



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO **UNAM** POSGRADO 

---

---

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO  
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

CONSTRUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN  
DE *Mycobacterium microti* RECOMBINADA  
CON LOS GENES Rv0934 Y Rv1886c DE  
*Mycobacterium tuberculosis* H37Rv

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :  
**MAESTRA EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)**

**P R E S E N T A :**  
**TERESA DE JESÚS FLORES RODRÍGUEZ**

Tutor: DRA. YOLANDA LÓPEZ VIDAL



MÉXICO, D. F.

Abril 2008



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.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco la colaboración del Dr. Luis Servín González, del Departamento de Biología Molecular del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, en cuyo laboratorio se llevaron a cabo los experimentos de clonación de los genes Rv0934 y Rv1886c en el plásmido pYUB412.

Agradezco la asesoría técnica de la M. en C. Gabriela González Cerón que gentilmente apoyó en los experimentos de clonación de los genes Rv0934 y Rv1886c en el plásmido pYUB412.

Agradezco el apoyo y la asesoría brindados por la Dra. Yolanda López Vidal, así como también el tiempo y apoyo del Dr. Gonzalo Castillo Rojas en la realización de esta tesis.

## DEDICATORIAS

### **A Jehová:**

Te doy las gracias por haberme permitido concluir esta etapa de mi formación, por todos los momentos de ayuda que me brindaste cuando más lo necesitaba.

### **A mis padres:**

Gertrudis Rodríguez Flores y Manuel Flores García por darme la vida, por su amor, su confianza y ese ejemplo de lucha que me impulsó para llegar al final.

### **A mis hermanos:**

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

### **A mis compañeros del Programa de Inmunología Molecular Microbiana.**

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

### **A Rodrigo:**

Gracias por estar siempre a mi lado, por tu amor, por apoyarme, por aguantarme, escucharme y motivarme. Espero corresponderte siempre de la misma manera.

A todas aquellas personas que de uno u otra manera fueron partícipes para poder realizar este gran objetivo en mi vida, gracias.

## ÍNDICE

	Pág
<b>Reconocimientos</b>	i
<b>Agradecimientos</b>	ii
<b>Dedicatorias</b>	iii
<b>Índice</b>	iv
<b>Resumen</b>	vii
<b>Abreviaturas</b>	viii
<b>1. Introducción</b>	1
1.1 Tuberculosis	1
1.2 <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	1
1.3 Transmisión	3
1.4 Epidemiología	4
1.4.1 Tuberculosis en México	6
1.5 Respuesta inmune	7
1.5.1 Respuesta inmune innata	7
1.5.2 Respuesta inmune adquirida	8
1.6 Prevención	11
1.6.1 El bacilo de Calmette y Guérin	12
1.7 Estrategias para el desarrollo de nuevas vacunas	14
1.7.1 Vacunas de ADN	15
1.7.2 Vacunas de subunidades protéicas	15
1.7.3 Vacunas mutantes/auxótrofas	15
1.7.4 Vacunas recombinantes	16
1.8 <i>Mycobacterium microti</i>	17
1.9 Antígeno PstS-1	20

1.10 Antígeno 85B	21
<b>2. Justificación</b>	23
<b>3. Hipótesis</b>	24
<b>4. Objetivo</b>	25
<b>5. Objetivos particulares</b>	25
<b>6. Metodología</b>	26
6.1 Detección de los genes Rv0934 y Rv1886c en <i>Mycobacterium microti</i>	26
6.2 Secuenciación de los genes Rv0934 y Rv1886c en <i>Mycobacterium microti</i>	27
6.3 Detección de PstS-1 (Rv0934) y Ag85B (Rv1886c) en <i>Mycobacterium microti</i>	27
6.4 Clonación de los genes Rv0934 y Rv1886c de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv en el plásmido pMV261	30
6.5 Clonación de los genes Rv0934 y Rv1886c de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv en el plásmido pYUB412	35
6.6 Transformación de <i>Mycobacterium microti</i>	39
6.7 Identificación de los antígenos PstS-1 y 85B en <i>Mycobacterium microti</i> recombinante	42
<b>7. Resultados</b>	44
7.1 Detección de los genes Rv0934 y Rv1886c en <i>Mycobacterium microti</i>	44
7.2 Secuenciación de los genes Rv0934 y Rv1886c en <i>Mycobacterium microti</i>	44
7.3 Detección de PstS-1 (Rv0934) y Ag85B (Rv1886c) en <i>Mycobacterium microti</i>	47
7.4 Clonación de los genes Rv0934 y Rv1886c de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv en el plásmido pMV261	48
7.5 Clonación de los genes Rv0934 y Rv1886c de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv en el plásmido pYUB412	52

7.6 Transformación de <i>Mycobacterium microti</i>	59
7.7 Identificación de los antígenos PstS-1 y 85B en <i>Mycobacterium microti</i> recombinante	62
<b>8. Discusión</b>	69
<b>9. Conclusiones</b>	74
<b>10. Bibliografía</b>	75

## RESUMEN

Actualmente la tuberculosis representa un problema serio de salud a nivel mundial, su incidencia ha aumentado debido a la co-infección con el virus de la inmunodeficiencia humana y al desarrollo de cepas de *M. tuberculosis* multi-fármaco resistentes. Hasta hoy la principal medida preventiva contra la tuberculosis es la vacunación con BCG. Sin embargo, presenta una gran variación en su eficacia protectora en los distintos ensayos clínicos que se han realizado. Esto hace necesario desarrollar vacunas más eficaces. Una alternativa es la recombinación de cepas filogenéticamente relacionadas a *M. tuberculosis* con sus antígenos inmunodominantes, por lo que *M. microti*, que es una cepa naturalmente atenuada para el humano, se recombinó con los antígenos 85B (Rv1886c) y PstS-1 (Rv0934) de *M. tuberculosis* H37Rv, para desarrollar un candidato a vacuna contra la tuberculosis. Estos antígenos no habían sido estudiados en *M. microti* y se encontró que cuenta con genes homólogos a los de *M. tuberculosis* H37Rv para estas proteínas. Sin embargo, se hallaron diferencias en la expresión de PstS-1, las cuales pudieran deberse a su procesamiento post-traducciona. Esto resulta en la producción de una proteína de menor tamaño en el extracto celular, en comparación con la del filtrado de cultivo, la cual, sí tiene el peso esperado. Ambas cepas de *M. microti* recombinadas producen en mayor cantidad los antígenos 85B y PstS-1 en comparación con *M. microti* sin recombinar, siendo mayor la expresión de Ag85B en comparación con la de PstS-1. También se encontró que la expresión del antígeno PstS-1 en la cepa de *M. microti* recombinada no afecta la producción del Ag85B. Sin embargo, la liberación de PstS-1 en el medio de cultivo, en la cepa recombinada con Ag85B, sí se ve afectada.



## ABREVIATURAS

<b>ADC</b>	Albúmina dextrosa catalasa
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>Ag85B</b>	Antígeno 85B
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>ARNr</b>	Ácido ribonucleico ribosomal
<b>ATCC</b>	Colección americana de cultivos tipos
<b>BCG</b>	Bacilo de Calmette-Guerán
<b>CD4</b>	Designación de grupo 4
<b>CD8</b>	Designación de grupo 8
<b>CDs</b>	Células dendríticas
<b>CFP-10</b>	Proteína de filtrado de cultivo de 10 kDa
<b>CIE</b>	Contra inmuno-electroforesis
<b>DO</b>	Densidad óptica
<b>DTH</b>	Hipersensibilidad de tipo tardío
<b>ESAT-6</b>	Antígeno blanco de secreción temprana de 6 kDa
<b>g</b>	Gravedad
<b>GM-CSF</b>	Factor estimulador de colonias de monocitos y granulocitos
<b>HSP</b>	Proteína de choque térmico
<b>Ig</b>	Inmunoglobulina
<b>IL</b>	Interleucina
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interferón gamma
<b>MHC</b>	Complejo mayor de histocompatibilidad
<b>mg</b>	Miligramos
<b>mL</b>	Militros
<b>mM</b>	Milimolar
<b>mV</b>	Mili volts
<b>NK</b>	Asesinas naturales
<b>nm</b>	Nanómetros
<b>OADC</b>	Ácido-oleico albúmina- dextrosa-catalasa
<b>OMS</b>	Organización mundial de la salud
<b>ON</b>	Óxido nítrico
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa.
<b>PstS-1</b>	Proteína transportadora de fosfatos
<b>RD1</b>	Región deletada 1
<b>RNI</b>	Intermediarios reactivos de nitrógeno
<b>ROI</b>	Intermediarios reactivos de oxígeno
<b>SCID</b>	Síndrome de inmunodeficiencia severa combinada
<b>SDS-PAGE</b>	Electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio
<b>TBS</b>	Amortiguador salino de tris
<b>TE</b>	Tris-EDTA

<b>Th1</b>	Respuesta T cooperadora tipo 1
<b>Th2</b>	Respuesta T cooperadora tipo 2
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Factor de necrosis tumoral alfa
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>V</b>	Volts
<b>VIH</b>	Virus de la inmunodeficiencia humana
<b>%</b>	Porcentaje
<b><math>\mu</math>g</b>	Microgramos
<b><math>\mu</math>m</b>	Micrómetro

## 1. Introducción.

### 1.1 Tuberculosis.

La tuberculosis es una enfermedad muy antigua. Con el uso de técnicas moleculares se logró detectar ADN de *M. tuberculosis* en muestras de lesiones identificadas en huesos de momias egipcias. Esta enfermedad fue conocida como “tisis” desde la época de Hipócrates. En tiempos bíblicos se conocía con el nombre de “consumo, extinción” y en el siglo XVIII como la “peste blanca” (29, 103). La tuberculosis se consideró como hereditaria hasta 1865 cuando el médico Antoine Villemin comprobó su naturaleza infecciosa al transferir fluidos y pus de lesiones humanas y bovinas a conejos que desarrollaron la enfermedad.

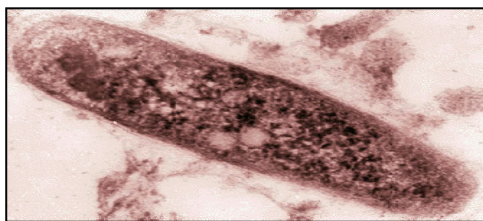
Actualmente la tuberculosis se define como una enfermedad infecto-contagiosa que se identifica por la presencia de lesiones semejantes a tubérculos y necrosis caseosa. Afecta principalmente el pulmón. Es causada por un grupo de micobacterias conocidas como ‘complejo *Mycobacterium tuberculosis*’, el cual consiste de micobacterias que presentan un 99.9% de identidad a nivel de nucleótidos y secuencias idénticas de ARN ribosomal 16S, pero difieren en su hospedero, fenotipo y patogenicidad. De esta manera las especies *M. tuberculosis*, *M. canetti* y *M. africanum*, tienen como hospedero al humano; *M. pinnipedii* y *M. microti* infectan roedores; *M. caprae* cabras y *M. bovis* bovinos (18, 70).

### 1.2 *Mycobacterium tuberculosis*.

*Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*), el principal agente causal de la tuberculosis humana, fue descubierto por Robert Koch en 1882, al aislar la bacteria de lesiones tuberculosas de animales infectados, por lo que también se le conoce como el ‘bacilo de Koch’.

Este microorganismo se clasifica taxonómicamente dentro del reino Bacteria, en el phylum de Actinobacteria, de la clase Actinobacteria, subclase *Actinobacteridae*, del orden de los Actinomycetales, suborden *Corynebacterineae*, compuesto por ocho familias entre las que se encuentra la familia *Mycobacteriaceae*, con un solo género: *Mycobacterium*.

*M. tuberculosis* es un bacilo ácido alcohol-resistente, aerobio, recto o ligeramente curvo; mide de 0.3 a 0.6  $\mu\text{m}$  de ancho y de 1 a 4  $\mu\text{m}$  de largo (Figura 1). En los macrófagos el bacilo tuberculoso es recto y delgado, mide casi 0.4 x 3  $\mu\text{m}$ . Los bacilos no forman esporas (101).

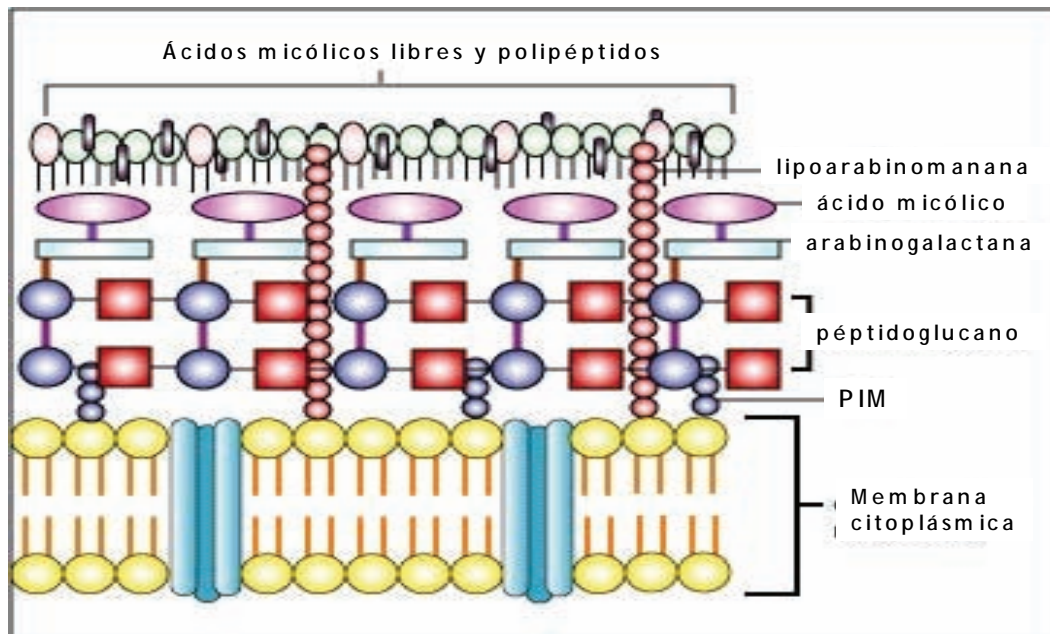


**Figura 1.** *Mycobacterium tuberculosis*. Foto de micrografía electrónica de transmisión de *M. tuberculosis*. Tomada de [www.wadsworth.org](http://www.wadsworth.org).

Al igual que otras micobacterias cuenta con una pared celular compleja (Figura 2) que contiene una gran cantidad de lípidos, los cuales son alrededor del 60% del peso seco de la pared. Esta pared le confiere la característica de ser ácido alcohol resistente. Ésta tiene tres capas. La más interna, está contiene principalmente peptidoglucano. En la segunda hay arabinogalactano y ácidos micólicos, mientras que la más externa presenta ceras D y micósidos-C. Además, también tiene lipoarabinomananas las cuales se encuentran a través de toda la pared micobacteriana (90, 101).

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

un factor de patogenicidad, ya que, estudios realizados por Hubert Bloch en 1950, mostraron la toxicidad de este factor en ratones. Sin embargo, Goren en 1972 demostró que la trehalosa dimicolato también está presente en micobacterias saprófitas. Estudios recientes sugieren que diferencias en la composición relativa y estructura de la trehalosa dimicolato influyen en la respuesta biológica que se obtiene (90).

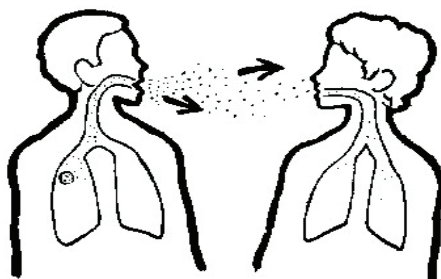


**Figura 2.** Representación esquemática de los componentes de la pared celular de *M. tuberculosis*. La pared celular micobacteriana se divide en tres capas. La más interna se compone principalmente de peptidoglucano, representado en la figura por el entramado de cuadros rojos y círculos violeta. La capa intermedia se conforma principalmente por arabinogalactana (rectángulos azules) y ácidos micólicos (óvalos morados). La tercer capa, la más externa contiene micósidos C, ceras D y en menor proporción ácidos micólicos libres y polipéptidos. También contiene lipoarabinomanana (cadenas de círculos anaranjados), la cual está ampliamente distribuida en la pared. Tomada de [www.cpmc.columbia](http://www.cpmc.columbia).

### 1.3 Transmisión.

*M. tuberculosis* se transmite de persona a persona por vía aérea, al toser o estornudar, ya que se generan aerosoles que se conforman de pequeñas gotas de saliva las cuales contienen abundantes bacilos (Figura 3). La tuberculosis se adquiere también por vía oral

cuando se ingiere leche no pasteurizada proveniente de vacas infectadas con *M. bovis* o por fómites pero esto es muy poco frecuente (42, 43). La tuberculosis se manifiesta generalmente en su forma pulmonar pero también afecta a otros órganos, como ganglios linfáticos, riñón, oviductos, epidídimo, esqueleto, meninges, intestino y en otros sitios; asociada o no, al proceso pulmonar. En la infección secundaria se disemina por vía hematógena e infecta simultáneamente diversos órganos. En todos los sitios la contención de la infección se da por la formación de una estructura organizada denominada “granuloma tuberculoso” (37, 48, 75, 79, 87).

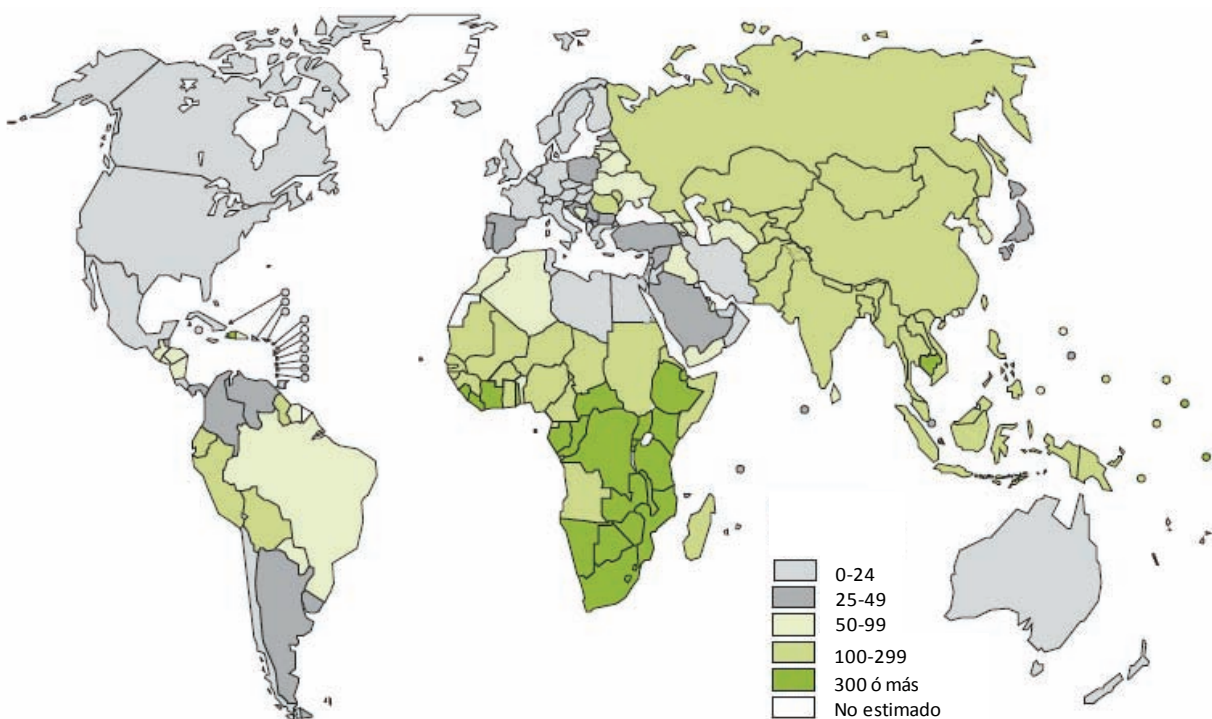


**Figura 3.** Vía de transmisión de la tuberculosis. La transmisión se realiza principalmente de persona a persona por la exposición a un paciente con tuberculosis pulmonar activa. Tomada de [www.cpmc.columbia.edu](http://www.cpmc.columbia.edu).

#### 1.4 Epidemiología.

La tuberculosis representa un serio problema de salud a nivel mundial, ya que se estima que anualmente se infectan de 8 a 10 millones de personas y mueren de 2 a 3 millones (Figura 4). Esta situación se agrava debido a la creciente coinfección con el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), situación en la que el riesgo anual de desarrollar tuberculosis se incrementa de 7-10% y al surgimiento de cepas de *M. tuberculosis* fármaco-resistentes (89).

El uso de tratamientos inmunosupresores también es un factor que incrementa el riesgo a desarrollar la enfermedad en sujetos que presentan una infección latente por *M. tuberculosis*.



**Figura 4.** Distribución mundial de la tuberculosis. En la figura se esquematiza la incidencia de tuberculosis por país estimada para el año 2005. Casos de tuberculosis por 100 000 habitantes. WHO, 2007.

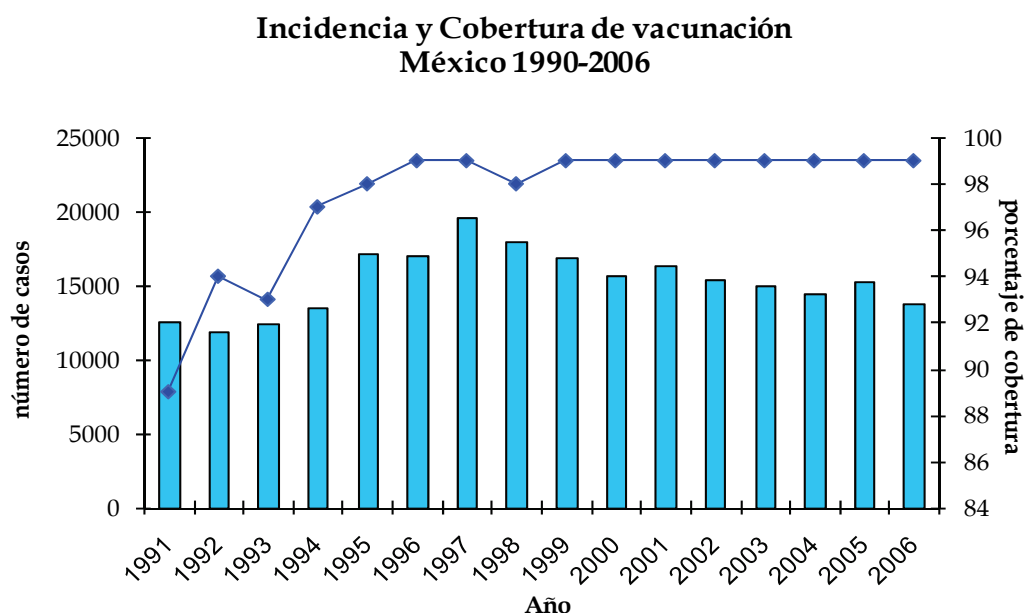
La tuberculosis se presenta en todo el mundo independientemente de factores geográficos o raciales. Sin embargo, la mayor incidencia se concentra en los países en vías de desarrollo, frecuentemente asociado a las clases socioeconómicas bajas, siendo característicos la desnutrición, el hacinamiento humano y las malas condiciones de higiene en estas regiones. Un grupo de alto riesgo de infección lo constituyen los trabajadores de la salud y las personas que conviven con pacientes con tuberculosis pulmonar activa. La diabetes y la silicosis pulmonar son padecimientos que predisponen al desarrollo de la tuberculosis (89).

Debido a que en los últimos años ya no se ha observado una disminución en el número de casos de tuberculosis, en abril de 1993 la Organización Mundial de la Salud (OMS) declaró el estado de emergencia global contra la tuberculosis (50).

### 1.4.1 Tuberculosis en México.

En México la tuberculosis afecta a todos los grupos de edad, particularmente a los adultos jóvenes. En el año 2000 la OMS consideró a México entre los países con tasas de incidencia intermedia, es decir, mayor de 25 y menor de 49 casos por 100 000 habitantes. Sin embargo, en México sólo se diagnosticaban de 15 000 a 20 000 casos nuevos de tuberculosis al año (7, 32).

De acuerdo a los datos de incidencia de los años 1990 a 2000 (Gráfica 1) a partir de 1994 se incrementa la notificación de casos como respuesta al informe de la Organización Panamericana de la Salud, ya que en 1993 se estimó que en México había un subregistro de casos nuevos de tuberculosis pues sólo se detectaban uno de cada 4 casos (82).



**Gráfica 1.** Incidencia de tuberculosis en México. En el gráfico aparece el número de casos de tuberculosis pulmonar por año en México (barras) y el porcentaje de cobertura de vacunación contra la tuberculosis por año (línea). Fuente: Dirección General de Epidemiología, SSA.

Además, la Secretaría de Salud (SSA) implementó el “Programa de Acción para la Prevención y Control de la Tuberculosis” el cual tiene como objetivo expreso, lograr la



detección oportuna de casos y el tratamiento de los enfermos a través de la estrategia del Tratamiento Acortado Estrictamente Supervisado (TAES). De acuerdo con los logros obtenidos por la implementación de este programa, a partir del 2005 la OMS consideró a México entre los países con tasas de incidencia de 0 a 24 casos por 100 000 habitantes.

### **1.5 Respuesta inmune.**

La principal vía de infección es a través de la inhalación de micro-gotas de saliva expelidas por una persona enferma de tuberculosis. Las bacterias viajan a través del tracto respiratorio a regiones distales del pulmón y entran en contacto con macrófagos alveolares y células dendríticas. Hay tres resultados potenciales de la interacción entre el hospedero y *M. tuberculosis*:

- a. El hospedero monta una respuesta inmune efectiva contra la micobacteria eliminándola.
- b. En el hospedero inmunocomprometido la enfermedad se desarrolla directamente después de la infección.
- c. En la mayoría de los casos (90%), la micobacteria es inicialmente contenida y la enfermedad se desarrolla después como resultado de una reactivación (62).

#### **1.5.1 Respuesta inmune innata.**

Los macrófagos alveolares y células dendríticas (CDs) del pulmón presentan en su superficie receptores que reconocen patrones asociados a patógenos o antígenos específicos (TLRs, FcRs, receptores de complemento, receptor de manosa, CD14, receptores scavenger) y una vez que *M. tuberculosis* entra en contacto con dichas células, éste es detectado por las mismas. Esto facilita la entrada de la micobacteria a estas células, en donde reside dentro de un fagosoma, lo que a su vez asegura que los antígenos tengan acceso a la maquinaria de procesamiento de antígenos para el Complejo Mayor de Histocompatibilidad clase II (MHC

---

II). Los macrófagos y CDs además expresan sobre su superficie una variedad de moléculas co-estimuladoras y producen una combinación de citocinas proinflamatorias, como factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), interleucina (IL) 1, IL-6, IL-12 e IL-18 y quimocinas que favorecen el reclutamiento de linfocitos T, neutrófilos, células natural killer (NK) y otros macrófagos, al sitio de infección. A su vez, las CDs infectadas migran a nodos linfáticos adyacentes para llevar a cabo, la presentación de antígenos a linfocitos T, con lo que se inicia una respuesta tipo T cooperadora 1 (Th1) (62, 63, 92).

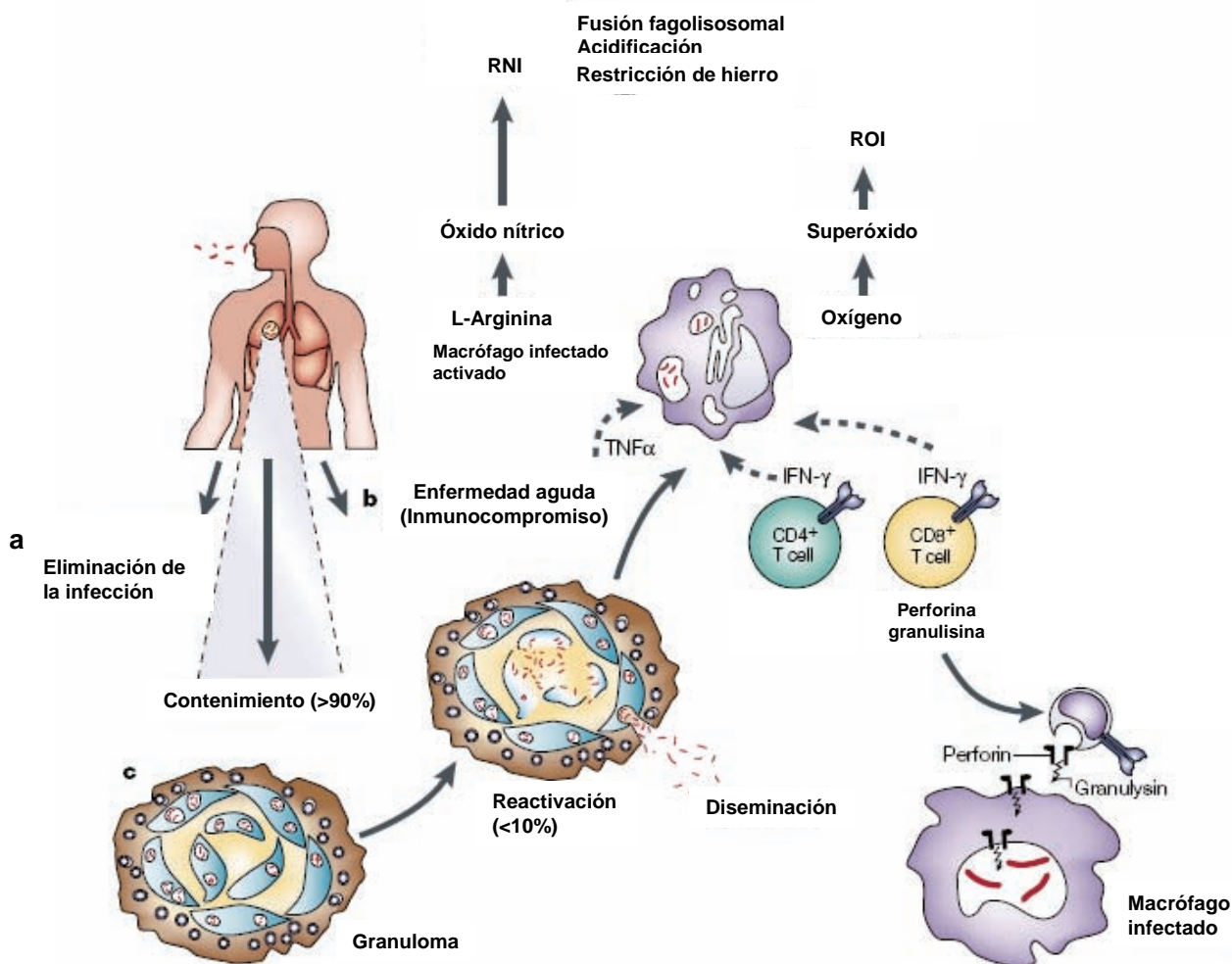
### 1.5.2 Respuesta inmune adquirida.

Se ha observado que la respuesta inmune tipo Th1 es la que genera inmunidad protectora contra la tuberculosis, ya que este tipo de respuesta es celular y va dirigida contra patógenos intracelulares y *M. tuberculosis* es uno de ellos. En tanto que la respuesta tipo Th2 es caracterizada por favorecer la producción de anticuerpos los cuales no tienen acceso a un patógeno si éste es intracelular. La respuesta tipo Th1 (Figura 5) es especialmente crucial en los pulmones debido a que los macrófagos alveolares requieren el estímulo de interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) exógeno para activar la vía de señalización dependiente de STAT1, lo que lleva a la producción de moléculas antimicrobianas (62, 25).

Las CDs y los macrófagos procesan y presentan antígenos micobacterianos a través de moléculas MHC II, que junto con la expresión de moléculas co-estimuladoras y citocinas como IL-12 activan a linfocitos T CD4<sup>+</sup> para montar una respuesta tipo Th1. Estos linfocitos T CD4<sup>+</sup> de tipo Th1 se caracterizan por la producción de IFN- $\gamma$ , IL-2, TNF- $\alpha$  y factor estimulador de crecimiento de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF). Lo que a su vez lleva a la activación de macrófagos y de esta manera permite la maduración fagosomal y la producción de moléculas antimicrobianas, como los intermediarios reactivos de nitrógeno (RNI) e intermediarios reactivos de oxígeno (ROI). El óxido nítrico (ON) y sus metabolitos forman parte de los principales mecanismos bactericidas de los macrófagos. El ON promueve la acidificación del fagosoma y por lo tanto, su fusión con el lisosoma, y

---

restringe el contenido de hierro, el cual requiere *M. tuberculosis* para su desarrollo (62, 63, 94).

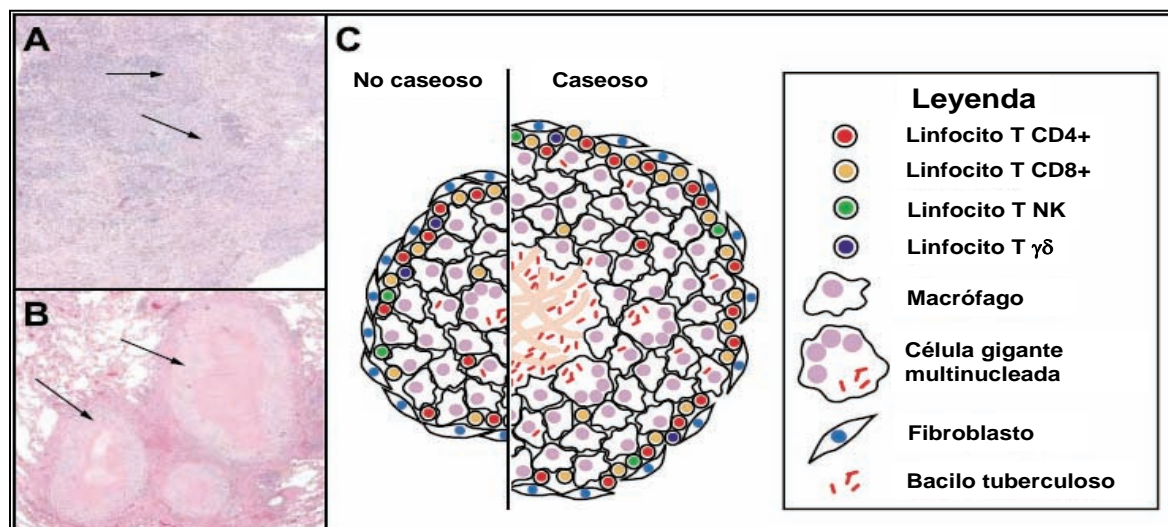


**Figura 5.** Respuesta inmune contra la tuberculosis. Hay tres resultados potenciales de la interacción de *M. tuberculosis* con el hospedero. **a.** Eliminación de la infección, cuya frecuencia no se conoce, pero se asume que es pequeña. **b.** El hospedero inmunocomprometido puede desarrollar la enfermedad directamente después de la infección. **c.** En la mayoría de los casos (90%), el bacilo tuberculoso es contenido en un granuloma, el cual se forma en el sitio de la infección y evita la diseminación. La enfermedad se desarrolla después como resultado de una reactivación. Macrófagos y linfocitos T CD4+ y CD8+ participan en el control de la tuberculosis. IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  producidos por los linfocitos T son importantes activadores de macrófagos. La activación de los macrófagos permite la maduración fagosomal y la producción de moléculas antimicrobianas como RNI y ROI (62).

A pesar de que *M. tuberculosis* reside dentro de fagosomas, se ha observado que es capaz de estimular linfocitos T CD8+ a través de la presentación de antígenos por MHC I y también hay evidencia de que estos linfocitos participan en la protección contra el patógeno. Se ha propuesto que *M. tuberculosis* puede perforar la membrana del fagosoma y de tal manera que puede tener acceso a los nutrientes que se encuentran en el citosol. Se cree que este mecanismo también puede permitir la salida de antígenos hacia el citosol de tal modo que pueden ser procesados y presentados por moléculas MHC I a linfocitos T CD8+. También hay evidencia de otro mecanismo por el cual se puede dar la presentación de antígenos por moléculas MHC I. Dicho mecanismo se da a través de vesículas que son liberadas de células apoptóticas, las cuales contienen antígenos micobacterianos, y que son abundantes en lesiones caseosas de pacientes tuberculosos. Estas vesículas son tomadas por CD8 las cuales promueven la presentación de los antígenos a través de moléculas MHC I. A esto se le conoce como cross-priming. Los linfocitos T CD8+ activados también pueden producir INF- $\gamma$  pero su principal función es promover la apoptosis de células del hospedero infectadas, lo que puede facilitar el traslado de la micobacteria de una célula “incapacitada” a una célula efectora más eficiente. Por otro lado, se ha observado que las células T CD8+ pueden expresar granulicina y perforina, las cuales pueden matar directamente a *M. tuberculosis* (62, 94).

Sin embargo, *M. tuberculosis* puede evadir al sistema inmune por medio de varios mecanismos. Impide la maduración del fagosoma mediante la retención del marcador de fagosoma temprano Rab5. Puede producir amoníaco y cambiar el pH intralisosomal para evitar la activación de las proteasas lisosomales. Inhibe la apoptosis y destruye superóxidos tóxicos que son secretados por células del sistema inmune, mediante la producción de las enzimas superóxido dismutasa y catalasa. Entonces, *M. tuberculosis* puede pasar a un estado de latencia, con actividad metabólica reducida, lo que facilita su supervivencia bajo condiciones de privación de nutrientes y oxígeno. Estas bacterias pueden persistir sin producir enfermedad y entonces crear un estado de latencia (62, 45, 94).

En el estado de latencia se contiene al bacilo tuberculoso dentro de un granuloma, el cual es una estructura protectora ya que impide la diseminación del patógeno y al mismo tiempo localiza la inflamación y daño en los pulmones (Figura 6).



**Figura6.** Estructura del granuloma micobacteriano. (A) Granuloma humano no caseoso (flechas). (B) Granuloma humano caseoso (flecha). Fotografías de microscopio cortesía del Dr. Meyer. Universidad de Wisconsin Medical School. (C) Representación esquemática de un granuloma caseoso y uno no caseoso.

El granuloma tuberculoso consiste de macrófagos epitelioides (macrófagos activados con abundante citoplasma), células gigantes multinucleadas (macrófagos que se fusionaron), macrófagos activados, células NK, linfocitos T CD4+ y TC8+, y fibroblastos. Los fibroblastos producen colágena, la cual forma un tejido fibroso que rodea la estructura. Éstos posteriormente se calcifican dando lugar a lo que se conoce como complejo de Ghon o tubérculos, los cuales son visibles a través de rayos-X (92).

### 1.6 Prevención.

En cuanto a prevención, el nivel socioeconómico de los miembros de la comunidad influye, la mejora de la vivienda, sin hacinamiento y en general mejorar las condiciones de higiene y nutrición, particularmente de niños y jóvenes; ayuda a prevenir la transmisión. También se puede evitar la transmisión humana de la enfermedad por medio de la

detección y tratamiento oportunos de todos los casos comprobados. Sin embargo, la medida más importante es la inmunización. Esta se logra por medio de la vacunación con el bacilo de Calmette y Guérin (BCG).

### 1.6.1 El bacilo de Calmette y Guérin.

La vacuna conocida comúnmente como BCG, fue desarrollada entre 1908 y 1921 en el Instituto Pasteur de Lille, Francia por Albert Calmette y Camille Guérin durante sus investigaciones sobre la vía de transmisión del bacilo tuberculoso de la especie *M. bovis* (82). La cepa BCG fue obtenida cuando el Dr. Calmette cultivó *M. bovis* sobre el medio de papa glicerizada y bilis de buey. Durante la propagación del bacilo cada 21 días, observó cambios en la morfología de la cepa después de varios subcultivos. En diciembre de 1908 Calmette y Guérin reportaron ante la Academia de Ciencias que su bacilo había modificado sus propiedades morfológicas. Posteriormente inmunizaron becerros con esta cepa, los retaron con *M. tuberculosis* y encontraron que éstos se conservaban sanos (53).

Durante los años siguientes continuaron sus estudios sobre el bacilo no tuberculoso confirmando la inocuidad absoluta del mismo y la imposibilidad del bacilo de revertir a su virulencia. Esta cepa, obtenida después de 230 subcultivos fue denominada bacilo Calmette-Guerin. La vacuna BCG se aplicó por primera vez a un humano en 1921, se le administró por vía oral a un recién nacido, hijo de una madre tuberculosa y que fue criado por la abuela que también padeció la enfermedad. A este niño se le administraron tres dosis de 6 mg de BCG por vía oral y fue protegido exitosamente. Posteriormente se vacunaron 120 recién nacidos de madres tuberculosas siguiendo el mismo esquema de vacunación. En 1923 se cambió la vía de administración oral por la intradérmica y posteriormente a subcutánea. Para 1926 ya se habían vacunado 5 183 niños recién nacidos en Francia, con lo cual Calmette y colaboradores demostraron que la vacunación con BCG redujo la mortalidad por tuberculosis en bebés, de 25% a 2% (53).

En los siguientes años, se incrementó el uso de la vacuna BCG en Europa; sin embargo, también hubo controversia por la carencia de evidencias estadísticas que demostraran que la vacunación reducía la mortalidad por tuberculosis en los infantes y por el miedo a que BCG recuperara su virulencia (11, 69, 76). En 1928, la Liga de las Naciones aceptó la vacunación con BCG. Entonces, la vacuna se distribuyó a diferentes laboratorios en el mundo. Cada uno la preservó de manera diferente, lo que trajo como consecuencia el surgimiento de diferencias genotípicas y fenotípicas a lo largo del tiempo, producto de mutaciones que ocasionaron la pérdida de genes con relevancia inmunológica.

Sin embargo, hasta hoy, la principal medida de prevención es la vacunación con BCG, la cual no previene la infección, pero sí protege contra las formas severas de la enfermedad (tuberculosis miliar y meníngea) y reduce el riesgo de progresión a tuberculosis pulmonar y de muerte. La mayoría de los países recomienda la vacunación rutinaria con BCG para prevenir la tuberculosis. No obstante, algunos de los ensayos clínicos realizados para evaluar su eficacia protectora, en los más de 80 años de uso de la vacuna BCG, mostraron resultados contradictorios, con un intervalo en la eficacia protectora de la vacuna BCG que va desde 0 a 80 %, lo cual es muy preocupante (41). Estos resultados han sido revisados varias veces por diversos investigadores. En 1992, Colditz y colaboradores publicaron un meta-análisis en el que sólo incluyen ensayos clínicos controlados y estudios caso-control y reportan una eficacia protectora promedio del 50 %; sin embargo, ésta varía entre 30 y 66 % (24).

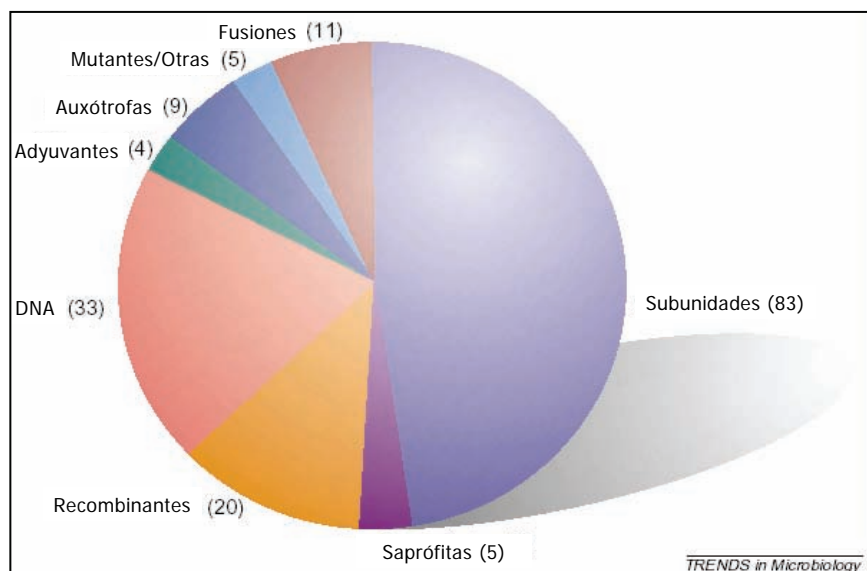
Dentro de las hipótesis planteadas para explicar esta variación se encuentran:

1. Diferencias entre las sub-cepas BCG y pérdida progresiva de capacidad de generar inmunidad protectora (9, 10, 12).
2. Diferencias genéticas en la susceptibilidad del hospedero.
3. Bloqueo o enmascaramiento de la eficacia protectora por pre-sensibilización con micobacterias no tuberculosas (1, 3, 13, 36).

## 1.7 Estrategias para el desarrollo de nuevas vacunas.

Ante el panorama antes descrito, es necesario el desarrollo de una nueva vacuna que supere la eficacia protectora que presenta BCG. Para lograrlo se han explorado varias alternativas, destacando: las vacunas de subunidades protéicas, de DNA y recombinantes (1, 4, 20, 31, 35, 41, 80).

En la figura 7, se muestra la distribución de los principales tipos de vacunas que fueron evaluadas hasta el 2001 por el Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos. Aproximadamente el 50% de éstas lo ocupan las vacunas de subunidades. Si bien esto refleja un mayor conocimiento sobre las proteínas que constituyen al bacilo tuberculoso, también representa un abordaje del problema en base a las hipótesis del bloqueo o enmascaramiento de la eficacia protectora de BCG. En dichas hipótesis, la falla de la vacuna BCG se atribuye a la inmunidad generada por antígenos que existen en común entre las micobacterias ambientales y las diferentes sub-cepas BCG. Esto trata de evitarse en las vacunas de subunidades, ya que no emplean micobacterias como vehículo para los antígenos.



**Figura 7.** Vacunas evaluadas en modelos animales por el Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos. *TRENDS in Microbiology* 2001.



### **1.7.1 Vacunas de ADN.**

Consisten en la aplicación de vectores de ADN desnudo que codifican proteínas inmunogénicas de *M. tuberculosis*, principalmente las proteínas secretadas al medio de cultivo. Este tipo de vacunas requieren de un adyuvante, además la inmunización debe ser intramuscular, para inducir una respuesta Th1. Estas vacunas se han evaluado en varios modelos animales, destacando las que expresan los antígenos Ag85A, TB10.4 y Ag85B, las cuales demostraron reducir el nivel de infección pulmonar después del reto con *M. tuberculosis*, por medio de respuesta celular por linfocitos T CD4<sup>+</sup> y T CD8<sup>+</sup>. Sin embargo, se requieren ensayos que estudien su seguridad en población humana, de manera que algunas de estas vacunas están siendo evaluadas en estudios preclínicos y otras ya están en fase clínica I (5, 35, 41, 61, 80, 94).

### **1.7.2 Vacunas de subunidades proteicas.**

Este tipo de vacunas consisten en proteínas obtenidas a partir de un filtrado de cultivo de *M. tuberculosis*. Requieren ser administradas con adyuvantes, lo que potencia la respuesta inmune y disminuye la dosis, pero tienen la gran desventaja de no inducirla a largo plazo, misma que, según observaciones previas, genera inmunidad protectora. Las vacunas de subunidades proteicas han mostrado inmunidad protectora en modelos de ratones, cobayos y primates. Destacan vacunas que consisten de fusiones de antígenos como: Ag85B-ESAT-6, MTB39-MTB32 (MTB72F) y Ag85B-TB10.4. No obstante, para examinar su seguridad en población humana, estas vacunas están siendo evaluadas en fase clínica I (5, 20, 35, 61, 78).

### **1.7.3 Vacunas mutantes/ auxótrofas.**

El desarrollo de vacunas mutantes/auxótrofas se ha tomado como una alternativa debido a que éstas crecen en ratón lo suficiente para generar respuesta inmune y protección

pero sólo a corto plazo (81). Además de cepas mutantes de micobacterias ambientales y de *M. bovis*, principalmente se han probado cepas de *M. tuberculosis*, a las cuales se les interrumpen, por inserción, genes relacionados con virulencia. Éstas han mostrado protección en el modelo murino de tuberculosis pulmonar y algunas de ellas, al parecer, no son patógenas para ratones SCID. Sin embargo, existe la posibilidad de que reviertan la mutación y sean nuevamente virulentas. Por el riesgo que esto representa, la Organización Mundial de la Salud no ha mostrado intención de aprobarlas (22, 33).

#### **1.7.4 Vacunas recombinantes.**

Las vacunas recombinantes son otra opción han mostrado inducir una respuesta inmune protectora igual o mayor a la presentada por BCG. Estas vacunas consisten en cepas que expresan o sobre-expresan antígenos de *M. tuberculosis* o citocinas. Los principales antígenos y citocinas usados para el desarrollo de estas vacunas son: el Ag85A, Ag85B, TB10.4, PstS-1, las interleucinas 2, 4 y 6, el IFN- $\gamma$  (5, 61, 80, 94).

Para el desarrollo de estas vacunas se requiere de una cepa que servirá como vehículo para la expresión de los antígenos con los cuales son recombinadas. La cepa debe tener las siguientes características: no ser patógena para el hospedero, ser capaz de reproducirse en éste, guardar una alta homología con el agente etiológico y expresar los antígenos con los cuales se recombina (4, 20, 35, 80).

Se han empleado diferentes subcepas de BCG como vehículo para la expresión de los antígenos. Esto se debe a que BCG ofrece varias ventajas: es la vacuna más usada en el mundo, ésta puede ser aplicada poco tiempo después del nacimiento, funciona como un potente adyuvante en modelos animales y en humanos y su producción no es cara. Sin embargo tiene la desventaja de sufrir subsecuentes atenuaciones y como consecuencia, pérdida de eficacia protectora (72, 73, 77, 95).

Dentro de este tipo de vacunas destaca una BCG Tice recombinada con el antígeno 85B de *M. tuberculosis*, que demostró producir una respuesta inmune protectora superior a la conferida por BCG en ensayos realizados en cobayos, y actualmente ya se completó satisfactoriamente la fase I de ensayos clínicos en humanos (5, 55, 56, 61, 94). También Castañón-Arreola y colaboradores, demostraron que BCG Tice recombinada con el antígeno PstS-1 incrementa de forma significativa la protección al ser comparada con la subcepa Tice parental en el modelo murino de tuberculosis pulmonar progresiva; adicionalmente induce el desarrollo de una respuesta inmune Th1 caracterizada por la producción de citocinas como IL-12 e IFN- $\gamma$  (19).

Brodin y colaboradores desarrollaron una vacuna recombinante, empleando como vehículo a *Mycobacterium microti* (*M. microti*) y los antígenos ESAT-6 y CFP-10. Demostraron, además, que la pérdida de la región RD1 probablemente no es la única razón de su atenuación, ya que esta vacuna confirió inmunidad protectora al reto con *M. tuberculosis* en el modelo murino de tuberculosis pulmonar.

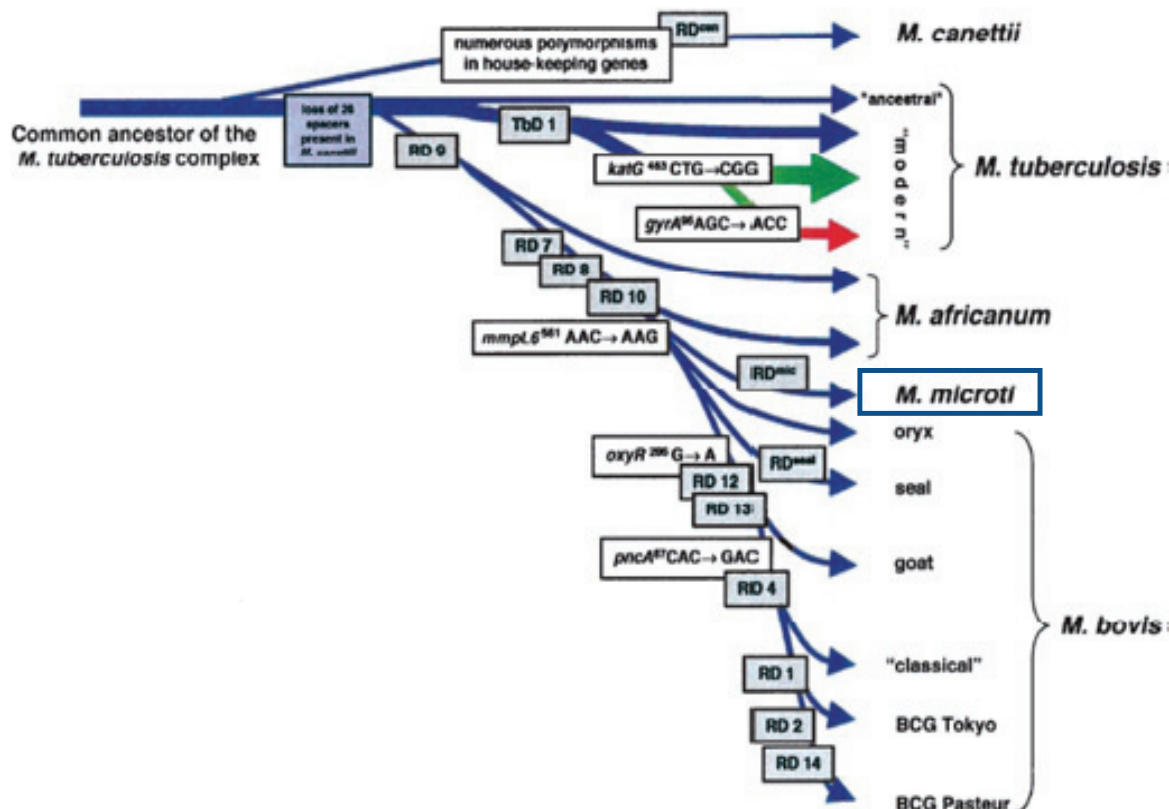
Actualmente se ha retomado a *M. microti* y se estudia la posibilidad de que este microorganismo sea un buen candidato a una nueva vacuna, ya que no es patógeno para el humano y se observó que es capaz de inducir una respuesta inmune protectora contra la tuberculosis, comparable a la conferida por BCG (67).

### 1.8 *Mycobacterium microti*.

*M. microti* fue descubierto en 1937 por Wells durante sus investigaciones sobre las especies de microorganismos que infectan al ratón de campo *Microtus agrestis*. En un principio se le clasificó como *M. tuberculosis* subespecie *muris*; sin embargo, actualmente se le conoce como *M. microti* y se le clasifica en el complejo *M. tuberculosis* ya que causa una infección pulmonar caseosa diseminada en los ratones de campo (voles) (99). Mediante la comparación de las secuencias 16S ARNr y regiones deletadas (RD) se encontró que *M.*

---

*microti* es filogenéticamente muy cercano a *M. tuberculosis* ya que tiene 99.9% de similitud en la comparación de estos genes (Figura 8) (18).



**Figura 8.** Árbol filogenético del complejo *Mycobacterium tuberculosis*, construido principalmente por análisis de regiones RD. En el esquema se observa que *M. microti* está filogenéticamente más cercano a *M. tuberculosis* que *M. bovis*.

Debido a que es una especie patógena específica de roedores de campo, en la segunda mitad del siglo XX se exploró su utilidad como vacuna. En Checoslovaquia se administró como vacuna por vía intradérmica a alrededor de 500,000 personas entre 1951 y 1969, principalmente recién nacidos y, se observó una protección de aproximadamente el 75%. En 1954 Wells reportó los resultados de un ensayo comparativo entre *M. microti* y BCG. En dicho ensayo participaron enfermeras, estudiantes de medicina y niños. Se hizo un seguimiento durante ocho años y se observó una protección de 75 a 80 %, la cual se

determinó por la hipersensibilidad de tipo tardío (DTH). Sin embargo, actualmente se sabe que este parámetro no es representativo para evaluar la eficacia protectora de una vacuna.

En otro ensayo realizado por la British Medical Research Council (entre 1950 y 1952) se comparó la eficacia protectora de *M. microti* con la vacunación con BCG. Se vacunaron aproximadamente 54 239 niños de ambos sexos, de entre 14 y 15 años de edad. Se hizo un seguimiento de los casos de tuberculosis durante los 20 años siguientes y se encontró que ambas vacunas tuvieron el 77% de protección (26). Debido a las reacciones cutáneas de aspecto lupoides que se presentaron, aunque de forma infrecuente (3-17%) en las personas vacunadas, se prefirió discontinuar la vacunación.

Hoy en día aun se considera la posibilidad de que *M. microti* sea un buen candidato vacunal (21, 74). Diversos estudios evaluaron vías de administración alternativas de *M. microti* para evitar las reacciones secundarias. En ensayos con ratones se observó que al administrar la vacuna por vía oral se lograba mayor protección en comparación con BCG administrada subcutáneamente. Asimismo, la administración intranasal demostró que *M. microti* confiere mayor protección a los ratones, comparada con la vacunación subcutánea.

En ensayos en los cuales se comparó el genoma de los miembros del complejo *M. tuberculosis* se encontró que en *M. microti* y en BCG está ausente la región RD1, la cual probablemente contribuye a la virulencia de cepas como *M. tuberculosis* y *M. bovis* (15, 46, 47, 68, 86). En un ensayo en el que se complementó a una cepa de *M. microti* con la región RD1 se observó un cambio morfológico y, al administrarla a ratones SCID se incrementó la formación de granulomas (16, 30). Las ventajas de *M. microti* sobre otros vehículos para el desarrollo de vacunas recombinantes son su atenuación natural y la posibilidad de recuperar su inmunogenicidad al infectar ratones de campo.

## 1.9 Antígeno PstS-1.

Este antígeno es una lipoproteína glicosilada de 38kDa que está codificado por el gen *pstS-1*, y es uno de los principales constituyentes de filtrado de cultivo de *M. tuberculosis* y también se encuentra en *M. bovis* BCG, aunque en muy bajas concentraciones (102). Se ha investigado su presencia en diferentes especies de micobacterias no tuberculosas como *M. avium*, *M. kansasii*, *M. scrofulaceum*, *M. fortuitum*, *M. vaccae*, *M. smegmatis*, *M. phlei*, *M. marinum*, *M. chelonae*, empleando anti-sueros. Sin embargo, los resultados indican que estas cepas no producen este antígeno a pesar de la reactividad cruzada que presentan para muchos otros antígenos de *M. tuberculosis* (59).

Se le ha denominado de diferentes maneras: Ag5 al detectarse por inmunolectroforesis, Ag78 por CIE, proteína de 38kDa por reactividad con referencia a anticuerpos monoclonales TB71 y TB72, y proteína AgB. En el *tuberculist* de su genoma ([www://genolist.pasteur.fr/TubercuList](http://www.genolist.pasteur.fr/TubercuList)) se le denomina Rv0934.

A pesar de que esta proteína se encuentra en el filtrado de cultivo del bacilo tuberculoso, no se conoce el mecanismo por que se libera al medio de cultivo. PstS-1 es sintetizada como una pre-proteína con una péptido señal que es proteolíticamente removido para generar una proteína madura de 351 residuos, después de ser exportada a la superficie de la membrana de *M. tuberculosis*. Previo al corte del péptido señal, un grupo lipoil es enzimáticamente unido al grupo tiol del primer residuo que conforma a la proteína madura, cisteína. Por medio de este grupo lipoil, la proteína se ancla a la membrana externa. Esta proteína también está glicosilada (23, 39, 98).

PstS-1 se localiza en la membrana celular de la micobacteria. Es el receptor primario de un sistema de transporte de fosfato tipo ABC y presenta 30% de identidad con la proteína PhoS de *E. coli*, la cual es responsable del transporte de fosfato en este microorganismo (23). Existe la evidencia experimental de que los genes *pst* están

organizados en un operón el cual, al parecer, está regulado por fosfato debido a que el incremento de la expresión del gen *pstS1* se da en ausencia de fosfato en el medio de cultivo (2, 38, 96).

Este antígeno es capaz de inducir la proliferación de células T CD4<sup>+</sup> y altos niveles de INF- $\gamma$  e IgG2a. Hay una elevada producción de IL-12 por los macrófagos y estimulación de CD8<sup>+</sup> citotóxicas. Su naturaleza inmunodominante y su baja concentración en la cepa vacunal lo hacen un atractivo candidato vacunal (19, 44, 58, 88, 91, 93).

### 1.10 Antígeno 85B.

Este antígeno es una proteína de 30kDa y fue descrito por primera vez en una serie de reportes por Fukui y Yoneda en 1961, como componente principal de filtrado de cultivo de *M. tuberculosis* H37Rv. En 1965 con resultados más refinados, presentaron un trabajo sobre el antígeno, que entonces lo llamaron antígeno alfa. Posteriormente, otros autores lo describieron y lo denominaron antígeno 6, MPT59/MPB59, antígeno 85B. En el *tuberculist* a su gen se le denomina Rv1886c (100).

El Ag85B forma parte de un grupo de tres proteínas conocido como complejo 85 ó 30/32kDa. Estas proteínas están codificadas por tres genes independientes: *fbpA*, *fbpB* y *fbpC*. Se secretan en una relación de 3:2:1 (30kDa/32A/32B), siendo el antígeno 85B el componente mayoritario en el filtrado de cultivo de *M. tuberculosis*. Esta proteína es producida como una pre-proteína, con una péptido señal de 40 residuos de aminoácidos, el cual permite su secreción (34, 52).

Presenta una actividad de micolil transferasa por lo que tiene un papel importante en la síntesis de la pared celular. Se ha visto que la depleción del gen que codifica para la proteína, altera la formación adecuada de la pared celular (6, 64). Dado que esta proteína se ha identificado en el filtrado de cultivo de *M. tuberculosis*, *M. bovis* BCG, *M. leprae* y *M. avium*, hace suponer que ésta forma parte de la pared celular de todas las especies de

micobacterias (28). También se ha visto que esta proteína puede unirse a fibronectina (la cual es una molécula abundante en plasma y tejidos conectivos) y de esta manera estimular la fagocitosis de *M. tuberculosis* (40, 71).

Ya ha sido comprobada la presencia de esta proteína en el fagosoma dentro de macrófagos humanos (52). Además es un candidato vacunal, pues se ha observado que la vacunación de cobayos con la proteína purificada confiere inmunidad protectora (tipo Th1), al reto con *M. tuberculosis* (57).

Este antígeno, ampliamente estudiado y probado en la preparación de vacunas de ADN, subunidades proteicas y recombinantes, ha mostrado en todos los casos conferir inmunidad protectora; sin embargo, y sólo bajo esta condición, supera la protección conferida por BCG (27, 49, 55, 60).



## 2. Justificación.

La variación en la eficacia de la vacuna BCG en el control de la tuberculosis, hace necesario desarrollar vacunas conservadas y más eficaces. Una alternativa es la recombinación de cepas filogenéticamente relacionadas a *M. tuberculosis* con sus antígenos inmunodominantes. Por lo que *M. microti*, que es una cepa naturalmente atenuada para el humano, es una opción para recombinarse con los antígenos 85B (Rv1886c) y Psts-1 (Rv0934) de *M. tuberculosis* H37Rv, para desarrollar un candidato a vacuna contra la tuberculosis.

### 3. Hipótesis.

La clonación de los genes Rv0934 y Rv1886c de *M. tuberculosis* H37Rv en *M. microti* permitirá sobre-expresar los antígenos PstS-1 y Ag85B.

#### 4. Objetivo.

Construir y caracterizar cepas recombinantes de *M. microti* con los genes Rv0934 (antígeno PstS-1) y Rv1886c (antígeno 85B) de *M. tuberculosis* H37Rv.

#### 5. Objetivos particulares.

1. Identificar y secuenciar los genes homólogos a Rv0934 y Rv1886c de *M. tuberculosis* H37Rv en *M. microti*, así como verificar su expresión.
2. Obtener cepas recombinantes de *M. microti* que sobre-expresen los genes Rv0934 y Rv1886c.

## 6. Metodología.

### 6.1 Detección de los genes Rv0934 y Rv1886c en *Mycobacterium microti*.

La detección de los genes Rv0934 y Rv1886c en *M. microti* ATCC 11 152, se hizo por PCR. Con tal propósito, se sembró una placa de medio Middlebrook 7H10 (DIFCO) con *M. microti* y se incubó por 15 días a 37° C. Al término, se inoculó con una colonia de *M. microti* un volumen de 100 mL de medio 7H9 (Becton Dickinson) suplementado con Tween 80 al 0.05% y ADC (albúmina-dextrosa-catalasa) al 10 %. La cepa se cultivo con agitación a 150 rpm y a 37° C hasta obtener una D.O.<sub>600nm</sub> de 0.6. y se cosechó por centrifugación a 10 000 rpm por 15 min a 4° C. El sobrenadante se descartó y las bacterias se resuspendieron en 10 mL de glicerol al 10%. Se hicieron alícuotas de 500 µL y se guardaron a -70° C hasta su uso.

Se extrajo el ADN genómico por el método de digestión enzimática con lisozima y proteinasa K. Se tomó una alícuota de 500 µL, se descongeló y se centrifugó a 10 000 rpm, 10 minutos. El sobrenadante se decantó y el paquete bacteriano se resuspendió en 350 µL de TE (Tris 10 mM, EDTA 0.1 mM pH 8.0), se homogeneizó, se le adicionó 0.1 volumen de Tris-HCl 1 M pH 8.0 y 0.01 volumen de lisozima (10 mg/mL) y se incubó toda la noche a 37° C. Posteriormente se adicionó 0.1 volumen de SDS al 10% y 0.01 volumen de proteinasa K (10 mg/mL), se homogeneizó e incubó a 55° C por 4 horas. Se hizo una extracción con fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1) por 30 segundos, agitando en vortex y posteriormente se centrifugó a 14 000 rpm por 15 minutos. La fase acuosa se recuperó y se le adicionó un volumen de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1). Se extrajo por 30 segundos en vortex y se centrifugó a 14 000 rpm por 15 minutos. La fase acuosa se recuperó y se precipitó el ADN adicionando 2.5 volúmenes de etanol absoluto frío toda la noche a -20° C. El ADN se recuperó por centrifugación a 14 000 rpm por 10 minutos y se lavó dos veces con 1 volumen de etanol al 70% (centrifugación a 14 000 rpm por 10 minutos). El ADN se secó, se resuspendió en 50 µL de agua, se cuantificó por espectrofotometría a 260/280 nm y se almacenó a -20° C hasta su uso.

El DNA extraído se empleó para realizar PCR con iniciadores específicos para amplificar los genes Rv0934 y Rv1886c (Rv0934: forward 5' GTGAAAATTCGTTTGCATACGCTGT 3' y reverse 5' CTAGCTGGAAATCGTCGCGATCAA3'. Rv1886c: forward 5' GGCTGAATTCATGACAGACGTGAGCCGAAA 3' y reverse 5' CGCGAAGCTTCAGCCGGCGCCTAACGAAC 3'. Las letras itálicas en Rv1886c forward indican el sitio de corte para la enzima *Eco* RI y para reverse *Hind* III). El programa que se empleó para amplificar Rv0934 fue: 1 minuto a 94° C, 1 minuto a 56° C y 1 minuto a 72° C, por 30 ciclos y para Rv1886c: 1 minuto a 94° C, 1 minuto a 55° C y 1 minuto a 72° C, por 35 ciclos. Los amplicones se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 2%.

## 6.2 Secuenciación de los genes Rv0934 y Rv1886c en *Mycobacterium microti*.

A partir del ADN extraído de *M. microti* se amplificaron los genes Rv0934 y Rv1886c por PCR, utilizando los iniciadores antes descritos. Posteriormente los amplicones se purificaron a partir de geles de agarosa y se clonaron en el vector pCR 2.1-TOPO de acuerdo al manual del proveedor (Invitrogen) para su secuenciación. Para la secuenciación se emplearon los iniciadores M13 forward y reverse. Se efectuó el análisis del electroferograma obtenido y se determinó el porcentaje de identidad entre las secuencias de los genes de *M. tuberculosis* y de *M. microti*, utilizando los programas FinchTV, DNAMAN, MEGA 3.0 y BLAST.

## 6.3 Detección de PstS-1 (Rv0934) y Ag85B (Rv1886c) en *Mycobacterium microti*.

Para la detección de los antígenos PstS-1 y Ag85B, *M. microti* se cultivó en medio Sauton (asparagina 30.3 mM, ácido cítrico 10.4 mM, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2.9 mM, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 2 mM, citrato férrico de amonio 0.4 mM, Tween 80 al 0.05%, glicerol al 1.5%) suplementado con 40 mM de glucosa y 40 mM de piruvato de sodio, a 37° C con agitación a 150 rpm. Hasta que se obtuvo una D.O.<sub>600nm</sub> de 0.6 el cultivo se cosechó por centrifugación a 5 000 rpm por 15 min a 4° C. El sobrenadante se colocó en un frasco estéril y se le adicionó el inhibidor de

---

proteasas PMSF 1 mM, EDTA 100  $\mu$ M y azida de sodio al 0.05% (concentración final). En seguida, se filtró una vez por membrana de 0.45  $\mu$ m y otra por 0.22  $\mu$ m. Posteriormente se concentró hasta un volumen de 10 mL con el sistema AMICON (Stirred Ultrafiltration Cell MILLIPORE), empleando membrana de PLBC, de punto de corte de 3 kDa. Una vez hecho esto se adicionaron nuevamente azida de sodio 0.05% y PMSF 1 mM (concentración final). El volumen se transfirió a un tubo AMICON (Ultra-15 centrifugal Filter Units) y se centrifugó a 3 500 rpm, 60 minutos a 4° C. El volumen fue concentrado 150 veces, se recuperó y se almacenó a -70 ° C hasta su uso.

El paquete bacteriano se lavó tres veces con agua desionizada estéril, en cada lavado se recuperó el paquete por centrifugación a 5 000 rpm, 15 minutos a 4° C y se resuspendió en agua desionizada estéril para obtener una suspensión bacteriana de 300 mg/mL. Posteriormente, se obtuvo un extracto proteico de *M. microti* por sonicación, aplicando 15 pulsos de 100 mV (1 minuto encendido/1 minuto apagado). Durante la sonicación se adicionó PMSF (concentración final 1 mM). Al término de la sonicación, se recuperó la suspensión y se eliminaron los bacilos no lisados y detritos de pared celular por centrifugación a 14 000 rpm por 5 min. El sobrenadante se recuperó, se colocó en un tubo nuevo y se almacenó a -70° C hasta su uso.

La concentración de proteínas se cuantificó tanto en los extractos celulares como en el sobrenadante de cultivo concentrado, por la técnica de Bradford. Se analizaron 20  $\mu$ g de proteína, tanto de los extractos celulares como de los sobrenadantes concentrados, por electroforesis en un gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) al 12%. Al término de la electroforesis el gel se tiñó con plata y se analizó.

La técnica de tinción con plata realizó como se describe a continuación. Al término del corrimiento electroforético el gel se colocó en solución de fijación (50% metanol, 50% ácido acético, 0.5 mL de formaldehído al 37% por cada litro) por lo menos 2 horas. Se hicieron 3 lavados, cada uno de 20 minutos, con solución de lavado (50% etanol, 50% agua

desionizada). Se retiró la solución de lavado, se adicionó una solución de pretratamiento (tiosulfato de sodio pentahidratado 0.2 g/L) por 1 minuto y se lavó con agua desionizada 3 veces por 20 segundos. El agua se retiró, se adicionó la solución de plata (nitrato de plata 2 g/L, 750  $\mu$ L de formaldehído al 37%/L) y se incubó por 20 minutos en obscuridad. La solución se retiró y el gel se lavó con agua desionizada estéril 2 veces por 20 segundos e inmediatamente se adicionó la solución de revelado (carbonato de sodio 60 g/L, 500  $\mu$ L de formaldehído al 37%/L, tiosulfato de sodio pentahidratado 4 mg/L) por 10 minutos. Posteriormente, el gel se lavó con agua desionizada 2 veces por 2 minutos y se colocó en solución de paro (50% metanol, 12% ácido acético) por 10 minutos. La solución se retiró y se adicionó una solución de lavado (50% metanol, 50% agua desionizada estéril) en la cual el gel se conservó hasta su secado.

Se evidenció la presencia de los antígenos PstS-1 y Ag85B por inmunoblot, con los anticuerpos TB71 y  $\alpha$ Ag85 (TBVTRM Contract, Colorado State University, EEUU), respectivamente. Para confirmar la presencia del antígeno PstS-1 se hizo la separación electroforética de 20  $\mu$ g de proteína total, tanto de los extractos celulares como de los sobrenadantes concentrados, en gel de acrilamida SDS-PAGE al 12% y para Ag85B se utilizaron 10  $\mu$ g de proteína. Posteriormente las proteínas se transfirieron en cámara de transferencia en semi-seco (Trans-Blot SD, Bio-Rad) a una membrana de nitrocelulosa (Immobilon NC 0.45  $\mu$ m, MILLIPORE), con la solución amortiguadora de Towbin (25 mM Tris, 192 mM glicina, 20% metanol, pH 8.3), por 30 minutos a 20 V, 0.3 A. Una vez hecha la transferencia, la membrana se colocó en solución de bloqueo (5.0% leche descremada en TBS-Tween 20: NaOH 136 mM, KCl 2 mM, Tris base 25 mM, Tween 20 0.05%), por dos horas a temperatura ambiente con agitación. En seguida, se incubó con el anticuerpo primario diluido ( $\alpha$ Ag85 1:1000, TB71 1:100) en solución de bloqueo (1:10), toda la noche a 4° C, con agitación. Se hicieron tres lavados de 10 minutos cada uno, con solución de TBS-Tween. Se incubó con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano, diluido (para PstS-1, cabra anti-ratón IgG de Jackson 1:1000 y para Ag85B, cabra anti-conejo IgG de ZYMED: 1:5000) en solución de bloqueo (1:10), por dos horas a temperatura

---

ambiente, con agitación. Se hicieron tres lavados de 10 minutos cada uno, con solución de TBS-Tween. Finalmente se reveló por quimioluminiscencia y se realizó un análisis densitométrico de las bandas observadas con el programa Quantity One (BioRad).

#### **6.4 Clonación de los genes Rv0934 y Rv1886c de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv en el plásmido pMV261.**

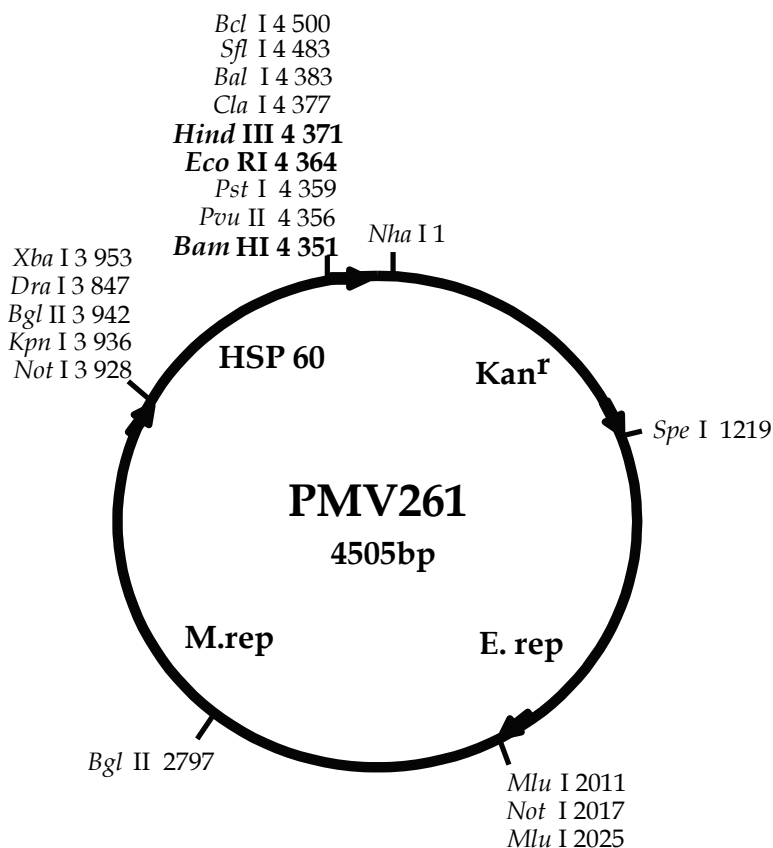
Para la clonación de los genes Rv0934 y Rv1886c, individualmente, en el plásmido pMV261 (Figura 9), se extrajo el DNA genómico de *M. tuberculosis* H37Rv (inactivadas por radiación gamma) por el método digestión enzimático con lisozima y proteinasa K anteriormente descrito.

El DNA extraído se usó para amplificar los genes por PCR, con iniciadores específicos para cada uno (Rv0934: forward 5' ATAGTACGAGGATCCTGAAAATTCGTT TGC 3' y reverse 5' ATAGTACGAGAATTCCTAGCTGGAAATCGT 3'. Rv1886c: forward 5' GGCTGAATTCATGACAGACGTGAGCCGAAA 3' y reverse 5' CGCGAAGCTTTCAG CCGGCGCCTAACGAAC 3'). Los iniciadores fueron diseñados a partir de las secuencias reportadas en el GeneBank para *M. tuberculosis* H37Rv (números de acceso: BX842575 y BX842578, respectivamente). Las letras itálicas en Rv0934 indican el sitio de corte para *Bam* HI y para reverse *Eco* RI. En Rv1886c forward es *Eco* RI y reverse *Hind* III. El programa que se empleó para amplificar Rv0934 fue: 1 minuto a 94° C, 1 minuto a 56° C y 1 minuto a 72° C, por 30 ciclos y para Rv1886c: 1 minuto a 94° C, 1 minuto a 55° C y 1 minuto a 72° C, por 35 ciclos.

Los amplicones se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 2%. Una vez que se confirmó la correcta amplificación de los genes Rv0934 y Rv1886c, se realizó una nueva amplificación para obtener los genes en mayor concentración y se purificaron a partir de gel de agarosa al 1% en TBE 0.5X a 100 V, 1.5 h y teñido con bromuro de etidio, con el kit



Wizard de PROMEGA, con las indicaciones del proveedor. Una vez purificados, se cuantificaron por espectrofotometría UV a 260nm/280nm.



**Figura 9.** Mapa del plásmido de expresión pMV261. El plásmido tiene sitios de replicación para *E. coli* y para micobacterias, sitios de clonación múltiple, un casete de resistencia a kanamicina.

El gen Rv0934 se digirió con las enzimas *Bam* HI y *Eco* RI y el gen Rv1886c con *Hind* III y *Eco* RI. El plásmido pMV261 se digirió por un lado con las enzimas *Bam* HI/*Eco* RI y por otro con *Hind* III /*Eco* RI. Los productos de la digestión se precipitaron con etanol absoluto y se procedió a ligar Rv0934 y Rv1886c con pMV261 por separado, en relación 1:3 (vector: inserto). La ligación se llevó a cabo con T4 DNA ligasa (GIBCO BRL) toda la noche a 24° C. Con el producto de la ligación se transformó la cepa de *E. coli* GM 2199 (*dam*-) por

choque térmico a 42° C. Para lo cual se prepararon células competentes como se describe a continuación.

Para preparar las células competentes de *E. coli* GM 2199 (*dam*-) la cepa se sembró en medio agar luria (0.5% extracto de levadura, 1.0% bacto-triptona, 1% NaCl, 1.5% agar. pH 7.0) y se incubó a 37° C de 12 a 15 horas, seleccionó una colonia y con ésta se inocularon 5 mL de caldo luria (0.5% extracto de levadura, 1.0% bacto-triptona, 1% NaCl, pH 7.0) y se incubó a 37° C por 2 h a 300 rpm. Con el cultivo se inocularon 100 mL de caldo luria y éste se incubó a 37° C con agitación a 300 rpm hasta que se obtuvo una DO<sub>600nm</sub> de 0.5. Una vez que se alcanzó la DO, el cultivo se cosechó por centrifugación a 2,500 rpm por 5 minutos a 4° C. El sobrenadante se eliminó y el paquete celular se resuspendió solución amortiguadora I (KOAc 30 mM, MnCl<sub>2</sub> 78.5 mM, KCl 100 mM, CaCl<sub>2</sub> 13.5 mM, glicerol al 12%, pH 5.8). La suspensión bacteriana se incubó en hielo por 30 min y se centrifugó a 2,000 rpm por 5 minutos a 4° C. El sobrenadante se descartó y el paquete bacteriano se resuspendió en solución amortiguadora II (MOPS 100 mM, CaCl<sub>2</sub> 100 mM, KCl 10 mM, glicerol al 12%). La suspensión bacteriana se distribuyó en volúmenes de 100 µL e inmediatamente se congelaron en nitrógeno líquido. Las bacterias competentes se almacenaron a -70° C, hasta su uso.

En la transformación por choque térmico se emplearon 100 µL de células competentes y 10 µL (1 µg de ADN) del producto de la ligación. Posteriormente se llevó a un volumen final de 1 mL con medio SOC (2% triptona, 0,5% extracto de levadura, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 20 mM glucosa) y se incubó a 37° C con agitación a 300 rpm. Finalmente se plaquearon 100 µL de las células en medio agar luria con kanamicina a una concentración 50 µg/mL.

De las colonias obtenidas se seleccionaron algunas, las cuales se sembraron en caldo luria con kanamicina a una concentración 50 µg/mL y se incubaron con agitación de 150

rpm a 37° C por 24 horas. Las muestras sembradas se cosecharon por centrifugación a 10 000 rpm, 5 minutos y se procedió a extraer el ADN plasmídico por lisis alcalina, como se describe a continuación. El paquete de bacterias se resuspendió en 100 µL de TE (Tris 10 mM, EDTA 0.1 mM pH 8.0) y se adicionaron 200 µL de solución de lisis recién preparada (NaOH 0.2N, SDS 1%), se mezcló por inversión y se adicionaron 150 µL de acetato de potasio (3M pH 4.8), se mezcló por inversión y se centrifugó a 14 000 rpm por 10 minutos. Los sobrenadantes se recuperaron y colocaron en tubos nuevos, se les adicionó 2.5 volúmenes de etanol absoluto y se dejó precipitar por 10 minutos en hielo. Posteriormente se centrifugó a 14 000 rpm por 10 minutos, el sobrenadante se desechó y el ADN se lavó dos veces con etanol al 70%, se secó y resuspendió en 50 µL de agua para PCR.

El ADN obtenido se analizó por electroforesis en agarosa al 1%, en TBE 0.5X, a 100V, 1 h y se tiñó con bromuro de etidio. De las muestras analizadas para Rv0934 y Rv1886c se seleccionaron las que presentaban un tamaño mayor al plásmido sin inserto, para someter a PCR y amplificar los genes Rv0934 y Rv1886c.

Para identificar los plásmidos clonados con el gen Rv1886c y con el gen Rv0934, se generaron sondas a las cuales se les denominó Sr30 (contra Rv1886c) y Sr38 (contra Rv0934). Las sondas se obtuvieron por amplificación por PCR de los genes Rv1886c y Rv0934, utilizando dNTP's marcados con digoxigenina.

Las sondas se titularon, para lo cual el producto de PCR se purificó por precipitación con cloruro de litio y a partir de éste se hicieron diluciones seriadas (1:10), las cuales se utilizaron para sensibilizar una membrana de nylon. En la misma membrana se colocaron diluciones 1:10 seriadas de un estándar de concentración conocida (5 ng/µL). Las sondas y los estándares se fijaron con luz UV a la membrana con el cross-linker UVP. La membrana se incubó con el anticuerpo anti-digoxigenina marcado con fosfatasa alcalina (dilución 1:5,000) y se reveló con nitro azul de tetrazolio (NBT) y 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato (X-

fosfato), para determinar la dilución en la cual se utilizó la sonda y establecer las condiciones de astringencia para la mejor sensibilidad y especificidad. Por comparación se obtuvo el título de la sonda, como se presenta a continuación:

Sonda	→	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>
Estándar	→	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>

A partir de la marca de la sonda cuya intensidad coincidió con la del estándar, de concentración conocida, se multiplicó ésta por el inverso de la dilución de la mancha de la sonda y así se determinó su título.

Para identificar las clonas transformadas por hibridación, se prepararon membranas con el DNA extraído de las clonas seleccionadas. Como control positivo se emplearon los genes Rv1886c y Rv0934 y como control negativo el plásmido pMV261 sin clonar.

El ADN de las muestras seleccionadas se desnaturalizó por calentamiento a 96° C por 10 min e inmediatamente se colocaron en hielo por 5 min. Posteriormente, se colocó una alícuota del ADN en la membrana y se fijó a ésta con luz UV (crosslinker UVP). La membrana se pre-hibridó por 1 h a 42° C con solución de prehibridación (SSC 2x, reactivo de bloqueo 10x, sarcosinato, SDS 10%, reactivo de Denharts 50x) y posteriormente, se hibridó toda la noche a 42° C con una solución de sonda/solución de prehibridación. Para eliminar la hibridación inespecífica del ADN, al día siguiente se lavó la membrana con solución SSC 2x-SDS 0.1% y se incubó en esta solución durante 60 min a 65° C. El revelado se realizó como en la titulación de la sonda.

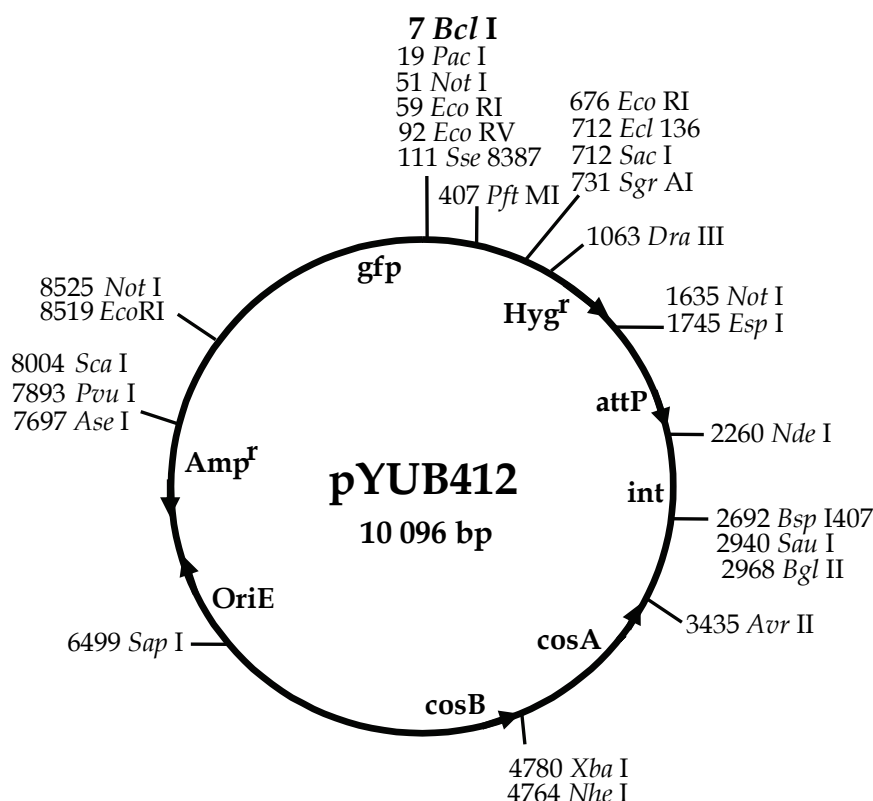
Para pMV261-Rv0934 y pMV261-Rv1886c se seleccionó una muestra para continuar con el trabajo. Cada una, por separado, se cultivó en 500 mL de medio YT2X con kanamicina a una concentración de 50 µg/mL, para extraer las construcciones a gran escala

---

por el método de lisis alcalina. Se cuantificaron por espectrofotometría UV a 260nm/280nm y se utilizaron para la transformación de células electrocompetentes de *M. microti*.

### 6.5 Clonación de los genes Rv0934 y Rv1886c de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv en el plásmido pYUB412.

La clonación de los genes Rv0934 y Rv1886c en el plásmido integrativo pYUB412 (Figura 10), se realizó a partir de las construcciones pMV261-Rv0934 y pMV261-Rv1886c.



**Figura 10.** Mapa del plásmido integrativo pYUB412. El plásmido tiene un sitio de replicación para *E. coli*, sitios de clonación múltiple, dos casetes de resistencia, uno a ampicilina (para selección en *E. coli*) y otro a higromicina (para selección en micobacterias), sitios *cos*, además attP y una región que codifica para una integrasa.

De cada uno de los tres plásmidos, 15 µg de ADN fueron digeridos con la enzima *Bcl* I a 50° C toda la noche. Por electroforesis en gel de agarosa al 0.8% se verificó la completa digestión de los plásmidos y entonces sólo pMV261-Rv0934 y pMV261-Rv1886c se digirieron con *Bgl* II a 37° C por dos horas. Nuevamente por electroforesis en agarosa al 0.8% se confirmó la completa digestión de los plásmidos, en el cual se debía detectar una banda de 1683 pb correspondiente a HSP60-Rv0934 y una banda de 1536 pb correspondiente a HSP60-Rv1886c.

Una vez que se comprobó la adecuada y completa digestión de los plásmidos, se purificaron los fragmentos de interés por electroforesis en gel de agarosa de bajo punto de fusión (LMP al 0.6%), como se describe a continuación.

Después de la electroforesis el gel se tiñó con bromuro de etidio y se cortaron las bandas que se deseaban purificar. Cada una se colocó en un tubo eppendorf y se fundió a una temperatura de 65 - 70° C, 10 minutos. Se adicionó 0.1 volumen de NaCl 5 M. Se mezcló bien y se dejó otros 5 minutos en el baño y después se colocó otros 5 minutos a 37° C. A la agarosa se le añadió 2/3 de volumen de fenol saturado con NaCl a 37° C e inmediatamente se agitó en vórtex por 30 segundos y se centrifugó 5 minutos en una microfuga, la fase acuosa se pasó a un tubo nuevo. Se añadió al tubo con fenol, 90 µL de TE y 100 µL de NaCl 5 M, se agitó en vórtex y centrifugó 2 minutos. La fase acuosa se mezcló con la anterior y se le añadió 1 volumen de fenol/cloroformo, se agitó 15 segundos en vórtex y se centrifugó 2 minutos. La fase acuosa se colocó en un tubo nuevo y se extrajo con 1 volumen de cloroformo. La fase acuosa se colocó en un tubo nuevo, se adicionó 1 µL de glucógeno (20 mg/mL) y se precipitó con 1 volumen de isopropanol por al menos 2 horas a -20° C. Posteriormente se centrifugó a 14 000 rpm por 10 minutos, se retiró el isopropanol, se secó el ADN y se resuspendió en un volumen adecuado de TE.

Por otro lado, el plásmido pYUB412 una vez que se digirió con *Bcl* I se trató con fosfatasa alcalina por 1 hora a 37° C y se extrajo con 1 volumen de fenol/cloroformo, la fase

---

acuosa se colocó en un tubo nuevo y se extrajo con 1 volumen de cloroformo. La fase acuosa se colocó en un tubo nuevo, se adicionó 1  $\mu$ L de glucógeno (20 mg/mL) y se precipitó con acetato de sodio 3 M pH 6 y 2.5 volúmenes de etanol absoluto por al menos 2 horas a - 20° C. Posteriormente se centrifugó a 14 000 rpm por 10 minutos, se retiró el etanol, se hizo un lavado con etanol al 70%, se secó el ADN y se resuspendió en un volumen adecuado de TE. Los fragmentos se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 0.8 %

Los fragmentos HSP60-Rv0934 y HSP60-Rv1886c se ligaron por separado con el plásmido pYUB412 linearizado y desfosforilado, en relación 1:10 (vector: inserto). La ligación se llevó a cabo con T4 DNA ligasa (GIBCO BRL) toda la noche a temperatura ambiente. Posteriormente, se adicionó 1  $\mu$ L de glucógeno (20 mg/mL) y se precipitó con acetato de sodio 3 M pH 6 y 2.5 volúmenes de etanol absoluto por al menos 2 horas a - 20° C. A continuación, se centrifugó a 14 000 rpm por 10 minutos, se retiró el etanol, se hizo un lavado con etanol al 70%, se secó el ADN y se resuspendió en un volumen adecuado de agua para PCR.

Con el producto de cada ligación se transformó la cepa de *E. coli* DH5 $\alpha$  por electroporación. Para lo cual la cepa se sembró en 3 mL de medio SOB (2% bacto-triptona, 0.5% extracto de levadura, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, suplementado con 2.5 mL de MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O 2 M y 2.5 mL de MgSO<sub>2</sub> · 7H<sub>2</sub>O 2M) se incubó a 37° C toda la noche a 300 rpm. Del cultivo se tomaron 250  $\mu$ L y vertieron en 25 mL de medio SOB y se incubó a 37° C a 300 rpm hasta que se obtuvo una DO<sub>600nm</sub> de 0.6, entonces el cultivo se cosechó por centrifugación a 6 000 rpm, 10 minutos a 4° C. El sobrenadante se eliminó y se hicieron tres lavados, cada uno con 25 mL de glicerol al 10% frío, después de cada lavado las bacterias se recuperaron por centrifugación a 6 000 rpm, 10 minutos a 4° C. Las bacterias se resuspendieron en 100  $\mu$ L de glicerol al 10% frío. Se tomaron 50  $\mu$ L de suspensión bacteriana y se mezclaron con 2.5  $\mu$ L (400 - 600 ng) del producto de cada ligación y se incubaron en hielo de 1 a 2 minutos. La mezcla ADN-bacterias se transfirió a una celda para

electroporar de 0.2 cm y se dio un pulso a 1.8 kv. Se incubó en hielo por 1 minuto más, se adicionó 1 mL de medio SOB y se incubó a 37° C a 300 rpm, por 1 hora. Las bacterias se recuperaron por centrifugación a 6 000 rpm, 5 minutos y el sobrenadante se descartó. Las bacterias se resuspendieron en 300 µL de medio SOB y se hicieron diluciones 10<sup>-1</sup> y 10<sup>-2</sup>. De cada dilución se plaquearon 100 µL por duplicado en agar luria con ampicilina (100 µg/mL).

De las clonas obtenidas se seleccionaron algunas de cada transformación, se resembraron en agar luria con ampicilina (100 µg/mL) y se incubaron a 37° C toda la noche. Con estas clonas se realizó lisis en gel de agarosa, para seleccionar las posibles positivas, como se describe a continuación.

Se colocó una asada de cada una de las colonias seleccionadas en 20 µL de solución de lisis (EDTA 25 mM, Tris 25 mM pH 8.0, sacarosa 2.5 g por cada 10 mL), posteriormente, se adicionó a cada tubo 20 µL de solución de lisis suplementada con lisozima (0.1 mg/mL) y RNasa (5 µL/mL) y se mezcló bien. En un gel de agarosa al 0.8 % y SDS al 0.5 %, se colocaron 15 µL de muestra en cada pozo, 10 µL de colorante (Tris 25 mM pH 8.0, sacarosa 2.5g por cada 10 mL, SDS 1g para 10 mL, azul de bromofenol 0.007g) y se incubó por 5 minutos. Cuidadosamente se agregó TBE 1 X, se aplicó una corriente de 40 V por 30 minutos y posteriormente 80 V hasta que el colorante salió del gel. El gel se tiñó con bromuro de etidio por 15 minutos y se analizó.

Las muestras que presentaban un patrón de corrimiento menor en comparación con el correspondiente al plásmido sin clonar se seleccionaron y se sembraron en caldo luria con ampicilina (100 µg/mL). De las clonas resembradas se extrajo el ADN por lisis alcalina para analizar por PCR y restricción, y de esta manera identificar a las positivas.

El DNA obtenido se sometió a digestión con la enzima *Eco* RI y se analizó por electroforesis en agarosa al 1%, en TBE 1 X, a 100 V, 1 h y se tiñó con bromuro de etidio. Las



muestras que presentaron el patrón esperado se sometieron a PCR para amplificar el gen Rv0934. Los amplicones se analizaron por electroforesis en agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio. De las clonas en las que se observó la amplificación del gen, se seleccionó una para realizar la recombinación de *M. microti*.

## 6.6 Transformación de *Mycobacterium microti*.

Para la recombinación, se prepararon células electrocompetentes de *M. microti*, como se describe a continuación. La cepa *M. microti* ATCC 11152 se cultivó en 5 mL medio Middlebrook 7H9 suplementado con Tween 80 y ADC al 10%, por 10 días, a 37° C y 150 rpm. Este cultivo se utilizó para inocular 10 mL de medio Middlebrook 7H9 y se cultivó por 10 días más en las condiciones en las que se cultivó anteriormente. Con este cultivo se inocularon 250 mL de medio Middlebrook 7H9 y se continuó la incubación hasta obtener una D.O.<sub>600</sub> de 0.5-1.0. Un día antes de la cosecha se adicionó glicina (200 mM concentración final). El cultivo se cosechó por centrifugación a 6 000 rpm por 20 min a 4° C. El paquete celular se lavó dos veces con 50 mL de agua desionizada estéril y una vez con glicerol al 10% estéril a temperatura ambiente. Las bacterias se resuspendieron en 2.5 mL de glicerol al 10%.

La transformación de *M. microti* con los plásmidos extracromosomales (pMV261, pMV261-Rv0934 y pMV261-Rv1886c) se realizó por electroporación, colocando en un tubo eppendorf de 1 a 5 µL (1 µg) de ADN plasmídico y 250 µL de células competentes recién preparadas. La mezcla se incubó en hielo por 10 minutos y posteriormente se colocó en una celda para electroporar de 0.2 cm y se aplicó un pulso eléctrico de 2.5 kV. En seguida se colocó la celda en hielo por 5 minutos más y entonces la suspensión se transfirió a un tubo falcon de 15 mL y se le adicionó 5 mL de medio Middlebrook 7H9 (DIFCO) suplementado con ADC y se incubó toda la noche a 37° C a 150 rpm. Las células se cosecharon por centrifugación a 3500 rpm por 10 minutos, se resuspendieron en 300 µL de medio 7H9 y se hicieron diluciones de 10<sup>-1</sup> y 10<sup>-2</sup>, se plaqueó en medio 7H10 con kanamicina (30 µg/mL),

dos cajas de  $10^0$ , dos de  $10^{-1}$  y dos de  $10^{-2}$ , cada una con 100  $\mu\text{L}$ , y se incubaron a  $37^\circ\text{C}$  hasta observar colonias (3 a 4 semanas).

La transformación de *M. microti* con los plásmidos integrativos (pYUB412, pYUB412-Rv0934 y pYUB412-Rv1886c), se realizó como se indicó para los plásmidos extracromosomales, pero se probaron 5 diferentes condiciones para el ADN que se empleó para realizar la transformación: (1) 2  $\mu\text{g}$  de ADN, (2) 10  $\mu\text{g}$  de ADN, (3) 2  $\mu\text{g}$  de ADN linearizado, (4) 2  $\mu\text{g}$  de ADN tratado previamente con luz UV y (5) 10  $\mu\text{g}$  de ADN tratado previamente con luz UV. El tiempo de recuperación fue de 24 horas a  $37^\circ\text{C}$  y 150 rpm en todos los casos. Las bacterias se plaquearon en medio 7H10 (DIFCO) con higromicina (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y se incubaron a  $37^\circ\text{C}$  hasta observar colonias (3 a 4 semanas).

Una vez que se obtuvo crecimiento, de cada transformación se seleccionaron algunas colonias y se resembraron en medio 7H9 con higromicina (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ó kanamicina (30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y se incubaron a  $37^\circ\text{C}$ , 150 rpm de 10 a 15 días. Posteriormente, cada muestra se resembró tanto en medio 7H9 como en Sauton y con el cultivo restante se procedió a la identificación de las colonias positivas.

La identificación de las colonias transformadas con los plásmidos extracromosomales pMV261, pMV261-Rv0934 y pMV261-Rv1886c, se realizó por electroducción. Para lo cual se cosecharon 500  $\mu\text{L}$  de cultivo por centrifugación a 14000 rpm, 10 minutos. Las bacterias se lavaron una vez con agua desionizada estéril y otra con glicerol al 10% estéril y se resuspendieron en 20  $\mu\text{L}$  de glicerol al 10%, se adicionó a cada muestra 50  $\mu\text{L}$  de células electrocompetentes de *E. coli* DH5 $\alpha$ , se incubó en hielo por 10 minutos. La mezcla se colocó en una celda para electroporar de 0.2 cm y se dio un pulso eléctrico a 2.5 kV y se incubó por 5 minutos más en hielo. Se adicionó 1 mL de medio SOB y se incubó a  $37^\circ\text{C}$  y 150 rpm por 1 hora. Las bacterias se recuperaron por centrifugación a 6000 rpm, 5 minutos, se resuspendieron en 100  $\mu\text{L}$ , se plaquearon en agar luria con kanamicina (30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y se incubó a  $37^\circ\text{C}$  toda la noche. De las clonas obtenidas por

---

electroducción se seleccionaron algunas y se sembraron en caldo luria con kanamicina, se extrajo el ADN por lisis alcalina y se realizó PCR para amplificar los genes Rv0934 y Rv1886c. Los amplicones se analizaron por electroforesis en agarosa al 2% para identificar las colonias positivas.

La identificación de las colonias transformadas con los plásmidos integrativos pYUB412, pYUB412-Rv0934 y pYUB412-Rv1886c se realizó por PCR e hibridación. Para lo cual se tomaron 2mL de cultivo de las colonias sembradas y se extrajo el ADN por el método de lisozima y proteinasa K anteriormente descrito. El ADN se analizó por electroforesis en gel de agarosa al 1%, se cuantificó por espectrofotometría UV 260nm/280nm y se almacenó a -20° C hasta su análisis.

Para la identificación de las clonas positivas, se amplificó el gen *gfp* (gen que codifica para la proteína verde fluorescente) presente sólo en el plásmido y no así en el ADN de la mycobacteria. Antes de someter a PCR el ADN extraído de las clonas de *M. microti*, se estandarizaron las condiciones para su corrimiento, empleando diferentes concentraciones de ADN del plásmido pYUB412 para conocer el nivel de detección por PCR y por lo tanto la cantidad necesaria de ADN de la muestra. Una vez establecido, se realizó la amplificación con iniciadores específicos para el gen *gfp* (forward 5' ATGAGTAAAGGAGAAGAAGACT 3' y reverse 5' TATTTGTATAGTTCATCCAT 3'). El ciclo que se empleó fue: 1 minuto a 94° C, 1 minuto a 50° C y 1 minuto a 72° C, por 30 ciclos. Los amplicones se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 2%.

Para identificar por hibridación las colonias transformadas, se prepararon membranas con el ADN de las muestras previamente extraído; como control positivo se empleó el plásmido pYUB412 y como control negativo el plásmido pMV261 sin clonar. La obtención de la sonda y el procedimiento seguido para la hibridación fue el mismo que se describió anteriormente en el punto 6.4.

### 6.7 Identificación de los antígenos PstS-1 y 85B en *Mycobacterium microti* recombinante.

Para identificar los antígenos 85B y PstS-1, se obtuvieron las proteínas tanto de filtrado de cultivo como de extracto celular de *M. microti* recombinada y sin recombinar (control), las proteínas primero se analizaron por electroforesis en gel de acrilamida al 12% (SDS-PAGE) y posteriormente por inmunoblot, como se describió anteriormente en el punto 6.3 de la metodología, pero con la siguiente modificación. Previo a la separación electroforética, las proteínas del filtrado de cultivo de *M. microti*, *M. microti*(pMV261) y transformada con los plásmidos pMV261-Rv0934 y pMV261-Rv1886c se precipitaron adicionando ácido tricloroacético a una concentración final de 4% y se dejó incubando por dos horas en hielo. Posteriormente, se centrifugó a 14000 rpm, 10 minutos a 4° C. Se hicieron dos lavados con tres volúmenes de acetona al 80% fría, las proteínas se recuperaron por centrifugación a 14 000 rpm, 10 minutos a 4° C. Se dejó secar 5 minutos con el tubo abierto boca abajo sobre papel absorbente. Se adicionó un volumen de amortiguador Laemmli, carbonato de potasio a una concentración final de 5 mM, se mezcló y se esperó 5 minutos a que se disolvieran las proteínas, se calentó 5 minutos y se cargó en el gel.

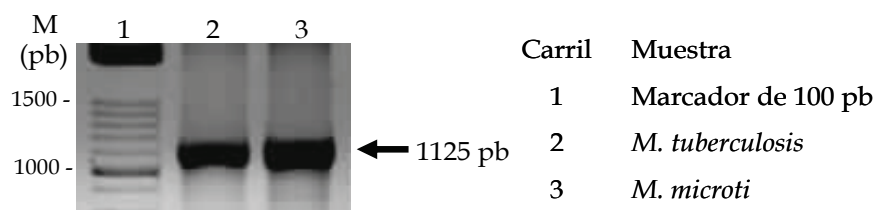
La cuantificación de ambos antígenos se realizó por el ensayo de inhibición por competencia por ELISA, como se describe a continuación. Se sensibilizó una microplaca de 96 pozos con 100 ng del antígeno puro PstS-1 y otra con 100 ng con Ag85 (TBVTRM Contract, Colorado State University, EEUU) en amortiguador de bicarbonatos ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1.5 mM,  $\text{NaHCO}_3$  3.5 mM, pH 9.6), a 4° C toda la noche. Posteriormente se eliminó el antígeno libre con lavados con PBS-Tween 20 ( $\text{NaCl}$  137 mM,  $\text{KCl}$  2.7 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  8 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.5 mM, Tween 20 0.05%, pH 7.4). Los espacios libres en la microplaca se bloquearon BSA al 1% disuelta en PBS ( $\text{NaCl}$  137 mM,  $\text{KCl}$  2.7 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  8 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.5 mM, pH 7.4) por 1 hora a 37° C. En seguida se adicionó el antígeno libre (muestras) a una concentración de 500 ng y diluciones 1:5 del anticuerpo primario TB71 ó 1:2 de  $\alpha\text{Ag85}$  (TBVTRM Contract, Colorado State University, EEUU) diluidos 1:100 y 1:1250, respectivamente. Al término, se

eliminó el exceso de los antígenos y anticuerpos primarios lavando con PBS-Tween y se adicionó 100  $\mu$ L de anticuerpo secundario a cada uno de los pozos, para PstS-1 dilución 1:1000 (cabra anti-ratón IgG de Jackson) y para Ag85B dilución 1:5000 (cabra anti-conejo IgG de ZYMED), y se incubó una hora a 37° C. El sustrato orto-fenilendiamina se adicionó [5.4 mg de OPD (Sigma) disuelto en 10 mL de solución amortiguadora de citratos (ácido cítrico 3.8 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 10 mM)] y al término de 20 min se agregó 50  $\mu$ L de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1N por pozo. A continuación se realizó la lectura de la absorbancia a 492 nm.

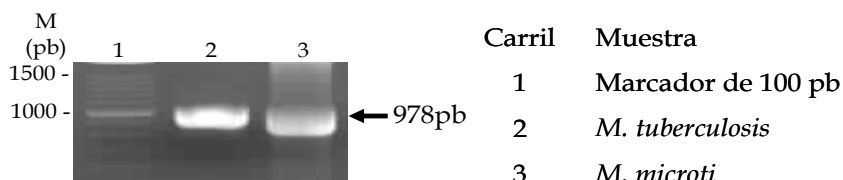
## 7. Resultados.

### 7.1 Detección de los genes Rv0934 y Rv1886c en *Mycobacterium microti*.

De acuerdo al análisis de las secuencias de los iniciadores diseñados se determinó una temperatura de alineamiento para amplificar el gen Rv0934 de 56° C y para Rv1886c de 55° C. Se observó un producto de PCR para Rv0934 de 1,125 pb, correspondiente al peso molecular reportado previamente (Figura 11) y otro de 978 pb correspondiente a Rv1886c (Figura 12). Los resultados confirman la presencia de genes homólogos a Rv0934 y Rv1886c en *M. microti*.



**Figura 11.** Producto de PCR del gen Rv0934. La flecha indica la posición de la banda esperada y su tamaño.



**Figura 12.** Producto de PCR del gen Rv1886c. La flecha indica la posición de la banda esperada y su tamaño.

### 7.2 Secuenciación de los genes Rv0934 y Rv1886c en *Mycobacterium microti*.

Una vez obtenidos los electroferogramas, se analizaron y se determinaron las secuencias de ambos genes y el porcentaje de identidad entre los genes de *M. microti* y de *M. tuberculosis*.

Para Rv0934 (Figura 13) en el análisis por BLAST, se encontró una identidad del 99.9% entre *M. tuberculosis* y *M. microti*, ya que hay un cambio de base en la posición 1055 de T por C, que se traduce en un cambio de aminoácido, alanina por valina.

<i>M.microti</i>	GTGAAAATTCGTTTGCATACGCTGTTGGCCGTGTTGACCGCTGCGCCGCTGCTGCTAGCA	60
<i>M. tuberculosis</i>		8387
<i>M.microti</i>	GCGGCGGGCTGTGGCTCGAAACCACCGAGCGGTTGCGCTGAAACGGGCGCCGGCGCCGGT	120
<i>M. tuberculosis</i>		8447
<i>M.microti</i>	ACTGTGCGGACTACCCCGCGTCGTCGCCGGTGACGTTGGCGGAGACCGGTAGCACGCTG	180
<i>M. tuberculosis</i>		8507
<i>M.microti</i>	CTCTACCCGCTGTTCAACCTGTGGGGTCCGGCCTTTCACGAGAGGTATCCGAACGTCACG	240
<i>M. tuberculosis</i>		8567
<i>M.microti</i>	ATCACCGCTCAGGGCACCAGTTCTGGTGCCGGGATCGCGCAGGCCCGCCCGGGACGGTC	300
<i>M. tuberculosis</i>		8627
<i>M.microti</i>	AACATTGGGGCTCCGACGCCTATCTGTGCGAAGGTGATATGGCCGCGCACAAGGGGCTG	360
<i>M. tuberculosis</i>		8687
<i>M.microti</i>	ATGAACATCGCGCTAGCCATCTCCGCTCAGCAGGTCAACTACAACCTGCCCGGAGTGAGC	420
<i>M. tuberculosis</i>		8747
<i>M.microti</i>	GAGCACCTCAAGCTGAACGGAAAAGTCTGGCGGCCATGTACCAGGGCACCATCAAAACC	480
<i>M. tuberculosis</i>		8807
<i>M.microti</i>	TGGGACGACCCGAGATCGCTGCGCTCAACCCGGCGTGAACCTGCCCGGCACCGCGGTA	540
<i>M. tuberculosis</i>		8867
<i>M.microti</i>	GTTCCGCTGCACCGCTCCGACGGGTCCGGTGACACCTTCTTGTTCACCCAGTACCTGTCC	600
<i>M. tuberculosis</i>		8927
<i>M.microti</i>	AAGCAAGATCCCAGGGCTGGGGCAAGTCGCCCGGCTTCGGCACCACCGTCGACTTCCC	660
<i>M. tuberculosis</i>		8987
<i>M.microti</i>	GCGGTGCCGGGTGCGCTGGGTGAGAACGGCAACGGCGGCATGGTGACCGGTTGCGCCGAG	720
<i>M. tuberculosis</i>		9047
<i>M.microti</i>	ACACCGGGCTGCGTGGCCTATATCGGCATCAGCTTCTCTCGACCAGGCCAGTCAACGGGGA	780
<i>M. tuberculosis</i>		9107

<i>M. microti</i>	CTCGGCGAGGCCCAACTAGGCAATAGCTCTGGCAATTTCTTGTGCCCCGACGCGCAAAGC	840
<i>M. tuberculosis</i>	CTCGGCGAGGCCCAACTAGGCAATAGCTCTGGCAATTTCTTGTGCCCCGACGCGCAAAGC	9167
<i>M. microti</i>	ATTCAGGCCGCGCGGCTGGCTTCGCATCGAAAACCCCGGCGAACCAGGCGATTTTCGATG	900
<i>M. tuberculosis</i>	ATTCAGGCCGCGCGGCTGGCTTCGCATCGAAAACCCCGGCGAACCAGGCGATTTTCGATG	9227
<i>M. microti</i>	ATCGACGGGCCCGCCCCGGACGGCTACCCGATCATCAACTACGAGTACGCCATCGTCAAC	960
<i>M. tuberculosis</i>	ATCGACGGGCCCGCCCCGGACGGCTACCCGATCATCAACTACGAGTACGCCATCGTCAAC	9287
<i>M. microti</i>	AACCGGCAAAGGACGCGCCACCGCGCAGACCTTGCAGGCATTTCTGCACTGGGCGATC	1020
<i>M. tuberculosis</i>	AACCGGCAAAGGACGCGCCACCGCGCAGACCTTGCAGGCATTTCTGCACTGGGCGATC	9347
<i>M. microti</i>	ACCGACGGCAACAAGGCCTCGTTCCTCGACCAGG <b>C</b> TCATTTCCAGCCGCTGCCGCCCGCG	1080
<i>M. tuberculosis</i>	ACCGACGGCAACAAGGCCTCGTTCCTCGACCAGG <b>T</b> TCATTTCCAGCCGCTGCCGCCCGCG	9407
<i>M. microti</i>	GTGGTGAAGTTGTCTGACGCGTTGATCGCGACGATTTCCAGCTAG	1125
<i>M. tuberculosis</i>	GTGGTGAAGTTGTCTGACGCGTTGATCGCGACGATTTCCAGCTAG	9452

**Figura 13.** Secuencia del gen Rv0934. Los electroferogramas se analizaron para determinar la secuencia del gen en *M. microti* y ésta se comparó con la de *M. tuberculosis* por BLAST. Presenta una identidad del 99.9% ya que hay un cambio de base en la posición 1055 de T por C (letras en negritas), que se traduce en un cambio de aminoácido, alanina por valina.

Para Rv1886c se encontró una identidad del 100% en comparación con *M. tuberculosis* H37Rv al hacer la comparación con el programa BLAST (Figura 14).

<i>M. microti</i>	TCAGCCGGCGCCTAACGAACTCTGCAGGTCACCCTTCATGGCGTTGAGCTGAGCGCCCCA	60
<i>M. tuberculosis</i>	TCAGCCGGCGCCTAACGAACTCTGCAGGTCACCCTTCATGGCGTTGAGCTGAGCGCCCCA	56246
<i>M. microti</i>	GTA	120
<i>M. tuberculosis</i>	GTA	56306
<i>M. microti</i>	GGCGTTGTACGCATCCTGGA	180
<i>M. tuberculosis</i>	GGCGTTGTACGCATCCTGGA	56366
<i>M. microti</i>	GGCGGGTATGTTGGCACCGCCCAACTCGTTCGGGGTGCCGTTCCCGCAATAAACCCATAG	240
<i>M. tuberculosis</i>	GGCGGGTATGTTGGCACCGCCCAACTCGTTCGGGGTGCCGTTCCCGCAATAAACCCATAG	56426
<i>M. microti</i>	CCGGGTGTTGTTTGC	300
<i>M. tuberculosis</i>	CCGGGTGTTGTTTGC	56486



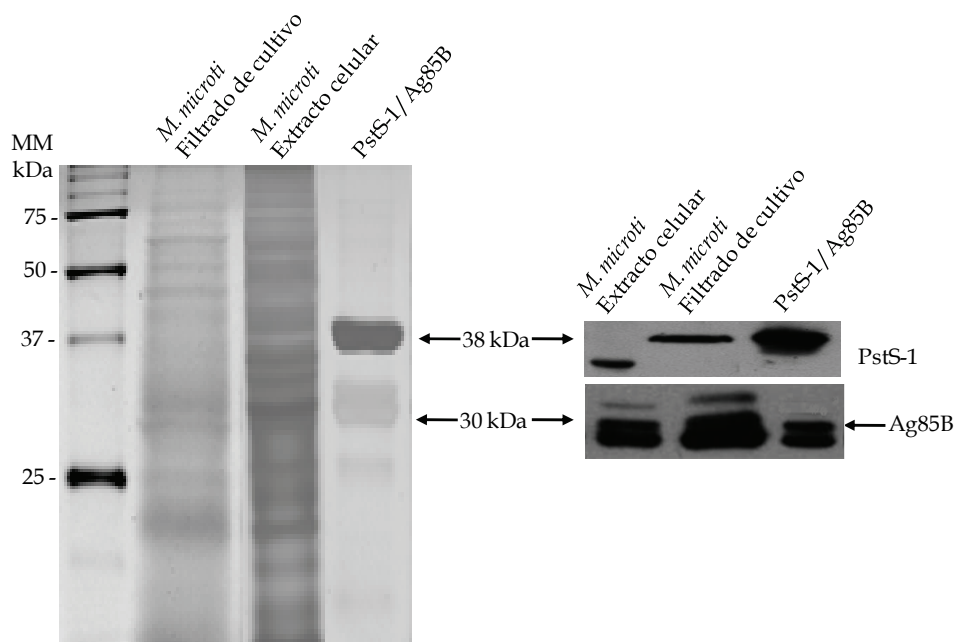
<i>M. microti</i>	CGGGTCACTCGAGGGACCCACATGTCTGCGGCCTTGTAACCGCCGGCGTCACCCATCGC	360
<i>M. tuberculosis</i>	CGGGTCACTCGAGGGACCCACATGTCTGCGGCCTTGTAACCGCCGGCGTCACCCATCGC	56546
<i>M. microti</i>	GAGGCCGATCAGGCTAGGCCCATCCCCTGAGAGGGGTCCAGCAGGGCCGACAGCGAGCC	420
<i>M. tuberculosis</i>	GAGGCCGATCAGGCTAGGCCCATCCCCTGAGAGGGGTCCAGCAGGGCCGACAGCGAGCC	56606
<i>M. microti</i>	GGCGTAGATGAACTGCTGGGGGTGGTAGGCGGCCAAGATCATTGCCGACGAGCCGGCCAT	480
<i>M. tuberculosis</i>	GGCGTAGATGAACTGCTGGGGGTGGTAGGCGGCCAAGATCATTGCCGACGAGCCGGCCAT	56666
<i>M. microti</i>	CGACAAGCCGATTGCAGCGCTGCCGGTGGGCTTCACGGCCCTGTTGGCGGACAACCATTG	540
<i>M. tuberculosis</i>	CGACAAGCCGATTGCAGCGCTGCCGGTGGGCTTCACGGCCCTGTTGGCGGACAACCATTG	56726
<i>M. microti</i>	CGGCAGCTCGCTGGTCAGGAAGGTTTCCCACTTGTAAGTCTGGCAGCCAGCCTTACCGCA	600
<i>M. tuberculosis</i>	CGGCAGCTCGCTGGTCAGGAAGGTTTCCCACTTGTAAGTCTGGCAGCCAGCCTTACCGCA	56786
<i>M. microti</i>	GGCCGGGCTGTACCAGTCGCTGTAGAAGCTGGACTGCCCGCCGACCGGCATGACTATCGA	660
<i>M. tuberculosis</i>	GGCCGGGCTGTACCAGTCGCTGTAGAAGCTGGACTGCCCGCCGACCGGCATGACTATCGA	56846
<i>M. microti</i>	CAGTCCCGACTGGTAGTACCACTCGAACGCCGGGTGTTGATATCCAGCCGTTGTAGTC	720
<i>M. tuberculosis</i>	CAGTCCCGACTGGTAGTACCACTCGAACGCCGGGTGTTGATATCCAGCCGTTGTAGTC	56906
<i>M. microti</i>	GTCTTGGGCGCGCAGGCCGTCGAGCAGATAAACCGCAGGTGAGTTGTTCCACCGCTCTG	780
<i>M. tuberculosis</i>	GTCTTGGGCGCGCAGGCCGTCGAGCAGATAAACCGCAGGTGAGTTGTTCCACCGCTCTG	56966
<i>M. microti</i>	GAACTGAACCTTGATGTGCGGCCCATCGACGGCGACGGCACCTGCAGGTACTCGACCGG	840
<i>M. tuberculosis</i>	GAACTGAACCTTGATGTGCGGCCCATCGACGGCGACGGCACCTGCAGGTACTCGACCGG	57026
<i>M. microti</i>	CAGCCCCGGCCGGGAGAACGCGCCCGCGTTGCCGCTCCGCCGGCAAGCCCCACCAGGCC	900
<i>M. tuberculosis</i>	CAGCCCCGGCCGGGAGAACGCGCCCGCGTTGCCGCTCCGCCGGCAAGCCCCACCAGGCC	57086
<i>M. microti</i>	CGGAAGGACTACAGCCGCTGCCGTGCCGATCATCAATCGGCGTCCCCAAGCTCGAATCTT	960
<i>M. tuberculosis</i>	CGGAAGGACTACAGCCGCTGCCGTGCCGATCATCAATCGGCGTCCCCAAGCTCGAATCTT	57146
<i>M. microti</i>	TCGGCTCACGTCTGTCAT	978
<i>M. tuberculosis</i>	TCGGCTCACGTCTGTCAT	57164

**Figura 14.** Secuencia del gen Rv1886c. Se analizaron los electroferogramas para determinar la secuencia del gen en *M. microti* y ésta se comparó con la de *M. tuberculosis* por BLAST. Presenta una identidad del 100%.

### 7.3 Detección de PstS-1 (Rv0934) y Ag85B (Rv1886c) en *Mycobacterium microti*.

En el gel de poliacrilamida del extracto celular y de filtrado de cultivo de la cepa de *M. microti* sin recombinar, se detectaron proteínas con masa molecular de 30 kDa y 38 kDa.

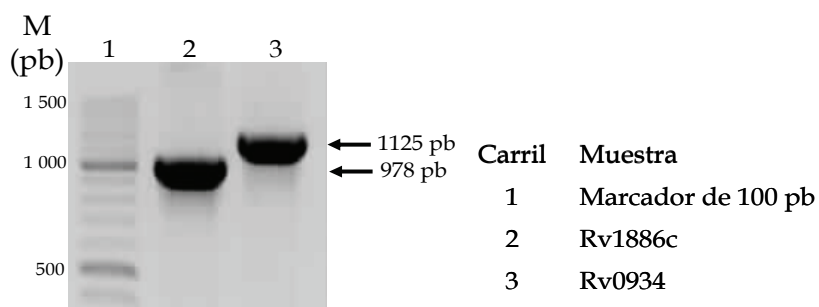
Para confirmar que correspondían a los antígenos PstS-1 y Ag85B se realizó un inmunoblot en el que se utilizó el anticuerpo monoclonal TB71 específico contra el antígeno PstS-1 y otro en el que se empleó el anticuerpo policlonal  $\alpha$ Ag85 específico para el complejo 85 de *M. tuberculosis*. Se logró detectar la presencia de ambos antígenos (Figura 15). En la identificación de Ag85B se observa un doblete en el control, ya que el anticuerpo usado detecta todo el complejo 85.



**Figura 15.** Detección de PstS-1 y Ag85B en *M. microti*. (A) Electroforesis SDS-PAGE de extracto celular y filtrado de cultivo de *M. microti* sin recombinar. En la separación electroforética se usaron como controles positivos las proteínas de 30 kDa (Ag85B) y 38 kDa (PstS-1) del filtrado de cultivo de *M. tuberculosis* H37Rv (Universidad de Colorado, EEUU). (B) Detección específica de las proteínas por Inmunoblot, se usaron como controles positivos los antígenos PstS-1 y 85B (100 ng de cada uno). Las flechas indican la posición de las bandas esperadas y su peso. En el

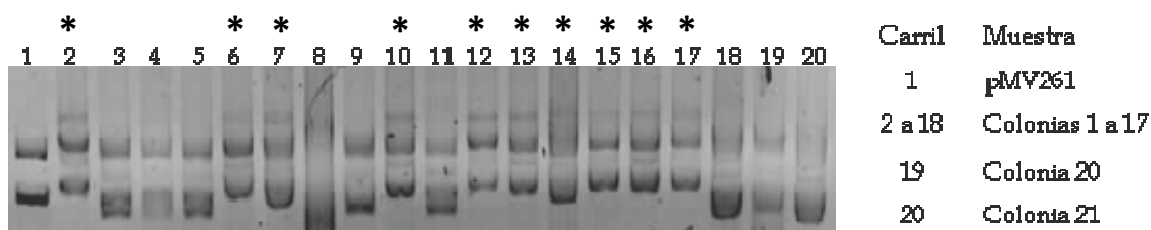
#### 7.4 Clonación de los genes Rv0934 y Rv1886c de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv en el plásmido pMV261.

Los amplicones de los genes Rv0934 y Rv1886c de *M. tuberculosis*, obtenidos por PCR, se visualizaron por electroforesis en gel de agarosa al 2% (figura 16) y una vez que se verificó la correcta amplificación se clonaron en el plásmido pMV261.



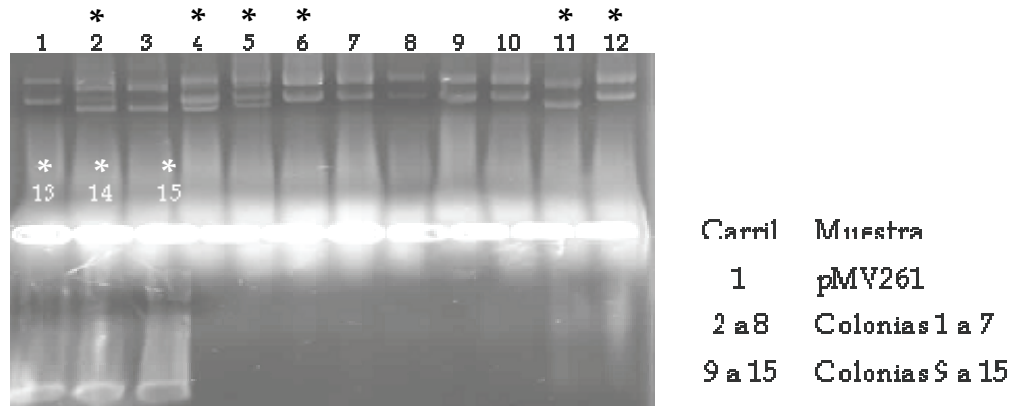
**Figura 16.** Producto de PCR de los genes Rv0934 y Rv1886c.

De las colonias obtenidas después de la transformación de la cepa de *E. coli* GM2199 (*dam*-), con cada uno de los productos de la ligación de Rv0934 y Rv1886c con pMV261, por separado, se seleccionaron algunas y se extrajo el ADN plasmídico, el cual se analizó por electroforesis en agarosa al 1%. De las muestras analizadas para Rv0934 se seleccionaron la 1, 5, 6, 9, 11, 12, 14, 15, 16 (carriles 2, 6, 7, 10, 12, 13, 14, 15, 16 y 17) ya que de acuerdo a su patrón electroforético presentaron un mayor peso en comparación con el vector (figura 17). Se verificó la clonación del gen correspondiente por PCR e hibridación.



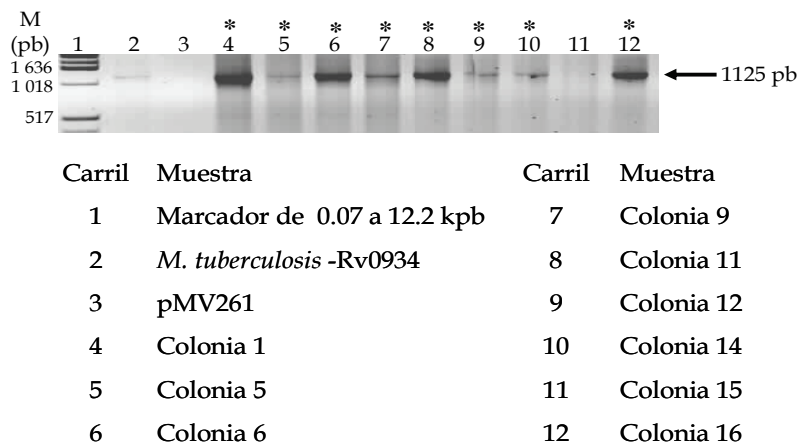
**Figura 17.** ADN plasmídico de las colonias seleccionadas para verificar la clonación del gen Rv0934 en pMV261. El asterisco indica las muestras seleccionadas para confirmar la clonación por PCR e hibridación.

De las muestras analizadas para Rv1886c se seleccionaron la 1, 3, 4, 5, 11, 12, 13, 14 y 15 (carriles 2, 4, 5, 6, 11, 12, 13, 14 y 15) para someter a PCR e hibridación (Figura 18).



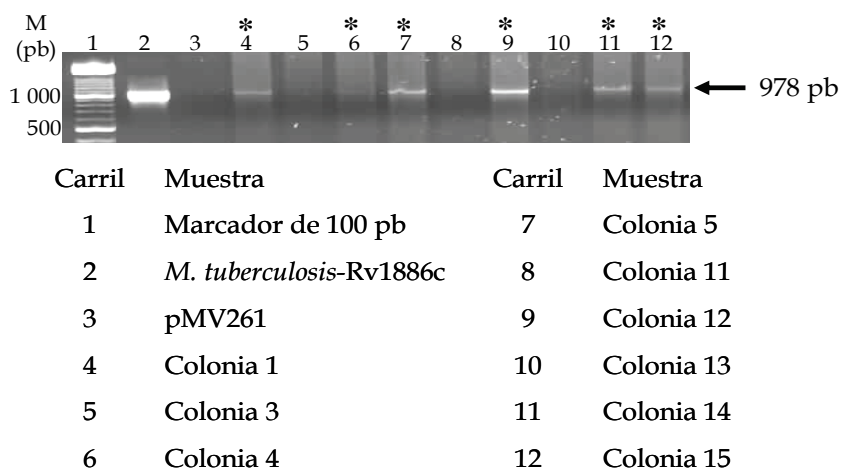
**Figura 18.** ADN plasmídico de las colonias seleccionadas para verificar la clonación del gen Rv1886c en pMV261.

El ADN de las muestras seleccionadas se sometió a PCR para amplificar los genes correspondientes. En la figura 19 se observa amplificación del gen Rv0934 sólo en las muestras 1, 5, 6, 9, 11, 12, 14 y 16 (carriles 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 y 12).



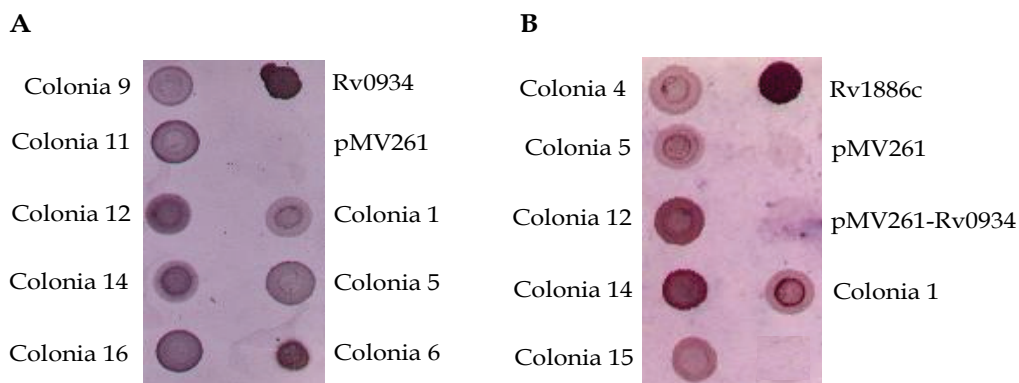
**Figura 19.** Producto de PCR del gen Rv0934 a partir de ADN plasmídico de las muestras seleccionadas. El asterisco indica las muestras en las que se observa un amplicón de 1125pb.

En caso del gen Rv1886c (Figura 20) sólo las muestras 1, 4, 5, 12, 14 y 15 (carriles 4, 6, 7, 9, 11 y 12) hubo amplificación por lo que son positivas.



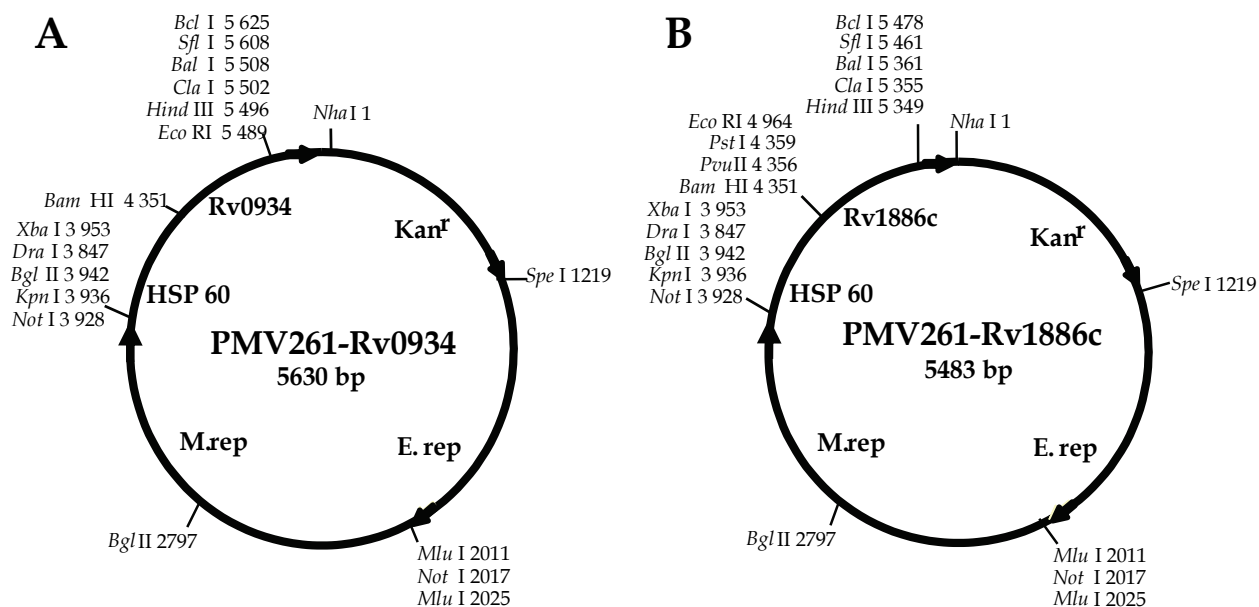
**Figura 20.** Producto de PCR del gen Rv1886c a partir de DNA plasmídico de las muestras seleccionadas. El asterisco indica las muestras en las que se observa un amplicón de 978 pb.

Las muestras que fueron positivas en PCR se sometieron a hibridación para confirmar la presencia del gen. En la figura 21 se observa que todas las muestras son positivas, por lo que de las clonas analizadas se seleccionó una de cada una, para la clonación de Rv0934 y Rv1886c en el plásmido pYUB412. De la construcción pMV261-Rv0934 se seleccionó la muestra 6 y de pMV261-Rv1886c la muestra 12.



**Figura 21.** Hibridación de las muestras seleccionadas, (A) para Rv0934 con la sonda Sr38 y (B) para Rv1886c con la sonda Sr30.

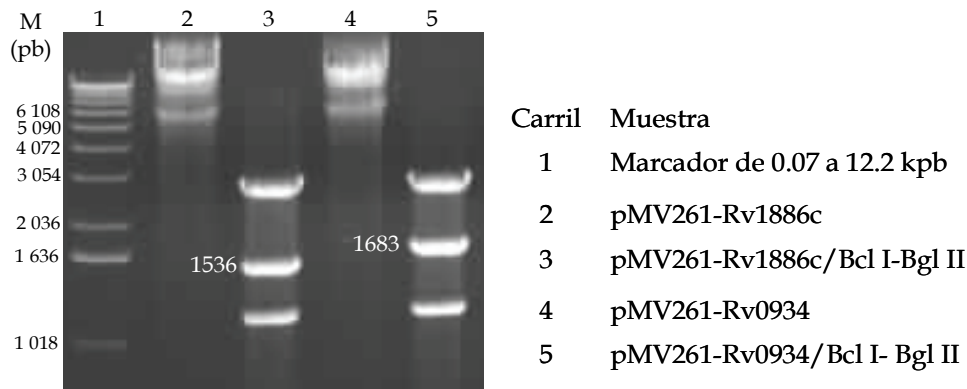
En la figura 22 se muestran los mapas de las construcciones pMV261-Rv0934 y pMV261-Rv1886c a partir de las cuales se obtuvo cada uno de los genes junto con el promotor HSP60, por separado, para clonarlos en el plásmido pYUB412.



**Figura 22.** Mapas de los plásmidos de expresión (A) pMV261-Rv0934 y (B) pMV261-Rv1886c. Los plásmidos tienen sitios de replicación para *E. coli* y para micobacterias, sitios de clonación múltiple, un casete de resistencia a kanamicina y los genes en cada plásmido se expresan bajo el promotor HSP60.

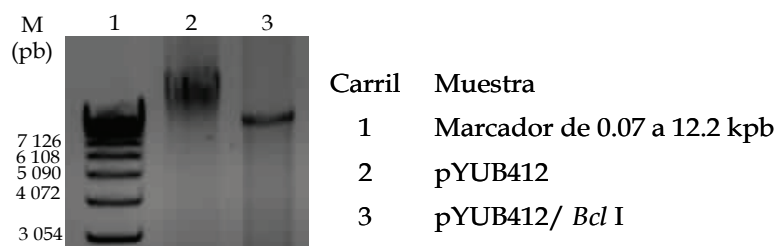
### 7.5 Clonación de los genes Rv0934 y Rv1886c de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv en el plásmido pYUB412.

Para clonar los genes Rv0934 y Rv1886c en el plásmido integrativo pYUB412, los plásmidos pMV261-Rv0934 y pMV261-Rv1886c se digirieron con las enzimas *Bgl* II y *Bcl* I. Al realizar la separación electroforética, se obtuvieron tres bandas, siendo las de 1683 pb y 1536 pb (correspondientes a HSP60-Rv0934 y HSP60-Rv1886c, respectivamente) las bandas esperadas y, por lo tanto, fueron las que se purificaron (Figura 23).



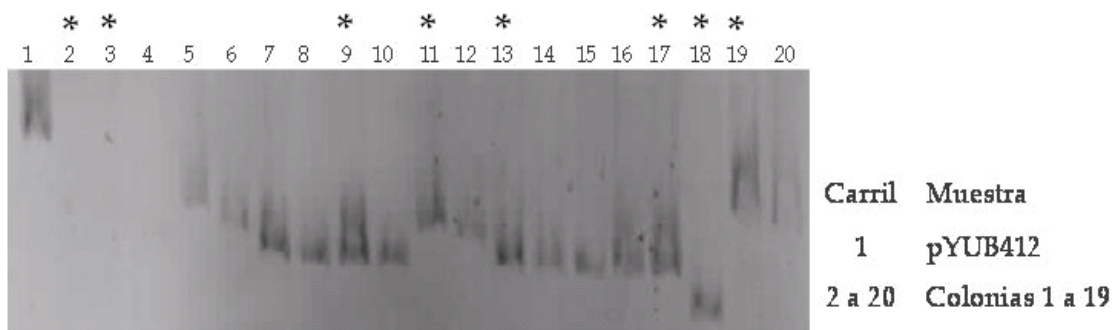
**Figura 23.** Digestión de los plásmidos pMV261-Rv0934 y pMV261-Rv1886c con *Bcl* I y *Bgl* II.

El plásmido integrativo pYUB412 se digirió con *Bcl* I (Figura 24) y se obtuvo sólo una banda de 10096 pb.



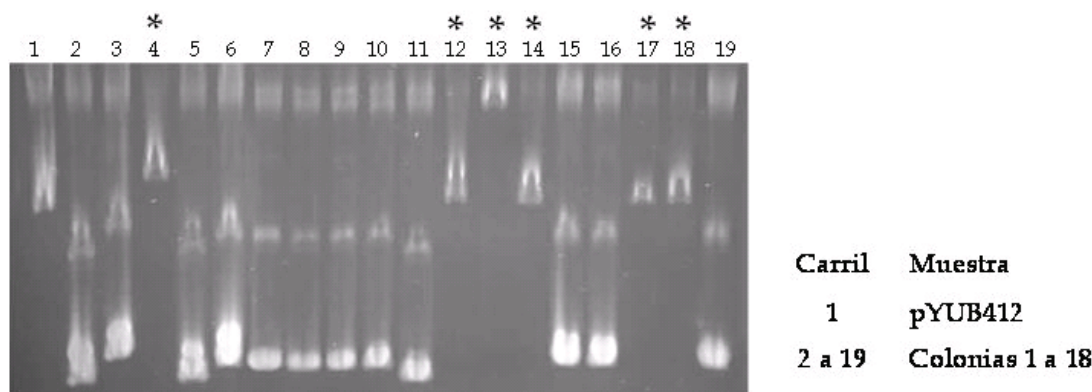
**Figura 24.** Digestión del plásmido pYUB412 con *Bcl* I.

Una vez que se verificó la correcta digestión de los plásmidos, los fragmentos correspondientes a HSP60-Rv0934 y HSP60-Rv1886c, se clonaron en el plásmido pYUB412 previamente digerido con *Bcl* I y desfosforilado. De las clonas obtenidas después de la transformación de la cepa de *E. coli* DH5 $\alpha$  con cada uno de los productos de la ligación, se seleccionaron algunas y se analizaron por lisis en agarosa. De las muestras analizadas para Rv0934 (Figura 25) se seleccionaron las correspondientes a 2, 3, 9, 11, 13, 17, 18 y 19 para analizar su patrón de restricción con *Eco* RI.



**Figura 25.** Lisis en gel de agarosa de las colonias seleccionadas para verificar la clonación del gen Rv0934 en pYUB412. El asterisco indica las muestras seleccionadas para analizar posteriormente su patrón de restricción.

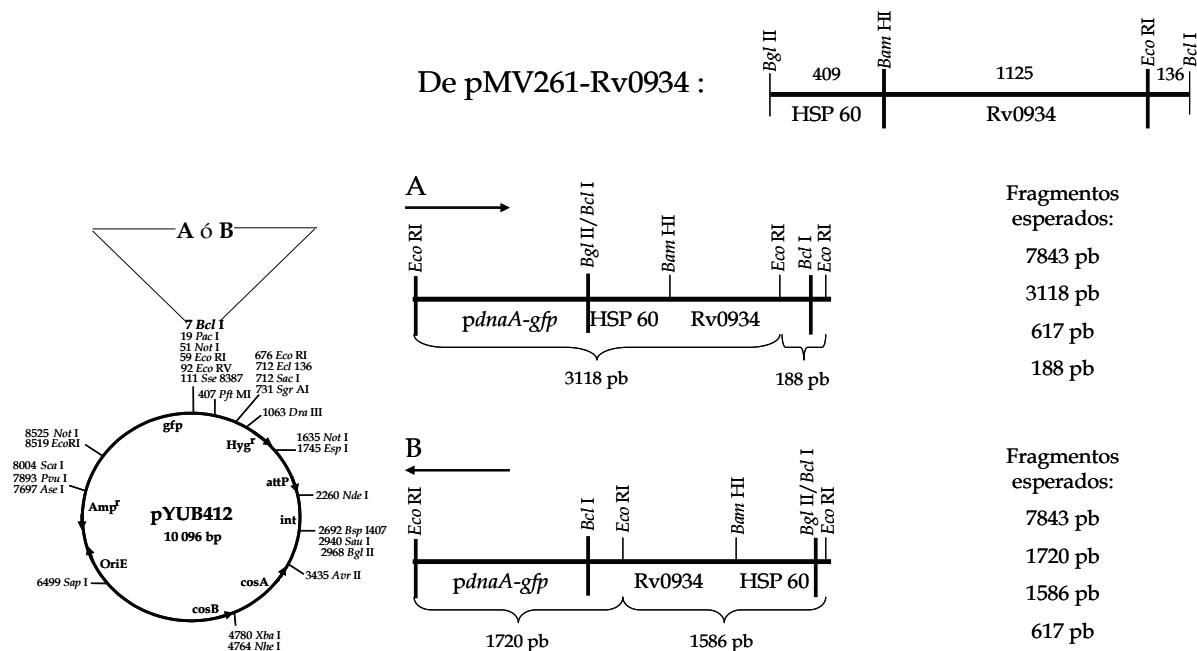
De las muestras analizadas para Rv1886c (Figura 26) se seleccionaron las correspondientes a 3, 11, 12, 13, 16 y 17 para analizar su patrón de restricción con *Eco* RI.



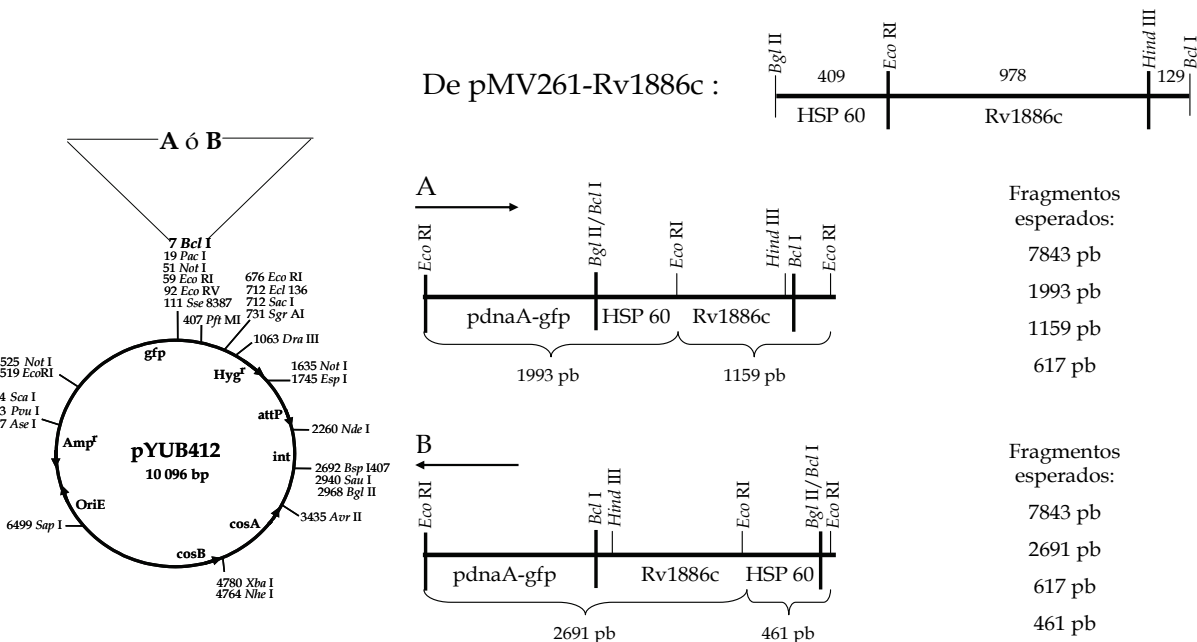
**Figura 26.** Lisis en gel de las colonias seleccionadas para verificar la clonación del gen Rv1886c en pYUB412. El asterisco indica las muestras seleccionadas para analizar posteriormente su patrón de restricción.

El ADN de las muestras seleccionadas se sometió a restricción con la enzima *Eco* RI. Para cada una de las clonaciones se esperaba que las muestras positivas presentaran uno de dos patrones de restricción posibles (Figuras 27 y 28).



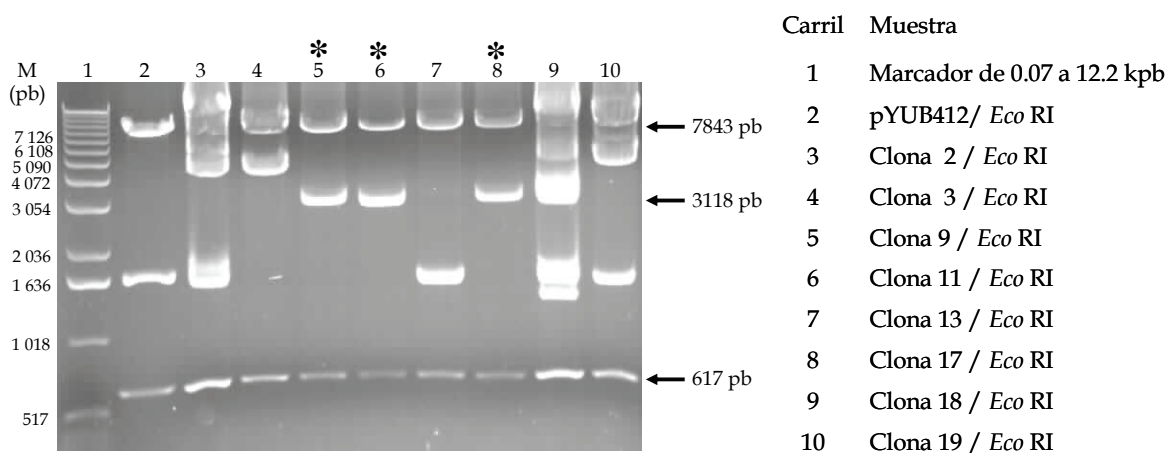


**Figura 27.** Patrones de restricción para pYUB412-Rv0934 digerido con *Eco* RI. De acuerdo a la orientación en que el fragmento HSP60-Rv0934 se clone en pYUB412 será el patrón de restricción que se observe en la clona positiva. (A) Patrón esperado si el promotor HSP60 está río abajo de *pdnaA-gfp*. (B) Patrón esperado si Rv0934 está río abajo de *pdnaA-gfp*.

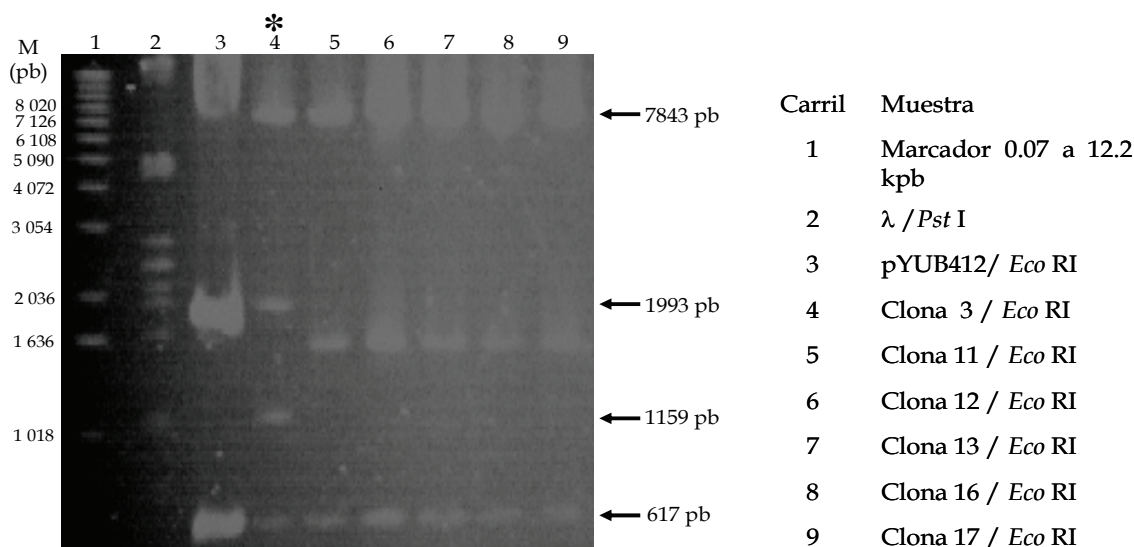


**Figura 28.** Patrones de restricción para pYUB412-Rv1886c digerido con *Eco* RI. De acuerdo a la orientación en que el fragmento HSP60-Rv1886c se clone en pYUB412 será el patrón de restricción que se observe en la clona positiva. (A) Patrón esperado si el promotor HSP60 está río abajo de *pdnaA-gfp*. (B) Patrón esperado si Rv1886c está río abajo de *pdnaA-gfp*.

Las muestras 9, 11 y 17 de la clonación de Rv0934 y la 3 de Rv1886c, presentaron el patrón de restricción A (Figuras 29 y 30). Sólo con estas muestras se realizó PCR para amplificar los genes Rv0934 y Rv1886c.

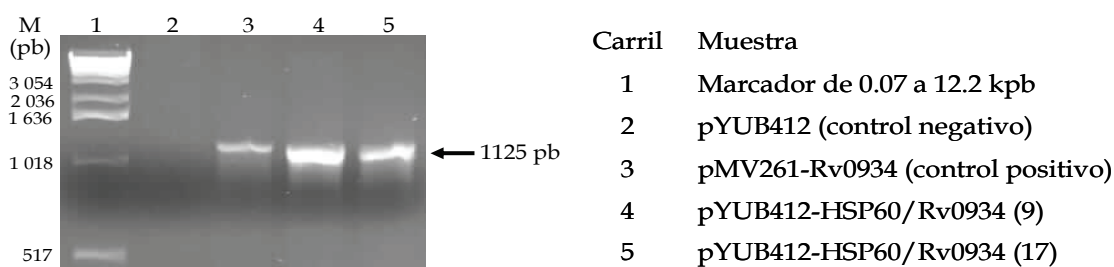


**Figura 29.** Patrón de restricción para pYUB412-Rv0934 con *Eco* RI. El asterisco indica las muestras que se seleccionaron para amplificar por PCR el gen Rv0934.

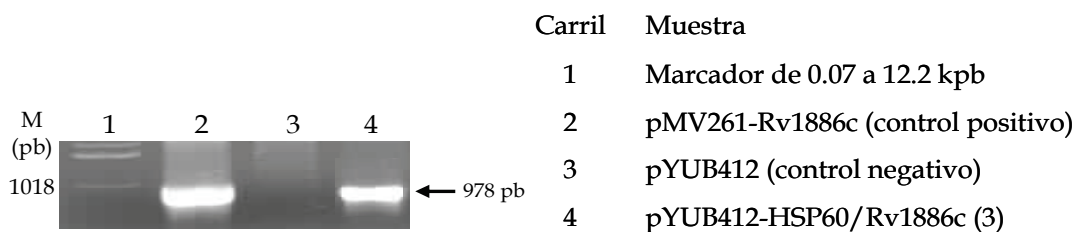


**Figura 30.** Patrón de restricción para pYUB412-Rv1886c con *Eco* RI. El asterisco indica las muestras que se seleccionaron para amplificar por PCR el gen Rv1886c.

De las muestras seleccionadas para confirmar la clonación de Rv0934 en pYUB412 por PCR, sólo se observó amplificación del gen en las muestras 9 y 17 (Figura 31). La muestra seleccionada para corroborar la clonación de Rv1886c por PCR fue positiva (Figura 32).

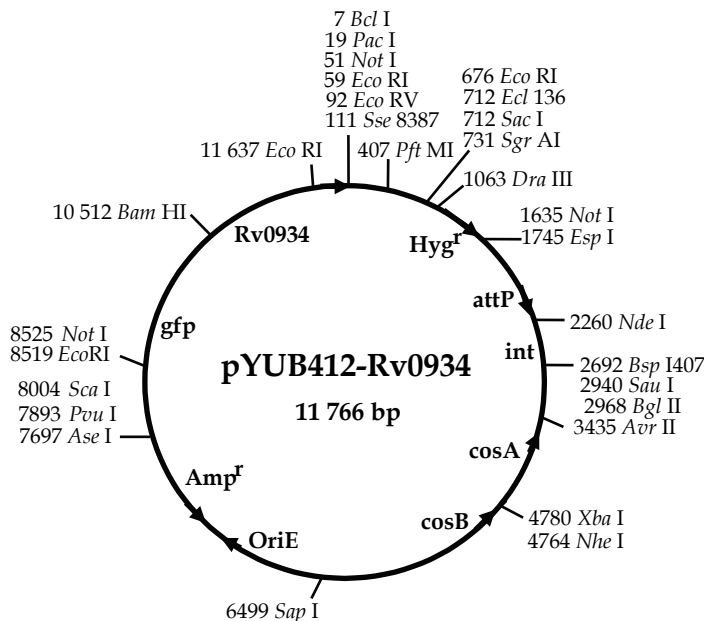


**Figura 31.** Producto de PCR del gen Rv0934 a partir de ADN plasmídico de las muestras seleccionadas para confirmar la clonación de Rv0934 en pYUB412.

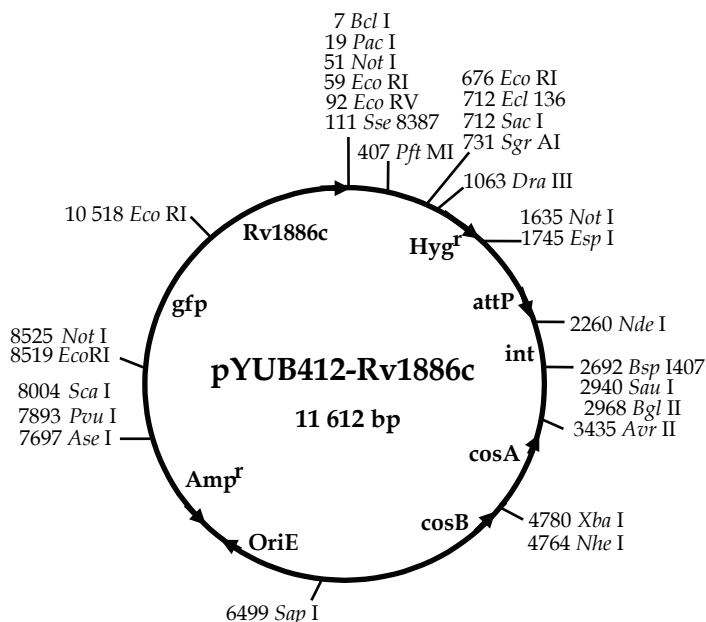


**Figura 32.** Producto de PCR del gen Rv1886c a partir de DNA plasmídico de las muestras seleccionadas para confirmar la clonación de Rv1886c en pYUB412.

De las clonas que fueron positivas para la clonación de Rv0934 en pYUB412, se seleccionó la número 9, que junto con la número 3 para pYUB412-Rv1886c, se emplearon para la recombinación de *M. microti*. Los mapas de ambos plásmidos se presentan en las figuras 33 y 34.



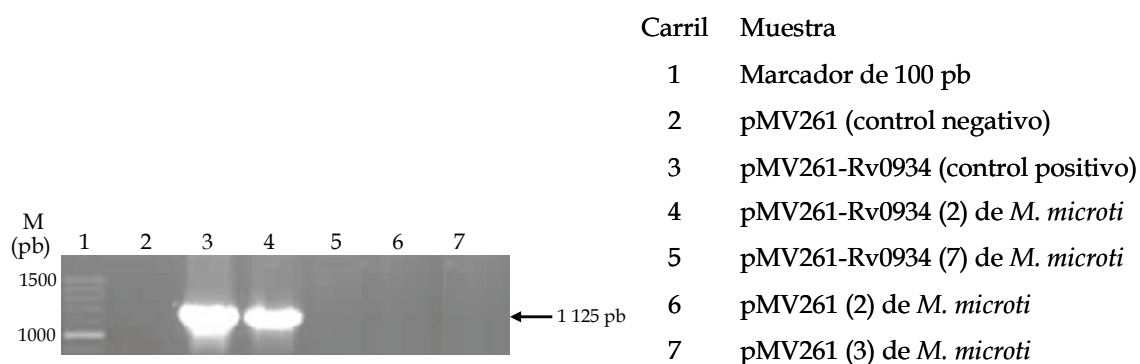
**Figura 33.** Mapa del plásmido de inserción pYUB412-Rv0934. El plásmido expresa el gen Rv0934 de *M. tuberculosis* H37Rv, tiene un sitio de replicación para *E. coli*, sitios de clonación múltiple, dos casetes de resistencia, uno a ampicilina (para selección en *E. coli*) y otro a higromicina (para selección en micobacterias), sitios cos, además attP y una región que codifica para una integrasa, por lo que se puede insertar en el genoma de la micobacteria.



**Figura 34.** Mapa del plásmido de inserción pYUB412-Rv1886c. El plásmido expresa el gen Rv1886c de *M. tuberculosis* H37Rv, tiene un sitio de replicación para *E. coli*, sitios de clonación múltiple, dos casetes de resistencia, uno a ampicilina (para selección en *E. coli*) y otro a higromicina (para selección en micobacterias), sitios cos, además attP y una región que codifica para una integrasa, por lo que se puede insertar en el genoma de la micobacteria.

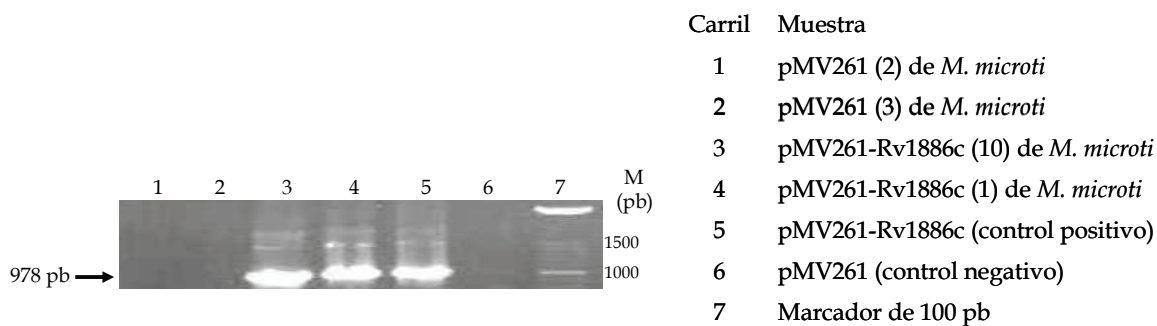
## 7.6 Transformación de *Mycobacterium microti*.

De las colonias obtenidas de la transformación de *M. microti* con los plásmidos extracromosomales (pMV261, pMV261-Rv0934 y pMV261-Rv1886c) se seleccionaron algunas, para hallar por electroducción las positivas. Para la mayoría de las muestras que se probaron se obtuvieron colonias (lo cual se considera un resultado positivo), principalmente en el caso de pMV261 y pMV261-Rv1886c. Para confirmar que eran positivas se seleccionaron dos de las muestras en las que hubo un mayor número de colonias, para cada uno de los plásmidos. Se extrajo el ADN de las muestras por lisis alcalina y se sometió a PCR para amplificar los genes Rv0934 y Rv1886c (Figuras 35 y 36).



**Figura 35.** Producto de PCR de la amplificación del gen Rv0934 de muestras de *M. microti* seleccionadas.

Para las clonas de *M. microti* recombinadas con pMV261-Rv0934 se esperaba un amplicón de 1125 pb, por lo que sólo la clona 2 es positiva. En el caso de pMV261-Rv1886c, se esperaba un amplicón de 978 pb, por lo que las muestras probadas (1 y 10) son positivas. Además las clonas 2 y 3 de *M. microti* recombinada con el plásmido pMV261 se sometieron a PCR para amplificar ambos genes y se verificó la ausencia de éstos.

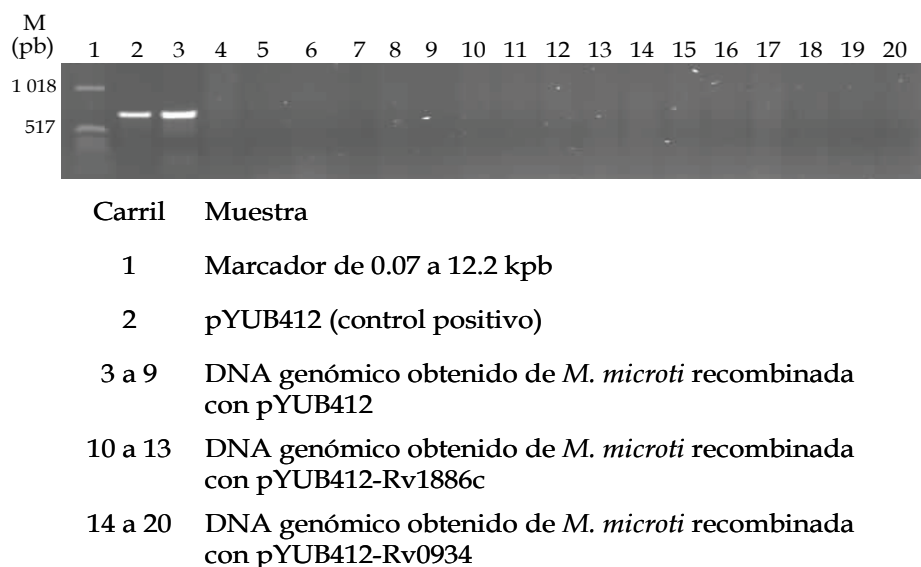


**Figura 36.** Producto de PCR de la amplificación del gen Rv1886c de muestras de *M. microti* seleccionadas.

Las colonias de *M. microti* seleccionadas para realizar la identificación de los antígenos PstS-1 y Ag85B fueron la 2 para pMV261, la 2 para pMV261-Rv0934 y la 1 para pMV261-Rv1886c.

En el caso de las colonias obtenidas de la transformación de *M. microti* con los plásmidos integrativos (pYUB412, pYUB412-Rv0934 y pYUB412-Rv1886c) se seleccionaron algunas, para identificar por PCR e hibridación las positivas. Previo a la identificación se estandarizaron las condiciones para realizar el PCR y se determinó que la cantidad óptima para realizar la amplificación del gen *gfp* era de 1 ng. En la figura 37 se presenta el análisis electroforético de uno de los ensayos de amplificación realizados, el cual corresponde a la transformación de *M. microti* con 10 µg de ADN.

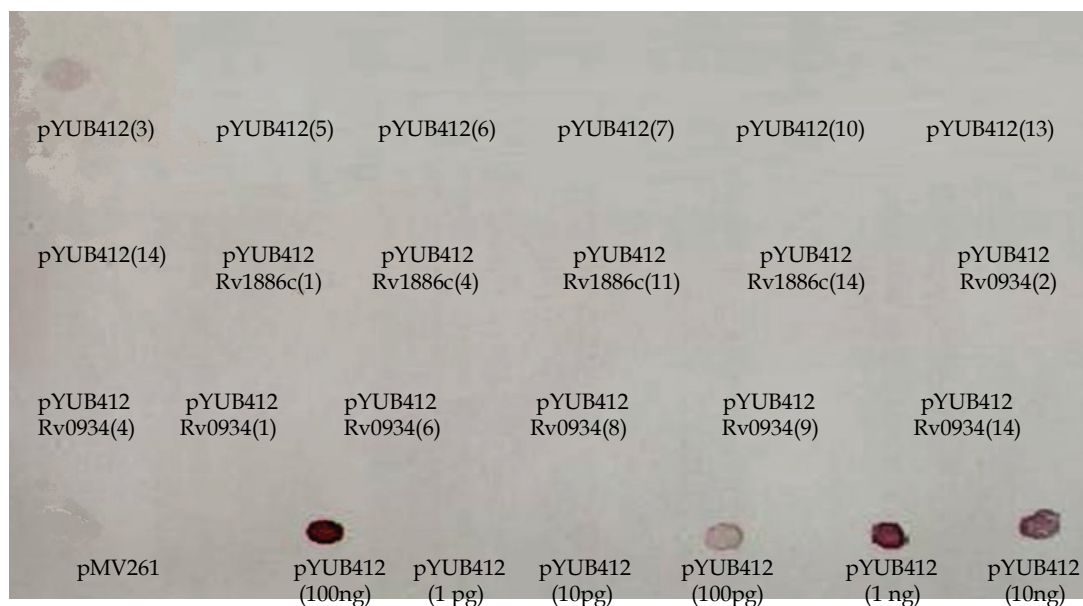
Como se puede observar en la figura 37, sólo una de las muestras correspondiente a *M. microti* transformada con el plásmido pYUB412, fue positiva ya que se observa un amplicón del tamaño esperado (720 pb). En las muestras de los otros ensayos de recombinación que se analizaron no se observó amplificación del gen *gfp*.



**Figura 37.** Producto de PCR de la amplificación del gen *gfp* en muestras de *M. microti* seleccionadas.

Para descartar que los resultados negativos obtenidos en la amplificación del gen se deban a la sensibilidad del método, las muestras se sometieron a hibridación (Figura 38). En este ensayo se empleó la misma cantidad de ADN que en el PCR. Los resultados nuevamente fueron negativos por lo que en las colonias analizadas no hubo recombinación.

Debido a los resultados obtenidos, sólo se procedió a la identificación de los antígenos PstS-1 y Ag85B en *M. microti* transformada con los plásmidos extracromosomales.

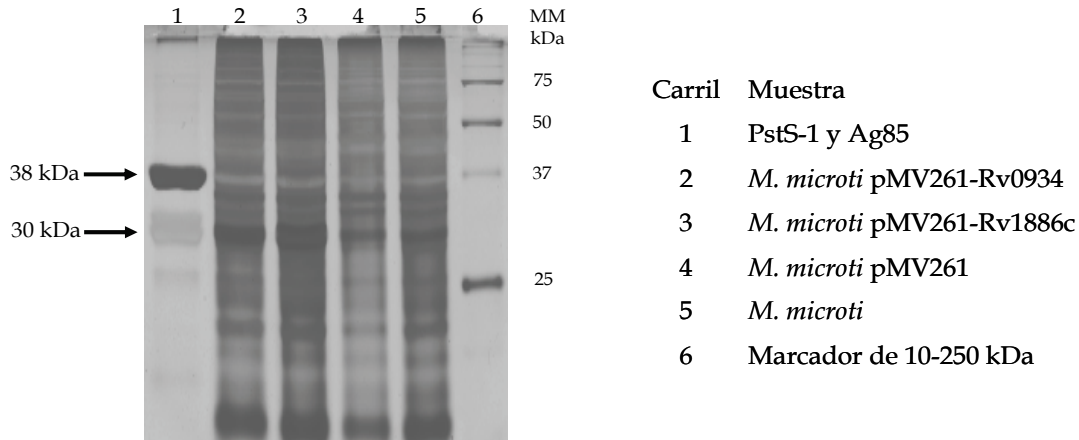


**Figura 38.** Hibridación del ADN genómico de las colonias de *M. microti* seleccionadas, de la transformación con los plásmidos pYUB412, pYUB412-Rv0934 y pYUB412-Rv1886c. Se utilizó una sonda específica contra el gen *gfp*. La última línea corresponde al control negativo (plásmido pMV261) y al control positivo (pYUB412 purificado a partir de *E. coli*) en diferentes concentraciones.

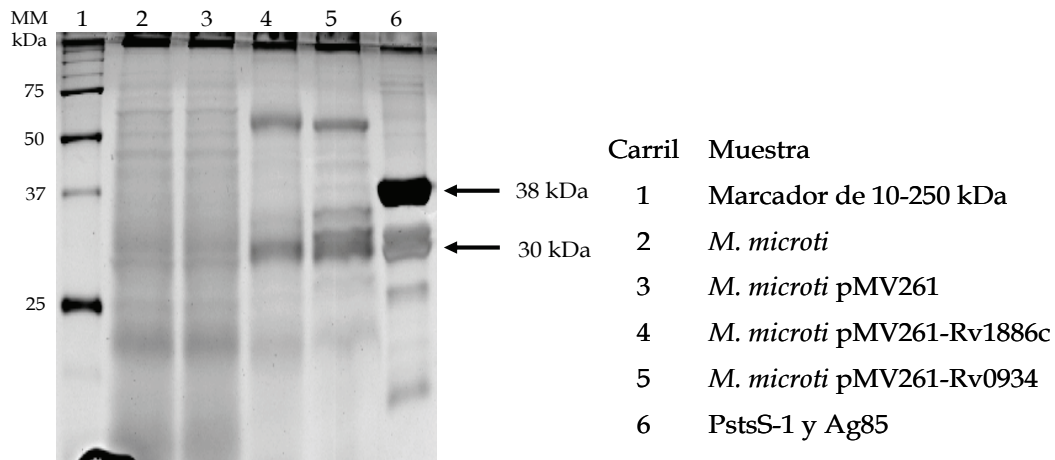
### 7.7 Identificación de los antígenos PstS-1 y 85B en *Mycobacterium microti* recombinante.

En la electroforesis en gel de poliacrilamida tanto del extracto celular como del filtrado de cultivo de la cepa de *M. microti* sin recombinar y recombinada con los plásmidos pMV261, pMV261-Rv0934 y pMV261-Rv1886c, se encontró la expresión de proteínas con masas moleculares de 30 kDa y 38 kDa (Figuras 39 y 40).



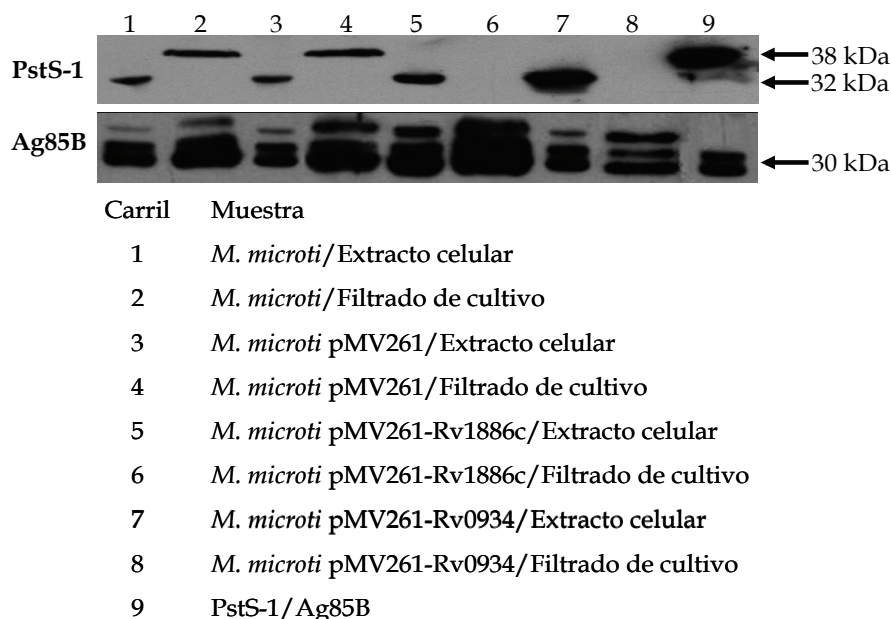


**Figura 39.** Perfil electroforético de las proteínas del extracto celular de *M. microti* sin recombinar y recombinada con pMV261, pMV261-Rv0934 y pMV261-Rv1886c. Se usaron como controles positivos las proteínas de 30 kDa (Ag85B) y 38 kDa (PstS-1) obtenidas del filtrado de cultivo de *M. tuberculosis* H37Rv (Universidad de Colorado, EEUU).



**Figura 40.** Perfil electroforético de las proteínas del filtrado de cultivo de *M. microti* sin recombinar y recombinada con pMV261, pMV261-Rv0934 y pMV261-Rv1886c. Se usaron como controles positivos las proteínas de 30 kDa (Ag85B) y 38 kDa (PstS-1) obtenidas del filtrado de cultivo de *M. tuberculosis* H37Rv (Universidad de Colorado, EEUU).

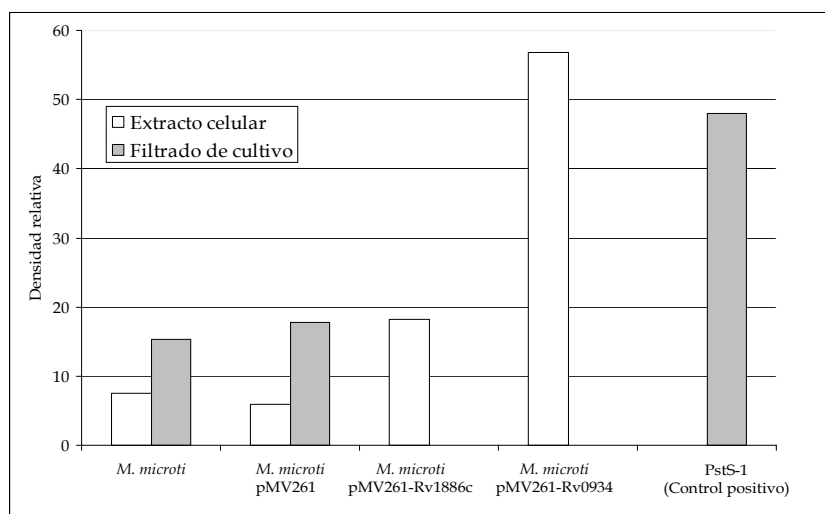
Para verificar la presencia de los antígenos se realizó inmunodetección utilizando anticuerpos específicos contra las proteínas (Figura 41).



**Figura 41.** Detección de PstS-1 y Ag85B en *M. microti*. Se realizó la identificación de ambos antígenos en las proteínas de extracto celular y filtrado de cultivo de *M. microti* sin recombinar y recombinada con pMV261, pMV261-Rv0934 y pMV261-Rv1886c, por inmunoblot. Se emplearon los anticuerpos TB71 y  $\alpha$ Ag85 para identificar los antígenos PstS-1 y Ag85B respectivamente, usando como controles positivos las proteínas de 30 kDa (Ag85B) y 38 kDa (PstS-1) obtenidas del filtrado de cultivo de *M. tuberculosis* H37Rv (Universidad de Colorado, EEUU)

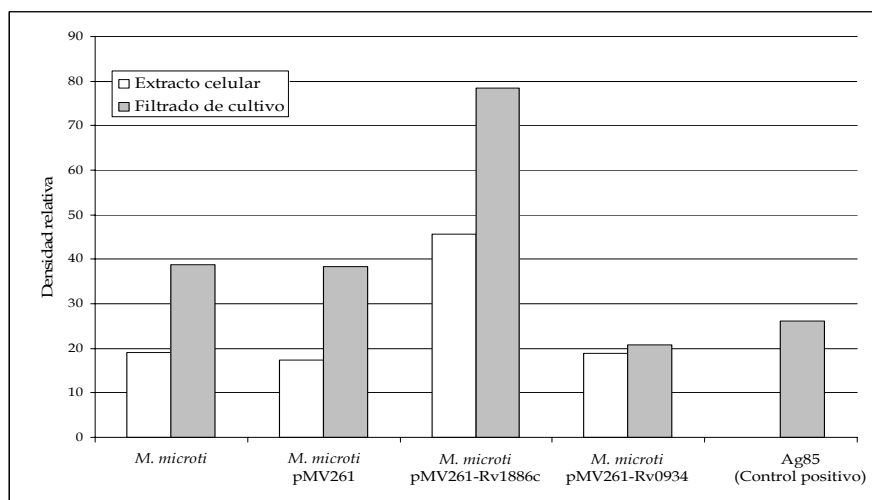
En la figura 41 se puede observar que el Ag85B (30 kDa) se encuentra presente en todas las muestras, siendo visiblemente mayor su expresión en *M. microti* recombinada con el plásmido pMV261-Rv1886c (carriles 5 y 6). En el caso del antígeno PstS-1, sólo se observa el peso esperado (38 kDa) en la proteína del filtrado de cultivo, en el extracto celular se observa e un menor tamaño (32 kDa). Además en *M. microti* recombinada con pMV261-Rv0934 y pMV261-Rv1886c, en el filtrado de cultivo no se observa su expresión. Sin embargo, sí hay una mayor expresión de PstS-1 en *M. microti* recombinada con pMV261-Rv0934.

Las imágenes obtenidas del inmunoblot se sometieron a análisis densitométrico con el programa Quantity One y se obtuvieron gráficos en los cuales se puede observar de una forma más clara la expresión de ambos antígenos (Figuras 42 y 43).



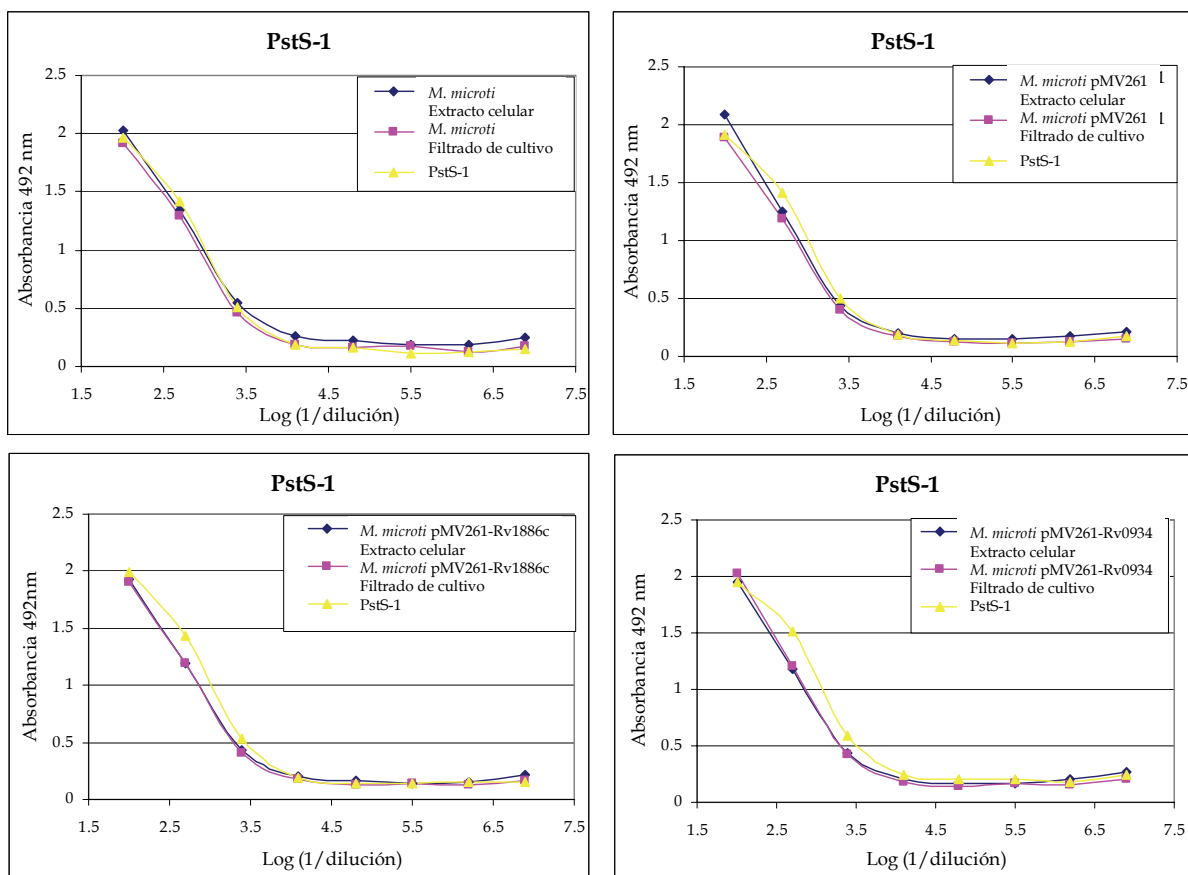
**Figura 42.** Análisis densitométrico de la expresión de PstS-1. El inmunoblot se realizó con proteínas de extracto celular y filtrado de cultivo de *M. microti* sin recombinar y recombinada con pMV261, pMV261-Rv0934 y pMV261-Rv1886c.

En la figura 42 se observa que PstS-1 se encuentra cuatro veces incrementada en el extracto celular en *M. microti* pMV261-Rv0934 en comparación con *M. microti* y en la figura 43 que en *M. microti* pMV261-Rv1886c el antígeno 85B se encuentra dos veces incrementada en comparación con *M. microti*.



**Figura 43.** Análisis densitométrico de la expresión de Ag85B. El inmunoblot se realizó con proteínas de extracto celular y filtrado de cultivo de *M. microti* sin recombinar y recombinada con pMV261, pMV261-Rv0934 y pMV261-Rv1886c.

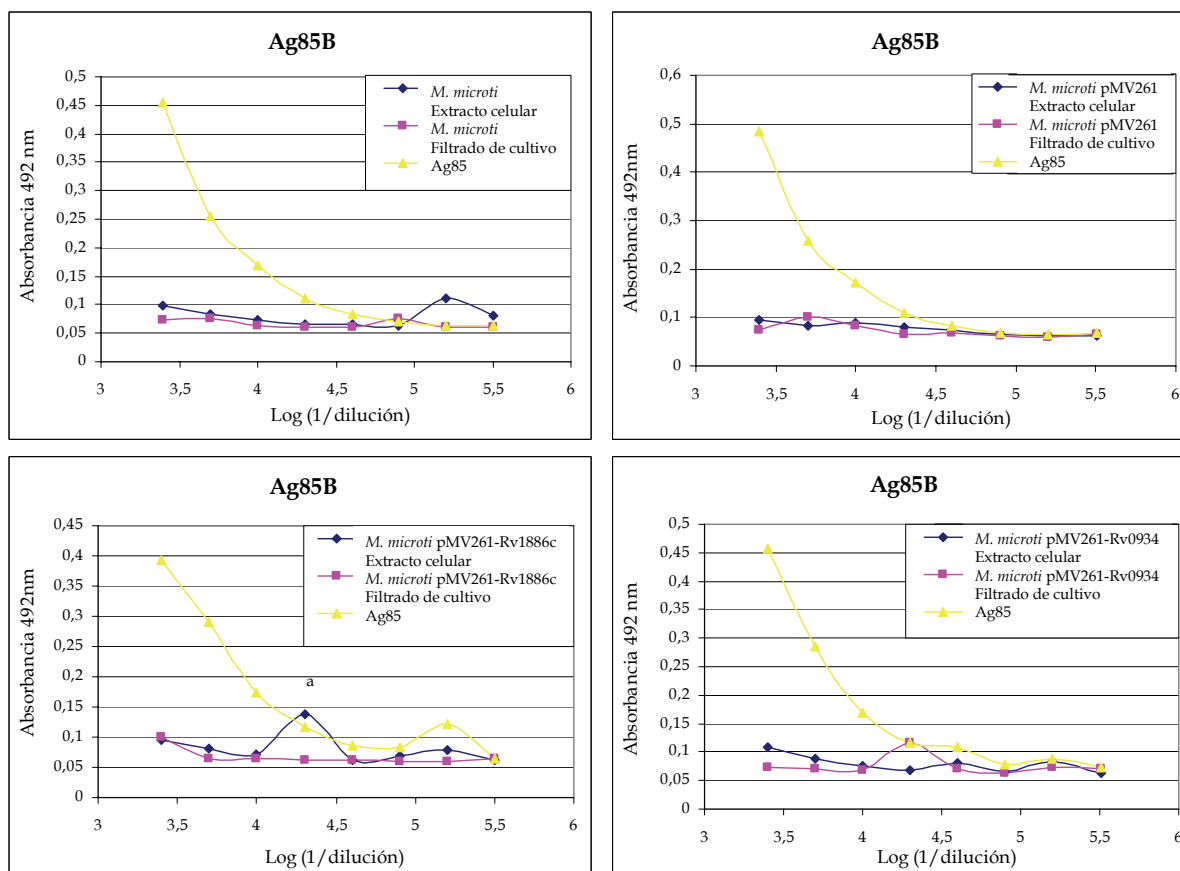
Por otro lado, en el ensayo de ELISA se encontró para PstS-1 (Figura 44, Tabla 1) que el porcentaje de inhibición de unión al anticuerpo para *M. microti* pMV261-Rv0934 fue del 22% y 20.3% para el extracto celular y el filtrado de cultivo, respectivamente y para *M. microti* fue del 5.1% y 8.6% para el extracto celular y el filtrado de cultivo, respectivamente. Por lo que, por medio de este ensayo se detectó que *M. microti* pMV261-Rv0934 expresa cuatro y dos veces más, la concentración de PstS-1 en comparación con *M. microti*, en extracto celular y filtrado de cultivo, respectivamente. Como se observa, por ELISA se logra detectar la presencia de PstS-1 en el filtrado de cultivo.



**Figura 44.** Ensayo de ELISA para detectar la presencia de PstS-1. El ensayo se realizó con proteínas de extracto celular y filtrado de cultivo de *M. microti* sin recombinar y recombinada con pMV261, pMV261-Rv0934 y pMV261-Rv1886c.

Muestra		Porcentaje de inhibición de unión al anticuerpo (%)
Extracto celular	<i>M. microti</i>	5.1
	<i>M. microti</i> pMV261	10.8
	<i>M. microti</i> pMV261-Rv0934	17.4
	<i>M. microti</i> pMV261-Rv1886c	22
Filtrado de cultivo	<i>M. microti</i>	8.6
	<i>M. microti</i> pMV261	15.9
	<i>M. microti</i> pMV261-Rv0934	17.3
	<i>M. microti</i> pMV261-Rv1886c	20.3

**Tabla 1.** Porcentaje de inhibición de unión al anticuerpo. Los datos fueron obtenidos a partir del ensayo de ELISA para detectar la presencia de PstS-1. El ensayo se realizó con proteínas de extracto celular y filtrado de cultivo de *M. microti* sin recombinar y recombinada con pMV261, pMV261-Rv0934 y pMV261-Rv1886c.



**Figura 45.** Ensayo de ELISA para detectar la presencia de Ag85B. El ensayo se realizó con proteínas de extracto celular y filtrado de cultivo de *M. microti* sin recombinar y recombinada con pMV261, pMV261-Rv0934 y pMV261-Rv1886c.

Por otro lado, en el ensayo de ELISA para Ag85B se encontró que el porcentaje de inhibición de unión al anticuerpo (Figura 45, Tabla 2) en todos los casos fue similar. Por lo que, la concentración de antígeno (muestras) empleada no permitió observar diferencias en la expresión del antígeno.

Muestra		Porcentaje de inhibición de unión al anticuerpo (%)
<b>Extracto celular</b>	<i>M. microti</i>	28.0
	<i>M. microti</i> pMV261	30.6
	<i>M. microti</i> pMV261-Rv0934	32.3
	<i>M. microti</i> pMV261-Rv1886c	33.0
<b>Filtrado de cultivo</b>	<i>M. microti</i>	24.6
	<i>M. microti</i> pMV261	22.4
	<i>M. microti</i> pMV261-Rv0934	29.4
	<i>M. microti</i> pMV261-Rv1886c	39.2

**Tabla 2.** Porcentaje de inhibición de unión al anticuerpo. Los datos fueron obtenidos a partir del ensayo de ELISA para detectar la presencia de Ag85B. El ensayo se realizó con proteínas de extracto celular y filtrado de cultivo de *M. microti* sin recombinar y recombinada con pMV261, pMV261-Rv0934 y pMV261-Rv1886c.

## 8. Discusión.

La tuberculosis hoy en día es la segunda causa de muerte por un agente infeccioso, *M. tuberculosis*. El aumento en la incidencia se debe en parte a la co-infección con el virus de inmunodeficiencia humana, a la gran diversidad de genotipos y al desarrollo de cepas de *M. tuberculosis* multi-fármaco resistentes, hace necesaria la implementación de mejores medidas preventivas. Hasta ahora, la principal medida preventiva contra esta enfermedad es la vacunación con BCG. Sin embargo, a pesar de proteger eficientemente contra las formas más severas de la enfermedad (97), la eficacia protectora contra la tuberculosis pulmonar a largo plazo no es exitosa, lo cual se ve reflejado en un aumento en la incidencia, principalmente, de la tuberculosis pulmonar (14, 24, 41, 51).

Varias alternativas se han explorado para generar una vacuna más eficaz que BCG. Las opciones potenciales más prometedoras son las vacunas basadas en micobacterias, ya que son fuente de una gran variedad de antígenos inmunodominantes que se expresan *in vivo*, y su producción es sencilla y económica.

*M. microti*, una micobacteria naturalmente atenuada y que no causa la enfermedad en el humano, se evaluó como vacuna contra la tuberculosis a mediados del siglo pasado. Sin embargo, a pesar de que su eficacia protectora contra la tuberculosis resultó ser comparable a la de BCG (77 %) se discontinuó su uso debido, principalmente, a que del 3 al 17% de las personas vacunadas presentaban reacciones cutáneas de aspecto lupoides de un mayor tamaño en comparación a las personas vacunadas con BCG (26). Cabe señalar que la administración de la vacuna se realizó por punción múltiple, lo que favorece el desarrollo de estas lesiones. A finales del siglo XX e inicios del siglo XXI se reevaluó *M. microti* como vacuna en modelos animales, con vías de administración alternativas. Dannenberg, así como Manabe y cols., con la vía oral para inmunizar, reportaron que *M. microti* es igualmente eficaz que BCG administrada por vía subcutánea para conferir protección contra la tuberculosis (30, 67).

Hasta el momento, sólo un trabajo evaluó el desarrollo de una vacuna recombinante, con *M. microti* como vehículo para la expresión de antígenos inmunodominantes de *M. tuberculosis*. Brodin y cols., la complementaron con la región RD1, misma que también está ausente en todas las subcepas BCG. Si bien no abarca la misma región cromosómica en *M. microti* y BCG, sí afecta a dos genes cuyos productos proteicos están asociados con virulencia (ESAT 6 y CFP 10). *M. microti* complementada con esta región mostró incrementar su eficacia protectora al compararse con la cepa silvestre (16).

En nuestro laboratorio se evaluó la cepa de *M. microti* ATCC 11152 en el modelo murino de tuberculosis pulmonar y mostró inducir eficacia protectora al reducir tanto la carga bacilar, como el porcentaje de tejido pulmonar con neumonía, al reto con *M. tuberculosis* H37Rv (65).

Asimismo, los antígenos PstS-1 y Ag85B están ampliamente estudiados y por sí mismos son capaces de estimular la proliferación de linfocitos T y B e inducir una respuesta tipo Th1 en modelos animales (27, 44, 49, 58, 60, 91, 93). Por esta razón, fueron considerados para el desarrollo de vacunas contra la tuberculosis. El potencial inmunológico de dichos antígenos ha conducido a la generación de vacunas recombinantes basadas en BCG para sobre-expresarlos. Algunos trabajos que adoptaron esta línea mostraron que la eficacia protectora contra *M. tuberculosis* fue superior a la conferida con BCG, al recombinarse tanto con el Ag85B como con el antígeno PstS-1 (19, 55, 88).

De acuerdo a estos antecedentes, se construyeron dos cepas de *M. microti* que sobre-expresan los antígenos PstS-1 y Ag85B.

Antes de recombinar a *M. microti* se determinó la presencia de ambos genes y se encontró una identidad del 99.9% para el gen de la proteína PstS-1 y del 100% para Ag85B con respecto a los de *M. tuberculosis*. Por lo tanto, ambos genes son homólogos.



También, se indagó la presencia de los productos de ambos genes por inmunoblot con anticuerpos específicos contra estos antígenos, para saber si se expresaban y además para conocer los niveles basales de expresión de las proteínas. Se encontró que efectivamente *M. microti* expresa los genes que codifican para estas proteínas.

En el inmunoblot que se realizó para detectar Ag85B en *M. microti*, se observó un triplete tanto extracto celular como filtrado de cultivo, lo cual pudiera deberse a que el anticuerpo utilizado detecta al complejo 85, no sólo a 85B y tal vez el tamaño de 85A ó 85C en *M. microti* es mayor al reportado para *M. tuberculosis*.

En el inmunoblot del extracto celular se identificó a PstS-1 en un menor tamaño (~32 kDa) en comparación con la masa molecular esperada (38 kDa) y que ya ha sido reportada (102, 2). Esta proteína tiene modificaciones post-traduccionales como glicosilación y lipoilación. Por lo que probablemente aún no se llevaban a cabo estos procesos de modificación post-traduccionales en la proteína detectada. La lipoilación y glicosilación contribuyen en la masa molecular de esta proteína (39). Incluso, ya se ha reportado que la glicosilación de proteínas en *M. tuberculosis* puede ser un mecanismo por medio del cual se regule la exportación de este tipo de proteínas (54). Herrmann y cols., realizaron sustituciones de treonina por valina en la región amino terminal de la lipoproteína madura de 19 kDa de *M. tuberculosis*, lo que resultó en una disminución en la glicosilación (de 1 a 2 kDa) y masa molecular (de 5 a 6 kDa), comparada con la proteína nativa. Un análisis posterior mostró que la proteína tenía menor masa molecular como consecuencia de proteólisis, quizás debida a la falta de glicosilación. Por lo que postulan que los de sitios glicosilación también son susceptibles a proteólisis, y que además esto puede resultar en un mecanismo de regulación para la exportación de proteínas.

Al realizar un análisis de la secuencia de aminoácidos de la proteína PstS-1 se encontró un motivo "potencial" de treonina (residuos de aminoácidos 57, 58 y 59) que tal vez no fue glicosilado o este sustituido por otro aminoácido, por lo que tal vez fuese

susceptible a proteólisis. Los fragmentos proteicos teóricos resultantes tendrían una masa molecular aproximada de 6 kDa y 32 kDa. El fragmento de 6 kDa no fue detectado en inmunoblot debido a su tamaño.

Por otro lado, se encontró que *M. microti* al ser recombinada con los plásmidos extracromosomales pMV261-Rv0934 y pMV261-Rv1886c, incrementa la producción de los antígenos PstS-1 y Ag85B, con una producción mayor de Ag85B en el filtrado de cultivo (aproximadamente dos veces mayor al basal) en comparación con el extracto celular. Para PstS-1 la expresión de la proteína fue mayor en el extracto celular, comparado con *M. microti* sin recombinar y recombinada con el vector. Por inmunoblot no se observó su presencia en el filtrado de cultivo, sin embargo, por el ensayo de inhibición por competencia por ELISA se detectó que *M. microti* pMV261-Rv0934 expresa cuatro y dos veces más, la concentración de PstS-1 en comparación con *M. microti*, en extracto celular y filtrado de cultivo, respectivamente.

*M. microti* sólo se recombinó con el vector integrativo pYUB412, no se logró la transformación con las construcciones pYUB412-Rv0934 y pYUB412-Rv1886c, aún con diferentes condiciones para el ADN utilizado en la transformación, las cuales se ha reportado que incrementan significativamente la recombinación sitio específico (8, 83, 84). La posibilidad de deficiencias en la preparación de las células competentes se descarta, ya que en cada ensayo se empleó el plásmido extracromosomal pMV261 como control y en todos los casos se obtuvieron colonias transformadas. Ya se ha descrito anteriormente que los plásmidos integrativos muestran una buena eficiencia de transformación en ciertas cepas de micobacterias, especialmente en las de rápido crecimiento, pero en otras ésta es muy baja. Lee y cols., encontraron que el plásmido integrativo pMH5 (basado en el micobacteriófago L5) transforma eficientemente las cepas de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 y *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>6 pero no BCG Pasteur. Un análisis de las transformantes obtenidas les sugirió que el plásmido había sido integrado y que a eso se debía el crecimiento en el medio de selección pero que a su vez había perdido fragmentos ADN, las cuales comprobaron por

hibridaciones, aún se desconoce el mecanismo de cómo ocurre (66). También Pavelka reportó una muy baja eficiencia de transformación al utilizar el plásmido pYUB412 (85). Si bien, la eficiencia de transformación con éste plásmido, en cepas de micobacterias de lento crecimiento es muy baja, se sigue utilizando ya que su integración es muy estable. De acuerdo a lo observado, es posible que *M. microti* sea una cepa en la cual el plásmido pYUB412 tiene una baja eficiencia de recombinación.

De acuerdo con los resultados obtenidos *M. microti* recombinada con el Ag85B representa un buen candidato a evaluar como vacuna, ya que se observó que secreta la proteína en mayor cantidad que la cepa silvestre. Esto en base a las observaciones que se han hecho y que indican que muy probablemente, las proteínas que son liberadas en abundancia pueden ser las que induzcan una respuesta inmune protectora, debido a la frecuencia y rapidez con la que pueden ser procesadas y presentadas sobre la superficie de la célula hospedera a través de moléculas MHC (62, 63, 94).

En el caso de *M. microti* recombinada con PstS-1, si bien se observó que no libera la proteína al medio de cultivo en mayor cantidad, en comparación con la cepa silvestre, sí hay una mayor producción de la proteína en el extracto celular. Esta proteína puede estar disponible a través del procesamiento que llevan a cabo las células presentadoras de antígeno profesionales. En las cuales, la maduración del fagosoma conduce a la lisis del microorganismo y posterior presentación de antígenos a través de moléculas MHC. (62, 63, 94).

## 9. Conclusiones.

1. Existen genes homólogos a Rv0934 y Rv1886c en *M. microti*.
2. La presencia de las proteínas PstS-1 y Ag85B se detectó en *M. microti*.
3. La construcción de los plásmidos con los genes Rv0934 y Rv1886c de *M. tuberculosis* H37Rv fue exitosa.
4. Se obtuvieron dos cepas recombinantes de *M. microti* que sobreexpresan los antígenos PstS-1 y Ag85B.

## 10. Bibliografía

1. **Agger EM, Andersen P.** A novel TB vaccine; towards a strategy based on our understanding of BCG failure. *Rev Vaccine* 2002;21:7-14.
2. **Andersen AB, Hansen EB.** Structure and mapping of antigenic domains of protein antigen b, a 38,000 molecular weight protein of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 1989;57:2481-2488.
3. **Andersen P, Doherty TM.** The success and failure of BCG-implications for a novel tuberculosis vaccine. *Nature Rev* 2005;3:656-662.
4. **Andersen P.** TB vaccines: progress and problems. *TRENDS Immunol* 2001;22:160-168.
5. **Andersen P.** Tuberculosis vaccines an update. *Nature Rev Microbiol* 2007;5:484-487.
6. **Anderson DH, Hart G, Horwitz MA, Eisenberg D.** An interfacial mechanism and a class of inhibitors inferred from two crystal structures of the *Mycobacterium tuberculosis* 30 kDa major secretory protein (Antigen 85B), a mycolil transferase. *J Mol Biol* 2001;307:671-681.
7. **Báez-Saldaña AR.** Epidemiología de la tuberculosis en México. *Salud pública de México* 2003;43:3-6.
8. **Balasubramanian V, Pavelka MS, Bardarov SS, Mertin J, Weisbrod TR, McAdam RA, Bloom BR, Jacobs WR.** Allelic Exchange in *Mycobacterium tuberculosis* with long linear recombination substrates. *J Bacteriol* 1996;178:273-279.
9. **Behr MA, PM Small.** A historical and molecular phylogeny of BCG strains. *Vaccine* 1999;17:915-922.
10. **Behr MA, Small PM.** Has BCG attenuated to impotence? *Nature* 1997;389:133-134.
11. **Behr MA, Wilson MA, Gill WP, Salamon H, Schoolnik GK, Rane S, Small PM.** Comparative Genomics of BCG Vaccines by Whole-Genome DNA Microarray. *Science* 1999;284:1520-1523.
12. **Behr MA.** BCG-different strains, different vaccines? *Lancet* 2002;2:86-92.
13. **Brandt L, Cunha JF, Olsen AW, Chilima B, Hirsch P, Appelberg R, Andersen P.** Failure of the *Mycobacterium bovis* BCG Vaccine: Some Species of Environmental

- Mycobacteria Block Multiplication of BCG and Induction of Protective Immunity to Tuberculosis. *Infect Immun* 2002;70:672-678.
14. **Brewer TF.** Preventing tuberculosis with *Bacillus Calmette-Guérin* vaccine: a meta-analysis of the Literature. *CID* 2000;31:S64-S67.
  15. **Brodin P, Karin Eiglmeier, Magali Marmiesse, A Billault, T Garnier, s Niemann, ST Cole, R Brosch.** Bacterial Artificial Chromosome-Based Comparative Genomic Analysis Identifies *Mycobacterium microti* as a Natural ESAT-6 Deletion Mutant. *Infect Immun* 2002;70:5568-5578.
  16. **Brodin P, Majlessi L, Brosch R, Smith D, Bancroft G, Clark S, Williams A, Leclerc C, Cole ST.** Enhanced Protection against Tuberculosis by Vaccination with Recombinant *Mycobacterium microti* Vaccine That Induces T Cell Immunity against Region of Difference 1 Antigens. *JID* 2004;190:115-122.
  17. **Brodin P, Majlessi L, Marsollier L, de Jonge MI, Bottai D, Demangel C, Hinds J, Neyrolles O, Butcher PD, Lclerc C, Cole ST, Brosch R.** Dissection of ESAT-6 system 1 of *Mycobacterium tuberculosis* and impact on Immunogenicity and virulence. *Infect Immun* 2006;74:88-98.
  18. **Brosch R, SV Gordon, M Marmiesse, P Brodin, C Buchrieser, K Eiglmeier, T Garmier, C Gutierrez, G Hewinson, K Kremer, LM Parsons, AS Pym, S Samper, D van Soolingen, ST Cole.** A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *PNAS USA* 2002;99:3684-3689.
  19. **Castañón-Arreola Mauricio, López-Vidal Yolanda, Espitia-Pinzón Clara.** A new vaccine against tuberculosis shows greater protection in a mouse model with progressive pulmonary tuberculosis. *Tuberculosis* 2005;85:115-126.
  20. **Castañón-Arreola Mauricio, Yolanda López-Vidal.** A second-generation anti TB vaccine is long overdue. *Rev Ann Clin Microb* 2004;3(1):10.
  21. **Cavanagh R, M Begon, M Bennett, T Ergon, IM Graham, PEW de Haas, CA Hart, M Koedman, K Kremer, X Lambin, P Roholl, D van Soolingen.** *Mycobacterium microti* Infection (Vole Tuberculosis) in Wild Rodent Populations. *J Clin Microbiol* 2002;40:3281-3285.
-

22. **Chambers MA, Williams A, Gavier-Wide D, Whelan A, Hall G, Marsh PD, Bloom BR, Jacobs WR, Hewinson RG.** Identification of a *Mycobacterium bovis* BCG auxotrophic mutant that protects guinea pigs against *M. bovis* and hematogenous spread of *Mycobacterium tuberculosis* without sensitization to tuberculin. *Infect Immun* 2000;68:7094-7099.
23. **Chang Z, Choundhary A, Lathigra R, Quioco FA.** The immunodominant 38-kDa lipoprotein antigen of *Mycobacterium tuberculosis* is a phosphate-binding protein. *J Biological Chem* 1994;269:1956-1958.
24. **Colditz GA, Brewer TF, Berkey CS, Wilson ME, Burdick E, Fineberg HV, Mosteller F.** Efficacy of BCG vaccine in the prevention of tuberculosis. *JAMA* 1994;271:698-702.
25. **Curtis JL.** Cell-mediated adaptive immune defense of the lungs. *Proc Am Thorac Soc* 2005;2:412-416.
26. **D'Arcy HP, I Sutherland.** BCG and vole bacillus vaccines in the prevention of tuberculosis in adolescence and early adult life. *Brit Med J* 1977;2:293-295.
27. **D'Souza S, Rosseels V, Romano M, Tanghe A, Denis O, Jurion F, Castiglione N, Vanockelen A, Palfleit K, Huygen K.** Mapping of murine Th1 helper T-cell epitopes of mycolil tranferases Ag85A, Ag85B and Ag85C from *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 2003;71:483-493.
28. **Daffé Mamadou.** The mycobacterial antigens 85 complex-from structure to function and beyond. *TRENDS Microbiol* 2000;8:438-440.
29. **Daniel VS, Daniel TM.** Old Testament Biblical References to Tuberculosis. *CID* 1999;29:1557-1558.
30. **Dannenberg MA, Bishai WR, Parrish N, Ruiz R, Johson W, Zook BC, Boles JW, Pitt LM.** Efficaces of BCG and vole bacillus (*Mycobacterium microti*) vaccines in preventing clinically apparent pulmonary tuberculosis in rabbits: a preliminary report. *Vaccine* 2001;19:796-800.
31. **De Jonge MI, Brosch R, Brodin P, Demangel D, Cole ST.** Tuberculosis: from genome to vaccine. *Expert Rev Vaccines* 2005;4:541-551.

32. **De la Parte-Pérez M, MP Hurtado, M Rivera.** Tuberculosis en el nuevo milenio. *Revista de La Facultad de Medicina* 2001;24:104-119.
33. **De Mendonc L, Picardeau M, Raynaud C, Rauzier J, De la Salmonie're YOG, Barker L, Bigi F, Cataldi A, Gicquel B, Reyrat JM.** Erp, an extracellular protein family specific to mycobacteria. *Microbiol* 2001;147:2315-2320.
34. **Devi KR, Kumar KS, Ramalingam B, Alamelú R.** Purification and Characterization of Three Immunodominant Proteins (38, 30, and 16 kDa) of *Mycobacterium tuberculosis*. *Protein Expression and Purification* 2002;24:188-195.
35. **Doherty TM.** New vaccines against tuberculosis. *Trop Med Int Health* 2004;9:818-826.
36. **Doherty TM.** Real world TB vaccines: clinical trials in TB-endemic regions. *Vaccine* 2005;23:2109-2114.
37. **Dominic O, Hogan LH, Kim S, Sandor M.** Mycobacterial granulomas: keys to a long-lasting host-pathogen relationship. *Clin Immunol* 2004;113:130-136.
38. **Espitia C, Elinos M, Hernández-Pando R, Mancilla R.** Phosphate starvation enhances expression of the immunodominant 38-kildalton protein antigen of *Mycobacterium tuberculosis*: demonstration by immunogold electron microscopy. *Infect Immun* 1992;60:2998-3001.
39. **Espitia C, Mancilla R.** Identification, isolation and partial characterization of *Mycobacterium tuberculosis* glycoproteins antigens. *Clin Exp Immunol* 1989;77:378-383.
40. **Espitia C, Sciutto E, Bottasso O, González-Amaro R, Hernández-Pando R, Mancilla R.** High antibody levels to the mycobacterial fibronectin-binding antigen of 30-31 kD in tuberculosis and lepromatous leprosy. *Clin Exp Immunol* 1992;87:362-367.
41. **Fine PEM, LC Rodríguez.** Modern Vaccines. Mycobacterial diseases. *Lancet* 1990;335:1016-1020.
42. **Flynn JL, Joel D Ernst.** Immune responses in tuberculosis. *Cur Opin Immunol* 2000;12:432-436.
43. **Flynn JL, John Chan.** Immunology of tuberculosis. *Annu Rev Immunol* 2001;19:93-129.



44. **Fonseca DPAJ, Benaissa-Trouw B, Engelen MV, Kraaijeveld CA, Snippe H, Verheul AFM.** Induction of cell-mediated immunity against *Mycobacterium tuberculosis* using DNA vaccines encoding cytotoxic and helper T-cell epitopes of the 38-kilodalton protein. *Infect Immun* 2001;69:4839-4845.
45. **Fratti RA, Backer JM, Gruenberg J, Corvera S, Deretic V.** Role of phosphatidylinositol 3-kinase and Rab5 effectors in phagosomal biogenesis and mycobacterial phagosome maturation arrest. *J Cell Biol* 2001;154:631-644.
46. **Frota CC, DM Hunt, RS Buxton, L Rickman, J Hinds, K Kremer, D Soolingen, MJ Colston.** Genome structure in the vole bacillus, *Mycobacterium microti*, a member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex with a low virulence for humans. *Microbiol* 2004;150:1519-1527.
47. **Garcia-Pelayo MC, Caimi KC, Inwald JK.** Microarray analysis of *Mycobacterium microti* reveals deletion of genes encoding PE-PPE proteins and ESAT-6 family antigens. *Tuberculosis* 2004;84:159-66.
48. **García-Sancho, Figueroa María CE.** Respuesta inmune a la infección por *Mycobacterium tuberculosis*. Una revisión de la literatura. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias* 2001;14:114-128.
49. **Geluk A, van Meijgaarden KE, FrankenKLMC, Drijfhout JW, D'Souza S, Necker A, Huygen K, Ottenhoff THM.** Identification of major epitopes of *Mycobacterium tuberculosis* Ag85B that are recognized by HLA-A\*0201-restricted CD8+ T cells in HLA-transgenic mice and humans. *J Immunol* 2000;165:6463-6471.
50. **Grange JM, Zumla A.** The global emergency of tuberculosis: what is the cause? *J R Soc Health* 2002;122:78-81.
51. **Hart PD.** Efficacy and applicability of massive BCG vaccination in tuberculosis control. *Brit Med J* 1967;1:587-592.
52. **Harth G, BY Lee, J Wang, DL Clemens, MA Hortwitz.** Novel Insights into the Genetics, Biochemistry, and Immunocytochemistry of the 30-Kilodalton Major Extracellular Protein of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 1996;64:3038-3047.

53. **Hawgood BJ.** Doctor Albert Calmette: founder of antivenomous serotherapy and of antituberculous BCG vaccination, *Rev Toxicol* 1999;37:1241-1258.
54. **Herrmann JL, O'Gaora P, Gallagher A, Thole JER, Young DB.** Bacterial glycoproteins: a link between glysylation and proteolytic cleavage of a 19 kDa antigen from *Mycobacterium tuberculosis*. *EMBO* 1996;15:3547-3554.
55. **Horwitz MA, G Harth, BJ Dillon, Maslesa GS.** Recombinant bacillus Calmette-Guérin (BCG) vaccines expressing the *Mycobacterium tuberculosis* 30kDa major secretory protein induce greater protective immunity against tuberculosis than conventional BCG vaccines in a highly susceptible animal model. *Microbiol* 2000;97:13853-13858.
56. **Horwitz MA, Günter Harth.** A New Vaccine against Tuberculosis Affords Greater Survival after Challenge than the Current Vaccine in the Guinea Pig Model of Pulmonary Tuberculosis. *Infect Immun* 2003;71:1672-1679.
57. **Horwitz MA, Lee BWE, Dillon BJ, Hart G.** Protective immunity against tuberculosis induced by vaccination with major extracellular proteins of *Mycobacterium tuberculosis*. *PNAS USA* 1995;92:1530-1534.
58. **Jung SB, Yang CS, Lee JS, Shin AR, Jung SS, Son JW, Harding CV, Kim HJ, Park JK, Paik TH, Song CH, Jo EK.** The mycobacterial 38-kilodalton glycoprotein antigen activates the mitogen-activated protein kinase pathway and release of proinflammatory cytokines through toll-like receptors 2 and 4 in human monocytes. *Infect Immun* 2006;74:2686-2696.
59. **Kadival GV, Chaparas SD, Hussong D.** Characterization of serologic and cell-mediated reactivity of a 38-kDa antigen isolated from *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* 1987;139:2447-2451.
60. **Kariyone A, Tamura T, Kano H, Iwakura Y, Takeda K, Akira S, Takatsu K.** Immunogenicity of peptide-25 of Ag85B in Th1 development: role of IFN- $\gamma$ . *Int Immunol* 2003;15:1183-1194.
61. **Kaufmann SHE.** Envisioning future strategies for vaccination against tuberculosis. *Nature Rev Immunol* 2006;6:699-704.

62. **Kaufmann SHE.** How can immunology contribute to the control of tuberculosis? *Nature Rev Immunol* 2001; 1:20-30.
63. **Kaufmann SHE.** The contribution of immunology to the rational desing of novel antibacterial vaccines. *Nature Rev Microbiol* 2007;5:491504.
64. **Kremer L, WN Maughan, LG Dover, GS Besra.** The *M. tuberculosis* antigen 85 complex and mycolyltransferase activity. *Lett Appl Microbiol* 2002;34:233–237.
65. **Larracilla CJ.** Evaluación del potencial de *Mycobacterium microti* como vacuna contra la tuberculosis. Tesis para obtener el Título de Química Farmacéutica-Bióloga. Facultad de Medicina, UNAM. 24 de mayo del 2006.
66. **Lee MH, Pascopella, Jacobs WR, Hatfull GF.** Site-specific of mycobacteriophage L5: Integration-proficient vectors for *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium tuberculosis*, and bacille Calmette-Guérin. *PNAS USA* 1991;88:3111-3115.
67. **Manabe YC, CP Scott, WR Bishai.** Naturally Attenuated, Oraly Administered *Mycobacterium microti* as a Tuberculosis Vaccine Is Better than Subcutaneous *Mycobacterium bovis* BCG. *Infect Immun* 2002;70:1556-1570.
68. **Marmiesse M, Brodin P, Buchrieser C, Gutierrez C, Simoes M, Vincent V, Glaser P, Cole ST, Brosch R.** Macro-array and bioinformatic analyses reveal mycobacterial “core” genes, variation in the ESAT-6 gene family and new phylogenetic markers for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Microbiol* 2004;150:483–496.
69. **Mostowy S, Behr MA.** The origin and evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Chest Med* 2005;26:207-216.
70. **Mostowy S, Imwald J, Gordon S, Martin Carlos, Warren R, Kremer K, Cousins D, Behr MA.** Revisiting the Evolution of *Mycobacterium bovis*. *J Bacteriol* 2005;187:6386-6395.
71. **Naito M, OharaN, Matsumoto S, Yamada T.** The novel fibronectin-binding motif and key residues of mycobacteria. *J Biol Chem* 1998;273:2905-2909.
72. **Neeraj D, Rao V, Tyagi AK.** Recombinant BCG approach for development of vaccines: cloning and expression of immunodominant antigens of *M. tuberculosis*. *FEMS Microbiol Letts* 2000;190:309-316.

73. **Neeraj D, Rao V, Tyagi AK.** Skewing of the Th1/Th2 responses in mice due to variation in the level of expression of an antigen in a recombinant BCG system. *Immunol Letters* 2003;88:175-184.
  74. **Niemann S, Elvira Richter, Helga Dalügge-Tamm, H Schlesinger, D Graupner, B Königstein, G Gurath, U Greinert, SR Gerdes.** Two Cases of *Mycobacterium microti*-Derived Tuberculosis in HIV-Negative Immunocompetent patients. *Emerg Infect Dis* 2000;6:539-542.
  75. **North RJ, Yu-Jin Jung.** Immunity to Tuberculosis. *Annu Rev Immunol* 2004;22:599-623.
  76. **Oettinger T, Jorgensen M, Ladefoged A, Haslov K, Andersen P.** Development of the *Mycobacterium bovis* BCG vaccine: review of the historical and biochemical evidence for a genealogical tree. *Tubercule and Lung Disease* 1999;79:243-250.
  77. **Ohara Naoya, Takeshi Yamada.** Recombinant BCG vaccines. *Rev Vaccine* 2001;19:4089-4098.
  78. **Olsen AW, Williams A, Okkels LM, Hatch G, Andersen P.** Protective effect of a tuberculosis subunit vaccine based on a fusion of antigen 85B and ESAT-6 in the aerosol guinea pig model. *Infect Immun* 2004;72:6148-6150.
  79. **Orme I.** Adaptive immunity to mycobacteria. *Curr Opin Microbiol* 2004;7:58-61.
  80. **Orme IM, McMurray DN, Belisle JT.** Tuberculosis vaccine development: recent progress. *TRENDS Immunol* 2001;9:115-118.
  81. **Orme IM.** Current progress in tuberculosis vaccine development. *Vaccine* 2005;23:2105-2108.
  82. **Pacheco CR, VV Rinza, N Badillo.** Vacuna del Bacilo de Calmette y Guérin (BCG). *Vacunas, Ciencia y Salud*. 1998. pág. 187-201.
  83. **Parish T, Gordhan BG, McAdam RA, Duncan K, Mizrahi V, Stoker NG.** Production of mutants in aminoacid biosynthesis genes of *Mycobacterium tuberculosis* by homologous recombination. *Microbiol* 1999;145:3497-3503.
  84. **Pashley CA, Parish T.** Efficient switching of mycobacteriophage L5-based integrating plasmids in *Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS Microbiol Letts* 2003;229:211-215.
-

85. **Pavelka MS, Jacobs WR.** Comparison or the construction of unmarked deletion mutations in *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guérin, and *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv by allelic exchange. *J Bacteriol* 1999;181:4780-4789.
86. **Pym AS, P Brodin, R Brosch M Huerre, ST Cole.** Loss of RD1 contributed to the attenuation of the live tuberculosis vaccines *Mycobacterium bovis* BCG and *Mycobacterium microti*. *Mol Microbiol* 2002;46:709-717.
87. **Raja Alamelu.** Immunology of tuberculosis, Review Article. *Indian J Med Res* 2004;120:213-232.
88. **Rao V, N Dhar, AK Tyagi.** Modulation of Host Immune Responses by Overexpression of Immunodominant Antigens of *Mycobacterium tuberculosis* in Bacille Calmette-Guérin. *Scan J Immunol* 2003;58:449-461.
89. **Raviglione MC.** The TB epidemic from 1992 to 2002. *Tuberculosis* 2003;83:4-14.
90. **Riley LW.** Of mice, men, and elephants: *Mycobacterium tuberculosis* cell envelope lipids and pathogenesis. *J Clin Inv* 2006;116:1475-1478.
91. **Rodríguez A, Troye-Blomberg M, Lindroth K, Ivanyi J, Singh M, Fernández C.** B and T responses to the mycobacterium surface antigen PstS-1 in the respiratory tract and adjacent tissues role of adjuvants and routes of immunization. *Vaccine* 2003;21:458-467.
92. **Salgame P.** Host innate and Th1 responses and the bacterial factors that control *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Curr Opin Immunol* 2005;17:374-380.
93. **Shams H, Barnes PF, Weis SE, Klucar P, Wizel B.** Human CD8+ T-cells recognize epitopes of the 28-kDa hemolysin and the 38-kDa antigen of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Leukocyte Biology* 2003;74:1008-1014.
94. **Skeyky YAW, Sadoff JC.** Advances in tuberculosis vaccine strategies. *Nature Rev Microbiol* 2006;4:469-476.
95. **Stover CK, VF de la Cruz, TR Fuerst, JE Burlein, LA Benson, LT Bennett, GP Bansal, JF Young, MH Lee, GF Hatfull, SB Snapper, RG Barletta, WR Jacobs, BR Bloom.** New use of BCG for recombinant vaccines. *Nature* 1991;351:456-460.

96. **Torres A, Juárez MD, Cervantes R, Espitia C.** Molecular analysis of *Mycobacterium tuberculosis* phosphate specific transport system in *Mycobacterium smegmatis*. Characterization of recombinant 38 kDa (PstsS-1). *Microbial Pathogenesis* 2001;30:289-297.
97. **Trunz BB, Fine PEM, Dye C.** Effect of BCG vaccination on childhood tuberculous meningitis and miliary tuberculosis worldwide: a meta-analysis and assesment of cost-effectiveness. *Lancet* 2006;367:1173- 1180.
98. **Vyas NK, Vyas MN, Quioco FA.** Crystal structure of *M. tuberculosis* ABC phosphate transport receptor: specificty and charge compensation dominated by ion-dipole interactions. *Structure* 2003;11:765-774.
99. **Wells AQ, JAH Wylie, D Phil.** Vaccination against tuberculosis with the vole bacillus. *Brit Med Bull* 1954;10:96-100.
100. **Wiker HG, Harboe M.** The antigen 85 complex: a major secretion product of *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiol Rev* 1992;56:648-661.
101. **Wolfgang K, MP Willett, DB Amos.** *Microbiología de Zinsser*. 20<sup>a</sup> edición. Editorial Médica Panamericana. Argentina, 1994. Pág. 684-703.
102. **Young D, Kent L, Rees A, Lamb J, Ivanyi J.** Immunological activity of 38-kilodalton protein purified from *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 1986;54:177-183.
103. **Zink AR, Grabner W, Nerlich AG.** Molecular Identification of Human Tuberculosis in Recent and Historic Bone Tissue Samples: The Role of Molecular Techniques for the Study of Historic Tuberculosis. *Am J Phis Anthropol* 2005;126:32-47.