicina, como las presentes en la seda<sup>47</sup> y en la pared celular de las plantas<sup>48</sup>, que son notables por su gran elasticidad y fuerza a la tensión, lo cual sugiere que las PGRS de las micobacterias podrían igualmente fortalecer a la pared micobacteriana ante un medio ambiente adverso al cual se enfrentan las micobacterias, al encontrarse dentro de los granulomas por ejemplo.

Es también importante señalar que el dominio PGRS de las proteínas PE-PGRS presentan una alta homología con el antígeno nuclear del virus del Epstein-Barr (EBNA-1), esta última es esencial para la persistencia del virus en las células B humanas<sup>49</sup>. Aunque el EBNA-1 es el principal blanco para la respuesta inmune humoral, existen estudios que sugieren que los linfocitos T citotóxicos no son capaces de reconocer estas proteína, porque el dominio repetido de Gly-Ala, previene el procesamiento de las proteínas dependientes del proteosoma y la presentación de los antígenos a través del MHC-I<sup>49-50</sup>. El hecho de que las proteínas PGRS contengan múltiples repeticiones de Gly-Ala, sugiere que estas también pudieran inhibir el procesamiento de antígenos por la vía del MHC-I, lo cual evitaría el desarrollo de una respuesta inmune efectiva, permitiendo al *M. tuberculosis* persistir dentro del huésped por muchos años<sup>51-52</sup>

Al parecer estas secuencias también pudieran estar involucradas en virulencia, como se demostró en un estudio reciente con las PE-PGRS de *M. marinum*, ya que la eliminación de algunos genes PE\_PGRS entre otros efectos, disminuyó considerablemente la capacidad de la bacteria de replicarse en los granulomas<sup>53</sup>. Por todas estas razones es importante determinar el papel que estas proteínas pudieran tener en la biología de las micobacterias y en la relación bacteria-hospedero, así como determinar claramente su papel en la variación genética, aspecto muy importante desde el punto de vista evolutivo y en la variación antigénica, aspecto crucial desde el punto de de la respuesta inmune y por supuesto establecer el papel que juegan estas proteínas en la inducción de la respuesta inmune del hospedero y en la inmunopatología de la tuberculosis<sup>39</sup>. Es por esto que en el presente trabajo se estudió la expresión y la respuesta inmune inducida por el producto del gen *Rv1759c* en un modelo de tuberculosis crónica en el ratón. Este gen pertenece a la subfamilia de secuencias

polimórficas ricas en GC del complejo de *M. tuberculosis*. En estudios previos se observó que esta secuencia contiene un frente de lectura abierto que codifica para una proteína rica en glicina<sup>39</sup>. Así mismo, el análisis de los fragmentos de restricción polimórfica (RFLP's) del ADN de aislados clínicos de *M. tuberculosis*, utilizando como sonda la secuencia *Rv1759c*, confirmó la naturaleza polimórfica de esta secuencia<sup>39</sup>.

### III. OBJETIVO GENERAL

- Caracterizar la respuesta inmune inducida por la PE-PGRS Rv1759c de *Mycobacterium tuberculosis* en un modelo murino de tuberculosis crónica.

### IV. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- Clonar y expresar el gen PE-PGRS Rv1759c en *E. coli*.
- Producir anticuerpos policlonales en conejo en contra de la proteína recombinante.
- Determinar la presencia de anticuerpos en contra de la Rv1759c en los sueros de pacientes con tuberculosis.
- Determinar por inmunoelectromicroscopia la localización celular de la proteína Rv1759c en *M. tuberculosis*.
- Cuantificar los niveles de ARNm del gen PE-PGRS Rv1759c micobacteriano por PCR en tiempo real durante la infección crónica experimental.
- Determinar la localización celular de la proteína PE-PGRS Rv1759c en los pulmones de ratones con infección experimental crónica mediante la técnica de inmunohistoquímica.
- Identificar la localización subcelular de la proteína PE-PGRS Rv1759c en los pulmones de ratones con infección experimental crónica mediante la técnica de inmunoelectromicroscopia.
- Cuantificar la producción de IFN- $\gamma$  en sobrenadante del cultivo celular de las células obtenidas de linfonodos mediastínicos, pulmones y bazo después de la estimulación con el antígeno PE-PGRS Rv1759c durante el curso de la infección experimental crónica.
- Medir la respuesta de hipersensibilidad retardada a la proteína recombinante Rv1759c en ratones con infección experimental crónica.
- Prevenir la reactivación de la infección experimental tuberculosa crónica en ratones mediante la inmunización con la proteína recombinante Rv1759c.

## V. MATERIAL Y MÉTODOS

### 5.1 Bacterias

*M. tuberculosis* H37Rv fue obtenido de la colección de cultivo tipo (ATCC, Rockville MD, USA). La bacteria fue crecida en el medio Middlebrook 7H9 (Difco Labs, Detroit, MI, USA) y suplementado con OADC (Difco Labs). Después de un mes de cultivo, las bacterias fueron cosechadas y ajustadas a una concentración de  $4 \times 10^3$  en 100  $\mu$ l de PBS, se alicuotaron y se mantuvieron a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. Inmediatamente antes de ser inoculados, los bacilos fueron contados y se verificó su viabilidad.

### 5.2 Animales.

Se utilizaron ratones, hembras de ocho semanas de edad B6D2F1 (C57BL/6J x DBA2/J) los cuales se obtuvieron de los laboratorios Jackson (Labs. Jackson Mar Harbor, ME, USA). El trabajo con animales se llevó a cabo en el bioterio del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y de la Nutrición Salvador Zubirán en conformidad con la **NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999**, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

### 5.3 Secuencia PE- PGRS Rv1759c.

El gen PE-PGRS *Rv1759c* contenido en el plásmido pUC19 dentro de un fragmento *Sa*II de 3.9 Kb fue donado al laboratorio por la Dra. C. Aboud-Zeid. (Imperial College School of Medicine at St. Mary's, London, U.K.).

### 5.4 Clonación y expresión del dominio PGRS de la proteína Rv1759c en *E. coli*.

Del fragmento *Sa*II de 3.9 Kb (Figura 5a) se obtuvo el fragmento *Sma*I / *Sa*I de 1.5 Kb que corresponde a la región carboxilo-terminal de gen *Rv1759c* (Fig 5b), el cual fue subclonado en el plásmido pQ32 del sistema Quiagen express (Quiagen, Valencia, CA, USA). Con esta construcción, se transformó la cepa de *E. coli* XL-1 Blue. La expresión de la proteína recombinante fue inducida por la adición de IPTG y monitoreada en geles de PAGE-SDS. Con este sistema de expresión se obtuvo una proteína recombinante

truncada de 40 kDa, la cual contiene el dominio carboxilo terminal rico en glicina o dominio PGRS, a esta proteína la denominamos Rv1759c-C. Esta fue purificada por cromatografía de afinidad a metales utilizando el sistema Quiagen express (Qiagen).

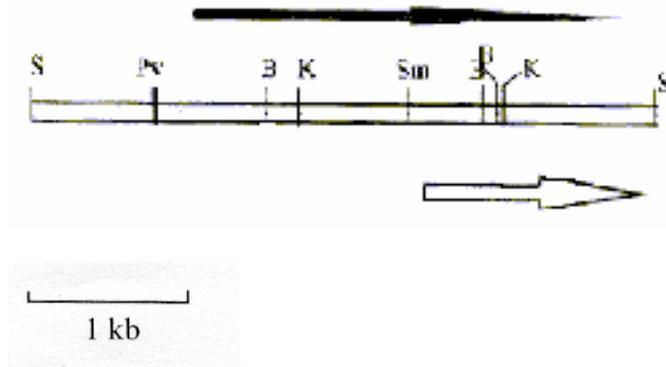


Figura 5a. Mapa de restricción de la Rv1759c. La flecha superior indica la región codificadora. Figura 5b La flecha inferior indica el fragmento de ADN que fue expresado y utilizado para los ensayos de "Western-blot" con los sueros de pacientes tuberculosos y para la producción de anticuerpos policlonales en conejo. Abreviaturas: S, *SalI*, Pv, *PvuII*, B, *BamHI*, Sm, *SmaI*, K, *KpnI*.

### 5.5 Producción de anticuerpos policlonales en conejo dirigidos contra la PGRS Rv1759c-C.

La proteína recombinante purificada fue utilizada para la inducción de anticuerpos policlonales en dos conejos blancos Nueva Zelanda de 2 meses de edad, de acuerdo al siguiente esquema de inmunización (ver Tabla 1).

Tabla I. Esquema de inmunización

Día	Cantidad de inóculo	Vía de administración
1	100 µg de la proteína + 100 µl de adyuvante incompleto de Freund en 800µl de PBS estéril.	Subcutánea
14	100 µg de la proteína + 100 µl de adyuvante incompleto de	Subcutánea

	Freund en 800µl de PBS estéril.	
28	100 µg de la proteína + 100 µl de adyuvante incompleto de Freund en 800µl de PBS estéril.	Subcutánea
60	100 µg de la proteína + 100 µl de adyuvante incompleto de Freund en 800µl de PBS estéril.	Subcutánea
90	100 µg de la proteína.	Intradérmica

### **5.6 Suero de pacientes con tuberculosis.**

Los sueros de pacientes con tuberculosis pulmonar fueron proporcionados amablemente por el Dr. Raúl Cicero Sabido, Jefe de la Unidad de Neumología del Hospital General de México de la SS. El diagnóstico de tuberculosis fue confirmado por cultivo bacteriológico.

### **5.7 Inmuno-electromicroscopía en el bacilo.**

Con la finalidad de establecer la localización de la proteína Rv1759c, se cosecharon las bacterias de un cultivo de 8 semanas de la cepa H37Rv por centrifugación e inmediatamente se fijaron con paraformaldehído al 4%, posteriormente las micobacterias se incluyeron en resina LR-White. Una vez incluidas fueron cortadas a 70 Å y colocadas en rejillas de níquel, donde fueron incubadas durante 24 h con el anticuerpo primario anti- Rv1759c diluido 1:20 en PBS con 1% de BSA y 0.05% Tween 20. Después, las rejillas fueron lavadas intensamente con PBS y posteriormente incubadas con el anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con partículas de oro con un tamaño de 10 nm, diluido 1:40 en el mismo regulador que se utilizó para el anticuerpo primario. Las rejillas fueron observadas en un microscopio electrónico Zeiss M-10.

### **5.8 Modelo experimental de tuberculosis crónica en ratones**

El modelo experimental de tuberculosis crónica en ratones, utilizado en este trabajo presenta algunas características similares a la infección latente en humanos: entre otras destaca el mantenimiento durante un periodo largo un número bajo y estable de

bacilos en el pulmón, sin que los animales presenten evidencias de enfermedad activa y sin mortalidad. Este modelo ha sido descrito y evaluado ampliamente por el Dr. Rogelio Hernández-Pando en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y de la Nutrición Salvador Zubirán de la Secretaría de Salud<sup>44</sup>.

Para inducir la infección crónica estable se emplearon ratones hembra B6D2F1 (C57BL/6J x DBA2/J) las cuales fueron anestesiadas con 56 mg/kg de pentotal sódico aplicado vía intraperitoneal. Posteriormente la traquea fue expuesta por una pequeña incisión en la línea media en la región cervical, en donde se inyectaron 100 µl de solución salina fisiológica conteniendo una concentración de  $4 \times 10^3$  micobacterias de la cepa H37Rv. La incisión fue suturada y los ratones se mantuvieron en grupos de 5 animales dentro de micro-aisladores conectados a presión negativa. Todos los procedimientos se realizaron en campanas de bioseguridad nivel III. El trabajo con los animales se realizó de acuerdo a la **Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999**. Dos experimentos por separado se realizaron con 24 animales cada uno. Grupos con ocho ratones se sacrificaron por desangrado a los días 30, 90, 150 días después de la inoculación intratraqueal.

### **5.9 Cuantificación de los niveles de ARNm del gen Rv1759c micobacteriano por PCR en tiempo real durante la infección crónica experimental**

La extracción total de ARNm de los pulmones se realizó de la siguientes forma: el tejido pulmonar se fragmentó y posteriormente se colocó en 2 ml de amortiguador de lisis (26 mM citrato de sodio/4M tiocinato de guanidina/0.5% *N*-lauril sarcosina/0.125 M 2-mercaptoetanol, pH 6.0) en tubos eppendorf con perlas de zirconia/silica ( $\phi = 1$  mm and 0.1 mm). Los tubos fueron entonces colocados en un homogenizador Mini-Bead Beater-8 (Biospec Products, Bartlesville, OK). El homogenizado fue tratado con fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1) y cloroformo. La fase acuosa resultante fue

precipitada con etanol absoluto a  $-20^{\circ}\text{C}$  toda la noche. La pastilla fue recuperada por centrifugación, tratada con el reactivo TRI (Molecular Research Center, Cincinnati, OH) durante cinco veces para remover el ADN cromosomal, de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El ARN total, fue disuelto en 50–200  $\mu\text{l}$  de agua bidestilada tratada con DEPC y almacenado a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Los oligonucleótidos para los genes *16S* y *Rv1759c* de *M. tuberculosis* fueron diseñados con el software Primer Express, versión 2.0 (Applied Biosystems, USA). Las secuencias sentido y antisentido fueron las siguientes *Rv1759c* (5'-cctgcagcaggacattctca-3', 5'-gtcaatgcctcggtgggtt-3') y *16S* (5'-atgacggccttcgggtgtaa-3', 5'-cggctgctggcagtagttg-3'). La calidad y concentración del ARN fue evaluado por espectrofotometría (Absorbancia 260/280 nm) y en geles de agarosa. La síntesis de ADNc se realizo con 5  $\mu\text{g}$  ARN total, 2  $\mu\text{M}$  of Oligo (dT) 15 RT oligo (Promega, Madison, WI,USA), 10 unidades/ $\mu\text{l}$  inhibidor de la ribonucleasa (Invitrogen, Carlsbad, CA,USA), 1x amortiguador RT, 0.5 mM de cada dNTPs y 4 unidades de transcriptasa reversa Omniscript (Qiagen, Valencia, CA, USA). La reacción de PCR utilizando los oligos para el gen *16S* se llevó a cabo en alícuotas de ADNc. El producto de PCR fue utilizado para la cuantificación en geles de agarosa. La concentración del ADNc se determino comparando la intensidad de la fluorescencia del fragmento *16S* con fragmentos de ADN teñidos con SYBR Green (Invitrogen) de concentración conocida. El PCR cuantitativo en tiempo real

fue realizado con el sistema QuantiTect SYBR Green y con el PCR master mix (Qiagen). El número de amplicones, fue medido por PCR tiempo real utilizando oligos para genes específicos. Para obtener una curva estándar, se realizaron cuatro PCR's en forma paralela utilizando como muestra diluciones dobles del gen *16S* de *M. tuberculosis* H37Rv de concentración conocida ( $10^2$  a  $10^8$  copias) junto con una muestra

sin caracterizar. Las reacciones de PCR se realizaron en tubos sellados en placa para 96 pozos en el termociclador espectrofluorométrico Prism 7500 (Applied Biosystems, USA) en un volumen total de 20µl. Las mezclas de reacción contenían 0.5 µM de los oligos de la muestra y del control, 12.5 µl de la mezcla maestra, 1µg de ADNc. Las condiciones para llevar a cabo las reacciones fueron las siguientes: Temperatura inicial de desnaturalización por 15 min a 95°C seguido de 40 ciclos a 95°C por 20 seg, 59°C por 20 seg y 72°C por 34 seg. Se realizaron tres experimentos independientes.

#### **5.10 Localización celular de la proteína Rv1759c en los pulmones de ratones con infección experimental latente mediante la técnica de inmunohistoquímica**

Los pulmones fueron perfundidos vía endotraqueal con etanol al 100%, fijados por 24 h y embebidos en parafina en forma rutinaria. Secciones de pulmón de 3 µm de grosor fueron teñidas con Hematoxilina y Eosina. Para inmunohistoquímica, los cortes de pulmón se colocaron en laminillas previamente cubiertas con silano al 3%, desparafinados e inactivada la actividad de peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno al 0.03% en metanol absoluto. El tejido pulmonar fue incubado por 12 h a temperatura ambiente con el anticuerpo policlonal de conejo dirigido en contra del dominio PGRS de la PE-PGRS 1759c<sup>39</sup> y con el anticuerpo policlonal anti-BCG (Dako Lab, Carpintería, CA, USA). Los anticuerpos unidos se detectaron con un anticuerpo de cabra en contra de IgG de conejo marcado con peroxidasa (Vector, Burlingame, CA, USA) y revelado con diaminobencidina (Sigma Co., St Louis, USA) y contrateñido con hematoxilina. Para cuantificar, se tomaron cinco campos al azar de cada lóbulo pulmonar y evaluado a 200x aumentos. Las células positivas y negativas dentro del granuloma y áreas de alveolitis para inmunohistoquímica, fueron contadas con un analizador de imágenes computarizado QWin Leica 500 (Leica Imaging Systems, Cambridge, UK) y los datos se expresaron como porcentaje de células positivas<sup>44</sup>.

### **5.11 Localización subcelular de la proteína Rv1759c en los pulmones de ratones con infección experimental latente mediante la técnica de inmunoelectromicroscopia**

Fragmentos de pulmón fueron fijados en paraformaldehído al 4%, disuelto en el amortiguador de Sorensen a pH 7.3, después fueron deshidratados a diferentes concentraciones de etanol. Posteriormente, los tejidos fueron embebidos en una resina hidrosoluble (LR-White, London Resin Co, Hampshire, UK). Se obtuvieron secciones de 60 a 90 nm y se colocaron en rejillas de de nickel (Electron microscopy Science, Fort Washington, Pennsylvania, USA). Las gradillas fueron incubadas con el anticuerpo policlonal de conejo dirigidos contra la proteína Rv1759c-C. Como anticuerpo secundario se utilizó un antisuero de cabra conjugado a partículas de oro de 10nm dirigido contra las IgG de conejo (Amersham, Braunschweig, Germany). El antisuero fue diluido en PBS 1/30. Después de varios lavados con PBS, las rejillas fueron contrateñidas con citrato de uranilo y revisadas en un microscopio electrónico Zeiss M-10. Los controles negativos consistieron en sustituir el anticuerpo primario con un anticuerpo irrelevante.

### **5.12 Producción de IFN- $\gamma$ en sobrenadantes de cultivo celular de linfonodos mediastínicos, pulmones y bazo después de la estimulación con el antígeno Rv1759c-C durante la infección experimental crónica**

Para definir la inmunogenicidad del antígeno Rv1759c-C durante la infección experimental latente, se obtuvieron las suspensiones celulares de linfonodos mediastínicos, pulmones y bazo a diferentes tiempos de infección y se comparó la producción de IFN- $\gamma$  inducido por la estimulación con los antígenos del filtrado de cultivo de *M. tuberculosis* (FC) y el antígeno Rv1759c-C. Los filtrados del cultivo fueron cosechados de cultivos de *M. tuberculosis* H37Rv, cultivados durante 4-5 semanas como fue descrito anteriormente. Posteriormente, el FC fue precipitado con 45% de

sulfato de amonio (w/v), lavado y resuspendido en PBS. La proteína Rv1759c se obtuvo mediante cromatografía de afinidad utilizando el sistema Xpress de Quiagen como se describió anteriormente. Después de sacrificar a los ratones, los pulmones, bazo y linfonodos mediastínicos fueron removidos inmediatamente y colocados en 2 ml de medio RPMI con 0.5 mg/ml de colagenasa tipo II (Worthington, NJ, USA) e incubados por 1 hora, posteriormente se disgregaron y se pasaron a través de una rejilla de 70  $\mu\text{m}$  y lavadas con medio RPMI. Las células fueron centrifugadas a 1500 rpm durante 5 minutos, el sobrenadante fue recolectado y los glóbulos rojos se eliminaron mediante una solución de lisis. Después de lavar las células, estas fueron resuspendidas en medio RPMI suplementado con 2mM glutamina, 100 U/ml de penicilina y 1 $\mu\text{g}$ /ml de estreptomicina y 10% de suero fetal bovino (Sigma).  $10^6$  células por ml fueron distribuidas en cajas de cultivo con y sin los antígenos FC y Rv1759c-C. Después de 72 h de estimulación los sobrenadantes se colectaron y se utilizaron para cuantificar el IFN- $\gamma$ , mediante la técnica de ELISA con un kit comercial (Pharmingen, San Diego, CA, USA). Con estudios preliminares de dosis respuesta se observó que la concentración óptima de los antígenos para la estimulación fue de 10  $\mu\text{g}$  durante 72 h.

### **5.13 Respuesta de hipersensibilidad retardada a la proteína recombinante Rv1759c-C en ratones.**

La respuesta de hipersensibilidad retardada (DTH) se evaluó en los ratones B6D2F1/J infectados crónicamente a los 330 días post-infección así como en los ratones control. Se aplicaron 10  $\mu\text{g}$  en 40  $\mu\text{l}$  de PBS por vía intradérmica en el cojinete plantar derecho de cinco ratones tanto de la proteína recombinante Rv1759c-C como del FC. La lectura del incremento del tamaño del cojinete plantar fue medida en micras cuadradas con un vernier y se tomó a las 48 h después del reto.

#### **5.14 Prevención de la reactivación de tuberculosis mediante la inmunización con la proteína recombinante Rv1759c-C**

Los animales con cinco meses de infección latente estable fueron vacunados con la Rv1759c-C, para evaluar su habilidad para prevenir la reactivación inducida por corticosterona suplementada en el agua de bebida. En dos diferentes experimentos, a dos grupos de ratones de seis animales cada uno, les fue administrada por vía subcutánea en la base de la cola 10 µg de la proteína Rv1759c-C disuelta en 100 µl de PBS. La vacuna se administro una vez por semana durante tres semanas en paralelo con el grupo control, que solo recibió PBS, Cuatro semanas después de la última vacunación, los ratones recibieron durante un mes 3 mg/l de corticosterona (Sigma) en el agua de bebida para inducir la reactivación de la enfermedad. Después de un mes de la administración de la corticosterona (Sigma), los animales fueron sacrificados, el pulmón y el bazo fueron disecados e inmediatamente homogenizados en un Polytron (Kinematica, Luzern, Suiza) en tubos estériles de 50 ml los cuales contenían tres ml de solución salina isotónica. Se hicieron entonces cuatro diluciones de cada homogenizado, las cuales fueron extendidas en placas de bacto agar Middlebrook 7H10 enriquecido con OADC (Difco Labs, Detroit, MI, USA, USA). Después de 21 días. Se contabilizaron las unidades formadoras de colonia (UFC's).

#### **5.15 Análisis Estadístico**

Cada experimento se realizó por lo menos dos veces y los resultados de cada uno de ellos se expresaron como promedio  $\pm$  desviación estándar. Para determinar las diferencias entre cada experimento los datos fueron comparados utilizando la prueba de *t-student's* para datos pareados utilizando la versión 10.0 del programa SPSS para Windows. Se determinó como significativamente diferentes si el valor de  $p < 0.05$

## VI. RESULTADOS.

### 6.1 Secuencia del gen PE-PGRS *Rv1759c*

La secuencia de DNA del fragmento *Sal* de 3.9 kb mostró 100% de homología con la secuencia del gen *Rv1759c*<sup>38</sup> reportada en la base de datos, así mismo, el patron de restricción de ambas secuencias fue idéntica. Esta secuencia, presenta un frente de lectura abierto de 2.7 kb, el cual codifica para un proteína putativa rica en glicina con un peso molecular calculado de 74.2 kDa. A lo largo de la secuencia se observa el motivo de 9 pb CGG CGG CAA que caracteriza a esta familia de genes como lo describió Poulet<sup>38</sup>. Además es interesante señalar, que en esta secuencia se presenta el motivo CpG dentro de un hexámero palindrómico (por ejemplo GACGTC), el cual se ha sugerido sea una secuencia inmunoestimulante (Figura 6). A nivel de proteína, al igual que las otras proteínas putativas de la familia PE-PGRS, nuestra proteína presenta una secuencia amino terminal altamente conservada en sus primeros 110 aa y dentro de esta región se encuentra el motivo PE (Pro-Glu), seguido de una región carboxilo terminal en donde se encuentran varios motivos GGXGG (Figura 7).

```

atgtcgtttg gcccggagact atcgcggcgg cggcgacgga tctagccgat ctcggctcga cgatcgtctg ggccaacgcg gctcggcggc ccaacacgac
gagcctgctg gccgcgggtg ccgatgagat ctccggcgca atcgtctcgt tgttggcgcg gcaacggcgg gcctatcagg cggcgagcgc cggagcggcg
gcgtttcaatg gtcgggttcgt gcaggcgtgt accaccgggg gggggccta tgccggccgc gaggccgcgc ccgtgacgcc gctgctcaac tcgatcaacg
cgcccgctcct ggccgctacc ggccgctccg tgatcggtaa cggggctaac ggtgctcccg gcaacggggc caacggaggg gatccggct ggttgatcgg
caacgggtgg gccggcggtat ccggtgcaaa gggcgccaac ggggggctg gttggccctg tggggccgcc gggctgttcg gcaacggcgg ggccggcggt
gccggcgga caacggcgcc caacaacggg atcggcgggg ccggtggcgc tggcgggtcc gccatgctgt ttggggccgg cggcgccggc ggcccgcgcg
gggctcgac gtctctgttc ggtggcatcg gcgtaccgg cggaaacgggc ggcaacggcc gtatgctcgc cggcgccgcc gggcgccggc gtcggcgcg
gttcagcttc agcactcgcg gggggctgg cggcgccggc gggggcggg ggtgttccac caccggcggt gtccggcgcc ccggtgggca ggttcaacg
ggcggggcgg ggcggccggc cggggccggc ggggttttg gtccggcgcc catggggcgg gcggggcgat tcggggatca cggaaacgct cggaccggc
ggcggcgcg ggaacggtgg ggccgggtt tgttcggcgc cggcggggac gggggggcag gcgggtcaag actgaccacc ggcggcgctg ccgtaacgg
tggttaacgc ggacccttt ccctgggtgc cgcgggtggc gggcggggca ccggtggggc tggcggaact gtcttcggtg gttgtaaggg cggcccgggc
ggagccggcg gtaacggcg catgctcttc ggtcggcgcc ggggtggcgg caccggcggg ttcggcttcg ccgcccggcg gcaaggtggg gtcggcgcca
gcgcggcat gctcagcggc tcggcggggt cggcggtgc tggcggtctc tggcggtctc gggggccccg cgggaccgc gcagggtggg cgggtggggc
gcccgggtg atcgccaacg gcggcaacgg cggcaacggc ggcgagagt ggcgcaacgg tgggtgggg gggcgcggtg gaaatgccgt gctgatcggc
aacggcgcg agggcgccat cggcgcgctc gccggcaagt ccggtctcgg cggcttcggc ggttgcctg tgggscgcca aggcattgac cgggaccccg
gcacctcgc atggcaaac ctgcagcagg acattctcag tttcatcaac gaaaccaccg aggcattgac cgggaccccg cgggaccccg cgggaccccg
tggaacgc ggaaccgggg acgatggcg tgccggcggc tgggtgttc gcaacggcgg caacggcggg gccggtgcgg ccggcaccaa cggcagcgc
ggcggcgccg gttgggcaag cgggatcctg tttggcaccg gttggcggc cggggccggc ggcctcggaa cggcggttc gcggcgggcc ggtggcgccg
gcggatccgc cttctgatc ggttcggcg gtaaccggtg tgcggcggg gtcggcggg gccgccacca ccaccggcgt gtcggcggg gcccggggga acgcccggct
gctcatcggc gcggctgggc tcggcggggt tggcgggcgc gcttcaacc caaccgggac cactggcggc gccggcgggg ctggcgggcg tgcggggtg
ttcgccaacg gggggcggc cggcgccggc gggacggcga gcaacggcgg gggcgccggc gggcgccggc gggcgccggc gctgtaccgc caccggggaa
ccggcggaac aggtgggaac gacgttcca cggggcgcg agggacagg ggtgcggcg ggcocgggtg gctgtaccgt gcccgcgctg cttggcgggc
cggcgctcat gggggcatgg cggggcgatg ccggcgggg tggggggta gggcgcaatg ctggctcgt caacctcaat ggcctcggcg gtcggcgcg
tccagcctgt caggcaagg ccgtgctggc gggccggcg gcagcgcggg gcaacggcgg ggcctcggcg gggcgggcg caacggggcg taacggcctc
atggcactgg cgtgatggc ggcacgggtg gggccggcca aatcaccggc cttcgacgc gcttcggcg cggcgggcg gcccgggcg ccagcgctc
cggcgccggc ggaacggcg gcgcccggcg caagggcggc ctgtaccgca acggcggtg acggcggtg cggtgggcgc gggcggggat ggcaccacg
ggagccggc gcaacggcgt ggtgatcggc aacggcgcca acggcggcaa tggcggaaaa gccgggggca cggcggggtg cggcgggcgc
tactcggcg ggtggggcag cagggcttga cgtagtatc gcggt

```

Figura 6. Secuencia del gen *Rv1759c*. Frente de lectura abierto de 2.7 kb.  
 Motivo de 9 pb CCG CGG CAA característico de la familia PGRS  
 Hexámero palindrómico GACGTC ejemplo de secuencia inmunoestimulante



## PE-PGRS (*Mycobacterium tuberculosis* Rv1759c)

```

MSFVIAVPET IAAAATDLAD LGSTIAGANA)AAAANTSSL AAGADEISAA IAALFGAHR AYQAASAEAA AFHGRFVQAL TTGGGAYAAA EAAAVTPLLN
SINAPVLAAT GRPLIGNGAN GAPGTGANGG DAGWLIENGG AGSGAKGAN GGAGGPGGAA GLFGNGGAGG AGGTATANNG IGGAGGAGGS AMLFGAGGAG
GAGGAATSLV GGIGGTGGTG GNAGMLAGAA GAGGAGGFSF STAGGAGGAG GAGGLEFTTG VGAGGQGGHT GGAGGAGGAG GLFGAGGMGG AGGFGDHGTL
GTGGAGDGG GGLFGAGGD GGAGSGLTT GGAAGNGNA GTLSLGAAGG AGTGGAGGT VFGGKGGAG GAGGNAGMLF GSGGGGTGG FGFAAGGQGG
VGGSAGMLSG SGGSGGAGGS GGPAGTAAGG AGGAGGAPGL IGNGNGNGG GESGGTGGV GAGGNAVLI NGGEGGIGAL AGKSGFGGFG GLLLGADGYN
APESTSPWHN LQQDILSFIN EPTEALTGRP LIGNGDSGTP GTDDCGAGC WLFNGGNGG AGAAGTNGSA GGAGGAGGIL FGTGGAGGAG GVTAGAGGA
GGAGGS AFLI GSGGTGGVGG AATTTGGVGG AGNAGLLIG AAGLGCCGGG AFTAGVTTGG AGGTGGAAGL FANGGAGGAG GTGSTAGGAG GAGGAGGLYA
HGGTGGPGGN GGSTGAGGTG GAGGPGGLYG AGSGGAGGH GMAGGGGGV GGNAGSLTLN ASGGAGGSGG SSLSGKAGAG GAGGSAGLFY GSGGAGNGG
YSLNGTGGDG GTGGAGQITG LRSFGGAGG AGGASDTGAG GNGGAGGKAG LYNGGDDGA GGDGATSGKG GAGGNAVVI NGNGGNAGK AGGTAGAGGA
GGLVLRDQ QHGLT

```

Figura 7 Esquema y secuencia de la proteína PE-PGRS codificada por el gen Rv1759c localizado en el genoma de *Mycobacterium tuberculosis* cepa H37Rv (número de acceso P0A686). El dominio PE conservado se muestra en color rojo y el motivo Pro-Glu en color negro, y la región rica en Gly-Ala en el dominio PGRS se observan de color verde y múltiple motivos repetidos GGXGG (donde X representa cualquier aminoácido).

Potencial péptido señal 30 aa

Longitud: 914 aminoácidos

Peso molecular: 74354 Da

Punto Isoeléctrico: 4.598

### 6.2 Expresión del dominio carboxilo terminal de la PE-PGRS Rv1759c

En la Figura 8a se observa la expresión del fragmento de 1.5 Kb (*Sma*-*Sal*) de la PGRS Rv1759c, el peso molecular de la proteína recombinante es aproximadamente de 38.5 kDa (→).

La proteína recombinante purificada fue reconocida por los anticuerpos presentes en 7 de 13 pacientes con tuberculosis en un ensayo de "Western blot" (WB). Para detectar los anticuerpos se utilizó la proteína A-peroxidasa y la reacción se reveló con Diaminobencidina (Figura 8b). En contraste, la proteína recombinante no fue reconocida con el suero hiperinmune de conejo originado en contra del bacilo tuberculoso. Por otra parte, como se había descrito anteriormente para una proteína homóloga a la Rv1759c (AbouZeid et al), la proteína recombinante se unió a fibronectina (Figura 8b carril Fn).

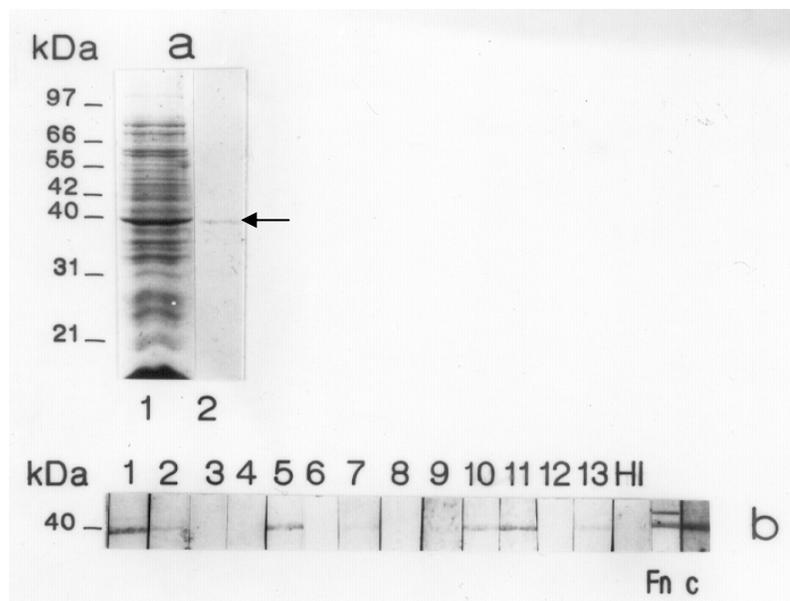


Figura 8. Expresión y purificación de la proteína recombinante Rv1759c-C. a: PAGE-SDS al 12% teñido con azul Coomassie. (carril 1) Lisado de *E. coli* XL- 1 Blue transformada; (carril 2) Rv1759c-C recombinante de *M. tuberculosis* purificada (flecha). b: WB de la proteína Rv1759c-C recombinante de *M. tuberculosis* con el suero de individuos con tuberculosis pulmonar (carriles 1-13). Los carriles HI y Fn fueron incubadas con suero hiperinmune de conejo anti-*M. tuberculosis* o fibronectina marcada con biotina, respectivamente. El carril c muestra la proteína Rv1759c-C purificada y teñida con azul Coomassie.

### 6.3 Localización de la proteína Rv1759c en células de *M. tuberculosis* H37Rv por inmunoelectromicroscopía

Utilizando los anticuerpos policlonales anti-Rv1759c, se logró definir la distribución topográfica de la proteína Rv1759c. Mediante el estudio de inmunoelectromicroscopía se observó que el mayor número de partículas de oro se localizaron en el citoplasma y en menor cantidad en la membrana y en pared celular (Figura 9).

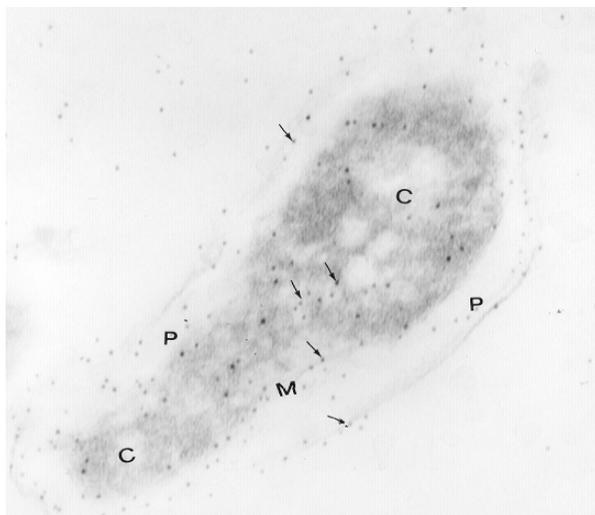


Figura 9. Electromicrografía del bacilo tuberculoso. C (citoplasma). M (membrana citoplásmica). P (pared celular). Las flechas indican el marcaje de oro coloidal de la proteína Rv1759c-C.

#### **6.4 Cinética de la expresión de la proteína Rv1759c durante la infección crónica experimental**

Mediante la técnica de PCR en tiempo real se pudo demostrar la expresión del gen Rv1759c en los pulmones de los ratones durante el desarrollo de la infección crónica. En la Figura 10, se muestra la cinética de infección, observándose que la transcripción del gen Rv1759c comienza desde el primer mes postinfección, y se incrementa gradualmente alcanzando un pico a los 150 días.

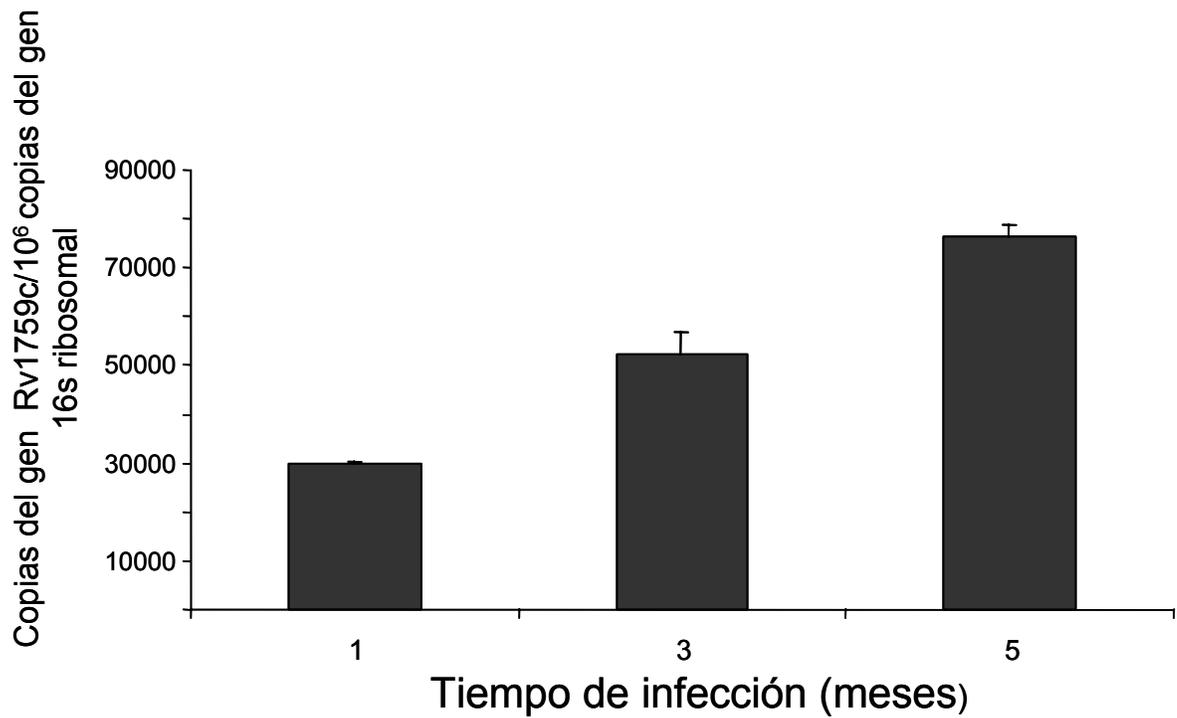


Figura 10. Se observa la cinética de la transcripción del gen *Rv1759c* de *M. tuberculosis* mediante la técnica de cuantitativa de PCR en tiempo real de los pulmones de animales con infección latente. Los resultados analizados son de tres animales por cada tiempo, en dos experimentos independientes. El número de copias del RNAm del gen *Rv1759c* fue relacionado a un millón de copias del gen ribosomal 16s de *M. tuberculosis*

Estos resultados concuerdan, con la detección de la proteína por inmunohistoquímica analizada por morfometría automatizada en los pulmones de los ratones infectados, en donde se observó un incremento en la intensidad de la tinción en los macrófagos activados localizados en el intersticio alveolo capilar y en los granulomas pulmonares (Figura 11A,B).

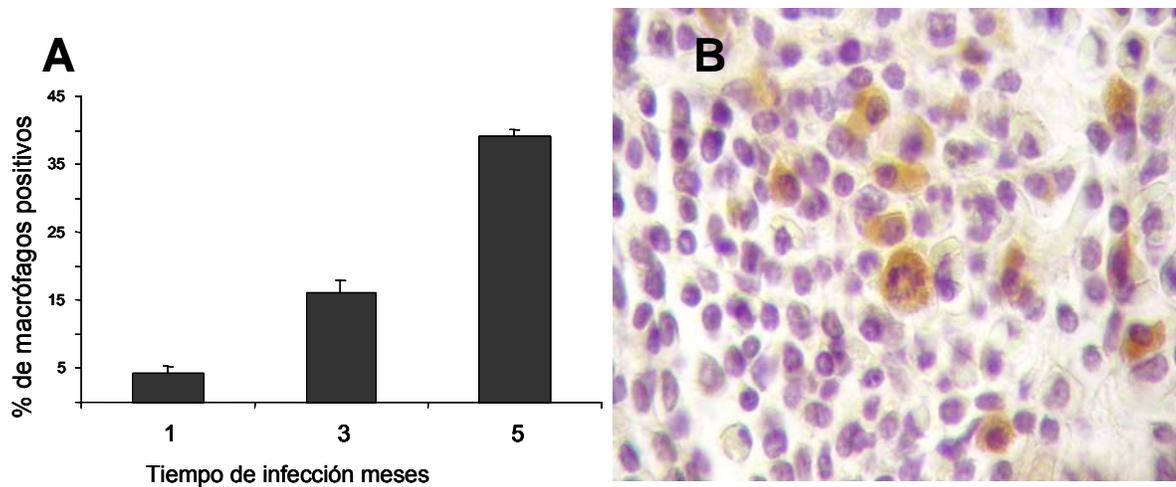


Figura 11 A muestra el porcentaje de macrófagos positivos para el antígeno Rv1759c en los granulomas pulmonares durante la infección crónica determinado por inmunohistoquímica y morfometría automatizada. La Figura 11 B. Indica la localización celular del antígeno Rv1759c en macrófagos activados en el granuloma pulmonar a los 150 días de infección.

Por otra parte, la inmunoelectromicroscopía de los granulomas pulmonares a los cinco meses postinfección, mostró la distribución subcelular de la proteína Rv1759c en los macrófagos infectados. La proteína se localizó preferentemente en el citoplasma y en la pared celular en donde la marca específica fue muy intensa (Figura 12). Estos resultados indican que el antígeno Rv1759c de *Mycobacterium tuberculosis* se expresa abundantemente durante la infección latente y se localiza en la pared de los bacilos fagocitados. Así mismo, es conveniente señalar que esta es la misma localización que se observa en las micobacterias que crecen en medios de cultivo, como se describió anteriormente.

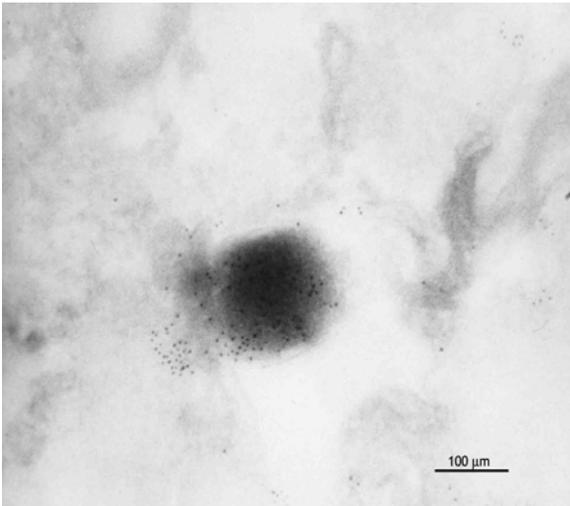


Figura 12. Inmuno electromicroscopía en la cual se observa la localización subcelular del antígeno Rv1759c en micobacterias fagocitadas por macrófagos activados y el inmunomarcaje en la pared celular de la micobacteria.

### **6.5 Inmunogenicidad del antígeno micobacteriano Rv1759c**

Para demostrar la inmunogenicidad del antígeno micobacteriano Rv1759c, se determinó la concentración de IFN- $\gamma$  al mes, a los tres y cinco meses postinfección en linfonodos mediastínicos, pulmón y bazo (Figura 13). Se observó un incremento de alrededor dos, tres y cuatro veces en concentración de IFN- $\gamma$  con respecto al control, al mes a los 3 y 5 meses respectivamente. No hubo diferencias significativas entre la proteína Rv1759c y el FC.

En las células del pulmón la concentración de IFN- $\gamma$  Incremento dos, tres veces al mes a y a los tres meses postinfección con respecto al control, disminuyendo notablemente a nivel del control al quinto mes. Nuevamente no se observaron diferencias significativas entre la la proteína Rv1759c y el FC.

En contraste, en el bazo el incremento en la concentración de IFN- $\gamma$  se observó únicamente al primer mes, decayendo a los tres meses y desapareciendo para el quinto mes.

Esto nos indica que el antígeno Rv1759c es eficiente en la producción de IFN- $\gamma$  en los linfonodos mediastinales, cuando se compara con el FC durante una infección latente estable. Por otra parte, la DTH inducida por el antígeno Rv1759c a los cinco meses de infección, fue significativamente mayor a las 48 h después cuando se comparo a la respuesta inducida por el FC (Figura 14).

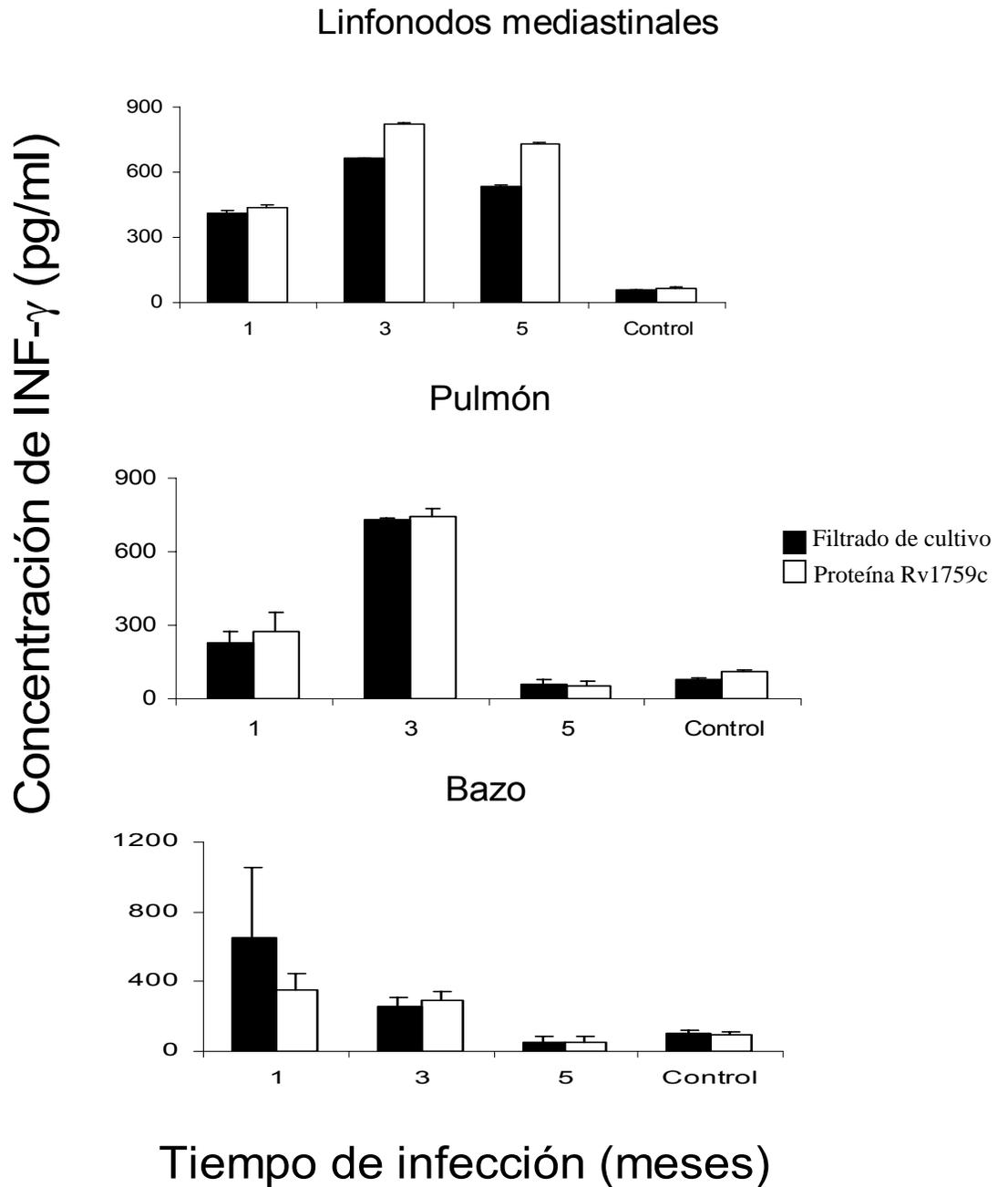


Figura 13 . Cuantificación de IFN- $\gamma$  por ELISA de los sobrenadantes de suspensiones celulares de los linfonodos mediastinales, pulmón y bazo después de la estimulación con antígenos del filtrado de cultivo micobacteriano y la proteína Rv1759c a diferentes tiempos durante la infección latente. Las células de los linfonodos mediastinales estimuladas con el antígeno Rv1759c produjeron mayor concentración de IFN- $\gamma$  en comparación con el FC. Las barras representan en promedio y la desviación estándar de 4 animales en cada tiempo.

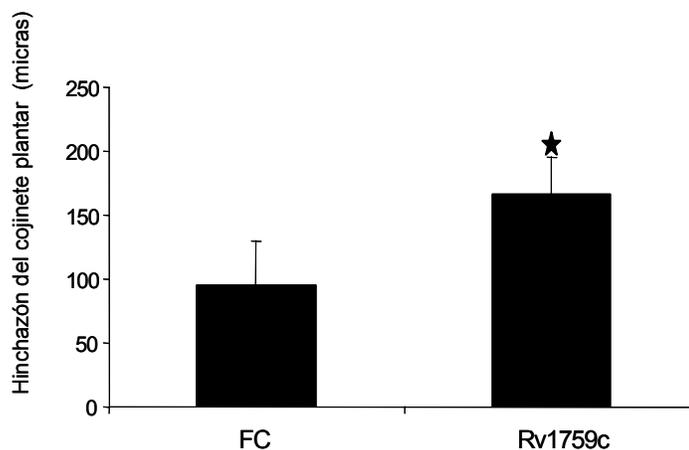


Figura 14 . Respuesta de hipersensibilidad retardada al antígeno Rv1759c y FC de *M. tuberculosis* en ratones con 5 meses de infección, resultante de la instilación de *M. tuberculosis* por vía intratraqueal. La induración fue medida a las 24 h después del reto. Los resultados corresponden a dos experimentos independientes, en donde se observa el promedio y la desviación estandar. El asterico indica la significancia estadística ( $p < 0.05$ ).

### 6.6 Protección en contra de la reactivación de la tuberculosis inducida por corticosterona en ratones con infección latente vacunados con el antígeno Rv1759c

La alta carga bacteriana ( $1.2 \times 10^6$  UFC) en los pulmones de los animales sin vacunar considerados como control, muestra que estos fueron incapaces de contener la reactivación de la enfermedad inducida por la administración de corticosterona a los cinco meses post- infección, en contraste, con los ratones vacunados con el antígeno Rv1759c que mostraron una carga 10 veces menor después de un mes de administración de corticosterona (Figura 15). El homogenizado del bazo de los ratones no vacunados mostró algunos pocos bacilos vivos ( $24 \pm 12$  UFC), y no se detectaron bacilos vivos en los homogenizados del bazo procedentes de los ratones vacunados ( $p < 0.008$ ), indicandonos que la vacunación subcutánea con el antígeno Rv1759c previene en forma eficiente la reactivación de la enfermedad.

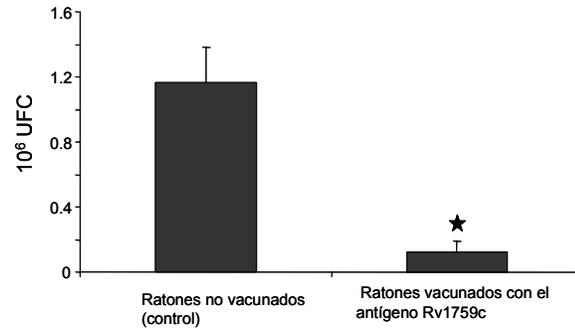


Figura 15 . Se observa la carga bacilar en los pulmones de ratones con infección latente después de recibir durante un mes corticosterona para inducir la reactivación de la enfermedad. Comparación de los animales vacunados con el antígeno Rv1759c y los animales no vacunados utilizados como control. Los ratones vacunados muestran una reducción de la unidades formadoras de colonia (UFC). Las barras representan el promedio y la desviación estándar de 4 animales en dos experimentos independientes. El asterisco indica la significancia estadística ( $p < 0.05$ ).

## VII. Discusión

La secuencia completa del genoma de la cepa H37Rv de *M. tuberculosis* consta de 4,411, 529 pb, y aproximadamente 3,986 proteínas. El contenido de G + C es de 65.6%, el cual es relativamente constante a través de todo el genoma, sin embargo existen regiones que muestran un mayor contenido de G + C<sup>14</sup>. En algunas de estas regiones se encuentran secuencias que pertenecen a una familia constituida por 61 genes denominados PE\_PGRS, las cuales se caracterizan por presentar secuencias consenso repetidas de 9 pb CGGCGGCAA<sup>38</sup> y poseer frentes de lectura abierto, que codifican para proteínas potenciales ricas en glicina. Así mismo, se ha considerado que las proteínas de familia PE-PGRS pueden ser fuente de variación antigénica, lo cual sería de gran importancia para entender algunos aspectos de la respuesta inmune en contra de la micobacteria. Abou-Zeid<sup>46</sup> en 1991, logró identificar una proteína con capacidad de unión a Fn la cual denominó TB1 y además fue reconocida por pacientes enfermos de tuberculosis. El análisis de la secuencia de la TB1, sugiere una estrecha relación con el gen Rv1759c. Posteriormente se obtuvo la región carboxilo terminal de la proteína recombinante (Rv1759c-C), la cual también fue reconocida por sueros de pacientes con tuberculosis, sin embargo, el suero policlonal de conejo dirigido en contra de *M. tuberculosis* H37Rv no reaccionó en contra de la proteína recombinante Rv1759c-C, como sucedió con los sueros de los pacientes, sugiriendo estos resultados que la proteína se expresa durante la infección *in vivo* y en menor concentración durante el crecimiento *in vitro* de la bacteria, lo cual está de acuerdo con lo establecido en la literatura donde se habla de la expresión diferencial de estas proteínas de acuerdo las condiciones a las que es sometida la bacteria<sup>55,56</sup>.

Las proteínas de *M. tuberculosis* con capacidad de unión a Fn, son antígenos inmunodominantes<sup>39,57,58</sup> que le permiten a la micobacteria unirse a las superficie celulares<sup>59</sup>. Resulta de interés este hallazgo, ya que se ha demostrado variación

antigénica en adhesinas con capacidad de unión a Fn en *Streptococcus pyogenes*<sup>60</sup> lo que nos lleva sugerir que las proteínas PE-PGRS con capacidad de unión a Fn pudieran jugar un papel importante en la interacción huésped-bacteria.

En la literatura se han descrito algunos de los motivos de unión a Fn como el motivo FEWYYQ<sup>61</sup> para las proteínas del complejo 85 y el motivo RWFV para otras familias de proteínas homologas de unión a Fn<sup>62</sup>. En nuestro estudio ninguno de los motivos antes descritos fue localizado en la proteína Rv1759c-C, lo que sugiere que la unión a Fn se debe a otros motivos no descritos y esto pudiera constituir un tercer grupo de proteínas con capacidad de unión a Fn<sup>39</sup>.

Como se explico anteriormente, al parecer la proteína Rv1759c solo se expresa en condiciones *in vivo*, por lo que se decidió estudiar su expresión y localización *in vivo* así como su probable participación en la respuesta inmune protectora en un modelo murino de tuberculosis crónica.

El modelo murino de tuberculosis empleado en este trabajo, permite tener una condición similar a la tuberculosis latente humana. La infección se establece, despues de la inoculación intratraqueal en ratones B6D2F1<sup>54</sup> de un número relativamente bajo de micobacterias virulentas de la cepa H37Rv. Este modelo se caracteriza porque durante la infección, se mantiene un número bajo y estable de micobacterias, se observan pocos granulomas y pequeños focos de alveolitis, que no comprometen la vida de los animales, lo que permite que los animales continúen ganando peso y se observen saludables por más de dos años.

En otros modelos experimentales al igual que este, existe un importante predominio de citocinas de tipo Th1, con alta expresión de TNF- $\alpha$  e INOs<sup>25</sup>. Por lo que se considera, que este perfil inmunológico es un factor importante en la inducción y mantenimiento del estado de latencia<sup>33,55</sup>. Este tipo de respuesta

inmune es también crítico en la protección contra el desarrollo de la tuberculosis humana y murina. Hipotéticamente, durante la infección latente, un grupo de antígenos micobacterianos deben ser expresados en su superficie o deben ser secretados, para inducir y mantener el estado de infección crónica. La caracterización de estos antígenos y su uso como subunidades vacunales podrían reforzar la respuesta tipo Th-1 para prevenir el desarrollo de la enfermedad. En este trabajo se empleó la proteína Rv1759c perteneciente a la familia PE-PGRS, debido a que se tienen evidencias indirectas de su expresión, ya que se encontraron anticuerpos en contra de este antígeno en pacientes con tuberculosis<sup>39</sup>. Los resultados de los estudios *in vitro* de inmunoelectromicroscopia, mostraron que el antígeno Rv1759c se expresa preferencialmente en el citoplasma y en menor proporción en la pared celular y membrana citoplásmica de las bacterias, así mismo por medio de la técnica de inmunohistoquímica se apreció una sobreexpresión *in vivo* específicamente en macrófagos epitelioides localizados en los granulomas, durante el desarrollo de la infección crónica. También se demostró que el antígeno Rv1759c recombinante indujo concentraciones similares de IFN- $\gamma$  comparables a las inducidas por el FC, cuando estos antígenos se emplearon en los cultivos de células provenientes de los linfonodos mediastinales a los tres y cinco meses post-infección, lo cual nos indica que el antígeno Rv1759c es inmunogénico en los linfonodos que reciben material proveniente de los pulmones y estos pudieran jugar un papel importante en el establecimiento y mantenimiento de la infección, como ha sido observado en cobayos infectados con baja dosis de micobacterias por vía aerógena, donde la bacteria causa linfangitis en los pulmones y linfadenitis, lo cual permite considerar a estos sitios afectados como los compartimentos que favorecerían el mantenimiento de la infección latente<sup>63</sup>.

Los ratones con una infección crónica latente a los cinco meses post-infección fueron vacunados subcutáneamente con tres dosis de 10 µg de la proteína purificada Rv1759c, una vez por semana. Después de un mes, los ratones inmunizados fueron tratados con corticosterona para inducir la reactivación de la enfermedad. En los animales vacunados no se observó un incremento en el número de unidades formadoras de colonias, las cuales se mantuvieron al mismo nivel que tenían antes de que los animales fueran tratados con la corticosterona, en tanto que en el grupo control, se observó un incremento importante en el número UFC. Todas estas observaciones, sugieren que este antígeno podría ser como una eficiente subunidad vacunal, durante el periodo post-sensibilización, que refuerza la respuesta tipo Th-1 y por lo tanto podría prevenir la reactivación de la enfermedad<sup>64-65</sup>.

## VIII. CONCLUSIONES.

- ❖ La proteína Rv1759c es inmunogénica, ya que induce una respuesta inmune humoral en humanos y conejos, además de la respuesta inmune celular en ratones.
- ❖ La proteína Rv1759c es una proteína que une fibronectina.
- ❖ Se determinó que la proteína Rv1759c en *M. tuberculosis* se localiza en citoplasma, membrana y pared celular.
- ❖ Por sus características inmunológicas y estructurales la proteína Rv1759c es importante en la relación huésped-bacteria.
- ❖ Induce una alta respuesta inmune celular que puede contribuir al mantenimiento de la infección crónica latente.
- ❖ Por su expresión preferencial en el modelo crónico de latencia pudiera ser considerado como marcador de latencia.
- ❖ Por sus características inmunogénicas se puede considerar como antígeno alternativo para desarrollar una nueva vacuna para prevenir la reactivación de la enfermedad.

## IX. LITERATURA CITADA

1. **Bloom B.R., 1994.** Tuberculosis: Pathogenesis, Protection, and Control. *American Society for Microbiology Press, USA.*
2. **Schlossberg, D. 2000.** Tuberculosis e infecciones por micobacterias no tuberculosas. *Mc Graw Hill.* Cuarta edición. USA.
3. **Sudre P, Ten Dam G, Kochi A. 1992.** Tuberculosis in the present time: A global overview of the tuberculosis situation. *Bull World Health Organ.*70(2):149-59.
4. **Cauten GM, Pio A, tem Dam HG. 2002.** Annual Risk of Tuberculosis Infection. *Bull World Health Organ.* 80(6):503-11
5. **Davey S. 2001.** New global plan to halt TB. *Bull World Health Organ.* 79(12):1172-3.
6. **Gazzard B. 2001.** Tuberculosis, HIV and the developing world. *Clin Med* 1(1): 62-8.
7. **Rajagopalan S. 2001.** Tuberculosis and Aging: A Global Health Problem. *Aging and Infectious diseases.* *Clin Infect Dis.*1;33(7):1034-9.
8. **WHO Report 2003.** Global Tuberculosis Control: Surveillance, Planning, Financing. *Bull World Health Organ.* <http://www.who.int/gtb>
9. **Morbilidad por tuberculosis pulmonar en Salud: México 2001.** Primera edición. Secretaría de Salud. pp. 54-55. [http:// www.ssa.gob.mx](http://www.ssa.gob.mx)
10. **Báez-Saldaña R, Pérez-Padilla R, Salazar-Lezama M. 2003.** Discrepancias entre los datos ofrecidos por la Secretaría de Salud y la Organización Mundial de la Salud sobre tuberculosis en México, 1981-1998. *Salud Pública Mex.* 45(2): 78-83
11. **Pérez-Padilla R. 2001.** La tuberculosis en México, deuda añeja de salud pública. *Gac Med Mex.* 137(1): 93-4.
12. **Flisser A, Velasco A, Martínez C, González F, Briseño B, García R, Caballero A, Hernández I, García H, Gutiérrez L, Rodríguez G, López I, Galindo S, Vázquez R, Balandrano S, Guzmán C, Olivo A, De la Rosa JL, Magos C, Escobar A, Correa D. 2002.** Infectious Diseases in Mexico. A Survey from 1995–2000. *Arch Med Res.* 33(4):343–350
13. **Garcia-Garcia Mde L, Valdespino-Gomez JL, Palacios-Martinez M, Mayar-Maya ME, Garcia-Sancho C, Sepulveda-Amor J. 1995.** Tuberculosis and AIDS in Mexico. *Salud Pública Mex.* 37(6):539-48.

14. **Cole T S., Brosh R. et al. 1998.** Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*. **393**: 537-544
15. **Jonge de IM., Brosh R., Brodin P., Demangel C., Cole TS. 2005.** Tuberculosis: from genome to vaccine. *Expert Rev. Vaccines* 4 (4), 541-551.
16. **Leung AN. 1999.** Tuberculosis: the essentials. *Radiology*. 210(2):307-322
17. **Cardona P, Auxina V. 2000.** Histopathology of tuberculosis. Approaching the development of pulmonary lesions through an aerosol-induced experimental model in animals. *Arch Bronconeumol*; 36(11): 645-650
18. **Clark-Curtiss JE, Haydel SE. 2003.** Molecular genetics of *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis. *Annu Rev Microbiol*. 57:517–49
19. **Falkow S. 2004.** Molecular Koch's postulates applied to bacterial pathogenicity a personal recollection 15 years later. *Nature Rev Microbiol*. 2(1): 67-72
20. **Milburn HJ. 2001.** Primary tuberculosis. *Curr Opin Pulm Med*. 7(3):133-41.
21. **Murray CJ, Styblo K, Rouillon A. 1990.** Tuberculosis in developing countries: burden, intervention and cost. *Bull Int Union Tuberc Lung Dis*. 65(1): 6-24.
22. **Zúñiga JA. 2000.** Aspectos inmunogenéticos de la tuberculosis pulmonar. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex*. 13(4): 240-247
23. **Stewart G, Robertson BD, Young DB. 2003.** Tuberculosis: a problem with persistence. *Nature Rev Microb*. 1(2): 97-105
24. **Flynn JL, Ernst JD. 2000.** Immune responses in tuberculosis. *Curr Opin in Immunol*. 12(4):432–36
25. **Flynn JL, Chan J. 2001.** Immunology of Tuberculosis. *Annu Rev Immunol*. 19:93–129
26. **Kaufmann S. 2001.** How can immunology contribute to the control of tuberculosis? *Nat Rev Immunol*. 1: 20-30
27. **Crevel R, Ottenhoff TH, Meer JW. 2002.** Innate Immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Microbiol Rev*. 15(2): 294–309
28. **Cardona P-J., Ruiz-Manzano J. 2004.** On the nature of *Mycobacterium tuberculosis*- latent bacilli. *Eur. Respir. J.* (24) 1044-1051.
29. **Kochi, A. 1991.** The global tuberculosis situation and the new control strategy of the World Health Organization. *Tubercle* 72: 1-6.

30. **Styblo K., Meijer J., and sutherland I. 1969.** The transmission of tubercle bacilli: its trends in a human population. *Bull World Health Organ.* 41: 137-178.
31. **Sutherland I. 1976.** Recent studies in the epidemiology of tuberculosis, based on the risk of being infected with tubercle bacilli. *Adv Tuberc Res.* 19: 1-63.
32. **Selwyn PA., Hartel D. and Lewis VA. 1989.** A prospective study of the risk of tuberculosis among intravenous drug users with human immunodeficiency virus infection. *N Engl J Med.* 320:545-550
33. **Tufariello JM, Chan J, Flynn JL. 2003.** Latent tuberculosis: mechanism of host and bacillus that contribute to persist infection. *Lancet Infect Dis.* 3: 578-590.
34. **DeMaio J., Zhang Y, Ko C, and Bishai WR. 1997.** *Mycobacterium tuberculosis* sigF is part of a gene cluster with similarities to the *Bacillus subtilis* sigF and sigB operons. *Tuber Lung Dis.* 78: 3-12
35. **Michele TM, Ko C, and Bishai WR. 1999.** Exposure to antibiotics induces expression of the *Mycobacterium tuberculosis* sigF gene: implications for chemotherapy against mycobacterial persistors. *Antimicrob Agents Chemother.* 43: 218-225.
36. **Cunningham AF, Spreadbury CL. 1998.** Mycobacterial stationary phase induced by low oxygen tension: cell wall thickening and localization of the 16-Kilodalton alpha-crystallin homolog. *J Bacteriol.* 180 : 801-808
37. **Boon C and Dick T. 2002.** *Mycobacterium bovis* BCG response regulator essential for hipoxic dormancy. *J Bacteriol.* 184: 6760-6767.
38. **Poulet, S., Cole, S. T., et al. 1995.** Characterization of the highly abundant polymorphic CG-rich-repetitive sequence (PGRS) present in *Mycobacterium tuberculosis*. *Arch. Microbiol.* 163: 87-95
39. **Espita, C., Laclette, J.P., Mondragón-Palomino, M., Amador A., Campuzano J., Martens, A., Singh, M., Zhang,Y., Cicero, R. and Moreno,C. 1999.** The PE-PGRS glycine-rich proteins of *Mycobacterium tuberculosis*: a new family of fibronectin-binding proteins? *Microbiol.* 145: 3487-3495.
40. **Bigi, F., Romano, M.I., Alito, A., and Cataldi, A. 1995.** Cloning of a novel polymorphic GC-rich repetitive DNA from *Mycobacterium bovis*. *Res. Microbiol.* 146: 341-348

41. **Ross. B.C., Raios, K., Jackson, K., van Soolingen, D., Zainuddin, Z.F., Catty, D., van Embden, J.D.A. and Dale, J.W. 1992.** Molecular cloning of a highly repeated DNA element from *Mycobacterium tuberculosis* and its use as an epidemiological tool. *J. Clin. Microbiol.* 30: 942-946
42. **March, F., Coll P., Rodríguez P., Moreno C., Garigo M., Prats G. 1996.** Usefulness of DR, PGRS and Spoligotyping in the typing of *Mycobacterium tuberculosis*. Comparison with IS6110. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 14: 160-166.
43. **Banu,S., Honore, N., Saint-Joanis, B., Philpott, D., Prevost, M. and Cole, ST. 2002.** Are the PE-PGRS proteins of *Mycobacterium tuberculosis* variable surface antigens? *Mol. Microbiol.* 44:9-19.
44. **Betts J.C, Lukey PT., Robb LC., MacAdam RA. and Duncan. 2002.** Evaluation of a nutrient starvation model of *Mycobacterium tuberculosis* persistence by gene and protein expression profiling. *Mol. Microbiol.* 43: 717-731.
45. **Brenann, MJ., Delogu G., Chen Y., Bardarov S., Kriakov J., Alavi M., and Jacobs Jr. RW. 2001.** Evidence that mycobacterial PE\_PGRS proteins are cell surface constituents that influence interactions with other cells. *Infect. Immun.* 69:7326-7333.
46. **Abou-Zeid, C., Garbe, T., Latigra, R., Wiker, H.G., Harboe, M., Rook, G.A.W and Young, D. 1991.** Genetic and immunological analysis of *Mycobacterium tuberculosis* fibronectin-binding proteins. *Infect. Immun.* 59: 2712-2718.
47. **Hayshi CY., and Lewis RW.2000.** Molecular architecture and evolution of a modular silk protein gene. *Science* 287: 1477-1479.
48. **Ye ZH., Song YR., Marcus A., and Varner J.E. 1991.** Comparative localization of three classes of cell wall proteins. *Plant J.*1:175-183.
49. **Dillner J., Sternas L., Kallin B., Alexander H., Ehlin-Henriksson B., Jornvall H., Klein G., and Lerner R. 1984.** Antibodies against a synthetic peptide identify the Epstein-Barr virus-determined nuclear antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:4652-56.
50. **Levitskaya J., Coram M., Levitsky V., Imreh S., Steiger-wald-Mullen, Klein G., Kurilla MG., and Massuci MG. 1995.** Inhibition of antigen processing by the internal repeat region of the Epstein-Barr virus nuclear antigen-1. *Nature* 375:685-688

51. **Levitskaya J., Sharipo A., Leonchicks A., Ciechanover A., and Massuci MG. 1997.** Inhibition of ubiquitin/proteasome-dependent protein degradation by the Gly-Ala repeat domain of the Epstein-Barr virus nuclear antigen-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:12216-21.
52. **Collins FM. 1993.** Tuberculosis: the return of an old enemy. *Crypt Rev. Microbiol.* 19:1-16
53. **Ramakrishnan L., Federspiel NA and Falkow S. 2000.** Granuloma-specific expression of *Mycobacterium* virulence proteins from the glycine-rich PE-PGRS family. *Science.* 288: 1436-1439.
54. **Arriaga AK, Orozco EH, Aguilar LD, Rook GA, Hernández-Pando R. 2001.** Immunological and pathological comparative analysis between experimental latent tuberculosis and progressive pulmonary tuberculosis. *Clin Exp Immunol.* 28:229-237.
55. **Brennan JM., Gey van Pittuis CN., Espitia C. 2005.** The PE and PPE multigene families of Mycobacteria. *Tuberculosis and Tubercle Bacillus.* Ed Stewart Cole. ASM Press. Washington D.C. USA.
56. **Flores J. and Espita C. 2003.** Differential expression of PE and PE-PGRS genes in *Mycobacterium tuberculosis* strains. *Gene.* 318: 75-81.
57. **Huygen, K. , Van Vooren, J. P. , Turneer, M. , Bosmans, R. , Dierckx, P. & De Bruyn, J. 1988.** Specific lymphoproliferation, gamma interferon production, and serum immunoglobulin G directed against a purified 32 kDa mycobacterial protein antigen (P32) in patients with active tuberculosis. *Scand J Immunol.* 27. 187-194.
58. **Content, J. , De la Cuvelierie, A. , De Wit, L. , Vincent-Levy-Frébault, J. , Ooms, J. & De Bruyn, J. 1991.** The genes coding for the antigen 85 complexes of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* BCG are members of the gene family: cloning, sequence determination and genomic organization of the gene coding for the antigen 85-C of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun.* 59, 3205-3212
59. **Ratliff, T. L. , McGarr, J. A. , Abou-Zeid, C. , Rook, G. A. , Stanford, J. L. , Aslanzadeh, J. & Brown, E. J. 1988.** Attachment of mycobacteria to fibronectin-coated surfaces. *J Gen Microbiol.* 134, 1307-1313.
60. **Talay, S. R. , Valentin-Weigand, P., Timmis, K. N. & Chhatwal, G. S. 1994.** Domain structure and conserved epitopes of Sfb protein, the fibronectin-binding adhesin of *Streptococcus pyogenes*. *Mol Microbiol* 13, 531-539

61. **Naito, M., Ohara, N., Matsumoto, S. and Yamada, T. 1998.** The novel fibronectin-binding motif and key residues of mycobacteria. *J Biol Chem* 273, 2905-2909.
62. **Zhao, W. , Schorey, J. S. , Groger, R. , Allen, P. M. , Brown, E. J. & Ratliff, T. L. 1999.** Characterization of the fibronectin binding motif for a unique mycobacterial fibronectin attachment protein, FAP. *J Biol Chem* 274, 4521-4526.
63. **Basaraba RJ., Smith EE., Shanley CA. and Ormey IM. 2006.** Pulmonary lymphatics are primary sites of Mycobacterium tuberculosis infections in guinea pigs infected by aerosol. *Infect Immun.* 74: 5397-5401.
64. **Brandt L., Cunha J., Olsen AW., Chilima B., Hirsch P. and Appelberg R. 2002** Addressing the failure of the Mycobacterium bovis BCG vaccine; some species of environmental mycobacteria block multiplication of BCG and the induction of protective immunity to tuberculosis. *Infect Immun.* 70: 672-8
65. **Agger EM. and Andersen P. 2002.** A novel TB vaccine; towards a strategy based on our understanding of BCG failure. *Vaccine.* 21: 7-14