



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

ESTUDIO DE LOS AISLADOS CLÍNICOS
DE *Mycobacterium tuberculosis* CON
“TROPISMO” HACIA EL SISTEMA
NERVIOSO CENTRAL

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS
P R E S E N T A
EDEN MARCELA RODRÍGUEZ FLORES

DIRECTOR DE TESIS: DRA. CLARA INÉS ESPITIA PINZÓN

MÉXICO, 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.

Dedicatoria

A mi mamá por estar siempre que te he necesitado apoyándome, escuchándome y ayudándome a salir adelante. Gracias por enseñarme a ser una mujer fuerte, inteligente y a no rendirme. ¡Gracias Mami!

A mi papá por que siempre me has apoyado, confiado en mí, y por que siempre logras sacarme una sonrisa
¡Gracias Barry!

A Daniela por ser además de mi hermana, mi mejor amiga. Por entenderme, ayudarme y de vez en cuando ponerme en mi lugar ¡Gracias Nena!

A Renata por ser también mi mejor amiga y por que a pesar de estar un poquito más lejos, se que puedo contar contigo en cualquier momento y para cualquier cosa ¡Gracias Rana!

A mis abuelos por darme la familia tan maravillosa que tengo, por todo su cariño y apoyo. A mis tíos que siempre han estado conmigo y me han regalado excelentes fines de semana. A Elizabeth por que siempre puedo platicar contigo y olvidarme de todo lo demás.

A las amazonas por que aunque ya no estamos tanto tiempo juntas seguimos unidas. A Faby por ser la alegría, a Chio por ser la chispa, a Mony por ser el corazón, a Vale por ser la mente, a Erika S por ser la paz y a Erika A por ser la cordura. A Paulina, Dulce, Lorena, Iván, Marco, Alejandra, y con todos los que compartí tantas cosas. A Natalia por ser mi primera sobrina amazónica.

A Ana, Sandra, Melina, Cesar y Manuel por que la amistad que nos une sigue siendo más fuerte que el trabajo, las obligaciones y los problemas, gracias por todos estos años en que hemos sido una gran familia. A Hino, Iliana y María por que sé que aunque pasen los años o estemos lejos, siempre serán mis hermanos ¡Nunca olviden cuanto los quiero!

A Memo, gracias por que siempre has estado a mi lado motivándome y por hacerme creer en mi misma

A Jaime, Cristina, Fernando, Ingrid, Vanessa, Toño, Wendy, Pedro, Martha, Margarita, Anahid y Ana Laura por todos sus consejos, sugerencias y apoyo ¡ah! todo el tiempo que pasamos juntos.

A Dios, gracias Padre por que Tú eres quien me ha permitido llegar hasta aquí.

Agradecimientos

A la Dra. Clara I. Espitia Pinzón, por permitirme realizar este trabajo, su asesoría y por todo el tiempo e interés que dedicó a este trabajo.

Al Dr. Rogelio Hernández Pando, y al departamento de Patología Experimental del Instituto Nacional de la Nutrición y Ciencias Médicas, por su apoyo en este proyecto.

A Diana Aguilar León por su asesoría y apoyo, tanto académico como personal.

A Martha Lara, por su apoyo en la realización experimental.

A mi comité tutorial, la Dra. Bertha González Pedrajo y el Dr. Edmundo Calva Mercado, por todas sus recomendaciones para mejorar.

A mis sinodales, Dr. Rogelio Hernández Pando, Dra. Yolanda López Vidal, Dra. Bertha González Pedrajo, Dr. Edmundo Calva Mercado y a la Dra. Bertha Espinoza Gutiérrez, por su tiempo y sus sugerencias en la revisión de esta tesis.

A mis profesores por compartirme su conocimiento y motivarme a seguir en este camino.

A la Facultad de Química por permitirme estudiar esta maestría.

A la Facultad de Ciencias, por que siempre seré Bióloga.

A Zenón Cano por que siempre serás el mejor profesor que he tenido.

A la UNAM por permitirme pertenecer a la Máxima Casa de Estudios.

ÍNDICE

1. RESUMEN.....	6
2. MARCO TEÓRICO	
2.1. Tuberculosis.....	8
2.2. Epidemiología.....	8
2.3. Agente causal.....	10
2.4. Virulencia.....	12
2.5. Manifestaciones clínicas.....	12
2.6. Diseminación.....	13
2.7. Tuberculosis extrapulmonar.....	14
2.8. Tuberculosis en el sistema nervioso central.....	16
2.9. Respuesta inmune.....	18
2. 10. Genética de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	21
3. ANTECEDENTES.....	23
3.2. Interacción de <i>Mycobacterium</i> con células epiteliales.....	24
3.3. Genes posiblemente involucrados en invasión.....	26
3.3.1. hemaglutinina de unión a heparina (<i>hbha</i>).....	27
3.3.2. histone like protein (<i>hlp</i>).....	29
3.3.3. Genes de entrada a células de mamíferos.....	31
3.3.4. Genes polimorficos ricos en GC, PE- PGRS (<i>Rv1818</i>).....	34
3.4. Sujeto de estudio.....	36

4. JUSTIFICACIÓN.....	38
5. HIPÓTESIS.....	39
6. OBJETIVOS	
6.1. Objetivo general.....	40
6.2. Objetivos particulares.....	41
7. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	42
8. MÉTODOS.....	43
9. RESULTADOS.....	50
9.1. Cultivo de micobacterias.....	50
9.2. Animales infectados.....	51
9.3. Cuantificación de la expresión <i>in vitro</i> de los genes de estudio por RT-PCR en tiempo real.....	53
9.4. Cuantificación de la expresión <i>in vivo</i> de los genes de estudio por RT-PCR en tiempo real.....	55
9.5. Análisis comparativo.....	66
9.6. Análisis de la secuencia del gen <i>hbha</i>	69
10. DISCUSIÓN.....	72
11. CONCLUSIONES.....	77
12. BIBLIOGRAFÍA.....	78

1. RESUMEN

Un paso inicial en las infecciones, es la adherencia de los microorganismos a su célula blanco. Este evento, considerado crucial para la subsiguiente invasión bacteriana a los sitios de infección secundaria y el daño a los tejidos, es utilizado por diversos patógenos. Entre ellos, *Mycobacterium tuberculosis*, un patógeno que tiene la capacidad de sobrevivir en su hospedero y diseminarse a diferentes órganos y tejidos. No obstante la importancia de este fenómeno, es poco lo que se conoce acerca de las moléculas bacterianas involucradas en la interacción bacteria-hospedero. A la fecha se han identificado en *M. tuberculosis* algunas proteínas que han demostrado tener un papel importante en el proceso de adherencia e invasividad, como son: la hemaglutinina de unión a heparina HBHA (heparin-binding hemagglutinin), que promueve la interacción e invasión de neumocitos y la diseminación de la bacteria hacia el bazo e hígado; una proteína tipo histona Hlp (Histone like protein) que interacciona con laminina, lo cual le permite a la bacteria adherirse a diferentes células y facilitar su ingestión; y las proteínas codificadas por los genes de los operones *mce* (mammalian cell entry) que también se han visto involucradas en la invasividad.

En el presente trabajo se estudió por PCR-tiempo real la expresión de algunos genes que codifican para las proteínas de *M. tuberculosis* relacionadas con adherencia e invasividad. Los genes se amplificaron de los órganos de ratones infectados con aislados clínicos de *M. tuberculosis* con diferente grado de virulencia, que habían sido aislados del líquido cefalorraquídeo de pacientes con tuberculosis meníngea.

Los resultados muestran que los aislados clínicos de *M. tuberculosis* expresan diferencialmente estos genes siendo notoria una mayor expresión de los mismos en las cepas extrapulmonares, cuando se compara con la cepa pulmonar de *M. tuberculosis* H37Rv. La mayor diferencia en expresión entre los aislados clínicos y la cepa pulmonar se observó en el gen que codifica para la proteína HBHA. Los resultados sugieren, que esta proteína podría estar jugando un papel importante en la diseminación de las micobacterias hacia el sistema nervioso central. La inactivación de este gen en las cepas meníngeas será el siguiente paso para esclarecer su participación tanto en la diseminación como en la fisiopatología de la tuberculosis meníngea.

2.1. TUBERCULOSIS

La tuberculosis es una de las afecciones humanas más antiguas. Representa la enfermedad infecciosa que causa más muertes en el mundo. Se ha encontrado evidencia morfológica y molecular de la infección por *Mycobacterium tuberculosis* en restos fósiles del pleistoceno en Norteamérica que datan de hace 18000 años (Rothschild et al., 2001). También se han observado en restos humanos óseos de más de 4000 años de antigüedad deformidades características de la tuberculosis ósea. La frecuencia de esqueletos con estas deformidades en Egipto sugiere que la tuberculosis fue común entre la población de este tiempo (Daniel et al., 1994). Este padecimiento se incrementó considerablemente en Europa en la primera mitad del siglo XIX y causó la muerte de un cuarto de la población europea. Por otra parte los inmigrantes europeos expandieron la enfermedad en el continente Americano (Haas et al., 1996). La mortalidad debido a la tuberculosis en Europa, disminuyó inicialmente debido al mejoramiento de las condiciones sanitarias y de urbanización y posteriormente, a la aparición de la vacuna BCG y al desarrollo de antibióticos durante el siglo XX (Frieden et al., 1995). A pesar de esto, aún en la actualidad la incidencia de la tuberculosis varía entre 10×10^4 en USA hasta 300×10^4 casos en África central.

2.2. EPIDEMIOLOGÍA

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que durante el periodo 2000 a 2020 habrán 1 000 millones de infectados por *M. tuberculosis*, 200 de los cuales enfermarán y 35 morirán si no se mejora el control de la enfermedad (Schlossberg, 2000). Se estima que un tercio de la población mundial está infectada por *M. tuberculosis* y

la incidencia anual mundial ofrece cifras de unos 8 millones de casos nuevos por año. La OMS estima que cada año 3 millones de personas mueren de tuberculosis (Fig. 1). Las incidencias más altas están en los países de África, Asia, y América Latina, ya que el 95% vive en estas regiones (Fig. 2). La incidencia mundial de tuberculosis aumenta aproximadamente un 0.4% al año (WHO Report 2004). Este incremento en la incidencia de la tuberculosis está relacionado con la aparición de la pandemia del virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) y la emergencia de cepas multidrogo resistentes (Waalder, 2002).

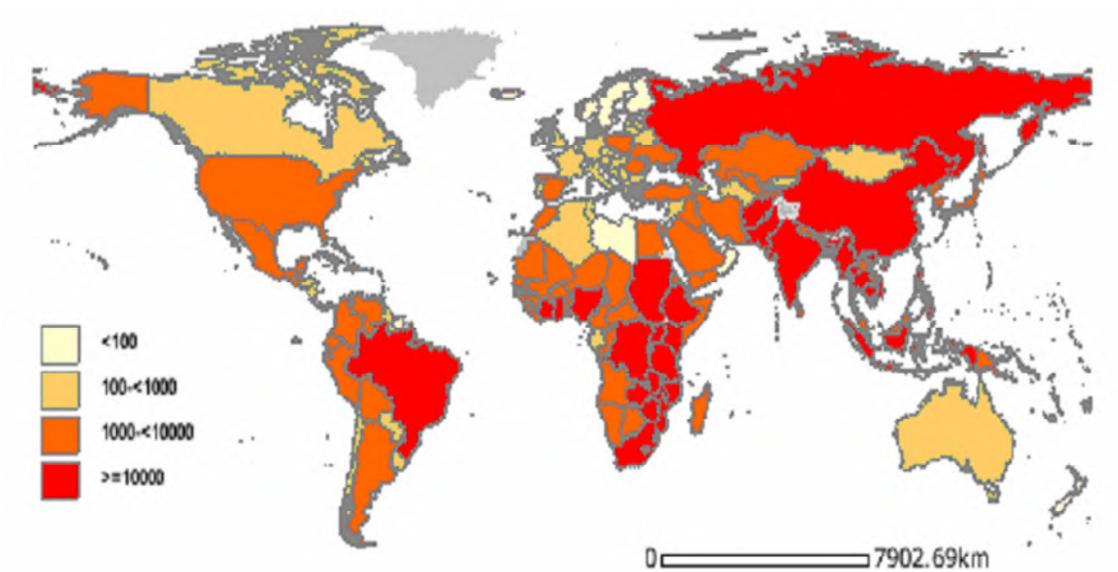


Figura 1. Mortalidad mundial de tuberculosis. En este mapa se representa el número de muertes por 100 000 habitantes por año reportados en 2006 (www.who.int.tb)

La tuberculosis continúa representando un problema importante de salud en México y de acuerdo con las cifras notificadas por la OMS ha ocurrido un incremento en el número de casos en los últimos años, principalmente en adultos jóvenes; se estima la tasa en 51.7 casos por 100000 habitantes. En los pacientes con SIDA ocupa el tercer lugar como entidad infecciosa, después de la candidiasis y la neumonía por *Pneumocystis carinii*.

La tuberculosis es un problema de salud pública de tal magnitud y trascendencia, que la OMS la ha declarado como una emergencia mundial (WHO Report 2001).

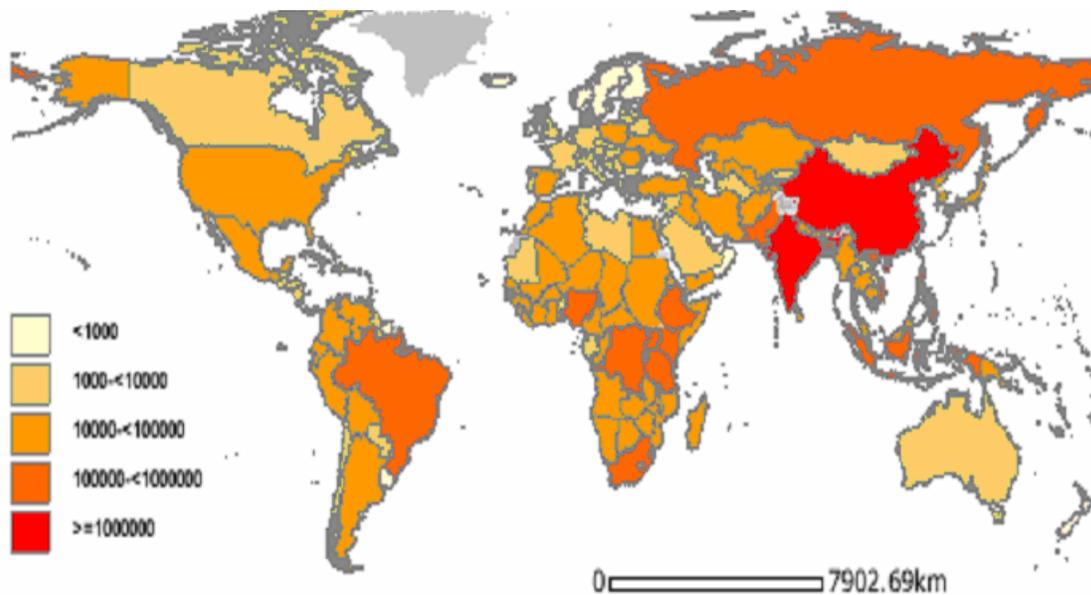


Figura 2. Incidencia mundial de tuberculosis. En este mapa se representa la incidencia de la tuberculosis por 100 000 habitantes reportada en 2006 (www.who.int.tb)

2.3 AGENTE CAUSAL

La tuberculosis es causada por micobacterias del género *Mycobacterium*. El ser humano puede infectarse por tres especies distintas de *Mycobacterium*: *M. tuberculosis*, *Mycobacterium bovis* y *Mycobacterium africanum*. *M. tuberculosis* es el patógeno que más comúnmente se asocia al desarrollo de la enfermedad en el hombre. *M. tuberculosis* es un bacilo aerobio, inmóvil, no esporulado, no encapsulado, que precisa de un tiempo muy prolongado (15-20 horas) para su multiplicación y requiere de 2 a 6 semanas para crecer en medios sólidos. La temperatura corporal (35-37°) y una atmósfera enriquecida con CO₂ estimula su desarrollo. Microscópicamente es un bacilo alargado de aproximadamente 0.4 x 3 µm y de forma arrozada. En la Figura 3 se observa a *M. tuberculosis* expresando la proteína verde fluorescente (Daniel et al., 1994).



Figura 3. *M. tuberculosis* expresando la proteína verde fluorescente

Una de las características distintivas del género *Mycobacterium* es la resistencia a la decoloración por alcohol-ácido en la tinción de Zhiel-Neelsen debido al alto contenido de lípidos en la pared celular. Es por esto que se le ha denominado bacilo ácido-alcohol resistente. La pared celular de las micobacterias, se caracteriza por tener una cubierta lipídica constituida por ácidos micólicos. Los organismos sobreviven en un clima seco durante largos periodos aunque pueden ser eliminados por ejemplo, mediante rayos de sol directos o la radiación ultravioleta. La envoltura celular contiene una capa adicional de peptidoglicanos que es muy rica en lípidos poco usuales, glicolípidos y peptidoglicanos. El contenido lipídico de la pared celular de la micobacteria es extraordinariamente alto. Como consecuencia, esta pared será la responsable de una tinción difícil, de la relativa resistencia a las defensas fagocitarias del organismo huésped y posiblemente, de los acontecimientos inmunológicos que contribuyen a la patología de la enfermedad causada por esta micobacteria (Daniel et al., 1994).

2.4. VIRULENCIA

M. tuberculosis no posee factores de virulencia clásicos como otras bacterias patógenas (toxinas, etc). Experimentalmente, la virulencia se mide en términos de mortalidad y se refiere al porcentaje de animales infectados que mueren debido a la infección. Otro parámetro importante asociado con virulencia es la carga bacteriana, es decir, el número de micobacterias encontradas en un hospedero infectado después de la infección inicial. La morbilidad es medida por análisis histopatológicos ya que el daño al pulmón causado por la bacteria produce anoxia debido a la obliteración de las células del parénquima pulmonar involucradas en la captura de oxígeno, así como a la obstrucción de bronquiólos por los granulomas y liberación de sangre durante la ruptura de granulomas con licuefacción en el tejido adyacente. Esta anoxia lleva a la muerte (Zugar et al., 1996).

2.5. MANIFESTACIONES CLÍNICAS

La tuberculosis es una enfermedad que se caracteriza por la formación de estructuras histológicas características denominadas granulomas o tuberculomas donde los bacilos quedan atrapados. La enfermedad se localiza principalmente en el pulmón, sobre todo en los lóbulos inferiores; aunque puede afectar a otros órganos, enfermedad que se denomina tuberculosis extrapulmonar. El principal reservorio del bacilo tuberculoso son los macrófagos del hospedero, donde habita intracelularmente. Algunos bacilos podrán ser destruidos por los macrófagos y otros, con mayor capacidad agresiva, tendrán la facultad de resistir los mecanismos defensivos celulares. La primera reacción inflamatoria en contra del bacilo constituye el llamado complejo primario. En general la infección con *M. tuberculosis* tiene una

repercusión sobre el pulmón que puede traducirse en dos situaciones patológicas distintas. La primoinfección tuberculosa subclínica se caracteriza por la ausencia de síntomas y signos clínicos, radiológicos y bacteriológicos, sólo la prueba de tuberculina es positiva. La enfermedad tuberculosa donde se presentan las manifestaciones clínicas, radiológicas, bacteriológicas e inmunológicas (Milburn, 2001). Cada persona enferma no tratada infectará en promedio entre 10 y 15 personas cada año. Solamente del 5 al 10% de las personas infectadas desarrollaran la enfermedad. Los bacilos tuberculosos pueden permanecer latentes en el organismo durante un largo periodo, hasta que una disminución de las defensas le da la oportunidad de multiplicarse y producir los síntomas de la enfermedad (Schlossberg, 2000).

2.6. DISEMINACIÓN

El bacilo de la tuberculosis se transmite mediante pequeñas partículas de menos de 10 μm emitidas al estornudar, hablar o toser. La mayoría de los pacientes tuberculosos excretan pocos bacilos, por lo que generalmente se requiere un contacto continuo para infectarse aunque una sola bacteria es teóricamente capaz de producir la enfermedad en un individuo susceptible. Desde el foco inicial de infección el bacilo tuberculoso puede diseminarse, fundamentalmente por vía hematológica, aunque también por vía linfática y broncógena, a otras áreas del pulmón y a los demás órganos. Solamente las partículas inhaladas más pequeñas, que contienen entre 1-3 bacilos, van a ser capaces de llegar al alveolo y ser fagocitados por los macrófagos alveolares (Leung, 1999).

Dentro del lumen de los alvéolos pulmonares, los bacilos se multiplican y posteriormente pueden ganar acceso al torrente sanguíneo debido al daño en el tejido. La diseminación extrapulmonar puede ocurrir por el transporte de los bacilos vía el sistema linfático o por el pase directo del bacilo del lumen alveolar hacia los capilares. El proceso de diseminación puede permitir al bacilo alcanzar regiones vulnerables como el sistema nervioso central, el tracto genital, el intestino, la piel, los huesos, etc. En los pulmones las micobacterias pueden causar cavitación y a partir de estas lesiones pueden posteriormente diseminarse y convertirse en una tuberculosis extrapulmonar (Clark-Curtiss y Haydel, 2003). En un estudio donde infectan con *M. tuberculosis* ratones susceptibles y resistentes a la tuberculosis, la diseminación del bacilo fue idéntica en los dos fenotipos. La capacidad de diseminación parece estar determinada más por factores bacterianos que del hospedero (Mischenko et al., 2004).

2.7. TUBERCULOSIS EXTRAPULMONAR

La forma más grave de la tuberculosis extrapulmonar es la infección del sistema nervioso central donde principalmente causa meningitis. Sin embargo el bacilo puede afectar también el tracto urogenital, digestivo y el sistema tegumentario. La incidencia de la tuberculosis extrapulmonar varía entre 5 y 20% de los casos registrados. Sin embargo en un estudio en Estados Unidos se encontró una incidencia de 68% de tuberculosis extrapulmonar en personas infectadas con HIV (Vijayan, 2000).

La enfermedad se desarrolla en cuatro etapas, la primera se da entre 3 y 8 semanas después de que la bacteria fue inhalada y se implanta en los alvéolos, la bacteria se

disemina por circulación linfática a los ganglios linfáticos regionales del pulmón (Garay, 1996^a). La segunda etapa es caracterizada por la circulación hematogena de la bacteria dentro de diferentes puntos en el pulmón y hacia otros órganos. En la tercera etapa se puede originar una inflamación en la superficie pleural. El último estado es la resolución del complejo primario donde la enfermedad ya no progresa (Garay, 1996^b). Generalmente en las personas inmunocompetentes la enfermedad queda latente, sólo un 5% de los infectados desarrollarán la enfermedad. En personas coinfectadas con HIV y *M. tuberculosis* la posibilidad de desarrollar la infección es del 50% (Elder, 1992; Haenselt, 1982).

La infección con *M. tuberculosis* generalmente es causada por una sola cepa, sin embargo se han encontrado infecciones con diferentes cepas (infecciones mixtas). Interesantemente, en un trabajo en el cual se estudió en ratones el comportamiento de cepas pulmonares y extrapulmonares aisladas de individuos enfermos, se demostró que algunas de las cepas de *M. tuberculosis* extrapulmonares, presentaron una mayor habilidad para la diseminación sugiriendo estas observaciones que posiblemente estas cepas se adaptan mejor a un ambiente extrapulmonar (García et al., 2003). Posteriormente, estos mismos autores demostraron que las cepas de *M. tuberculosis* extrapulmonares eran más eficientes para la invasión ya que causan con mayor frecuencia bacteremia, daño y diseminación en ratones cuando se comparan con las cepas de origen pulmonar. Esto demuestra que existen factores bacterianos que determinan la invasión. Sin embargo aún no se han dilucidado el o los mecanismos que subyacen atrás del “tropismo” pulmonar o extrarespiratorio (García et al., 2005).

2.8. TUBERCULOSIS EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL (SNC)

Green publicó la primera descripción de la tuberculosis meníngea como una enfermedad del SNC en 1836 (Green, 1836). El número de casos de tuberculosis extrapulmonar es de 10-20%, siendo la meningitis tuberculosa una de las principales formas de esta enfermedad. *M. tuberculosis* es considerada la bacteria intracelular que infecta el sistema nervioso central con mayor frecuencia (Drevets DA, 2004). La incidencia de la tuberculosis meníngea en niños es de 19.8 por 100 000 habitantes (Topley et al., 1998).

La tuberculosis meníngea es la forma más grave de las afecciones causadas por el bacilo. Las lesiones características de la infección por *M. tuberculosis* en el SNC ocurren principalmente en las meninges, en el parénquima cerebral y pueden presentarse focos en la médula espinal. Puede llevar a la muerte debido a la inflamación del tejido cerebral. La enfermedad se caracteriza por afectar el sistema vascular cerebral (arterias, y vasos sanguíneos) provocando inflamación. Esta vasculitis provoca oclusión vascular e isquemia cerebral. En algunos casos también se presenta hidrocefalia. El tejido cerebral puede presentar varios grados de daño como edema, infiltración perivascular y un proceso de inflamación en la microglía llamado "encefalitis en la zona de borde" (Katti, 2004). Pueden formarse tuberculomas en el cerebro como estructuras ovoides grandes formadas por el alargamiento de los granulomas cerebrales. Los signos y síntomas que se presentan normalmente son fiebre, dolor de cabeza y en casos graves puede provocar coma. Al no haber una

sintomatología clara ni un diagnóstico certero se puede retrasar el diagnóstico de este tipo de tuberculosis (Surendra et al., 2005).

La mortalidad por tuberculosis meníngea es alta, los pacientes no tratados mueren dentro de las primeras tres semanas. A nivel histológico se presenta un aumento en neutrófilos, la formación de un exudado gelatinoso que cubre la superficie del cerebro, el cual contiene eritrocitos, neutrófilos y macrófagos. Además pueden presentarse áreas con necrosis caseosa, rodeadas de células epitelioides y células gigantes. Las lesiones características son llamadas “focos de Rich” (pequeños nódulos de 1µm de diámetro) (Rich y Mc Cordock, 1993). Existe además infiltrado infeccioso crónico subendotelial en los vasos del polígono de Willis, fibrosis y endocarditis obliterativa con infartos secundarios (Laguna et al., 1992).

En el SNC, las células de la microglía, que son macrófagos residentes del parénquima cerebral son las células preferencialmente infectadas por el bacilo. Se ha propuesto que la bacteria puede alcanzar el espacio subaracnoides debido a la ruptura de lesiones en el parénquima adyacente como se ha observado en la meningitis aguda (Simmons et al., 2005). Por otra parte, *M. tuberculosis* es capaz de invadir y atravesar la barrera vasocerebral del cerebro (Jain et al, 2006). El paso de sustancias a través de la barrera cerebral sanguínea es regulado por capilares cerebrales que poseen algunas propiedades morfológicas y enzimáticas diferentes comparadas con los capilares de otros órganos. Esta barrera esta compuesta por células endoteliales unidas por uniones estrechas y representa una compleja estructura dinámica, capaz de modular rápidamente diferentes condiciones, ya que regula y protege el microambiente del cerebro. Las uniones estrechas permiten que

esta barrera pueda regular la composición del parénquima cerebral. Los astrocitos tienen un papel protector contra la hipoxia e hipoglucemia (Cecchelli et al., 1999).

En los últimos años se ha estudiado cómo el bacilo de *M. tuberculosis* pudiera atravesar la barrera cerebral. Al infectar ratones deficientes en el marcador CD182/2 el cual está presente en la superficie de los monocitos y neutrófilos, se demostró que no obstante la ausencia de estas células, se presentó igual número de bacterias en el cerebro en los ratones deficientes que en el de los ratones silvestres (Cecchelli et al., 1999). Esto descarta la posibilidad de que las micobacterias puedan atravesar la barrera cerebral dentro de monocitos o neutrófilos. En este mismo trabajo, también se demostró que las micobacterias no alteran las uniones estrechas celulares, por lo que los autores sugieren que *M. tuberculosis* pudiera atravesar la barrera cerebral invadiendo las células epiteliales del plexo coroideo. Posteriormente se demostró que las micobacterias no patógenas no son capaces de atravesar las barreras endoteliales en un modelo *in vitro*. De acuerdo a los resultados los autores sugieren que la invasión celular por las micobacterias requiere rearrreglos en el citoesqueleto de actina por lo que el paso de la barrera cerebral puede ser transcelular (Jain et al., 2006).

2.9. RESPUESTA INMUNE

El pulmón representa el epitelio de mayor superficie en contacto con el exterior en el cuerpo, esto debido al requerimiento de intercambio gaseoso. Está expuesto a una gran cantidad de partículas que pueden ser depositadas en la superficie del tracto respiratorio. Existe un sistema elaborado de mecanismos de defensa para mantener la esterilidad del pulmón (Condos et al., 2000). La inmunidad innata es la principal

respuesta responsable de la eliminación de los organismos bacterianos del alveolo, esta involucra la expresión de moléculas de adhesión vascular, leucocitos, así como el establecimiento de gradientes quimiotácticos por la generación de citocinas y quimiocinas proinflamatorias. Algunos componentes de la respuesta innata con actividad antimicrobiana son proteínas de complemento, lisozima, lactoferrina, defensinas, leucoproteasas, catelcidinas y la proteína inductora de permeabilidad (Kaufmann et al., 2005). La respuesta incluye moléculas antimicrobianas y defensas fagocíticas (macrófagos alveolares y leucocitos polimorfonucleares) (Frevert y Martin, 2005).

La respuesta adquirida es el mecanismo antígeno-específico. Este sistema interacciona con otros sistemas como las vías de apoptosis (Zhang et al., 2000). Entre los componentes del sistema adaptativo están las inmunoglobulinas, importantes en la opsonización de los patógenos; y los linfocitos B presentes en mucosas que secretan las inmunoglobulinas (Mason y Nelson, 2005). Además existen barreras como la humidificación y el arreglo anatómico de las fosas nasales que permite la filtración del aire inhalado (Condos et al., 2000). Las partículas grandes aspiradas son “barridas” o expulsadas por la expectoración. El reflejo del estornudo facilita también la expulsión de las partículas extrañas. La glotis es otra barrera para prevenir la contaminación de tractos superiores y evitar el paso a la tráquea y pulmones. *M. tuberculosis* puede llegar al árbol bronquial y estimular el reflejo de la tos y ser expulsados (Jacobs et al., 2004). Una vez establecidas en el pulmón las micobacterias viables pueden persistir de 2 formas: secuestradas dentro de lesiones focales caracterizadas por fibrosis y calcificación subsiguiente (caseación y licuefacción); ó fuera de lesiones focales. Las

bacterias pueden ser liberadas por la lisis de las células que las contienen mediada por gránulos de perforina generados por células CD8⁺ (Stewart et al., 2003).

El control de la tuberculosis requiere la generación de una respuesta de células T y el reclutamiento de células inflamatorias que rodeen y contengan a los macrófagos infectados y limiten la diseminación de los bacilos. La respuesta inmune adquirida a *M. tuberculosis* puede ser dividida en tres fases sobrelapadas, el inicio y desarrollo de respuesta inmune celular específica, la expresión de inmunidad protectora en el pulmón y el mantenimiento de inmunidad protectora. La fase del inicio y desarrollo es caracterizado por la activación de los linfocitos T (Saunders y Cooper, 2000).

Las células dendríticas del pulmón capturan los componentes micobacterianos. Estas células procesan los antígenos y migran hacia los nodos linfáticos mediastinales y activan linfocitos T "naive". La fase de expresión de la inmunidad protectora es dependiente de la sobrerregulación de selectinas, integrinas, adhesinas que actúan en leucocitos y células endoteliales para mediar el reclutamiento de leucocitos y extravasación en el pulmón. El patrón de quimiocinas y citocinas controla el reclutamiento y migración de *M. tuberculosis* y por ende la activación de linfocitos para la formación del granuloma. Por un lado el granuloma provee un ambiente donde las células T y los macrófagos mantienen una posición cerrada para la activación efectiva de macrófagos. Además, provee un ambiente de acumulación celular que circunscribe un ambiente tóxico para controlar a la micobacteria. También limita la diseminación de la infección (Saunders y Cooper., 2000).

2.10. GENÉTICA DE *M. tuberculosis*

Actualmente se ha logrado la secuenciación de los genomas de *M. tuberculosis*, *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium bovis* disponibles en la página <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/static/eub.html>. El genoma de *M. tuberculosis* H37Rv consiste en 4 411 529 pares de bases (pb), contiene 3924 genes correspondientes al 91% de capacidad codificante (Cole et al., 1998). Los genes encontrados se clasificaron en 11 grupos. Cerca del 51% de los genes son resultado de una duplicación génica o eventos de entrecruzamiento (Cole S, 2002). Tiene un alto contenido (65.6 %) de G + C. Alrededor del 3% del genoma está compuesto por secuencias de inserción y profagos (Brosch et al., 2001; Manabe et al., 2000).

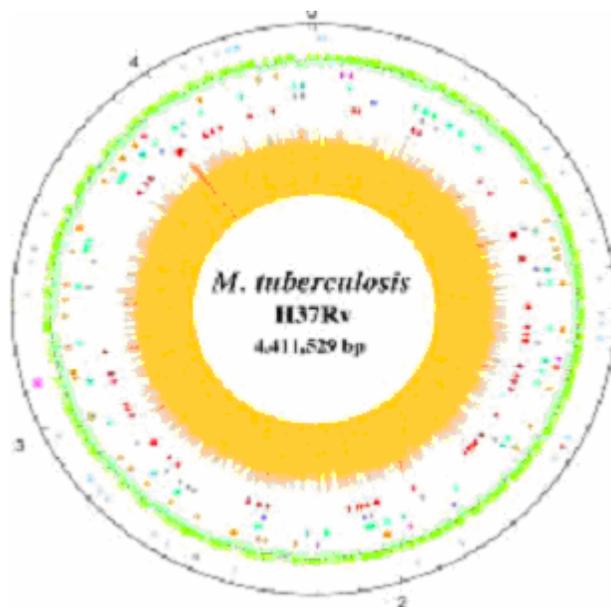


Figura 4. Genoma de *M. tuberculosis*

El 8% codifica enzimas involucradas en lipogénesis y lipólisis. Alrededor del 4% codifica dos familias de proteínas ricas en glicina con una estructura repetitiva.

A pesar de los esfuerzos en la investigación, hay poca información sobre las bases moleculares de la virulencia micobacteriana. Sin embargo, gracias a la secuenciación de los genomas de algunos miembros del género, se han empezado a elucidar los factores bacterianos que contribuyen a la virulencia. Así se ha establecido que se requiere la expresión coordinada de numerosos determinantes específicos de virulencia en diferentes tiempos de la infección. Gracias a la información obtenida de la secuenciación se comprobó la función de algunos genes micobacterianos y además estudiar otros genes involucrados potencialmente en la patogénesis.

3.1. ANTECEDENTES

Desde el punto de vista celular y molecular el primer evento que ocurre en la tuberculosis es la entrada de las micobacterias vía aerosol y su establecimiento en los alvéolos. En este paso las micobacterias pueden interactuar con los macrófagos, pero además pueden interaccionar con neumocitos y ser ingeridas por este tipo de células. La adhesión bacteriana evita la eliminación de la bacteria del tejido. En este proceso participan tanto componentes de la superficie del hospedero como de la superficie bacteriana. De la misma forma la capacidad de invadir a las células no fagocíticas ofrece al organismo nutrientes, protección contra las defensas inmunológicas, etc. *M. tuberculosis* es un patógeno capaz de adherirse, invadir, multiplicarse y modular algunas de las funciones respiratorias celulares (Bermudez y Goodman, 1996).

En la fagocitosis de las micobacterias intervienen diferentes receptores presentes en la superficie de los macrófagos que son las células hospederas más importantes en la infección (Schnappinger et al., 2006; Wang et al., 2003). Durante muchos años se creyó que los macrófagos eran las células principalmente involucradas en la interacción de las micobacterias con el hospedero. Sin embargo, las células epiteliales se encuentran de manera más frecuente en los alvéolos que los macrófagos y constituyen también un nicho para las micobacterias. En los últimos años un alto número de evidencias demuestran que las micobacterias pueden invadir también estas células, y que la entrada de la bacteria es mediada por factores bacterianos específicos (Leemans et al., 2001).

Puesto que los alvéolos están delimitados principalmente por neumocitos tipo I y II, existe una mayor probabilidad de que la bacteria encuentre una célula epitelial alveolar que un macrófago. Las micobacterias pueden interactuar principalmente con neumocitos como lo demuestra un estudio reciente, donde se encontró que existe un mecanismo de diseminación macrófago independiente, ya que se observó diseminación de las micobacterias en ratones carentes de macrófagos y del factor mononuclear de crecimiento fagocítico. Estos resultados sugieren que las células no fagocíticas y en especial las células epiteliales, podrían participar en la diseminación de *M. tuberculosis* (Leemans et al., 2001).

3.2. INTERACCIÓN DE *MYCOBACTERIUM* CON LAS CÉLULAS EPITELIALES

Se ha observado que una vez que *M. tuberculosis* infecta a los macrófagos en el pulmón se induce la producción de quimiocinas que atraen monocitos inactivados, linfocitos y neutrófilos. Este mecanismo no logra eliminar a la bacteria eficientemente, por lo que la bacteria puede escapar del granuloma y diseminarse dentro del pulmón o incluso a otros órganos (Dannenberget al., 1994).

La micobacteria es también capaz de infectar y crecer en los neumocitos (Trudeau, 1887; Bermudez y Goodman, 1996). McDonough et al., demostraron que la cepa virulenta de *M. tuberculosis* H37Rv causa daño a las células del epitelio pulmonar en humanos y a los macrófagos alveolares de ratones; sin embargo la cepa avirulenta BCG no presenta esta citotoxicidad, demostrando que las micobacterias patógenas pueden invadir directamente el epitelio alveolar (Mc Donough y Kress., 1995).

El epitelio alveolar está compuesto por dos tipos celulares: los neumocitos tipo I y II. La capa de células tipo I cubre la mayoría de la superficie alveolar área, mientras que sólo una pequeña porción está cubierta por neumocitos tipo II. Las células tipo I son responsables de formar una delgada barrera gaseosa, mientras que las células tipo II secretan surfactantes para prevenir el colapso alveolar durante la espiración. *M. tuberculosis* puede unir e invadir neumocitos y macrófagos, sin embargo se replica de manera más eficiente en los neumocitos (Bermudez y Young, 1994; Mehta et al., 1996). Esta bacteria, invade principalmente las células alveolares del epitelio tipo II (Bermudez y Goodman, 1996).

La micobacteria puede causar necrosis de los neumocitos destruyendo la barrera celular, lo que pudiera facilitar el paso al torrente sanguíneo y permitir la invasión; también atravesar una barrera epitelial *in vitro* cuando se encuentra dentro de monocitos. Así la micobacteria podría ganar acceso atravesando el epitelio y viajando en la sangre dentro de los monocitos. (Bermudez et al., 2002)

Por otra parte *M. tuberculosis* puede invadir a las células epiteliales M. Estas células están unidas por uniones estrechas e ínterdigitaciones; presentan bajos niveles de enzimas digestivas, secretan una ligera capa mucosa, tienen microvellosidades cortas y mecanismos de endocitosis y pinocitosis. Proveen un blanco perfecto para la entrada y sobrevivencia de los patógenos. La importancia de estas células en la infección fue comprobada al usar células M aisladas de la mucosa bronquial en un modelo *in vitro*, donde se demostró que permiten la entrada del bacilo en menos de 3 horas. Este hecho facilitaría la entrada a los ganglios linfáticos broncotraqueales y por lo tanto su diseminación (Teitelbaum et al., 1999).

La micobacteria se adhiere a la superficie causando perturbaciones en la membrana que provocan la formación de proyecciones membranales, las cuales rodean a los bacilos y los atrapan facilitando su internalización. De este modo la bacteria participa de manera activa en el proceso de la infección. Interesantemente este tipo de internalización no se observa con las micobacterias saprófitas (Reddy y Hayworth, 2002). En otro trabajo se observó que únicamente los macrófagos infectados más los macrófagos no infectados no podían atravesar la capa celular, lo que indica que la bacteria también juega un papel importante en este proceso (Bermúdez et al., 2002)

La salida de las micobacterias del pulmón está sustentada por numerosos trabajos en la literatura (Golden y Vikram, 2005). Uno de los estudios más recientes, demostró que la micobacteria se disemina inicialmente hacia el sistema linfático, en este trabajo las micobacterias se inocularon en el lóbulo medio del pulmón y se estudió la cinética de diseminación a diferentes sitios anatómicos y el reclutamiento de fagocitos y linfocitos activados (Mischenko et al., 2004).

3.3. GENES POSIBLEMENTE INVOLUCRADOS EN INVASIÓN

La adherencia y la invasión son factores críticos para una posterior colonización de la bacteria, en ambos casos participan tanto componentes de la superficie de la bacteria, como del hospedero. Gracias a la secuenciación del genoma de *M. tuberculosis* se han empezado a elucidar los componentes bacterianos posiblemente involucrados en estos procesos. A continuación se mencionan algunos genes ó proteínas que parecen estar involucrados en la capacidad invasiva de la micobacteria.

3.3.1. HEMAGLUTININA DE UNIÓN A HEPARINA (HBHA, heparin-binding hemagglutinin)

Debido a que *M. tuberculosis* es transmitido por vía aérea, las primeras estructuras del hospedero que encuentran las micobacterias son las células del epitelio respiratorio. Como resultado, las interacciones del microorganismo con las células respiratorias epiteliales y proteínas de la matriz extracelular durante los pasos iniciales de la infección pueden ser importantes para ganar acceso a los sistemas circulatorios y linfáticos por la adherencia directa y la penetración de células alveolares epiteliales. Es por esto que la adhesión microbiana al tejido del hospedero constituye un evento crítico en la patogénesis de muchas bacterias (Menozzi et al., 2002).

En 1996, Menozzi identificó una proteína micobacteriana de 199 aa con un peso molecular de 28 kDa que une heparina. Esta proteína presente en *M. tuberculosis* y *M. bovis*, fue llamada Hemaglutinina de unión a heparina (heparin-binding hemagglutinin HBHA) ya que promueve la aglutinación de eritrocitos de conejo y la agregación micobacteriana. Los anticuerpos originados contra esta proteína inhiben la hemoaglutinación, la agregación bacteriana así como la unión a células epiteliales. Además en este trabajo se demostró que la proteína está expuesta en la superficie celular y es reconocida por los sueros de los pacientes con tuberculosis, una indicación de que ésta se expresa durante las infecciones micobacterianas (Menozzi et al., 1996).

Posteriormente se demostró que la HBHA se une a carbohidratos sulfatados a partir de una región rica en Lisinas y Prolinas, promoviendo así su unión a los tejidos del hospedero (Menozzi et al., 1998). Además, la remoción de esta proteína inhibe la adhesión de la bacteria a neumocitos humanos (Menozzi et al., 1996). La HBHA es producida por todos los miembros del complejo tuberculosis pero no así por las micobacterias saprófitas como *M. smegmatis* (Menozzi et al., 2002).

Al mutar a la HBHA se comprobó que no participa en la morfología ni el crecimiento de la micobacteria, ni en la interacción de la bacteria con macrófagos *in vitro*; pero sí es necesaria para la interacción e invasión de los neumocitos humanos. En este mismo trabajo, al analizar su participación *in vivo* se demostró que la proteína no está involucrada en la colonización del pulmón, sin embargo si lo está en la invasión al bazo. En el mismo trabajo, al ser inoculada por vía intravenosa, el número de micobacterias fue similar a lo obtenido al inocular la cepa silvestre (Petthe et al., 2001). Estos resultados sugieren que HBHA es esencial para el escape de las micobacterias del pulmón y el establecimiento de la enfermedad extrapulmonar.

Posteriormente, en un modelo murino, se demostró que al mutar el gen que codifica la HBHA se disminuía la diseminación de las micobacterias al pulmón, hígado y bazo y que esta capacidad era restaurada al complementar las mutantes con el gen silvestre (Mueller et al., 2002). La diseminación extrapulmonar es inhibida con la preincubación de anticuerpos contra HBHA que reconoce la región C-terminal (Petthe et al., 2002).

Menozzi et al., demostraron en el 2006 que esta proteína induce una reorganización de los filamentos de actina en una barrera de células endoteliales, pero no afecta las uniones estrechas. Esta proteína medía la unión e internalización de la micobacteria en células epiteliales laríngeas humanas (HEp-2) y a neumocitos tipo II (A-549). Al parecer la región carboxilo terminal es la que media estos efectos biológicos, ya que al eliminarla se inhibe la transocitosis, lo que además sugiere que la HBHA induce una endocitosis mediada por receptores (Menozzi et al., 2006)

Por otra parte Delogu et al., demostraron que este gen es diferencialmente expresado durante la infección por *M. tuberculosis*, siendo mayor su expresión al inicio de la infección cuando la bacteria se disemina del sitio de infección primario. Además, estos autores observaron que el gen es sobrerregulado en células epiteliales pero no en macrófagos (Delogu et al., 2006a). Interesantemente, Shin et al., observaron que los sueros de pacientes que contenían anticuerpos α -HBHA neutralizan la entrada de *M. tuberculosis* a las células epiteliales (Shin et al., 2006).

3.3.2. PROTEÍNA DE UNIÓN A LAMININA (HLP)

Se ha demostrado recientemente que las cadenas de α -2 laminina presentes en la superficie de algunas células están involucradas en el proceso de unión de *M. lepra* a las células de Schwann. Prabhakar et al., identificaron y caracterizaron a la proteína micobacteriana capaz de unir estas cadenas de laminina (Prabhakar et al., 1998).

En 1999 Shimoji et al., demostraron que era una proteína catiónica de superficie de veinte aminoácidos. Es una proteína con actividad de adhesina uniéndose a laminina por lo que fue llamada proteína de unión a laminina (ML-LBP21, laminin-binding protein). Marques et al., demostraron que la proteína aumenta grandemente la unión de las micobacterias a las células de Schwann (Marques et al., 2001) Al ser caracterizada se determinó que está presente en la pared celular y que es una proteína tipo histona (Histone like proteín- HLP) (Melo et al., 2000).

Posteriormente se encontró que esta proteína muestra 78% de identidad con la proteína codificada por el gen *hupB* de *M. tuberculosis* (Shimoji et al., 1999). Aunque *hupB* presenta homología con proteínas en otras micobacterias, presenta diferencias en la región carboxilo terminal (Prabhakar et al., 2004) como en el caso de *M. smegmatis* (Lee et al., 1998).

HLP es capaz de unirse a laminina de sarcoma murino, células epiteliales y neumocitos humanos. Esto sucede tanto con *M. tuberculosis* y *M. smegmatis*, lo que demuestra que la función de esta proteína no está restringida únicamente a la citoadherencia a células nerviosas como fue observado inicialmente para *M. leprae* (Petthe et al., 2001).

También se ha demostrado que la habilidad de unión α 2-lamininas y de interactuar con y ser fagocitado por las células de Schwann a través de la Hlp es una función conservada entre el género *Mycobacterium* (Marques et al., 2001)

3.3.3. OPERONES DE ENTRADA A CELULAS DE MAMÍFEROS (MCE: mamalian cell entry locus)

Arruda et al., en 1993 utilizando una biblioteca de genes de *M. tuberculosis* lograron conferir a *Escherichia coli* no patogénica la capacidad de invadir a las células Hela y sobrevivir dentro de ellas. El gen responsable de la entrada a células de mamíferos y la supervivencia fue localizado en un locus en el fragmento del DNA de *M. tuberculosis* transfectado. Este gen de 1 535 pb fue llamado *mce* (Arruda et al., 1993). Parker et al., demostraron la presencia de genes homólogos en *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare* y *Mycobacterium scrofulaceum*. Posteriormente se demostró la existencia de otros genes *mce* arreglados en operones. (Parker et al., 1995).

Se han encontrado cuatro operones *mce*. En la Figura 5 se observa un esquema donde se representa el arreglo de los operones *mce* para *M. tuberculosis*.

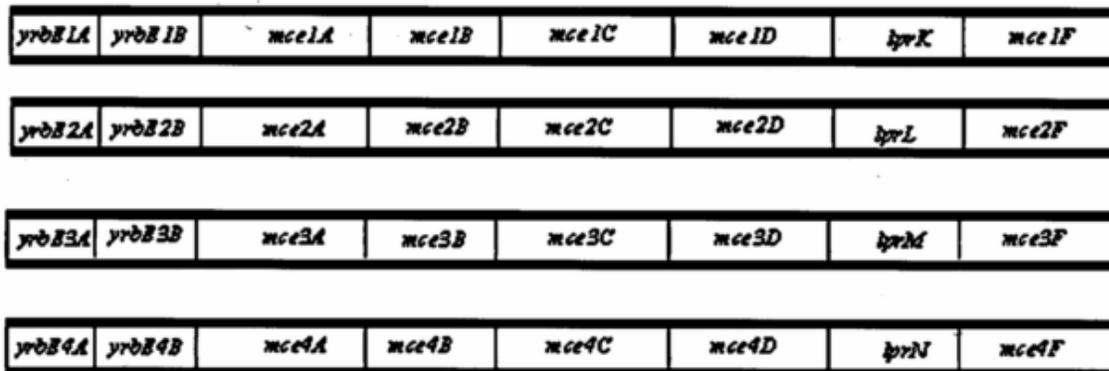


Figura 5. Esquema del arreglo de los operones *mce* en *M. tuberculosis*. Tomado de Kumar et al., 2003.

Los genes *mce* codifican para proteínas tipo invasinas y adhesinas localizadas en la superficie de las micobacterias involucradas en la invasión de las células hospederas. La infección a las células HeLa se redujo a un 45% cuando se infectaron con una cepa mutante para *mce-1A* al compararlo con la cepa silvestre (Flesselles et al., 1999). Ahmad et al., demostraron en 2004, que la proteína codificada por el gen *mce-1A* es reconocida por anticuerpos de pacientes tuberculosos indicando su expresión *in vivo* (Ahmad et al., 2004, Harboe et al., 2002). En otro estudio se demostró que al cubrir perlas de poliestireno con la proteína Mce-1A, estas interactuaban y eran fagocitadas por las células (Chitale et al., 2001, Haile et al., 2002).

Al analizar la presencia de los operones *mce* en diferentes cepas se estableció que estos genes están ampliamente distribuidos en el género *Mycobacterium*. La presencia y la organización de los cuatro operones varían en diferentes micobacterias. El operón *mce 3* está ausente en *M. bovis* y BCG. *M. leprae* contiene sólo los operones *mce 1* y *mce-4* (Haile et al., 2002). También se han observado diferencias en la expresión de los cuatro operones (Kumar et al., 2005). En *M. tuberculosis*, *mce-1* es altamente expresado *in vitro*, mientras que *mce-3* y *4* cambian a lo largo de la fase estacionaria. *In vivo* la expresión de estos genes varía dependiendo del hospedero infectado y el tipo de tejido afectado (Kumar et al, 2003).

El operón *mce-3* codifica para 6 proteínas, las cuales fueron reconocidas por sueros de pacientes con tuberculosis (Ahmad et al., 2004). Las proteínas del operón *mce-1* presentan reactividad cruzada usando diferentes anticuerpos (Harboe et al., 2004).

Para determinar el papel de los operones *mce*, se realizaron mutantes para los operones *mce-1*, *mce-2*, *mce-3* y se comparó su crecimiento *in vitro*. Se observó que estas cepas muestran las mismas características de crecimiento *in vitro* que las cepas parentales. *In vivo* se observó que las cepas mutantes no matan a los ratones en comparación con la cepa parental además de observarse una menor carga bacteriana para la cepa mutante. La cepa parental causa grandes lesiones mientras que las cepas mutadas causan muy poco daño. Esto sugiere que los genes codificados por *mce* pueden jugar un papel en la invasión y o la sobrevivencia de las micobacterias (Gioffre et al., 2005).

El papel de la proteína membranal Mce 1A en la invasión de las micobacterias se demostró en ensayos *in vitro* ya que esta proteína induce la invaginación de la membrana y la entrada a células HeLa. Estos procesos fueron inhibidos con citocalasina D y nocodazol indicando la existencia de rearrreglos en microtúbulos y filamentos. La actividad de esta proteína está dada por un dominio localizado en la región central de la proteína llamado Inv3 (Lu et al., 2006). Al comparar la estructura secundaria predicha para las proteínas Mce1A, Mce2A, Mce3A y Mce4A, se encontró que existe 70% de similitud y que contienen dominios alfa/beta similares. Al hacer un análisis mediante la predicción de la estructura de las proteínas se encontró que el dominio beta está probablemente involucrado en la unión de las células, mientras el dominio alfa en la formación de poros. También se encontró la posible existencia de una región de unión a lípidos requerida para señalización en el proceso de internalización (Mitra et al., 2005)

3.3.4. PE_PGRS

Poulet y Cole describieron en 1995 la existencia de secuencias repetitivas ricas en G+C (PGRS: polymorphic GC rich sequence) en el genoma de *M. tuberculosis*. La secuencia del genoma de *M. tuberculosis* definió la existencia de dos familias de secuencias repetitivas que se denominaron PE y PPE ya que presentan estos aminoácidos en el extremo amino-terminal. El hallazgo de que el genoma contuviera numerosos genes de estas familias ha representado uno de los hallazgos más interesantes. Se descubrieron casi 100 genes que pertenecen a la familia PE esparcidos a lo largo del genoma. Dentro de esta familia existen dos subfamilias llamadas PE y PGRS. Los genes PE_PGRS codifican proteínas complejas en las que el dominio de PE se une al extremo C-terminal con secuencias variadas en tamaño y conteniendo de un dominio rico en el Alanina y Glicina (el dominio de PGRS).

Aún son pocos los estudios que se han llevado a cabo para aclarar algunas funciones de estas proteínas. (Poulet y Cole, 1995; Espitia C, 1999). Ramakrishnan et al., mostraron que *Mycobacterium marinum* expresa una proteína homóloga a la Rv1651c en tejidos granulomatosos sugiriendo que estas proteínas están involucradas en las fases crónicas de infecciones micobacterianas. En este estudio también se demostró que al mutar algunos genes PE_PGRS se inhibe la replicación de las micobacterias en macrófagos y la persistencia en granulomas (Ramakrishnan et al., 2000).

Al eliminar el gen homólogo a Rv1818c en *M. bovis BCG* se demostró que la micobacteria crece más dispersa y se reduce la infección de macrófagos sugiriendo estos resultados que la proteína está localizada en la superficie celular (Brennan et al., 2001). La sobreexpresión de esta proteína afecta la forma y el tamaño de las colonias bacterianas confirmándose así que está asociada a la pared micobacteriana (Brennan y Delogu, 2002). Debido a la importancia de la pared en las micobacterias, la regulación en la expresión de esta proteína podría tener implicaciones en la sobrevivencia y patogénesis dentro del hospedero ya que son expresadas por *M. tuberculosis* durante la infección (Delogu et al., 2004., Brennan et al., 2001). Se ha observado que los genes PE_PGRS son expresados diferencialmente en varias cepas de *M. tuberculosis* durante el crecimiento *in vitro* (Flores et al., 2003; Dheenadhayalan et al., 2006) e *in vivo* (Delogu et al., 2006). Aunado a esto el extremo polimorfismo encontrado entre diferentes cepas sugiere que pudieran ser una fuente importante de variación antigénica en las bacterias del complejo *M. tuberculosis* (Talarico et al., 2005; Santillan et al., 2006). Al encontrarse en la pared celular, se ha propuesto su participación en variación antigénica (Brennan et al., 2002)

3.4. SUJETO DE ESTUDIO

En el Instituto Nacional de Salud, de Bogotá, Colombia, se llevó a cabo la caracterización molecular del locus DR de 500 aislados de *M. tuberculosis*, utilizando el spoligotyping. El spoligotyping es un método que permite la detección e identificación de las bacterias pertenecientes al complejo tuberculosis. Este método está basado en la amplificación de un locus de repeticiones directas altamente polimórfico presente en el genoma de *M. tuberculosis* (Groenen et al., 1993; Gori et al., 2005). Esto permitió la identificación de un grupo genotípico de aislamientos con un patrón característico de hibridación que fue exclusivo de 10 cepas aisladas del líquido cefalorraquídeo de pacientes con tuberculosis meníngea. Aunque estos 10 aislamientos compartieron el mismo patrón, al amplificar el locus DR por PCR, existieron diferencias en el tamaño de los fragmentos y sus secuencias, lo que permitió subclasificarlas en tres grupos.

Posteriormente se infectaron macrófagos con una bacteria representante de cada uno de los tres subgrupos mencionados. Las cepas usadas fueron la cepa 209, 28 y 136. En este experimento se observó que estas cepas sobreviven en menor proporción que la cepa H37Rv. Con el fin de conocer el comportamiento *in vivo* de dichas cepas, y la cepa de referencia *M. tuberculosis* H37Rv, estas fueron inoculadas por vía intratraqueal en ratones Balb/c. Estos fueron sacrificados en los días 1, 3, 7, 14, 21, 28, 60 y 120 post-infección extrayéndose: pulmón, bazo, hígado y encéfalo. Interesantemente se encontraron algunos bacilos ácido-alcohol resistentes en cortes histológicos del encéfalo.

Las bacterias meníngeas se encontraron en fibras nerviosas de la base del cerebro específicamente a nivel del bulbo raquídeo. Estas bacterias de origen meníngeo fueron detectadas por PCR in situ, UFC, inmunohistoquímica y Zhiel-Neelsen. Además estas cepas presentaron diferente nivel de virulencia con respecto, a la capacidad de matar a los ratones infectados con cada una de ellas. La cepa 209 fue la cepa de mayor virulencia y la cepa 28 la de menor (*com per.* Dr. Rogelio Hernández Pando)

Estos resultados sugieren que estas cepas muestran tropismo hacia el SNC requiriendo así factores que le permitan diseminarse del sitio de primoinfección hacia el SNC. Debido a esto, en el presente trabajo se utilizaron las cepas 209 y 28 que representan una bacteria de alta virulencia (209) y una de baja virulencia (28) para comparar el nivel de expresión de los genes mencionados.

4. JUSTIFICACIÓN

No obstante que la tuberculosis es una enfermedad que presenta uno de los más altos índices de mortalidad y morbilidad en el mundo, se sabe relativamente poco de los factores que permiten a *M. tuberculosis* invadir y diseminarse en el hospedero, a pesar del papel predominante que juegan estos eventos en el establecimiento y la progresión de la enfermedad.

Se cree que la tuberculosis extrapulmonar está determinada principalmente por la respuesta inmune del hospedero, pero no se ha investigado nada acerca del papel que los factores bacterianos pudieran jugar en este proceso. En un estudio reciente se comparó la infectividad de cepas respiratorias y extrarrespiratorias en un modelo *in vitro* con macrófagos. Las cepas extrarrespiratorias infectan a los macrófagos con mayor eficiencia que las cepas respiratorias (García et al., 2005). Esto indica que deben existir factores micobacterianos asociados con la virulencia.

El esclarecimiento de los mecanismos usados por *M. tuberculosis* para facilitarse el acceso a los tejidos vulnerables después de la infección pulmonar primaria puede proporcionar acercamientos racionales para un mejor entendimiento del proceso de infección y de los determinantes específicos de virulencia que utiliza esta bacteria para diseminarse y causar enfermedad en diferentes órganos. En este trabajo se estudió la capacidad de invasión de dos cepas meníngeas y la cepa pulmonar H37Rv y se comparó la expresión *in vivo* de los genes posiblemente involucrados con el proceso de diseminación en un modelo murino.

5. HIPÓTESIS

Los aislados clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* expresan diferencialmente genes involucrados en invasividad y diseminación.

6.1. OBJETIVO GENERAL

Estudiar la expresión de algunos genes involucrados con la invasividad y diseminación extrapulmonar de *M. tuberculosis* en aislados clínicos que afectan el sistema nervioso central comparado con su expresión en una cepa pulmonar.

6.2. OBJETIVOS PARTICULARES

-  Comparar el crecimiento de aislados clínicos meníngeos de *M. tuberculosis* (28 y 209) y la cepa de *M. tuberculosis* H37Rv pulmonar en un modelo de infección murino.

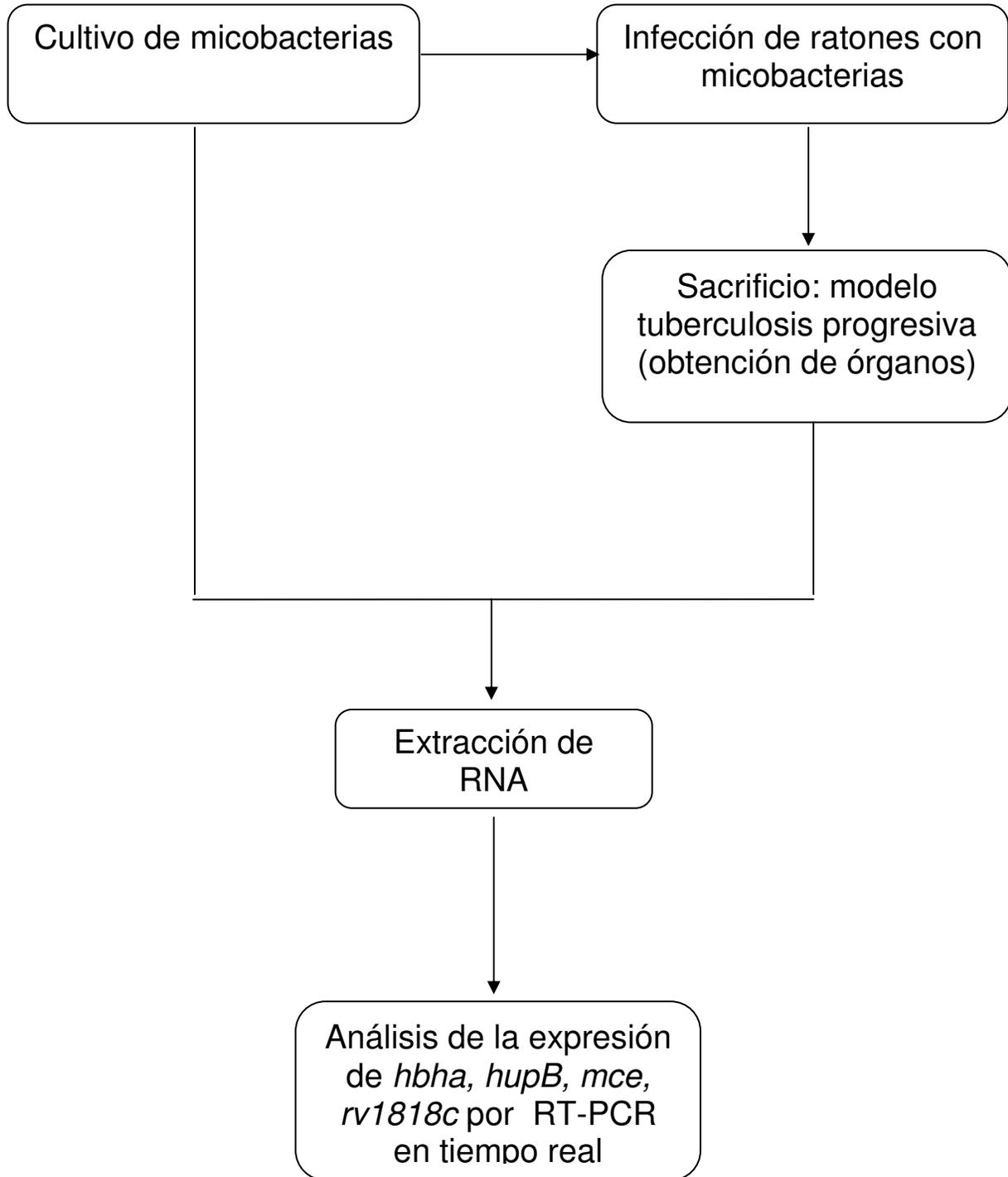
-  Comparar el porcentaje de sobrevivencia de ratones infectados con dos aislados clínicos de origen meníngeo y una cepa pulmonar.

-  Comparar el nivel de expresión de los genes *hbha*, *hupB*, *mce*, y *rv1818c* a diferentes tiempos de cultivo de las diferentes cepas.

-  Comparar el nivel de expresión de los genes *hbha*, *hupB*, *mce*, y *rv1818c* a diferentes tiempos de infección en tejido pulmonar de ratones infectados con las diferentes cepas.

-  Comparar el nivel de expresión de los genes *hbha*, *hupB*, *mce*, y *rv1818c* a diferentes tiempos de infección en tejido cerebral de ratones infectados con las diferentes cepas.

7. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



8. MÉTODOS

Cultivo de micobacterias: Se llevó a cabo un cultivo primario en medio 7H9 (Middlebrook, Difco) enriquecido con ADC (albumina, dextrosa, catalasa; Difco) al 10% para las cepas H37Rv, 28 y 209 a 37 °C. Estas bacterias fueron cultivadas en agitación hasta que alcanzaron una DO_{600nm} de 0.4. A partir de este cultivo primario se inocularon 200 ml de medio 7H9 con 10% de ADC a una dilución del 7% y se cultivaron a 37 °C en agitación para establecer la curva de crecimiento y determinar los días en los que se realizaría la extracción del RNA. Se tomaron dos puntos de la fase logarítmica, uno a los 10 (L1) y a los 15 días de cultivo (L2); además un punto en la fase estacionaria (30 días).

Extracción de RNA de cultivo

- Homogenización: Se obtuvo la pastilla bacteriana del cultivo por centrifugación. Las células se lisaron con Trizol en un homogenizador (Polytron). Se usó 1 ml de trizol por cada 5-10 millones de micobacterias.
- Separación: Las muestras se incubaron por 5 min a 15-30 °C para disociar los complejos nucleoproteicos. Posteriormente se añadieron 0.2 ml de cloroformo por cada ml de Trizol. Los tubos se agitaron vigorosamente por 15 seg y se incubaron 3 min a 15- 30 °C. Se centrifugaron a 12 000 g por 15 min (2-8° C). La mezcla se separó en tres fases: la fase inferior roja que corresponde a una mezcla de fenol-cloroformo, una interfase y una fase incolora superior acuosa. El RNA se encuentra en esta última fase.
- Precipitación de RNA: La fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo y el RNA se precipitó de la fase acuosa con alcohol isopropílico. Se usaron 0.5 ml de isopropanol por cada ml de Trizol. Posteriormente se incubaron las muestras 10

min a 15-30° C y se centrifugaron a 12000 g por 10 min a 2-8° C. El RNA precipitado permaneció en la pastilla.

- Lavado de RNA: Se removió el sobrenadante de la precipitación y se lavó la pastilla de RNA con etanol al 75%. Se añadieron 1 ml de etanol por cada ml de trizol. Se mezcló en el vórtex y se centrifugó a 7500 g por 5 min a 2-8 °C.
- Resuspensión: Se eliminó el sobrenadante y se secó la pastilla de RNA obtenido. El RNA se disolvió en agua libre de RNAsas incubando 10 min a 55-60 °C y a –70 °C hasta su utilización.

Infección de ratones: Los tejidos infectados fueron donados por el Dr. Rogelio Hernández Pando del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y de la Nutrición. Estos fueron obtenidos de acuerdo a un modelo de tuberculosis progresiva establecido por el Dr. Rogelio Hernández Pando (Hernández et al., 1996) de la siguiente forma: se infectaron ratones machos BALB/C con 10⁶ bacterias viables (*M. tuberculosis* H37Rv, 28 o 209) en 100 µl por vía intratraqueal. Los ratones se sacrificaron a los 21, 28 y 60 días post-infección (d.p.i) de acuerdo a un modelo previamente establecido. Se sacrificaron 6 ratones para cada d.p.i. A continuación se extrajeron los pulmones, bazos y cerebros y fueron congelados en nitrógeno líquido.

Extracción de RNA de tejidos: En tubos de 2 ml se adicionaron 0.5 ml de perlas de vidrio, un cuarto del tejido y un ml de solución de lisis (citrato de sodio 26 mM, tiocianato de guanidinio ó cloruro de guanidinio 4 M, N-lauryl sarcosina 0.5% y β-mercaptoetanol 0.125 M) Se homogenizó 7 veces por periodos de 15 s en un homogenizador (Ribolyser), dejándose reposar en hielo 2 min entre cada homogenizado. Posteriormente se agregaron 0.5 ml del homogenizado y se

adicionaron 50 μ l de acetato de sodio 3M pH6. Se homogenizó gentilmente y se colocó en hielo por 5 min. Se adicionaron 0.5 ml de fenol-cloroformo (vol/vol). A continuación se homogenizaron vigorosamente y se colocaron en hielo por 5 min. En seguida se centrifugaron 5 min a 12000 g y el sobrenadante se recuperó y se le adicionó 0.5 ml de fenol, se homogenizó vigorosamente y la muestra se colocó en hielo por 5 min. Posteriormente, se centrifugó 5 min a 12000 g y al sobrenadante recuperado se le adiciono 50 ml de acetato de sodio 3 M pH 5.2 y 1 ml de etanol absoluto. A continuación se homogenizó gentilmente la muestra y se dejó precipitando toda la noche a -20 °C. Después de esto, la muestra se centrifugó 25 minutos a 12000 g a 4 °C. Se eliminó el sobrenadante y se lavó la pastilla bacteriana con etanol al 75%. Nuevamente, se centrifugó 10 minutos a 12000 g a 4 °C. Posteriormente se eliminó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 100 μ l de agua DEPC. Se adicionaron 0.75 ml de Trizol y después de mezclarse suavemente se agregaron 150 μ l de cloroformo. La mezcla se homogenizó suavemente y se incubó por 15 min a temperatura ambiente. En seguida se centrifugó 15 min a 12 000g y a 4 °C y al sobrenadante recuperado se le adicionaron 375 μ l de isopropanol y 375 μ l de una solución alta en sales (citrato de sodio 0.8 M y cloruro de sodio 1.2 M). Se homogenizó nuevamente gentilmente y se incubó a -20 °C por dos horas. Se centrifugó por 20 min a 12000 g a 4 °C. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla bacteriana en 100 μ l de agua DEPC. A esta solución se le agregaron 0.75 ml de Trizol y se repitieron los pasos siguientes excepto la adición de solución alta en sales. Al final de estos pasos se secó la pastilla y se resuspendió en 20 μ l de agua DEPC después de calentarla a 55 °C por 5 min.

Tratamiento con DNAsa 1: Para eliminar cualquier contaminación con DNA que pudiera interferir con los resultados, todas las muestras de RNA se trataron con DNAsa 1 (Amplificación grade, Gibco BRL). A cada muestra se le agrega 1 μ l de DNAsa y 2.5 μ l de amortiguador (10X DNase 1 reaction buffer, Gibco BRL). Se mezclaron gentilmente y se incubaron por 15 min a temperatura ambiente. Posteriormente se le agregaron 2.5 μ l de EDTA 25mM (pH 8.0, Gibco BRL) y se incubaron por 10 min a 65 °C para inactivar a la enzima.

Cuantificación: Después del tratamiento con DNAsa se calculó la concentración de RNA por medio de su absorbancia a 260 nm. Se verificó su pureza por medio de la razón de su absorbancia a 260 nm entre su absorbancia a 280nm. Todas las muestras se pusieron a una concentración de 5 μ g/ml.

Síntesis de cDNA: Se prepararon 5 μ g de cDNA por medio de una reacción de transcripción reversa usando el Kit Omniscript RT de Qiagen. Para esto se agregaron: - Amortiguador RT 2x

- dNTPs 4mM
- Inhibidor de RNAsas 1u/ μ l
- Oligonucleótidos al azar (0.5 μ g/ μ l)
- Transcriptasa reversa 30U

La reacción se llevó a cabo incubando la mezcla 60 min a 42 °C. Posteriormente se inactivó la enzima incubando 10 min a 70 °C. Finalmente se guardaron a -20 °C.

PCR del gen 16s: Con este cDNA se realizó una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar la subunidad 16s ribosomal. Se realizó utilizando el kit HotStarTaq Master Mix, Qiagen. Las condiciones utilizadas fueron:

- i. Un ciclo de 10 min a 95 °C
- ii. 35 ciclos de 30 seg a 95 °C para desnaturalización
30 seg a 62 °C para alineamiento
30 seg a 72 °C para elongación
- iii. Un ciclo a 72 °C
- iv. Incubar a 5 °C

PCR convencional: De la misma manera se estandarizaron las reacciones por PCR para cada uno de los genes para asegurar que los iniciadores solo amplificaran un fragmento del tamaño esperado. Las condiciones fueron:

- v. Un ciclo de 10 min a 95° C
- vi. 35 ciclos de 30 seg a 95° C para desnaturalización
30 seg a temperatura de oligos para alineamiento
30 seg a 72 °C para elongación
- vii. Un ciclo a 72 °C
- viii. Incubar a 5 °C

El resultado de la reacción fue verificado en geles de agarosa al 1.8 % teñidos con bromuro de etidio, mediante su exposición a luz ultravioleta.

Curvas estándares: El producto del PCR fue usado para la cuantificación de la concentración en geles de agarosa por densitometría. La concentración fue determinada comparando la intensidad en fluorescencia del fragmento con el fragmento de un marcador de masa molecular de concentración conocida (invitrogen). Posteriormente en base al número de pares de bases del producto amplificado y la concentración en nanogramos de cada muestra problema, se realizaron curvas con diferentes números de copias (10^{13} - 10^2) que posteriormente serán utilizadas en las reacciones de PCR tiempo real.

PCR tiempo real: Las reacciones de PCR tiempo real se llevaron a cabo utilizando el kit QuantiTect SYBR Green PCR, Qiagen; en un aparato 7500 Real Time PCR System, Applied Biosystems. Las reacciones se llevaron a cabo bajo las siguientes condiciones. Primero se incubó por 10 min a 94 °C, posteriormente se aplicaron 40 ciclos donde la muestra se desnaturalizaron 20 seg a 95 °C, el alineamiento se realizó dependiendo de la Tm de los oligonucleótidos para cada gen por 20 seg, y la elongación se llevó a cabo 34 seg a 72 °C. Finalmente se incubó a 4 °C.

Análisis de resultados: Los resultados obtenidos de las PCR tiempo real se analizaron con el Software 7500 System Sequence Detection Software, Applied Biosystems. Con el programa se obtienen los valores del número de copias para cada gen de las muestras de estudio con respecto a la curva de concentraciones conocidas incluida en el experimento. Estos datos se normalizan con respecto a los resultados del gen constitutivo 16S ribosomal. Los datos obtenidos se dividen sobre el valor obtenido para el gen 16S ribosomal. Finalmente los datos de las cepas 28 y

209 se dividieron con respecto al resultado obtenido en H37Rv con el fin de determinar el número de veces que fue mayor la expresión de los genes en estas cepas comparadas con la cepa pulmonar.

Extracción de proteínas del cultivo: Se partió a partir de la fase de separación en la extracción de RNA. Se tomaron las fases intermedia y la fase orgánica. Estas se precipitaron con 300 μ l de etanol y se incubaron 5 min a 25° C. Se centrifugó a 2000 g por 5 min. Posteriormente se tomó la fase soluble y se precipitó con 1.5 ml de isopropanol incubándolo 10 min a 25° C. Se centrifugó a 12000 g por 10 min. La pastilla obtenida se resuspendió en 2 ml de GuHCL 0.3 M en 95% de etanol y se incubó 20 min a 25° C. Enseguida, se centrifugó a 7500 g por 5 min y se repitió el lavado en GuHCl dos veces. A continuación, se agregaron 2 ml de etanol y se incubó por 20 min. Se centrifugó a 7500 g por 5 min y se eliminó el sobrenadante. La pastilla fue secada en la vacofuga y resuspendido en PBS 1X. Este extracto proteico fue resuelto por SDS-PAGE e inmovilizado en una membrana de PVDF. Finalmente la proteína HBHA fue detectada mediante un anticuerpo policlonal producido en conejos en nuestro laboratorio.

9. RESULTADOS

9.1. Cultivo de las Micobacterias

A partir de un cultivo primario se establecieron los días en los que se realizaría la extracción del RNA tomando un punto a la mitad de la fase logarítmica (L1), al termino de esta fase (L2) y otro punto en la fase estacionaria (E). La cepa H37Rv crece ligeramente más rápido que las otras cepas, y la cepa 209 fue la que presentó un menor crecimiento, sin embargo las tres cepas presentaron un crecimiento similar. En todos los casos las cepas alcanzaron la fase estacionaria en un periodo de alrededor de 20 días (Figura 6)

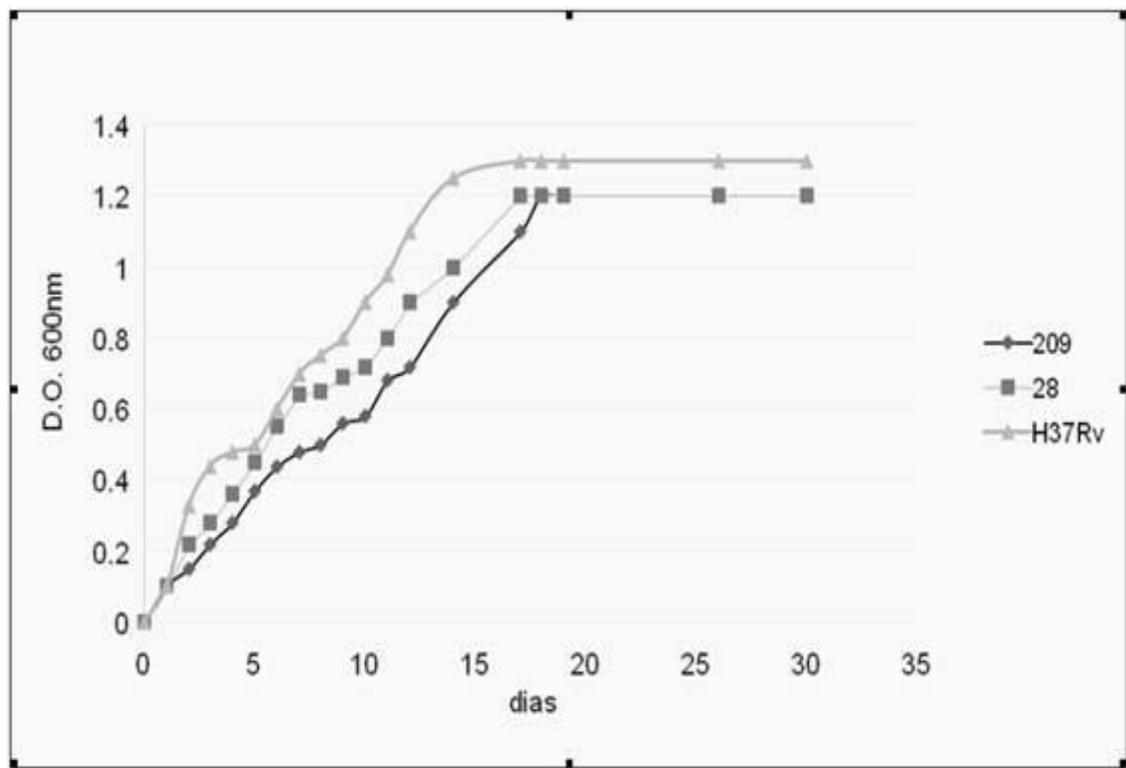


Figura 6. Cultivo cepas de estudio. Podemos observar el crecimiento de las diferentes cepas en medio 7H9 enriquecido con 10% ADC. En el eje de las Y se representa la D.O. a 600 nm y en el eje de las X el número de días de cultivo.

9.2. Infección de ratones

Seis ratones Balb/c fueron infectados con 10^6 micobacterias de las cepas H37Rv, 209 y 28 por la vía intratraqueal. Se obtuvieron los cerebros y los bazos de ratones infectados a los 21, 28 y 60 días post-infección debido a que en estudios anteriores solamente se detectó una cantidad suficiente de RNA a partir del día 21. Los órganos fueron homogenizados en solución salina y se llevó a cabo el conteo del número de colonias para cada uno de los órganos. En la Figura 7, se observa el número de unidades formadoras de colonias en homogenizados pulmonares de ratones infectados con las diferentes cepas. La cepa H37Rv y la cepa 209 presentan un alto crecimiento en pulmón siendo evidente el crecimiento de estas dos cepas desde los 14 días. La cepa 28 es capaz de crecer sólo ligeramente en el tejido pulmonar. Sin embargo es capaz de mantenerse hasta los 60 días.

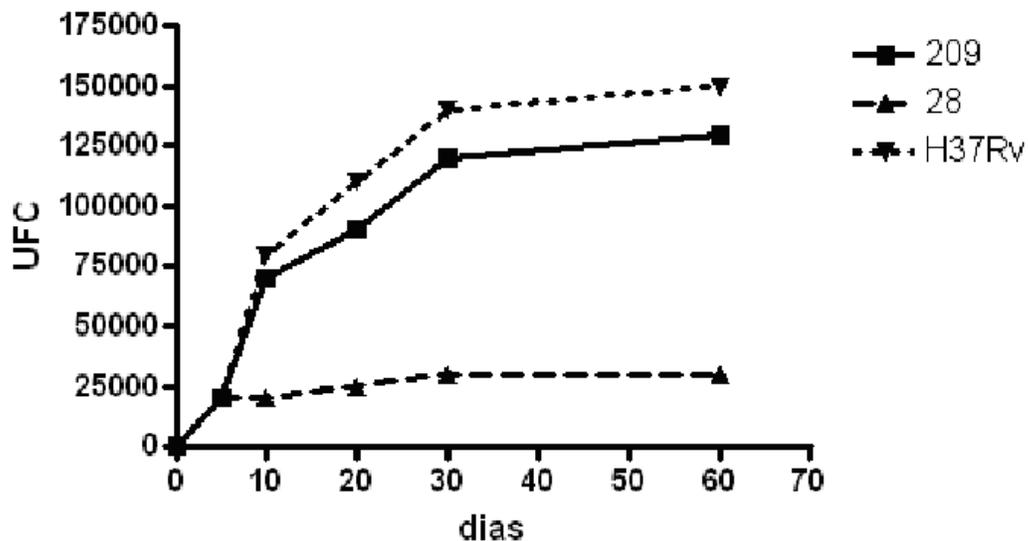


Figura 7. Unidades formadoras de colonias en pulmón. Podemos observar el crecimiento de las diferentes cepas en el pulmón. La línea continua representa a la cepa de origen meníngeo 209; la línea punteada representa a la cepa de origen meníngeo 28 y la línea discontinua a la cepa pulmonar H37Rv. Se muestra el resultado hasta los 60 días post- infección.

Por otra parte en la Figura 8, podemos observar que la cepa 209 presenta una gran carga bacteriana en el cerebro. Además la cepa 28 también se encuentra en el cerebro en una cantidad moderada y la cepa H37Rv no presenta crecimiento en el cerebro.

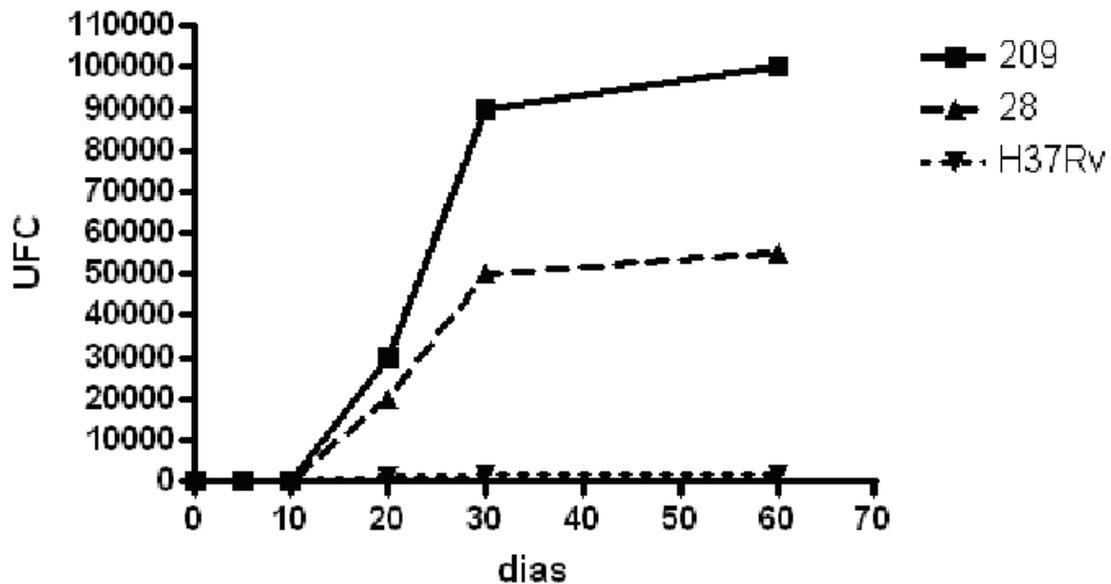


Figura 8. Unidades formadoras de colonias en cerebro. La línea continua representa a la cepa de origen meníngeo 209; la línea punteada representa a la cepa de origen meníngeo 28 y la línea discontinua a la cepa pulmonar H37Rv.

También se determinó el porcentaje de sobrevivencia de los ratones para cada cepa. En la Figura 9, podemos observar que la cepa 209 es altamente virulenta ya que es capaz de matar a casi el 90% de los ratones en 21 días. La cepa de *M. tuberculosis* H37Rv muestra también un alto grado de virulencia. La cepa 28 presenta el índice más alto de sobrevivencia. La cepa 209 es considerada una cepa de mayor virulencia debido a un menor sobrevivencia de los ratones infectados con esta cepa. La cepa 28 es una cepa de menos virulencia ya que no es capaz de matar a tantos ratones.

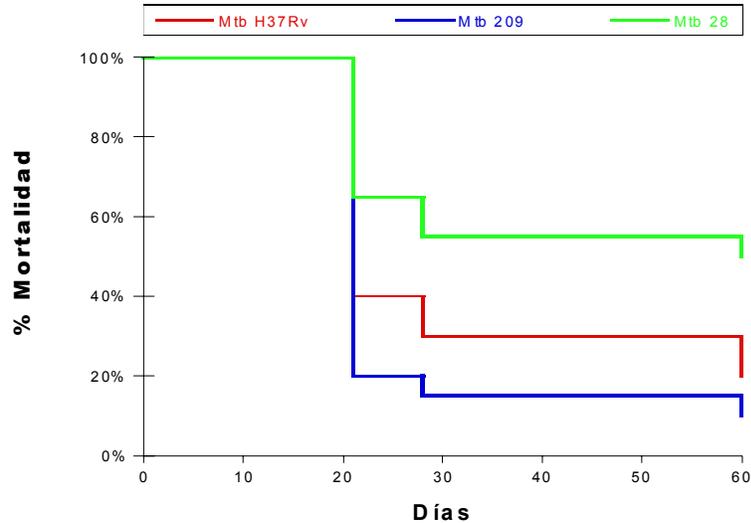


Figura 9. Sobrevivencia de ratones infectados. En la gráfica podemos observar el porcentaje de sobrevivencia de los ratones infectados con las diferentes cepas vía intratraqueal. La línea azul representa a la cepa de origen meníngeo 209, la línea verde representa a la cepa de origen meníngeo 28 y la línea roja a la cepa pulmonar H37Rv.

9.3. Cuantificación de la expresión de los genes de estudio *in vitro* por RT-PCR en tiempo real.

A partir de estos cultivos se extrajo el RNA que fue utilizado para medir la expresión de los genes de estudio por RT-PCR en tiempo real. El RNA fue tratado con DNAsa I para eliminar el DNA contaminante y posteriormente cuantificado. Enseguida se convirtieron 5 µg de RNA a cDNA mediante una reacción de reverso transcripción. Esta se llevó a cabo usando el Kit Omniscript RT de Qiagen de acuerdo al procedimiento que se detalla en la sección de métodos. A continuación se realizó una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando un par de oligonucleótidos específicos para amplificar una región de 100 pb de la subunidad 16s ribosomal. La reacción se llevó a cabo utilizando el kit HotStarTaq Master Mix, Qiagen bajo las condiciones indicadas en métodos.

En la Figura 10, se observa la amplificación del gen 16S ribosomal para cada una de las muestras analizadas. Se puede observar que en todos los casos se observa una sola banda del peso molecular esperado y que es similar en todas las muestras.

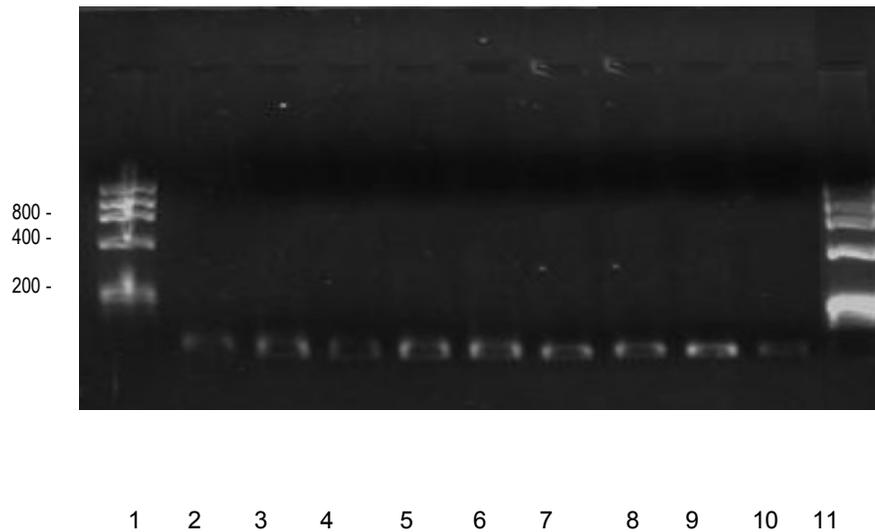


Figura 10. Amplificación del gen 16S ribosomal por PCR. En la figura podemos observar la amplificación por PCR. Los carriles 1 y 11 corresponden a los marcadores de masa molecular (nanogramos). Los siguientes carriles corresponden a las muestras de los cultivos bacterianos de la siguiente manera: carril 2: H37Rv-1, carril 3: H37Rv -2, carril 4: H37Rv -3, carril 5: 209-1, carril 6: 209 -2, carril 7: 209 -3, carril 8: 28-1, carril 9: 28 -2, carril 10: 28 -3.

De la misma manera se obtuvo el RNA de los cerebros y bazo de ratones infectados con las cepas de estudio. Posteriormente este RNA también fue tratado con DNAsa 1 para eliminar cualquier contaminación con DNA. A continuación estas muestras fueron cuantificadas para determinar la concentración de RNA. Enseguida se obtuvieron 5 μ g de cDNA por una reacción de reverso transcripción. Esta se llevó a cabo bajo las mismas condiciones descritas anteriormente.

Con este cDNA también se realizaron reacciones de PCR para confirmar la amplificación del gen de referencia (16S ribosomal) En la figura 11 observamos que se amplifica sólo un fragmento de 100 pb, que es el esperado.

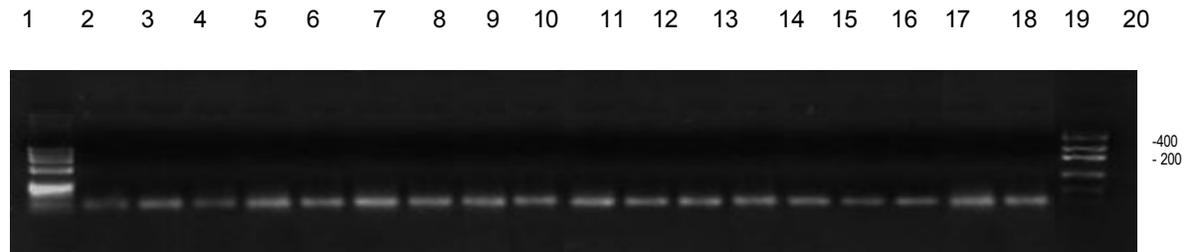


Figura 11. Amplificación del gen 16S ribosomal por PCR. Amplificación del gen 16S cada una de las muestras analizadas. Los carriles 1, y 20 corresponden a los marcadores de masa molecular. Los siguientes carriles corresponden a las muestras de los tejidos de la siguiente manera: carril 2: Cerebro H37Rv-21, carril 3: Cerebro H37Rv-28, carril 4: Cerebro H37Rv-60, carril 5: Cerebro 209-21, carril 6: Cerebro 209-28, carril 7: Cerebro 209-60, carril 8: Cerebro 28-21, carril 9: Cerebro 28 -28, carril 10: Cerebro 28 -60, carril 11: Pulmón H37Rv-21, carril 12: Pulmón H37Rv-28, carril 13: Pulmón H37Rv-60, carril 14: Pulmón 209-21, carril 15: Pulmón 209-28, carril 16: Pulmón 209-60, carril 17: Pulmón 28-21, carril 18: Pulmón 28 -28, carril 19: Pulmón 28 -60

Posteriormente se estandarizaron las reacciones de PCR para cada uno de los genes de estudio. Sólo se tomó una muestra de DNA del cultivo de H37Rv para realizar estas reacciones. Se realizaron las reacciones a diferentes temperaturas para encontrar la temperatura adecuada donde sólo se observara una banda del peso esperado. En todos los casos se diseñaron oligonucleótidos que amplificaban una región de 100 pb del gen de interés.

En la tabla 1 se muestran las secuencias de los oligonucleótidos usados y la temperatura óptima encontrada para cada uno de los genes de interés. Las condiciones con las que se llevaron a cabo las reacciones en cadena de la polimerasa fueron idénticas en todos los casos excepto la temperatura de alineamiento para cada par de oligonucleótidos. Se utilizó el kit HotStarTaq Master Mix, Qiagen. Las condiciones utilizadas están descritas en métodos.

Tabla 1. Oligonucleótidos usados para la amplificación de los genes de estudio y temperatura óptima para estas reacciones

Gen	Oligonucleótido Sentido	Oligonucleótido Antisentido	T° óptima
<i>hbha</i>	TGATGACATCAAGGCTCCGTT	GAGTCTCCTCCGCACGCTC	62
<i>hupB</i>	ACACAGAAATTGGGCTCGGA	ATGGTGACGCTGTCGCCT	62
<i>mce</i>	CGAAAACCCGACAAAGAGG	GATCGAGGTGAGCGTCTGGA	62
<i>rv1818c</i>	TCGGAACACAGACGACAAAG	GTGACGCTGCGAGGTGACTG	59
<i>rpoB</i>	CAGACGGTGTTTCATGGGTGA	GAACGTGCCCTTCTCGGTC	59

En la figura 12 podemos observar que la amplificación de los cinco genes analizados fue específica ya que en todos los casos se observa una sola banda de 100 pb

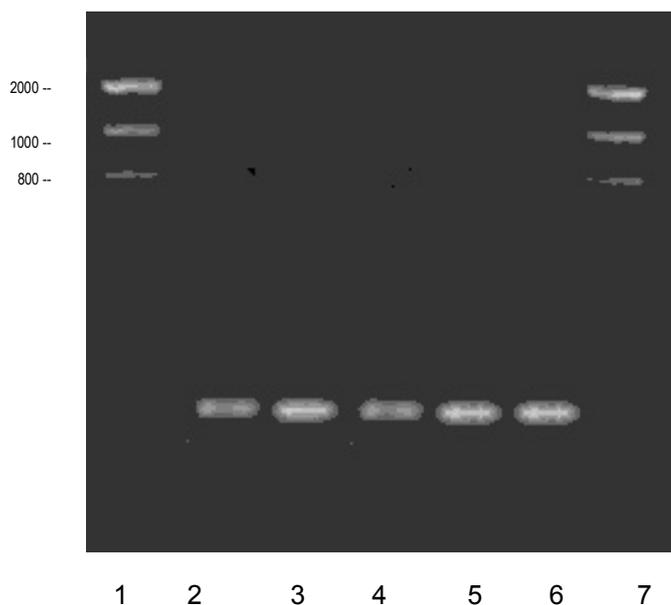


Figura 12. Amplificación de los genes de estudio por PCR. Amplificación de los genes de estudio para cada una de las muestras analizadas. El carril 1 y 7 corresponden a los marcadores de masa molecular. Los siguientes carriles corresponden a la amplificación de los genes de interés de la siguiente manera: carril 2: *hbha*, carril 3: *hupB*, carril 4: *mce*, carril 5: *rv1818c*, carril 6: *rpoB*

Con los geles de las PCR, se determinó la concentración presente en las reacciones por densitometría. Se tomaron como valores de referencia los datos por densitometría obtenidos con los marcadores de masa molecular. Con estos datos y con los datos obtenidos por densitometría de cada gen se determinó el número de copias presentes para cada uno y se realizaron curvas con diferentes números de copias (de 10^{13} - 10^2 copias del gen) para ser utilizados en las reacciones de RT-PCR tiempo real.

9.4. Cuantificación de la expresión *in vivo* de los genes de estudio por RT-PCR en tiempo real

En las reacciones de tiempo real se obtienen los valores del número de copias para cada gen de las muestras de estudio con respecto a la curva de concentraciones conocidas incluida en el experimento. Estos datos se normalizan con respecto a los resultados del gen constitutivo 16S ribosomal. Para esto se dividió el valor obtenido para el gen de interés entre el número de copias para el gen 16S ribosomal. En la Figura 13, podemos observar la expresión del gen *rv1818c* cuando las micobacterias son crecidas en medio 7H9. Podemos ver que la expresión del gen aumenta en la fase logarítmica (L1 a L2) pero disminuye en la fase exponencial (E) para la cepa 209. Igualmente la cepa 28 presenta una mayor expresión de este gen en las etapas tempranas (fase logarítmica en cultivo) y posteriormente disminuye. En el caso de la cepa H37Rv la expresión disminuye en la fase exponencial. En esta gráfica también podemos observar que la expresión es similar en las cepas meníngeas y en la cepa pulmonar.

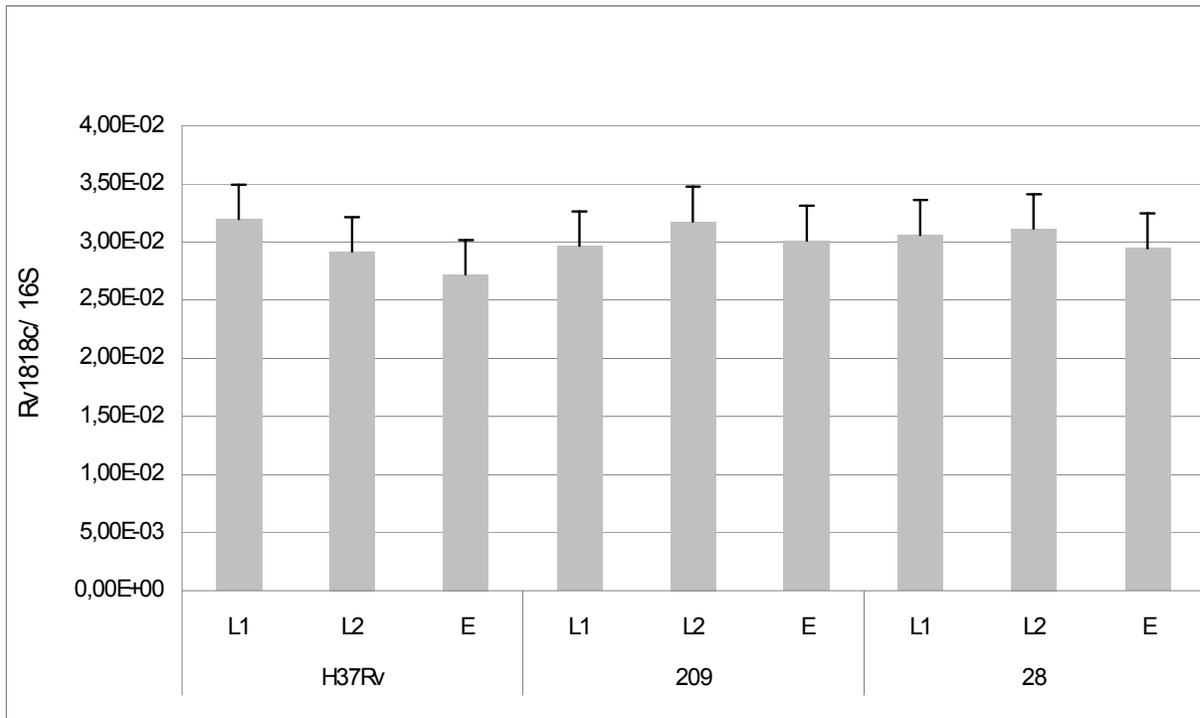


Figura 13. Cuantificación de la expresión genética de *rv1818c* por RT-PCR tiempo real en cultivo. Número de copias para el gen *rv1818c* en cultivo. Está representado como el número de copias de cDNA presente del gen sobre el número de copias del gen *16S*. (L1, fase logarítmica temprana; L2, fase logarítmica tardía y E, fase estacionaria)

En la Figura 14, se observa la expresión del gen *rv1818c in vivo*. La expresión de este gen fue menor en las cepas de origen meníngeo en comparación con la cepa H37Rv. En las cepas meníngeas, el gen es expresado principalmente en el día 21 de infección tanto en pulmón como en cerebro. En los días posteriores baja su expresión. En la cepa H37Rv la expresión es mayor en el día 28 y posteriormente disminuye. Debido a que la expresión de este gen es mayor en la cepa pulmonar es posible que no participe en el tropismo hacia el tejido cerebral en las cepas meníngeas.

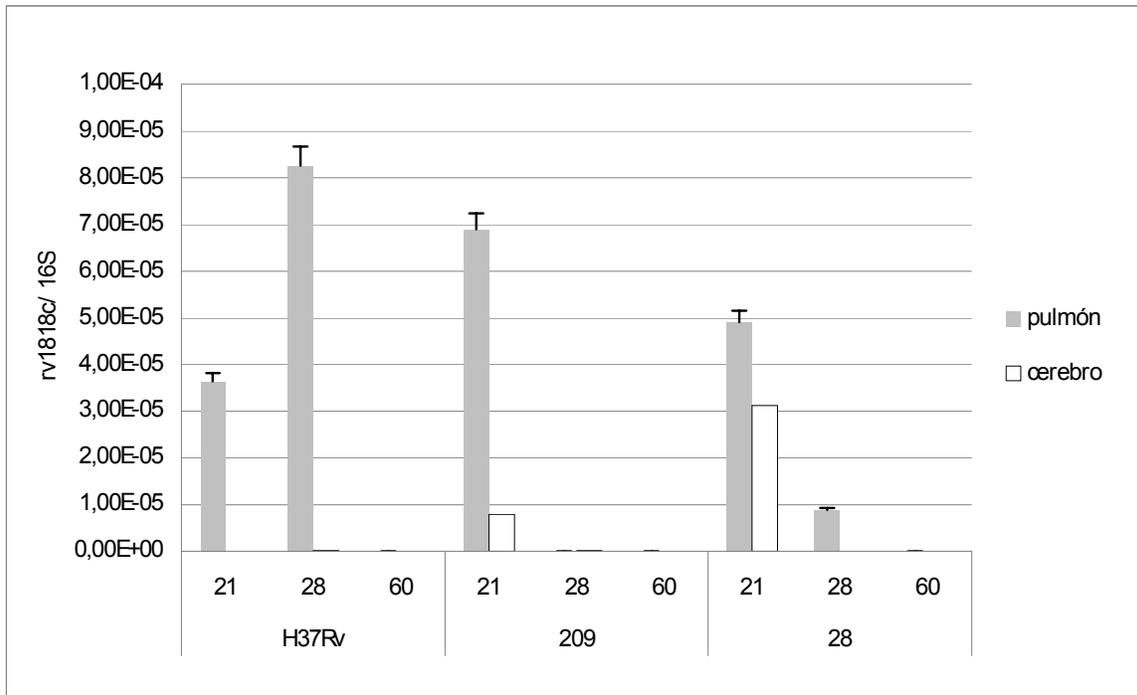


Figura 14. Cuantificación de la expresión genética de *rv1818c* por RT-PCR tiempo real in vivo. Expresión genética representada como el número de copias de cDNA presente del gen sobre el número de copias del gen *16S*. Se muestra el resultado obtenido en cerebro y en pulmón, a los 21, 28 y 60 días post- infección.

En la Figura 15, se observa la expresión del gen *mce 1* cuando las bacterias crecen en medio de cultivo. En la cepa H37Rv la expresión se mantiene constante con un ligero incremento en la fase logarítmica tardía y en la fase exponencial. En la cepa 209 la expresión es un poco menor, pero se mantiene relativamente constante en los diferentes días de cultivo. Disminuye ligeramente de la fase logarítmica a la exponencial. En cuanto a la cepa 28, el número de copias aumenta en la fase logarítmica temprana, sin embargo posteriormente disminuye. La expresión de este gen fue similar a la cepa pulmonar en comparación con la expresión del gen en las cepas meníngeas. A pesar de ser un poco mayor la expresión en la cepa 28 en la fase logarítmica temprana los valores son muy similares cuando se compara con los datos obtenidos para las otras cepas en los diferentes días de cultivo.

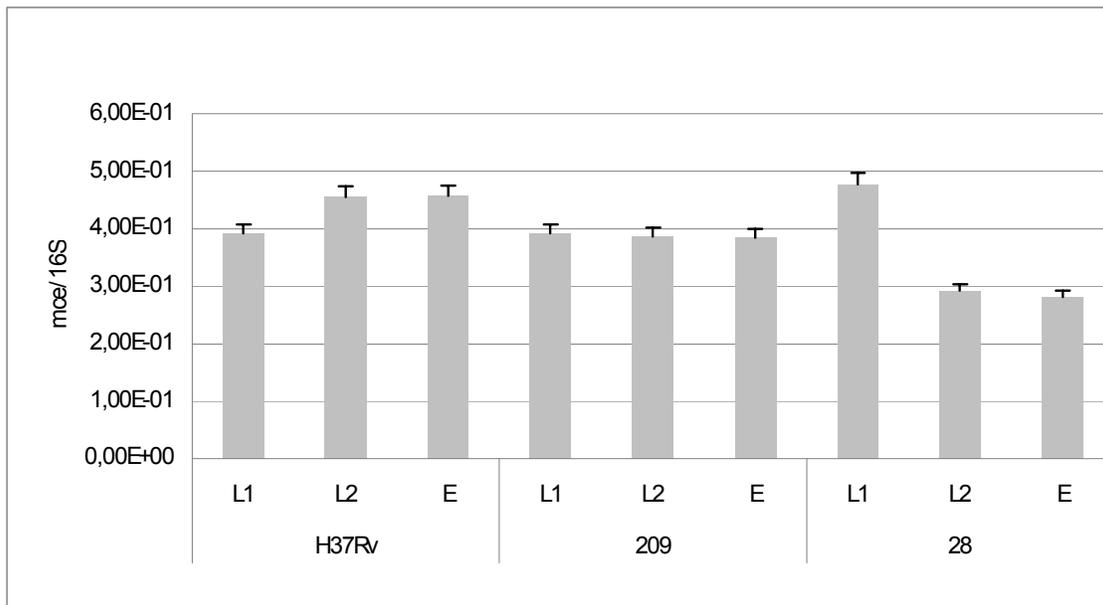


Figura 15. Cuantificación de la expresión genética de *mce* por RT-PCR tiempo real en cultivo. En la gráfica anterior observamos el incremento en el número de copias para el gen *mce* en cultivo. Está representado como el número de copias de cDNA presente del gen sobre el número de copias del gen 16S.

En la Figura 16, podemos observar la expresión del gen *mce 1 in vivo*. La expresión del gen en todas las cepas es mayor en pulmón que en cerebro. En las cepas H37Rv y 209 la expresión incrementa conforme aumentan los días post infección. En la cepa 28 la expresión es mayor en los días 21 y 28. En la cepa 209 la expresión aumenta del día 21 al 60 en pulmón, sin embargo en cerebro disminuye conforme avanzan los días post infección. A pesar de que la expresión de este gen es mayor en las cepas meníngeas que en la cepa pulmonar, debido a su baja expresión en cerebro es posible que este gen no participe en la colonización de este órgano.

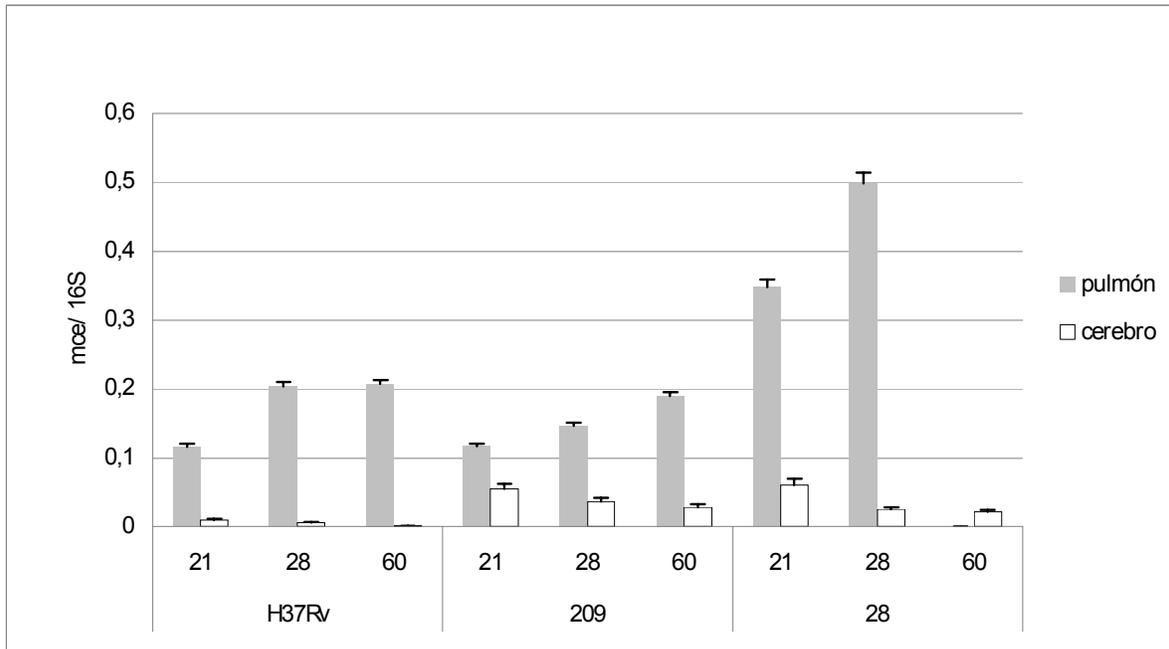


Figura 16. Cuantificación de la expresión genética de *mce* por RT-PCR tiempo real in vivo. Está representado como el número de copias de cDNA presente del gen sobre el número de copias del gen *16S*. Se muestra el resultado obtenido en cerebro y en pulmón, a los 21, 28 y 60 días post-infección.

En la Figura 17, podemos observar la expresión del gen *hupB* en cultivo. En la cepa H37Rv es mayor su expresión en la fase exponencial. En la cepa 209 incrementa en la fase logarítmica y disminuye en la fase exponencial. En la cepa 28 se expresa principalmente en la fase exponencial al igual que en la cepa 209. Otro resultado importante es que la expresión de este gen es menor en la cepa pulmonar que en las cepas meníngeas.

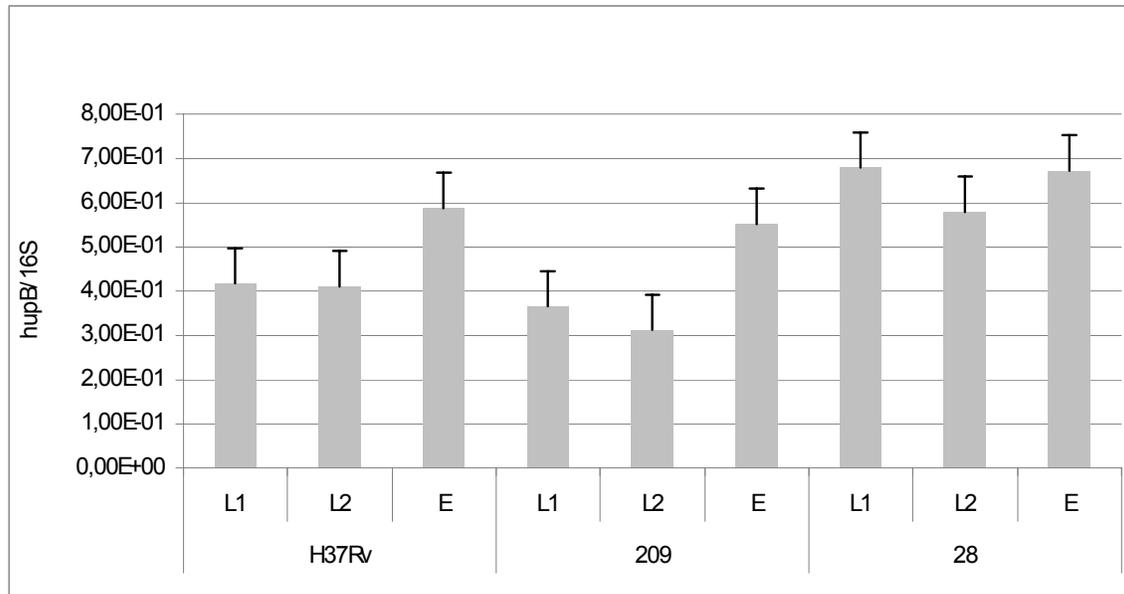


Figura 17. Cuantificación de la expresión genética de *hupB* por RT-PCR tiempo real en cultivo. En la gráfica anterior observamos el número de copias para el gen *hlp*. Está representado como el número de copias de cDNA presente del gen sobre el número de copias del gen 16S.

En la Figura 18, podemos observar la expresión del gen *hupB* en tejidos. Este gen se expresa en menor grado en la cepa pulmonar H37Rv. En esta cepa pulmonar se observa que la expresión es muy baja tanto en pulmón como en cerebro. Sin embargo es ligeramente mayor en el día 60 post infección. En la cepa 209 la expresión en el pulmón es mayor en el día 21 y posteriormente disminuye.

En cerebro aumenta según los días post infección. Para este gen la expresión es mayor en pulmón sólo en el día 21 ya que en el día 28 y 60 es mayor la expresión en cerebro. Esto concuerda con el incremento de esta cepa en el cerebro a partir del día 28. En la cepa 28 la expresión es similar tanto en pulmón como en cerebro en los diferentes días. Sin embargo sí se observa un ligero aumento de la expresión en los días 28 y 60. Este resultado concuerda con el aumento del crecimiento de esta cepa tanto en pulmón como en cerebro.

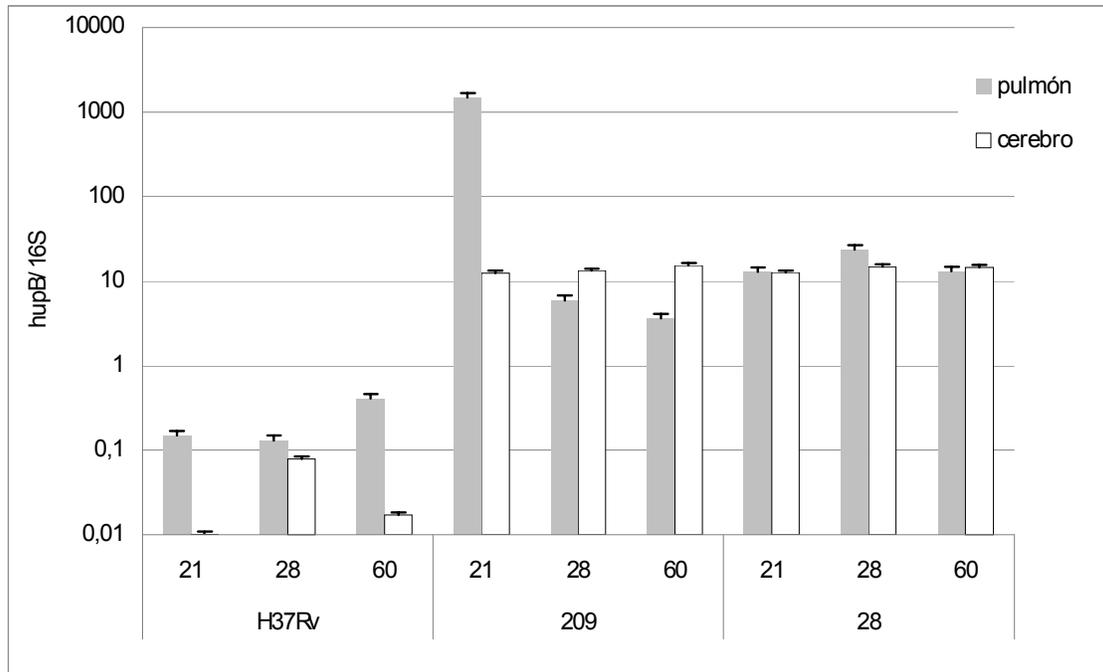


Figura 18. Cuantificación de la expresión genética de *hupB* por RT-PCR tiempo real *in vivo*. Representado como el número de copias presente del gen sobre el número de copias del gen 16S. Se muestra el resultado en cerebro y en pulmón, a los 21, 28 y 60 días post- infección.

En la Figura 19, se gráfica la expresión del gen *hbha* en cultivo. La expresión es un poco mayor en las cepas meníngeas que en la cepa pulmonar H37Rv. Siendo en las tres cepas mayor en la fase exponencial.

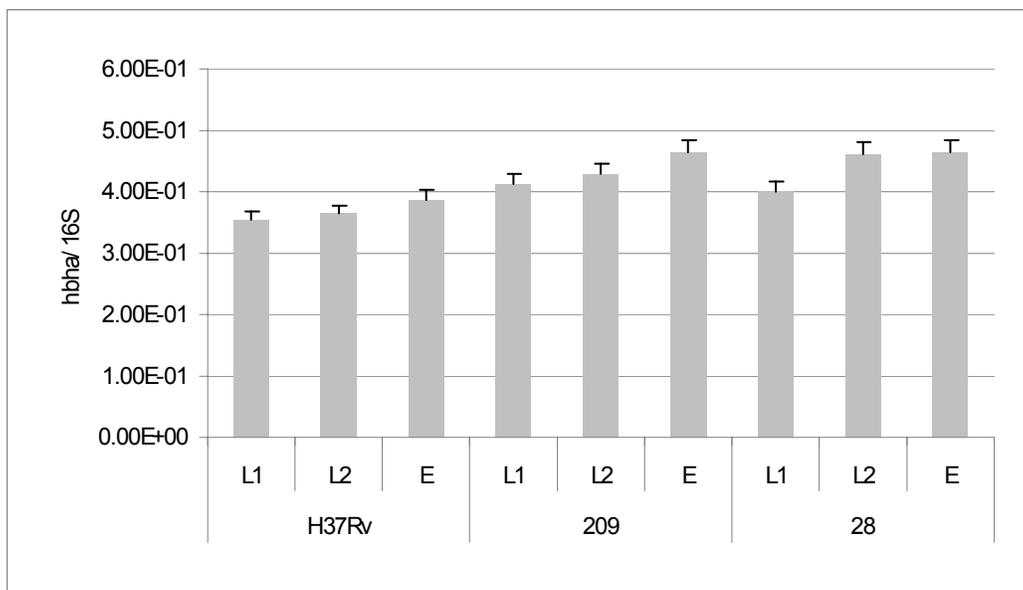


Figura 19. Cuantificación de la expresión genética de *hbha* por RT-PCR tiempo real en cultivo. En la gráfica observamos el número de copias para el gen *hbha* en cultivo. Está representado como el número de copias de cDNA presente del gen sobre el número de copias del gen 16S.

En la gráfica 20, se observa la expresión del gen *hbha* *in vivo*. Podemos observar una clara diferencia entre las cepas meníngeas y la cepa pulmonar. La cepa pulmonar H37Rv aumenta su expresión en pulmón en el día 60. En las dos cepas meníngeas el resultado es muy similar ya que en pulmón la expresión de este gen aumenta hacia el día 28 y posteriormente disminuye. En cerebro, aumenta conforme aumentan los días post infección. Este resultado también concuerda con lo observado en el crecimiento de las micobacterias en los tejidos. El hecho de que la expresión en el pulmón aumente en los días iniciales podría facilitar la salida de las cepas del pulmón. Estos resultados junto con la gran diferencia en la expresión en las cepas meníngeas comparada con la cepa pulmonar, sugiere que este gen podría facilitar la diseminación hacia el cerebro.

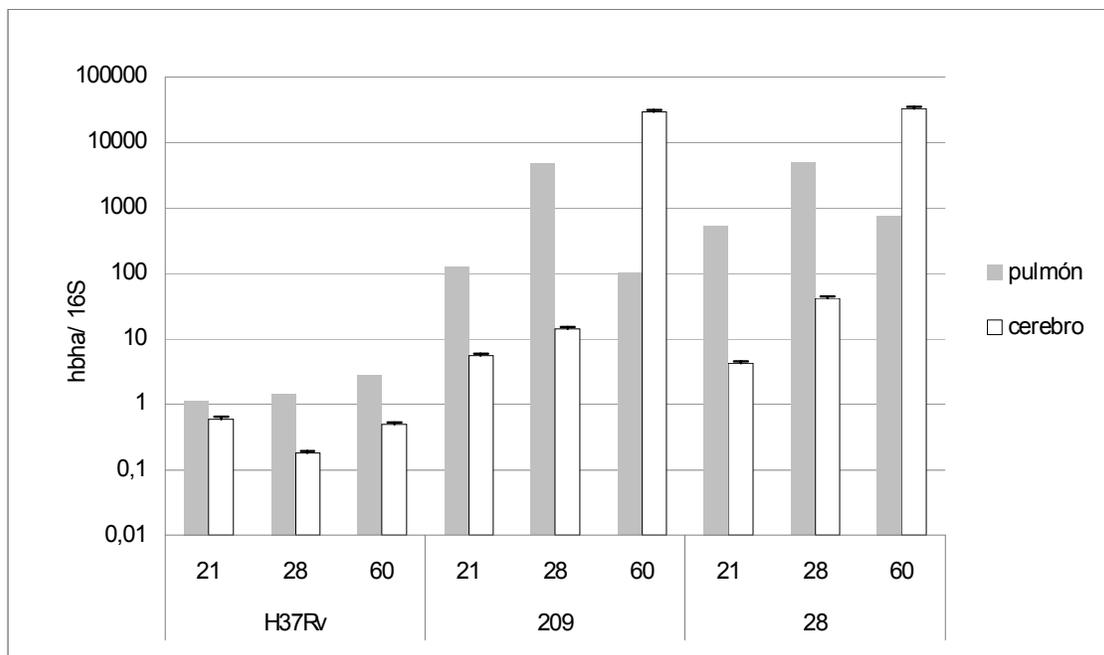


Figura 20. Cuantificación de la expresión genética de *hbha* por RT-PCR tiempo real in vivo. Está representado como el número de copias de cDNA presente del gen sobre el número de copias del gen 16S. Se muestra el resultado obtenido en cerebro y en pulmón, a los 21, 28 y 60 días post-infección.

Finalmente también se midió la expresión del gen *rpoB*, que es un gen que codifica para una región de la DNA polimerasa. La expresión de este gen se tomó como un control. En la gráfica 21 podemos observar la expresión de este gen es similar en las tres cepas durante todo el crecimiento de las micobacterias.

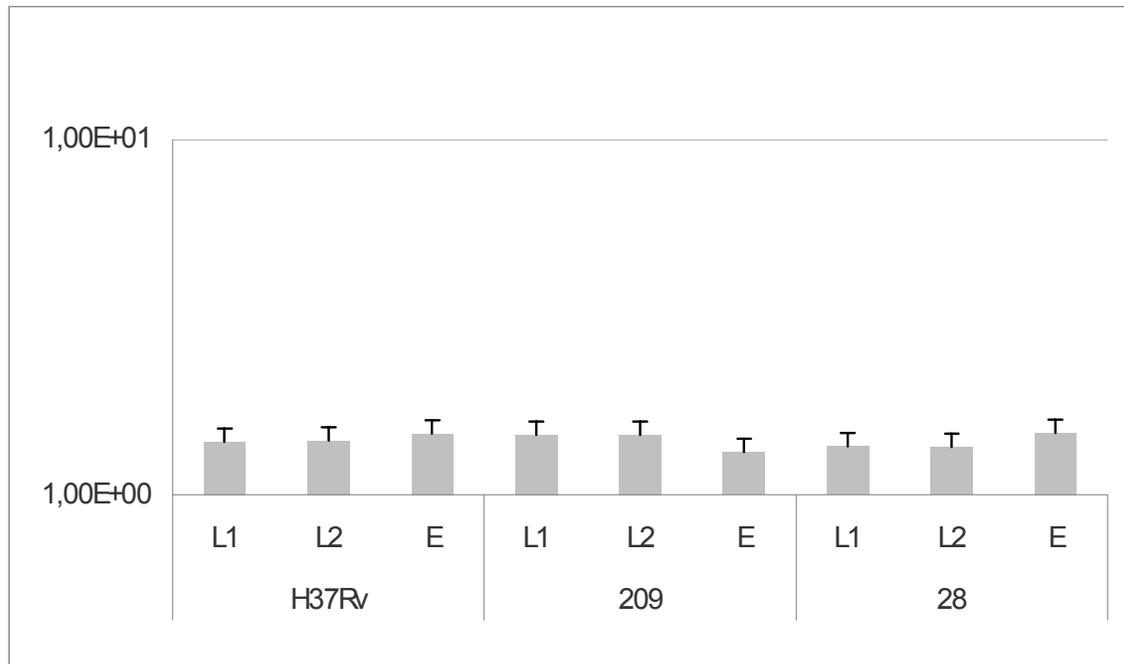


Figura 21. Cuantificación de la expresión genética de *rpoB* por RT-PCR tiempo real en cultivo. En la gráfica observamos el número de copias para el gen *hbha* en cultivo como el número de copias presente del gen sobre el número de copias del gen *16S*.

En la gráfica 22 podemos observar que la expresión de este gen fue similar en todas las cepas a los diferentes días post infección y en los dos órganos analizados. Esto nos indica que el incremento en los genes anteriores es real y no por algún artefacto en estas cepas.

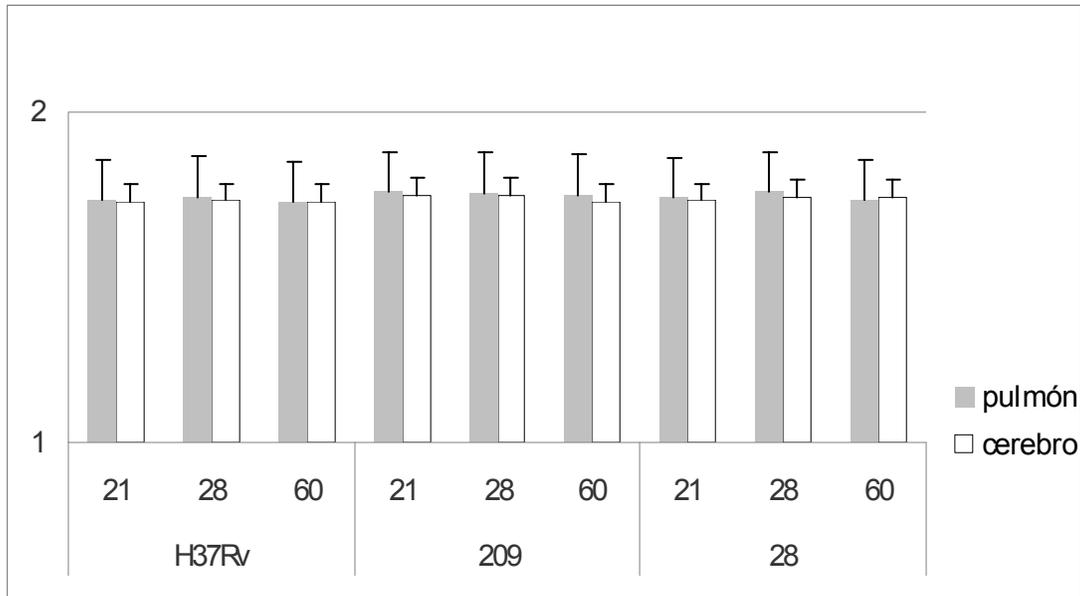


Figura 22. Expresión genética del gen *rpoB* por RT-PCR tiempo real in vivo representado como el número de copias del gen sobre el número de copias del gen *16S*. Se muestra el resultado en cerebro y en pulmón, a los 21, 28 y 60 días post- infección.

9.5. Análisis comparativo de resultados

Como el objetivo de este trabajo fue comparar la expresión de diferentes genes en las cepas meníngeas comparados con la cepa pulmonar, dividimos los resultados obtenidos en la cepas 28 y 209 por el resultado obtenido para la cepa H37Rv con el fin de conocer el número de veces que fue mayor la expresión de los genes de estudio en estas cepas. En la Figura 23, podemos ver el número de veces en que la expresión es mayor en las cepas meníngeas, comparado con la cepa pulmonar para cada gen. Se observó que la diferencia en expresión entre las cepas meníngeas y la pulmonar es mucho mayor para el gen *hbha* ya que la expresión en pulmón es de 3200 veces más para la cepa 209 y 3300 en la cepa 28. Otro gen que también presenta una gran diferencia en expresión es el gen *hlp* que es expresado hasta 1000 veces más en la cepa 209. La diferencia en los otros genes es mucho menor como se observa en la Tabla 2.

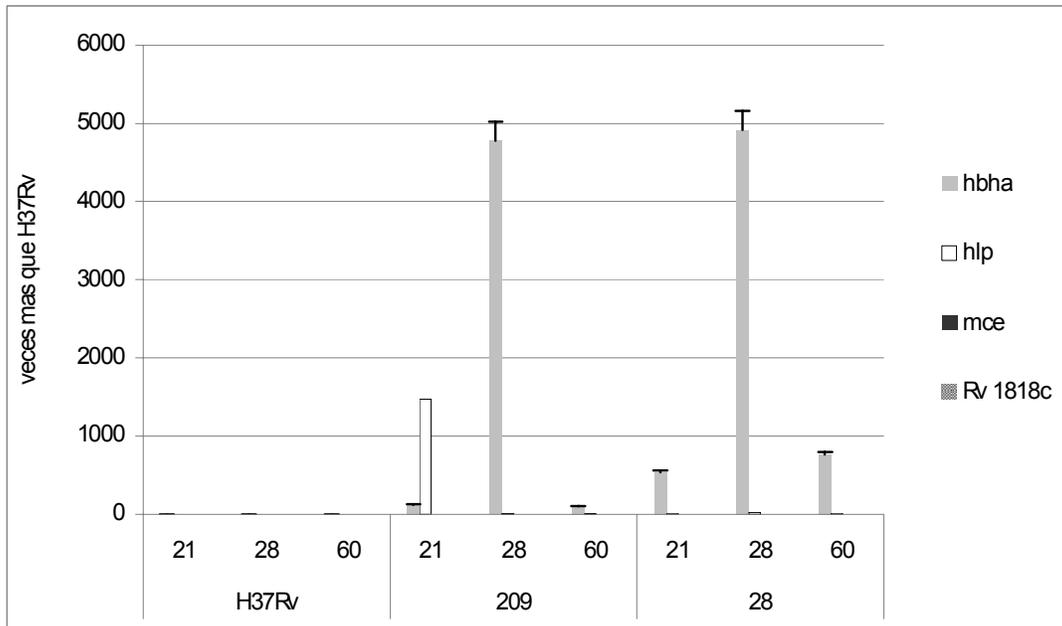


Figura 23. Número de veces en que la expresión de los genes estudiados es mayor en las cepas meníngeas comparadas con la cepa pulmonar H37Rv. El número representado es el número de copias del gen sobre el número de copias del mismo gen en H37Rv. Se muestra el resultado en cerebro y en pulmón, a los 21, 28 y 60 días post- infección.

En la Figura 24, podemos ver la diferencia en la expresión en cerebro. La diferencia en la expresión también es mayor para el gen *hbha*. En este caso la diferencia es mayor debido a que este gen no se expresa en cerebro. El incremento es de hasta 650 000 veces en la cepa 209 y 60000 veces más en la cepa 209. La diferencia en los otros genes es mucho menor como se observa en la Tabla 9.2. En esta gráfica también podemos ver que la diferencia se da en las dos cepas meníngeas en el día 60 post infección. Esto coincide con el incremento en el crecimiento de las cepas meníngeas en el cerebro.

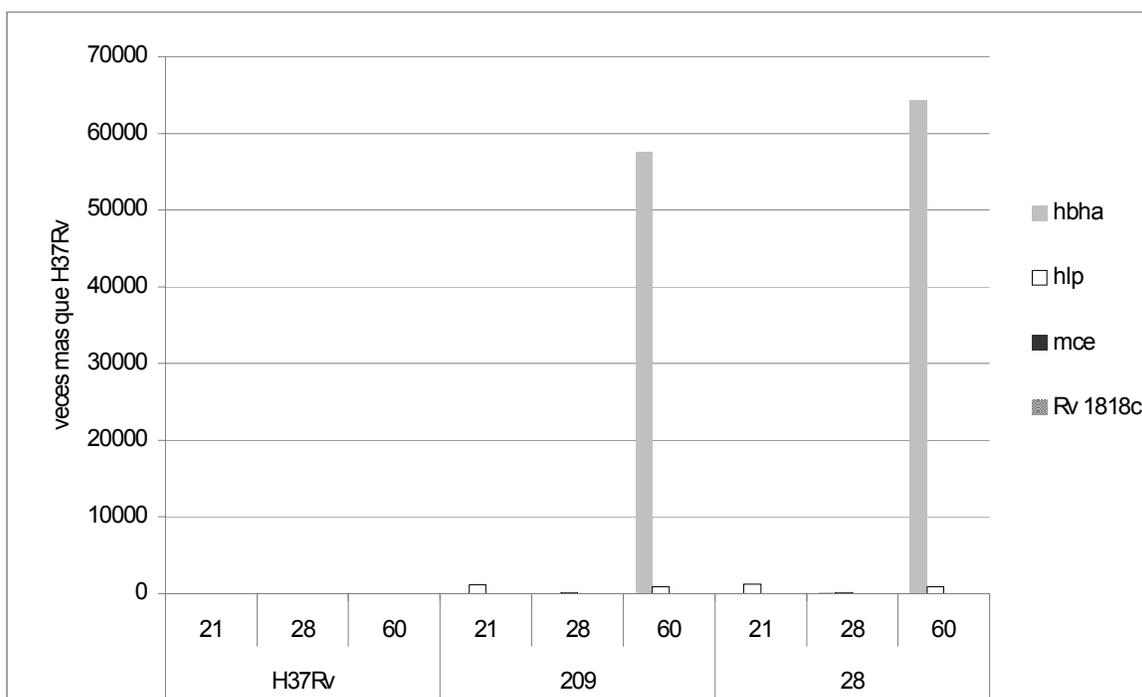


Figura 24. Número de veces en que la expresión de los genes estudiados es mayor en las cepas meníngeas comparadas con la cepa pulmonar H37Rv. El número representado es el número de copias del gen sobre el número de copias del mismo gen en H37Rv. Se muestra el resultado en cerebro y en pulmón, a los 21, 28 y 60 días post- infección.

Tabla 2. Número de veces en que la expresión de los genes estudiados es mayor en las cepas meníngeas comparados con la cepa pulmonar H37Rv

Cepa	día	Incremento en pulmón				Incremento en pulmón			
		<i>rv1818c</i>	<i>mce</i>	<i>hupB</i>	<i>hbha</i>	<i>rv1818c</i>	<i>mce</i>	<i>Hlp</i>	<i>hbha</i>
209	21	1.89	1.0012	989.4	108.14	0.001	5.43	1211.8	9.31
	28	2.4 E-05	0.719	45.17	3294.6	0.36	21.18	166.57	78.01
	60	1.69E-05	0.916	8.86	36.21	0.60	6.09	882.49	57547.5
28	21	1.34	2.98	86.57	470.98	0.006	5.99	1217.1	7.17
	28	0.107	2.451	180.5	3385.6	5.60	18.52	188.90	228.01
	60	0.91	2.41	31.72	273.05	0.22	3.48	844.85	64307.4

Posteriormente se detectó la presencia de la proteína HBHA en cultivo. Se resolvió el extracto de cultivo de la fase logarítmica por SDS-PAGE y posteriormente fue inmovilizado en una membrana de nitrocelulosa donde se realizó la detección de la proteína mediante un anticuerpo policlonal contra la HBHA. Observamos que la expresión de la proteína es similar en las cepas H37Rv y la 28, sin embargo fue menor en la cepa 209 (Fig. 25)

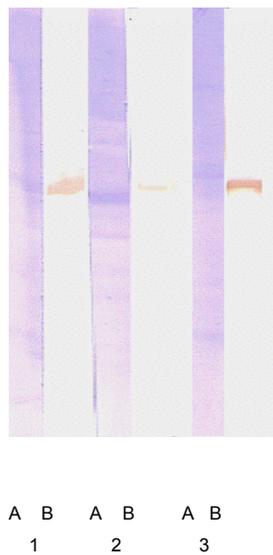


Figura 25. Detección de HBHA por medio de un anticuerpo policlonal para las proteína HBHA en las cepas H37Rv (1), 209 (2) y 28 (3). A. Extracto proteico total teñido con azul de coomassie. B. Detección de la HBHA con un anticuerpo policlonal.

9.6. Análisis de la secuencia del gen *hbha*.

Al analizar la secuencia del gen *hbha* con respecto a un aislado clínico de *M. tuberculosis* (CDC1551) del cual se cuenta con su secuencia se encontró que difieren en un triplete tanto en la región codificante, como en la región reguladora, lo cual podría estar indicando que pueden existir polimorfismos entre aislados clínicos. En la Figura 26, se muestra el alineamiento de los aminoácidos de la proteína HBHA. En la Figura 27, se muestra el alineamiento para la región reguladora del gen *hbha*.

```

      *      20      *      40      *      60      *      80
H37Rv  : MAENSNIDDIKAPLLAALGAADLALATVNELITNLRERAEE TRTDTRS RVEESRARLTKLQEDLPEQLTELREKFTAELRKA :
CDC1551 : MAENSNIDDIKAPLLAALGAADLALATVNELITNLRERAEE TRTDTRS RVEESRARLTKLQEDLPEQLTELREKFTAELRKA :

      *      100     *      120     *      140     *      160
H37Rv  : AEGYLEAATSRYNELVERGEAALERLRSQOSFEEVSARAE GYVDOQAVELTQEALGTVASQTRAVGERAAKLVGIELPKKAAPA :
CDC1551 : AEGYLEAATSRYNELVERGEAALERLRSQOSFEEVSARAE GYVDOQAVELTQEALGTVASQTRAVGERAAKLVGIELPKKAAPA :

      *      180     *
H37Rv  : KKAAPAKKAAPAKKAAAKKAPAKKAAAKKVTQK : 199
CDC1551 : KKAAPAKKAAPAKKAAAKKAPAKKAAAKKVTQK : 199

```

Figura 26. Alineamiento de secuencias de aminoácidos de HBHA para las cepas H37Rv y CDC1551. Los aminoácidos compartidos se representan en negro. Las diferencias se representan en blanco.

```

      *      20      *      40      *      60      *      80      *
H37Rv  : AGTCAGGTGCGTGACGCCATCATCACC GATACGGCGATCACC GAGCGTCAGAAGCAGATTCTGCTCGATATCTACGGCTCATTTACCACCAGAACG :
CDC1551 : AGTCAGGTGCGTGACGCCATCATCACC GATACGGCGATCACC GAGCGTCAGAAGCAGATTCTGCTCGATATCTACGGCTCATTTACCACCAGAACG :

      100     *      120     *      140     *      160     *      180     *
H37Rv  : AAGCCACCCGGGAGGAGTGTCGAGCGATCCGACACCGACCGGATGACTAGCCGTTGGCCGGCTGTTTTGCGCACCGGCTGGCGGGTAATCAAACCTG :
CDC1551 : AAGCCACCCGGGAGGAGTGTCGAGCGATCCGACACCGACCGGATGACTAGCCGTTGGCCGGCTGTTTTGCGCACCGGCTGGCGGGTAATCAAACCTG :

      200     *      220     *      240     *      260     *      280     *
H37Rv  : AAGGACAGTCATCTGGGTGAGGTCGACCGCAGGCTGATCCAGCCGATCGGCCGCGCTGGCCAAACAGCGACTCCGTCGATGACGTGCAGCAAAGGAGA :
CDC1551 : AAGGACAGTCATCTGGGTGAGGTCGACCGCAGGCTGATCCAGCCGATCGGCCGCGCTGGCCAAACAGCGACTCCGTCGATGACGTGCAGCAAAGGAGA :

      300     *      320     *      340     *      360     *      380
H37Rv  : CATGTAGTGACCGGATCAGCTGGGCCTGACATCTACGAACTCGACCGACAACCGACCCGACGATCAGGAGGTTTCCCGGCAAGTCGCGTGCCATGT :
CDC1551 : CATGTAGTGACCGGATCAGCTGGGCCTGACATCTACGAACTCGACCGACAACCGACCCGACGATCAGGAGGTTTCCCGGCAAGTCGCGTGCCATGT :

      *      400     *      420     *      440     *      460     *      480
H37Rv  : CAATCCGCGGGTCTTGACTAGTCTCCCTGGAGGAGCCGACGCTTGCCCCAACGTCAGACCAAAGATGTAAGAACGCCGATATCAGAAAATAGTTA :
CDC1551 : CAATCCGCGGGTCTTGACTAGTCTCCCTGGAGGAGCCGACGCTTGCCCCAACGTCAGACCAAAGATGTAAGAACGCCGATATCAGAAAATAGTTA :

      *      500
H37Rv  : ATGAAAGGAATACCC : 500
CDC1551 : ATGAAAGGAATACCC : 500

```

Figura 27. Alineamiento de secuencias de nucleótidos de la región reguladora de HBHA para las cepas H37Rv y CDC1551. Los aminoácidos compartidos se representan en negro. Las diferencias se representan en blanco.

El gen *hbha* de las cepas 209 y 28 y se amplificó por PCR y se obtuvieron las secuencias de DNA. Sólo se pudo obtener la secuencia parcial del gen. La comparación de la secuencia en las tres cepas muestra una alta identidad; se encontraron cambios sinónimos en la secuencia. Sin embargo, no se pudo comparar la región carboxiterminal, que es el sitio donde se encuentra el dominio de unión a células epiteliales, ni la región aminoterminal donde se encuentra la región necesaria para la interacción entre micobacterias. Es posible que las regiones que no se pudieron secuenciar fue debido al alto número de repeticiones presentes en esta zona. Se propone terminar el estudio de esta región en mis estudios de doctorado (Fig. 28).

		*	20	*	40	*	
H37Rv	:	MAENSNIDDIKAPLLAALGAADLAL	ATV	NELITNLRERAEETRTD	TRSRVE	:	51
209	:	-----	ATV	KELITNLRERAEETRTD	TRSRVE	:	26
28	:	-----	ATL	KELITNLRERAEETRTD	TRSRVE	:	26
		60	*	80	*	100	
H37Rv	:	ESRARLTKLQEDLPEQLTELREKFTA	EELRKA	AEGL	EAATSR	YNELVERG	: 102
209	:	ESRARLTKLQEDLPEQLTELREKFTA	EELRKA	AEGL	EAATSR	YNELVERG	: 77
28	:	ESRARLTKLQEDLPEQLTELREKFTA	EELRKA	AEGL	EAATSR	YNELVERG	: 77
		*	120	*	140	*	
H37Rv	:	EAALERLRSQQSFEEVSARAEGYVDQ	AVELTQE	ALGT	VASQ	TRAVGERAAK	: 153
209	:	EAALERLRSQQSFEEVSARAEGYVDQ	AVELTQE	ALGT	VASQ	TRAVGERAAK	: 128
28	:	EAALERLRSQQSFEEVSARAEGYVDQ	AVELTQE	ALGT	VASQ	TRAVGERAAK	: 128
		160	*	180	*	200	
H37Rv	:	LVGI	ELPKKA	APAKKA	APAKKA	AAKAPAKKAAAKKVTQK	----- : 199
209	:	LVGI	EL	-----	-----	-----	: 134
28	:	LVGI	EL	-----	-----	-----	: 134

Figura 28. Alineamiento de secuencias de aminoácidos de HBHA para las cepas 209, 28 y H37Rv. Los aminoácidos compartidos se representan en amarillo. Las diferencias se representan en blanco y la similitud entre dos cepas en naranja.

10. DISCUSIÓN

Uno de los pasos más importantes para el desarrollo de las infecciones bacterianas es la interacción del patógeno con el hospedero. Las micobacterias patógenas tienen la capacidad de adherirse e invadir los tejidos del hospedero y evadir sus defensas. Este proceso induce daño tisular produciendo enfermedad. La adherencia a la célula blanco es entonces un paso crucial en el proceso de infección, ya que constituye el evento inicial para la invasión bacteriana a sitios de infección secundaria dentro del hospedero y el daño posterior los a tejidos. Algunas micobacterias patógenas expresan proteínas de superficie con afinidad por componentes de la matriz extracelular que favorecen las interacciones con tejidos y colonización de los mismos (Menozzi et al., 2002).

M. tuberculosis es capaz de interactuar con células epiteliales como las células pulmonares M, lo que puede permitir a los bacilos atravesar directamente la capa epitelial. Asimismo, se ha demostrado que induce daño de los neumocitos humanos originando infiltración celular y necrosis, lo que facilitaría el paso de los bacilos directamente al torrente sanguíneo (Teitelbaum et al., 1999). Debido a que la micobacteria es transmitida por la vía aérea, las primeras estructuras con las que tiene contacto en el hospedero son las células del epitelio respiratorio. Así las interacciones con estas células o con las proteínas de matriz extracelular durante la infección pueden ser importantes para la patogénesis (Menozzi et al., 1992).

La invasión al SNC por parte de las micobacterias es uno de los aspectos más interesantes de la patogenia de estas bacterias; ya que el SNC está separado por la barrera cerebral sanguínea compuesta de células endoteliales microvasculares unidas firmemente por uniones estrechas que protegen al cerebro. Se ha encontrado que las micobacterias atraviesan la barrera sanguínea invadiendo las células epiteliales en el plexo coroidal. Usando un modelo celular *in vitro* se ha comprobado que la micobacteria es capaz de invadir y atravesar una barrera de células endoteliales. Las cepas virulentas son capaces de atravesar la barrera, pero no así las cepas patogénicas, esto sugiere el requerimiento de factores de virulencia específicos (Jain et al., 2006).

Se ha propuesto que diferentes genes podrían facilitar esta interacción y adherencia y por ende facilitar la diseminación de las micobacterias. Algunos de ellos son: la hemaglutinina de unión a heparina (hbha), la proteína tipo histona (hlp), los genes mce, y un miembro de la familia PE_PGRS *Rv1818c*.

En este trabajo se estudió la expresión de estos genes posiblemente involucrados con la diseminación extrapulmonar de *M. tuberculosis* en dos cepas que se diseminan al cerebro (209, 28) comparados con una cepa pulmonar (H37Rv). Nuestros resultados muestran que existe una expresión diferencial de los cuatro genes analizados entre las cepas de origen meníngeo (209 y 28) y la cepa pulmonar (H37Rv). El hecho de que existan grandes diferencias en la expresión de algunos de estos genes en las cepas de origen meníngeo sugiere que justamente pudieran ser utilizados para el escape de la micobacteria del pulmón y el establecimiento de la infección en el cerebro.

La diferencia entre las cepas meníngeas y la pulmonar es mucho mayor en el gen *hbha* ya que la expresión en pulmón es de 3200 veces más para la cepa 209 y 3300 en la cepa 28. Otro gen que también presenta una gran diferencia es el gen *hlp* que es expresado hasta 1000 veces más en la cepa 209. La mayor diferencia de la expresión en el pulmón se da en el día 28 que es justo el día donde se da el mayor crecimiento de estas cepas en el pulmón.

En cuanto a la expresión en cerebro la diferencia en la expresión también es mayor para el gen *hbha*. El incremento es de hasta 650 000 veces en la cepa 29 y 60000 veces más en la cepa 209. Interesantemente, los genes *hbha* y *hlp* se expresan más en el cerebro aumentando su expresión entre los días 21 al 60, lo cual coincide con el incremento de micobacterias en el cerebro.

Es de resaltar que la mayor diferencia de la expresión del gen en el pulmón se da en el día 28 que es justo el día donde se da el mayor crecimiento de estas cepas en el pulmón.

Estas observaciones sugieren que los genes *hbha* y *hupB*, además de ayudar a la bacteria a migrar al cerebro podrían contribuir a la permanencia de la misma en este órgano. Sin embargo, es necesario demostrar su participación en el proceso de diseminación hacia el cerebro mediante su inactivación o bloqueando la proteína con anticuerpos.

De acuerdo a la bibliografía la HBHA se encuentra en la superficie bacteriana y media la unión a células epiteliales (Menozzi et al., 1996), neumocitos y es esencial para el escape de las micobacterias del pulmón y el establecimiento de la enfermedad extrapulmonar. Se ha encontrado que esta proteína también induce rearrreglos del citoesqueleto de actina sin alterar uniones estrechas en la capa endotelial (Menozzi et al., 2006) e induce la internalización de las micobacterias a las células. En un modelo *in vitro* se comprobó que *M. tuberculosis* no causa lisis o aperturas en las uniones celulares por lo que este proceso puede darse por rearrreglos en el citoesqueleto.

Las células endoteliales presentes en el cerebro no son células fagocíticas profesionales por lo que la bacteria debe dirigir su propia captura para poder invadirlas. Es por esto que las características mencionadas anteriormente de la HBHA pudieran cumplir con los requerimientos para la invasión al cerebro.

En este trabajo estudiamos solamente la expresión en cepas que muestran un tropismo hacia el cerebro, sin embargo los resultados obtenidos no indican que esta proteína sea la responsable de la diseminación al cerebro. Es por esto, que es necesario además comparar la expresión de estos genes en cepas que puedan diseminarse hacia cualquier órgano, para establecer si estas proteínas juegan un papel en la diseminación hacia cualquier órgano o si pudieran ser importantes sólo para la diseminación hacia el cerebro.

Así mismo encontramos que la expresión del RNA mensajero en la cepa H37Rv aumenta en la fase exponencial, lo que coincide con lo reportado anteriormente (Deloug, 2006). En la Figura 25, observamos que la expresión de la proteína es menor en la cepa 209. Estos resultados no concuerdan con los datos obtenidos con el RT-PCR. Estas proteínas fueron obtenidas a partir de extractos totales de los cultivos micobacterianos, como ya se ha demostrado que esta proteína puede exportarse, una posible explicación a estos resultados es que la proteína se libere más en la cepa 209 y por lo tanto no sea detectada en este ensayo y no, porque sea sintetizada en menor proporción.

11. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.

En el presente trabajo se estudió por PCR-tiempo real la expresión de algunos los genes que codifican para las proteínas de *M. tuberculosis* relacionadas con invasividad en los órganos de ratones infectados con cepas de *M. tuberculosis* aisladas del líquido cefalorraquídeo de pacientes con tuberculosis meníngea. Los resultados muestran que las cepas expresan diferencialmente estos genes siendo notoria una mayor expresión en las cepas extrapulmonares, cuando se compara con la cepa pulmonar H37Rv. Estas observaciones no son resultado de que estas micobacterias expresen con mayor frecuencia cualquier gen en comparación con la cepa H37Rv, ya que al analizar la expresión de un gen de expresión constitutiva no se observaron diferencias entre las cepas extrapulmonares y la cepa pulmonar.

La mayor diferencia en expresión entre los aislados clínicos y la cepa pulmonar se observó con el gen que codifica para la proteína HBHA. Los resultados sugieren, que esta proteína podría estar jugando también un papel importante en la diseminación de las micobacterias hacia el sistema nervioso central.

Debido a las características de la HBHA y de los resultados mostrados en este trabajo nosotros proponemos que esta proteína pudiera ser importante para la colonización del cerebro. Es por esto que proponemos la creación de una mutante en el gen *hbha* para las cepas 209 y 28 y evaluar el efecto de la mutación en la diseminación de las micobacterias al cerebro.

12. BIBLIOGRAFIA

- Ahmad S, El-Shazly S, Mustafa AS, Al-Attiyah R. 2004. Mammalian cell-entry proteins encoded by the mce3 operon of *Mycobacterium tuberculosis* expressed during natural infection in humans. *Scand J Immunol.* 60(4):382-391
- Aoki K, Matsumoto S, Hirayama Y, Wada T, Ozeki Y, Niki M, Doménech P, Umemori K, Yamamoto S, Mineda A, Matsumoto M, Kobayashi K. 2004. Extracellular *Mycobacterium* DNA-binding protein 1 participates in *Mycobacterium*-lung epithelial cell interaction through hyaluronic acid. *J Biologic Chem.* 279(38): 39798–39806
- Arruda S, Bomfim G, Knights R, Huima-Byron T, Riley LW. 1993. Cloning of an *M. tuberculosis* DNA fragment associated with entry and survival inside cells. *Science.* 261(5127):1454-1457
- Bermudez L, Sangari FJ. 2001. Cellular and molecular mechanisms of internalization of mycobacteria by host cells. *Microb Infect.* 3: 37–42
- Bermudez L, Goodman J. 1996. *Mycobacterium tuberculosis* invades and replicates within type II alveolar cells. *Infect. Immun.* 64: 1400–1406
- Bermudez L, Sangari F, Kolonoski P, Petrofsky M, Goodman J. 2002. The efficiency of the translocation of *Mycobacterium tuberculosis* across a bilayer of epithelial and endothelial cells as a model of the alveolar wall is a consequence of transport within mononuclear phagocytes and invasion of alveolar epithelial cells. *Infect Immun.* 70: 140–146
- Bermudez LE, Young LS. 1994. Factors affecting invasion of HT-29 and HEp-2 epithelial cells by organisms of the *Mycobacterium avium* complex. *Infect Immun.* 62:2021–2026
- Bloom B. 1994. Tuberculosis: pathogenesis, protection, and control. American Society for Microbiology Press, USA.
- Brennan MJ, Delogu G, Chen Y, Bardarov S, Kriakov J, Alavi M, Jacobs WR. 2001. Evidence that *Mycobacterium* PE_PGRS proteins are cell

surface constituents that influence interactions with other cells. *Infect and Immun.* 69(12):7326–7333

- Brennan MJ, Delogu G. 2002. The PE multigene family: a 'molecular mantra' for mycobacteria. *Trends Microbiol.* 10(5):246-249
- Brosch R, Pym AS, Gordon SV, Cole ST. 2001. The evolution of mycobacterial pathogenicity: clues from comparative genomics. *Trends in Microbiol.* 9(9): 146-148
- Cecchelli R, Dehouck B, Descamps L, Fenart L, Buee-Scherrer V, Duhem C, Lundquist S, Rentfel M, Torpier G, Dehouck MP. 1999. In vitro model for evaluating drug transport across the blood-brain barrier. *Adv Drug Deliv Rev.* 36(2-3):165-178
- Chacón R, Serafín J, Ramos R, Méndez P, Hernández-Pando R, Van Soolingen D, Flores L, Estrada S, Estrada I. 2005. Differential pattern of cytokine expression by macrophages infected in vitro with different *Mycobacterium tuberculosis* genotypes. *Clinical Experim Immunology.* 140(3): 443–449
- Chitale S, Ehrt S, Kawamura I, Fujimura T, Shimono N, Anand N, Lu S, Cohen-Gould L, Riley LW. 2001. Recombinant *Mycobacterium tuberculosis* protein associated with mammalian cell entry. *Cellular Microbiol.* 3(4):247-254
- Clark-Curtiss JE, Haydel SE. 2003. Molecular genetics of *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis. *Annu Rev Microbiol.* 57:517–549
- Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, Gordon SV, Eiglmeier K, Gas S, Barry CE, Tekaia F, Badcock K, Basham D, Brown D, Chillingworth T, Connor R, Davies R, Devlin K, Feltwell T, Gentles S, Hamlin N, Holroyd S, Hornsby T, Jagels K, Krogh A, McLean J, Moule S, Murphy L, Oliver K, Osborne J, Quail MA, Rajandream MA, Rogers J, Rutter S, Seeger K, Skelton J, Squares R, Squares S, Sulston JE, Taylor K, Whitehead S, Barrell BG. 1998. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature.* 393(6685):537-544

- Cole ST. 2002. Comparative and functional genomics of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Microbiol.* 148: 2919–2928
- Condos R, Rom WN, Weiden M. 2000. Lung-specific immune response in tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis.* 4(2):S11–S17
- Daniel, T. M., J. H. Bates, and K. A. Downes. 1994. History of tuberculosis en *Tuberculosis: pathogenesis, protection, and control.* B. R. Bloom (ed.), American Society for Microbiology, Washington, D.C.:13–24
- Dannenberg, A. M., Jr., and J. A. Rook. 1994. Pathogenesis of pulmonary tuberculosis: an interplay of tissue-damaging and macrophage-activating immune responses. Dual mechanisms that control bacillary multiplication en *Tuberculosis: pathogenesis, protection, and control.* B. R. Bloom (ed.), American Society for Microbiology, Washington, D.C.:141:1239–1245.
- Delogu G, Brennan M. 1999. Functional domains present in the mycobacterial hemagglutinin, HBHA. *J Bacteriology.* 81(24) :7464-7469
- Delogu G, Pusceddu C, Bua A, Fadda G, Brennan MJ, Zanetti S. 2004. Rv1818c-encoded PE_PGRS protein of *Mycobacterium tuberculosis* is surface exposed and influences bacterial cell structure. *Molecular Microbiology.* 52 (3): 725–733
- Delogu G, Sanguinetti M, Posteraro B, Rocca S, Zanetti S, Fadda G. 2006. The hbhA gene of *Mycobacterium tuberculosis* is specifically upregulated in the lungs but not in the spleens of aerogenically infected mice. *Infect Immun.* 74(5):3006-3011
- Delogu G, Sanguinetti M, Pusceddu C, Bua A, Brennan MJ, Zanetti S, Fadda G. 2006. PE_PGRS proteins are differentially expressed by *Mycobacterium tuberculosis* in host tissues. *Microbes Infect.* 8(8): 2061-2067
- Dheenadhayalan V, Delogu G, Sanguinetti M, Fadda G, Brennan MJ. 2006. Variable expression patterns of *Mycobacterium tuberculosis* PE_PGRS genes: evidence that PE_PGRS16 and PE_PGRS26 are inversely regulated in vivo. *J Bacteriol.* 188(10):3721-3725.

- Dobos KM, Spotts EA, Quinn FD, King CH. 2000. Necrosis of lung epithelial cells during infection with *Mycobacterium tuberculosis* is preceded by cell permeation. *Infect. Immun.* 68: 6300–6310.
- Drevets D, Leenen P, Greenfield R. 2004. Invasion of the central nervous system by intracellular bacteria. *Clinical Microbiol Rev.* 17(2):323–347
- Elder NC. 1992. Extrapulmonary tuberculosis. *Arch Fam Med.* 1(1):91-98.
- Espitia C, Laclette JP, Mondrago M, Palomino N, Amador A, Campuzano J, Martens A, Singh M, Cicero R, Zhang Y, Moreno C. 1999. The PE-PGRS glycine-rich proteins of *Mycobacterium tuberculosis*: a new family of fibronectin-binding proteins? *Microbiol.* 145: 3487–3495
- Espitia C, Flores J. 2003. Differential expression of PPE and PE-PGRS genes in *Mycobacterium tuberculosis* strains. *Microbiol.* 145:3487–3495
- Flesselles B, Anand NN, Remani J, Loosmore SM, Klein MH. 1999. Disruption of the mycobacterial cell entry gene of *Mycobacterium bovis* BCG results in a mutant that exhibits a reduced invasiveness for epithelial cells. *Fems Microbiol Lett.* 177: 237-242
- Flores J, Espitia C. 2003. Differential expression of PE and PE_PGRS genes in *Mycobacterium tuberculosis* strains. *Gene.* 318: 75-81
- Flynn JL, Chan J. 2001. Immunology of tuberculosis. *Annu Rev Immunol.* 19:93–129
- Frevert C, Martin TR. 2005. Innate immunity in the lungs. *Proc Am Thorac Soc.* 2: 403–411
- Frieden, T. R., P. I. Fujiwara, R. M. Washko, and M. A. Hamburg. 1995. Tuberculosis in New York city turning the tide. *N. Engl. J. Med.* 333: 229–233
- Garay, S. 1996. Pulmonary tuberculosis en Tuberculosis. Little, W. N. Rom and S. Garay (ed.), Brown and Co., Boston, Mass:13–24^a
- Garay, S. 1996. Tuberculosis and the human immunodeficiency virus infection en Tuberculosis. Little, W. N. Rom and S. Garay (ed.), Brown and Co., Boston, Mass:13–24^b

- Garcia de Viedma D, Marín M, Ruiz M, Alcalá L, Bouza E. 2003. Polyclonal and Compartmentalized infection by *Mycobacterium tuberculosis* in patients with both respiratory and extrapulmonary involvement. *J of Infect Diseases*. 187:695–699
- Garcia de Viedma D, Lorenzo G, Cardona PJ, Rodriguez NA, Gordillo S, Serrano MJ, Bouza E. 2005. Association between the infectivity of *Mycobacterium tuberculosis* strains and their efficiency for extrapulmonary infection. *J Infect Dis*; 192(12):2059-2065.
- Gioffre A, Infante E, Aguilar D, Santangelo M, Klepp L, Amadio L, Meikle V, Etchechoury I, Romano MI, Cataldi A, Hernández-Pando R, Bigi F. 2005. Mutation in *mce* operons attenuates *Mycobacterium tuberculosis* virulence. *Microbes and Infection*. 7:325–334
- Glickman MS Jacobs WR. 2001. Microbial Pathogenesis Review of *Mycobacterium tuberculosis*: Dawn of a Discipline. *Cell*. 104(4):477–485
- Gori A, Bandera A, Marchetti G, Degli Esposti A, Catozzi L, Nardi GP, Gazzola L, Ferrario G, van Embden JD, van Soolingen D, Moroni M, Franzetti F. 2005. Spoligotyping and *Mycobacterium tuberculosis*. *Emerg Infect Dis*. 11(8):1242-8.
- Golden MP, Vikram HR. 2005. Extrapulmonary tuberculosis: an overview. *Am Fam Physician*. 72(9):1761-1768.
- Green, PH. 1836. Tubercular meningitis. *Lancet I*: 232–235.
- Groenen PMA, Bunschoten AE, van Soolingen D, van Embden JDA. 1993. Nature of DNA polymorphism in the direct repeat cluster of *Mycobacterium tuberculosis*; application for strain differentiation by a novel typing method. *Mol Microbiol*. 10:1057–65.
- Haas, F., and S. S. Haas. 1996. The origins of *Mycobacterium tuberculosis* and the notion of its contagiousness en Tuberculosis. Little, W. N. Rom and S. Garay (ed.), Brown and Co., Boston, Mass:13–24
- Haenselt V. 1982. Pathogenesis of extrapulmonary tuberculosis. *Zentralbl Chir*. 1982;107(5-6):295-300
- Haile Y, Bjune G, Wiker HG. 2002. Expression of the *mceA*, *esat-6* and *hspX* genes in *Mycobacterium tuberculosis* and their responses to

- aerobic conditions and to restricted oxygen supply. *Microbiol.* 148(Pt 12):3881-3886.
- Haile Y, Caugant DA, Bjune G, Wiker HG. 2002. Mycobacterium tuberculosis mammalian cell entry operon (mce) homologs in Mycobacterium other than tuberculosis (MOTT). *Fems Immunol and Med Microbiol* 33:125-132
 - Harboe M, Christensen A, Ahmad S, Ulvund G, Harkness RE, Mustafa AS, Wiker HG. 2002. Cross-reaction between mammalian cell entry (Mce) proteins of Mycobacterium tuberculosis. *Scand J Immunol.* 56(6):580-587.
 - Harboe M, Das AK, Mitra D, Ulvund G, Ahmad S, Harkness RE, Das D, Mustafaz AS, Wiker HG. 2004. Immunodominant B-cell epitope in the Mce1A mammalian cell entry protein of Mycobacterium tuberculosis cross-reacting with glutathione s-transferase. *Scand J Immunol.* 59: 190–197
 - Harmsen AG, Muggenburg BA, Snipes MB, Bice DE. 1985. The role of macrophages in particle translocation from lungs to lymph nodes. *Science.* 230 (4731):1277–1280
 - Hernández-Pando R, Orozcoe H, Sampieri A, Pavon L, Velasquillo C, Larriva-Sahd J, Alcocer JM, Madrid MV. 1996. Correlation between the kinetics of Th1, Th2 cells and pathology in a murine model of experimental pulmonary tuberculosis. *Immunol;* 89(1):26-33.
 - Huber JD, Egleton RD, Davis TP. 2001. Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions in the blood–brain barrier. *Trends Neurosc.* 24(12):719-725
 - Jacobs M, Anon J, Appelbaum PC. 2004. Mechanisms of resistance among respiratory tract pathogens. *Clin Lab Med.* 24(2): 419–453
 - Jain SK, Satyaseela MP, Lamichhane g, Kim KS, Bishai WR. 2006. Mycobacterium tuberculosis invasion and traversal across an in vitro human blood-brain barrier as a pathogenic mechanism for central nervous system tuberculosis. *J Infec Dis.* 193:1287–95
 - Jansen A, Yu J. 2006. Differential gene expression of pathogens inside infected hosts. *Curr Opin in Microbiol.* 9(2):1–5

- Katti MK. 2004. Pathogenesis, diagnosis, treatment, and outcome aspects of cerebral tuberculosis. *Med Sci Monit.* 10(9): RA215-229
- Kaufmann SH, Cole ST, Mizrahi V, Rubin E, Nathan C. 2005. *Mycobacterium tuberculosis* and the host response. 201(11): 1693–1697
- Kerr JR. 1999. Cell adhesion molecules in the pathogenesis of and host defence against microbial infection. *J Clin Pathol: Mol Pathol.* 52: 220–230
- Kumar A, Bose M, Brahmachari V. 2003. Analysis of expression profile of mammalian cell entry (*mce*) operons of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun.* 71(10): 6083-6087
- Kumar A, Chandolia A, Chaudhry U, Brahmachari B, Bose M. 2005. Comparison of mammalian cell entry operons of mycobacteria: in silico analysis and expression profiling. *Fems Immunol and Med Microbiol.* 43:185–195
- Laguna, F., M. Adrados, A. Ortega, and J. M. González-Lahoz. 1992. Tuberculous meningitis with cellular cerebrospinal fluid in AIDS patients. *AIDS.* 6:1165–1167.
- Lee BH, Murugasu-Oei B, Dick T. 1998. Upregulation of a histone-like protein in dormant *Mycobacterium smegmatis*. *Mol Gen Genet.* 260(5):475-479.
- Leemans J.C, Juffermans N.P, Florquin S, van Rooijen N, Vervoordeldonk M.J, Verbon A, van Deventer S.J.H, van der Poll T. 2001. Depletion of alveolar macrophages exerts protective effects in pulmonary tuberculosis in mice. *J. Immunol.* 166: 4604–4611.
- Leung AN. 1999. Tuberculosis: the essentials. *Radiology.* 210(2):307-322
- Lu S, Tager LA, Chitale S, Riley LW. 2006. A cell-penetrating peptide derived from mammalian cell uptake protein of *Mycobacterium tuberculosis*. *Anal Biochem.* 353(1):7-14.
- Manabe YC, Dannenberg AM Jr, Tyagi SK, et al. 2003. Different strains of *Mycobacterium tuberculosis* cause various spectrums of disease in the rabbit model of tuberculosis. *Infect Immun;* 71:6004–6011.

- Manabe YC, Dannenberg AM, Bishai WR. 2000. What we can learn from the *Mycobacterium tuberculosis* genome sequencing projects. Int J Tuberc Lung Dis. 4(2):S18–S23
- Manca C, Tsenova L, Bergtold A, et al. 2001. Virulence of a *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolate in mice is determined by failure to induce Th1 type immunity and is associated with induction of IFN- α /b. Proc Natl Acad Sci USA; 98:5752–7.
- Mapother ME, Songer JG. 1984. In Vitro Interaction of *Mycobacterium avium* with Intestinal Epithelial Cells. Infect Immun. 45 (1): 67-73
- Marques MA, Antonio VL, Sarno EN, Brennan PJ, Pessolani CV. 2001. Binding of α 2-laminins by pathogenic and non-pathogenic mycobacteria and adherence to Schwann cells. J Med Microbiol. 50:23-28
- Marques MA, Mahapatra S, Sarno EN, Santos S, Spencer JS, Brennan PJ, Pessolani MCV. 2001. Further biochemical characterization of *Mycobacterium leprae* laminin-binding proteins. Braz J Med and Biolog Research. 34:463-470
- Mason C, Nelson S. 2005. Pulmonary Host Defenses and Factors Predisposing to Lung Infection. Clin Chest Med 26: 11 – 17
- Masungi C, Temmerman S, Vooren JP, Drowart A, Pethe K, Menozzi FD, Mascart F. 2002. Differential T and B Cell Responses against *Mycobacterium tuberculosis* Heparin-Binding Hemagglutinin Adhesin in Infected Healthy Individuals and Patients with Tuberculosis. J Infectious Diseases. 185(4):513-520
- Mc Garvey JA, Wagner D, Bermudez. 2004. Differential gene expression in mononuclear phagocytes infected with pathogenic and non-pathogenic mycobacteria. Clin Exp Immunol. 136:490–500
- Mc Donough KA, Kress Y. 1995. Cytotoxicity for lung epithelial cells is a virulence-associated phenotype of *Mycobacterium tuberculosis*. Infection and Immun. 63(12): 4802-4811
- Mehta PK, King CH, White EH, Murtagh JJ, Quinn FD. 1996. Comparison of in vitro models for the study of *Mycobacterium tuberculosis* invasion and intracellular replication. Infect Immun. 64(7): 2673-2679

- Melo MA, Mahapatra S, Nandan D, Dick T, Nunes E, Brennan PJ, Vidal-Pessolani MC. 2000. Bacterial and host-derived cationic proteins bind α 2-laminins and enhance *Mycobacterium leprae* attachment to human Schwann cells. *Microb and Infect.* 2:1407–1417
- Menozzi FD, Bischoff R, Fort E, Brennan MJ, Locht C. 1998. Molecular characterization of the mycobacterial heparin-binding hemagglutinin, a mycobacterial adhesin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 12625–12630
- Menozzi FD, Pethe K, Bifani P, Soncin F, Brennan MJ, Locht. 2002. Enhanced bacterial virulence through exploitation of host glycosaminoglycans. *Mol Microbiol.* 43(6):1379-1386
- Menozzi FD, Reddy VM, Cayet D, Raze D, Debrue AS, Dehouck MP, Cecchelli R, Locht C. 2006. *Mycobacterium tuberculosis* heparin-binding haemagglutinin adhesin (HBHA) triggers receptor-mediated transcytosis without altering the integrity of tight junctions. *Microb and Infect.* 8(1):Pages 1-9
- Menozzi FD, Rouse JH, Alavi M, Laude-Sharp M, Muller J, Bischoff R, Brennan MJ, Locht C. 1996. Identification of a heparin binding hemagglutinin present in mycobacteria, *J. Exp. Med.* 184(3): 993–1001
- Milburn H.2001. Primary tuberculosis. *Curr Opin Pulm Med.* 7(3):133-141
- Mischenko VV, Kapina MA, Eruslanov EB, Kondratieva EV, Lyadova IV, Young DB, Apt AS.2004. Mycobacterial dissemination and cellular responses after 1-lobe restricted tuberculosis infection of genetically susceptible and resistant mice. *J Infect Dis.* 190(12):2137- 2145
- Mischenko, Kapina, Eruslanov, Kondratieva, Lyadova, Young, Apt. 2004. Mycobacterial dissemination and cellular responses after 1-lobe restricted tuberculosis infection of genetically susceptible and resistant mice. *J of Infect Dis.*190:2137–2145
- Mitra D, Saha B, Das D, Wiker HG, Das AK. 2005. Correlating sequential homology of Mce1A, Mce2A, Mce3A and Mce4A with their possible functions in mammalian cell entry of *Mycobacterium tuberculosis* performing homology modeling. *Tuberculosis.* 85(5-6): 337-345

- 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)
- Mueller- Ortiz S, Sepulveda E, Olsen M, Jagannath C, Wanger A, Norris SJ. 2002. Decreased infectivity despite unaltered C3 binding by *hbhA* mutant of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect and Immun.* 70 (12): 6751–6760
- Parker SL, Tsai YL, Palmer CJ. 1995. Comparison of PCR-generated fragments of the *mce* gene from *Mycobacterium tuberculosis*, *M. avium*, *M. intracellulare*, and *M. scrofulaceum*. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2(6):770-775.
- Parra M, Pickett T, Deloug G, Dheenadhayalan V, Debie AS, Locht C, Brennan MJ. 2004. The Mycobacterial Heparin-Binding Hemagglutinin Is a Protective Antigen in the Mouse Aerosol Challenge Model of Tuberculosis. *Infect Immun.* 72(12):6799-6805.
- Pennini ME, Pai RK, Schultz DC, Boom WH, Harding CV. 2006. *Mycobacterium tuberculosis* 19-kDa lipoprotein inhibits IFN-gamma-induced chromatin remodeling of MHC2TA by TLR2 and MAPK signaling. *J Immunol.* 176(7):4323-4330.
- Pethe K, Alonso S, Biet F, Delogu G, Brennan MJ, Locht C, Menozzi FD. 2001. The heparin-binding haemagglutinin of *M. tuberculosis* is required for extrapulmonary dissemination. *Nature.* 412 (6843):190-194.
- Pethe K, Aumercier M, Fort E, Gatoti C, Locht C, Menozzi FD. 2000. Characterization of the heparin-binding site of the Mycobacterial heparin-binding hemagglutinin adhesin. *J Biological Chemistry.* 275(19): 14273-14280
- Pethe K, Bifani K, Drobecq H, Sergheraert C, Debie AS, Locht C, Menozzi FD. 2002. Mycobacterial heparin-binding hemagglutinin and laminin-binding protein share antigenic methyllysines that confer resistance to proteolysis. *PNAS.* 99(16): 10759–10764
- Pethe K, Puech V, Daffe M, Josenhans C, Drobecq H, Locht C, Menozzi FD. 2001. *Mycobacterium smegmatis* laminin-binding glycoprotein shares epitopes with *Mycobacterium tuberculosis* heparin-binding haemagglutinin. *Mol Microbiol.* 39(1):89-99

- Poulet S, Cole ST.1995. Characterization of the highly abundant polymorphic GC-rich-repetitive sequence (PGRS) present in *Mycobacterium tuberculosis*. Arch Microbiol.163(2):87-95
- Prabhakar S, Annapurna PS, Jain NK, Dey AB, Tyagi JS, Prasad HK.1998. Identification of an immunogenic histone-like protein (HLPMt) of *Mycobacterium tuberculosis*. Tuber Lung Dis. 79(1):43-53
- Prabhakar S, Mishra A, Singhal A, Katoch VM, Thakral SS, Tyagi JS, Prasad HK. 2004. Use of the hupB gene encoding a histone-like protein of *Mycobacterium tuberculosis* as a target for detection and differentiation of *M. tuberculosis* and *M. bovis*. J Clin Microbiol. 42(6): 2724-2732
- Ramakrishnan L, Federspiel NA, Falkow S. 2000. Granuloma-Specific Expression of *Mycobacterium* Virulence Proteins: from the Glycine-Rich PE-PGRS Family. Science 288: 1436-1439
- Reddy VM, Hayworth DA. 2002. Interaction of *Mycobacterium tuberculosis* with human respiratory epithelial cells (HEp-2). Tuberculosis. 82(1):31-36.
- Rich AR, and McCordock HA. 1993. The pathogenesis of tuberculous meningitis. Bull. Johns Hopkins Hosp. 52:5–37.
- Rothschild BM, Martin LD, Lev G, Bercovier H, Bar-Gal GK, Greenblatt C, Donoghue H, Spigelman M, Brittain D. 2001. *Mycobacterium tuberculosis* complex DNA from an extinct bison dated 17,000 years before the present. Clin Infect Dis. 33(3):305-311
- Santillan-Flores MA, Flores J, Arriaga-Diaz C, Romero-Torres C, Suarez-Guemes F, Espitia C. 2006. Polymorphism of the PE domain of PE/PE_PGRS sequences in clinical isolates of *Mycobacterium bovis* in Mexico. Vet Microbiol. 115(4):364-369
- Saunders BM and Cooper AM. 2000. Restraining mycobacteria: Role of granulomas in mycobacterial infections. Immunol and Cell Biology 78: 334–341
- Schnappinger D, Schoolnik GK, Ehrt S. 2006. Expression profiling of host pathogen interactions: how *Mycobacterium tuberculosis* and the macrophage adapt to one another. Microbes Infect. 8(4):1132-1140

- Schlossberg, D. 2000. Tuberculosis e infecciones por micobacterias no tuberculosas. *Mc Graw Hill*. Cuarta edición. USA.
- Shimoji Y, Ng V, Matsumura K, Fischetti V, Rambukkana A. 1999. A 21-kDa surface protein of *Mycobacterium leprae* binds peripheral nerve laminin-1 and mediates Schwann cell invasion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 96:9857-9862
- Shin AR, Lee KS, Lee JS, Kim SY, Song CH, Jung SB, Yang CS, Jo EK, Park JK, Paik TH, Kim HJ. 2006. *Mycobacterium tuberculosis* HBHA protein reacts strongly with the serum immunoglobulin M of tuberculosis patients. *Clin Vaccine Immunol*. 13(8):869-875
- Simmons C, Thwaites GE, Ha Quyen NT, Chau H, Mai P, Dung T, Stepniewska K, White NJ, Tinh Hien, Farrar J. 2005. Tuberculous Meningitis is not associated with measurable attenuation of peripheral or local immune responses. *J of Immunol*, 175: 579–590
- Smith, I. 2003. *Mycobacterium tuberculosis*, pathogenesis and molecular determinants of virulence. *Clin Microbiol Rev*. 16 (5): 463–496
- Stewart G, Robertson BD, Young DB. 2003. Tuberculosis: a problem with persistence. *Nature Rev Microb*. 1(2): 97-105
- Surendra Kumar Sharma, Alladi Mohan, Anju Sharma, Dipendra Kumar Mitra. 2005. Miliary tuberculosis: new insights into an old disease. *Lancet Infect Dis*. 5: 415–30
- Talarico S, Cave MD, Marrs CF, Foxman B, Zhang L, Yang Z. 2005. Variation of the *Mycobacterium tuberculosis* PE_PGRS 33 gene among clinical isolates. *J Clin Microbiol*. 43(10):4954-60
- Teitelbaum R, Schubert W, Gunther L, Kress Y, Macaluso F, Pollard JW, McMurray DN, Bloom BR. 1999. The M cell as a portal of entry to the lung for the bacterial pathogen *Mycobacterium tuberculosis*. *Immunity* 10:641–650
- Thomas M. Daniel, The history of tuberculosis, *Respiratory Medicine* (2006), doi:10.1016/j.rmed.2006.08.006

- Topley JM, Bamber S, Coovadia HM, Corr PD. 1998. Tuberculous meningitis and co-infection with HIV. *Ann of trop paediatrics*. 18(4): 261-266
- Trudeau, E. L. 1887. Environment in its relation to the progress of bacterial invasion in tuberculosis. *Am. J. Sci.* 94:118–123
- Tsenova L, Ellison E, Harbacheuski R, Moreira AL, Kurepina N, Reed MB, Mathema B, Barry CF, Kaplan G. 2005. Virulence of Selected *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates in the rabbit model of meningitis is dependent on phenolic glycolipid produced by the bacilli. *J Infect Diseases*. 192:98–106
- Vidal Pessolani MC, Melo Marques MA, Reddy VM, Loch C, Menozzi FD. 2003. Systemic dissemination in tuberculosis and leprosy: do mycobacterial adhesins play a role? *Microb and Infect* 5: 677–684
- Vijayan VK. 2000. Disseminated tuberculosis. *J Indian Med Assoc.* 98(3):107-109
- Wang XL, Lei JQ, Wang HH. 2003. The macrophage receptors for uptaking *Mycobacterium tuberculosis*. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi.* 26(5):297-299
- Waaler, H. T. 2002. Tuberculosis and poverty. *Int. J. Tubercle Lung Dis.* 6:745–746
- WHO Report 2004. Global Tuberculosis Control: Surveillance, Planning, Financing. *Bull World Health Organ.* <http://www.who.int/gtb>
- Zhang P, Summer WR, Bagby GJ, Nelson S. 2000. Innate immunity and pulmonary host defense. *Immunol Rev.* 173:39-51
- Zugar, A., and F. D. Lowy. 1996. Tuberculosis of the brain, meninges, and the spinal cord, p. 541–556. *In Tuberculosis*. Little, W. N. Rom and S. Gary (ed.), Brown and Col., Boston, Mass.